

METODE ODVAJANJA

Odvajanje radnog materijala predstavlja jednu od osnovnih i najčešće primenjivanih tehnika u hemijskim laboratorijama.

Fizičke i hemijske osobine supstanci na kojima se zasnivaju analitička određivanja obično nisu specifične, tako da pojedina analitička određivanja ometaju ili onemogućuju druge prisutne supstance.

Svi prirodni i veštački proizvodi koji podležu hemijskim ispitivanjima praktično predstavljaju manje ili više složene smeše.

Poteškoće prilikom određivanja pojedinih komponenti smeše se mogu ponekad prevazići jednostavnim postupcima maskiranja i demaskiranja, ali u većini slučajeva to nije moguće, pa se pre određivanja supstance moraju odvajati.

Dve supstance možemo međusobno odvojiti ako se razlikuju po svojim osobinama, kao što su veličina molekula, gustina, napon para, rastvorljivost, naelektrisanja i sl.

Metode odvajanja koje se zasnivaju na ovim osobinama veoma su raznovrsne i njihova potpuno zadovoljavajuća podela ne postoji.

Osnovi većine metoda leže u dva procesa:

Građenje dvofaznog sistema, tako da jedna faza sadrži supstancu koja se određuje, a druga supstancu koja ometa određivanje.

Mehaničko odvajanje dve faze

Građenje dvofaznog sistema i mehaničko odvajanje faza mogu se ostvariti na više načina.

Dvofazni sistem se nekada može ostvariti dodavanjem odgovarajućeg taložnog reagensa rastvoru uzorka i prevođenjem u čvrstu fazu komponente koja se određuje ili komponente koja smeta, a čvrsta i tečna faza se mogu odvojiti filtriranjem.

Dvofazni sistemi se nekada mogu graditi zagrevanjem uzorka i prevođenjem u gasnu fazu komponente koja se određuje ili komponente koja smeta, a odvajanje tečne i gasne faze se može izvesti na destilacionoj koloni ili jednostavnim isparavanjem.

Dvofazni sistem se nekad može dobiti dovođenjem analiziranog rastvora u kontakt sa drugim tečnim rastvaračem koji se ne meša sa prvim rastvaračem i u koji prelazi, određivana komponenta ili komponenta koja smeta, a dve tečne faze se mogu odvojiti u levku za odvajanje.

Odvajane supstanci kod ovih metoda se zasniva na nejednakoj raspodeli supstance između dve faze.

Procesi raspodele su ravnotežni procesi, odvajanje nikada nije potpuno.

Uvek će u obe faze zaostajati izvesna količina željene i neželjene supstance, a njihova količina će biti određena njihovim ravnotežnim koncentracijama u svakoj fazi.

Da bi se efikasnost odvajanja povećala, često je proces odvajanja potrebno ponoviti više puta.

Kod nekih metoda odvajanja koriste se razlike u kinetičkim osobinama čestica supstanci kao što su: brzina u električnom, gravitacionom ili termičkom polju.

Postoji više načina klasifikacije metoda odvajanja:

-odvajanja po tipovima faza,

-odvajanja po tipu procesa i

-odvajanja po tipu sile koja prouzrokuje odvajanje.

Klasifikacija metoda odvajanja po tipovima faza

Faza koja sadrži uzorak ili je sama uzorak	D r u g a f a z a		
	Gas(para)	Tečnost	Čvrsta
Gas	Termička difuzija	Gasno-tečna hromatografija	Gasno-čvrsta hromatografija
Tečnost	Destilacija	Tečna hromatografija Ekstrakcija Dijaliza Ultrafiltracija	Tečno-čvrsta hromatografija Taloženje Elektrolitičko izdvajanje Obrazovanje okludovanih jed. Elektroforeza Metoda prstenaste peći
Čvrsta	Sublimacija		

Moguća je klasifikacija metoda po načinu kako faze dolaze u kontakt: kontinualni i stupnjeviti (diskontinualni) kontakt.

Od svih tehnika ekstrakcija pruža najveću fleksibilnost u ovom pogledu dok su ostale tehnike ograničene na jednu ili drugu metodu, hromatografija se po definiciji može primeniti samo kontinualno.

Postoji podela po pravcu protoka faza: proticanje kroz jednu fazu (u istom smeru) i proticanje u suprotnom smeru.

Kod proticanja kroz jednu fazu, faza u kojoj se nalazi uzorak smatra se stacionarnom.

Ona se dovodi u dodir sa drugom fazom sukcesivnim dodavanjem novih porcija za koje se može reći da prolaze "kroz" stacionarnu fazu.

Primer za ovu vrstu procesa je ekstrakcija, kod koje se jedna faza dovodi u vezu sa nekoliko zapremina faze kojom se vrši ekstrakcija, a koje se posle skupljaju u jedan jedini ekstrakt.

Kao drugi primer se može navesti obična destilacija.

Kod procesa protivstrujnog (suprotnog) proticanja dve faze se kreću u suprotnim pravcima u odnosu jedna na drugu.

U najvećem broju slučajeva jedna od faza je stacionarna dok se druga kreće, pa je to praktično pseudostacionarno proticanje.

Ovaj proces se razlikuje od prethodnog po tome što se sukcesivno dodaju porcije obe faze.

Tako se u stupnjevitom procesu svaka frakcija faze 1 dovodi u dodir sa svežom frakcijom faze 2, i svaka frakcija faze 2 dovodi u dodir sa svežom frakcijom faze 1.

Tehnike koje se izvode na ovaj način su: ekstrakcija, hromatografija, elektroforeza, diferencijalna dijaliza i frakciona destilacija.

Ovaj proces je od primarnog značaja u analitičkoj hemiji.

Klasifikacija metoda odvajanja po tipu procesa

Mehaničke	Fizičke	Hemijske
Dijaliza	Gasno-tečna hrom.	Taloženje
Hromatografija isključivanjem	Gasno-čvrsta hrom. Ekstrakcija	Elektrolitičko izdvajanje Maskiranje
Obrazovanje inkludovanog jedinjenja	Elektroforeza	
Filtriranje i ultrafiltriranje	Frakciona destilacija	
Centrifugiranje	Sublimacija Kristalizacija	

Težnja za uspostavljanje ravnoteže može se smatrati silom usled koje dolazi do odvajanja. Drugi tip sile je kinetičke prirode, jer od brzine putovanja rastvarača zavisi i odvajanje.

Klasifikacija nekih metoda odvajanja po tipu sile koja prouzrokuje odvajanje

Ravnoteža	Kinetika
Hromatografija	Dijaliza
Destilacija	Elektroforeza
Ekstrakcija	Termička difuzija
Sublimacija	Centrifugiranja i ultra-centrifugiranja
Taloženje	Ultrafiltriranje

Faktor iskorišćenja i faktor odvajanja

Postupkom odvajanja određivana supstanca treba da se dobije u što većem iskorišćenju i u što većem stepenu čistoće.

Faktor odvajanja za neku supstancu definisan je kao udeo od ukupne količine supstance dobijen odvajanjem

$$R(A) = \frac{n(A)}{n_0(A)}$$

$R(A)$ - faktor iskorišćenja

$n(A)$ - količina supstance A dobijene odvajanjem

$n_0(A)$ - ukupna (početna) količina supstance A u analiziranom rastvoru

Kod visoko efikasnog odvajanja faktor iskorišćenja za određivanu supstancu treba da je što bliži jedinici (100%), dok za supstancu od koje se odvajanje izvodi faktor treba da ima što nižu vrednost.

Faktor odvajanja željene komponente A , od od neželjne komponente B je (Sandell) veličina koja pokazuje koliko se puta izmenio odnos količina neželjene i željene komponente posle odvajanja prema odnosu njihovih količina u uzorku pre odvajanja.

$$S_{B/A} = \frac{n(B)/n(A)}{n_0(B)/n_0(A)} = \frac{R(B)}{R(A)}$$

Faktor odvajanja (faktor koncentrovanja) treba da ima što nižu vrednost.

Najpoželjnije su one metode kod kojih je ravnoteža raspodele supstance između dve faze selektivna i dovoljno kvantitativna tako da se odvajanje može izvesti u jednom jedinom stepenu.

Ovo se dešava u slučaju kada su faktori odvajanja $R(A)$ i $R(B)$ veoma povoljni odnosno kad $R(A) \rightarrow 1$, a $R(B) \rightarrow 0$.

Ukoliko jedan od dva faktora nije povoljan, odvajanje će biti moguće samo ako se jedan od postupaka odvajanja ponovi više puta.

Ukoliko odvajamo supstancu A od supstance B prevođenjem u neki organski rastvarač (ekstrakcijom), ako je $R(A) < 1$ ali $R(B) \rightarrow 0$ (što znači da se A ne ekstrahuje kvantitativno), dok se B (praktično uopšte ne ekstrahuje) uspešno odvajanje se može postići ponovljenom ekstrakcijom supstance A sa novim količinama organskog rastvarača.

Kada ni $R(A)$ ni $R(B)$ nisu povoljni, $R(A) < 1$ a $R(B) > 0$, postupak odvajanja postaje veoma kompleksan.

Odvajanje se može postići mnogobrojnim ili kontinualnim ponavljanjem procesa odvajanja putem protivstrujnog pomeranja jedne ili obe faze (postupcima frakcionisanja u hromatografskoj ili destilacionoj koloni)

Odvajanje taloženjem

Odvajanja taloženjem se zasnivaju na razlikama u rastvorljivosti taloga, a uvid u mogućnosti odvajanja i uslove neophodne za odvajanje možemo dobiti na osnovu veličina proizvoda rastvorljivosti.

Odvajanja taloženjem u praksi su znatno lošija i nepotpunija nego što to na osnovu teorijskih razmatranja može izgledati.

Radi povećavanja efikasnosti taloženje je potrebno ponoviti i po nekoliko puta.

Nesavršenost odvajanja kao i dužina analitičkih operacija (filtracija, pranje taloga) razlog su da se razdvajanja taloženjem izbegavaju kad god je to moguće i zamenjuju nekim drugim metodama (npr. ekstrakcijom).

Često se izvode taloženja sa nosačem (kolektorom).

Destilacija i isparavanje

Kod razdvajanja destilacijom koriste se razlike u isparljivosti komponenti, odnosno razlike u njihovim pritiscima para.

Što su razlike u isparljivosti komponenti veće lakše će se izvesti razdvajanje.

Destilacija je jedna od najznačajnijih i najšire primenjivanih procesa u hemijskoj industriji.

U analitičkoj praksi destilacija se koristi uglavnom za razdvajanje jednostavnijih smeša, u preparativne svrhe, za prečišćavanje i dobijanje čistih supstanci uključujući i hemijski čiste vode.

Kod analize višekomponentnih sistema destilacija je danas gotovo potpuno potisnuta hromatografijom.

Za analitička odvajanja destilacija nije dovoljno selektivna, često se grade azeotropne smeše, neke supstance se pri destilaciji termički ragrađuju, destilacija dugo traje i zahteva velike količine uzorka itd.

Isparavanje (volatilizacija) i sublimacija su procesi u principu slični jednostavnoj destilaciji.

Sublimacija predstavlja proces direktnog isparavanja čvrste supstance bez pojave njene tečne faze i može se posmatrati kao destilacija čvrste supstance.

