

الکتروفورز

مروزه الکتروفورز شاید اصلی ترین تکنیک برای جداسازی ملکولها در آزمایشگاه های سلولهای زیستی است. زیرا تکنیک قدرتمندی است و هنوز به طور معقولانه ای آسان و ارزان است و خیلی آسان و پیش پا افتاده شده است. علی رغم بسیاری از آرایش های فیزیکی برای دستگاه ها و صرف نظر از محیطی که ملکولها اجازه مهاجرت در آن دارند جداسازی با الکتروفورز به توزیع بار در ملکولی که جداسازی می شود بستگی دارد. الکتروفورز می تواند یک بعدی یا دو بعدی باشد. الکتروفورز یک بخشی برای جداسازی اغلب پروتئین های روتین و اسید نوکلئیک استفاده می شود. بخش دوم الکتروفورز برای جداسازی پروتئین هایی که در اثر انگشت هستند استفاده می شود. محیط کمکی برای الکتروفورز می تواند در ژل در لوله یا در ورقه های صاف خوابیده تشکیل شود لوله ها برای جداسازی یک بعدی استفاده می شوند و زمانی که ورقه ها فضای سطحی بلندی را اشغال می کنند برای جداسازی دو بعدی بهترند. شکل ۱-۴ نوعی واحد الکتروفورز ورقه ای تخت را نشان می دهد. زمانی که دیترجنت SDS سدیم دو دسیل سولفات با پروتئین ها استفاده می شود، همه پروتئین ها دارای بار منفی می شوند به وسیله وابستگی به آنیون

سدیم دودسیل سولفات در زمان جدا سازی با ژل پلی آکریلامید طرز عمل و رویه با پلی آکریلامید ژل الکتروفورز خلاصه می شود این تکنیک برای تعیین وزن مولکولی استاندارد شده است. ژل های پلی آکریلامید از پلیمریزه کردن دو ترکیب تشکیل شده اند. آکریلامید و N , متیلن بیس آکریلامید. بیس در اینجا عامل پیوند دهنده برای ژل هاست. پلیمریزاسیون با اضافه کردن آمونیوم پرسولفات در زمانی که همچنین دی متیل آمینوپروپیلونیتریل یا N , N , N , N تترامتیل اتیل اندیامین آغاز می شود. ژل ها خنثی و هیدروفیل هستند و شبکه سه بعدی از هیدروکربن های طولانی که به وسیله گروه های متیلن به هم وصل شده اند تشکیل شده است جداسازی ملکول ها در ژل بستگی به اندازه منافذها و سوراخهای تشکیل شده در ژل دارد. اندازه سوراخهای ژل به وسیله دو فاکتور تعیین می شوند. %T که مقدار درصد آکریلامید را نشان می دهد. 30% که مقدار درصد پیوند دهنده را نشان می دهد. هر چه مقدار کل آکریلامید افزایش یابد اندازه منفذ ژل کاهش می یابد. پیوند دهنده های با 5% C کوچکترین اندازه منفذ را می دهد. هر افزایش یا کاهش در C% باعث افزایش در اندازه منفذ می

شود. کل آکریلامید داده شده بعنوان نسبت درصد وزن به حجم از آکریلامید+بیس آکریلامید است.

پروتئین ها با وزن مولکولی در محدوده ده هزار یا یک میلیون با ۷۱/۲٪ ژل های آکریلامید جداسازی می شوند. زمانی که پروتئین ها با وزن مولکولی بالاتر نیازمند تمرکز ژل آکریلامید پایین تر هستند برعکس ژل های ۳۰٪ برای جداسازی پلی پپتیدهای کوچک استفاده می شود.

تمرکز بیشتر ژل باعث کوچکتر شدن اندازه منفذ ژل و جداسازی بهتر ملکولهای کوچک می شود. درصد ژل مورد استفاده بستگی به وزن مولکولی پروتئین مورد جداسازی دارد.

