

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie



Tomáš Novotný

**Změny základního elektrolytu způsobené elektrolýzou
při průběhu kapilární zónové elektroforézy**

Changes in the background electrolyte caused by electrolysis in
capillary zone electrophoresis

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: Prof. RNDr. Bohuslav Gaš, CSc.

Praha, 2019

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci zpracoval samostatně pod vedením školitele Prof. RNDr. Bohuslava Gaše a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu.

Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne

.....

Podpis

Abstrakt

Elektrodové reakce jsou nevyhnutelným vedlejším jevem standardní separace kapilární zónovou elektroforézou. Elektrolytické produkty vznikající následkem elektrolýzy vody, ke které dochází ve většině využívaných konfigurací, mohou způsobit postupné změny základního elektrolytu nacházejícího se v zásobních vialkách a uvnitř křemenné separační kapiláry. Degradací základního elektrolytu dochází ke snížení přesnosti a reprodukovatelnosti experimentů provedených kapilární zónovou elektroforézou. Změny ve složení základního elektrolytu jsou významně ovlivněny samotným složením výchozího pufu, kdy různé elektrolyty mají různou tendenci se s časem degradovat. Správný výběr složení a správná manipulace se základním elektrolytem v elektrodových vialkách může vést k vyšší přesnosti a reprodukovatelnosti provedených experimentů.

Klíčová slova:

Kapilární zónová elektroforéza, elektrolýza, základní elektrolyt, bezkontaktní vodivostní detekce

Abstract

Electrode reactions are one of the inevitable side effects which occur during standard separation measurement on capillary zone electrophoresis. Electrolytic products arising from the electrolysis of water, which is the main process occurring at the electrodes in the majority of cases, can cause changes in background electrolyte located in vials and inside the separation capillary. The precision and reproducibility of the separation experiments is decreased due to the degradation of background electrolyte in capillary zone electrophoresis. Changes in the background electrolyte are highly dependent on the composition of the buffer itself: some electrolytes are changed more than the others within the same configuration of the experiment. A correct choice of the buffer with the right manipulation of the background electrolyte leads to higher precision and reproducibility of the separation measurements.

Keywords:

Capillary zone electrophoresis, electrolysis, background electrolyte, contactless conductivity detection

Poděkování

Touto cestou bych rád poděkoval svému školiteli, Prof. RNDr. Bohuslavu Gašovi, CSc., za trpělivé vedení bakalářské práce, především za cenné rady, ochotu, přátelský a osobitý přístup a čas, který mi poskytl.

Mé poděkování patří též Mgr. Milanu Boublíkovi za užitečné podněty a rady s experimentálním ověřením teoretického modelu.

Obsah

1	Úvod	8
2	Literární přehled	9
2.1	Kapilární zónová elektroforéza	9
2.1.1	Elektroosmotický tok	9
2.1.2	Způsoby detekce látek při měření na kapilární elektroforéze	10
2.1.3	Výběr a optimalizace složení BGE	11
2.2	Koncentrační změny BGE jako projev elektrodových reakcí	12
3	Cíle práce	15
4	Výsledky práce	16
4.1	Model pro výpočet koncentračních a vodivostních změn	16
4.2	Experimentální ověření teoretického modelu	20
4.2.1	Použité chemikálie, přístroje a software	20
4.2.2	Postup experimentálního ověření teoretického modelu	21
5	Výsledky a diskuze	26
5.1	Experimentálně stanovené vodivostní změny	26
5.1.1	Kalibrace vodivostního detektoru	26
5.1.2	Stanovení relativních vodivostních změn BGE	28
5.2	Výsledky vodivostních změn dle teoretického modelu	30
5.2.1	Stanovení elektroosmotického toku	30
5.2.2	Výpočet koncentračních změn BGE	32
5.2.3	Výpočet měrné vodivosti a vodivostních změn	34
5.2.4	Změna pH základních elektrolytů	36
5.3	Porovnání teoretického modelu s experimentem a diskuze	38
6	Závěr	41
7	Literatura	43

Seznam použitých zkratek

CZE	kapilární zónová elektroforéza
BGE	základní elektrolyt
CCD	bezkontaktní vodivostní detektor
GC	plynová chromatografie
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
DAD	spektrofotometrický detektor s diodovým polem
EOF	elektroosmotický tok
UV-Vis	ultrafialová a viditelná oblast spektra
UV	ultrafialová oblast spektra
Form/Li, 20/9,3	pufr složený z kyseliny mravenčí ($c = 20 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$) a hydroxidu lithného ($c = 9,3 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$)
Ac/Li, 20/8,9	pufr složený z kyseliny octové ($c = 20 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$) a hydroxidu lithného ($c = 8,9 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$)
Form/Am, 20/8,3	pufr složený z kyseliny mravenčí ($c = 20 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$) a amoniaku ($c = 8,3 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$), pufrující složkou je kyselina mravenčí
Am/Form, 20/10	pufr složený z amoniaku ($c = 20 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$) a kyseliny mravenčí ($c = 10 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$), pufrující složkou je amoniak
DMSO	dimethylsulfoxid
EU	elektroforetická jednotka, odpovídá $10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$
EMD	elektromigrační disperze

1 Úvod

Kapilární zónová elektroforéza je v současné době jednou z významných separačních metod umožňující separaci elektricky nabitých analytů v elektrickém poli dle jejich rozdílné elektroforetické mobility. Oproti běžně využívaným separačním metodám GC a HPLC poskytuje kapilární zónová elektroforéza řadu výhod, jako jsou mj. nízké pořizovací náklady separačních kapilár a chemikálií, snadná výměna použitých pufrů či minimální úprava vzorku před separací. Často využívané vodné prostředí spolu s nízkými objemy odpadních produktů činí z kapilární zónové elektroforézy šetrnou instrumentální metodu vzhledem k moderním požadavkům na ochranu životního prostředí. Značnou výhodou užití kapilární zónové elektroforézy je vysoká dosažená účinnost, která umožňuje oddělení velkého množství analytů v krátkém čase. Velký důraz při průběhu separačních měření na kapilární zónové elektroforéze je kladen na přesnou reprodukovatelnost provedených měření. Té je dosaženo v takovém případě, jsou-li v kapiláře zachovány konstantní podmínky ve všech po sobě následujících experimentech.

Významným vedlejším jevem při průběhu separace je přítomnost redoxních reakcí na elektrodách. Produkty elektrodoových reakcí mění složení základního elektrolytu (background electrolyte, BGE) v elektrodoových nádobkách – vialkách a mohou tedy během experimentů měnit rychlost elektroosmotického toku, pH pufru v kapiláře a s tím související efektivní mobility analytů. Všechny zmíněné vedlejší nežádoucí jevy přispívají ke snížené reprodukovatelnosti a přesnosti prováděných experimentů. Pro přesné měření je třeba výše zmíněné nežádoucí jevy minimalizovat a udržovat tak stále stejné podmínky v separační kapiláře a zásobním roztoku BGE pro všechna po sobě jdoucí měření.

2 Literární přehled

2.1 Kapilární zónová elektroforéza

Kapilární zónová elektroforéza (CZE) je jednou z nejvyužívanějších elektromigračních metod založených na rozdílných elektroforetických pohyblivostech – mobilitách – elektricky nabitých látek. Základní uspořádání CZE je tvořeno dvěma zásobními vialkami spojenými kapilárou naplněnou základním elektrolytem (BGE), který umožňuje vést kapilárou elektrický proud. Uspořádání CZE nabízí vysokou účinnost separace a představuje řadu výhod oproti běžným chromatografickým metodám, jako je krátký separační čas či nízká spotřeba chemikálií [1].

2.1.1 Elektroosmotický tok

Elektroosmotický tok (EOF) je nedílným průvodním jevem téměř všech separačních měření v kapilární zónové elektroforéze. Jeho přítomnost a chování je třeba stanovovat při všech experimentech, jelikož EOF je subtilní projev měření v elektroforéze, který je značně závislý na pH, iontové síle a momentálním stavu povrchu vnitřní stěny kapiláry [2]. Elektroosmotický tok je způsoben přítomností ζ -potenciálu na vnitřním povrchu křemenné kapiláry jako důsledek disociace silanolových skupin povrchu stěny. Silanolové skupiny na povrchu křemenné kapiláry začínají být ionizovány v okolí pH 3,0 a jsou zcela disociovány v prostředí o pH > 8,0 [3]. Při použití BGE o pH blízkém hodnotě 3-4, kdy silanolové skupiny jsou jen málo disociovány, nabývá mobilita EOF jen malých a nestabilních hodnot. Naproti tomu v případě úplné disociace, při pH vyšším než 8, je hodnota mobility EOF několikanásobně vyšší a stabilnější.

Přítomnost EOF je nevyhnutelnou součástí užívání křemenných kapilár, které nemají vnitřní povrch pokryt vrstvou ovlivňující zeta potenciál. V řadě případů, například při separaci aniontů, je EOF při dostatečně velké mobilitě účinným pomocným tokem, díky kterému lze anionty přivést k detektoru i přes jejich přirozeně protisměrný směr

migrace. Zároveň je třeba mít na paměti, že elektroosmotický tok analyty neseperuje, pouze přečerpává všechny přítomné látky z jedné zásobní vialky do druhé. Již po mnoho let je známo, že elektroosmotický tok v křemenné kapiláře je možné pokrytím vnitřního povrchu kapiláry modifikovat – zastavit či úplně převrátit v závislosti na potřebách konkrétního separačního měření [4, 5].

