

Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta
Katedra fyzikální a makromolekulární chemie



DIPLOMOVÁ PRÁCE

Oscilující elektrolyty v elektroforéze

Martina Riesová

Praha 2008

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně, pod vedením školitele prof. RNDr. Bohuslava Gaše, CSc., a že jsem všechny použité prameny řádně citovala.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne.....

.....
podpis

Klíčová slova

kapilární zónová elektroforéza

lineární model elektromigrace

systemové píky

eigenproblém

komplexní eigenmobility

oscilující elektrolyty

PeakMaster

Ráda bych zde poděkovala svému školiteli prof. RNDr. Bohuslavu Gašovi, CSc., za rady a podnětné vedení práce na tomto zajímavém tématu.

Dále bych chtěla poděkovat RNDr. Vlastimilu Hruškovi za jeho pomoc a užitečné rady a celé skupině Elektromigračních metod za milé pracovní prostředí.

Obsah

1	Úvod	8
2	Teoretická část	10
2.1	Literární přehled problematiky systémových píků	10
2.2	Lineární teorie elektromigrace	15
2.3	Oscilující elektrolyty	18
2.4	Softwarové nástroje pro řešení a modelování elektromigrace	20
2.4.1	Simul.	21
2.4.2	PeakMaster	21
3	Cíle práce	22
4	Experimentální část	23
4.1	Přístroje a vybavení	23
4.2	Seznam chemikálií	24
4.3	Vytipování oscilujících systémů pomocí programu PeakMaster	25
4.4	Diskuse výsledků	33
4.4.1	Systém GMP, kyselina fosforečná a Na ⁺	33
4.4.2	Systém kyselina maleinová, kyselina citrónová a Na ⁺	37
4.4.3	Systém kyselina chromová, kyselina ftalová a Cs ⁺	41
4.4.4	Systém kyselina octová, kyselina citrónová a Na ⁺	43
4.4.5	Systém kyselina maleinová, kyselina ftalová a Na ⁺	45
4.4.6	Kvarterní systém	47
4.4.7	„Neoscilující“ systémy	48
4.4.8	Robustnost oscilujícího systému	48
4.4.9	Porovnání amplitudy oscilací se simulací	50
5	Závěr	52

Seznam použitých zkratk a symbolů

symbol význam

A	amplituda gaussovského píku
b_x	molární vodivostní odezva
c_i	molární koncentrace i -té složky
$c_{i,z}$	molární koncentrace z -té formy i -té složky
c_i^{in}	počáteční molární koncentrace i -té složky
\bar{c}	vektor molárních koncentrací
\tilde{c}_i	porucha v koncentraci i -té složky
\vec{c}	vektor poruch v koncentracích
C_i	konstantní hodnota molární koncentrace i -té složky
E	intenzita elektrického pole
j	proudová hustota
L_{celk}	celková délka kapiláry
L_{det}	délka kapiláry k detektoru
\mathbf{M}	čtvercová matice mobilit
n_i	nejmenší sytnost i -té složky
ρ_i	nejvyšší sytnost i -té složky
pK_a	záporný dekadický logaritmus disociační konstanty
\bar{q}_i	levý vlastní vektor matice \mathbf{M} příslušející vlastnímu číslu λ_i
\mathbf{Q}	matice levých vektorů
\mathbf{Q}^{-1}	inverzní matice k matici \mathbf{Q}
S_x	<i>velocity slope</i>
t	čas
TR	<i>transfer ratio</i>
u_i	iontová mobilita i -té složky
$u_{i,z}$	iontová mobilita z -té iontové formy i -té složky
v_i	elektroforetická rychlost i -té složky

w_i	proměnná závislá na \tilde{c}_i
w_i^{in}	počáteční hodnota proměnné w_i
x	podélná osa kapiláry ve směru vnějšího elektrického pole
z	nábojové číslo
α	reálná část komplexní elektroforetické rychlosti
β	imaginární část komplexní elektroforetické rychlosti
κ	specifická vodivost
κ_{BGE}	specifická vodivost neporušeného základního elektrolytu
λ	vlastní číslo matice \mathbf{M} ; eigenmobilita
σ^2	variance gaussovského píku

zkratka význam

BGE	základní elektrolyt (<i>background electrolyte</i>)
CCD	bezkontaktní vodivostní detektor (<i>contactless conductivity detector</i>)
CZE	kapilární zónová elektroforéza (<i>capillary zone electrophoresis</i>)
DAD	detektor diodového pole (<i>diod array detector</i>)
EOF	elektroosmotický tok (<i>electroosmotic flow</i>)
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie (<i>high performance liquid chromatography</i>)
kap.	kapitola
kys.	kyselina
LTE	lineární teorie elektromigrace
Obr.	Obrázek
PM	PeakMaster
Tab.	Tabulka

1 Úvod

Elektroforéza je známa již více než sto let a v kapilárním provedení jako kapilární zónová elektroforéza (CZE) je posledních dvacet pět let využívána jako analytická separační metoda. Nevyhnutelně stejně starý musí být i jev, kterému dnes říkáme systémový pík. Trvalo však poměrně dlouho, než se začali vědci tímto jevem zabývat a vysvětlovat jej.

V prvním kroku musela být opuštěna myšlenka, že základní elektrolyt (BGE) je jen pasivním nosným médiem. Kationty a anionty základního elektrolytu ovlivňují pohyb iontů vlivem Coulombických interakcí či vlastním pohybem v elektrickém poli, podílejí se na vodivosti elektrolytu a ovlivňují tak pohyb každé složky elektroforetického systému. Následně mohly přijít pokusy o nalezení obecných zákonů, které by popsaly pohyb analytů a chování složek základního elektrolytu. Uvážíme-li, že koncentrace a pohyb jednotlivých složek kapilárou výrazně závisí i na koncentraci ostatních složek (rovnice continuity), potom jakýkoliv přístup k popisu elektromigrace vede nevyhnutelně k nelineárnímu problému. Takové rovnice se pak mohou řešit numericky, což vyžaduje pomoc počítačů a matematických programů. Pokud se ale hledá uzavřené, analytické řešení, pak je většinou nutné omezit platnost rovnic a výrazně je tím zjednodušit, nebo, pokud je to možné, rovnice zlinearizovat, jak je tomu v případě lineárního modelu elektromigrace. Zde je linearizace snáze možná díky uspořádání kapilární zónové elektroforézy. I analytická řešení si ale vyžadují pomoc počítačů a programů schopných rychle vypočítat zadané rovnice a poskytnout tak potřebné informace v krátkém čase. Lze říci, že bez použití počítačů by byly veškeré teoretické přístupy a modely pro praxi téměř nevyužitelné. Proto se nelze divit, že se se studiem systémových píků a s jejich vysvětlováním a popisem začalo až v uplynulých dvou desetiletích.

Lineární model elektromigrace se zdá být vhodným a správným přístupem. Na jeho základě byly dokázány jevy dříve experimentálně zjištěné (systémové píky a jejich pozice, interakce systémových zón a zón analytů, neobvyklé tvary a disperze píků), ale také byly předpovězeny jevy nové, které byly až následně experimentálně prokázány (systémy bez stacionárního píku).

Posledními a nejzvláštnějšími elektroforetickými systémy, které byly předpovězeny na základě lineárního modelu elektromigrace, jsou systémy s komplexními hodnotami jistých parametrů separačního systému, které nazýváme eigenmobility. V těchto systémech se namísto formování systémových píků vytvářejí, při průchodu elektrického proudu, periodické struktury, oscilace. Jsou proto nazývány oscilující systémy, či oscilující elektrolyty. Uvedené elektrolyty by byly jen s malou pravděpodobností nalezeny náhodou, experimentálně, a za svůj objev vděčí právě teoretické předpovědi jejich existence. I přes intenzivní hledání bylo obtížné takové systémy najít a bez využití počítačů a příslušného softwarového vybavení by se tak pravděpodobně ani nestalo. Oscilující elektrolyty byly objeveny teprve nedávno v naší skupině *Elektromigračních metod*, vedené prof. Gašem [1], a jsou tedy velmi málo experimentálně prozkoumány. Tato práce má za cíl právě experimentální studium oscilujících elektrolytů.

2 Teoretická část

2.1 Literární přehled problematiky systémových píků

Když je v kapilární zónové elektroforéze dávkován vzorek do kapiláry, výsledný elektroferogram často obsahuje nadbytečné píky, které nepřísluší žádnému analytu. Tyto píky se nazývají systémové píky. Název systémový pík byl poprvé použit pro pojmenování stejného jevu ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii (HPLC). V elektroforéze byl jev poprvé důkladněji studován Poppem [2,3], který obě separační metody popsal jednotným matematickým modelem a ukázal tak na podobnost vzniku systémových píků v obou metodách. Ačkoliv systémové píky nelze snadno předpovědět a vysvětlit je, jsou nedílnou součástí separačního systému. Nadávkování vzorku do původně homogenního složení základního elektrolytu způsobí poruchu, která se po zapnutí hnacího napětí pohybuje kapilárou. Pohybující se porucha v koncentraci základního elektrolytu, která nedoprovází žádný analyt, se nazývá systémová zóna. Pokud systémová zóna doputuje až na místo detektoru, je jím zaznamenána jako systémový pík. Systémové píky se mohou objevit pouze v případě, že detektor reaguje alespoň na jednu složku základního elektrolytu (nepřímá UV detekce, vodivostní detekce).

Jelikož systémové píky mohou být podobné píkům analytů a putující systémová zóna může ovlivnit zónu analytu, je tento jev považován spíše za rušivý a snižuje robustnost elektroforetických separací.

Elektroforéza má, například ve srovnání s chromatografií, výhodu v jednoduchosti prostředí, v němž probíhá separační proces (homogenní roztok, jednoduchá geometrie kapiláry). To umožňuje dobře formulovat transportní rovnice pro všechny složky systému. Složka základního elektrolytu je definována jako slabá kyselina nebo báze, případně amfolyt, jakékoliv sytnosti. Například všechny iontové i neiontové formy jedné vícesytné kyseliny jsou považovány za jednu složku. Tento přístup samozřejmě zahrnuje i silné kyseliny a báze, u nichž se jednoduše předpokládá, že mají nízkou resp.

vysokou hodnotu pK_a . Hydroxidové a vodíkové ionty nejsou v tomto modelu považovány za složky systému [2], protože jsou určeny makroskopickou podmínkou elektroneutality a iontovým součinem vody.

