

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

---

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



**Tereza Kolečkářová**

Vliv druhu iontů separačního elektrolytu na stabilitu základní  
linie v kapilární elektroforéze

Effect of separation electrolyte ions on baseline stability in  
capillary electrophoresis

Bakalářská práce

Vedoucí práce/Školitel: RNDr. Tomáš Křížek, Ph.D.

Praha 2019

### **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu. Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků získaných v této práci mimo Univerzitu Karlovu je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze 10. 1. 2019

Tereza Kolečkářová

### **Poděkování**

Ráda bych poděkovala svému školiteli RNDr. Tomášovi Křížkovi, PhD. za jeho čas, ochotu, trpělivost a odbornou pomoc, kterou mi věnoval při řešení této práce. Dále chci poděkovat své rodině a přátelům za veškerou poskytnutou podporu.

## Abstrakt

V této práci je studován jev nestability základní linie elektroferogramu při použití draselného pufru jako základního elektrolytu, který byl zjištěn při studii elektroferotických mobilit markerů elektroosmotického toku v různých separačních pufrech [1]. Tento jev znesnadňuje vyhodnocení výsledků při vyšších koncentracích pufru. Cílem je zjistit, jestli je tento jev specifický pro draselné ionty nebo se týká i jiných iontů a v tom případě za jakých podmínek.

Míra nestability základní linie signálu je sledována jako její směrodatná odchylka a je porovnávána pro draselný, sodný, amonný a lithný pufr. Pro draselný a sodný pufr je nejprve nestabilita signálu zkoumána při aplikaci vysokého napětí a tlaku na systém v různých časových intervalech. Je prokázáno, že větší nestabilita základní linie je v draselném pufru způsobena aplikací vysokého napětí. Poté je nestabilita signálu porovnávána při různých hodnotách aplikovaného napětí a je demonstrován pravděpodobný vliv Joulova tepla.

U všech zkoumaných kationtů bylo pozorováno snížení stability základní linie signálu s rostoucí iontovou silou a konduktivitou, nejedná se tedy o jev výlučně spojený s draselnými ionty. Přesto je v pufru s draselným kationtem, ač nemá nejvyšší vodivost, nestabilita signálu největší. Míra nestability základní linie signálu draselného pufru nezávisí tedy pouze na konduktivitě roztoku, ale vystupuje zde další neznámý faktor, který náleží přímo acetátovému pufru s draselným kationtem.

Nakonec je demonstrován vliv nestability základní linie na mez detekce analytických měření na příkladu stanovení benzoové a 4-hydroxybenzoové kyseliny. Za stejných podmínek se při přechodu ze sodného na draselný pufr zvýšily meze detekce benzoové, resp. 4-hydroxybenzoové kyseliny z 0,004 g/l, resp. 0,003 g/l na 0,010 g/l, resp. 0,015 g/l.

**Klíčová slova:** Kapilární zónová elektroforéza, Joulovo teplo, nestabilita základní linie signálu

## Abstract

Unstable electropherogram baseline of potassium buffer, found while studying electrophoretic mobilities of electroosmotic flow markers in different separation buffers [1], makes it harder for higher concentrations of buffers to evaluate the results. This work investigates, whether the above described phenomenon is confined to potassium ions, and if it is not, what conditions influence it.

The measure of instability of signal baseline is taken as its standard deviation and it is compared for potassium, sodium, ammonium and lithium buffers. For potassium and sodium buffers influence of high voltage on the system is studied using pressure to mobilize solution inside the capillary. It is proven that the instability for potassium buffer is increased with high voltage. The instability of the signal is then compared for different voltage levels. The results show to the influence of Joule heating.

The stability of signal baseline for all studied cations was found to be decreasing with increasing ionic strength and conductivity. This work concludes, that this phenomenon does not confine only to potassium ions. Even though the potassium buffer does not have the highest conductivity, signal instability was the highest however. The degree of instability of signal baseline for potassium buffer depends not only on the conductivity of the solution, but also on an unknown factor of potassium acetate buffer.

Finally, the influence of baseline instability on detection limit of analytical measurements is demonstrated on the example of benzoic and 4-hydroxybenzoic acids. Under identical experimental conditions, when switching from sodium to potassium buffer limits of detection of benzoic and 4-hydroxybenzoic acid increased from 0.004 g/L and 0.003 g/L to 0.010 g/L and 0.015 g/L, respectively.

**Key words:** Capillary zone electrophoresis, Joule heating, instability of signal baseline

# Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod</b> .....	<b>9</b>
1.1	Elektroforetická separace .....	9
1.1.1	Elektroforetická pohyblivost .....	9
1.1.2	Elektroosmotický tok .....	10
1.2	Detekce .....	11
<b>2</b>	<b>Cíle práce</b> .....	<b>14</b>
<b>3</b>	<b>Experimentální část</b> .....	<b>15</b>
3.1	Chemikálie .....	15
3.2	Instrumentace .....	15
3.3	Postup přípravy roztoků .....	16
3.3.1	Acetátový pufr dobře rozpustných hydroxidů .....	16
3.3.2	Acetátový pufr málo rozpustného hydroxidu lithného .....	16
3.3.3	Bezuhlíčitanový draselno-acetátový pufr .....	16
3.4	Metoda měření .....	16
3.5	Způsob vyhodnocení signálu .....	17
<b>4</b>	<b>Výsledky a diskuze</b> .....	<b>18</b>
4.1	Nestabilita základní linie .....	18
4.2	Vliv napětí .....	19
4.3	Vliv vlastností základního elektrolytu .....	22
4.4	Vliv na parametry analytické metody .....	24
<b>5</b>	<b>Závěr</b> .....	<b>28</b>
	<b>Literatura</b> .....	<b>29</b>

## Seznam zkratek

CZE	kapilární zónová elektroforéza
BGE	základní elektrolyt
EOF	elektroosmotický tok
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
SD	směrodatná odchylka
LOD	mez detekce
BA	benzoová kyselina
4-HBA	4-hydroxybenzoová kyselina

## Seznam symbolů

$\mu$	elektroforetická mobilita
$\eta$	viskozita roztoku
$\epsilon_r$	relativní permitivita roztoku
$v$	elektroforetická rychlost
$r$	hydratovaný poloměr
$E$	elektrické pole
$U$	napětí
$l_c$	délka kapiláry
$Q$	náboj
$\zeta$	zeta potenciál
$t$	čas
$I$	elektrický proud
$K$	měrná vodivost

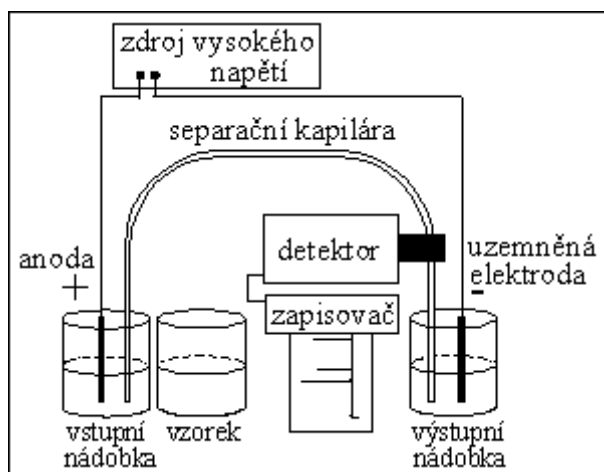
$R^2$	koeficient determinace
$T$	teplota
$h$	výška šumu
$m$	směrnice kalibrační přímky



# 1 Úvod

## 1.1 Elektroforetická separace

Kapilární zónová elektroforéza, capillary zone electrophoresis, (CZE), schématické zapojení na obr. 1, je analytická separační metoda založená na migraci nabitých látek v elektrickém poli, které vzniká díky vloženému napětí mezi elektrody na koncích kapiláry [3, 4]. Tento pohyb vlivem elektrického pole v kapiláře nazýváme elektroforetickou migrací. Křemenná kapilára je naplněna základním elektrolytem, background electrolyte, (BGE), interakcí mezi stěnou kapiláry a elektrolytem dochází k dalšímu pohybu zvanému elektroosmotický tok (EOF).