2.1.2 Způsoby detekce látek při měření na kapilární elektroforéze

Stěžejními detekčními metodami užívanými v analýze CZE jsou optické metody vycházející z interakce elektromagnetického vlnění o určité vlnové délce s analytem [6]. Nejčastěji používanou detekční metodou CZE je detekce v UV-Vis části spektra. Fluorescenční detekce nabízí sice ještě výrazně vyšší citlivost, její použití je však méně univerzální v porovnání s běžnou UV-Vis detekcí. Pro analyty, které neabsorbují v požadovaném intervalu vlnových délek, se nabízejí další možné alternativy detekce. Často používanou metodou je detekce pomocí nepřímé UV absorpce, během které absorbuje záření základní elektrolyt namísto analytu. Přítomnost analytu na detektoru je zaznamenána jako změna koncentrace absorbujícího BGE, díky čemuž dojde ke změně absorpce a příslušnému signálu.

Nepříliš komerčně používanou, ovšem velmi univerzální detekční metodou, je bezkontaktní vodivostní detekce (CCD). Bezkontaktní vodivostní detekce umožňuje stanovení měrné vodivosti uvnitř křemenné kapiláry, aniž by elektrody byly ve styku s migrujícími analyty a BGE. CCD detekce umožňuje stanovení všech analytů, které mají odlišnou vodivost od základního elektrolytu, pro neabsorbující analyty je vodivostní detekce zvláště výhodná, jelikož její citlivost je vyšší než v případě nepřímé UV detekce [7]. Podobně jako u nepřímé UV detekce i v bezkontaktní vodivostní detekci je možné analyzovat změny a poruchy základního elektrolytu, tzv. systémové píky, které mohou v určitých případech způsobovat značné komplikace v separaci analytů [8]. Pomocí CCD detekce lze měřit změny týkající se separačního systému, například změny v měrné vodivosti vznikající jako důsledek koncentračních změn základního elektrolytu vlivem

elektrodových procesů. Zařízení CZE firmy Agilent v současné době neposkytuje komerčně dostupné vodivostní detektory, i přesto však je možné na jejich přístrojích vodivostní detekci měřit – naše laboratoř vyvinula pro podobné použití konstrukci bezkontaktního vodivostního detektoru [9].

2.1.3 Výběr a optimalizace složení BGE

Základní elektrolyt přítomný v separační kapiláře a v zásobních vialkách na ústích kapiláry hraje důležitou roli v celkovém separačním procesu v CZE. Mezi nejvýznamnější funkce BGE patří vedení elektrického proudu a udržování stálých hodnot pH v průběhu celého měření. Standardně se pro sestavení BGE používají elektrolyty, slabé kyseliny, resp. báze, společně se silnými bázemi, resp. kyselinami, za účelem vytvoření pufru o vhodném pH. V řadě případů je výhodné použití amfolytů při přípravě BGE díky jejich stabilnějšímu chování při průběhu dlouhých separačních měření [10].

Díky správnému složení BGE pro konkrétní sérii separačních měření je možné dosáhnout vhodných podmínek na základě optimalizace parametrů uplatňujících se v kvalitě provedeného měření. Je-li koncentrace analytu alespoň stokrát menší než koncentrace BGE, je při vhodně zvolených složkách BGE možné dosáhnout nízké hodnoty elektromigrační disperze (EMD), a tedy vyššího rozlišení [11]. Častým problémem separace proteinů je jejich adsorpce na záporně nabitou stěnu kapiláry. Vysoká koncentrace koiontů BGE může poté zlepšit kvalitu rozlišení díky kompetitivní adsorpci koiontů a analyzovaného proteinu na stěnu křemenné kapiláry [11]. Mobilita EOF je silně závislá na pH separačního prostředí, BGE, zároveň je určena koncentrací základního elektrolytu [11]. Rychlost EOF lze tedy optimalizovat vhodným složením pufrů.

Rušivým jevem doprovázejícím elektroforetické měření jsou systémové píky. Systémové píky vznikají jako důsledek lokální poruchy (změny koncentrace) v axiální distribuci BGE, běžně je možné se s nimi setkat jako následek dávkování analytu, během kterého se vytvoří lokální porucha na místě nadávkovaného vzorku. Systémové píky

následně migrují kapilárou s jistými mobilitami, počet systémových píků odpovídá celkovému počtu složek elektrolytů tvořících BGE. Blíží-li se mobilita systémového píku mobilitě jednoho ze separovaných analytů, dochází k rezonančnímu efektu, podobně jak je tomu v případě elektrických či mechanických oscilací, následkem čehož není možné kvantitativní stanovení analytu a vyhodnocení měření [8, 12, 13]. Pro optimalizaci separačního prostředí je třeba sestavit takový pufr, jehož mobility systémových zón budou vzdáleny od mobilit měřených analytů. Metoda zkusemého výběru vhodných elektrolytů je možná, nicméně časově neúsporná, a proto je efektivnější využití simulačních programů [14]. Mobility systémových zón jsou rovny vlastním hodnotám matice M , podle vztahu (1):

$$\frac{\overrightarrow{\partial c}}{\partial t} = -\frac{j}{\kappa_{BGE}} M \frac{\overrightarrow{\partial c}}{\partial x} \quad 1$$

Pro výpočet mobility systémových zón je zapotřebí speciální software. Jediným softwarem pro výše zmíněné výpočty je program PeakMaster, který byl vyvinut v naší skupině na základě linearizovaných rovnic vycházejících z rovnice kontinuity [15]. Pomocí programu PeakMaster lze teoreticky navrhnout složení BGE tak, aby rušivé vlivy byly minimalizovány.

2.2 Koncentrační změny BGE jako projev elektrodových reakcí

Přesnost a reprodukovatelnost separačních měření na kapilární zónové elektroforéze může být negativně ovlivněna řadou rušivých jevů, které více či méně narušují průběh prováděných experimentů. Separace analytů v módu CZE probíhá pomocí zdroje vysokého napětí, přítomnost elektrod a s nimi spojené elektrodové reakce jsou tedy nevyhnutelnými vedlejšími projevy separačního procesu. Produkty elektrodových reakcí vznikají na příslušných elektrodách a následně na základě koncentračního gradientu procházejí difuzí do celého objemu zásobních vialek BGE. Pomocí simulačního programu založeného na software COMSOL je možné pozorovat propagaci produktů elektrodových reakcí a jejich progresivní vstup do ústí kapiláry. Při malé vzdálenosti ústí

kapiláry a příslušné elektrody může být efekt elektrodových produktů vstupujících do kapiláry velký, jelikož má za následek značnou změnu vnitřního prostředí separační kapiláry. Macka testoval závislost pozice kapiláry vůči přítomné elektrodě a došel k závěru, že pro málo pufované BGE je reprodukovatelnost experimentů snižena, je-li ústí separační kapiláry v blízkosti elektrody či v pozici nad elektrodou [16]. V běžném komerčním instrumentálním zapojení CZE firmy Agilent však k podobnému jevu nedochází, jelikož ústí separační kapiláry je umístěno 4 a více milimetrů pod elektrodou. V zařízení je zároveň umístěna membránová pumpa, která způsobuje vibraci celého přístroje a tím napomáhá homogenizaci základního elektrolytu v zásobních vialkách. Do kapiláry poté nevstupují koncentrované elektrolytické produkty vytvořené na povrchu elektrod, jelikož je těmito vibracemi obsah vialek promícháván. Pokud tedy do kapiláry vstupuje BGE z vialky – například jako důsledek přítomnosti EOF – jedná se pouze o rovnoměrně pozměněný a homogenizovaný elektrolyt.

Při použití běžných elektrolytových systémů dochází ve většině případů při průběhu separačního měření nikoliv k elektrolýze složek BGE, ale k elektrolýze vody, během které na anodě vznikají molekuly O_2 a na katodě molekuly H_2 [17, 18]. Koncentrační změny v důsledku elektrolýzy vody i změny pH elektrolytů v obou vialkách jsou úzce spojeny s použitým typem BGE, jelikož pufr složený z elektrolytů o vysoké efektivní mobilitě vedou k větším koncentračním změnám v zásobních vialkách, zároveň jejich použití má za následek vysoké hodnoty procházejícího proudu, tedy i vyšší míru tvorby elektrolytických produktů pramenící z Faradayova zákona. Elektromigrace iontů tvořících BGE vede k postupným změnám pH zásobních vialek, přičemž na anodě dochází ke snižování hodnoty pH, zatímco na katodě dochází ke zvyšování hodnoty pH [19, 20]. Přítomnost elektroosmotického toku dále tyto jevy komplikuje, protože se pozměněný elektrolyt dostává ze zásobní vialky do prostředí separační kapiláry a následně do druhé vialky, kde tedy dochází k postupné změně původního elektrolytu. Změny pH elektrolytu v kapiláře vycházející z elektrodových reakcí zároveň mohou měnit během průběhu separace ζ -potenciál stěny kapiláry, což vede ke kontinuální změně velikosti mobility EOF. To vše je doprovázeno změnou efektivní mobility analytů a měrné vodivosti BGE. Všechny zmíněné vlivy vedou ke snížení reprodukovatelnosti a robustnosti separace tím

více, čím méně je pufovaný zásobní roztok BGE [20]. Již změny v řádu 0,03 jednotky pH mohou negativně ovlivnit průběh a přesnost měřených experimentů [21].

Pro optimalizaci a udržení reprodukovatelnosti měření na CZE při řadě po sobě následujících experimentů se nabízí několik možných preventivních opatření. Prvním možným řešením je používání takových zásobních roztoků BGE, které jsou složeny z elektrolytů o nízké mobilitě. Pufry složené z takto vybraných elektrolytů mají při průběhu CZE za následek nižší koncentrační změny v zásobních vialkách oproti pufrům složeným z elektrolytů o vysoké mobilitě. Použitím amfolytů lze koncentrační změny vyvolané dlouhým průběhem několika po sobě jdoucích měření efektivně minimalizovat [10]. Druhou možností, pomocí které se lze vyhnout negativním vedlejším vlivům vyplývajícím z tvorby elektrolytických produktů, je častá výměna zásobních vialek [22]. Tím lze minimalizovat koncentrační a vodivostní změny, které snižují přesnost a reprodukovatelnost měřených experimentů. Při elektrokinetickém dávkování analytu doporučují někteří autoři měnit vialku s analytem po každém měření [23]. V neposlední řadě je možné předejít negativním vlivům vznikajících elektrodových produktů na separační proces CZE alternativní konfigurací, během které je prostor zásobní vialky s elektrodou oddělen od ústí samotné separační kapiláry [24]. V takto navrženém uspořádání je elektrodový prostor oddělený od kapiláry solným můstkem, díky čemuž se produkty elektrolýzy nemohou dostat do kontaktu s kapilárou a měřeními analyty. Podobné schéma může najít uplatnění při práci s málo pufovanými roztoky či při optimalizaci podmínek pro elektrolýzu na čipu [24]. V konvenční konfiguraci kapilární zónové elektroforézy firmy Agilent však podobné uspořádání není možné.