Jedan potpuni proces sublimacije obuhvata sukcesivnu promenu faza čvrsto \rightarrow gasovito \rightarrow čvrsto i primenjuje se uglavnom za prečišćavanje supstanci.

Destilacija

Razmotrićemo destilaciju binarne smeše tečnosti A i B , koje se međusobno potpuno mešaju.

Kako se razdvajanja destilacijom zasnivaju na razlikama u isparljivosti supstanci,

isparljivost i relativna isparljivost su pojmovi koji se u teoriji destilacije često koriste.

Isparljivost je definisana kao odnos parcijalnog pritiska supstance u parnoj fazi i njenog molarnog udela u tečnoj fazi, pa će za komponentu A i B biti:

$$isparljivost_A = \frac{p_A}{(x_A)_l}$$

$$\text{isparljivost}_B = \frac{p_B}{(x_B)_l}$$

gde su: p_A i p_B parcijalni pritisci komponenti A i B u parnoj fazi (gasnoj).

$(x_A)_l$ i $(x_B)_l$ molski udeli komponente A i B u tečnoj fazi.

Relativna isparljivost dveju komponenti jednaka je odnosu njihovih individualnih isparljivosti.

$$\text{relativna isparljivost} = \alpha = \frac{\text{isparljivost}_A}{\text{isparljivost}_B} = \frac{p_A / (x_A)_l}{p_B / (x_B)_l}$$

Izrazimo li parcijalne pritiske komponenti kao proizvod njihovog molskog udela i pritiska para u čistom tečnom stanju (Raultov zakon za idealne rastvore)

$$p_A = (x_A)_l \cdot p_A^o$$

$$p_B = (x_B)_l \cdot p_B^o$$

gde su p_A i p_B pritisci para čistih komponenti A i B u tečnom stanju i to uvrstimo u izraz za relativnu isparljivost, dobijamo:

$$\alpha = \frac{p_A^o}{p_B^o}$$

odakle vidimo da je relativna isparljivost dve komponente jednaka odnosu pritiska para čistih komponenti u parnom stanju.

(Relativna isparljivost ima značenje faktora (koeficijenta) selektivnosti i služi kao jedno od merila efikasnosti razdvajanja, a može se odrediti pomoću tački ključanja (T_A i T_B))

$$\log \alpha = 8,9 \frac{T_B - T_A}{T_A + T_B}$$

Relativna isparljivost se definiše tako da bude veća od jedinice ($\alpha > 1$) pa se brojilac u izvedenoj reakciji uvek odnosi na isparljiviju komponentu, što znači da je u našem slučaju komponenta A više isparljiva od komponente B .

Kako se odnos parcijalnih pritiska komponenti $\frac{p_A}{p_B}$ može zameniti odnosom njihovih

molskih udela u gasnom stanju $\frac{(x_A)_g}{(x_B)_g}$, dobija se drugi izraz za relativnu isparljivost.

$$\alpha = \frac{(x_A)_g / (x_A)_l}{(x_B)_g / (x_B)_l} \text{ odnosno } \frac{(x_A)_g}{(x_B)_g} = \alpha \cdot \frac{(x_A)_l}{(x_B)_l}$$

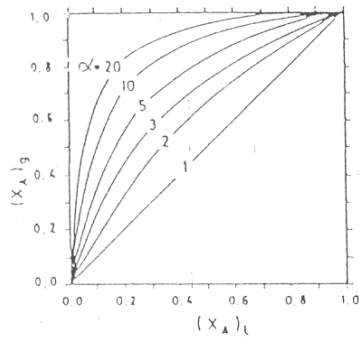
(Primenom Daltonovog zakona $p_A = (x_A)_g p$ biće $\frac{p_A}{p_B} = \frac{(x_A)_g p}{(x_B)_g p} = \frac{(x_A)_g}{(x_B)_g}$ gde je $p = p_A + p_B$

ukupan pritisak iznad tečnosti.)

Pošto je komponenta A isparljivija od komponente B , odnos ($\alpha > 1$), iz jednačine se vidi da će odnos molskih udela isparljivije i manje isparljivije komponente u parnoj fazi uvek biti veći od odnosa u tečnoj fazi, što znači da će parna faza uvek biti obogaćenija isparljivijom komponentom.

Ovo predstavlja osnovni princip odvajanja destilacijom.

Stepen obogaćivanja parne faze isparljivijom komponentom utoliko je veći što je α veće.

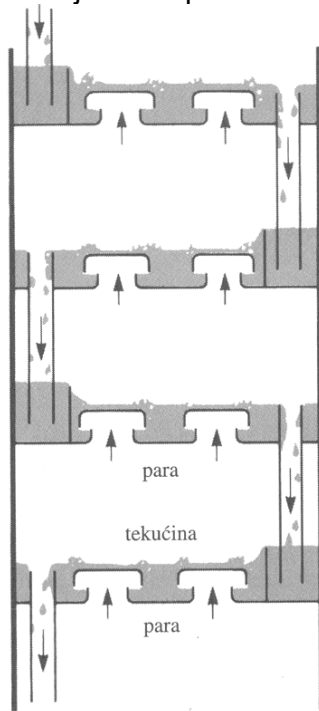


Zavisnost A u gasnoj fazi u zavisnosti od njenog udela u tečnoj fazi za razne vrednosti α koji se može smatrati i kao faktor obogaćenja jer od njegove veličine zavisi koliko će jedno razdvajanje biti lako ili teško izvesti.

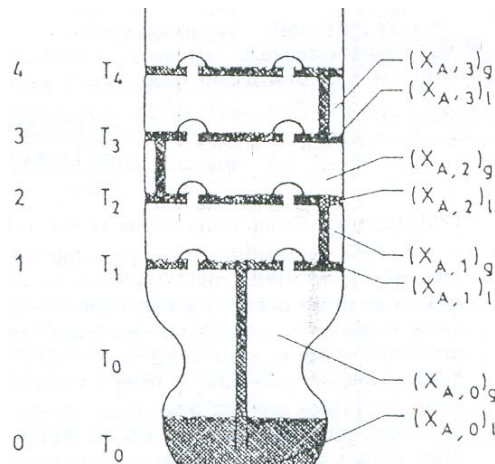
Zagrevamo li prema tome smešu tečnosti A i B na temperaturu ključanja, dobijena parna faza u ravnoteži sa tečnošću biće obogaćena isparljivijom komponentom (a tečna faza manje isparljivom komponentom) utoliko više što je veće α .

Nijedna faza neće biti potpuno čista jer se jednom destilacijom dobija obogaćenje faza, što znači samo parcijalno razdvajanje komponenti, a ne čisti proizvodi.

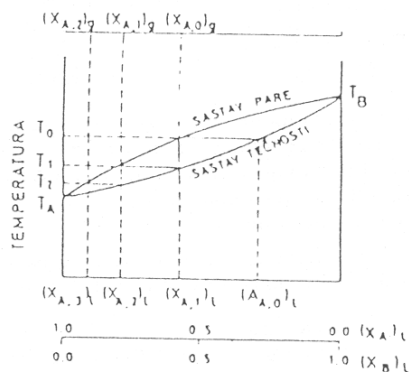
Poboljšanje razdvajanja bi se moglo postići ako bi se parna faza obogaćena isparljivijom komponentom ponovo kondenzovala, a dobijeni destilat ponovo destilovao, a taj proces se ponavljao više puta.



kolona s tavanima



Kolona s tavanima



Zavisnost $(x_A)_l$ i $(x_A)_g$ od T za $\alpha = 3$

$$H = \frac{L}{N} \text{ (HETP-high equivalent to a theoretical plate)}$$

Metode frakcione destilacije nalaze široku primenu kod razdvajanja organskih jedinjenja. Pri razdvajanju neorganskih jedinjenja frakciona destilacija se praktično ne primenjuje, nego se uglavnom koriste jednostavni postupci destilacije i isparavanja.

Jednostavno se može odvojiti voda, silicijum se može odvojiti u obliku SiF_4 , arsen u obliku $AsCl_3$, ili AsH_3 , antimon kao $SbCl_3$, kalaj kao $SnBr_4$ ili SnI_4 , germanijum kao $GeCl_4$, hrom kao CrO_2Cl_2 , živa u elementarnom obliku, bor u obliku metil-borata, osmium i rutenijum u obliku OsO_4 , odnosno RuO_4 , renijum kao Re_2O_7 , itd.

EKSTRAKCIJA

Kada se rastvor neke supstance u jednom rastvaraču dovede u kontakt sa drugim rastvaračem koji se ne meša se prvim, rastvorena supstanca će se zbog različite rastvorljivosti u ova dva rastvarača raspodeliti između njih.

Na ovom principu se zasnivaju metode odvajanja supstanci ekstrakcijom.

U neorganskoj analizi se najčešće koriste ekstrakcije iz vodenih rastvora pomoću organskih rastvarača koji se ne mešaju sa vodom.

Pretpostavimo da jedan vodeni rastvor sadrži supstance A i B i da se mućka sa nekim organskim rastvaračem u kome se supstanca A rastvara bolje nego u vodi, dok je supstanca B u njemu praktično nerastvorna, dovođenjem ovih tečnih faza u međusobni kontakt najveći deo supstance A će preći u organsku fazu (ekstrahovati se), dok će supstanca B ostati u vodi.

Razdvajanjem dveju tečnih faza (levak za odvajanje) razdvajaju se i supstance A i B . Ako je pri tome zapremina organskog rastvarača manja od zapremine vodenog sloja, supstanca će se ekstrahovati i koncentrovati.

Ekstrakcija je vrlo efikasna, brza popularna tehnika razdvajanja (i koncentrovanja) supstanci.

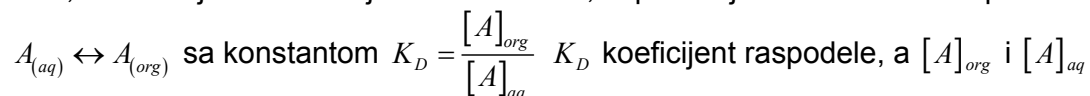
Primenjuje se kako za razdvajanje supstanci prisutnih u vrlo niskim koncentracijama tako i za razdvajanje supstanci prisutnih u makrokoličinama.

Razdvajanja su čista, problemi koekstrakcije nisu jako izraženi, a dobijeni ekstrakt se vrlo često može direktno upotrebiti za određivanje izdvojene komponente.

Koeficijent raspodele i odnos raspodele

Raspodela supstance između dva rastvarača koji se ne mešaju određena je zakonom raspodele.

Posmatramo li supstancu A koja se raspodeljuje između vodene (aq) i organske (org) faze, dovođenjem ovih dveju faza u kontakt, uspostavlja se ravnoteža raspodele



ravnotežne koncentracije supstance A u organskoj, odnosno vodenoj fazi.

Što je koeficijent raspodele veći ekstrakcija je povoljnija.

Opisivanje ekstrakcionih ravnoteža preko koeficijenta raspodele pogodno je u slučajevima kada se rastvorena supstanca rastvara u jednom obliku u obe faze.

Često se, zbog sporednih ravnoteža rastvorena supstanca nalazi u više oblika u jednoj ili u obe faze (molekula, polimera, jona, asocijata itd.), pa bi se u takvom slučaju za karakterizaciju ekstrakcionog procesa trebalo koristiti više koeficijenata raspodele, od kojih bi svaki opisivao raspodelu samo jednog oblika.