Obrázek 1. Schématické zapojení kapilární zónové elektroforézy [2].

### 1.1.1 Elektroforetická pohyblivost

Nabité částice o daném poloměru a náboji jsou hnány gradientem elektrického pole k elektrodě opačného náboje [3, 4]. Každá látka v takovémto elektrickém poli má svou pohyblivost a pro daný iont v daném prostředí je konstantní. Dle vzorce

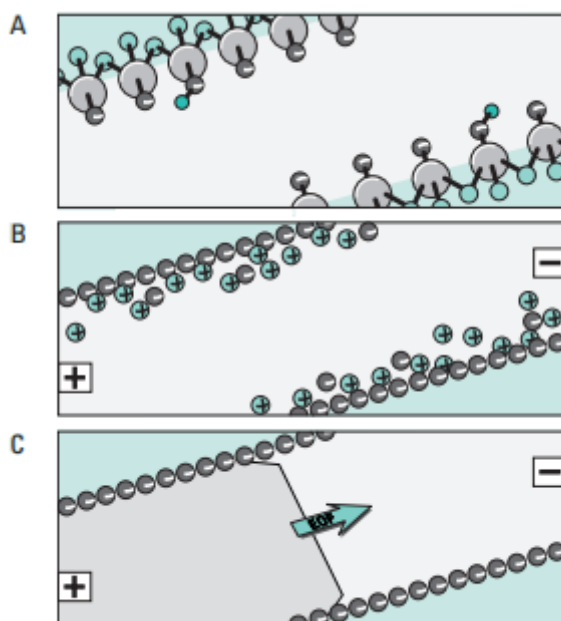
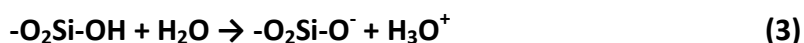
$$\mu_i = \frac{v_i}{E} \quad (1)$$

kde  $\mu_i$  je elektroforetická mobilita iontu  $i$ ,  $v$  rychlost daného iontu  $i$  a  $E$  intenzita elektrického pole. Rychlost je tedy přímo úměrná intenzitě elektrického pole. Mobilita je také přímo úměrná náboji látky  $Q$  a nepřímo úměrná hydratovanému poloměru látky  $r$  a viskozitě základního elektrolytu  $\eta$ .

$$\mu_i = \frac{Q}{6\pi r \eta} \quad (2)$$

### 1.1.2 Elektroosmotický tok

Další transportní jev je elektroosmóza, která způsobuje tok celého základního roztoku křemennou kapilárou [3-5]. Elektroosmotický tok tedy plní podobnou funkci jako pumpy v HPLC. Fyzický tok kapaliny kapilárou je vyvolán vložení stejnosměrného elektrického pole mezi elektrody a je důsledkem vlastností fázového rozhraní kapilára-roztok. Vnitřní stěna křemenné kapiláry obsahuje na povrchu silanolové skupiny – SiOH, které v závislosti na pH základního elektrolytu (BGE) disociují na  $-\text{SiO}^-$  dle rovnice (3), čímž stěna získává záporný náboj [6], obr. 2A.



**Obrázek 2. Vznik elektroosmotického toku: A) Disociované silanolové skupiny na vnitřní stěně kapiláry. B) Vznik difuzní dvojvrstvy z hydratovaných kationtů. C) Znárodnění profilu elektroosmotického toku. [6]**

Tento náboj je úplně kompenzován kationty ze základního roztoku, kationty se naadsorbují na záporně nabitou stěnu kapiláry a vytvoří elektrickou dvojvrstvu [17].

První vrstva se nazývá Sternova, na kterou je navázána část difuzní vrstvy a kde vzniká Sternův potenciál. Na druhé části difuzní vrstvy dochází ke vzniku zeta-potenciálu ( $\zeta$ -potenciál), který závisí na  $\eta$  dynamické viskozitě roztoku,  $\epsilon_r$  relativní permitivitě roztoku a  $\mu_{EOF}$  mobilitě elektroosmotického toku.

$$\zeta = \frac{4\pi\eta \mu_{EOF}}{\epsilon_r} \quad (4)$$

Díky tomuto potenciálu začnou v aplikovaném elektrickém poli kationty z pohyblivé difuzní vrstvy migrovat směrem ke katodě. Kationty migrují spolu se svými hydratačními obaly a tak strhávají všechny roztok uvnitř kapiláry směrem od anody ke katodě, obr. 2B. Vzhledem k malým průměrům kapilár je elektroosmotický tok přítomný celým průřezem kapiláry a jeho rychlostní profil je tím pádem rovinný, obr. 2C.

Rychlost elektroosmotického toku je dána jeho elektroforetickou pohyblivostí  $\mu_{EOF}$  a intenzitou elektrického  $E$  pole dle vzorce:

$$v_{EOF} = \mu_{EOF} \cdot E \quad (5)$$

Ze kterého vyplývá, že tok celého roztoku je urychlen větší intenzitou elektrického pole. Tato intenzita závisí na vloženém napětí  $U$  a na délce kapiláry  $l_c$ , dle rovnice:

$$E = \frac{U}{l_c} \quad (6)$$

Elektroosmotický tok, čímž i samotná separace, se zrychluje s klesající délkou kapiláry, jelikož roste intenzita elektrického pole.

## 1.2 Detekce

V kapilární zónové elektroforéze CZE detekujeme látky přímo v kapiláře [4, 8, 9]. Nejčastěji je používán UV-VIS spektrometrický detektor díky své univerzalitě při analýzách. K absorpci záření dochází v detekčním okénku, kde je odstraněna polymidová vrstva křemenné kapiláry, aby jí mohlo procházet záření. Výhodou UV-VIS

detektorů, které jsou vybaveny diodovým polem, je možnost snímat během jedné analýzy celé spektrum.

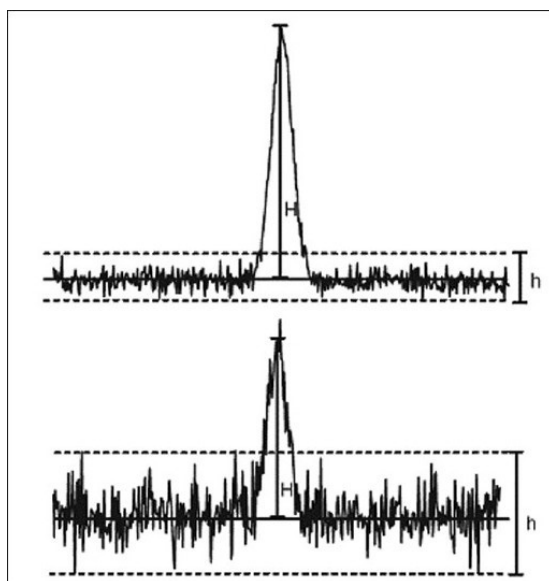
V CZE lze detekovat kladně nabitě látky, záporně nabitě látky i neutrální molekuly díky již výše zmíněnému elektroosmotickému toku. Kationty migrují rychlostí, která je součtem jejich elektroforetické rychlosti a rychlosti elektroosmotického toku, doputují tak první v pořadí. Neutrální látky migrují rychlostí elektroosmotického toku, můžeme je tak použít jako jeho markery. Anionty migrují rychlostí, která je rovna součtu elektroosmotického toku a jejich záporné elektroforetické rychlosti, jelikož putují ke kladné anodě, dochází tak k detektoru poslední.