3 Cíle práce

- Analyzovat vliv elektrolýzy na degradaci základního elektrolytu v kapilární zónové elektroforéze
- Porovnat teoretický model pro výpočet vodivostních změn základního elektrolytu s experimenty

4 Výsledky práce

4.1 Model pro výpočet koncentračních a vodivostních změn

Pro výpočet relativních vodivostních změn BGE v zásobních vialkách na anodě, resp. katodě, je třeba nejprve vypočítat koncentrační změny, ke kterým dochází v důsledku elektroforetických mobilit příslušných elektrolytů tvořících BGE. Anionty tvořící zásobní elektrolyt migrují při průběhu separačního měření ke kladné elektrodě, anodě, zatímco kationty migrují k opačné záporné elektrodě, katodě. Pro výpočet změn látkového množství v jednotlivých zásobních vialkách jsme navrhli následující způsob, který dosud nebyl publikován.

Kapiláru sloužící k separaci analytů a spojující obě vialky si lze představit jako válec o délce, L , a průřezu, S . Objem takového válce poté získáme jako součin délky válce, L , a jeho průřezu, S , podle vztahu (2):

$$V = L \cdot S \quad 2$$

Použijeme-li obecně platné vztahy (3) a (4):

$$v = L \cdot t^{-1} \quad 3$$

$$S = \pi \cdot r^2 \quad 4$$

kde v představuje rychlost pohybu ve směru válce, L délku válce, t čas, za který elektricky nabitá částice přejde přes vzdálenost L , S průřez kapiláry a r její poloměr, můžeme objem válce vyjádřit pomocí rovnice (5):

$$V = v \cdot t \cdot \pi \cdot r^2 \quad 5$$

Dosažením vztahu (5) do všeobecně platné rovnice (6):

$$n = c \cdot V \quad 6$$

získáme rovnici (7) popisující vztah pro látkové množství migrující látky v objemu separační kapiláry, V :

$$n_i = c_i \cdot v_i \cdot t \cdot \pi \cdot r^2 \quad 7$$

kde n_i představuje látkové množství migrující i -té látky, c_i koncentraci migrující i -té látky a v_i rychlost, jakou se i -tá látka propaguje kapilárou. Rovnice (7) nám říká, jaké látkové množství migrující látky projde kapilárou o délce L za dobu t . Pokud nahradíme v_i v rovnici (7) za součin elektroforetické mobility migrující i -té látky, u_i , a intenzity elektrického pole v kapiláře, E , podle vztahu (8):

$$v_i = u_i \cdot E \quad 8$$

získáme vztah (9):

$$n_i = u_i \cdot E \cdot c_i \cdot t \cdot \pi \cdot r^2 \quad 9$$

Vztah (9) lze následně použít pro výpočet koncentračních změn, ke kterým dochází v důsledku úbytku záporně nabitých elektrolytů na katodě a jejich příbytku na anodě a opačně v případě kladně nabitých elektrolytů, které jsou přitahovány zápornou elektrodou. Látky jsou transportovány kapilárou z jedné zásobní vialky do druhé na základě

- (i) své vlastní efektivní mobility, kde hnací silou je rozdílný potenciál na příslušných elektrodách,
- (ii) a kvůli EOF, který je vyvolán ζ -potenciálem na stěnách nepokryté křemenné kapiláry.

Člen u_i v rovnici (8) a (9) představuje součet efektivní mobility i -té migrující látky a mobility EOF v příslušné konfiguraci daného pufru. Je třeba brát do úvahy skutečnost, že přítomnost EOF urychluje částice migrující ve směru elektroosmotického toku a naproti tomu zpomaluje částice migrující ve směru opačném. V případě standardního anodického směru EOF tedy budou urychleny kationty migrující od anody ve směru ke katodě, zatímco efektivní mobility aniontů budou sníženy o mobilitu EOF, jelikož jejich směr je opačný. Hodnotu mobility EOF není teoreticky možné stanovit, proto musí být její hodnota stanovena experimentálně pro každý konkrétní pufr a konkrétní kapiláru zvlášť. Příklad koncentračního úbytku aniontů na katodě lze zapsat podle následujícího vztahu (10):

$$c_{A,K,t} = \frac{n_{A,K,t}}{V_t} = \frac{n_{A,0} - n_A}{V_t} = \frac{c_{A,0} \cdot V_0 - u_A \cdot E \cdot c_A \cdot t \cdot \pi \cdot r^2}{V_t} \quad 10$$

kde $c_{A,K,t}$ značí koncentraci aniontů na katodě v čase t , $n_{A,K,t}$ látkové množství aniontů na katodě v čase t , $n_{A,0}$ počáteční látkové množství aniontů na katodě, n_A látkové množství aniontů, které ubylo v zásobní katodické vialce v důsledku migrace elektrolytu směrem k opačné elektrodě, V_t celkový objem vialky v čase t , $c_{A,0}$ počáteční koncentraci aniontů v zásobní vialce na katodě a V_0 počáteční objem zásobní katodické vialky.

Ze vztahu (10) je zřejmé, že nelze pro všechny případy ztotožnit počáteční objem BGE v zásobní vialce, V_0 , s celkovým objemem BGE v zásobní vialce v čase t , V_t , protože EOF přečerpává roztoky mezi vialkami. To je možné uvažovat pouze v případě, je-li EOF při průběhu měření nulový. Toho je možné dosáhnout ve velmi kyselých pufrách, kdy EOF je malý [25], či ve speciálně pokrytých, tzv. koutovaných kapilárách [5, 26]. Objemové změny způsobené migrujícími ionty tvořící BGE lze vzhledem k jejich nízké počáteční koncentraci a vzhledem k celkovému objemu zásobních vialek zanedbat. V této práci jsme uvažovali pouze objemové změny roztoků způsobené EOF.

Elektroosmotický tok má za následek čerpání všech látek z jedné zásobní vialky do druhé, čerpá všechny látky stejnou rychlostí bez ohledu na jejich elektrický náboj, nepodílí se tedy na separaci analytů. Má-li EOF rychlost v ve směru kapiláry, můžeme podle vztahu (8) při znalosti intenzity elektrického pole v separační kapiláře spočítat jeho mobilitu u a následně pro výpočet změny látkového množství BGE v zásobních vialkách můžeme použít identický vztah (9) jako v případě migrujících iontů. Základní elektrolyt v zásobních vialkách je vodným roztokem pufru tvořícího BGE. Jelikož koncentrace elektrolytů v BGE je oproti vodě nízká, lze ji zanedbat a dále uvažovat pouze přesun vody v rámci EOF. Změnu látkového množství vody lze tedy snadno spočítat ze vztahu (9), kde mobilita u_{EOF} odpovídá mobilitě EOF, kterou je třeba stanovit experimentálně pomocí elektroneutrálního markeru pro každý pufr zvlášť, jelikož jeho hodnota závisí na složení pufru, iontové síle, pH či teplotě [2].

Spočteme-li změnu látkového množství vody v zásobních vialkách za čas t , můžeme vyjít ze vztahu (6) a stanovit změnu objemu pro daný pufr. Koncentrace vody,

c_{H_2O} , v zásobních vialkách je během průběhu separačního měření pozměněna pouze rozdílnými změnami látkového množství jednotlivých elektrolytů tvořících BGE, kdy úbytek látkového množství aniontů je jiný než příbytek látkového množství kationtů na katodě a opačně v případě anody. V porovnání s látkovým množstvím vody v zásobních vialkách jsou však takové změny zanedbatelné, a proto lze považovat c_{H_2O} za konstantní po celou dobu probíhajících experimentů. Můžeme proto zavést vztah (11) sloužící k výpočtu objemu zásobních vialek po separačním měření v čase t :

$$V_t = \frac{n_t}{c_{H_2O}} = \frac{n_0 \pm n}{c_{H_2O}} = \frac{c_0 \cdot V_0 \pm u_{EOF} \cdot E \cdot c_{H_2O} \cdot t \cdot \pi \cdot r^2}{c_{H_2O}} \quad 11$$

kde n_t představuje látkové množství vody v zásobní vialce v čase t , n_0 značí počáteční látkové množství vody v zásobní vialce a n představuje změnu látkového množství vody za čas t , která byla přesunuta z jedné zásobní vialky do druhé jakožto důsledek mobility EOF. Znaménko ve vztahu (11) závisí na směru propagace EOF, záporné znaménko v případě standardního anodického směru EOF při použití nepokryté křemenné kapiláry, měříme-li objemovou změnu na anodě, kladné znaménko v případě standardního anodického směru EOF při použití nepokryté křemenné kapiláry, měříme-li objemovou změnu na katodě. Dosazením V_t do vztahu (10) lze následně spočítat všechny koncentrace elektrolytů tvořících BGE v čase t . Je zřejmé, že koncentrační změny budou v přítomnosti elektrického proudu s plynoucím časem růst. To je důvod snížené robustnosti elektroforetických separací v důsledku elektrolyzy v elektrodových nádobkách – vialkách.