Za analitičke potrebe je obično važnije znati, koliko je od ukupne rastvorene supstance ekstrahovano, nezavisno od toga u kojim se sve oblicima supstanca nalazi u pojedinim fazama.

Zbog toga je za opisivanje ravnoteže ekstrakcije pogodnije koristiti odnos raspodele D , koji označava odnos ukupnih koncentracija supstance (u svim njenim oblicima) u dve faze.

$D = \frac{c(A)_{org}}{c(A)_{aq}}$ D odnos raspodele ili distribicioni koeficijent, a $c(A)_{org}$ i $c(A)_{aq}$ ukupne

koncentracije supstance A u svim njenim oblicima u organskoj i u vodenoj fazi. Ekstrakcija jedne supstance. Stepen ekstrakcije jednostruke i višestruke ekstrakcije Prilikom posmatranja postupka ekstrakcije, pogodno je najpre posmatrati ekstrakciju jedne supstance, a nakon toga razmatranje proširiti na razdvajanje smeše supstanci. Ekstrahujemo li tako supstancu A iz vodenog rastvora nekim organskim rastvaračem, u stanju ravnoteže imaćemo

$$D = \frac{c(A)_{org}}{c(A)_{aq}}$$

Ako je zapremina organske faze V_{org} , a vodene V_{aq} količine supstance u organskoj i vodenoj fazi biće

$$n(A)_{org} = c(A)_{org} \cdot V_{org}$$

$$n(A)_{aq} = c(A)_{aq} \cdot V_{aq}$$

a ukupna količina

$$n(A) = n(A)_{org} + n(A)_{aq}$$

Označimo li sa p udeo količine supstance koja se ekstrahuje i prelazi u organsku fazu, a udeo koji se ne ekstrahuje i ostaje u vodenoj fazi sa q , posle prve ekstrakcije imaćemo

$$p = \frac{n(A)_{org}}{n(A)_{org} + n(A)_{aq}} = \frac{D \cdot V_{org} / V_{aq}}{D \cdot V_{org} / V_{aq} + 1} = \frac{D}{D + V_{aq} / V_{org}}$$

$$q = \frac{n(A)_{aq}}{n(A)_{org} + n(A)_{aq}} = \frac{1}{D \cdot V_{org} / V_{aq} + 1} = 1 - p$$

Efikasnost ekstrakcije jednaka je udelu ekstrahovane supstance, i obično se izražava u procentima i naziva se stepen ekstrakcije E (ili iskorišćenjem ekstrakcije R), tako da je kod jednostruke ekstrakcije

$$E = p \cdot 100 = \frac{D \cdot V_{org} / V_{aq}}{D \cdot V_{org} / V_{aq} + 1} \cdot 100 = \frac{D}{D + V_{aq} / V_{org}} \cdot 100$$

Iz jednačine se jasno vidi da je stepen ekstrakcije u jednakoj meri zavisao od odnosa raspodele i od odnosa zapremne organske i vodene faze.

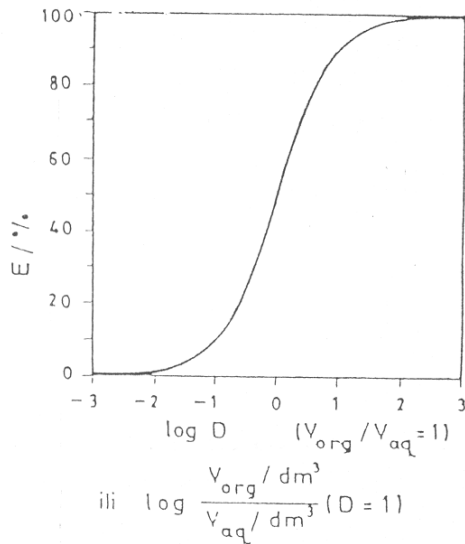
Što su D i V_{org} / V_{aq} i stepen ekstrakcije je veći.

Uzmemo li kao primer da je $D = 1000$ a $V_{org} / V_{aq} = 1$, jednom jedinom ekstrakcijom ekstrahovaće se

$$E = p \cdot 100 = \frac{1000 \cdot 1}{1000 \cdot 1 + 1} \cdot 100 = 99,90\%$$

dok će neekstrahovano ostati 0,10%.

Za isti stepen ekstrakcije $D = 100$ trebalo bi da je odnos $V_{org} / V_{aq} = 10$ itd.



Zavisnost stepana ekstrakcije od $\log D$ (uz V_{org}/V_{aq}) ili od $\log \frac{V_{org}/dm^3}{V_{aq}/dm^3}$ uz ($D = 1$)

Ako je, prema tome odnos raspodele kod neke ekstrakcije vrlo veliki ($D > 1000$), jedna jedina ekstrakcija će uz jednake zapremine dve faze obično biti dovoljna, da se praktično ekstrahuje sva supstanca 99,9%.

Ovako visoka vrednost D sreće se veoma retko.

Nedovoljne vrednosti D se u principu mogu nadoknaditi povećanjem odnosa V_{org}/V_{aq} , ali iz praktičnih razloga to se teško ostvaruje.

Visok stepen ekstrakcije se može postići primenom višestruke ekstrakcije sa manjim zapreminama organskog rastvarača.

To znači da se posle prvog uravnoteženja dva tečna sloja odvoje i vodeni sloj ponovo ekstrahuje malom zapreminom organskog rastvarača.

Pri svakom uravnoteženju jedan jedan konstantan udeo q supstance se ekstrahuje iz vodene u organsku fazu, tako da se na kraju ekstrahuje više supstance sa manje rastvarača.

Efikasnost ekstrakcije za svaki pojedinačan stepen izražena je u udelu supstance u svakoj fazi.

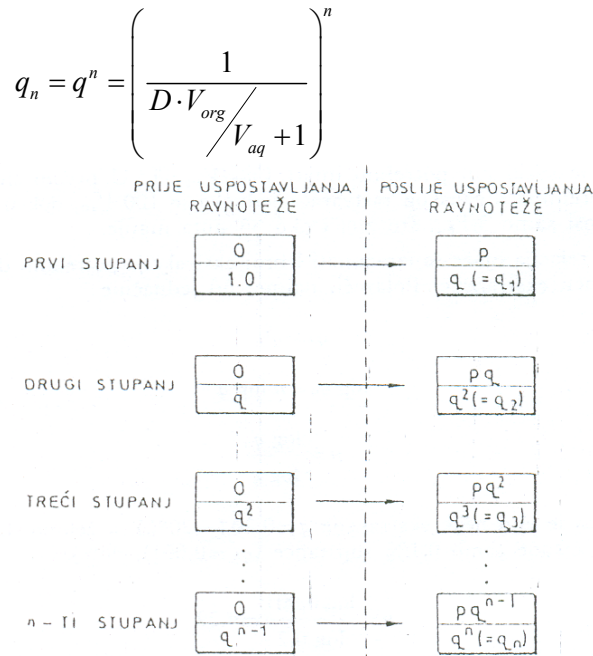
Tako će posle prve ekstrakcije udeo neekstrahovane supstance koji zaostaje u vodenoj fazi biti

$$q_1 = q = \frac{1}{D \cdot V_{org}/V_{aq} + 1}$$

$$\text{posle druge ekstrakcije } q_2 = q \cdot q_1 = q^2 = \left(\frac{1}{D \cdot V_{org}/V_{aq} + 1} \right)^2$$

$$\text{posle n-te ekstrakcije } q_n = q \cdot q^{n-1} = q^n = \left(\frac{1}{D \cdot V_{org}/V_{aq} + 1} \right)^n$$

dok će udeo ukupno neekstrahovane supstance biti



Shema raspodjeljivanja supstance između dvije faze kod višestruke ekstrakcije

Udeo supstance ekstrahovane prvom ekstrakcijom biće p , drugom ekstrakcijom $p \cdot q$, trećom ekstrakcijom $p \cdot q^2$, n -tom ekstrakcijom $p \cdot q^{n-1}$ dok će ukupni udeo ekstrahovane supstance biti jednak zbiru udela supstance u svim gornjim fazama ili razlici između jedinice (kao udela ukupno prisutne supstance na početku ekstrakcije) i udela supstance zaostale u donjoj fazi posle poslednje ekstrakcije.

$$\text{ukup.udeo.eks.sup.} = (p + pq + pq^2 \dots + pq^{n-1}) = \sum_{i=1}^n p \cdot q^{i-1} = (1 - q_n) = (1 - q^n)$$

Pošto se u izvedenim jednačinama broj ekstrakcija n pojavljuje kao eksponent, njegov uticaj na stepen ekstrakcije je mnogo veći od uticaja zapremine organskog rastvarača, pa će višestruka ekstrakcija uz istu zapreminu organskog rastvarača biti mnogo efikasnija od jedne jedine ekstrakcije.

Uzmimo primer da je kod neke ekstrakcije $D = 10$ i da želimo da uz jednu jedinu ekstrakciju neekstrahovano ostane samo 0,1% ($q = 0,001$), a da se ekstrahuje 99,9% ($p = 0,999$), polazeći od

$$q_1 = q = 0,001 = \frac{1}{D \cdot V_{org} / V_{aq} + 1} = \frac{1}{10 \cdot V_{org} / V_{aq} + 1}$$

nalazimo da je potreban odnos zapremina dveju faza $V_{org} / V_{aq} \approx 100$ i isti učinak ako se ekstrakcija ponovi tri puta, polazeći od

$$q_3 = q^3 = 0,001 = \left(\frac{1}{10 \cdot V_{org} / V_{aq} + 1} \right)^3$$

nalazimo da je svaki put potrebno imati odnos $V_{org} / V_{aq} \approx 1$.

U prvom slučaju ukupna potrebna zapremina organskog rastvarača je $100V_{aq}$, dok u drugom iznosi samo $3V_{aq}$ što je 33 puta manje.

Iz datih relacija se može izračunati i broj ekstrakcija potrebnih da se postigne određeni stepan ekstrakcije.

Polazeći od jednačine $q_n = q^n$ odnosno $\log q_n = n \log q$ dobija se

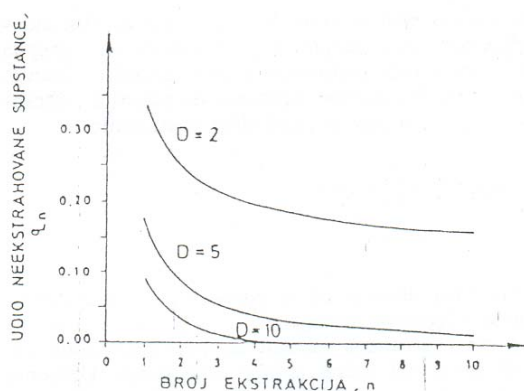
$$n = \frac{\log q_n}{\log q}$$

Tako npr. ako je kod neke ekstrakcije $q = 0,20$ (20%), a želimo da ukupno neekstrahovano ostane samo 0,1% supstance ($q = 0,001$) dobijamo

$$n = \frac{\log 0,001}{\log 0,2} = 4,29$$

što znači da ekstrakciju treba ponoviti 5 puta.

Očigledno je da se povećanjem broja ekstrakcija udeo ukupne ekstrahovane supstance povećava, ali zbog eksponencijalnog odnosa između ove dve veličine ne dobija se mnogo ako se proces ekstrakcije ponavlja više od 4–5 puta.