### 1.3 Šum signálu detektoru

Odečtení signálu může být znesnadněno nestabilitou základní linie neboli šumem signálu, obr. 3, zvláště při nízkých koncentracích stanovovaného analytu [8, 9]. Hranice, kde je už nemožné analyt s jistotou detekovat, je pojmenována mez detekce, anglicky *limit of detection* (LOD), a je definována poměrem šumu k signálu následujícím vztahem:

$$LOD = \frac{3h}{m} \quad (7)$$

kde  $h$  představuje šum signálu a  $m$  směrnici kalibrační křivky. Mez detekce lze snížit potlačením šumu signálu. Šum může být způsoben různými příčinami a to chemickými, což zahrnuje nežádoucí chemické interakce, výkyvy teplot a tlaku, nebo instrumentálními, které jsou způsobeny přístrojem nebo okolními vlivy.



**Obrázek 3. Šum signálu [10]**

Jedním z nežádoucích a velice častých jevů je přehřívání roztoku v kapiláře, toto teplo, které vzniká průchodem elektrického proudu elektrolytem, se nazývá Joulovo teplo. Zvýšení teploty základního elektrolytu je přímo úměrné zvýšení nestability základní linie, které se objeví při zvýšení aplikovaného napětí [11] a zhoršuje se při větších průměrech kapilár. Přestože výhodou malých vnitřních průměrů kapilár je generace minimálního množství tepla a na rozdíl od rezistorů je kapilára snadněji chlazena termostatem za použití vzduchu či kapaliny, způsobuje řadu problémů [12, 13]. Při zahřívání roztoku dochází ke vzniku teplotních gradientů jak v průřezu, tak v délce kapiláry, což může způsobit destrukci separovaných látek, rozmývání zón analytu a celkovou nestabilitu základní linie signálu, vzhledem k tomu, že většina vlastností kapalin se mění s teplotou, a tak indukované teplotní gradienty zapříčiňují nehomogenitu fyzikálně chemických vlastností kapalin, jako jsou viskozita, konduktivita, mobilita a iontová síla [14-21]. V kapiláře tak vznikají koncentrační gradienty, lokální neuniformní elektrická pole a bublinky, které mimo jiné vedou ke vzniku tlaku v kapiláře, který zapříčiňuje parabolický profil elektroosmotického toku.

## 2 Cíle práce

Při studii elektroforetických mobilit markerů elektroosmotického toku v různých separačních pufrech [1] byl zjištěn jev, kdy při použití draselného pufru byla pozorována nestabilita na základní linii elektroferogramu, která při vyšších koncentracích pufru znemožňovala odečtení výsledků. Cílem práce je zjistit, zda je tento jev specifický pro draselné ionty nebo zda se může projevovat i u jiných iontů.

## 3 Experimentální část

### 3.1 Chemikálie

Pro přípravu acetátových pufrů byla použita 99,9% octová kyselina p. a. společnosti Lach-Ner Neratovice, hydroxid sodný p. a. firmy Penta Praha, hydroxid draselný p. a. firmy Penta, hydroxid amonný p. a. firmy Lach-Ner a hydroxid lithný p. a. firmy Sigma-Aldrich, USA. Jako marker elektroosmotického toku byla použita thiomocovina p. a. firmy Sigma-Aldrich, USA. Pro přípravu všech roztoků byla použita deionizovaná vody připravená systémem od firmy Premier MFG'D, USA.

K měření pro výpočet meze detekce byly použity benzoová kyselina p. a. firmy Lach-ner Neratovice a 4-hydroxybenzoová kyselina p. a. firmy Sigma-Aldrich, USA.

### 3.2 Instrumentace

Měření byla realizována na přístroji Agilent CE 7100 firmy Agilent Technologies, Německo. Pro měření byla zvolena křemenná kapilára s vnitřním průměrem 50  $\mu\text{m}$  firmy Polymicro Technologies, USA, s celkovou délkou 50,0 cm a s efektivní délkou 41,5 cm. Kapilára byla chlazena na teplotu 25  $^{\circ}\text{C}$  vzduchem. Vzorek byl dávkován hydrodynamicky (5 kPa x 3 s). K detekci byl použit UV-Vis detektor s diodovým polem při vlnové délce 200 nm.

Při přípravě roztoků NaOH, KOH, a  $\text{NH}_4\text{OH}$  bylo váženo na předvážkách VIBRA firmy Shinko Denshi, Japonsko. Při přípravě pufrů bylo pH měřeno přístrojem 3540 pH & Conductivity meter firmy Jenway, Velká Británie. Dále byly použity analytické váhy Precisa 262 SMA-FR, Precisa Instruments, Švýcarsko.

Vodivost jednotlivých pufrů byla měřena na přístroji 3540 pH & Conductivity meter firmy Jenway, Velká Británie.

### 3.3 Postup přípravy roztoků

Nejprve byla vypočítána potřebná koncentrace acetátového aniontu pro příslušný pufr o požadované iontové síle 250 mmol/l a požadovaném  $pH = 4,5$  v programu Peak Master [22], a to 590 mmol/l.

#### 3.3.1 Acetátový pufr dobře rozpustných hydroxidů

Poté bylo příslušné množství octové kyseliny naředěno deionizovanou vodou a titrováno příslušným 10 mol/l roztokem dobře rozpustného hydroxidu (hydroxid sodný, hydroxid draselný, hydroxid amonný) na  $pH = 4,5$ . Hodnota  $pH$  byla sledována pomocí  $pH$  metru. Roztoky hydroxidů byly připraveny rozpuštěním příslušných pevných hydroxidů a naředěním koncentrovaného roztoku hydroxidu amonného v deionizované vodě.

#### 3.3.2 Acetátový pufr málo rozpustného hydroxidu lithného

V případě lithno-acetátového pufru byl roztok připravený zředěním octové kyseliny a pomalu titrován přidavky pevného málo rozpustného hydroxidu lithného na  $pH = 4,5$ . Hodnota  $pH$  byla opět sledována pomocí  $pH$ -metru.

#### 3.3.3 Bezuhlíčitanový draselno-acetátový pufr

Naředěný zásobní roztok octové kyseliny byl titrován ošetřeným hydroxidem draselným. Pevný hydroxid draselný byl navážen na koncentraci 15 mol/l a jeho pevné perličky byly následně prolity deionizovanou vodou přivedenou k varu na vařiči. Takto ošetřený pevný hydroxid draselný byl rozpuštěn v deionizované vodě.

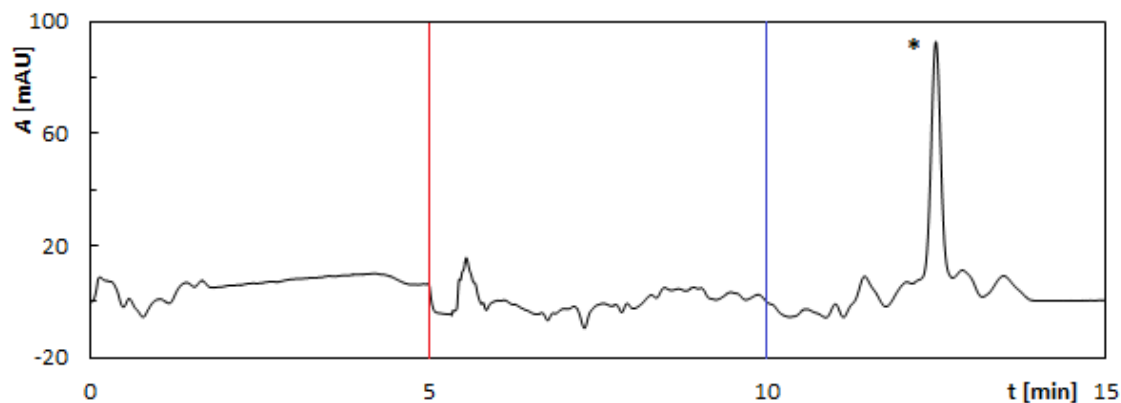
### 3.4 Metoda měření

Před každou sadou měření byla kapilára promývána deset minut 1 mol/l roztokem NaOH, dále pět minut deionizovanou vodou a tři minuty základním elektrolytem. Poté byl hydrodynamicky nadávkován marker elektroosmotického toku, thiomocovina, nebo vzorek tlakem 5 kPa po dobu 3 s. Na elektrody bylo následně vloženo stejnosměrné napětí či byl na vstupním konci kapiláry aplikován tlak 5 kPa dle konkrétního měření. Každé měření bylo prováděno třikrát.