Vyvstává otázka jak ověřit tento model změn elektrolytů experimentálně. Změny koncentrací jednotlivých iontů by bylo velmi obtížné a pracné měřit přímo. Naštěstí se nabízí pro tento účel využití měření vodivosti. Na základě koncentračních změn všech iontů ve vialkách spočtených podle rovnice (10), lze určit i měrnou vodivost BGE pro obě zásobní vialky s pozměněným základním elektrolytem. To už nelze tak jednoduše pomocí vzorců, ale pro tento účel lze s výhodou použít výpočetní engine použitý v našem software Simul 5 [27] či PeakMaster [28]. Porovnáním spočtených měrných vodivostí pozměněných elektrolytů na anodě, resp. katodě, s výchozím nepozměněným

elektrolytem lze předpovědět relativní změny v měrné vodivosti pro obě zásobní vialky a snadno tak ověřit validitu výše popsaného modelu. Naše laboratoř má k dispozici stabilní bezkontaktní vodivostní detektory, které jsou schopné měření vodivosti snadno provádět.

4.2 Experimentální ověření teoretického modelu

4.2.1 Použité chemikálie, přístroje a software

Pro přípravu pufrů sloužících jako základní elektrolyty byly použity následující chemikálie:

- hydroxid lithný, monohdrát (Honeywell Fluka, USA, >99,0%)
- kyselina mravenčí (Honeywell, USA, >95%)
- amoniak (Sigma-Aldrich, Německo, 28-30%)
- kyselina octová (Sigma-Aldrich, Německo, >99%)

Pro měření EOF byl použit elektroneutrální marker DMSO (Sigma-Aldrich, Německo, 99,9%).

K proplachu kapiláry byl použit 1M roztok NaOH (Agilent Technologies, Německo).

Pro kalibraci vodivostního detektoru byl použit chlorid draselný (LACHEMA n. p. Brno, Česká republika, >99,5%).

Základní elektrolyty byly následně připraveny a jejich vlastnosti byly změřeny za současného využití níže zmíněné instrumentace:

- pH-metr PHM 240 (MeterLab, Itálie)
- analytické váhy Mettler AE 240 (Mettler Toledo, Švýcarsko)
- injekční stříkačka 20 ml (B. Braun, Německo)
- teflonové filtry Minisart 0,20 μ l (Sartorius, Německo)
- pipety 500 μ l, 100-1000 μ l a 20-100 μ l (Eppendorf, Německo)

Pro zpracování a interpretaci naměřených výsledků byl využit následující software:

- MS Excel (Microsoft, USA)
- Origin 2018b (OriginLab, UK)
- ChemStation B.01.03 (Agilent Technologies, Německo)
- PeakMaster 5.3 (skupina prof. Gaše, Česká republika)
- Simul 5 (skupina prof. Gaše, Česká republika)

Vlastní měření bylo provedeno na kapilární zónové elektroforéze G7100A (Agilent Technologies, Německo) za současné přítomnosti CCD detektoru (skupina prof. Gaše, Česká republika) a UV-Vis detektoru s diodovým polem DAD v rozsahu vlnových délek 190-600 nm. Samotné experimenty byly uskutečněny v tenké křemenné kapiláře potažené zevnějšku vrstvou polyimidu s vnitřním průměrem 50 μm a vnějším průměrem 375 μm (Labicom s.r.o., Česká republika). Bylo pracováno při napětí 20 kV při délce kapiláry 48 cm; intenzita elektrického pole uvnitř kapiláry byla 41 667 V/m. Vzdálenost k DAD detektoru od počátku kapiláry byla 39,5 cm, vzdálenost k CCD detektoru byla 33 cm.

4.2.2 Postup experimentálního ověření teoretického modelu

Byly připraveny pufrы o následujícím složení:

Tabulka 1, složení základních elektrolytů

	Složka č. 1	Složka č. 2
Pufr 1	kyselina mravenčí, $c = 20 \text{ mM}$	amoniak, $c = 8,3 \text{ mM}$
Pufr 2	kyselina octová, $c = 20 \text{ mM}$	hydroxid lithný, $c = 8,9 \text{ mM}$
Pufr 3	kyselina mravenčí, $c = 20 \text{ mM}$	hydroxid lithný, $c = 9,3 \text{ mM}$
Pufr 4	amoniak, $c = 20 \text{ mM}$	kyselina mravenčí, $c = 10 \text{ mM}$

Pufry byly přefiltrovány a následně bylo změřeno pH jednotlivých roztoků. V programu Simul 5 byla spočtena specifická vodivost příslušných roztoků na základě koncentrací viz Tabulka 1. Fyzikálně-chemické vlastnosti takto připravených roztoků jsou popsány v Tabulce 2:

Tabulka 2, fyzikálně-chemické vlastnosti připravených základních elektrolytů

BGE	pH	κ [$S \cdot m^{-1}$]
Pufr 1	3,588	0,1113
Pufr 2	4,621	0,06603
Pufr 3	3,669	0,08935
Pufr 4	9,291	0,1209

Před počátkem experimentálního ověření teoretického modelu koncentračních a vodivostních změn BGE bylo třeba připravit instrumentální sestavu. Byla připravena křemenná nepokrytá kapilára o délce 48 cm, na které byl následně vypálen polyimid kryjící kapiláru ve vzdálenosti 8,5 cm od konce kapiláry. Takto upravená kapilára byla následně umístěna do kazety s vodivostním detektorem a okénkem pro DAD detekci.

Z přístroje pro kapilární elektroforézu byly vyjmuty platinové elektrody a hadičky sloužící k aplikaci tlaku na koncové vialky – tyto součásti instrumentálního uspořádání byly ponořeny do ultrazvukové lázně v deionizované vodě, resp. propan-2-olu, po dobu 10 minut pro oba případy. Po vyčištění elektrod a tlakových hadiček byl přístroj sestaven včetně kazety s připravenou křemennou kapilárou. Před použitím byla kapilára propláchnuta 1M roztokem NaOH po dobu 5 minut, díky čemuž byly odstraněny nečistoty na vnitřním povrchu křemenné mikrokapiláry.

Vlastní experimenty byly provedeny pro každý pufr zvlášť v experimentálním uspořádání totožném pro všechny měřené pufry. Před počátkem samotného průběhu elektrolýzy byla kapilára propláchnuta příslušným pufrem (Pufr 1-4) po dobu 5 minut při

tlaku 940 mbar. Pomocí elektroneutrálního markeru byla následně stanovena mobilita EOF pro daný pufr: hydrodynamicky byl nadávkován DMSO jako elektroneutrální marker (150 mbar · s), jehož elektroforetická mobilita je nulová, tudíž jeho pohyb v kapiláře vychází výhradně z pohybu způsobeným mobilitou EOF. Elektroneutrální marker byl detekován pomocí UV-Vis DAD detektoru při vlnové délce 210 nm, jelikož DMSO absorbuje v UV oblasti spektra. Mobilita DMSO, která odpovídá mobilitě EOF, byla stanovena pomocí vzorců (3) a (8). Experimentálně stanovená mobilita EOF byla využita v teoretickém modelu koncentračních a vodivostních změn, jelikož teoreticky nelze mobilitu EOF stanovit. Po stanovení mobility EOF pro daný pufr byla kapilára opět propláchnuta základním elektrolytem po dobu 5 minut při tlaku 940 mbar a následně bylo na elektrody vloženo elektrické napětí po dobu jedné hodiny.

Pro každý pufr bylo celkem změřeno pět sad vialek s elektrolyticky pozměněným zásobním elektrolytem, délka trvání elektrolýzy činila pro všechny sady jednu hodinu. Výsledky byly statisticky zpracovány.

Byly změřeny signály vodivostního detektoru u vialek s elektrolýzou pozměněným základním elektrolytem: na dávkovací konec kapiláry byla nasazena analyzovaná vialka a byl aplikován tlak 940 mbar až do ustálení konstantní hodnoty odezvy vodivostního detektoru. Číselná hodnota signálu byla zaznamenána pro všechny analyzované případy. Dále byla změřena odezva vodivostního detektoru pro elektrolýzou nepozměněné základní elektrolyty, které sloužily jako reference. Pro měření nepozměněných referenčních vialek bylo zajištěno, aby jejich doba setrvání na vzduchu byla stejná jako pro vialky, které byly elektrolyzovány. Zvláště v alkalickém prostředí (Pufr 4) bylo toto zajištění žádoucí, jelikož ve vzduchu přítomný oxid uhličitý se v alkalických roztocích rozpouští za vzniku aniontu HCO_3^- , který pozměňuje měrnou vodivost pufru nezávisle na proběhlé elektrolýze. Různá doba setrvání vialky na vzduchu má za následek různé rozpuštěné množství oxidu uhličitého na vzduchu – je třeba tento vedlejší jev minimalizovat.

Experimenty byly provedeny jak ve velkých ($V = 500 \mu\text{l}$) tak v malých ($V = 100 \mu\text{l}$) vialkách pro všechny analyzované pufrы (Pufr 1-4). Celkem bylo získáno 40 sad

elektrolýzou pozměněných roztoků BGE, u kterých byla zjištěna odezva vodivostního detektoru.

Procentuální vodivostní změny jednotlivých pufrů byly stanoveny na základě naměřených měrných vodivostí pozměněných a původních elektrolytů. Vztah mezi signálem vodivostního detektoru a měrnou vodivostí není lineární závislostí, a proto bylo třeba vodivostní detektor kalibrovat na základě tabelovaných hodnot měrných vodivostí pro zvolenou standardní látku. Pro tyto účely byl zvolen chlorid draselný, jehož hodnoty měrných vodivostí jsou pro dané koncentrace tabelované [29]. Měrné vodivosti chloridu draselného odpovídající příslušným koncentracím jsou uvedeny v Tabulce 3:

Tabulka 3, měrné vodivosti roztoku pro příslušné koncentrace KCl

c_{KCl} [mol · dm ⁻³]	$10^{-3} \kappa_{KCl}$ [S · m ⁻¹]
0,0005	7,387
0,001	14,69
0,005	71,74
0,01	141,2
0,02	276,5

Byly připraveny roztoky KCl podle Tabulky 3 rozpuštěním pevného KCl v deionizované vodě. Takto připravené roztoky byly postupně protlačovány křemennou kapilárou pod tlakem 940 mbar až do ustálení konstantního signálu vodivostního detektoru. Pro každý roztok KCl byla zaznamenána hodnota signálu vodivostního detektoru. Byla vynesena závislost tabelovaných měrných vodivostí na signálech vodivostního detektoru, obdržené body byly proloženy polynomem třetího stupně pomocí programu Origin 2018b. Takto provedenou kalibrací bylo následně možné převést signály vodivostního detektoru při průběhu kapilární zónové elektroforézy na měrné vodivosti.