Prvním přístupem k řešení chování systémových zón byla formulace rovnic hmotnostní bilance na pohyblivých rozhraních. Prvními, kdo představil tento koncept pro kapilární zónovou elektroforézu, byli Longsworth [4] a Alberty [5] v polovině 20. století. Původně byly tyto rovnice formulovány pro rozhraní dvou zón složek s konečnou koncentrací, ale mohly být použity i pro zóny CZE, kde je koncentrace analytu v zóně blízká nule. Použití tohoto matematického modelu umožnilo například určit pH a složení v zóně vzorku. Beckers ve své sérii článků aplikuje model stacionárního stavu i na nestacionární procesy v CZE. Pík vzorku dělí na malé segmenty, v každém segmentu počítá pH, intenzitu elektrického pole, koncentraci koiontu a protiiontu. Za koion je považována složka základního elektrolytu pohybující se v elektrickém poli stejným směrem jako vybraný analyt, protiiont putuje směrem opačným. Tyto parametry získává pomocí hmotnostní bilance obou iontů na pohyblivých rozhraních segmentů, upraveného Ohmova zákona a podmínky elektroneutality [6]. V práci [7] ukazuje dobrou shodu ve srovnání teoretických předpovědí a experimentů z hlediska asymetrie a polaritý píků (*fronting-tailing*, *peak-dip*) pro základní elektrolyty s jedním koiontem. Pro systémy se dvěma koionty tyto předpovědi selhávají [8]. Obecný popis je proto nahrazen sadou diagramů, tzv. SystChart, zobrazujících vztahy mezi mobilitou analytu a jednotlivými parametry (pH, koncentrace kationtů a aniontů v BGE) pro konkrétní základní elektrolyt. To poté umožňuje v daném případě odhadnout asymetrii a polaritu píků [9]. Gebauer s Bočkem dávají do spojitosti *fronting* a *tailing* píků se záporným či kladným znaménkem veličiny *velocity slope* S_x a sestavují diagramy tvarů píků (*Peak Shape Diagram*) pro daný BGE [10]. Dále bylo možné, v rámci tohoto přístupu, formulovat pro jednoduché systémy veličiny důležité pro vodivostní a nepřímou detekci – limitní molární vodivostní odezva b_x [11] a *transfer ratio* TR [10,12]. Tato teorie uměla předpovídat existenci některých systémových píků nebo interakci systémových zón se zónou analytu, způsobující neobvyklou nebo tzv. schizofrenní disperzi píku analytu [13,14,15,16]. Vykonáno bylo

mnoho experimentální práce a z ní dále pramenily snahy vysvětlit a popsat a případně i předpovědět výskyt systémových píků. Ne všechny jevy byl však schopen tento přístup osvětlit a proto tyto snahy často ústily jen v empirická pravidla pro dané typy systémů a v galerie systémových zón [15]. Nebyl to přístup schopný charakterizovat obecný systém (N složek, slabých či silných, jednosytných či vícesytných, kyselin, zásad či amfolytů) z pohledu počtu systémových zón, jejich mobilit a ovlivnění separace analytů.

Druhý přístup zavedl do CZE Poppe [2], když vysvětlil existenci systémového píku a možnost nepřímé detekce na základě matematického modelu linearizovaných transportních rovnic. Tento matematický model ústil v řešení problému vlastních hodnot matice (*eigenvalue problem*) a Poppe proto nazval systémové píky eigenpíky. Jako první také vyslovil předpověď, že systém s N stupni volnosti (N složek systému) bude mít N eigenpíků. Každému z píků přísluší jedna vlastní hodnota matice s rozměrem mobility a vlastní vektor, který popisuje relativní intenzity poruchy každé složky. Pro tento model se později vžil název lineární teorie elektromigrace (LTE). V dalších pracích tato skupina úspěšně objasňovala, na základě LTE, jevy související s nepřímou detekcí [17,18] či s předávkovanými systémy [3] nebo předpovídala pozice a intenzitu systémových píků [19].

Tento model dále rozvíjela Gašova skupina. V prvním díle série článků [20] zavedla termín eigenmobilita pro mobility systémových píku získané v rámci LTE jako vlastní hodnoty matice mobilit a zabývala se systémovými píky v systémech silných elektrolytů. Konkrétně základním elektrolytem obsahujícím tři silné jednosytné složky (jeden protiion, dva koionty). Čtvrtou složkou systému byl analyt. Dále se v této práci věnuje případu, kdy se mobilita analytu rovná mobilitě systémového píku. V druhém díle [21] již autoři uvažují slabé jednosytné složky elektrolytů a libovolnou hodnotu pH. Vysvětlují existenci stacionárního píku (*water, injection peak, gap, dip*). Třetí díl [22] zobecňuje lineární teorii elektromigrace pro N složek, slabých či silných kyselin, zásad nebo amfolytů libovolné sytnosti. Dále ukazuje, že v rámci tohoto modelu je možné získat veličiny limitní molární vodivostní odezvu b_x , *transfer ratio* TR a *relative velocity slope* S_x . Spektrálním rozkladem matice mobilit je získána

matici amplitud systémových píků. Také jsou předpovězeny systémy, které již zmíněný stacionární pík nemají. Čtvrtý díl [23] představuje program PeakMaster, ve kterém je LTE realizována (viz kap. 2.4.2). V posledním, pátém, díle se autoři věnují intenzitám systémových píků [24].

Často diskutovaným tématem v problematice systémových píků byl jejich počet. Z modelu pohybujících se rozhraní nevyplývá jednoznačné pravidlo o počtu systémových píků a předpovědi se často opíraly jen o experimentální zkušenosti pro dané typy BGE [25,26,27,28]. Také se předpokládalo, že při nízkém a vysokém pH plní H^+ resp. OH^- ionty funkci dalšího koiontu a způsobí tedy vznik dalšího systémového píku [29]. Z lineární teorie elektromigrace vyplývá [2,22], že počet eigenmobilit systému, tedy i počet systémových zón, je roven počtu složek systému. Pokud uvažujeme analyt jako jednu ze složek systému, bude jeho eigenmobilita rovna efektivní mobilitě analytu [20] a bude se tedy jednat o zónu analytu. Ostatní zóny budou systémové. Jsou to pohybující se poruchy ve složení základního elektrolytu. Koncentrace iontů OH^- a H^+ v určitých oblastech pH mohou významně ovlivňovat chování systémových píků, ale nemají vliv na jejich počet, žádný pík tedy nepřidávají. Vysvětlení poskytují zákony zachování, které lze pro elektroforetické systémy definovat a určit jejich platnost v různých oblastech pH.

Pro systém tvořený výhradně jednosytnými složkami v bezpečné oblasti pH (oblast kde lze zanedbat koncentraci H^+ a OH^- vůči koncentraci složek; pro koncentrace v řádech mM je to pH 5 – 9) lze najít dva zákony zachování. První zákon je Kohlrauschova regulační funkce [30], která byla později formulována Diskmukesem a Albertem [31] pro jednosytné slabé či silné kyseliny a báze. Druhý zákon zachování byl odvozen Jovinem [32].

Oba tyto zákony mohou být odvozeny také z lineární teorie elektromigrace [20,21]. Existence těchto dvou zákonů má za následek, že bez ohledu na procházející elektrický proud musí jistý rys elektroforetického systému zůstat v čase konstantní. Pokud porušíme nástříkem vzorku původně homogenní koncentraci základního elektrolytu, tato porucha bude stacionární (stacionární, nehybná zóna). Pokud je tato zóna unášena elektroosmotickým tokem (EOF) a dosáhne tak pozice detektoru, pak zaznamenaný pík může sloužit jako značka

EOF. Je-li tedy základní elektrolyt složen se dvou jednosytných složek v bezpečné oblasti pH bude se řídit dvěma zákony zachování, a bude mít dvě překrývající se stacionární systémové zóny [33].

V kyselém základním elektrolytu ($\text{pH} < 5$) je koncentrace OH^- iontů zanedbatelná, ale koncentrace H^+ iontů je významná a musí být brána v úvahu. V takovém případě existuje pouze jeden zákon zachování, který byl prvně odvozen Gašem a kol. [34] a později i skupinou kolem Ermakova [35]. Dvousložkový systém má dvě systémové zóny. Jelikož platí pouze jeden zákon zachování, pouze jedna zóna bude stacionární. Nástřiková zóna se bude v základním elektrolytu složeném ze dvou jednosytných složek, kyseliny a báze, dělit do dvou zón, z nichž jedna bude nehybná a druhá se bude pohybovat s určitou rychlostí [33]. Stejně je tomu i v alkalických základních elektrolytech ($\text{pH} > 9$), kdy zanedbáváme H^+ a uvažujeme OH^- . Štěpení injekčních zón bylo experimentálně prokázáno Beckersem a Bočkem [26,36]. Mobilita pohybující se zóny závisí na pH a může se pohybovat v širokém rozmezí hodnot – od téměř nuly až po velmi vysoké hodnoty (větší než $100 \times 10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$), které jsou větší než mobilita jakékoliv složky základního elektrolytu.

Pokud do základního elektrolytu přidáme třetí složku, druhý koion, potom je mobilita třetího, přibylého, systémového píku mezi mobilitami dvou koiontů [37,38]. Systémy se dvěma koionty se používají často při nepřímé detekci. Jedna složka je UV aktivní a druhá zajišťuje potřebné pH systému. Přestože se zdají být tyto systémy výhodné, přinášejí s sebou rizika spojená s výskytem systémových píků [39] a proto jsou raději doporučovány co nejjednodušší základní elektrolyty [27]. Měnící se pozice systémového píku v závislosti na vzájemném poměru koncentrací dvou koiontů, histidinu a draslíku, je ukázána v práci Beckerse [37].