Udio ukupno neekstrahovane supstance q_n u zavisnosti od broja ekstrakcija n . Kod svake ekstrakcije $V_{org} = V_{aq}/n$, tako da je $\sum V_{org} = V_{aq}$

Na slici je prikazan udeo ukupno neekstrahovane supstance, za nekoliko vrednosti D , uz iste ukupne zapremine organske i vodene faze.

U praksi se zato data zapremina organskog rastvarača razdeli i koristi za nekoliko ekstrakcija i ako se nakon 4–5 ponovljenih ekstrakcija ne postigne dovoljna efikasnost, treba tražiti uslove u kojima je odnos raspodele D povoljniji (veći).

Primer: Za jedan ekstrakcioni sistem $D = 5$. Izračunati udeo supstance koji ostaje neekstrahovan: a) posle jedne ekstrakcije sa jednakim zapreminama org i aq i b) posle 5 ponovljenih ekstrakcija uz iste ukupne zapremine org i aq.

$$\text{a) } V_{org} = V_{aq} \quad q_1 = q = \frac{1}{5 \cdot 1 + 1} = 0,1667 (16,67\%)$$

$$\text{b) } V_{org} = \frac{V_{aq}}{5} \quad q_5 = q^5 = \left(\frac{1}{5 \cdot \frac{1}{5} + 1} \right)^5 = 0,0312 (3,12\%)$$

HROMATOGRFSKE METODE

1903. godine Cvet je opisao svoj klasičan ogled u kome je izveo odvajanje pigmenata lišća i ovaj proces nazvao hromatografijom.

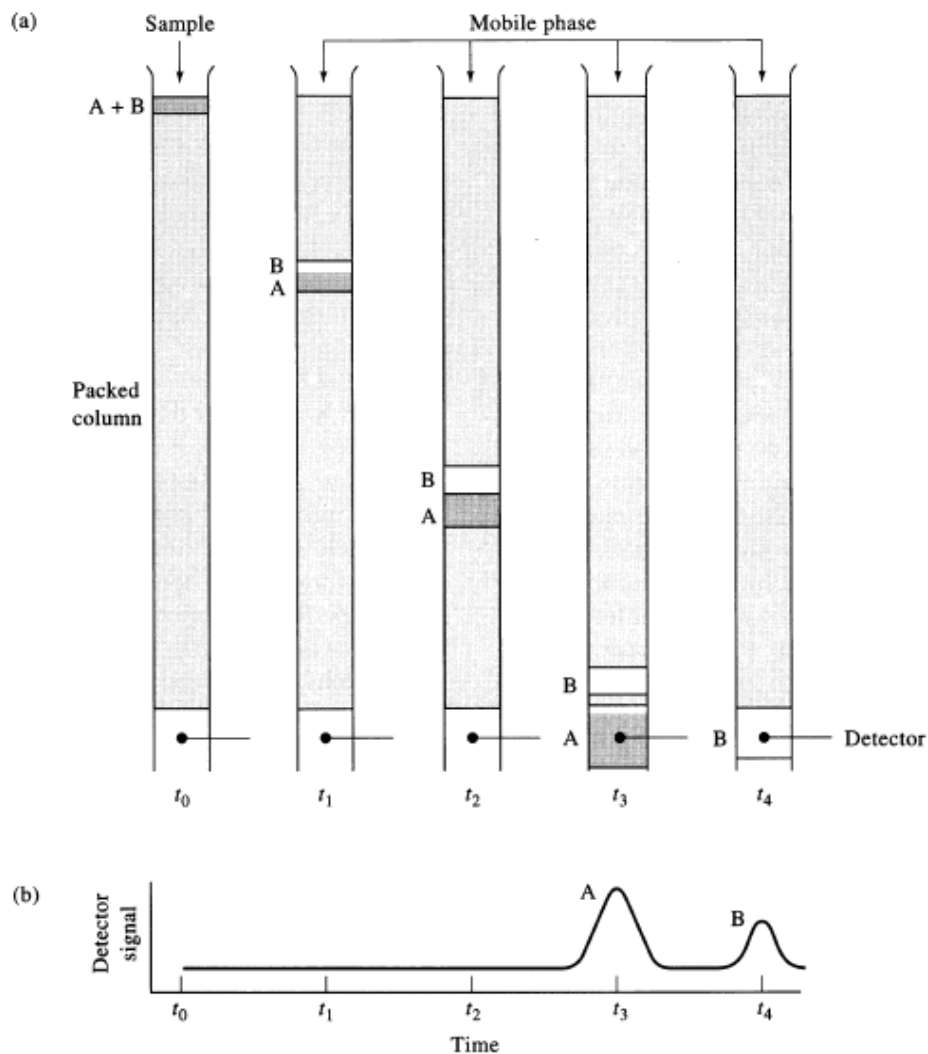
Cvet je pretpostavio da boja zelenog lišća nije prosta materija, pa kako se do tad poznatim fizičkim i hemijskim metodama nije mogla razložiti na prostije komponente, on je to pokušao da postigne na osnovu razlike u adsorpciji različitih komponenti, na stubu kalcijum-karbonata.

Hromatografija se zasniva na različitim migracijama rastvorenih supstanci kroz sistem koji se sastoji od dve faze, od kojih je jedna mobilna.

Druga faza je neki aktivni sorbent koji ostaje nepokretan i predstavlja stacionarnu fazu. Uzorak se postavlja na jedan kraj stacionarne faze i kontinualno ispira svežom mobilnom tečnošću koja prolazi kroz stacionarni sloj.

U zavisnosti od interakcije različitih komponenti uzorka sa sorbentom dolazi do njihovog različitog zadržavanja na stacionarnoj fazi i do raspodele uzorka između dve faze.

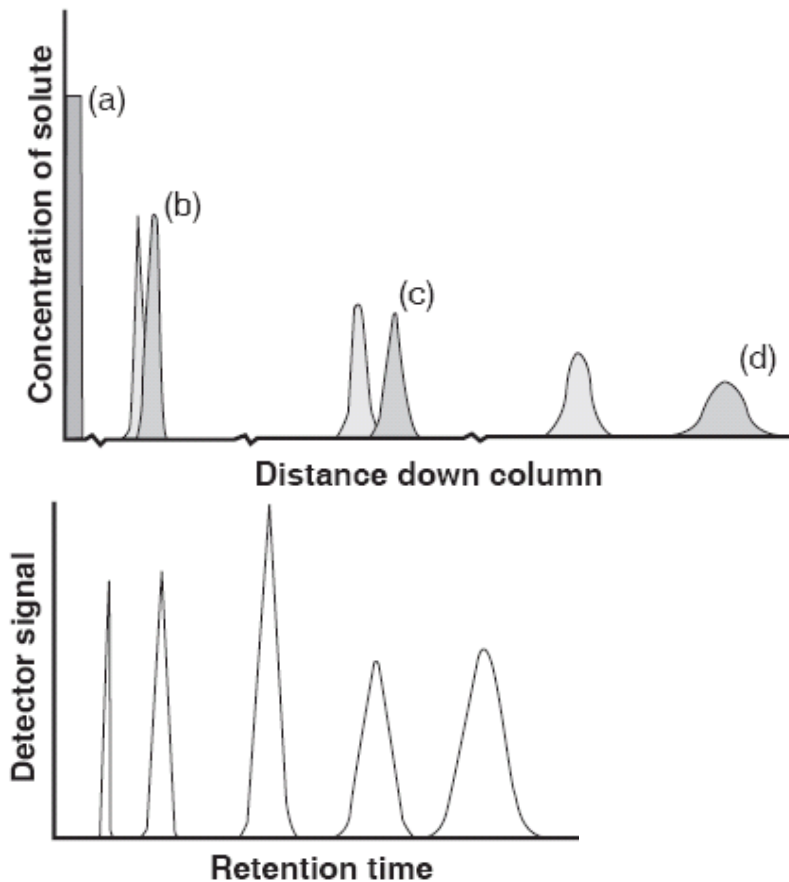
U toku procesa dolazi do adsorpcije, odnosno desorpcije, a odvajanje je završeno kada se različite komponente pojavljuju na detektoru posle različitih vremena zadržavanja.



Odvajanje smese A i B eluacionom hromatografijom na stubu sa izlaznim zapisom sa detektora

Brzina kojom se komponente kreću kroz kolonu zavisice od njihovih koeficijenata raspodele.

Ako postoji i najmanja razlika u ovim koeficijentima, komponente će kroz kolonu putovati različitim brzinama i postepno će se razdvojiti u zone ili trake.



Opća podjela	Specifična metoda	Stacionarna faza	Vrsta ravnoteže
Tekućinska kromatografija (LC) (mobilna faza: tekućina)	Tekuće–tekuće, ili raspodjela	Tekućina adsorbirana na čvrstoj tvari	Razdioba između tekućina koje se ne miješaju
	Tekuća–vezana faza	Organski spojevi vezani na čvrstu površinu	Razdioba između tekuće i vezane površine
	Tekućina–čvrstina, ili adsorpcija	Čvrsta tvar	Adsorpcija
	Ionska izmjena	Ionski izmjenjivač	Ionska izmjena
	Odjeljivanje na temelju veličine čestica	Tekućina u prostorima polimera	Raspodjela/prosijavanje
Plinska kromatografija (GC) (mobilna faza: plin)	Plinsko–tekućinska	Tekućina adsorbirana na čvrstoj tvari	Raspodjela između plina i tekućine
	Plinska vezana faza	Organski spojevi vezani na površinu čvrste tvari	Raspodjela između tekuće i vezane površine
	Plinsko–čvrstinska	Čvrsta tvar	Adsorpcija
Kromatografija sa superkričnom tekućinom (SFC) (Mobilna faza: tekućina pri superkričnim uvjetima)		Organski spojevi vezani na čvrstu površinu	Raspodjela između superkrične tekućine i vezane površine

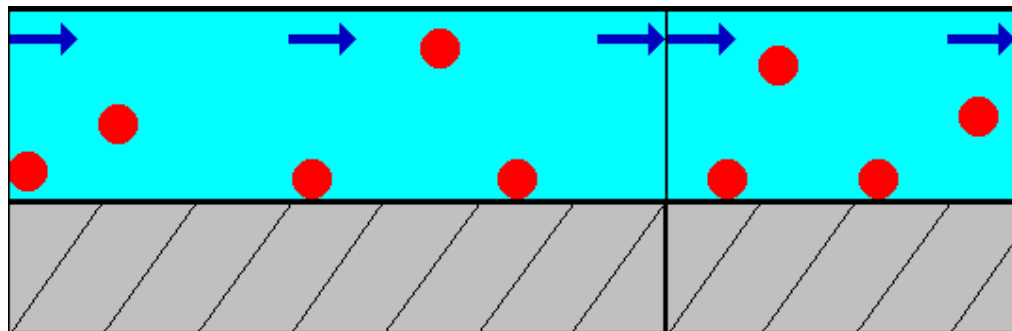
JONSKA HROMATOGRAFIJA

Kod jonskog hromatografskog odvajanja vrši se izmena jona sa naelektrisanim funkcionalnim grupama na stacionarnoj fazi.