### 3.5 Způsob vyhodnocení signálu

Míra nestability základní linie byla vyhodnocena pomocí směrodatné odchylky signálu detektoru bez analytu v programu Microsoft Excel 2010. Směrodatná odchylka byla vypočítána pro hodnoty signálu detektoru v intervalu od  $t = 0$  min do  $t = 5$  min a v intervalu od  $t = 5$  min do  $t = 10$  min, Obr. 4. Každé měření bylo prováděno třikrát, pro další vyhodnocení byl použit medián směrodatných odchylek.

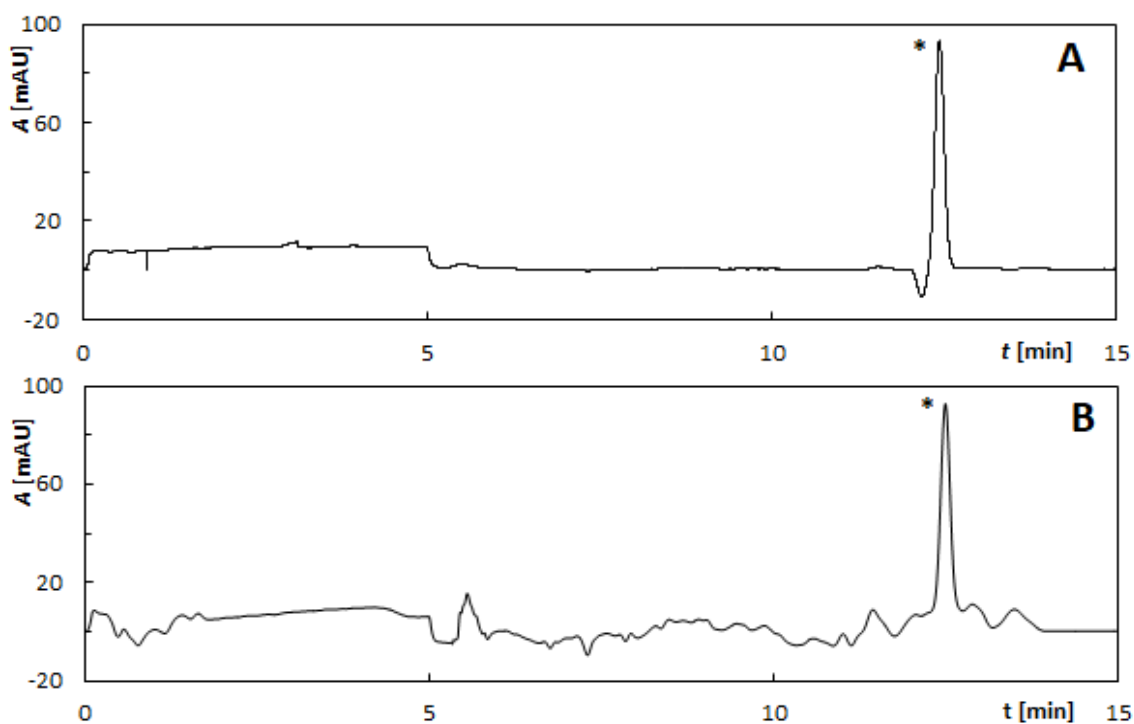


Obrázek 4. Ukázka vyhodnocení signálu detektoru na záznamu elektroferogramu za použití draselno-acetátového pufru, o iontové síle  $I = 250$  mM,  $pH = 4,5$ , napětí aplikováno od  $t = 0$  min do  $t = 5$  min,  $U = 10$  kV, od  $t = 5$  min aplikován tlak 5 kPa, (\*) marker elektroosmotického toku thiomocovina. Červená příčka vyznačuje hranici intervalů v  $t = 5$  min, modrá příčka hranici intervalu v  $t = 10$  min. Identifikace píku: (\*) EOF.

## 4 Výsledky a diskuze

### 4.1 Nestabilita základní linie

Na obr. 5 pozorujeme vysokou nestabilitu základní linie signálu pro draselný pufr ve srovnání se sodným pufrém. Nerovnosti jsou výraznější v intervalu 5-12 min, kdy je roztok v kapiláře mobilizován tlakem a prochází tak poměrně rychle detektorem. V intervalu 0-5 min, kdy je aplikováno napětí 15 kV, se pufr pohybuje kapilárou velmi pomalu, takže se nerovnosti příliš neprojevují, obr. 5. Kvůli nízké hodnotě pH pufru, která potlačuje disociaci silanolových skupin na vnitřní stěně kapiláry, je hustota elektrického náboje na stěně velmi nízká a stejně tak hodnota zeta potenciálu, která je hustotě náboje přímo úměrná. V důsledku toho je elektroosmotický tok v kapiláře prakticky nepřítomen a pohyb roztoku kapilárou v průběhu vkládání napětí je velmi pomalý.



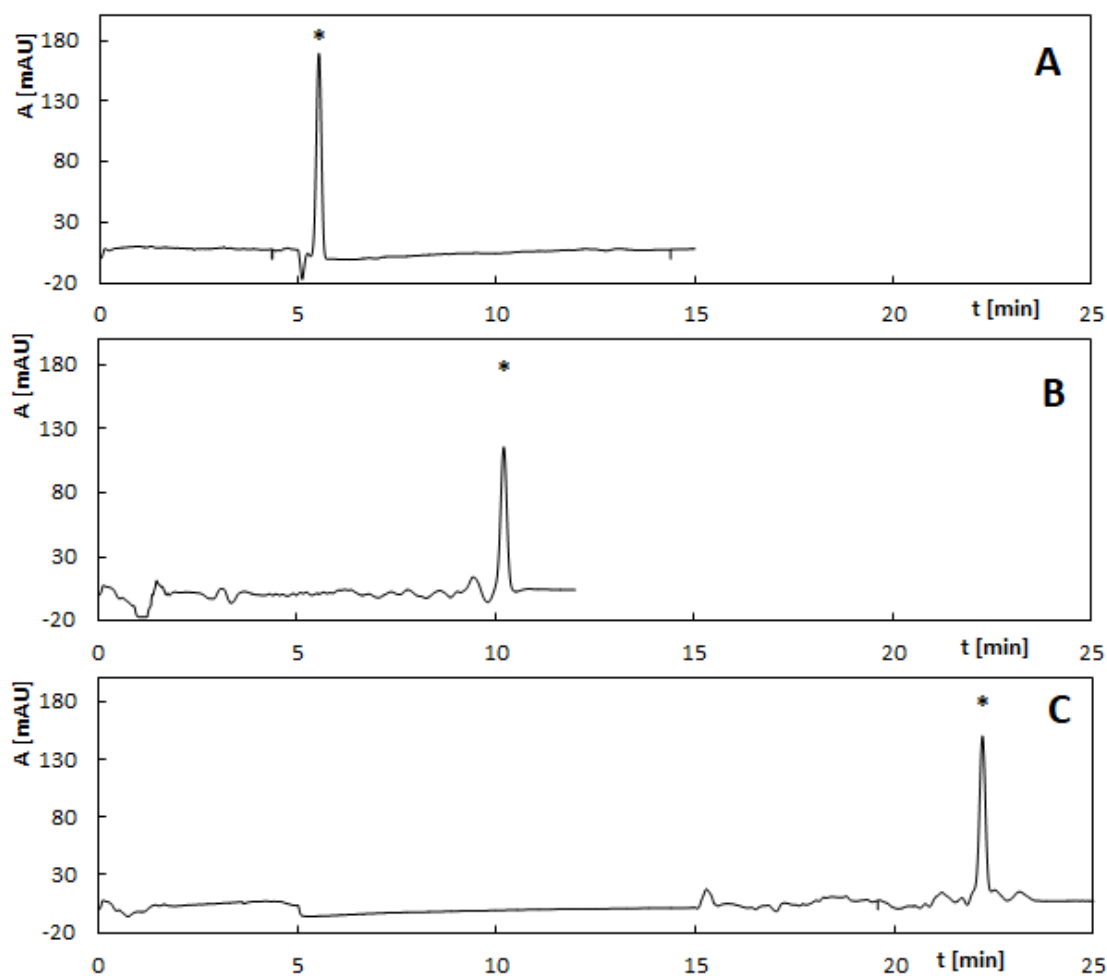
Obrázek 5. (A) Elektroferogram základního elektrolytu acetátového pufru se sodným kationtem,  $I = 250$  mM,  $pH = 4,5$ . Identifikace píku: (\*) EOF. (B) Elektroferogram základního elektrolytu acetátového pufru s draselným kationtem,  $I = 250$  mM,  $pH = 4,5$ . Metoda měření: vložení napětí 15 kV od  $t = 0$  min do  $t = 5$  min, od  $t = 5$  min aplikován tlak 5 kPa k mobilizaci systému. Identifikace píku: (\*) EOF.