Systémy s vícesytnými složkami nejsou jen zobecněním systémů se složkami jednosytnými a v některých případech se chovají odlišně. Například systémy složené z fosforečnanového či ftalátového pufru mají jeden rychlý anionický pík [40,41,42], a to i přesto, že mají neutrální pH (očekávány byly tedy dvě stacionární zóny). Mobilita anionického píku se navíc pohybuje v hodnotách, kde má svou mobilitu i mnoho analytů. Hrozí proto interakce zón

analytů se systémovou zónou a tedy jejich disperze. Z tohoto hlediska jsou základní elektrolyty s vícesytnými složkami považovány za „riskantní“ systémy [43].

Systémy složené s vícesytných složek je možné rozdělit do dvou skupin. První skupinu tvoří systémy, v nichž existuje alespoň jedna stacionární systémová zóna (mobilita velmi blízká nule, menší než $0,5 \times 10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$) a lze pro ně tedy najít alespoň jeden zákon zachování. Druhá skupina byla Hruškou a Gašem [44] nazvána nekonzervativní systémy a patří sem systémy, které nemusí mít žádnou z eigenmobilit blízkou nule a v takovém případě pro ně neplatí žádný zákon zachování. Nekonzervativní systémy byly objeveny Štědrým a kol. [22] nejprve teoreticky a následně i experimentálně prokázány na příkladu systému složeného z kyseliny šťavelové a imidazolu v určitém rozmezí koncentrací [23].

Vypočítat mobilitu systémových zón může být poměrně obtížné. Jak roste složitost a komplexnost systému, roste i matematická obtížnost řešení a klesá použitelnost přibližných přístupů. Lineární teorie elektromigrace nabízí řešení i pro složitější obecné systémy [22].

Problematika systémových píků byla několikrát shrnuta v pracích Gebauera a Beckerse [26,27] a později podali přehled Gaš a kol. [33,45].

Ačkoliv jsou systémové píky považovány za rušivý jev, Lokajová a kol. je využívá ke stanovení kritické micelární koncentrace [46].

2.2 Lineární teorie elektromigrace

Uvažuje se obecný elektroforetický systém složený z N složek rozpuštěných ve vodě, umístěný v kapiláře o konstantním průřezu a s konstantní radiální distribucí všech složek (tedy neuvažují se teplotní a sorpční efekty). Zanedbána je také difúze způsobená gradientem chemického potenciálu. Kapilára je umístěna podél osy x a koncentrace $c(x,t)$ je pak tedy funkcí prostorové proměnné x a času t . Výchozím bodem je rovnice kontinuity popisující jednorozměrnou elektromigraci:

$$\frac{\partial c_i}{\partial t} = -j \sum_{z=n_i}^{p_i} \text{sgn}(z) \frac{\partial}{\partial x} \left(\frac{u_{i,z} c_{i,z}}{\kappa} \right) \quad i=1, \dots, N \quad (1)$$

kde

$$\kappa = \left(\sum_{i=1}^N \sum_{z=n_i}^{p_i} |z| u_{i,z} c_{i,z} + u_{\text{OH}} c_{\text{OH}} + u_{\text{H}} c_{\text{H}} \right) \quad (2)$$

c_i je analytická koncentrace i -té složky, t je čas, j značí proudovou hustotu, z nábojové číslo, n_i a p_i je nejnižší a nejvyšší sytnost i -té složky, x je podélná osa kapiláry ve směru vnějšího elektrického pole, $u_{i,z}$ udává iontovou mobilitu z -té iontové formy i -té složky a $c_{i,z}$ její koncentraci. κ je specifická vodivost základního elektrolytu. Rovnice lze upravit a zapsat je v maticovém tvaru :

$$\frac{\partial \vec{c}}{\partial t} = - \frac{j}{\kappa_{\text{BGE}}} \mathbf{M}(\vec{c}) \times \frac{\partial \vec{c}}{\partial x} \quad (3)$$

kde $\vec{c} = (c_1, \dots, c_N)^T$ je sloupcový vektor koncentrací složek (index T značí transponovanou matici), \mathbf{M} je čtvercová matice typu $N \times N$, jejíž členy závisejí na $\vec{c}(x, t)$. κ_{BGE} je specifická vodivost BGE. Tuto maticovou rovnici lze díky vhodnému uspořádání CZE linearizovat. Uvažuje se, že koncentrace složek základního elektrolytu jsou podél kapiláry rovnoměrně rozloženy a v průběhu separace se koncentrace i -té složky mění jen málo, tedy zůstává blízka konstantní hodnotě koncentrace C_i . Potom tuto změnu koncentrace můžeme označit jako poruchu, \tilde{c}_i , kde $\tilde{c}_i = c_i - C_i$. Takto lze uvažovat i o analytech, které jsou dávkovány v malých koncentracích (mnohem menších než jsou koncentrace složek základního elektrolytu) a pro které tedy uvažujeme, že podél kapiláry mají $C = 0$ a porucha v místě dávkování odpovídá nadávkované koncentraci. Poruchy jsou malá čísla blízka nule a rovnici (3) lze tedy přepsat do linearizovaného tvaru:

$$\frac{\partial \vec{c}}{\partial t} = -\frac{j}{\kappa_{\text{BGE}}} \mathbf{M} \times \frac{\partial \vec{c}}{\partial x} \quad (4)$$

Vektor \vec{c} je vektor poruch koncentrací složek, $\vec{c} = (\tilde{c}_1, \dots, \tilde{c}_N)^T$. Matice \mathbf{M} je zde již konstantní matice. Řešení této maticové rovnice vede na problém vlastních čísel. Vlastní čísla matice \mathbf{M} mají rozměr mobilit. Štědrý a kol. pro ně zavedli název eigenmobility [20]. Existence eigenmobility naznačuje, že jistý jev, zóna, se může pohybovat separačním kanálem s právě takovou mobilitou. Pro zóny mající spojitost s těmito eigenmobilitami zavedli Gaš a Poppe název eigenzóna a pro příslušný pík pak název eigenpík. Tento přístup, založený na hledání eigenmobilit systému, poskytuje plnou informaci o chování elektroforetického systému a je tedy upřednostňován při popisu a vysvětlování jevů v CZE.

Rovnice (4) představuje lineární systém hyperbolických rovnic, které se řeší následujícím postupem. Každému vlastnímu číslu λ_i matice \mathbf{M} přísluší levý vlastní vektor \vec{q}_i , $i=1, \dots, N$. Z těchto vektorů se zkonstruuje matice \mathbf{Q} tak, že \vec{q}_k je její k -tý řádek. Protože vlastní čísla matice \mathbf{M} jsou vzájemně odlišná, jsou vektory \vec{q}_k lineárně nezávislé a matice \mathbf{Q} , typu $N \times N$, je regulární (existuje inverzní matice \mathbf{Q}^{-1}). Pomocí matice \mathbf{Q} se tedy převede řešení rovnice (4) na řešení pro nové závislé proměnné w_1, \dots, w_N . Dostáváme $\vec{w} = \mathbf{Q} \times \vec{c}$. V této podobě je problém snadno řešitelný. Pokud maticí \mathbf{Q} vynásobíme zleva počáteční podmínku $\vec{c}(x,0) = (c_1^{\text{in}}(x), \dots, c_N^{\text{in}}(x))^T$ a rovnici (4), dostaneme pro každou složku vektoru \vec{w} :

$$\frac{\partial w_k(x,t)}{\partial t} = -\frac{j}{\kappa_{\text{BGE}}} \lambda_k \frac{\partial w_k(x,t)}{\partial x} \quad (5)$$

s počáteční podmínkou

$$w_k(x,0) = w_k^{\text{in}}(x) = \vec{q}_k \times (c_1^{\text{in}}(x), \dots, c_N^{\text{in}}(x))^T \quad (6)$$

a tedy

$$w_k(x, t) = w_k^{\text{in}} \left(x - \frac{j}{\kappa_{\text{BGE}}} \lambda_k t \right) \quad (7)$$

Výraz $(x - j\kappa_{\text{BGE}}^{-1} \lambda_k t)$ je argumentem funkce w_k^{in} . Pokud známe $w_k(x, t)$ poruchy $\vec{c}(x, t)$ získáme z rovnice $\vec{c} = \mathbf{Q}^{-1} \times \vec{w}(x, t)$, kde \mathbf{Q}^{-1} je inverzní matice k matici \mathbf{Q} . Každá funkce $\vec{w}(x, t)$ reprezentuje putující vlnu, která se pohybuje kapilárou rychlostí $j\kappa_{\text{BGE}}^{-1} \lambda_k$.

Pokud má systém N složek a N vzájemně odlišných eigenmobilit, pak bude mít N putujících zón.

Pokud se vynášejí eigenmobility proti nějaké veličině (koncentrace složky, pH atd.), pak u výnosu dvou vlastních čísel může dojít ke třem různým situacím. Vlastní hodnoty matice mohou koincidovat, „křížit se“, třemi způsoby – transversálně (průsečně), neuskutečně a komplexně (*transversal, avoided, complex crossing*). Všechny typy byly již v CZE pozorovány. Transverzální křížení je typické pro rezonanci, kde se kříží mobilita systémového píku s mobilitou píku analytu. Neuskutečně křížení se objevilo u vyšetřování systémů bez stacionárního píku a je dobře patrné na Obr.1b v práci [22]. Třetí, komplexní, křížení je rozhodující pro oscilující elektrolyty, kdy se eigenmobility kříží a přecházejí do komplexních hodnot.

Tyto typy křížení a jevy s nimi související jsou pozorovány i v jiných fyzikálních jevech, popsaných například v práci [47].

2.3 Oscilující elektrolyty

Oscilující elektrolyty [48] jsou jedněmi z nejpozoruhodnějších systémů. Jejich existence v principu nemohla být předpovězena z přibližných modelů typu hmotnostní bilance na pohybujícím se rozhraní. Byly objeveny teprve nedávno pomocí lineární teorie elektromigrace. Ve většině elektroforetických systémů jsou eigenmobility (vlastní čísla matice \mathbf{M} v rovnici (4)) reálná čísla a vyjadřují mobilitu příslušné systémové zóny. V některých případech však může být eigenmobilita komplexní číslo. Z pohledu výše popsaných možností křížení

dvou eigenmobilit se jedná o komplexní křížení. Tyto dvě eigenmobility se vzájemně přibližují a v jistém intervalu koncentrací se stanou komplexně sdruženými. Namísto vzniku systémového píku dochází k rozvoji periodických struktur – oscilací. Reálná část komplexní eigenmobility udává mobilitu, se kterou se bude kapilárou pohybovat celý „obrazec“ oscilací. Imaginární část má souvislost s periodou oscilací. Hruška a kol. [48] jako první našli dvousložkový oscilující systém skládající se z kyseliny sebakové a imidazolu.