ژل های ۵درصد برای پروتئین هایی در محدوده ۶۰۰۰۰ تا ۲۰۰۰۰۰ دالتون استفاده می شوند. ژل های ده درصد برای پروتئین های ۱۶۰۰۰ تا ۷۰۰۰۰ دالتون استفاده می شوند و ژل های پانزده درصد برای پروتئین های ۱۲۰۰۰ تا ۴۵۰۰۰ دالتون استفاده می شوند.

سیستم های کاتیونی و آنیونی

در الکتروفورز پروتئین ها در یک بار پایه جداسازی می شوند و بار پروتئین می تواند مثبت یا منفی باشد. بسته به PH بافر. در عملیات معمولی ستون حاوی ژل قیمت بندی شده در سه قسمت شامل: ۱-

ژل جدا کننده ۲- ژل توده شده ۳- ژل نمونه . ژل نمونه ممکن است حذف بشود و نمونه از طریق غلیظ شدن محیط غیر هدایتی مانند ساکاروز به وجود بیاید. الکترودها به دو انتهای ستون متصل می شوند و جریان الکتریکی از طریق ژل جزءبندی شده عبور می کند. اگر الکترودها به صورت بالا آرایش پیدا کنند حمام بالای کاتد و حمام پایین آند (+) است.

آنیون ها اجازه دارند که به سمت آند بروند و به این سیستم آنودی می گویند. کاتیون ها اجازه دارند که به سمت کاتد بروند و به این سیستم کاتدی می گویند.

سیستم های لوله ای و ورقه ای

در طراحی پروتکل الکتروفورز دو سیستم نزدیک به هم طراحی شده است یکی ستون الکتروفورز که از ژلهای لوله مانند در لوله های شیشه ای تشکیل شده است و دیگری ژل های تخت که از ژل تخت بین دو صفحه شیشه ای تشکیل شده است. مزایای ژل های تیوبی در حرکت ملکولها از طریق ژل ها کمتر مستعد و مهیاست تا حرکت افقی و بنابراین گسترش آرامی در تجزیه و تحلیل باندها به خصوص در پروتئین ها وجود دارد و از نظر اقتصادی هم به صرفه است زیرا نسبتا آسان است برای ساختن این سیستم می توان در خانه از مواد

قابل دسترس استفاده کرد. با وجود اینکه ژل های تخت مزایایی دارند که اجازه می دهند برای تجزیه های دو بعدی از آنها استفاده شود جدا کردن چندین نمونه به طور همزمان در یک ژل وجود دارد. ژل های تخت طوری طراحی شده اند که چندین راه باریک دارند که نمونه ها به طور موازی حرکت کنند. اندازه و تعداد راه ها می تواند مختلف باشد زمانی که نمونه ها در یک محیط حرکت می کنند کمترین همانندی نمونه های مختلف منجر به تغییرات جزئی در ساختار ژل می شود. ژل تخت تکنیکی برای تجزیه های لکه ای و تجزیه های اتورادیوگرافیک است. نتیجتاً برای عملیات آزمایشگاهی روزمره مثل تجزیه نوکلئیک اسیدها و کنترل های آنتی ژنی ژل های تخت مناسبند. قابلیت استفاده و قیمت تجاری ژل تخت باعث استفاده بیشتر از اینها شده و به ندرت از ژل لوله ای استفاده می شود. تئوری و عملیات ژل تخت با ژل لوله ای الکتروفورز یکسان است و این که از کدام سیستم استفاده کنیم بستگی بیشتر به تجهیزات موجود دارد.

سیستم های ژل دنباله دار و بدون دنباله استفاده اصلی از ژل ها بعنوان محیط جدا کننده که شامل استفاده از یک ژل با پوشش PH است. مولکولها به وسیله حرکتشان در پایه از