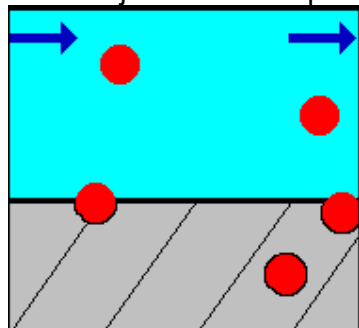
Odgovarajući suprotni joni vezani za funkcionalne grupe mogu se zameniti drugim jonima istog naelektrisanja u mobilnoj fazi.

Proces izmene za svaki jon okarakterisan je ravnotežnom jonskom izmenom koja određuje raspodelu između faza.

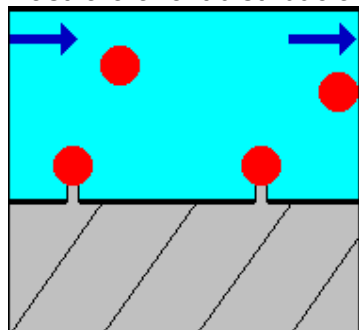
Mobilna faza rastvara i transportuje analit dok ga stacionarna faza zadržava.



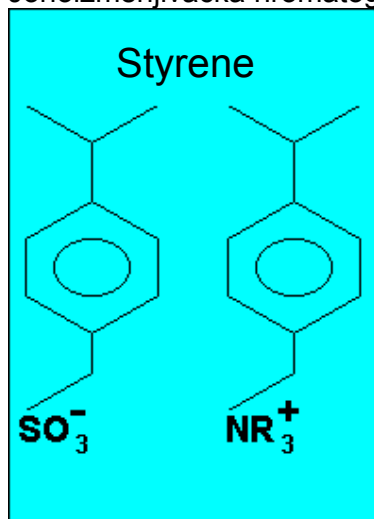
Adsorbuje analit adsorpciona hromatografija

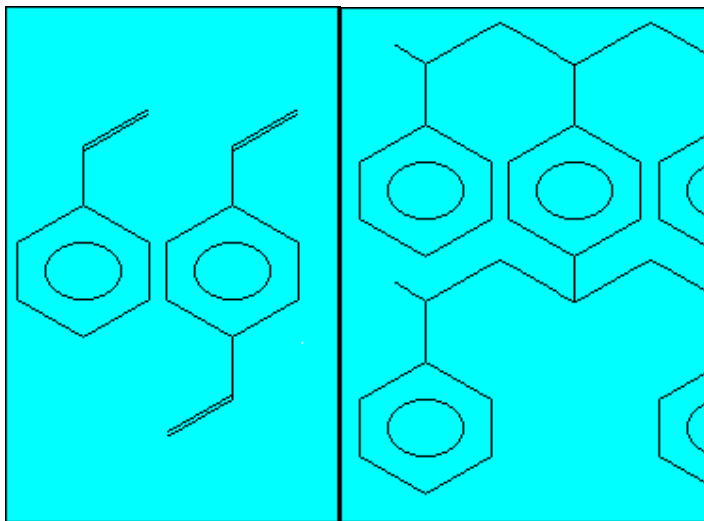


Rastvara analit distribuciona hromatografija



Jonoizmenjivačka hromatografija





Divinylbenzene Styrene-divinylbenzene
smola

Mobilne faze anjoni (I)

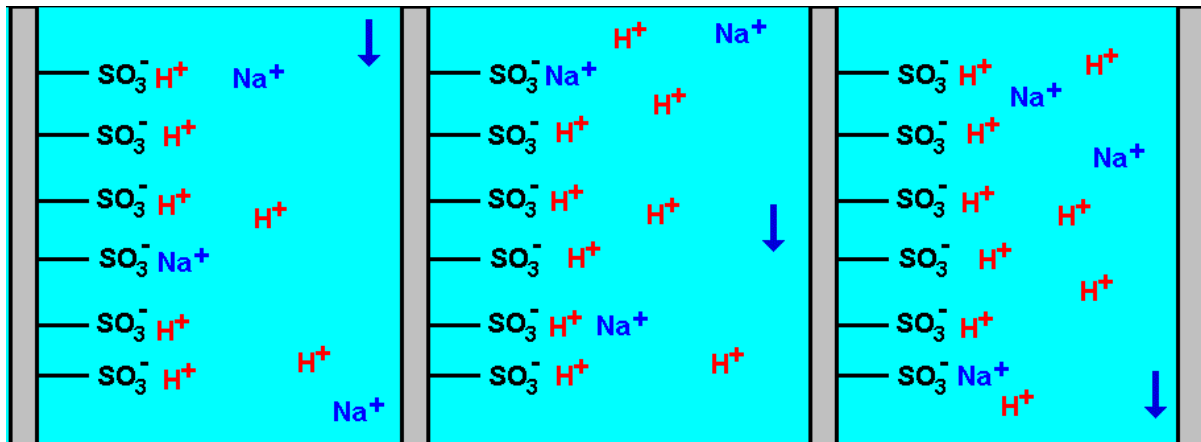
- Ftalna kiselina
- Salicilna kiselina
- *p*-Hidroksibenzojeva kis.
- Benzojeva kiselina
- Borati
- Borat/Glukonat
- Kalijum hidroksid
- ...

anjoni (II)

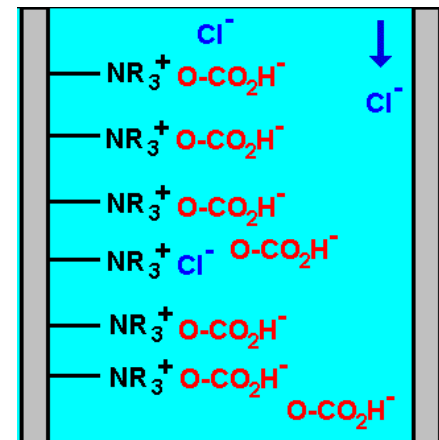
- Karbonat/bikarbonat
- Kalijum hidroksid
- Borat

katjoni (I)

- Azotna kiselina
- Vinska kiselina
- Vinska/dipikolinska kiselina
- Vinska/limunska kiselina
- Natrijum dihidrogen fosfat
- oksalna kiselina/etilen diamin/acetone



I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII			I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
H																	He
Li	Be											B	C	N	O	F	Ne
Na	Mg											Al	Si	P	S	Cl	Ar
K	Ca	Sc	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Ga	Ge	As	Se	Br	Kr
Rb	Sr	Y	Zr	Nb	Mo	Tc	Ru	Rh	Pd	Ag	Cd	In	Sn	Sb	Te	I	Xe
Cs	Ba	La	Hf	Ta	W	Re	Os	Ir	Pt	Au	Hg	Tl	Pb	Bi	Po	At	Rn
Fr	Ra	Ac	Ku														

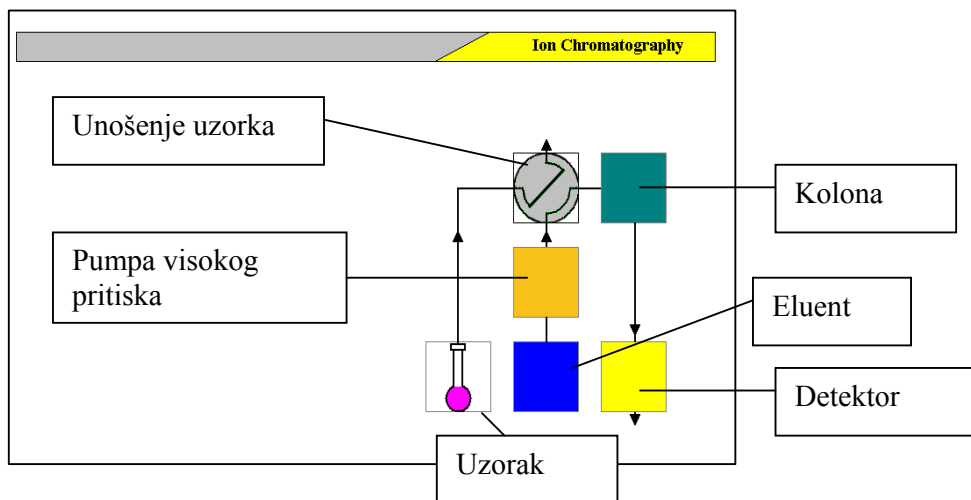


I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII			I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
H																	He
Li	Be											B	C	N	O	F	Ne

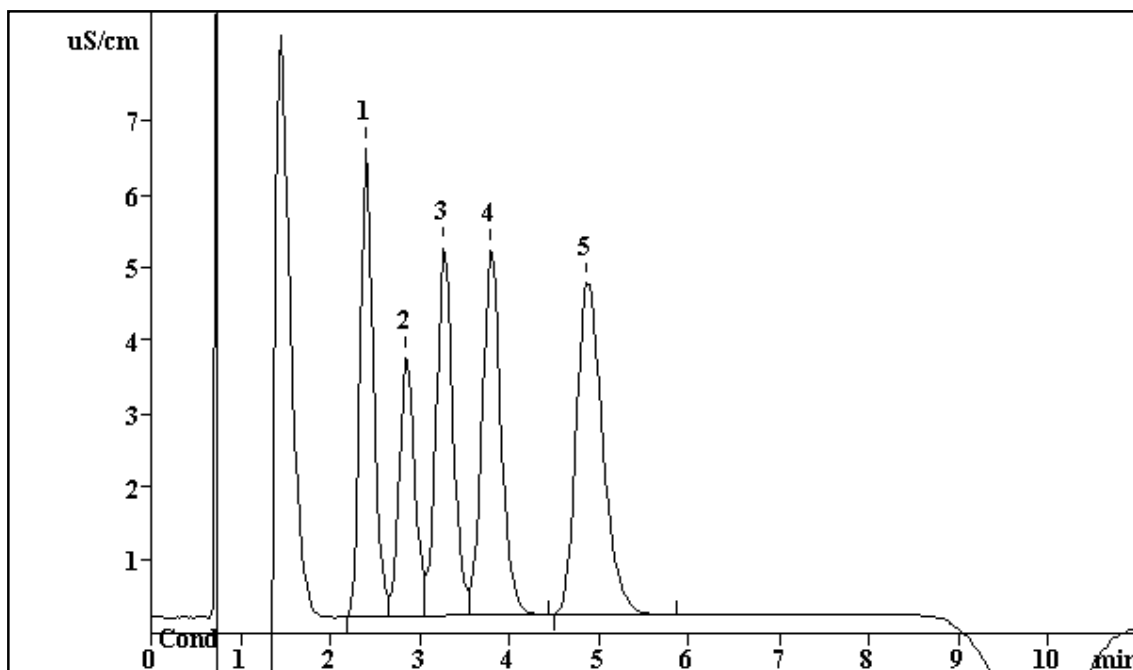
Na	Mg											Al	Si	P	S	Cl	Ar
K	Ca	Sc	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Ga	Ge	As	Se	Br	Kr
Rb	Sr	Y	Zr	Nb	Mo	Tc	Ru	Rh	Pd	Ag	Cd	In	Sn	Sb	Te	I	Xe
Cs	Ba	La	Hf	Ta	W	Re	Os	Ir	Pt	Au	Hg	Tl	Pb	Bi	Po	At	Rn
Fr	Ra	Ac	Ku														

Metrosep Dual 1 – 70

No	jon	ppm
1	Chlorid	5.00
2	Nitrit	5.00
3	Bromid	10.00
4	Nitrat	10.00
5	Sulfat	10.00
6	Sistem	-



Ftalna kiselina/acetoni-tril: $8,0/2,0$ $\frac{mmol}{l}/\%$ (TRIS $pH = 4,0$)



IZOLACIJA I KARAKTERIZACIJA PROTEINA

Biohemičar se veoma često sreće sa zadatkom da iz smese izdvoji pojedinačne proteine. Kao cilj se postavlja *preparativno dobijanje* nekog određenog proteina (enzima) ili *analitičko odvajanje* i *kvantitativno određivanje* pojedinih komponenti kao što se to radi pri analizi ljudskog seruma.