Hruška se i nadále zabývá teoretickým popisem oscilujících elektrolytů. Uvažoval dvousložkový systém s komplexně sdruženými eigenmobilitami (elektroforetickými rychlostmi), který se pohybuje jen elektromigračně, bez difúze. Nalezl analytický výraz pro $c_{1,2}(x, t)$ pro počáteční rozložení koncentrací ve tvaru gaussovských píků:

$$c_i(x, t) = \left[A_i \cos\left(\frac{\beta t(x - \alpha t)}{\sigma^2}\right) + \left(\frac{A_1 m_{i,1} + A_2 m_{i,2} - A_i \alpha}{\beta}\right) \sin\left(\frac{\beta t(x - \alpha t)}{\sigma^2}\right) \right] \exp\left(\frac{\beta^2}{2\sigma^2} t^2\right) \cdot \frac{1}{\sqrt{2\pi\sigma}} \exp\left(-\frac{(x - \alpha t)^2}{2\sigma^2}\right) \quad (8)$$

kde $A_{1,2}$ jsou amplitudy gaussovského píku pro první případně druhou látku, σ^2 je variance. α je reálná a β imaginární složka komplexní rychlosti ($v_{1,2} = \alpha \pm i\beta$, kde $\beta > 0$ a i je komplexní jednotka; eigenmobility $\lambda_{1,2} = v_{1,2} / E$, E je intenzita elektrického pole), x je podélná osa kapiláry a t je čas. Řešení má tři členy (v rovnici (8) na jednotlivých řádcích) s různými významy. První, goniometrická, část funkce je lineární kombinace funkcí sinus a kosinus, jejichž frekvence lineárně roste s časem se směrnicí $\beta / 2\pi\sigma^2$. Příslušná perioda je tedy $2\pi\sigma^2 / \beta t$. Tato část způsobuje oscilace. Druhou částí je exponenciální růst amplitudy oscilací s druhou mocninou času s faktorem $\beta^2 / 2\sigma^2$, která naznačuje, že se oscilace vybudí i z nepatrné poruchy – projev chaotického (nestabilního) chování vzhledem k počáteční podmínce (nástřík). Poslední částí je Gaussova funkce s jednotkovou plochou pohybující se rychlostí α a

s variancí σ^2 . Popis více se blíží realitě musí brát v úvahu i difúzi. Elektromigračně-difúzní problém se Hruška a Štědrý snaží řešit pomocí Fourierovy transformace. Tyto dvě teoretické práce nebyly dosud publikovány.

2.4 Softwarové nástroje pro řešení a modelování elektromigrace

Praktické využití všech teoretických modelů popisujících elektromigraci závisí také na rozvoji počítačových programů, které jsou nezbytné pro numerická řešení či simulace i pro výpočet matematických operací v případě analytických řešení. Pro oba matematické modely (model pohyblivých rozhraní i lineární teorii elektromigrace) byly vyvinuty programové nástroje. Poppe [19] používal program napsaný v Turbo Pascalu pro nalezení vlastních čísel a vlastních vektorů. Beckers použil počítač pro řešení modelu pohybujícího se rozhraní a předpověď profilů CZE zón. Později systém upravil k předpovědi chování systémových píků a nazval ho SystChart [9,29,27]. Skupina kolem Gebauera [10,14,25] využívala Peak Shape Diagram, který byl schopný stanovit elektromigrační disperzi píků analytů a určit pozici systémového píku. Jaroš a kol. vyvinuli PeakMaster. Nejprve byl vystavěn na modelu pohybujících se rozhraní [49] a později na lineární teorii elektromigrace [23].

Všechny výše uvedené programy slouží k výpočtům řešení jistých aproximativních modelů.

Vývoj simulačních programů, tedy programů numericky řešících matematické modely elektromigrace závisel především na vývoji počítačové techniky. První simulace byly prováděny již na hybridních počítačích [50,51]. Postupně počítače umožňovaly řešit složitější systémy s více složkami. Simulace pro jednosytné slabé kyseliny a báze najdeme v pracích [52,53,54,55]. V dnešní době, kdy jsou počítače velmi rychlé, je možné simulovat systémy s vícesytnými složkami a přidávat do modelů vliv dalších parametrů, např. iontové síly, difúze, teplotních efektů nebo komplexaci. Mezi nejrozšířenější programy tohoto druhu patří volně stažitelný program Simul.

2.4.1 Simul

Program Simul 4 [52] a jeho pozdější verze Simul 5 [56] byl vyvinut Gašovou skupinou a je volně stažitelný na webových stránkách [1]. Matematický model je postaven na zákonu zachování hmoty, acidobazických rovnováhách a podmínce neutrality. Simul 5 umožňuje simulovat systémy s libovolným počtem vícesytných látek, včetně amfolytů. Možné je ho využít pro vyšetřování systémových píků, k optimalizaci separačních podmínek (pufry, nástřík vzorku) v CZE nebo izotachoforéze. Napomáhá porozumět jevům pozorovaným při experimentech (rezonance, překryv píků), ale třeba i k výuce elektroforézy. V této práci byl použit pro simulaci elektroferogramu oscilujícího systému.

2.4.2 PeakMaster

Tento program počítačově realizuje model popsany v práci Štědrého a kol. [22]. Program počítá eigenmobility matice M v rovnici (4), umí také vypočítat další parametry základního elektrolytu, jako například pH, vodivost, pufrční kapacitu, iontovou sílu nebo koncentraci jednotlivých iontových forem složek v roztoku, dále efektivní mobilitu analytu a také *transfer ratio* TR , molární vodivostní odezvu b_x a *relative velocity slope* S_x . Program vyžaduje zadání složení základního elektrolytu, seznam analytů a experimentální podmínky (délka kapiláry, napětí). Výstup je v podobě simulovaného elektroferogramu a je tedy snadno srovnatelný s experimentem. Později byl do PeakMasteru přidán i modul pro výpočet amplitud systémových píků. PeakMaster 5.2 je stejně jako předešlá verze volně ke stažení na webových stránkách [1]. Umožňuje vyšetřovat a optimalizovat složení systému s jakýmkoliv počtem slabých, silných, maximálně čtyřsytných kyselin, bází a amfolytů, pro které jsou známy jejich pK_a konstanty a iontové mobility.

Pro účely zkoumání oscilujících systémů a k jejich vyhledávání byl dále Hruškou PeakMaster několikrát upraven (kap. 4.3). Tyto upravené verze nebyly zatím publikovány.

3 Cíle práce

Tato diplomová práce měla následující cíle:

- 1) Pomocí upraveného programu PeakMaster nalézt nové systémy s komplexními eigenmobilitami (tedy teoreticky oscilující systémy) a optimalizovat jejich složení.
- 2) U vybraných systémů ověřit oscilační chování experimentálně.
- 3) Najít experimentální parametry, které by bylo možné porovnat s teoretickými předpověďmi, toto porovnání provést a posoudit vzájemnou shodu.

4 Experimentální část

4.1 Přístroje a vybavení

Veškeré experimenty byly měřeny na přístroji Agilent ^{3D} CE pro kapilární elektroforézu. Přístroj byl ovládán softwarem ChemStation B.01.03 (Agilent Technologies, Waldbronn, Německo). K fotometrické detekci byl používán detektor diodového pole (DAD) při vlnové délce 214 nm (není-li u konkrétního elektroferogramu uvedeno jinak) a k vodivostní detekci byl použit bezkontaktní vodivostní detektor (CCD), který byl vyroben v naší laboratoři [57].

Byla používána křemenná kapilára s vnitřním průměrem 50 μm a vnějším průměrem 365 μm (CaCo, Slovenská republika). Celková délka kapiláry L_{celk} a vzdálenost k příslušnému detektoru L_{det} je uvedena vždy u zobrazeného elektroferogramu. Protože byly vždy sledovány anionické systémové zóny, bylo žádoucí obrátit směr EOF na anionickou stranu. Toho bylo dosaženo pokrytím kapiláry kationickým polymerem Polybrenem (v nepokryté kapiláře je EOF kationický). Použité napětí bylo -20 kV nebo -25 kV a vždy je uvedeno u příslušného elektroferogramu. Na Obr. 1 je znázorněno zapojení napětí a směr pohybu EOF a námi sledované systémové zóny. Vzorek byl dávkován tlakem 30 mbar po dobu 5 s. Část kapiláry, která prochází kazetou, byla termostatována na 25°C . Jako neutrální marker EOF byla používána thiomočovina.

Před prvním použitím byla kapilára propláchnuta :

- 10 min destilovanou vodou
- 10 min 0,1M NaOH
- 10 min destilovanou vodou

Pokrytí kapiláry Polybrenem:

- 5 min destilovaná voda
- 5 min 0,1M NaOH
- 5 min destilovaná voda
- 5 min 1M HCl
- 5 min destilovaná voda
- 5 min roztok Polybrenu (5 % hm, vodný roztok)

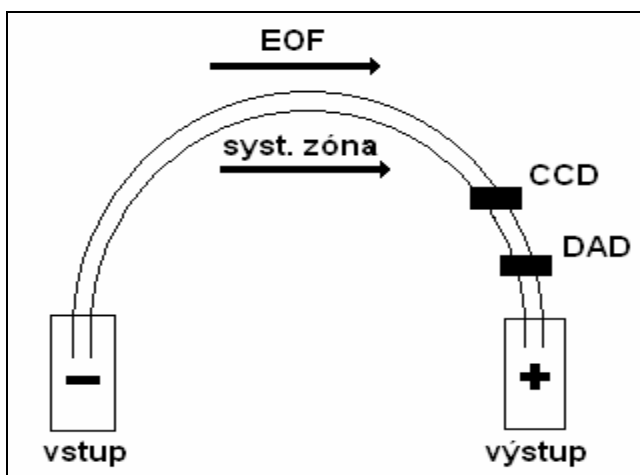
20 min aplikace napětí 5 kV, roztok Polybrenu (5 % hm, vodný roztok)
5 min roztok Polybrenu (5 % hm, vodný roztok)
5 min destilovaná voda

Pokud bylo pozorováno zpomalování EOF, byla kapilára promyta postupně:

5 min 1M HCl
5 min destilovanou vodou
10 min roztokem Polybrenu (5 % hm, vodný roztok)

Před každým měřením byla kapilára proplachována základním elektrolytem až do stabilizace základní linie signálu detektoru a následně byla základní linie vynulována.