طریق ماتریکس ژل تنها جدا می شوند این سیستم امروزه فقط گاهی در آزمایشگاهها استفاده می شود. و با سیستم های ژل چندتایی بدون دنباله جایگزین شده است. در سیستم های ژل چندتایی ژل جدا کننده به ژل توده ای و ژل نمونه انتخابی اضافه می شود. این ژل ها می توانند تجمع متفاوتی در یک محیط کمکی داشته باشند. یا ممکن است به طور کلی عامل های متفاوتی داشته باشند. تفاوت کلیدی در جداسازی ملکولها زمانی که آن ها به ژل جدا کننده وارد می شوند است ژل جدا کننده تجمع خواهند کرد. این منطقه در ژل توده کننده در محدوده میکرون تا میلیمتر است. زمانی که پروتئینها در باندهای تجمع توده می شوند آنها به مهاجرت ادامه می دهند برای رسیدن به ژل جداکننده تا باندهای باریک تشکیل دهند. باندها سپس از یکدیگر جدا می شوند.

ژل PH بدون دنباله

ابتدا باندهای پروتئین به ژل جدا کننده وارد می شوند جداسازی باندها با یون های عبوری از طریق ستون ژل در جفت افزایش می یابد هر یون در این جفت دارای پلاریته بار یکسان مانند پروتئین هستند. ولی متفاوت در بزرگی بار هستند. یک یون بزرگی بار بیشتری از پروتئین دارد. در حالی که دیگری بزرگی بار کمتری از پروتئین

دارد. یونی که بار بیشتری دارد تندتر حرکت می کند و بنابراین یون رهبر خواهد بود و یون با بار کمتر یون دنباله رو خواهد بود در سیستم های آنیونی یونهای کلر و گلیسینات از مخزن بافر (تریس گلیسین) مشتق می شوند یون رهبر معمولاً کلر و گلیسینات یون دنباله رو است طرح این سیستم آنیونی در شکل ۴-۳ نمایش داده شده است. یون کلر اول به ژل جدا کننده وارد می شود و به سرعت از ژل خارج می شوند سپس پروتئین و بعد یون گلیسینات یون گلیسینات پروتئین را خارج می سازد و در آخر یک پوشش گرادیان ولتاژ خطی با ژل می سازد. پروتئین ها سپس خودشان را با این شیب بر طبق بار و اندازه شان جور می کنند.

ژل های آگارز

زمانی که ژل های آکریلامید برای تجزیه پروتئین ها استاندارد شدند آنها کمتر برای اسیدهای نوکلئیک با وزن مولکولی بالا مناسب بوده اند به این منظور برای جداسازی مناسب این مولکولهای بزرگ تجمع آکریلامید نیاز به کاهش تا سطحی که مایع باقی بماند دارد. ژلها می توانند تشکیل بشوند با وجود اینکه آگارز اضافه شود (آگارز یک پلی ساکارید طبیعی است) برای کاهش تجمع آکریلامید. با اضافه کردن آگارز تجمع آکریلامید ۵٪ می شود و می توان برای ملکولهای با

وزن ملکولی بالاتر از ۱۰ دالتون جداسازی کرد. این روش مخصوصا برای جداسازی ترتیب طولانی از DNA مفید است. امروزه ژل های آگارز- آکرلامید به طور گسترده در آزمایشگاه های ژنتیک برای تعیین نقشه ژن ها استفاده می شود این فصل بروی جداسازی پروتئین ها متمرکز است. ترمینولوژی برای تکنیکهای تجزیه ای، مهاجرت الکترونی با لوله موئینه:

تکنیکهای مهاجرت الکترونی با لوله موئینه به طور افزاینده ای در شیمی تجزیه محبوب و مهم شده اند به خصوص در بیوتجزیه. بعضی از ترمینولوژی های وابسته در کاغذ یافت می شوند در ترمینولوژی الکتروفورز در شیمی کلینیکی. اما در بسیاری از موارد اینها برای تکنیکها کاپیلاری کاربردی نیستند و در تعاریف آیوپاک به حساب نمی آیند. در ۱۹۹۴ آقای KNOX مقاله ای را در زمینه تکنیکهای جداسازی الکترونی منتشر کرد اما این مقاله هماهنگ با فهرست علائم کروماتوگرافی آیوپاک نبود مقاله جاری بحث می کند و تعریف می کند جمله های وابسته مورد نیاز در تامین جاری، شامل نامهای تکنیکهای مختلف که در اصول مهاجرت الکترونی استفاده می شود و آن باید مورد توجه قرار بگیرد که تعداد موارد مرزی موجود با