Pomocí polynomu vycházejícího ze získané závislosti mezi měrnou vodivostí a odezvou vodivostního detektoru bylo možné převést všechny experimentálně naměřené odezvy vodivostního detektoru na měrné vodivosti. Všechny hodnoty měrných vodivostí základních elektrolytů pozměněných elektrolýzou byly porovnány s měrnými vodivostmi příslušných nepozměněných základních elektrolytů. Relativním srovnáním byly získány úbytky či přírůstky měrné vodivosti oproti původnímu roztoku BGE vyjádřené v procentech. Získané hodnoty vodivostních změn byly porovnány s teoreticky odvozeným modelem pro koncentrační a vodivostní změny uvedeném v první části kapitoly Výsledky této práce.

5 Výsledky a diskuze

5.1 Experimentálně stanovené vodivostní změny

5.1.1 Kalibrace vodivostního detektoru

Vodivost základního elektrolytu byla měřena na bezkontaktním vodivostním detektoru, který poskytuje vodivostní odezvu v jednotkách V či mAU. Pro porovnání s teoretickými výpočty je však třeba vyjádření měrné vodivosti v jednotkách S/m. Jelikož závislost odezvy vodivostního detektoru na měrné vodivosti není závislostí lineární, bylo nutné nejprve kalibrovat vodivostní detektor pomocí standardní látky, jejíž hodnoty měrné vodivosti jsou pro dané koncentrace tabelované. Zároveň bylo žádoucí, aby měrné vodivosti analyzovaných základních elektrolytů (Pufr 1-4) byly v rozsahu intervalu této kalibrace. Jako standard byl proto zvolen KCl, jehož hodnoty měrných vodivostí jsou tabelovány viz Tabulka 3.

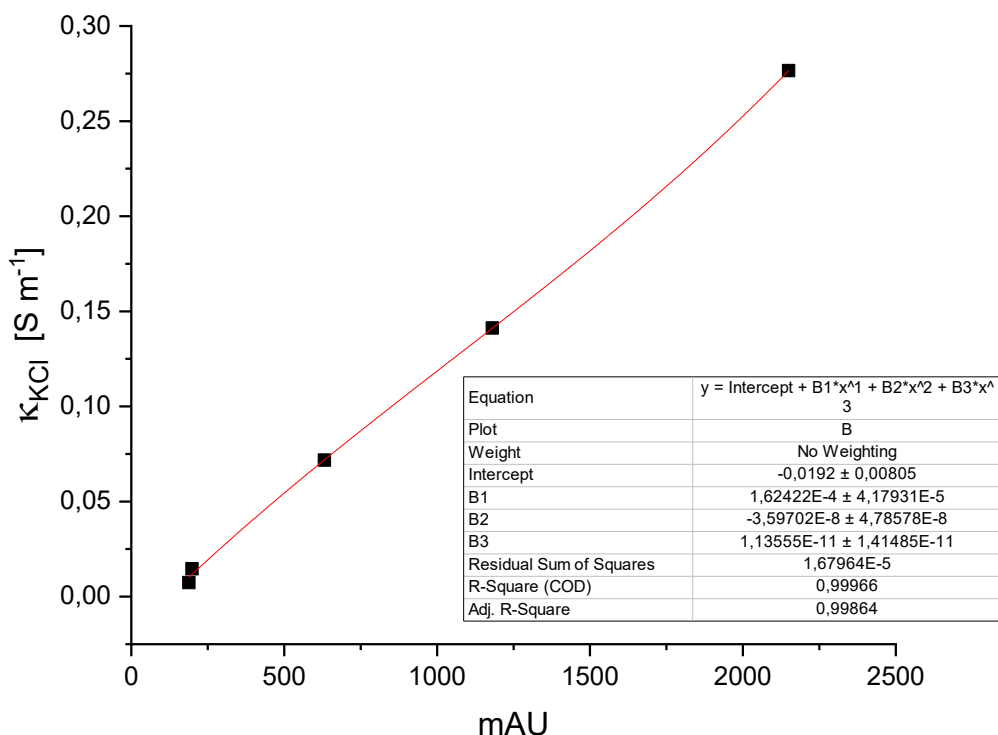
V níže uvedené Tabulce 4 jsou uvedeny hodnoty měrných vodivostí pro příslušné koncentrace roztoku KCl spolu s experimentálně naměřenými signály bezkontaktního vodivostního detektoru:

Tabulka 4, naměřené a tabelované hodnoty měrné vodivosti pro kalibraci CCD

c_{KCl} [mol dm ⁻³]	$10^{-3} \kappa_{KCl}$ [S/m]	Odezva CCD [mAU]
0,0005	7,387	188,6
0,001	14,69	198,7
0,005	71,74	631,6
0,01	141,2	1181
0,02	276,5	2150

Závislost měrné vodivosti na signálu vodivostního detektoru byla proložena polynomem třetího řádu v programu Origin 2018b:

Graf 1, Závislost měrné vodivosti na odezvě CCD



Měrná vodivost (y) byla spočtena z odezvy CCD (x) na základě následujícího polynomu (12):

$$y = -0,0192 + 1,624 \cdot x - 3,597 \cdot x^2 + 1,1356 \cdot x^3 \quad 12$$

V následujících kapitolách bude dále pracováno s měrnou vodivostí analyzovaných pufrů vyjádřenou v jednotkách [S/m], která byla získána pomocí kalibrační závislosti (12).

5.1.2 Stanovení relativních vodivostních změn BGE

Jelikož experimentální ověření jednotlivých pufrů bylo měřeno v sekvenčním uspořádání, byly jednotlivé pufrы s pozměněným elektrolytem ponechány v klidu po dobu 5-10 hodin. Díky tomu byla zajištěna homogenizace obsahu vialek pomocí difuze. Následně byly změřeny měrné vodivosti všech elektrolýzou pozměněných BGE. Výsledky měření jsou uvedené v Tabulce 5 a Tabulce 6 pro velké, resp. malé, vialky včetně průměrných hodnot společně se směrodatnou odchylkou měření. Složení jednotlivých pufrů vychází z následujícího rozpisu: Form/Am, 20/8,3 představuje pufr složený z kyseliny mravenčí o koncentraci 20 mM a amoniaku o koncentraci 8,3 mM; Ac/Li, 20/8,9 představuje pufr složený z kyseliny octové o koncentraci 20 mM a hydroxidu lithného o koncentraci 8,9 mM; Form/Li, 20/9,3 představuje pufr složený z kyseliny mravenčí o koncentraci 20 mM a hydroxidu lithného o koncentraci 9,3 mM a Am/Form, 20/10 představuje pufr složený z amoniaku o koncentraci 20 mM a kyseliny mravenčí o koncentraci 10 mM.

Tabulka 5, Měrné vodivosti elektrolýzou pozměněných BGE po 1 hodině, velké vialky (V = 500 µl)

Složení	Pufr 1		Pufr 2		Pufr 3		Pufr 4	
	Form/Am, 20/8,3		Ac/Li, 20/8,9		Form/Li, 20/9,3		Am/Form, 20/10	
κ [S/m]								
	Anoda	katoda	anoda	katoda	anoda	katoda	Anoda	Katoda
Sada 1	0,1132	0,1226	0,06668	0,07115	0,08960	0,09210	0,1543	0,1482
Sada 2	0,1145	0,1225	0,06676	0,07041	0,08895	0,09245	0,1543	0,1475
Sada 3	0,1149	0,1232	0,06732	0,06988	0,08902	0,09203	0,1535	0,1468
Sada 4	0,1149	0,1231	0,06701	0,07062	0,08899	0,09167	0,1524	0,1470
Sada 5	0,1149	0,1228	0,06716	0,07054	0,08888	0,09198	0,1512	0,1496
Průměr	0,1145	0,1228	0,06699	0,07052	0,08909	0,09205	0,1531	0,1478
	±0,0007	±0,0003	±0,00024	±0,00041	±0,00026	±0,00025	±0,0012	±0,0010

Tabulka 6, Měrné vodivosti elektrolýzou pozměněných BGE po 1 hodině, malé vialky (V = 100 µl)

Složení	Pufř 1		Pufř 2		Pufř 3		Pufř 4	
	Form/Am, 20/8,3		Ac/Li, 20/8,9		Form/Li, 20/9,3		Am/Form, 20/10	
κ [S/m]								
	anoda	katoda	anoda	katoda	anoda	katoda	Anoda	Katoda
Sada 1	0,1041	0,1462	0,06207	0,07754	0,07999	0,09732	0,1668	0,1429
Sada 2	0,1021	0,1448	0,06499	0,08141	0,08012	0,09707	0,1561	0,1315
Sada 3	0,1000	0,1396	0,06061	0,07819	0,08398	0,09959	0,1640	0,1380
Sada 4	0,1012	0,1438	0,05954	0,07793	0,08423	0,09921	0,1654	0,1412
Sada 5	0,0938	0,1396	0,06021	0,07819	*	*	0,1655	0,1347
Průměr	0,1002	0,1428	0,06148	0,07865	0,08208	0,09830	0,1636	0,1377
	±0,0035	±0,0027	±0,00194	±0,00140	±0,00203	±0,00110	±0,0038	±0,0042

**Naměřené hodnoty v páté sadě byly významně odchyleny od zbylých, proto byly vyloučeny.*

Naměřené hodnoty měrných vodivostí v Tabulce 5 a Tabulce 6 byly v rámci pěti, resp. čtyř, naměřených sad zprůměrovány a porovnány s referencemi, hodnotami měrných vodivostí nepozměněných základních elektrolytů pro jednotlivé pufry viz Tabulka 7. Relativní změny měrné vodivosti elektrolýzou pozměněných základních elektrolytů vyjádřené v procentech jsou dále uvedeny v Tabulce 8 jak pro případy velkých (V = 500 µl), tak pro případy malých (V = 100 µl), vialek.