Získané elektroferogramy byly převedeny do programu Origin 6.1 (OriginLab Corporation, Northampton, USA) a byly v něm dále zpracovávány.



Obr. 1 Schéma polarity napětí na elektrodách pro všechna měření z kap. 4.4 s vyznačeným směrem pohybu EOF v kapiláře pokryté Polybrenem a směrem pohybu anionické systémové zóny.

4.2 Seznam chemikálií

Použité chemikálie byly analytické čistoty:

disodná sůl guanosin 5' monofosfátu (Fluka, Švýcarsko)

hydroxid sodný (Lachema, Česká republika), standardizovaný na kys. šťavelovou (Fluka, Švýcarsko) nebo byl používán Titrisol® (Merck Chemicals, Německo)

dihydrogenfosforečnan sodný (Fluka, Švýcarsko)
kyselina fosforečná 85% (Lachema, Česká republika)
kyselina octová 99% (Lach-ner, Česká republika)
octan sodný (Lachema, Česká republika)
kyselina citrónová (Fluka, Švýcarsko)
kyselina maleinová (Lachema, Česká republika)
chroman cesný (Sigma-Aldrich, Německo)
hydroxid cesný (Sigma-Aldrich, Německo)
kyselina ftalová (Fluka, Švýcarsko)
hexadimethrin bromid (Polybren) (Fluka, Švýcarsko)
thiomočovina (Fluka, Švýcarsko)
kyselina chlorovodíková 35% (Lachema, Česká republika)
0,1 mM roztok NaOH (Agilent Technologies, Německo)

Destilovaná voda, která byla použita k přípravě všech roztoků, byla čištěna na iontoměníčovém systému Milli-Q (Millipore, USA). Všechny roztoky byly filtrovány.

4.3 Vytipování oscilujících systémů pomocí programu PeakMaster

Oscilující elektrolyt složený ze dvou látek, složek, byl již dříve popsán a experimentálně ověřen [48]. Jako složku roztoku budeme v této práci označovat: (i) silnou nebo slabou kyselinu, (ii) silnou nebo slabou bázi, (iii) amfolyt, všechny jakékoliv sytnosti. V této práci byla pozornost zaměřena na potenciálně oscilující systémy složené ze tří složek, které by teoreticky měly existovat a chovat se poněkud odlišně, než systémy složené ze dvou složek. Voleny byly systémy typu dvě kyseliny, většinou vícesytné, a jedna silná jednosytná báze, tedy dvě anionické složky elektrolytu a jedna kationická. Systémy byly hledány pomocí programu PeakMaster (PM) [58].

Zpočátku byla používána standardní verze PM, ve které však bylo vyhledávání časově náročné a namáhavé. Bylo zapotřebí ručně zkusmo měnit zadávané koncentrace a sledovat, jak na nové složení reagují hodnoty

eigenmobilit. I když se podařilo najít takové hodnoty koncentrací, kdy měl systém komplexní eigenmobility, standardní verze PM stále ještě neposkytovala informaci o velikosti imaginární části této mobility. Ta souvisí s ochotou systému propagovat oscilace a je tedy důležité znát její velikost. V principu jsou proto upřednostňovány systémy s větší imaginární částí eigenmobility. Kvůli experimentální realizovatelnosti bylo důležité určit i interval koncentrace variabilní složky, ve kterém má systém komplexní eigenmobilitu. Pokud by byl tento interval menší než je experimentální přesnost, pak by bylo nemožné dosáhnout správného složení. Složkou, jejíž koncentrace byla měněna, byla vždy kationická složka (výjimku najdeme v experimentu v kap. 4.4.3). Nalezení oscilujících systémů ve standardní verzi PM bylo proto věcí náhody a štěstí. Přesto byl tímto způsobem objeven například systém skládající se z guanosinmonofosfátu (GMP), kyseliny fosforečné a sodných iontů o následujícím složení:

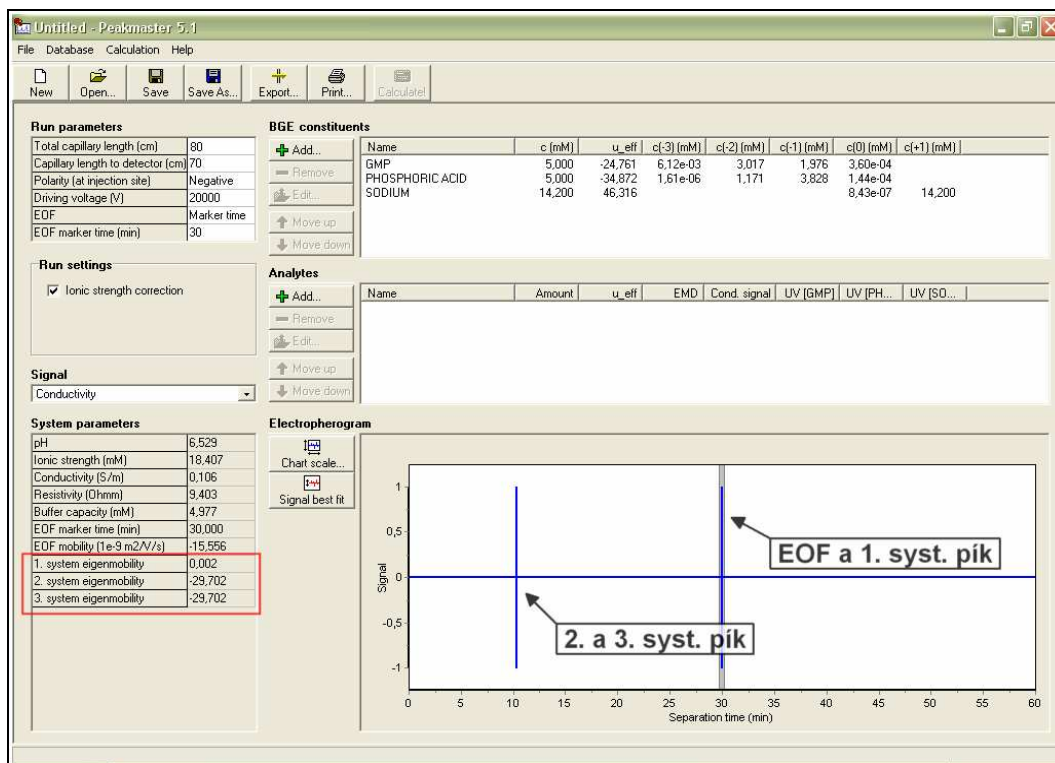
GMP	5 mM
kyselina fosforečná	5 mM
Na ⁺	13,3 – 15 mM

Při takovémto rozsahu složení roztoku má systém dvě komplexně sdružené eigenmobility. Složení elektrolytu bude uváděno v celkových (analytických) koncentracích jednotlivých složek. PM poskytuje i vypočítané koncentrace jednotlivých iontových forem složek pro daný systém (Obr. 2), ale je většinou zbytečné tyto dílčí informace uvádět. Výše uvedené složení také není seznamem použitých chemikálií. Tento elektrolyt byl například připravován z Na₂GMP, NaH₂PO₄ a NaOH tak, aby koncentrace jednotlivých složek odpovídaly daným hodnotám.

Name	c (mM)	u_eff	c(-3) (mM)	c(-2) (mM)	c(-1) (mM)	c(0) (mM)	c(+1) (mM)
GMP	5,000	-24,761	6,12e-03	3,017	1,976	3,60e-04	
PHOSPHORIC ACID	5,000	-34,872	1,61e-06	1,171	3,828	1,44e-04	
SODIUM	14,200	46,316				8,43e-07	14,200

Obr. 2 Program PeakMaster: vypočítané efektivní mobility a koncentrace jednotlivých iontových forem složek v elektrolytu o daném složení.

Uvedený systém je systém se třemi složkami a má tedy tři eigenmobility (červený rámeček na Obr. 3). Jak bylo řečeno výše, dvě eigenmobility jsou komplexně sdružené a jedna zůstává blízka nule a je reálná. Příslušný systémový pík s nulovou eigenmobilitou může tedy sloužit jako marker EOF.