ترتیب و احترام به نامگذاری تکنیک های مخصوص اقدام کند. جداسازی با تکنیک های مهاجرت الکترونی کاپیلاری در لوله موئینه باریک به وسیله اعمال میدان الکتریکی قوی به دست می آید این تکنیکها شامل کاپیلاری الکتروفورز و مشتقات تکنیکهای مهاجرت الکترونی کاپیلاری است که بر پایه اصول جداسازی متفاوت اند. در بعضی موارد این اصول دارای هم پوشانی هستند. میسلار کاپیلاری الکتروفورز برای جداسازی یونهای کوچک آلی و معدنی و پلیمرها رنگها، منفجر کننده ها، پروتئینها، پپتیدها و اسیدهای نوکلئیک استفاده می شود. جریان الکترواسمز برای جداسازی همکاری می کنند اگر چه همیشه مورد نیاز نیست. جریان الکترواسمز از تاثیر میدان الکتریکی بر روی بارها در قسمت پخش شده در لایه دوگانه در سطح داخلی کاپیلاری به وجود می آیند برای مثال در کاپیلاری فیوز سیلیکا در برخورد با بافر در PH بالای ۲ سطح گروه های سیلانول دیپروتونه شده و پروتون از دست می دهند و دیواره کاپیلاری بار منفی پیدا می کند. این گروه ها اتمسفر یونی را بالا می برند کاربرد میدان الکتریکی در کاپیلاری باعث می شود یونهای دارای بار مثبت به سمت کاتد حرکت کنند و آنیونها به سمت آنند حرکت کنند مزایای الکترواسمز شامل موارد زیر است:

۱- جداسازی خوب است

۲- زمان جداسازی کوتاه است

۳- مقدار نمونه مورد نیاز بسیار کم است

۴- هزینه تجزیه ای کم است

طول کاپیلاری بین ۲۰ تا ۱۰۰ سانتیمتر و قطر داخلی ۲۰ تا ۱۰۰

میکرومتر استدر جداسازی ملکولهای کوچک کاپیلاری فیوزسیلیکای

غیر پوشش دار استفاده می شود. دما و PH و قدرت یونی محلول

روی توزیع تاثیر می گذارد. در آینده کانالهای میکرو با ساختار چپ

مانند برای تکنیکهای مهاجرت الکترونی کاپیلاری با گسترش

نانوتکنولوژی استفاده می شود. اضافه شونده هایی مثل حلال های

آلی- سیکلودکسترین یا پلیمرها برای کنترل مهاجرت یا تولید پیک

تیز به کار می روند. سیکلودکسترین همچنین بعنوان قسمتی از

پوشش دیواره نیز به کار می رود. با استفاده از ملکولهای انتخاب گر

کایرال در سیستم ژل می توانیم ملکولهای کوچک کایرال را جدا کنیم.

در کاپیلاری الکتروفورز جداسازی در ستون کاپیلاری با پک های

مخصوص یا با مواد مونولیت است.

نمونه به دو طریق تزریق می شود: ۱- فشاری از طریق ایجاد خلا در

انتهای ستون کاپیلاری ۲- نمونه به صورت سینتیکی وارد می شود.