Tabulka 7, měrné vodivosti nepozměněných základních elektrolytů sloužících jako referenční hodnoty

Složení	κ [S/m], velké vialky	κ [S/m], malé vialky**	
Pufř 1	Form/Am, 20/8,3	0,1192	0,1202
Pufř 2	Ac/Li, 20/8,9	0,06776	0,07038
Pufř 3	Form/Li, 20/9,3	0,09099	0,09061
Pufř 4	Am/Form, 20/10	0,1510	0,1510

***Měrné vodivosti základních elektrolytů pro malé a velké vialky se v řadě případů liší (Pufř 1-3), jelikož sady malých vialek byly měřeny v jiné době než sady velkých vialek a tedy i s nově připravenými roztoky.*

Tabulka 8, Přehled relativních vodivostních změn pro malé a velké vialky

Složení	Pufr 1		Pufr 2		Pufr 3		Pufr 4	
	Form/Am, 20/8,3		Ac/Li, 20/8,9		Form/Li, 20/9,3		Am/Form, 20/10	
Relativní vodivostní změna [%]								
	anoda	katoda	anoda	katoda	anoda	Katoda	anoda	Katoda
velké vialky	-3,943	3,020	-1,136	4,073	-2,088	1,165	1,391	-2,119
V = 500 µl	± 0,587	± 0,252	± 0,354	± 0,605	± 0,286	± 0,275	± 0,795	± 0,662
malé vialky	-16,64	18,80	-12,65	11,75	-9,414	8,487	8,344	-8,808
V = 100 µl	± 2,91	± 2,25	± 2,76	± 1,99	± 2,240	± 1,214	± 2,517	± 2,781

5.2 Výsledky vodivostních změn dle teoretického modelu

5.2.1 Stanovení elektroosmotického toku

Ačkoliv elektroosmotický tok nepřispívá ke koncentračním změnám, jelikož sám o sobě přečerpává všechny látky ve všech formách stejnou rychlostí, je nutné jeho přítomnost brát do úvahy. V teoretickém odvození modelu pro koncentrační a vodivostní změny byla brána do úvahy změna objemu zásobních vialek, na které se podílí téměř výhradně EOF. Znalost mobility EOF tedy umožňuje spočtení objemových změn a následně dopočtení koncentračních a vodivostních změn základního elektrolytu podle rovnice (11) první části kapitoly Výsledky.

Stanovení hodnoty mobility EOF bylo provedeno za pomoci elektroneutrálního markeru DMSO, který byl dávkován hydrodynamicky (150 mbar · s). Elektroneutrální marker DMSO byl detekován pomocí DAD detektoru při vlnové délce $\lambda = 210$ nm. Dle rovnice (3) byla spočtena rychlost migrace DMSO v axiální souřadnici kapiláry a na základě její znalosti mohla být při známé hodnotě elektrické intenzity uvnitř kapiláry spočtena hodnota mobility EOF, jelikož platí vztah (13):

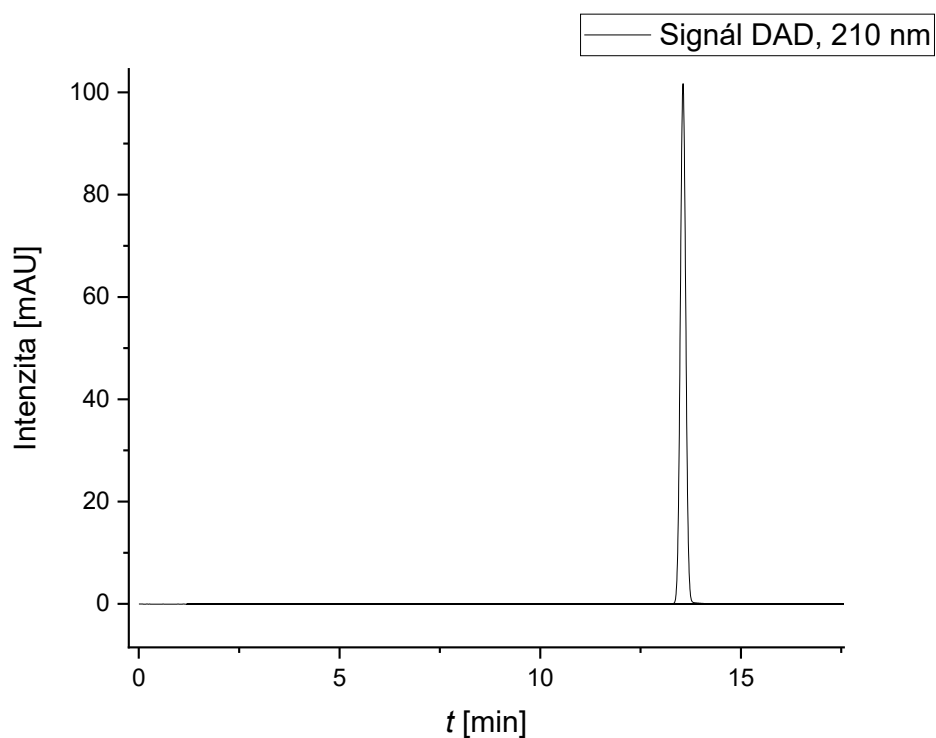
$$\mu_{\text{DMSO}} = \mu_{\text{EOF}} \quad 13$$

Vzorový elektroferogram z měření elektroosmotického toku pro Pufr 1 je zobrazen na Grafu 2. Mobility elektroosmotického toku byly pro všechny případy stanoveny experimentálně. Hodnoty mobility EOF jsou uvedeny v Tabulce 9:

Tabulka 9, experimentálně stanovené mobility EOF analyzovaných pufrů

	pH	μ_{EOF} [EU]
Pufr 1	3,588	11
Pufr 2	4,621	15
Pufr 3	3,669	13
Pufr 4	9,291	72

Graf 2, elektroferogram měření EOF v pufru Form/Am, 20/8,3



5.2.2 Výpočet koncentračních změn BGE

Výchozí koncentrace analyzovaných pufrů jsou uvedeny v Tabulce 1. Měrná vodivost těchto elektrolyzou nepozměněných pufrů byla uvažována jako reference, ke které jsou vztaženy všechny elektrolyticky pozměněné BGE v rámci provedených experimentů. Zatímco v experimentálním modelu byla referenční hodnota vodivosti daného pufru stanovena instrumentálně za pomoci kalibrovaného bezkontaktního vodivostního detektoru, v teoretickém modelu budeme uvažovat měrnou vodivost vypočtenou na základě příslušných koncentrací programem Simul 5. Takto spočtené hodnoty měrných vodivostí jsou uvedeny v Tabulce 10:

Tabulka 10, přehled měrných vodivostí elektrolyzou nepozměněných BGE

	Složení	κ [S/m]
Pufr 1	Form/Am, 20/8,3	0,1159
Pufr 2	Ac/Li, 20/8,9	0,07169
Pufr 3	Form/Li, 20/9,3	0,09469
Pufr 4	Am/Form, 20/10	0,1286

Je zřejmé, že teoreticky spočtené hodnoty měrných vodivostí se v případě Pufrů 1-3 blíží experimentálně stanoveným hodnotám (Tabulka 8). Rozdílné hodnoty měrné vodivosti u Pufru 4 mohly být způsobeny mj. rozpuštěným oxidem uhličitým v reálném roztoku alkalického pufru.

Elektrolyzou pozměněné základní elektrolyty byly stanoveny obdobným způsobem za využití programu Simul 5. Aby tak mohlo být učiněno, bylo nutné nejprve zjistit koncentrace elektrolytů v pufru po průběhu hodinové elektrolyzy. Ty budou od původních hodnot odchýlené z důvodu migrace aniontů, resp. kationtů, tvořících BGE k příslušným elektrodám.

Koncentrace elektrolytů po hodinovém průběhu elektrolýzy byly spočteny na základě rovnice (10) a rovnice (11). Nejprve bylo nutné vyšetřit objemové změny způsobené primárně přítomností EOF podle rovnice (11), díky čemuž bylo možné stanovit konečný objem anody, resp. katody, pro všechny analyzované pufrů v závislosti na mobilitě EOF viz Tabulka 9. Spočtený objem vialky v čase t , V_t , bylo následně možné dosadit do rovnice (10), pomocí které bylo možné postupně vypočítat všechny koncentrace elektrolytů tvořících BGE v čase t . Složení Pufrů 1-4 po hodinovém průběhu elektrolýzy na kapilární elektroforéze je zobrazeno pro velké vialky v Tabulce 11 a pro malé vialky v Tabulce 12:

Tabulka 11, Složení BGE ve velkých vialkách na počátku a po jedné hodině průběhu elektrolýzy

		c_0 [mol m ⁻³]	$c_{t,anoda}$ [mol m ⁻³]	$c_{t,katoda}$ [mol m ⁻³]
Pufr 1	amoniak	8,300	7,944	8,651
	kys. mravenčí	20,00	20,27	19,73
Pufr 2	lithium	8,900	8,705	9,091
	kys. octová	20,00	20,21	19,80
Pufr 3	lithium	9,300	9,097	9,500
	kys. mravenčí	20,00	20,30	19,71
Pufr 4	amoniak	20,00	19,56	20,41
	kys. mravenčí	10,00	10,32	9,706