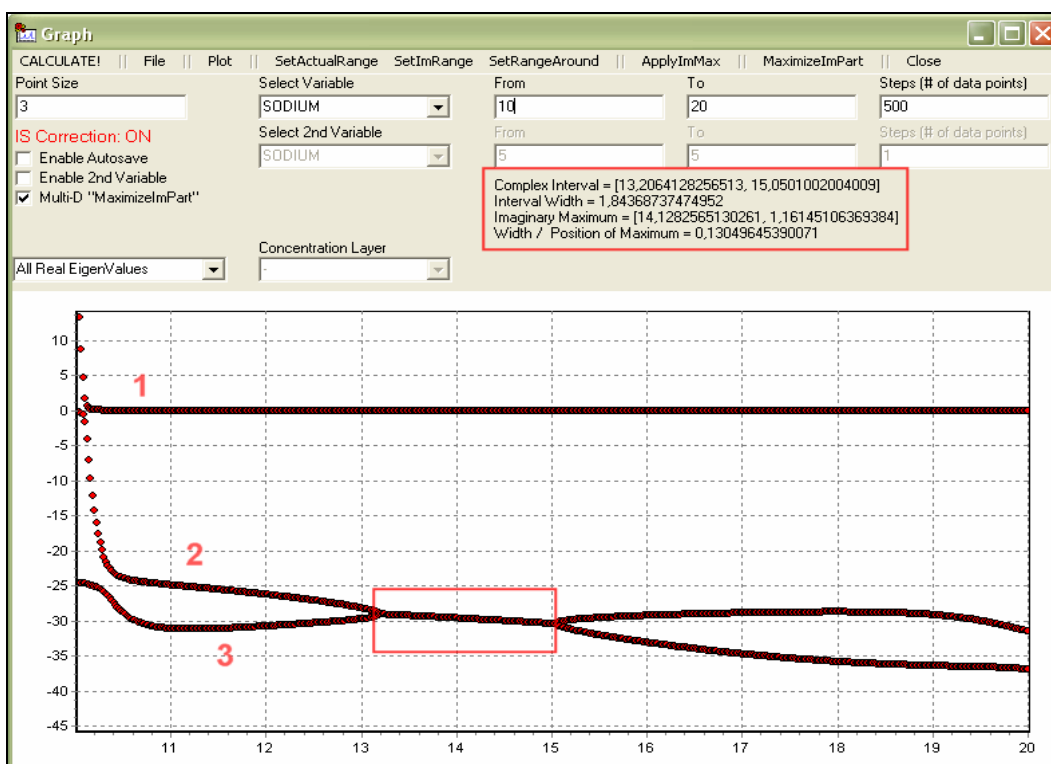
Obr. 3 PM: Výpočet systémových eigenmobilit (červený rámeček) pro systém 5 mM GMP, 5 mM kyselina fosforečná a 14,2 mM Na⁺. 1. eigenmobilita je blízka nule, příslušný systémový pík může sloužit jako značka EOF. 2. a 3. eigenmobilita mají stejnou reálnou část. Na simulovaném elektroferogramu jsou šipkami tyto skutečnosti naznačeny.

Další verze PM byly upraveny tak, aby zobrazovaly i velikost imaginární části komplexní eigenmobility. Takový výstup z programu je vidět v Tab. 1.

Tab. 1 Eigenmobility i s případnou imaginární částí *i*, vypočítané programem PM pro systém 5 mM GMP, 5 mM kyselina fosforečná, 14,2 mM Na⁺.

Eigenmobilita	$10^{-9} \text{m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$
[1]	0,00186284088232, 0*i
[2]	-29,7017864769, -1,15747559137*i
[3]	-29,7017864769, 1,15747559137*i

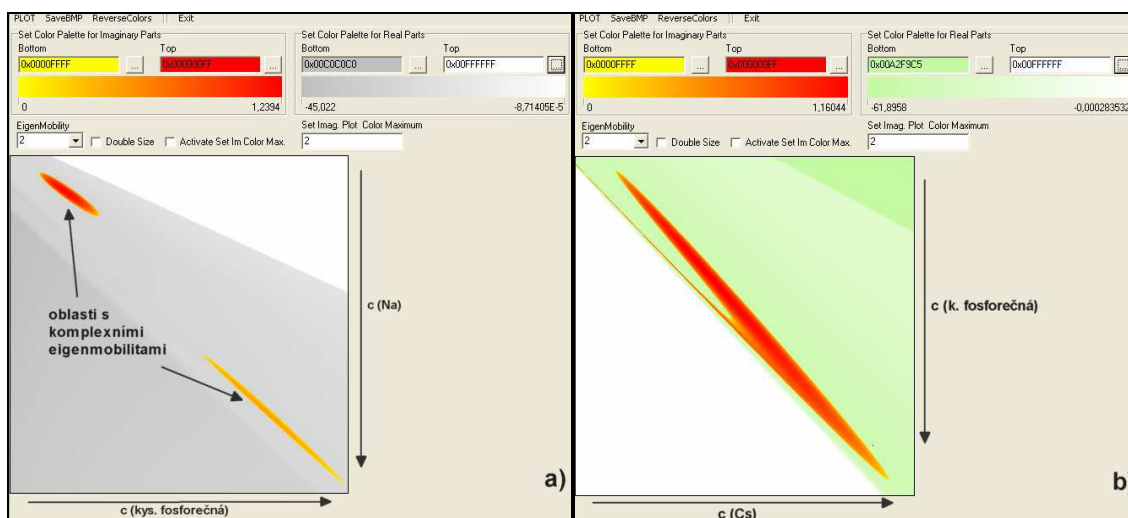
V této verzi PM je nové okno GraphPlot, které umožňuje spojitě měnit, v zadaném intervalu, koncentrace jedné či dvou složek a vypočítávat přitom eigenmobility. Výsledky se mohou zobrazit jako závislosti mobilit na jedné z koncentrací. Na Obr. 4 je příklad takové závislosti pro systém GMP, kyselina fosforečná a Na^+ , kdy měníme koncentraci Na^+ . Koncentrace dalších dvou složek jsou konstantní a sledujeme průběh eigenmobilit. Je zde zřejmý průběh první eigenmobility, která zůstává téměř nulová. Druhé dvě mobility se přibližují a v jistém rozmezí koncentrace sodných iontů jsou komplexně sdružené.



Obr. 4 PM GraphPlot: Vypočítané křivky závislosti tří eigenmobilit (v jednotkách $10^{-9} \text{m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$, osa y) na koncentraci variabilní složky (v mM, osa x) pro systém 5 mM GMP, 5 mM kyselina fosforečná a 10 až 20 mM Na^+ (variabilní složka). Eigenmobilita 1 zůstává blízká nule, eigenmobility 2 a 3 se přibližují a v jistém rozmezí koncentrace Na^+ jsou komplexně sdružené. Pokud je nalezena oblast s komplexními eigenmobilitami, je tato oblast a její parametry vypsány (červený rámeček).

Okno GraphPlot rovněž umožňuje měnit současně dvě koncentrace, zatímco třetí je konstantní. PM pak zobrazí výsledek jako tzv. mapu, kde na x a y ose jsou koncentrace jedné a druhé složky. Velikost eigenmobility, případně velikost imaginární části komplexní eigenmobility je pak vynášena jako odstín

barev. Příklady dvou zajímavých map jsou ukázány na Obr. 5. Systém GMP, kyselina fosforečná, Na^+ má dvě oblasti s komplexní eigenmobilitou (Obr. 5a). Druhá mapa je mapa systému kyselina chromová, kyselina fosforečná, Cs^+ . Zde se z jedné hlavní komplexní oblasti odštěpuje další větev (Obr. 5b). Nová verze PM umí navíc optimalizovat složení tak, aby imaginární část eigenmobility byla v absolutní hodnotě maximální. Umožňuje hledat maxima lokální i globální. Nová verze tedy částečně automatizuje a značně urychluje vyhledávání oscilujících systémů doposud neznámých a optimalizaci systémů stávajících.



Obr. 5 PM GraphPlot: a) Mapa systému 5 mM GMP, 2-25 mM kyselina fosforečná, 10-60 mM Na^+ . Na osách roste koncentrace Na^+ a kys. fosforečné tak, jak značí šipky. Oranžové oblasti jsou oblasti s komplexními eigenmobilitami. b) Mapa systému 2,445 mM kys. chromové, 7-21 mM kys. fosforečné a 10-25 mM Cs^+ . Na osách roste koncentrace Cs^+ a kyselina fosforečné tak, jak značí šipky. Oranžové oblasti jsou oblasti s komplexními eigenmobilitami.

Pomocí nové verze PM jsme našli nové systémy s komplexními eigenmobilitami a tedy systémy potenciálně oscilující. Tab. 2 shrnuje všechny systémy vytipované pro experimentální práci, u kterých se oscilační chování následně prokázalo. Uvádí jejich složení, interval ve kterém se může pohybovat koncentrace měnící se složky (aby zůstala zachována komplexní eigenmobilita), koncentraci variabilní složky pro lokální maximum imaginární části c_{MAX} , komplexně sdružené eigenmobility (reálnou i imaginární složky) pro toto složení a poměr šířky intervalu variující složky ku c_{MAX} , což vyjadřuje jak je náročné na experimentální přesnost „trefit“ se do daného intervalu. Umožňuje

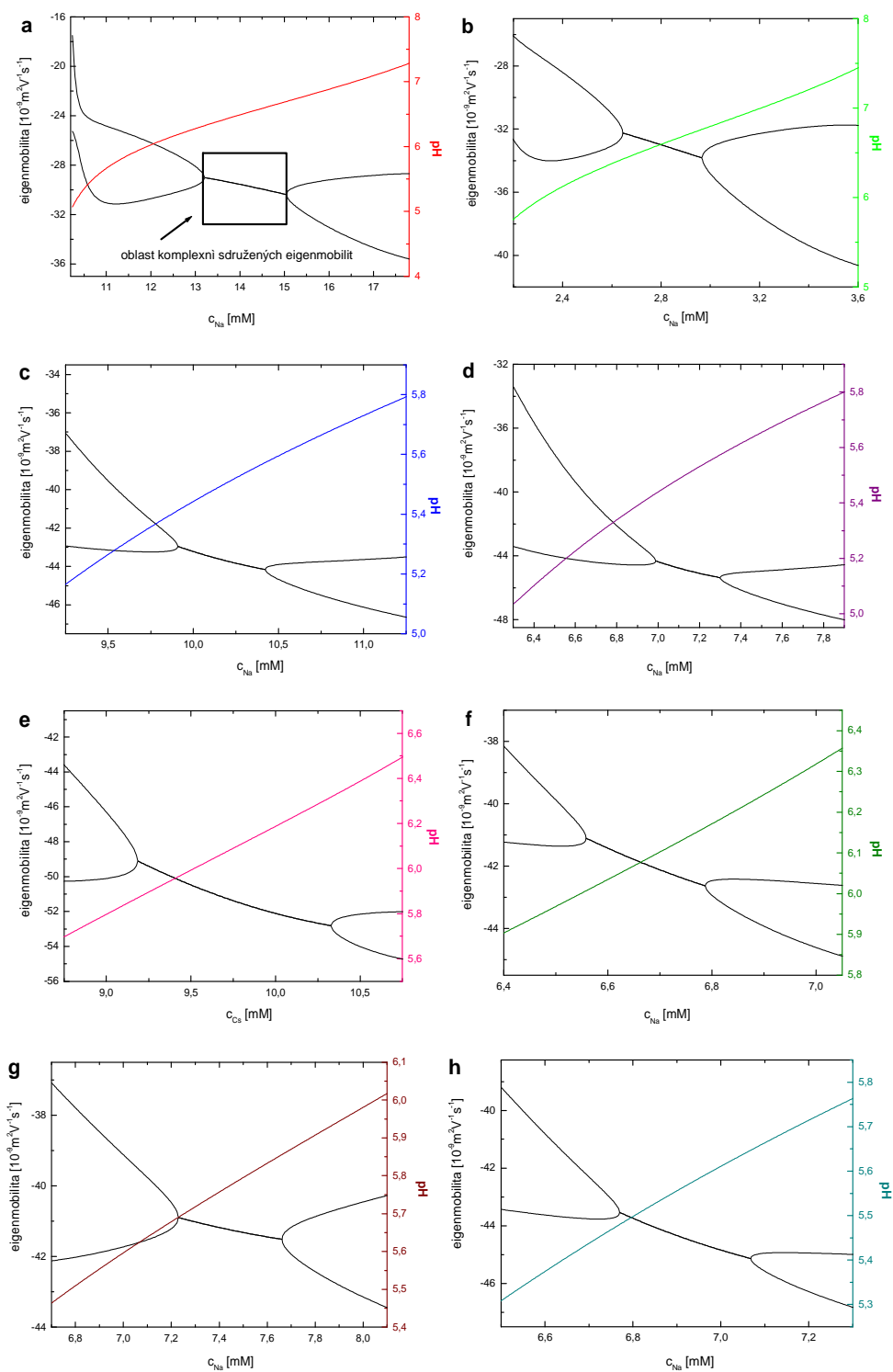
tedy z tohoto hlediska systémy srovnávat. Je samozřejmě snadnější experimentálně „trefit“ složení u systému, který má tento poměr větší. Reálná část komplexní eigenmobility určuje elektroforetickou rychlost, s níž se bude celý oscilační vzor pohybovat.