مونولیتها جداسازی عالی در زمان کوتاه انجام می دهند برای اینکه ستون با ذرات خیلی ریز پر نشود از مونولیت که از میله های متخلخل یک پارچه از جنس سیلیکا با دو نوع حفره است استفاده می شود. جریان الکترواسمز ناشی از باردار بودن دیواره کاپیلاری است. گونه های مثبت هدف گیری به سمت جداره لوله می کنند در نزدیک جداره چون مثبت هستند تمایل به قطب منفی هم دارند بنابراین حرکت می کنند و گونه های خنثی و منفی را در این مسیر می کشانند و در کاتد جمع می کنند. بارهای مثبت هم به لحاظ جریان الکترواسمزی و هم جریان الکتروفورزی به قطب منفی می روند در نتیجه بارهای مثبت زودتر از همه سیگنال آنها آشکار خواهد شد و به دتکتور می رسند جریان الکترواسمزی در نهایت به جریان الکتروفورزی می چربد در کاپیلاری الکتروفورز ضریب اصطکاک ناشی از حلال است که پدیده حلال پوشی را انجام داده است و ضریب اصطکاک با سرعت حرکت گونه رابطه عکس دارد. اساس الکتروفورز بر مبنای مهاجرت یونها در میدان الکتریکی در محلول بافر در لوله موئینه است. تکنیکهای مهاجرت الکترونی کاپیلاری CE کاپیلاری الکتروفورز ساده ترین فرم است.

CZE: کاپیلاری الکتروفورز منطقه ای. الکتروفورز معمولی است و ترکیب بافر ثابت است. برای جداسازی یونهای کوچک کربوهیدراتها و امینواسیدهای کوچکتر استفاده می شود. نمونه به صورت یک باند باریک جداسازی می شود که اطراف آن را بافر احاطه کرده است وقتی میدان الکتریکی اعمال می شود هر کدام از اجزای شرکت کننده نمونه به صورت منطقه های متفاوتی جدا می شوند جداسازی بر اساس تحرک آن گونه هاست از معایب این روش این است که ملکولهای خنثی جدا نمی شوند.

CAE کاپیلاری افینیتی الکتروز

CSE: کاپیلاری الکتروفورز الک کردن

تکنیکی که در کاپیلاری اتفاق می افتد شامل محیط الک مانند است مثل شبکه پلیمری در پیش زمینه ای از الکتروولیت است جداسازی بر پایه تفاوت در سایز و شکل بار آنالیت است.

CEG: کاپیلاری ژل الکتروفورز

یک سری ماتریکس ها و ترکیبات پیچیده پلیمری مثل ژل های پلی آکریلامید (ژلهای خلل و فرج دار) همراه محلول بافر استفاده می کنیم و حفره ها باعث می شوند مکانیزم های اضافی برای جداسازی داشته باشیم و ژل مانند الک عمل می کند آنهایی که درشت تر هستند در

حفره های ژل گیر می افتند این روش برای مولکولهای بزرگ مثل پروتئین ها و اسیدهای نوکلئیک مفید است.

CIEF کاپیلاری ایزوالکتری فوکاسینگ

تکنیک الکتروفورز برای جداسازی مواد آمفوتر است. از تفاوت نقطه ایزوالکتریک حل شونده استفاده می شود و ترکیب بافر مرتبا تغییر می کند در هر لحظه یکی از گونه ها به نقطه ایزوالکتریک خودش می رسد و خنثی می شود و حرکت الکتروفورز متوقف می شود و گونه ها از هم تفکیک می شوند.

CITP کاپیلاری ایزوتاگوفورز:

در این روش دو نوع بافر متفاوت به کاتد و آند تزریق می شوند مثلاً از کاتد یک بافر بازی و از آند یک بافر اسیدی تزریق می شود که تحرک این دو بافر یکی بیشتر از گونه مورد جداسازی و یکی کمتر است در نتیجه گونه های مورد جداسازی بین دو لایه بافری محصور شده و با پهن شونده کمی کمتر جداسازی انجام می شود.

EKC الکتروکینتیک کروماتوگرافی:

تکنیک جداسازی بر اساس ترکیب الکتروفورز و برخوردهای آنالیت با سورفکتانتها در فاز پخش شده با سرعتهای مختلف است.

MEKC میسلار الکتروکینتیک کروماتوگرافی:

نوع خاصی است که در آن فاز ثانویه فاز پخش شده میسلار است. مسیله‌ها دارای سر هیدروفیل و دم آب‌گریز هستند و به انواع کاتیونی آنیونی و زوئتریون و خنثی تقسیم می‌شوند میسل‌ها به عنوان فاز ساکن کاذب عمل می‌کنند.