Větší nerovnosti v základní linii signálu draselného pufru by mohly být způsobeny spektrometrickými vlastnostmi kationtu, rozdílné vlastnosti draselného a sodného kationtu se nicméně nepodařilo prokázat, jejich změřená UV-VIS absorpční spektra jsou shodná a ani jeden z pufrů nevykazuje spolehlivě měřitelnou absorpční vlnovku v rozsahu vlnových délek 200-750 nm.

Poté byl testován bezuhičitanový draselný pufr, aby byla vyloučena možnost, že nestabilitu základní linii signálu způsobuje přítomnost uhlíčitanů v elektrolytu. Výsledky se nelišily od normálně připraveného pufru.

## 4.2 Vliv napětí

Dále bylo ověřeno, že nestabilita základní linie signálu draselného pufru vzniká, ve chvíli, kdy se na systém s draselným kationtem aplikuje vysoké napětí, obr. 6. Při experimentu, kdy nebylo aplikováno napětí, ale pouze tlak 5 kPa na vstupním konci kapiláry, je základní linie draselného pufru stabilní, obr. 6A. Při vloženém vysokém napětí na elektrody po dobu jedné minuty se již projevují nerovnosti základní linie signálu, obr. 6B. Přestože se nechá základní elektrolyt v kapiláře stát po dobu deseti minut po aplikaci vysokého napětí před tím, než je mobilizován tlakem, je nestabilita základní linie signálu draselného pufru stále přítomná, obr. 6C. To vylučuje možnost, že nestabilita signálu by byla způsobena rozdílnými teplotními gradienty v délce kapiláry, které by se projevíly ve chvíli, kdy by doputovaly k detektoru, jelikož během doby deseti minut čekání by se teplotní gradienty uvnitř kapiláry umístěné v termostatované kazetě stihly alespoň částečně vyrovnat. Nestabilita základní linie signálu, která je pozorována za píkem elektroosmotického markeru, obr. 6C, značí, že pozorovaný jev se týká i roztoku základního elektrolytu draselného pufru, který se dostane do kapiláry až v průběhu vkládání napětí vlivem zbytkového elektroosmotického toku. Ustálení základní linie před koncem záznamu na Obr. 6C naopak značí, že u roztoku vnikajícího do kapiláry pouze pod vlivem tlaku již k deformaci základní linie nedochází.

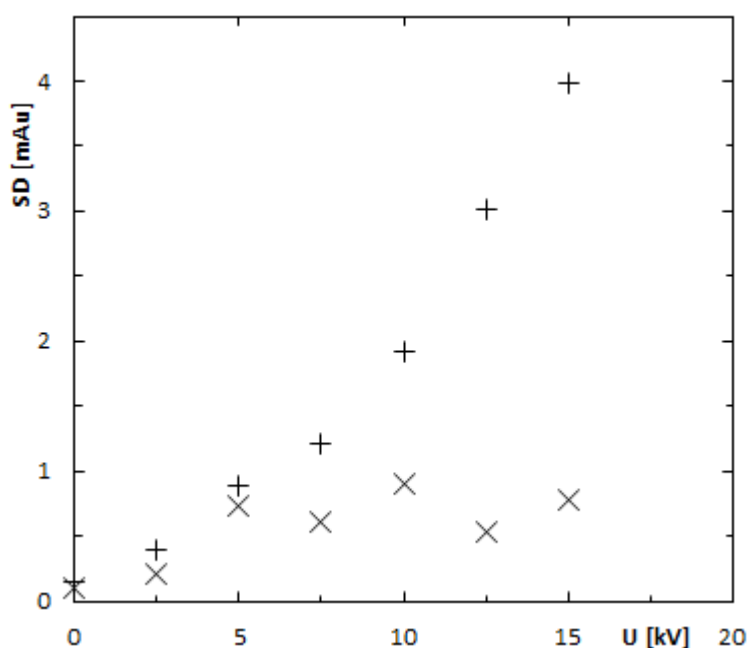


Obrázek 6. (A) Elektroferogram základního elektrolytu acetátového pufru s draselným kationtem,  $I = 250$  mM,  $pH = 4,5$ , tlak 5 kPa aplikován od  $t = 0$  min. Identifikace píku: (\*) EOF. (B) Elektroferogram základního elektrolytu acetátového pufru s draselným kationtem,  $I = 250$  mM,  $pH = 4,5$ . Metoda měření: Od  $t = 0$  min do  $t = 1$  min bylo vloženo napětí 15 kV, od  $t = 1$  min byl aplikován tlak 5 kPa. Identifikace píku: (\*) EOF. (C) Elektroferogram základního elektrolytu acetátového pufru s draselným kationtem,  $I = 250$  mM,  $pH = 4,5$ . Metoda měření: Od  $t = 0$  min do  $t = 5$  min bylo vloženo napětí 15 kV, od  $t = 5$  min do  $t = 15$  min byl roztok ponechán v klidovém stavu v kapiláře, od  $t = 15$  min byl aplikován tlak 5 kPa. Identifikace píku: (\*) EOF.

Následně byla měřena směrodatná odchylka základní linie signálu při různých hodnotách vloženého napětí na systém a výsledky byly vyneseny do grafu, obr. 7. Pozorujeme vzrůst SD signálu se vzrůstajícím vloženým napětím. Jedním z jevů, které

by mohly způsobovat takovéto chování je zahřívání roztoku v kapiláře, Joulovo teplo, ke kterému dochází při průchodu elektrického proudu roztokem.

S větším aplikovaným napětím vzniká mezi elektrodami intenzivnější elektrické pole, což znamená, že mezi elektrodami protéká větší proud. Tomu odpovídá vzrůst křivky jak draselného tak sodného pufru v grafu, obr 7. Vzrůst křivky draselného pufru je však značně strmější, toto vychýlení je způsobeno právě Joulovým přehříváním, s větším proudem se v systému s draselným pufrém roztok intenzivněji zahřívá než v systému se sodným, draselný pufr má tedy k tomuto jevu větší předpoklady.