Tab. 2 Vybrané systémy s komplexními eigenmobilitami vyhledané pomocí programu PM.

systém		koncentrace variabilní složky pro maximální imaginární část C_{MAX} (mM)	šířka intervalu variabilní složky/ C_{MAX}	komplexní eigenmobility ($10^{-9} \text{m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$)	
složky	koncentrace (mM)				
a)	GMP	5,000	14,200	0,12	-29,702 $\pm 1,16^*i$
	kys. fosforečná	5,000			
	Na ⁺	13,300–15,000			
b)	GMP	0,935	2,805	0,11	-33,015 $\pm 1,29^*i$
	kys. fosforečná	1,066			
	Na ⁺	2,645–2,967			
c)	kys. maleinová	5,000	10,200	0,05	-43,723 $\pm 0,54^*i$
	kys. citrónová	2,000			
	Na ⁺	9,920–10,420			
d)	kys. maleinová	4,000	7,129	0,04	-44,874 $\pm 0,48^*i$
	kys. citrónová	1,136			
	Na ⁺	6,991–7,301			
e)	kys. chromová	3,414	9,662	0,12	-51,082 $\pm 1,75^*i$
	kys. ftalová	2,734			
	Cs ⁺	9,189–10,328			
f)	kys. octová	2,152	6,660	0,03	-41,858 $\pm 0,56^*i$
	kys. citrónová	1,906			
	Na ⁺	6,560–6,787			
g)	kys. maleinová	3,995	7,433	0,06	-41,228 $\pm 0,66^*i$
	kys. ftalová	1,232			
	Na ⁺	7,231–7,660			
h)	kys. citrónová	1,455	6,896	0,04	-44,317 $\pm 0,55^*i$
	kys. maleinová	1,919			
	kys. fosforečná	1,485			
	Na ⁺	6,771–7,067			

Koncentrace složek jsou stejně jako v PM uváděny na tři desetinná místa. V Tab. 2 jsou uvedeny koncentrace teoretické. Při experimentech bylo někdy nalezeno oscilujících složení až při koncentraci, která nebyla v uvedeném intervalu koncentrací měnící se složky, ale byla blízko tohoto intervalu. To je pravděpodobně způsobeno přepočtem limitních iontových mobilit a pK_a konstant na aktuální iontovou sílu nebo nepřesností těchto vstupních dat, možná také nepřesnostmi při přípravě roztoků daných elektrolytů. Všechny

systemy uvedené v Tab. 2 oscilují v rozmezí pH 5 až 7. To dokládá Obr. 6a-h, kde jsou pro systémy uvedeny závislosti dvou eigenmobilit (těch které se stanou komplexně sdruženými) a pH na koncentraci variabilní složky (barevné závislosti).



Obr. 6 Programem PM vypočítané závislosti eigenmobilit a pH na koncentraci variabilní složky. Sledované eigenmobility se v daném intervalu komplexně sdužují (na a) označeno). Výnosy pH jsou barevné. Označení a)-h) koresponduje s označením systémů v Tab. 2. Všechny systémy oscilují v rozmezí pH 5-7.

4.4 Diskuse výsledků

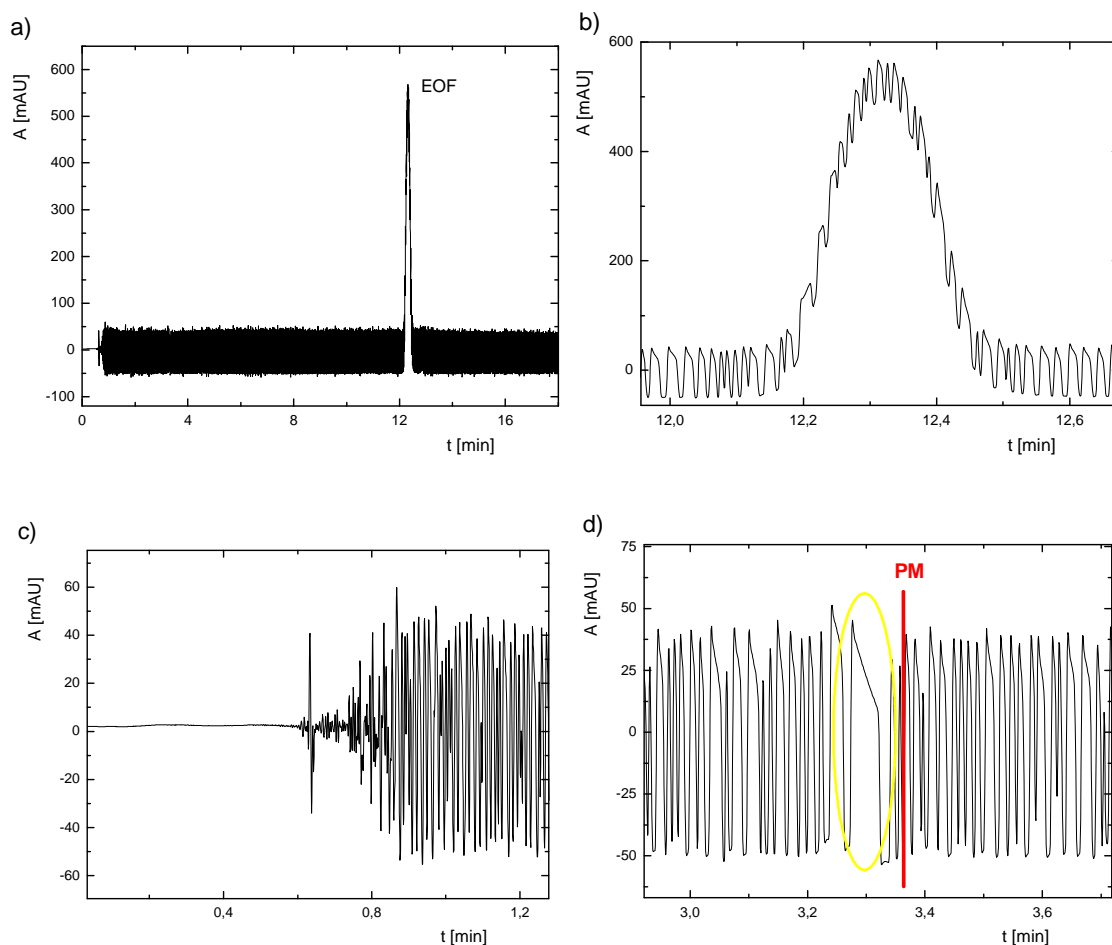
4.4.1 Systém GMP, kyselina fosforečná a Na⁺

Mezi prvními nalezenými systémy s komplexními eigenmobilitami byl systém sestávající se z guanosinmonofosfátu, kyseliny fosforečné a Na⁺. Tento systém byl vybrán pro první experimenty, přestože GMP není příliš běžná látka, a to proto, že měl největší imaginární část eigenmobility (později byly nalezeny systémy, které jej překonaly) a dostatečně široký interval koncentrace sodných iontů, kdy měl systém oscilovat (viz Tab. 2). Již první experimenty prokázaly oscilační chování a tento systém se stal později jedním z nejreprodukovatelnějších a nejspolehlivějších.

Systém byl zkoumán při dvou složeních s různými iontovými silami. Při nízké iontové síle a tedy i nízké elektrické vodivosti se totiž předpokládá, že bude méně znatelný vliv například rušivých teplotních efektů.

Nejprve byl zkoumán systém s vyšší iontovou silou o složení 5,000 mM GMP, 5,000 mM kyselina fosforečná a 14,200 mM Na⁺. Aby byla vytvořena počáteční porucha, byl dávkován zředěnějšího roztok základního elektrolytu (95% původní koncentrace). Dávkovaný vzorek navíc obsahoval 5 mM thiomocovinu jako marker EOF. Nikdy nebyly dávkovány žádné analyty. Bylo zkoušeno dávkovat i základní elektrolyt s porušenou pouze jednou složkou (např. + 10% Na⁺), ale nebyl pozorován žádný vliv na získané výsledky. Dokonce i dávkování neporušeného základního elektrolytu vedlo v některých případech k rozoscilování systému. To dokládá, že významnější poruchy mohou vznikat i vlivem teplotních efektů (například rozhraní chlazené a nechlazené části kapiláry) nebo třeba na okrajích kapiláry. Získaný elektroferogram je na Obr. 7. Obr. 7a ukazuje celkový oscilující elektroferogram s píkem thiomocoviny. I tento pík je, dle předpokladu, rušen oscilacemi, jak je vidět na Obr. 7b. Dochází k součtu obou signálů – oscilačního vzoru a píku thiomocoviny. Na Obr. 7d je přiblížení nástupu oscilací. Šum základní linie je oproti velikosti oscilací zanedbatelný.