Izolovanje proteina je često teško jer su oni veoma osetljivi i mogu se lako denaturisati, a pored toga se u telesnim tečnostima i ekstraktima tkiva nalaze vrlo komplikovane smese proteina.

Fizičko-hemijske karakteristike proteina određene su uglavnom sa dva faktora: *veličinom* i *naelektrisanjem* pa su razvijene metode izolovanja koje se baziraju na razlikama u ovim parametrima.

Pored toga se mogu iskoristiti i osobine vezivanja specifičnih molekula (afinitativna hromatografija i imunohemijska taloženja).

Metode koje odvajaju proteine prema veličini molekula mogu služiti, kako za preparativno dobijanje, tako i za izolaciju proteina.

Često su potrebne samo manje izmene u primenjenoj metodologiji da bi se postigao željeni cilj.

Uz manje modifikacije ova metoda može se koristiti i za određivanje relativne mase proteina.

U toku preparativnog izolovanja proteina mora se u svakoj fazi odrediti čistoća pa se preparativna i analitička metoda moraju dopunjavati.

Odvajanje prema rastvorljivosti

Većina se proteina može istaložiti iz vodenih rastvora pomoću neutralnih soli.

Taloženje zavisi od veličine i naelektrisanja molekula, a kod izoelektrične tačke rastvorljivost proteina je najmanja.

Metode taloženja sa natrijum i amonijum-sulfatom su najstariji postupci za izolovanje proteina.

Rastvoru koji sadrži protein se dodaje sve veća količina soli, a istaloženi proteini se svaki put odvajaju centrifugiranjem.

Promenom *pH* vrednosti rastvora metoda se može poboljšati, ali uprkos tome dobijaju se prilično nečiste proteinske frakcije i zbog toga se ova metoda danas koristi kao prvi korak u prečišćavanju proteina.

Taloženje proteina iz vodenih rastvora može se izvesti i pomoću organskih rastvarača kao što su alkohol i aceton, koji se mešaju sa vodom.

Taloženje se izvodi na niskim temperaturama jer se proteini inače lako denaturizuju.

Odvajanje prema naelektrisanju

Rastvoreni proteini su polivalentni joni i njihova naelektrisanja potiču od karboksilnih grupa u bočnim lancima glutaminske i asparaginske kiseline.

Karboksilna grupa terminalne aminokiseline lanca takođe donosi jedno negativno naelektrisanje.

Pozitivna naelektrisanja daju bočni lanci baznih aminokiselina kao što su arginin lizin i histidin.

Amino-terminalna grupa takođe daje pozitivno naelektrisanje ako nije acetilovana ili nije piroglutaminska kiselina.

Naelektrisanje ovih kiselih i baznih grupa zavisi od *pH* vrednosti rastvora.

Niske *pH* vrednosti suzbijaju disocijaciju kiselih grupa, a pri visokim *pH* vrednostima bazne grupe su nenaelektrisane (histidinska grupa prva gubi naelektrisanje).

Kod određene *pH* vrednosti broj pozitivnih i broj negativnih naelektrisanja je jednak i to se naziva *izoelektrična tačka* proteina.

Elektrofokusiranje

Elektrofokusiranjem se razdvajaju proteini prema svojoj izoelektričnoj tački.

Veštački amfoliti stvaraju *pH* gradijent u električnom polju a proteinski molekul se kreće u ovakvom *pH* gradijentu do mesta koje odgovara njegovoj izoelektričnoj tački.

On se više ne pokreće sa tog mesta jer je molekul nenaelektrisan (ima isti broj pozitivnih i negativnih naelektrisanja) i na njega ne deluje električno polje.

Upotrebom dobrih *pH* gradijenata postiže se dobro odvajanje proteina uz istovremeno određivanje njihovih izoelektričnih tačaka.

Elektroforeza

Kod određene pH vrednosti koja se dobije pomoću puferskog rastvora različiti proteini imaju različit broj naelektrisanja.

Ukoliko se uspostavi električno polje, brzina putovanja naelektrisanog molekula proteina zavisice od jačine električnog polja.

Ako u molekulu preovladava negativno naelektrisanje onda on putuje prema anodi.

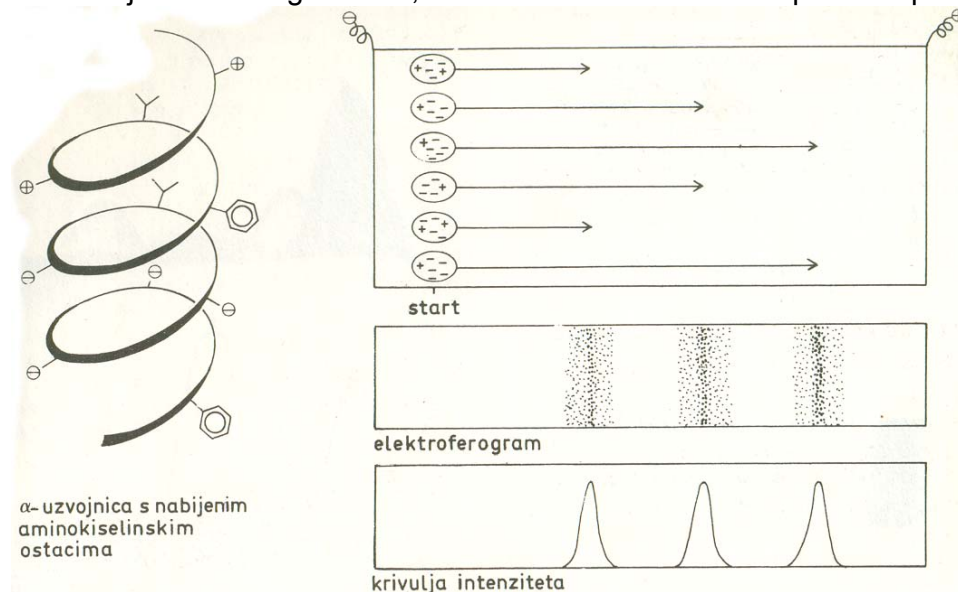
Brzina kretanja proteina u određenom električnom polju zavisi od zbira naelektrisanja kao i veličine i oblika molekula što uslovljava jačinu trenja.

Elektroforeza je veoma korisna metoda za odvajanje proteina, a pored toga služi i za određivanje čistoće nekog proteinskog preparata.

Pretežno se upotrebljava za analitičke svrhe, ali se može iskoristiti i za preparativno dobijanje različitih proteina.

Danas se elektroforeza uglavnom izvodi na nosačima.

Osim folija celuloznog acetata, kao vrlo dobri nosači su se pokazali poliakrilamidni gelovi.

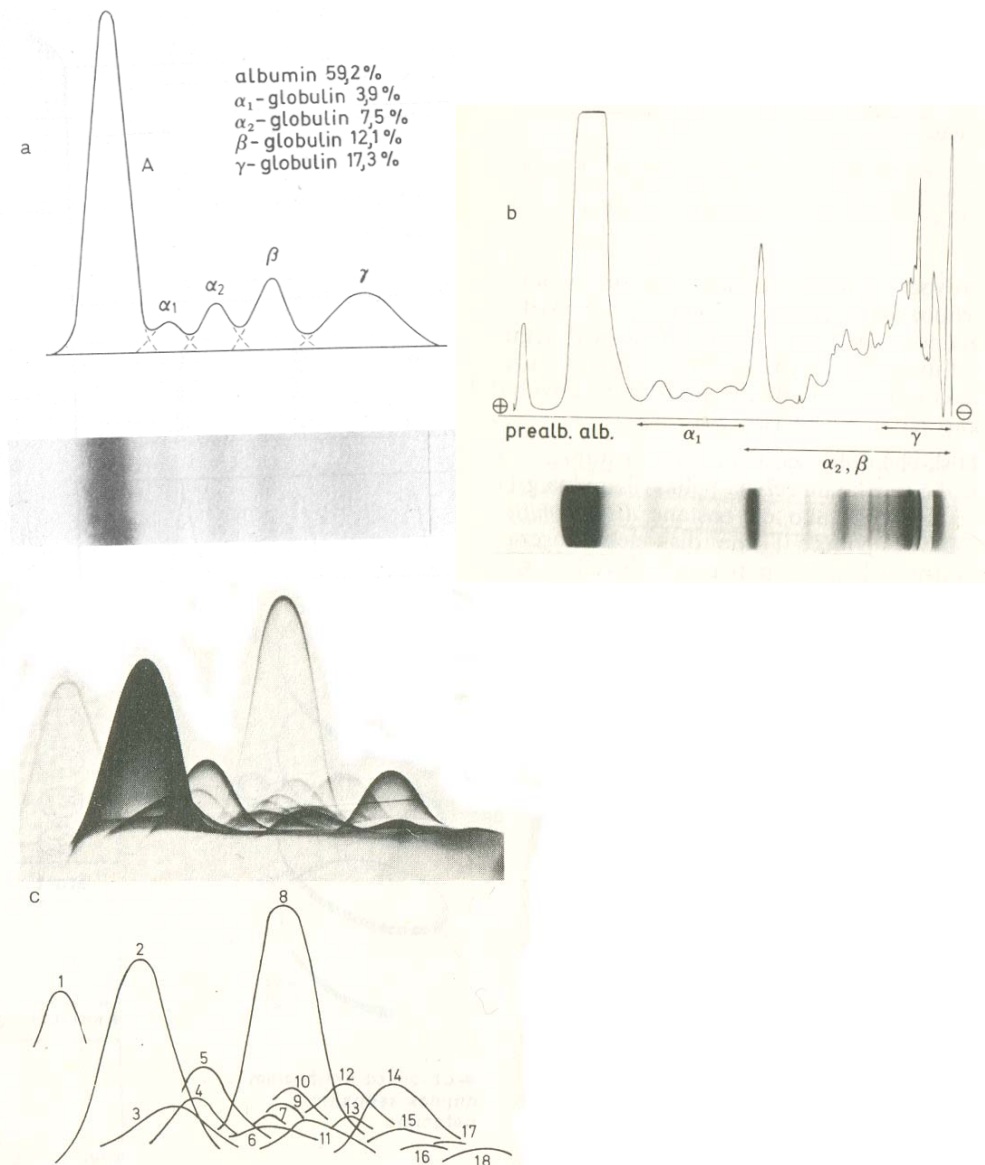


Shema elektroforeze. Levo je deo α -heliksa na kojim su označena mesta sa naelektrisanjima. Desno su na neki nosač naneta tri proteina sa različitim brojem naelektrisanja koji su određeno vreme (15h) putovali do vrha sterlice. Elektroferogram je izazvan bojenjem, a kvantitativno određivanje se može izvesti denzinometrijski ili fotometrijski.