**Obrázek 7. Graf závislosti směrodatné odchylky signálu detektoru na aplikovaném napětí. Metoda měření: vložení napětí od  $t = 0$  min do  $t = 5$  min, od  $t = 5$  min aplikován tlak 5 kPa. Vkládané napětí bylo následující 0,0 kV; 2,5 kV; 5,0 kV; 7,5 kV; 10,0 kV; 12,5 kV a 15,0 kV. Jako základní elektrolyt byl použit acetátový pufr  $I = 250$  mM,  $pH = 4,5$ , s draselným (+) a sodným (x) kationtem.**

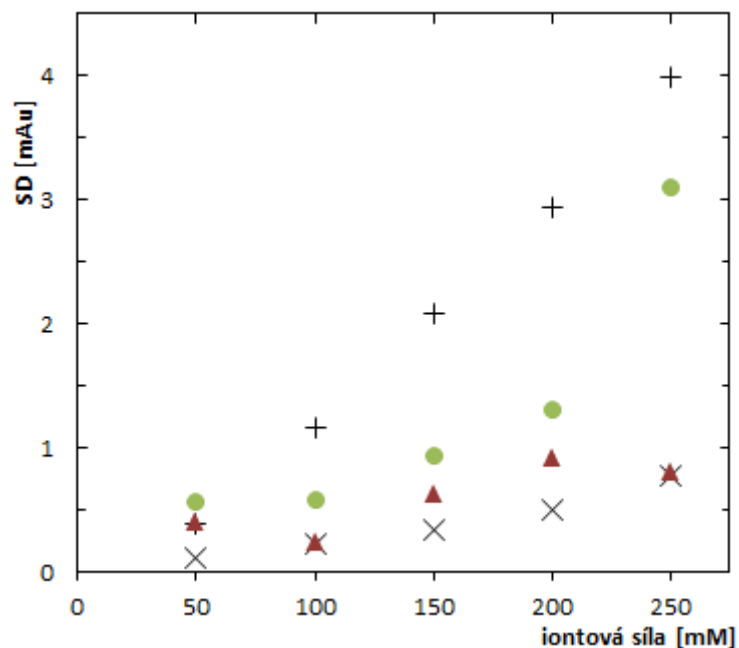
### 4.3 Vliv vlastností základního elektrolytu

Jedním z předpokladů pro silnější zahřívání draselného pufru v kapiláře je vyšší vodivost. Tabelované hodnoty limitní molární vodivosti při teplotě 25 °C jsou pro draselný iont  $0,00735 \text{ S m}^2 \text{ mol}^{-1}$  a pro sodný iont  $0,00501 \text{ S m}^2 \text{ mol}^{-1}$  [23]. Hodnota limitní molární vodivosti pro draselný iont je vyšší, tudíž při stejné iontové síle a pH bude mít roztok obsahující draselné ionty vyšší vodivost. Z Ohmova zákona vyplývá, že roztokem draselných iontů bude při stejné hodnotě vloženého napětí procházet vyšší elektrický proud, který povede k intenzivnějšímu zahřívání v kapiláře.

Závislost na iontové síle základního elektrolytu byla prověřena i pro základní elektrolyty s dalšími druhy kationtů, amonným a lithným, obr. 8. Pro každý druh kationtu byla změřena měrná vodivost jejich elektrolytu jednotlivých iontových sil, vyneseny v tabulce 1. Z této tabulky je zřetelné, že elektrolyt s amonným puftrem má nejvyšší vodivost, a tak by měl dle Ohmova zákona vykazovat největší nestabilitu základní linie signálu. Na obr. 8 je vynesena SD signálu proti iontové síle roztoku, kde je viditelné, že s iontovou silou, tedy i konduktivitou, narůstají nerovnosti u všech kationtů dle předpokladu, ale u draselného jsou opět zřetelně nejvyšší.

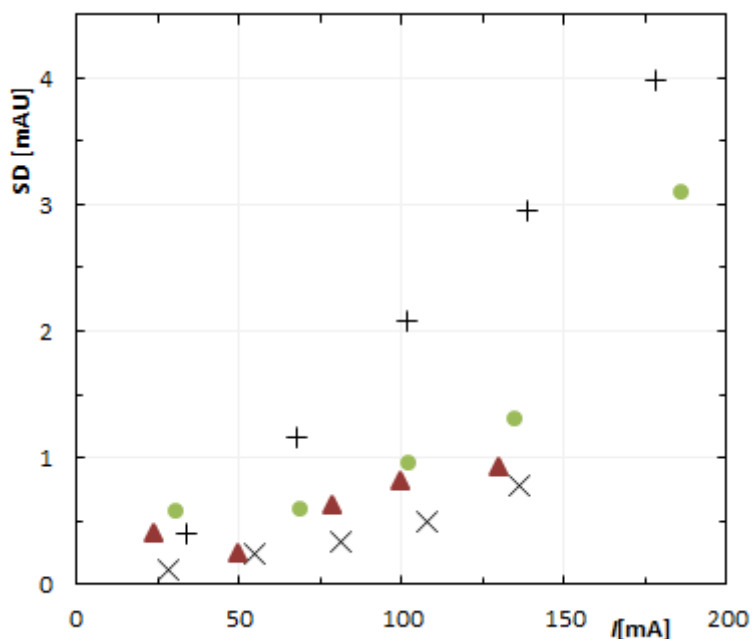
**Tabulka 1. Změřené hodnoty konduktivity acetátového pufru pro daný kationt.**

Iontová síla acetátového pufru s daným kationtem [mmol/l]	Konduktivita $\kappa$ pro daný kationt [mS/m]			
	Li <sup>+</sup>	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>
50	3,59	4,16	4,60	5,08
100	6,65	7,86	9,12	9,80
150	9,29	11,06	13,38	13,90
200	11,58	13,88	17,50	17,85
250	14,08	16,34	21,50	22,50



**Obrázek 8.** Graf závislosti směrodatné odchyly signálu detektoru na iontové síle acetátového pufru;  $pH = 4,5$ , s jednotlivými kationty: draselným (+), sodným (x), amonným (•), lithným (Δ). Metoda měření: do  $t = 5$  min aplikované napětí 15 kV, poté od  $t = 5$  min systém zmobilizován tlakem 5 kPa.

Závislost směrodatné odchyly signálu na iontové síle vzhledem k rozdílným vodivostem jednotlivých kationů nezobrazuje jednoznačně odchylku hodnot směrodatné odchyly signálu draselných kationtů. Byl tedy odečten elektrický proud, který protékal systémem pro jednotlivé druhy kationtů při jednotlivých iontových silách a byl vnesen do grafu, obr. 9, místo iontových sil. Pozorujeme, že pufru s draselným kationtem náleží největší nestabilita signálu. I v případech, kdy pufru ostatních kationtů protéká podobný proud jako pufr s draselným iontem, je hodnota směrodatné odchyly signálu pro draselný pufr výrazně vyšší než směrodatné odchyly pro všechny ostatní kationty. Míra nestability základní linie signálu tedy nezávisí pouze na konduktivitě roztoku, ale vystupuje zde další neznámý faktor, který náleží přímo acetátovému pufru s draselným kationtem.



**Obrázek 9.** Graf závislosti směrodatné odchylky signálu detektoru na proudu, který prochází mezi elektrodami, pro jednotlivé iontové síly; 50, 100, 150, 200, 250 mM, acetátového pufru s kationty: draselným (+), sodným (x), amonným (●), lithným (Δ). Metoda měření: do  $t = 5$  min aplikované napětí 15 kV, poté od  $t = 5$  min systém zmobilizován tlakem 5 kPa.