MEEKC میکرو مولژن الکتروکینتیک کروماتوگرافی:

نوعی خاصی است که در آن میکرومولژن‌ها بعنوان فاز پخش شده به کار می‌روند.

CEC کاپیلاری الکتروکروماتوگرافی

نوع خاصی از کروماتوگرافی مایع لوله موئینه که حرکت در فاز متحرک در لوله موئینه به وسیله جریان الکترواسمزیست و زمان بازداری از ترکیب مهاجرت الکتروفورزی و بازداری کوروماتوگرافیک به دست می‌آید.

انتخاب پذیری این روش از دو روش **CE** و **LC** بیشتر است و لوله‌های فیوزسیلیکا از پرکننده‌هایی مثل متیل آکریلامید پر شده‌اند. کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا ستون از بشقابکهای تشکیل شده است. هر چه تعداد بشقابکها بیشتر باشد و ارتفاع ستون کمتر باشد بهتر است.

$$H = A + \frac{B}{U} + CU$$

عوامل پهن شونده:

A: نفوذ گردابی است و مستقل از سرعت حرکت فاز متحرک است.

نمونه به همراه فاز متحرک پایین می آید و مسیر مارپیچی طی می

کند. نفوذ گردابی به نوع پر کردن بستگی دارد. اگر پرکردن ستون

نامنظم باشد و ذراتی که داخل ستون می ریزیم ابعاد مختلف داشته

باشند فضاهای خالی زیاد و نمونه از آن فضاها عبور کند باعث پهن

شوندگی می شوند و نمونه با زمانهای متفاوت به دکتور می رسند.

U: سرعت فاز متحرک

B: نفوذ طولی است و با سرعت نسبت عکس دارد. اگر سرعت خیلی

زیاد باشد نمونه فرصت زیادی برای پخش شدن در جداره های

مختلف ندارد. و اگر سرعت را کم بکنیم احتمال نفوذ زیاد می شود و

به خاطر کشش سطحی به دیواره ستون کشیده می شود. زمان

بازداری طولانی تری را خواهد داشت.

C: انتقال جرم غیر تعادلی است. اگر تعادل بین دو فاز به صورت

منظم انجام نشود باعث پهن شونده می شود و انتقال جرم غیر

تعادلی با سرعت فاز متحرک نسبت مستقیم دارد.

در الکتروفورز به جای اینکه از فلوی فشاری استفاده کنیم از فلوی

الکتریکی استفاده می کنیم و دو طرف ستون میدان الکتریکی قرار می

دهیم گونه های مثبت به سم قطب منفی می روند و برعکس. الکتروفورز اعمال جریان الکتریکی به جای فشار در سیستمهای کروماتوگرافی مایعی است. اعمال جریان به سادگی نیست و اختلاف تحرک یونها برای مهاجرت از طریق جاذبه یا دافعه در میدان الکتریکی باعث جداسازی در سیستم الکتروفورز می شود. در الکتروفورز علت اصطکاک حلال است و حلال معمولاً آب است. در کاپیلاری الکتروفورز دو بشر حاوی محلولهای بافر هستند محلولهای بافر تنظیم کننده PH هستند. طول کاپیلاری ۶۰ سانتیمتر و قطر داخلی آن ۷۵ میکرومتر است. در شیشه نمونه قرار دارد و سیستم بالایی دکتور ماوراء بنفش است. سیستم در داخل آون دمپا در حدود ۲۰ تا ۳۰ درجه سانتیگراد قرار دارد. دما روی تحرک یونها تاثیر می گذارد. بار جداره کاپیلاری منفی است. اولین لایه اطراف گونه (لایه مثبت) بارهای مثبت نمونه و بار منفی جداره کاپیلاری است. بقیه بارهای مثبت تمایل دارند به جداره منفی نزدیک بشوند بنابراین متحرکند و بار مثبت در نزدیک جداره بیشتر از وسط لوله است. کاپیلاری الکتروفورز و میسلر الکتروکینتیک کروماتوگرافی با آشکار ساز لیزر کاهش یافته فلورسانسی بعنوان وسایل تجزیه ای برای تعیین آمینواسیدهای مهم کلینیکی:

تجزیه آمینواسیدها در سیالهای بدن شامل جداسازی مخلوطی از اسیدها، بازها و ترکیبات خنثی است. زمانی که بیشتر آمینواسیدها به جز فنیل آلانین، تیروزین، تریپتوفان نیاز به گروه قوی کروموفوریک دارند جذب مستقیم یا آشکار کردن فلورسانسی ممکن نیست و مشتق شدن به طور معمول برای کمیت استفاده می شود. زمانی که HPLC تکنیک تجزیه ای محبوبی برای تعیین آمینواسیدها در سیالهای بدن بود از اشکالات زیر برخوردار بود:

۱- نیاز به استفاده از گرادیان شستشو برای جداسازی ترکیبات

مورد نیاز در مدت زمان لازم

۲- مصرف مشخصی از حلال و نیاز به همراه برای خارج کردن حلال

اضافی

۳- حجم تزریق نسبتاً زیادی برای تجزیه نیاز است.

امروزه CE دارای مزایای زیر است:

۱- تجزیه سریع بدون احتیاج به گرادیان شستشو

۲- جداسازی نمونه به وسیله پتانسیل است که به اجزای متحرک

پمپ می شود

۳- هدر شدن ناچیز حلال

۴- پیشرفت مشخص در یافتن جرم ها به خاطر حجم کم تزریق

۵- استفاده گسترده از نمونه های آبی که تاثیر جداسازی CE را افزایش می دهند

در این مثال نویسنده درباره آشکار ساز LIF بحث می کند تا تهیه کنند به حد زیادی سطوح پایین آشکار سازی آمینواسیدها را با استفاده از چندین ناحیه مختلف فلورسانس در محدوده وسیعی از نمونه های کلینیکی بیولوژیکی با استفاده از CE و MCE به طور نمونه حساسیت در محدوده 10^{-11} مولار به دست می آید با حداقل آشکار سازی کوانتایی در ناحیه زتامول.

روشها و مواد:

سیستم CE مورد استفاده است در وسایل Zeta اتوماتیک CE و اسپکتروفلوریمتری ۱۰۰ هر دوی اینها تجهیز شده اند با آشکار ساز LIF. فلورسانس قراردادی با موفقیت به کار برده می شود در HPLC در زمینه آشکار سازی محدود به 10^{-11} تا 10^{-12} مول بر لیتر. حساسیت می تواند به طور قابل ملاحظه ای با افزایش قدرت منبع نور مونوکروماتیک به وجود بیاید. زمانی که سیگنال فلورسانس مشاهده شده متناسب با قدرت تهییج کاربردی باشد.

برای این منظور سیستم لیزر مفید است زیرا منبع نور تهیه می کند به طور گسترده تعداد زیادی پرتوهای نوری موازی از

مونوکروماتیک رادیویی با قدرت خروج چندین وات. در سیستمهای آشکار ساز LIF قدرت تهییج شاید افزایش یابد ۴ تا ۶ برابر بزرگی مقایسه با آشکار کردن فلورسانس قراردادی. نتیجتاً نسبت سیگنال به نویز خیلی بهتر می شود. ضمناً پیش زمینه سیگنال نویز احتمالاً بالا می رود به خوبی نتیجه تشدید کردن پراکندگی تهییج رادیویی. لابراتورهای مختلف آشکار سازهای LIF را در چند سال گذشته گسترش داده اند. آنها ابتدا از HPLC استفاده کرده اند و بعداً از CE

توصیف آشکار ساز لیزر کاهش یافته فلورسانسی: آشکار ساز لیزر کاهش یافته فلورسانس زتا آشکار می کند آرایش هایی که در یک خط مستقیم واقع شده اند و استفاده می کنند ۲mm از قطر لنز توپی یاقوت را برای تجمع تمام انرژی لیزر به درون قطر کاپیلاری. این طراحی تجمع فلورسانس را بزرگ می کند. لیزرها و فیلترهای مورد استفاده در دتکتور حساسیت را بالا می برند.