Kod poliakrilamidnih gelova može se proizvoljno varirati stepen umreženosti, a samim tim i veličina pora.

U jako umreženom gelu pored razdvajanja molekula prema naelektrisanju dolazi i do efekta molekulskih sita.

Elektroforeza na poliakrilamidnim gelovima može se izvesti na taj način da se odvajanje proteina odvaja samo po molekulskoj masi (SDS-gel elektroforeza).



Primer elektroforetskog odvajanja proteina iz seruma a) elektroforeza na papiru, b) disk-elektroforeza, c) dvodimenzionalna imunoelktroforeza.

Disk elektroforeza

Kod ovog postupka dva različito jako umrežena poliakrilamidna gela sa nadsloje tako da nastane diskontinuitet.

Gornji gel sa širim porama služi kao tzv. gel sakupljač za koncentrovanje proteina.

Zbog toga se osobito oštre trake, a time i vrlo dobro odvajanje proteina.

Elektroforeza se može kombinovati sa imunoprecipitacijom, pa se takav postupak naziva imunoelktroforeza.

Hromatografija sa jonskim izmenjivačima

Princip ovog postupka služi pre svega za izolovanje, a kao jonski izmenjivači kod hromatografisanja proteina retko se upotrebljavaju sintetičke smole, jer one često denaturišu proteine.

Kao adsorbensi najčešće služe preparati celuloze kojima su veštačkim putem uvedene naelektrisane grupe.

Tako se u celulozu mogu uvest pozitivno naelektrisane dietilaminoetil-grupe

$(C_2H_5)_2 N^+H - CH_2 - CH_2 -$, ili negativno naelektrisane karboksimetil-grupe $-CH_2 - COO^-$.

Hromatografija pomoću ovih adsorbenasa izvodi se isključivo na stubu (koloni), a u eluentu se koncentracija proteina određuje merenjem UV-apsorpcije.

Hromatografska homogenost koja se zapaža kao oštar pik u dijagramu elucije može da služi kao kriterijum za čistoću proteina.

Određivanje prema veličini molekula

Proteini se veoma često jako razlikuju prema veličini i obliku molekula.

Ove osobine se mogu iskoristiti za njihovo odvajanje, a najvažnije metode koje se koriste ovim osobinama su ultracentrifugiranje i gel-filtracija (hromatografija ekskluzijom).

U ultracentrifugi, zbog rotacije nastaje sila koja je nekoliko stotina hiljada puta veća od zemljine sile gravitacije.

Molekuli proteina sedimentiraju u polju centrifugalnih sila različitim brzinama pa se tako mogu i odvojiti.

Ova metoda se koristi i za određivanje M_r .

Za preparativno odvajanje često se koristi i metoda centrifugiranja u gradijentu gustine i obično se koristi saharoza čija se gustina povećava od vrha prema dnu kiveta.

U toku centrifugiranja protein ili drugi molekuli putuju do one dubine u kiveti u kojoj lebde, to jest do one gustine saharoze koja odgovara njihovoj gustini.

Nakon centrifugiranja mogu se odvojiti pojedini slojevi a ova metoda se često koristi i za frakcionisanje nukleinskih kiselina.

SDS-gel elektroforeza

Za analitičko odvajanje proteina prema relativnoj molekularnoj masi primenjuje se gel elektroforeza u prisustvu natrijum-dodecilsulfata (SDS) što dovodi do denaturacije proteina.

Kod većih molekula javlja se veći otpor prema strujanju u poliakrilamidnom gelu, pa je dužina njihovog puta manja nego kod manjih molekula.

Obojenjem gel specifičnim bojama za proteine oni postaju vidljivi, a kako intenzitet obojenja zavisi od koncentracije, proteine možemo i kvantitativno odrediti.

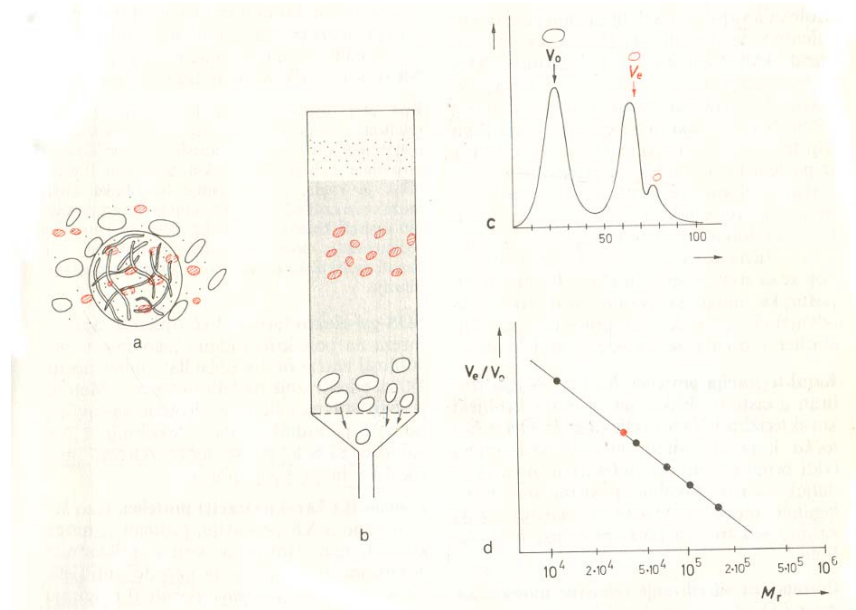
Gel filtracija (hromatografija ekskluzijom)

Kod ove vrste hromatografije stacionarna faza je polisaharidni gel koji deluje kao molekularno sito.

Unutar čestica gela nalaze se vodom ispunjene šupljine u koje mogu ući samo male molekule i molekule srednje veličine.

Kada se gel ispere rastvaračem molekuli koji su prodrli u šupljine mogu se eluirati.

Pogodnim izborom gela i postupkom elucije mogu se izolovati i prečistiti a ova metoda se može koristiti i za određivanje M_r .



Gel-filtracija na dekstrinskom gelu
Afinitetna hromatografija

Kod ovoga postupka se primenjuje potpuno drugačiji princip odvajanja proteina od do sada opisanih.

Metoda se zasniva na sposobnosti proteina da vrlo specifično vežu određene male molekule.

Takve sposobnosti pre svega imaju *enzimski proteini*, ali i *imunoglobulini*, *hormonski receptori* i ostali proteini koji pokazuje osobine specifičnog vezivanja.

Molekul supstrata nekog enzima veže se kovalentno za neki nosač i za nosač se najčešće veže preko kraćeg alifatičnog lanca.

Nosač sa tako učvršćenom molekulom supstrata se puni u staklenu kolonu.

Iz rastvora proteina koji se propušta kroz kolonu vezaće se samo odgovarajući enzim a nevezani proteini se isperu.

Na kraju se, dodatkom nekog supstrata ili molekule slične supstratu, odvoji vezani enzim koji se odvoji u eluent.

Po ovom postupku mogu se postići veoma specifična odvajanja jer se koristi prirodni specifični afinitet proteina za određeni molekul.

KAPILARNA ELEKTROFOREZA

Kapilarna elektroforeza je danas jedna od najčešće primenjivanih tehnika za razdvajanje supstanci.

Efikasnost, brzina i jednostavnost u podešavanju selektivnosti, osnovne su prednosti koje je vrlo često čine odabranom tehnikom odvajanja i određivanja čak u konkurenciji sa visokoefikasnom tečnom hromatografijom (HPLC).

Od samog početka primene elektroforeze do danas, njene mogućnosti su ograničene pojavom zagrevanja medijuma usled prolaska električne struje.

Jačina primenjenog električnog polja određuje efikasnost razdvajanja, ali i promenu temperature medijuma, pa se obično u klasičnoj elektroforezi na mogu koristiti električna

polja jača od $100 \frac{V}{cm}$.

Idejom da se elektroforeza izvodi u kapilarnim kolonama i konstrukcijom prvog komercijalnog aparata za "miro"-elektroforezu 80-ih godina prošlog veka, kapilarna elektroforeza postaje jedna od vodećih metoda na polju analitičkih razdvajanja i određivanja.

Razdvajanja kapilarnom elektroforezom izvode se u kapilarama (najčešće *fused silica*) čiji je unutrašnji prečnik $25 - 75 \mu m$ (mogu biti opsega $5 - 100 \mu m$).

Električno polje čija se jačina kreće i do $700 \frac{V}{cm}$, primenjuje se uz odgovarajući pufer i način detekcije.



Shema aparature za kapilarnu elektroforezu

Osnovni faktori koji određuju efikasnost razdvajanja su:

-zagrevanje usled usmerenog kretanja naelektrisanih čestica u električnom polju (Džulov zakon).

-disperzija (širenje zona razdvajanja) i

-elektroosmoze

Svi ovi faktori direktno zavise od osobina uzorka (M_r , pK_a , strukture, obrazovanja

kompleksa), osobina pufera (pH , viskoznost, aditivi, dielektrična konstanta) i

instrumenata kojima se određivanje izvodi (dužina kapilare, jačina primenjenog električnog polja).

Za razliku od HPLC profil kretanja rastvora kroz kapilaru je ravan pa su zbog toka i pikovi uži (ne dolazi do širenja zona zbog različitih brzina kretanja jona iste vrste u zavisnosti od rastojanja od zida kapilare).



Поређење профила брзине кретања честица и изгледа пикова (иста врста одређивања) у капиларној електрофорези и високо ефикасној течной хроматографији

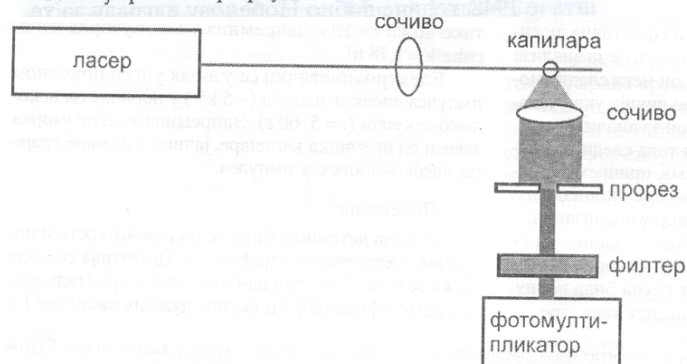


Схема апаратуре за капиларну електрофорезу са ласерски индукованом флуоресценцијом

Tehnike kapilarne elektroforeze

Razlikujemo nekoliko metoda(tehnika):

-kapilarna zonska elektroforeza

-kapilarna gel elektroforeza

-micelarna elektrokinetička hromatografija (MEKC)

-kapilarno izoelektrično fokusiranje

-kapilarna izotakoforeza (CITP)

Pod kapilarnom zonskom elektroforezom podrazumeva se u stvari klasična kapilarna elektroforeza u kojoj je razdvajanje određeno brzinama kretanja jona u električnom polju u skladu sa odnosom $\frac{m}{z}$, u smeru od anode ka katodi.