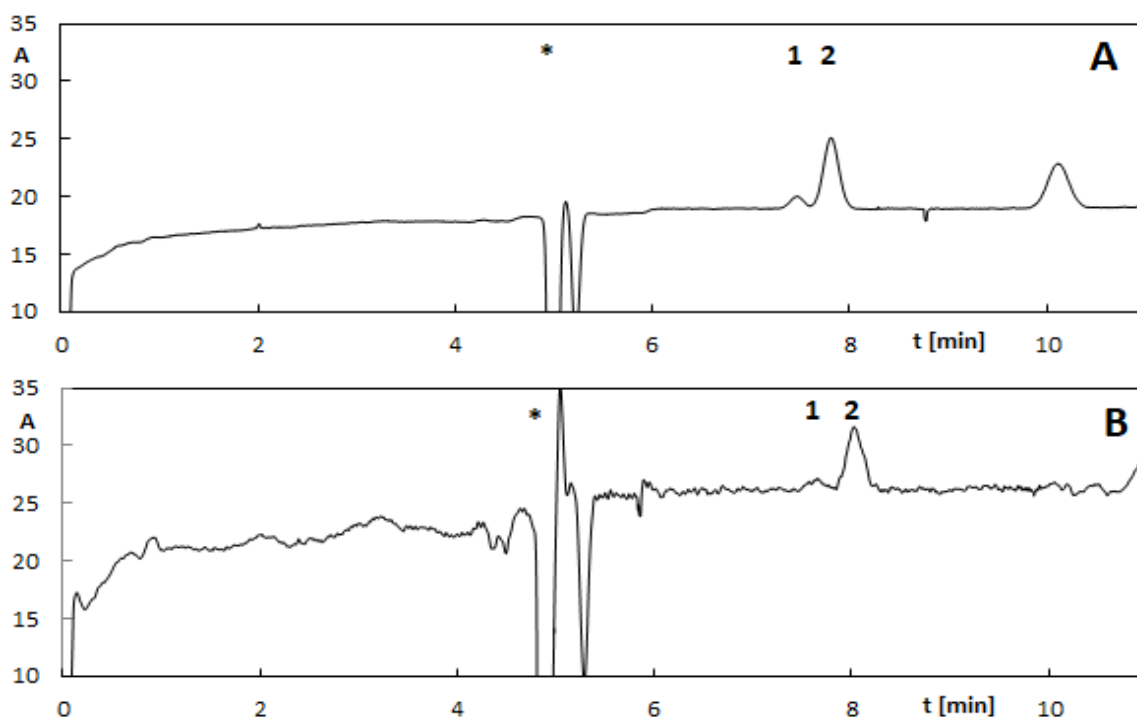
#### 4.4 Vliv na parametry analytické metody

Dále byla proměřena kalibrační závislost korigovaných ploch píků na koncentraci dvou aniontů, benzoové (BA) a 4-hydroxybenzoové kyseliny (4-HBA), v sodném a draselném pufru, aby byla ukázána nesnadnost odečtení signálu detektoru. Mez detekce byla vypočtena jako koncentrace odpovídající trojnásobku hodnoty chyby lineární regrese.

Ztížení odečtení signálu lze pozorovat již na obr. 10, elektroferogram separace v sodném pufru má pouhým okem viditelnou stabilní základní linii signálu, obr. 10A, oproti draselnému pufru, obr 10B, kde je pík 1 těžce rozeznatelný od šumu základní linie signálu. V obou případech se přitom jedná o shodnou koncentraci analytů. Na obr. 11 jsou zobrazeny čtyři kalibrační závislosti. Body kalibrační závislosti pro benzoovou a 4-hydroxybenzoovou kyselinu, které byly separovány v sodném pufru, obr. 11A a obr. 11C, jsou proloženy rovnicí lineární regrese velice přesně, u obou s koeficientem



determinace  $R^2$  0,9992, tab. 2, lineární regrese je tedy schopna popsat variabilitu dat z 99,92 %, a pouze 0,08 % hodnot odpovídá náhodnému kolísání. Koeficient determinace lineární regrese kalibrační závislosti 4-hydroxybenzoové kyseliny separované v draselném pufru, obr.11B, je nižší než při separaci v sodném pufru, rovnice lineární regrese nepopisuje 2,85 % variability hodnot, tab. 2. Rovnice lineární regrese kalibrační závislosti benzoové kyseliny separované v draselném pufru nepopisuje 0,6% variability, tab. 2.

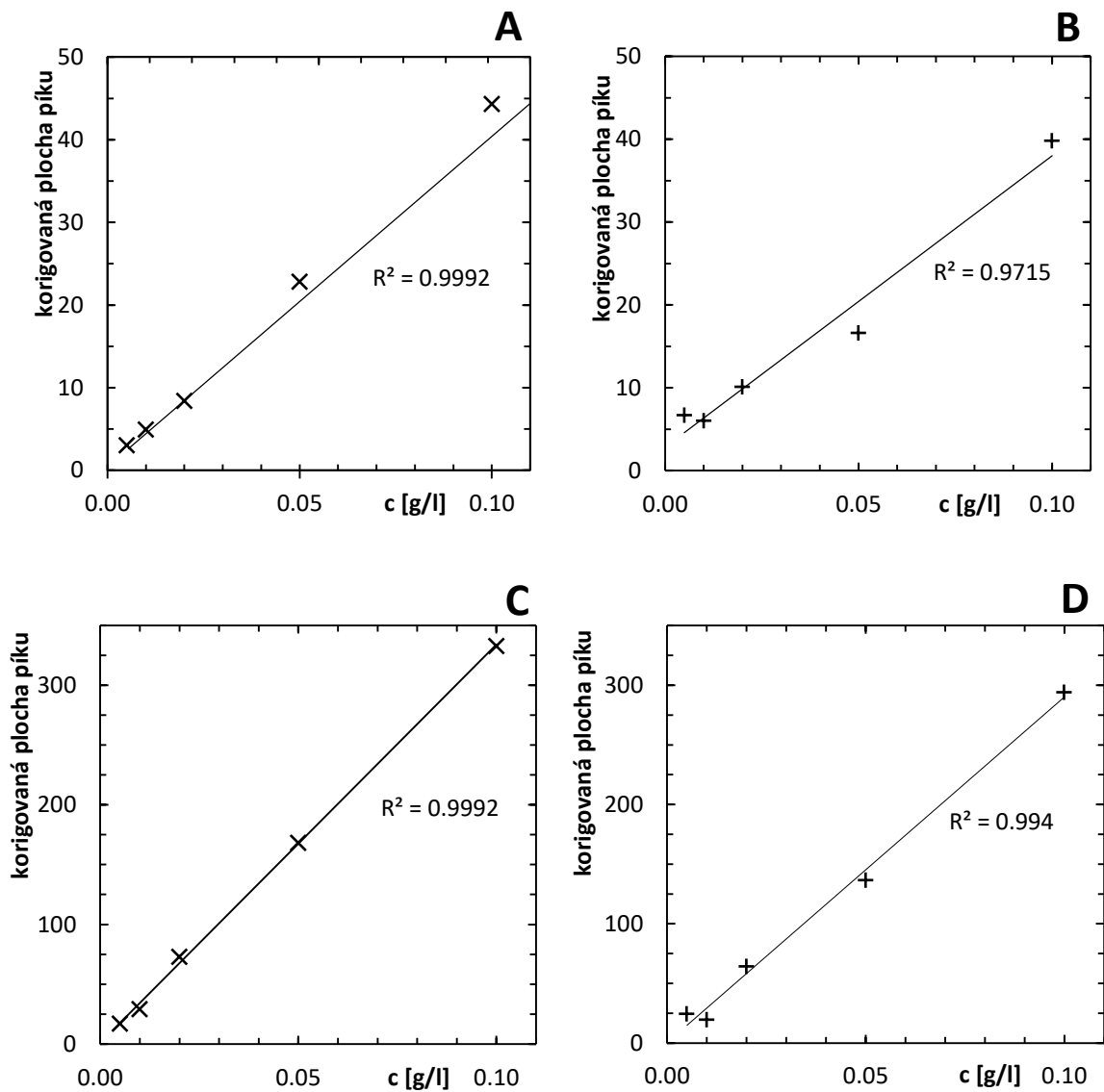


**Obrázek 10. (A) Elektroferogram separace v sodno-acetátovém pufru,  $I = 100$  mM,  $pH = 4,5$ . (B) Elektroferogram separace v draselnno-acetátovém pufru,  $I = 100$  mM,  $pH = 4,5$ ; identifikace píků (1) 4-hydroxybenzoová kyselina, (2) benzoová kyselina, (\*) EOF.**

**Tabulka 2. Charakteristika metody**

	Sodný pufr		Draselný pufr	
	4-HBA	BA	4-HBA	BA
<b>R<sup>2</sup></b>	0,9992	0,9992	0,9715	0,9940
<b>S<sub>y,x</sub> [g/l]</b>	0,5	4,3	2,7	10,2
<b>LOD [g/l]</b>	0,003	0,004	0,015	0,010

Mez detekce LOD byla vypočítána v programu Microsoft Excel přes chybu regrese  $s_{y,x}$  hodnoty v tab. 2. Mez detekce pro 4-hydroxybenzoovou kyselinu je v draselném pufru pětikrát vyšší než v sodném pufru. Mez detekce pro benzoovou kyselinu v draselném pufru je dvaapůlkrát vyšší.