Tabulka 12, Složení BGE v malých vialkách na počátku a po jedné hodině průběhu elektrolýzy

		c_0 [mol m ⁻³]	$c_{t,anoda}$ [mol m ⁻³]	$c_{t,katoda}$ [mol m ⁻³]
Pufr 1	amoniak	8,300	6,473	10,01
	kys. mravenčí	20,00	21,39	18,70
Pufr 2	lithium	8,900	7,891	9,823
	kys. octová	20,00	21,07	19,02
Pufr 3	lithium	9,300	8,255	10,27
	kys. mravenčí	20,00	21,54	18,57
Pufr 4	amoniak	20,00	17,31	21,75
	kys. mravenčí	10,00	11,94	8,736

5.2.3 Výpočet měrné vodivosti a vodivostních změn

Pro výpočet měrné vodivosti bylo využito údajů uvedených v Tabulce 11 a Tabulce 12, které popisují finální koncentrace elektrolytů tvořících BGE v příslušných vialkách. Na základě těchto pozměněných koncentrací byla pro jednotlivé pufry spočtena měrná vodivost pomocí softwaru Simul 5. Výsledky stanovení měrných vodivostí pro původní a elektrolýzou pozměněné pufry jsou uvedeny v Tabulce 13 pro výpočty měrných vodivostí ve velkých vialkách a v Tabulce 14 pro výpočty měrných vodivostí v malých vialkách:

Tabulka 13, Přehled měrných vodivostí původních a elektrolyzou pozměněných BGE, velké vialky

Velké vialky ($V = 500 \mu\text{l}$)									
		Pufr 1		Pufr 2		Pufr 3		Pufr 4	
Složení		Form/Am, 20/8,3		Ac/Li, 20/8,9		Form/Li, 20/9,3		Am/Form, 20/10	
κ [S/m]									
		anoda	katoda	anoda	katoda	anoda	katoda	Anoda	katoda
Elektrolyticky pozměněné BGE		0,1123	0,1196	0,07019	0,07317	0,09333	0,09605	0,1327	0,1249
Původní BGE		0,1159		0,07169		0,09469		0,1286	

Tabulka 14, Přehled měrných vodivostí původních a elektrolyzou pozměněných BGE, malé vialky

Malé vialky ($V = 100 \mu\text{l}$)									
		Pufr 1		Pufr 2		Pufr 3		Pufr 4	
Složení		Form/Am, 20/8,3		Ac/Li, 20/8,9		Form/Li, 20/9,3		Am/Form, 20/10	
κ [S/m]									
		anoda	katoda	anoda	katoda	anoda	Katoda	Anoda	Katoda
Elektrolyticky pozměněné BGE		0,09814	0,1343	0,06395	0,07883	0,08795	0,1014	0,1532	0,1127
Původní BGE		0,1159		0,07169		0,09469		0,1286	

Je zřejmé, že všechny spočtené měrné vodivosti se odchyľují od výchozí měrné vodivosti elektrolyzou nepozměněného BGE. V každém z analyzovaných pufrů se měrná vodivost snižuje, resp. zvyšuje, v závislosti na polaritě elektrody, která je do analyzovaného základního elektrolytu vnořena. Díky tomu lze podobně jako v kapitole 5.1, Tabulka 8, stanovit relativní vodivostní změny elektrolyzou pozměněných BGE. Relativní vodivostní změny pro velké a malé vialky jsou uvedeny v Tabulce 15:

Tabulka 15, Relativní vodivostní změny elektrolyzou pozměněných BGE, malé a velké vialky

Složení	Pufr 1		Pufr 2		Pufr 3		Pufr 4	
	Form/Am, 20/8,3		Ac/Li, 20/8,9		Form/Li, 20/9,3		Am/Form, 20/10	
Relativní vodivostní změna [%]								
	anoda	katoda	anoda	katoda	anoda	katoda	anoda	katoda
velké vialky V = 500 µl	-3,106	3,192	-2,092	2,064	-1,436	1,436	3,188	-2,877
malé vialky V = 100 µl	-15,32	15,88	-10,80	9,960	-7,118	7,086	19,23	-12,36

5.2.4 Změna pH základních elektrolytů

S měnícím se složením základních elektrolytů dochází též ke změnám pH příslušných roztoků. Při separačním měření na kapilární zónové elektroforéze je žádoucí, aby pH v separační kapiláře bylo konstantní po celou dobu měření, a to především u analytů, jejichž vlastní elektroforetická mobilita závisí na přítomném pH.

Změny pH vycházející z koncentračních změn BGE byly studovány v rámci teoretického modelu prezentovaném v kapitole 5.1. Hodnoty pH po hodinovém průběhu elektrolyzy byly stanoveny na základě koncentrací uvedených v Tabulce 11 a Tabulce 12 pomocí programu PeakMaster 5.3 využívajícího G-funkci pro přesné stanovení pH roztoků tvořených elektrolyty. Výsledné hodnoty pH pro elektrolyzou

pozměněné malé a velké vialky včetně hodnot pH původních BGE jsou uvedeny v Tabulce 16:

Tabulka 16, Hodnoty pH elektrolýzou pozměněných a původních roztoků BGE, malé a velké vialky

Složení	Pufr 1		Pufr 2		Pufr 3		Pufr 4	
	Form/Am, 20/8,3		Ac/Li, 20/8,9		Form/Li, 20/9,3		Am/Form, 20/10	
pH								
	anoda	katoda	anoda	katoda	anoda	katoda	anoda	katoda
velké vialky	3,549	3,627	4,596	4,645	3,641	3,697	9,244	9,333
malé vialky	3,394	3,787	4,497	4,743	3,532	3,816	8,948	9,461
původní vialky	3,588		4,621		3,669		9,291	

5.3 Porovnání teoretického modelu s experimentem a diskuze

Na základě provedených experimentů je zřejmé, že roztok základního elektrolytu se v průběhu separačního měření na kapilární zónové elektroforéze mění a dochází k jeho postupné degradaci. Mechanismus degradace je založen především na vlastní elektromigraci iontů tvořících BGE, která má za následek koncentrační změny elektrolytu v zásobních vialkách vedoucí ke změnám měrných vodivostí takto pozměněných roztoků. Elektrolýzou degradované základní elektrolyty mohou ovlivnit přesnost a reprodukovatelnost separačních stanovení, jelikož rozsah degradace s časem roste, a tedy i analyty stanovené v již použitém BGE mohou vykazovat odlišný migrační čas oproti analytům separovaným v čerstvě připraveném BGE. Koncentrační změny základního elektrolytu zároveň vedou ke změně pH, následkem čehož samotné analyty, jejichž elektroforetická mobilita závisí na hodnotě pH, mohou vykazovat odlišnou pohyblivost v několikrát použitých základních elektrolytech oproti čerstvě připraveným. Komplikace s časem se měnící hodnotou pH nabývá na důležitosti především u pufrů s nízkou pufrací kapacitou, kde i malé změny v koncentracích elektrolytů vedou k významným změnám hodnoty pH. Naproti tomu základní elektrolyty tvořené dobře pufrujícími roztoky, jejichž pH je rovné pK_A či v okolí pK_A pufrující složky jsou vůči koncentračním změnám odolnější, což bylo ukázáno v kapitole 5.3.

Analyzované roztoky základních elektrolytů v této práci byly připraveny tak, aby hodnota jejich pH byla v okolí jejich pK_A . I přes to byly pozorovány změny v rozsahu 0,024-0,047 jednotky pH v případě velkých vialek a 0,122-0,343 v případě malých vialek. Bylo ukázáno, že i změny v rozsahu 0,03 jednotky pH mohou snižovat přesnost a reprodukovatelnost separačních experimentů na kapilární elektroforéze [21]. Pro většinu analyzovaných roztoků je tedy hodinový průběh měření při konfiguraci CZE dostačující k příliš rozsáhlé degradaci BGE.

Byly studovány relativní změny měrné vodivosti u elektrolýzou pozměněných BGE v případě malých a velkých vialek. Výsledky dle teoretického modelu byly porovnány s experimentálně stanovenými měrnými vodivostmi pomocí kalibrovaného CCD. Souhrnný přehled je k dispozici v Tabulce 17:

Tabulka 17, porovnání relativních vodivostních změn experimentálně naměřených hodnot proti teoretické předpovědi

Složení	Pufr 1		Pufr 2		Pufr 3		Pufr 4	
	Form/Am, 20/8,3		Ac/Li, 20/8,9		Form/Li, 20/9,3		Am/Form, 20/10	
	anoda	katoda	anoda	katoda	anoda	katoda	anoda	katoda
Relativní vodivostní změna [%]								
Experimentální model								
velké vialky V = 500 µl	-3,943 ± 0,587	3,020 ± 0,252	-1,136 ± 0,354	4,073 ± 0,605	-2,088 ± 0,286	1,165 ± 0,275	1,391 ± 0,795	-2,119 ± 0,662
malé vialky V = 100 µl	-16,64 ± 2,91	18,80 ± 2,25	-12,65 ± 2,76	11,75 ± 1,99	-9,414 ± 2,240	8,487 ± 1,214	8,344 ± 2,517	-8,808 ± 2,781
Teoretický model								
velké vialky V = 500 µl	-3,106	3,192	-2,092	2,064	-1,436	1,436	3,188	-2,877
malé vialky V = 100 µl	-15,32	15,88	-10,80	9,960	-7,118	7,086	19,23	-12,36

Na základě Tabulky 18 je patrné, že degradace základních elektrolytů při použití běžných vialek o objemu 500 μl je v řádu jednotek procent a může negativně ovlivnit separační měření na kapilární zónové elektroforéze. Zároveň je patrné, že rozsah degradace závisí mimo instrumentální nastavení též na složení základního elektrolytu: složky BGE s vysokou elektroforetickou mobilitou mají větší tendenci k vytvoření rozsáhlých koncentračních změn oproti složkám s nízkou elektroforetickou mobilitou. Nejrozsáhlejší vodivostní změny byly pozorovány u pufrů tvořených mobilními elektrolyty (kyselina mravenčí, amoniak), oproti tomu u pufrů tvořených méně pohyblivými složkami (kyselina octová, lithium) byly vodivostní změny méně dramatické.