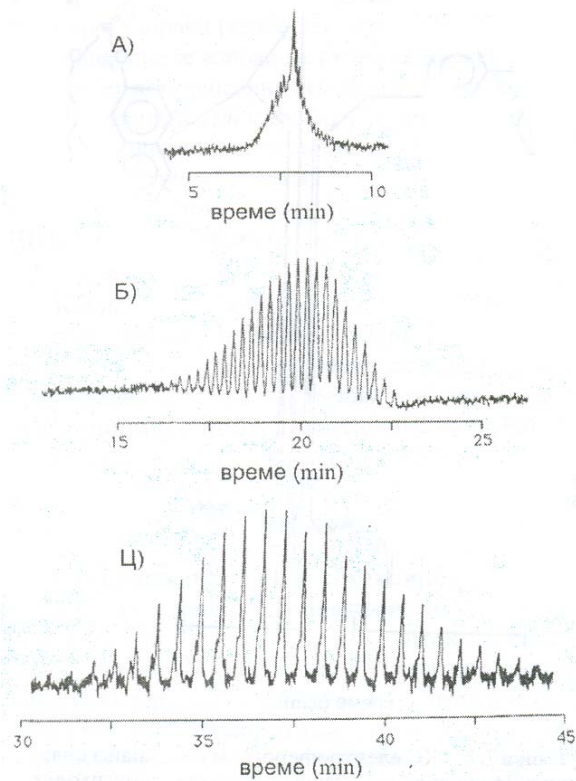
Ukupna brzina kretanja predstavlja vektorski zbir brzina elektroosmotskog (najviše zavisi od osobina pufera) i elektroforetskog kretanja (najviše zavisi od osobina samog uzorka).

Kapilarna gel elektroforeza predstavlja tehniku u kojoj je kapilara napunjena gelom, pa se

razmatra zavisnost ne samo od $\frac{m}{z}$ odnosa nego i od veličine jona.

Kao gel se uglavnom koristi polietilen oksid (PEO), poliakril amid (PAA), dekstrin ili agaroza.

Povećanjem koncentracije gela povećava se i rezolucija ali se produžava i vreme analize.



CGE електроферограми стандардног раствора олигонуклеотида $p(dA)_{12-18}$.
 А) 6 % PEO, Б) 8 % PEO, Ц) 10 % PEO; Услови одређивања: капилара R_f 75 μm , l 30 cm; E 250 V/cm; λ 260 nm; 75 mM Трис-боратни пуфер pH 8.3

GCE ima dve bitne prednosti u odnosu na CZE: prisustvom gela u kapilari neutralisan je elektroosmotski protok, pa su određivanja znatno reproduktivnija i kapilarnom gel elektroforezom se mogu razdvajati i polimerni molekuli kao što su DNA i proteini kod kojih se promenom broja monomera odnos $\frac{m}{z}$ ne menja znatno, ali se menja veličina.

Micelarna elektrokinetička hromatografija je tehnika u kojoj se supstance razdvajaju na osnovu različitih raspodela između dve faze, pa odatle i naziv hromatografija u imenu. U ovom slučaju se u kapilaru ubacuje neka površinski aktivna supstanca u dovoljnoj koncentraciji da bi došlo do udruživanja molekula i obrazovanja micela.

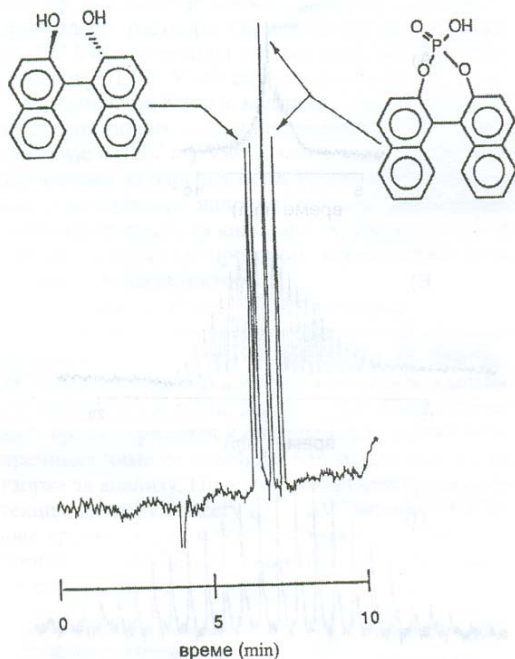
Kako je unutrašnjost micela hidrofobna, ovom tehnikom se osim jona mogu razdvajati i nenaelektrisane čestice.

joni se ne raspoređuju između rastvora i unutrašnjosti čestice pa njihovo razdvajanje i dalje zavisi samo od brzine kretanja, koja je doduše izmanjana elektrostatičkim interakcijama sa nenaelektrisanom površinom micela.

Nenaelektrisane čestice se razdvajaju isključivo u skladu sa raspodelom između rastvora i unutrašnjosti micela, a ono zavisi od hidrofobnosti molekula.

Kao površinski aktivna supstanca se uglavnom koristi: natrijum dodecil sulfat (SDS), anjonski surfaktant), cetiltrimetilamonijum hlorid (katjonski surfaktant), CHAPS

(cviterjonski surfaktant) ili Triton X-100 kao neutralni surfaktant.

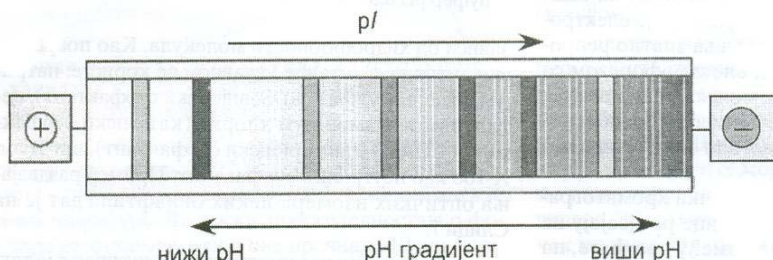


MEKC електроферограм раздвајања енантиомера неких бинафтила уз натријум деоксихолат (NaDC) као сурфактант; Услови одређивања: капилара R_f 50 μm , l 65 cm; E 300 V/cm; мобилна фаза 0.01 M NaDC, 0.01 M Na_2HPO_4 , 0.006 M $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$

Капиларно изоелектрично фокусирање је техника за раздвајање и концентровање протеина према вредности njihove изоелектричне тачке (pI).

У капилари се формира градијент pH тако да вредности pH расту идући од аноде према катоди.

Како су протеини “Zwitter” јони чије наелектрисање зависи од pH вредности, тако ће се по укључивању високог напона сваки од њих кретати према тачки у којој постаје електронутралан, и ту се зауставља.



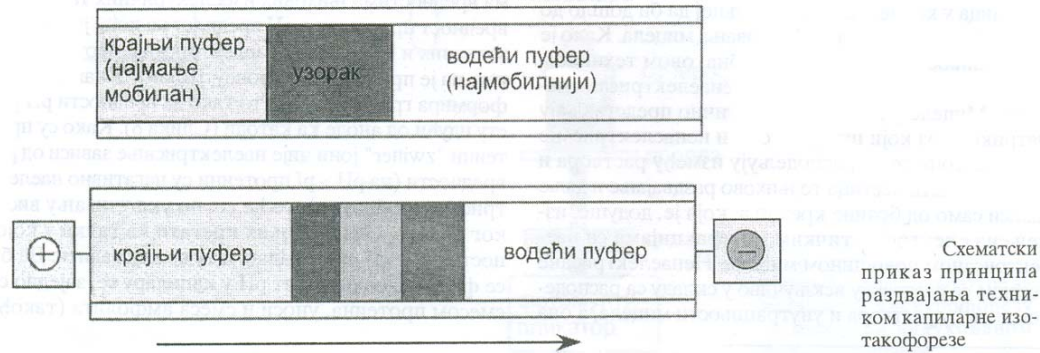
Схематски приказ принципа раздвајања техником капиларног изоелектричног фокусирања

Да би се формирао pH градијент у капилару се, заједно са смесом протеина, уноси и смеша амфолита (такође Zwitter јони) направљени тако да покривају широку област pH вредности.

Мобилизација се изводи повећањем притиска на супротном крају капиларе од оне на којој се налази детектор или додавањем соли у анодни или катодни простор.

Заповрине које се користе код CIEF су знатно веће него у претходно описаним техникама, јер је у овом случају комплетна капилара испunjена узорком.

У капиларној изоелектрофорези узорак је “sendvič” између два пуфера чија се мобилност у електричном пољу знатно разликује.



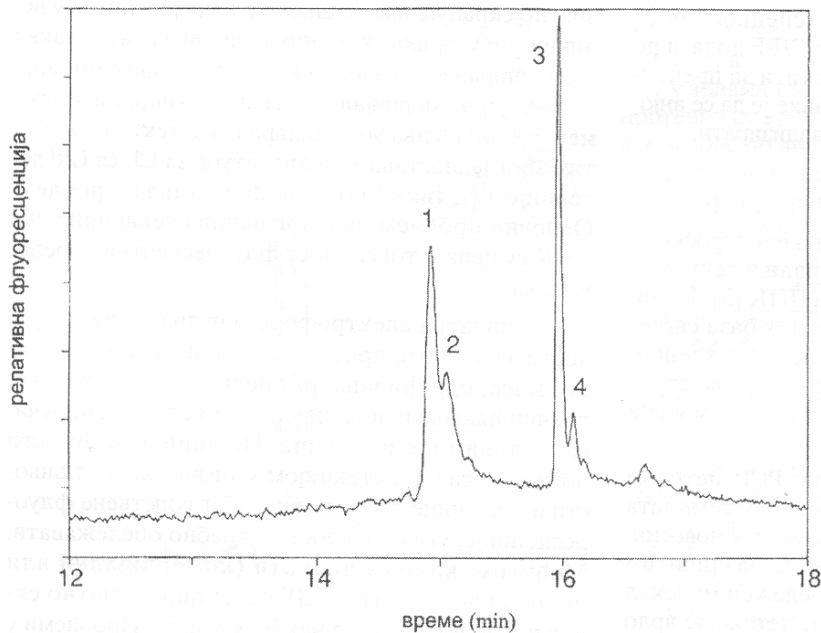
Пуфери се бирају тако да су јонске покретљивости супстанци у узорку по вредностима између покретљивости коришћених пуфера.

У капилару се прво уноси пуфер највеће покретљивости "водећи пуфер" па смеша супстанци за раздвајање и на крају пуфер најмање покретљивости.

Укључивањем електричног полја долази до прераспореде компоненти према покретљивостима, али се оне и даље крећу ношене пуферима па је брзина кретања свих зона кроз капилару једнака (специфичност CIP).

И у овој техници као и код CIEF долази до фокусирања, па се може користити за преконцентровање узорка.

Мана ове технике је што се анјони и катјони не могу истовремено анализирати.



CZE електроферограм ћелије еритроцита одраслог дијабетичара; пикови: 1. β ланац, 2. β -глицинован ланац, 3. α ланац и 4. α -глицинован ланац. Услови одређивања: капилара R_1 20 μm , R_2 360 μm , l 65 cm; E 330 V/cm

У проучавању ћелијског састава капиларна електрофореза има значајно место.

Завлажујући изузетно ниским границама детекције, фокусираности laserskog snopa *LiF* системи се користе за анализу појединачних ћелија.

Капиларна електрофореза се данас рутински користи у многим областима: хемији и биохемији, медицини, молекуларној биологији, заштити животне средине али су истраживања нових могућности примене још увек бројна.

Примена гасне хроматографије за испитивање старости мастила