Obrázek 11. (A) Kalibrační závislost korigované plochy píku 4-hydroxybenzoové kyseliny na její koncentraci v sodno-acetátovém pufru,  $I = 100$  mM,  $pH = 4,5$ . (B) Kalibrační závislost korigované plochy píku 4-hydroxybenzoové kyseliny na její koncentraci v draselno-acetátovém pufru,  $I = 100$  mM,  $pH = 4,5$ . (C) Kalibrační závislost korigované plochy píku benzoové kyseliny na její koncentraci v sodno-acetátovém pufru,  $I = 100$  mM,  $pH = 4,5$ . (D) Kalibrační závislost korigované plochy píku benzoové kyseliny na její koncentraci v draselno-acetátovém pufru,  $I = 100$  mM,  $pH = 4,5$ .

## 5 Závěr

Míra nestability základní linie signálu byla sledována jako její směrodatná odchylka a byla porovnávána pro draselný, sodný, amonný a lithný pufr. Pro draselný a sodný pufr bylo ověřeno, že nestabilita signálu je způsobena při aplikaci vysokého napětí. Při aplikaci pouze tlaku na vstupním konci kapiláry byla základní linie signálu stabilní. Již v případě aplikace vysokého napětí po dobu jedné minuty se projevila základní linie signálu jako nestabilní. Bylo vyloučeno, že by nestabilita signálu byla způsobena teplotními gradienty v kapiláře přítomnými ve chvíli detekce. Nestabilita signálu porovnávaná při různých hodnotách aplikovaného napětí demonstrovala vliv Joulova tepla. U všech zkoumaných kationtů bylo pozorováno zhoršení stability základní linie signálu s rostoucí iontovou silou a konduktivitou, bylo tedy ověřeno, že se nejedná o jev výlučně spojený s draselnými kationty. Byla změřena konduktivita jednotlivých pufrů a pufr s amonným kationtem měl nejvyšší hodnotu konduktivity. Přesto byl naměřen největší elektrický proud v pufru s draselným kationtem a nestabilita signálu v něm byla výrazně největší. Bylo zjištěno, že míra nestability základní linie signálu draselného pufru nezávisí pouze na konduktivitě roztoku, ale vystupuje zde další neznámý faktor, který náleží přímo acetátovému pufru s draselným kationtem. Dále byly sestrojeny kalibrační závislosti pro benzoovou a 4-hydroxybenzoovou kyselinu a byla vypočítána mez detekce, aby byla snáze ilustrována použitelnost metody. Pro draselný pufr byla mez detekce ztelně vyšší a to 0,015 g/l a 0,010 g/l, na rozdíl od sodného pufru, kde byly hodnoty nízké 0,003 g/l a 0,004 g/l.

## Literatura

- [1] Křížek T.; Kubíčková A.; Hladílková J.; Coufal P.; Heyda J.; Jungwirth P. *Electrophoresis* 2014, 35, 617-624
- [2] <https://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/cze.html>, převzato 7. 1. 2019, 12:35
- [3] Prof. Fritz, J. S.; Dr. Gjerde, D. T.: *Ion Chromatography*, Germany, 2009
- [4] Kašička, V.: Teoretické základy a separační principy kapilárních elektromigračních metod, *Chemické listy*, 1997, 91, 320-329
- [5] Wilson, W. H.; McNair, H. M.: Tunable positive and negative surface charges on a capillary wall: exploiting the Immobiline chemistry, *J. Chromatography*, 1991, 540, 77-83
- [6] Lauer, H. H.; Rozing, G. P.: *High Performance Capillary Electrophoresis*. Agilent Technologies, Germany, 2009
- [7] Kirby, B. J.; Hasselbrink Jr., E. F.: Zeta potential of microfluidic substrates: 1. Theory, experimental techniques, and effects on separations, *Electrophoresis*, 2004, 25, 187-202
- [8] Skoog; Holler; Crouch: *Principles of Instrumental Analysis*, Sixth edition, USA, 2007
- [9] Pohanka, M.: Základy statistiky laboratorních experimentů, *Vojenské listy*, 2010, 79, 60-63
- [10] <http://www.cyonline.org/article.asp?issn=22295186;year=2011;volume=2;issue=1;spage=21;epage=25;aulast=Shrivastava>, převzato 7. 1. 2019, 12:44
- [11] Bello, M. S.; de Besi, P.; Righetti, P. G.: Thermally induced fluctuations of the electric current and baseline in capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A*, 1993, 652, 317-327

- [12] Musheev, M. U.; Javaherian, S.; Okhonin, V.; Krylov, S. N.: Diffusion as a Tool of Measuring Temperature inside a Capillary, *Anal. Chem.* 2008, 80, 6752-6757
- [13] Evenhuis, Ch. J.; Musheev, M. U.; Krylov, S. N.: Universal Method for Determining Electrolyte Temperatures in Capillary Electrophoresis, *Anal. Chem.*, 2011, 83, 1808-1814
- [14] Xuan, X.: Joule heating in electrokinetic flow, *Electrophoresis*, 2008, 298, 33-34
- [15] Cetin, B.; Li, D.: Effect of Joule heating on electrokinetic transport, *Electrophoresis*, 2008, 29,994-1005
- [16] Nishikawa, T.; Kambara, H.: Temperature profile of buffer-filled electrophoresis capillaries using air convection cooling, *Electrophoresis*, 1996, 17, 1115-1120
- [17] Rathore, A. S.; Reynolds, K. J.; Colón, L. A.: Joule heating in packed capillaries used in capillary electrochromatography, *Electrophoresis*, 2002, 23, 2918-2928
- [18] Evenhuis, Ch. J.; Haddad, P. R.: Joule heating effects and the experimental determination of temperature during CE, *Electrophoresis*, 2009, 30, 897–909
- [19] Xuan, X.; Sinton, D.; Li, D.: Thermal and effects on electroosmotic flow in a capillary, *International Journal of Heat and Mass Transfer* 2004, 47, 3145-3157
- [20] Xuan, X.; Li, D.: Band broadening in capillary zone electrophoresis with axial temperature gradients, *Electrophoresis* 2005, 26, 166-175
- [21] Ghosal, S.: Fluid mechanics of electroosmotic flow and its effect on band broadening in capillary electrophoresis, *Electrophoresis*, 2004, 25, 214-228
- [22] Zusková, I.; Gaš, B.; Ušelová-Včeláková, K.: Peakmaster 5.3 (počítačový program, dostupný z <https://web.natur.cuni.cz/gas/> )
- [23] Mohr, P. J.; Taylor, B. N.: CODATA Recommended Values of the Fundamental Physical Constants: *Journal of Physical Chemical Reference Data*, Vol. 28, No. 6, 1999