Degradace základních elektrolytů přítomných ve vialkách o objemu 100 μl byla výrazně rozsáhlejší, ve většině případů přibližně pětinasobná oproti velkým vialkám. Použití malých vialek jako elektrodových nádobek pro BGE je značně rizikovější, je třeba volit pufrы složené z méně mobilních složek a měnit nádobky s BGE mnohem častěji pro udržení konstantních separačních podmínek.

Teoretický model pro výpočet koncentračních a vodivostních změn elektrolytů poskytuje velmi dobrou shodu s experimentálním ověřením, především v případě kyselých pufrů. Větší odchylky od teoretického modelu v případě analýzy alkalického pufru (Pufr 4, $\text{pH} = 9,291$) mohly být způsobeny rozpouštějícím se oxidem uhličitým v bazickém prostředí, který ovlivňuje měrnou vodivost připraveného roztoku a ke kterému v případě prostředí o hodnotě pH 3-5 prakticky nedochází.

6 Závěr

V úvodní části této práce byly popsány základní principy a výhody využití kapilární zónové elektroforézy jakožto separační instrumentální metody. Byl kladen důraz na popis a charakterizaci rušivých vedlejších jevů, které průběh separačního měření doprovází, především poté na přítomnost a vliv elektrolyzy jakožto nedílné součásti instrumentálního uspořádání CZE. Byl popsán mechanismus degradace základního elektrolytu spočívající v koncentračních změnách vedoucích mj. ke změnám měrné vodivosti BGE.

V další kapitole byly odvozeny vztahy tvořící teoretický model řešící rozsah degradace základního elektrolytu spočívající:

- (i) ve změně koncentrací elektrolytů tvořících BGE při průběhu CZE v důsledku jejich migrace k příslušným elektrodám
- (ii) ve změně měrné vodivosti vycházející z koncentračních změn BGE v příslušných vialkách
- (iii) ve změně pH vycházející z koncentračních změn BGE příslušných základních elektrolytů

Tento odvozený teoretický model nebyl dosud publikován v odborné literatuře.

V kapitole 5, Výsledky a diskuze, byly vypočteny koncentrační změny BGE na základě teoretického modelu, pomocí kterých byly stanoveny změny v měrné vodivosti a změny pH elektrolyzou pozměněných základních elektrolytů. Vypočtené hodnoty měrné vodivosti byly porovnány s experimentálně získanými daty, které byly obdrženy pomocí kalibrovaného CCD detektoru. Bylo konstatováno, že rozsah vodivostních změn po hodinovém průběhu elektrolyzy při konfiguraci CZE za použití napětí 20 kV je dost vysoký na to, aby ovlivnil přesnost a reprodukovatelnost separačního měření. Zároveň bylo zjištěno, že velikost vodivostních změn závisí na objemu použitých vial se základním elektrolytem. Elektrolyzou vyvolané změny v měrné vodivosti základních elektrolytů byly blízké teoreticky předpovězeným hodnotám a potvrzují tak náš

teoretický model. Bylo pozorováno, že změny v hodnotách pH základních elektrolytů mohou způsobit snížení přesnosti a reprodukovatelnosti separačních měření.

V rámci této bakalářské práce byly splněny všechny předem stanovené cíle.

7 Literatura

- [1] Alcantara-Licudine J. P., Bui N. L., Kawate M. K., Li Q., X.: Analysis of Phloxine B and Uranine in Coffee by High-Performance Liquid Chromatography and Capillary Zone Electrophoresis after Solid Phase Extraction Cleanup. *Journal of Agricultural and food chemistry* **46**:3, 1005-1011 (1998).
- [2] Corradini D., Spreccacenero L.: Dependence of the electroosmotic flow in bare fused-silica capillaries from pH, ionic strength and composition of electrolyte solutions tailored for protein capillary zone electrophoresis. *Chromatographia* **58**:9-10 587-596 (2003).
- [3] Guo Y., Imahori G. A., Colón L. A.: Hydrolytically stable amino-silica glass coating material for manipulation of the electroosmotic flow in capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A* **744** 17-29 (1996).
- [4] Horváth J., Dolník V.: Polymer wall coatings for capillary electrophoresis. *Electrophoresis* **22** 644-655 (2001).
- [5] Hsieh Y.-Y., Lin Y.-H., Yang S., Wei G.-T., Tien P., Chau L.-K.: Electroosmotic flow controllable coating on a capillary surface by a sol-gel process for capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A* **952**:1-2 255-256 (2002).
- [6] Baltussen E., Guijt M. R., van der Steer G., Laugere F., Baltussen S., van Dedem G. W. K.: Considerations on contactless conductivity detection in capillary electrophoresis. *Electrophoresis* **23** 2888-2893 (2002).
- [7] Zemann A. J.: Conductivity detection in capillary electrophoresis. *Trends in analytical chemistry* **20**:6-7 (2001).
- [8] Štědrý M., Jaroš M., Hruška V., Gaš B.: Eigenmobilities in background electrolytes for capillary zone electrophoresis: III. Linear theory of electromigration. *Electrophoresis* **25** 3071-3079 (2004).
- [9] Gaš B., Zuska J., Coufal P., van de Goor T.: Optimization of the high-frequency contactless conductivity detector for capillary electrophoresis. *Electrophoresis* **20** 3520-3527 (2002).
- [10] Stoyanov V. A., Pawliszyn J.: Buffer composition changes in background electrolyte during electrophoretic run in capillary zone electrophoresis. *Analyst* **129** 979-982 (2004).
- [11] Beckers J.L., Boček P.: The preparation of background electrolytes in capillary zone electrophoresis: Golden rules and pitfalls. *Electrophoresis* **24** 518-535 (2003).
- [12] Gaš B., Hruška V., Dittman M., Bek F., Witt K.: Prediction and understanding system peaks in capillary zone electrophoresis. *Journal of Separation Science* **30**:10 1435-1445 (2007).

-
- [13] Štědrý M., Jaroš M., Gaš B.: Eigenmobilities in background electrolytes for capillary zone electrophoresis – I. System eigenpeaks and resonance in systém with strong electrolytes. *Journal of Chromatography A* **960**:1-2 187-198 (2002).
- [14] Jaroš M., Včeláková K., Zusková I., Gaš B.: Optimization of background electrolytes for capillary electrophoresis: II. Computer simulation and comparison with experiments. *Electrophoresis* **23** 2667-2677 (2002).
- [15] Jaroš M., Hruška V., Štědrý M., Zusková I., Gaš B.: Eigenmobilities in background electrolytes for capillary zone electrophoresis: IV. Computer program PeakMaster. *Electrophoresis* **25** 3080-3085 (2004).
- [16] Macka M., Andersson P., Haddad P. R.: Changes in electrolyte pH due to electrolysis during capillary zone electrophoresis. *Analytical Chemistry* **70** 743-749 (1998).
- [17] Bateman K. P.: Electrochemical properties of capillary electrophoresis-nano-electrospray mass spectrometry. *Journal of the American society for mass spectrometry* **10**:4, 309-317 (1999).
- [18] Timperman A., Tracht S. E., Sweedler J. V., Dynamic on-column pH monitoring in capillary electrophoresis: Application to volume-limited outlet vials. *Analytical Chemistry* **68**:15 2693-2698 (1996).
- [19] Kelly M. A., Altria K.D. Clark B. J.: Approaches used in the reduction of the buffer electrolysis effects for routine capillary electrophoresis procedures in pharmaceutical analysis. *Journal of Chromatography A* **768**:1 73-80 (1997).
- [20] Corstjens H., Billiet H. A. H., Frank J., Luyben K.: Variation of the pH of the background electrolyte due to electrode reactions in capillary electrophoresis: Theoretical approach and in situ measurement. *Electrophoresis* **17**:1 137-143 (1996).
- [21] Kenndler E., Friedl W.: Adjustment of resolution and analysis time in capillary zone electrophoresis by varying the pH of the buffer. *Journal of Chromatography A* **608**:1-2 161-170 (1992).
- [22] Schwartz H. E., Melera M., Brownlee R. G.: Performance of an automated injection and replenishment system for capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A* **480** 129-139 (1989).
- [23] Zhang C. X., Thormann W.: Head-column field-amplified sample stacking in binary system capillary electrophoresis: A robust approach providing over 1000-fold sensitivity enhancement. *Analytical Chemistry* **68**:15 2523-2532 (1996).
- [24] Pereira de Jesus D., Brito-Neto J. G. A., Richter E. M., Agned L., Gebhardt Rolf Gutz I., do Lago C. L.: Extending the lifetime of the running electrolyte in capillary electrophoresis by using additional compartments for external electrolysis. *Analytical Chemistry* **77** 607-614 (2005).
- [25] Frank H., Čabala R.: Polypyrrole-coated capillaries for capillary zone electrophoresis. *Journal of Chromatography A* **1079**:1-2 344-348 (2005).

[26] Gelfi C., Viganò A., Ripamonti M., Righetti P. G., Sebastiano R., Citterio A.: Protein analysis by capillary zone electrophoresis utilizing a trifunctional diamine for silica coating. *Analytical Chemistry* **73** 3862-3868 (2001).

[27] Hruška V., Jaroš M., Gaš B.: Simul 5 – Free dynamic simulator of electrophoresis. *Electrophoresis* **27** 984-991 (2006).

[28] Carson S., Cohen A. S., Belenkii A., Ruizmartinez M. C., Berka J., Karger B. I.: DNA-sequencing by capillary electrophoresis – use of a 2-laser 2-window intensified diode-array detection system. *Analytical Chemistry* **65**:22 3219-3226 (1993).

[29] Vohlídal J., Julák A., Štulík K.: *Chemické a analytické tabulky*, Grada (1999).