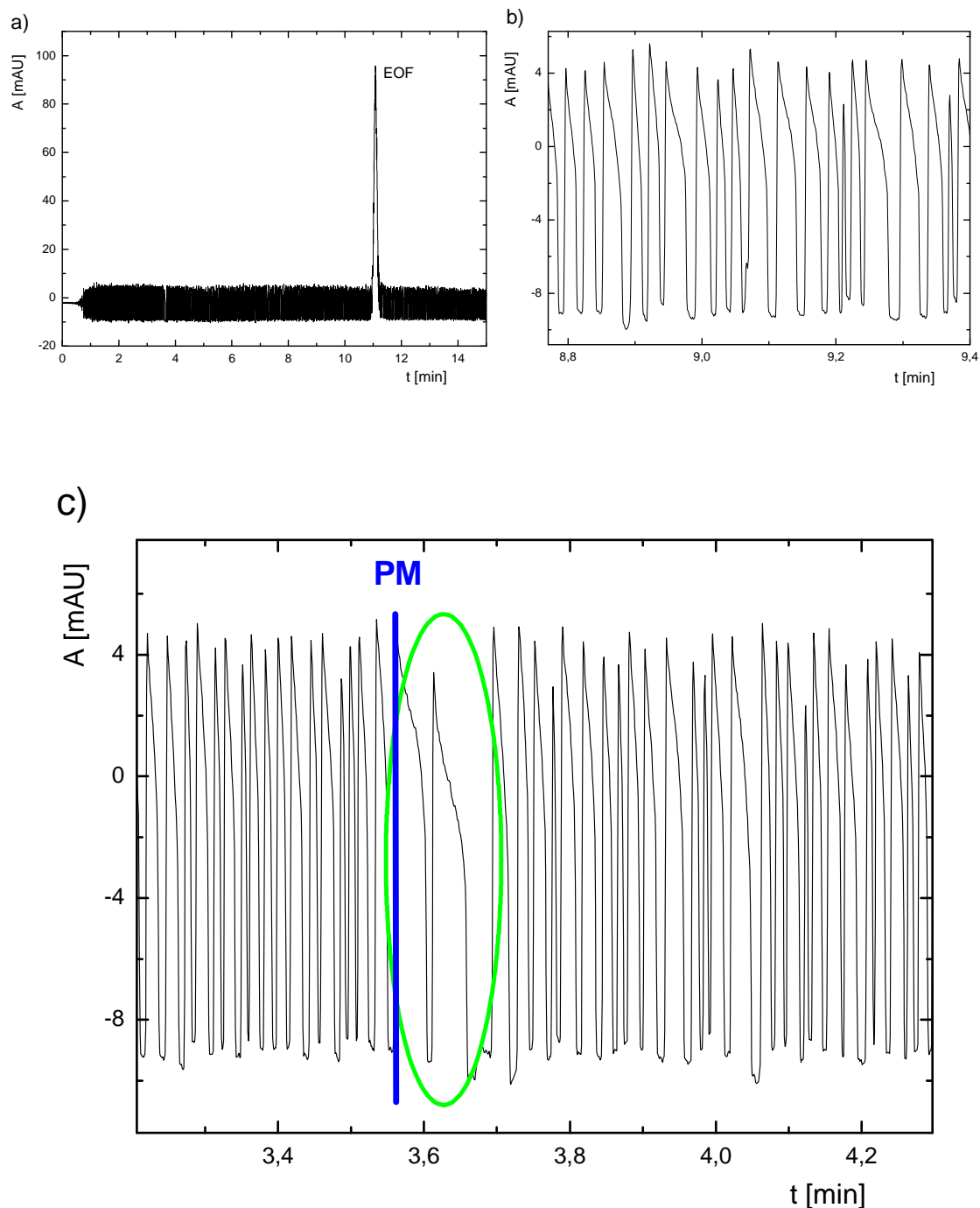
Zadáme-li nyní do PM parametry experimentu – délku kapiláry, použité hnací napětí a pozici markeru EOF, PM nám pro systém o daném složení předpoví, při kterém migračním čase by se měl vyskytovat systémový pík příslušející reálné hodnotě komplexní eigenmobility, pokud by se nějaký tvořil (červená čára na Obr. 7c). Zvětšíme-li si příslušnou část získaného elektroferogramu, zjistíme, že v blízkém okolí takto předpovězeného času se nachází zřejmá mezera ve vzoru oscilací (Obr. 7c, žlutě zakroužkováná)..



Obr. 7 a) Celkový elektroferogram BGE: 5,000 mM GMP, 5,000 mM kyselina fosforečná, 14,200 mM Na⁺; vzorek: 4,750 mM GMP, 4,750 mM kyselina fosforečná, 13,490 mM Na⁺, 5 mM thimočovina; napětí -25kV, L_{celk} = 49,8 cm, L_{det} = 41,4 cm (UV detekce 214 nm); b) zvětšená část stejného elektroferogramu v místě píku thimočoviny (marker EOF), signál je složený s oscilačního vzoru a z píku thimočoviny; c) místo nástupu oscilací, šum základní linie je zanedbatelný oproti velikosti oscilací; d) zvětšená část elektroferogramu v místě systémové poruchy, červená čára značí PeakMasterem vypočítanou pozici, žlutě zakroužkována je mezera ve vzoru oscilací, reálná porucha.

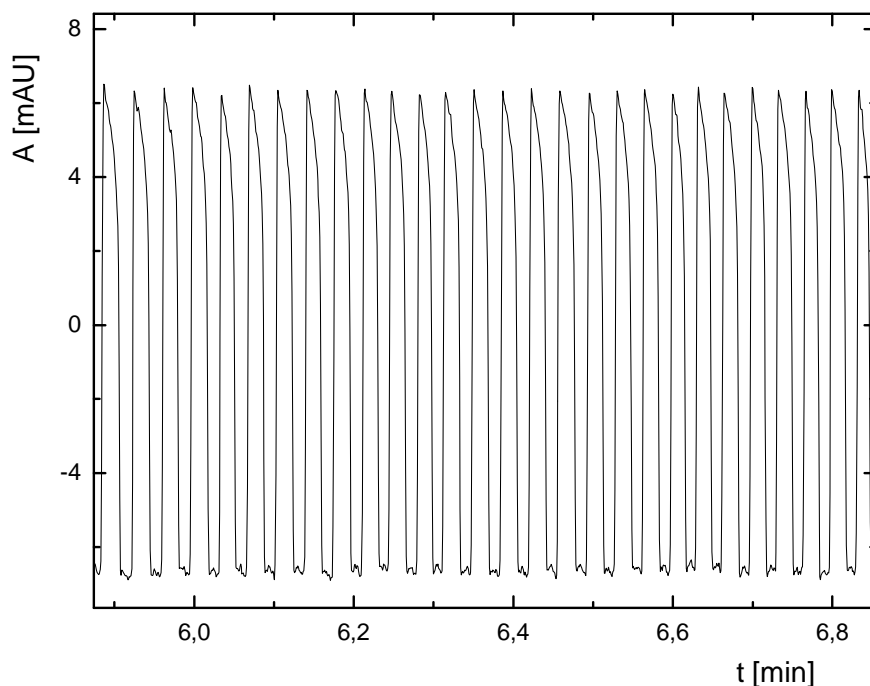
Tuto mezeru můžeme tedy pokládat za systémovou poruchu, ze které se oscilace vyvíjejí a šíří. Protože nelze s určitostí říci, jestli by se poloha této systémové zóny určovala dle polohy jejího okraje či středu, je porovnání s předpovědí PM ponecháno pouze na vizuálním posouzení a není vyčísleno. Na Obr. 7c je tedy patrné, že experiment byl z hlediska polohy systémové poruchy ve velmi dobré shodě s teoretickou předpovědí. Dále je vidět, že oscilace jsou poměrně pravidelné, s téměř konstantní amplitudou.

Poté byl proměřen systém složený ze stejných složek, ale v menších koncentracích. Systém měl tedy menší iontovou sílu a vodivost a předpokládalo se tedy, že případné teplotní efekty nebudou mít velký vliv. Základní elektrolyt měl složení 0,935 mM GMP, 1,066 mM kyselina fosforečná a 2,805 mM Na⁺. Dávkovaný vzorek byl opět základní elektrolyt zředěný na 95% původní hodnoty, s přídatkem 5 mM thiomocoviny. Výsledný elektroferogram, Obr. 8a, je velice podobný tomu jaký byl získán u systému s větší iontovou silou (Obr. 7a). Ani tvar oscilací, Obr. 8b, se příliš neliší. Pozice systémové zóny vypočítaná PM a na Obr. 8c naznačená modrou čarou je opět ve velmi dobré shodě s reálnou pozicí, zakroužkovanou zeleně.



Obr. 8 a) Celkový elektroferogram BGE: 0,935 mM GMP, 1,066 mM kyselina fosforečná, 2,805 mM Na⁺; vzorek: 0,888 mM GMP, 1,013 mM kyselina fosforečná, 2,665 mM Na⁺, 5 mM thiomocovina; napětí -20kV, L_{celk} = 50 cm, L_{det} = 41,5 cm (UV detekce 214 nm); b) zvětšená část stejného elektroferogramu; c) zvětšená část elektroferogramu v místě systémové poruchy, modrá čára značí PeakMasterem vypočítanou pozici, zeleně zakroužkována je mezera ve vzoru oscilací, reálná porucha.

Výrazný rozdíl v elektroferogramech pro systémy s vyšší a nižší iontovou silou nebyl tedy zaznamenán. V jednom z experimentů pro tento systém byl získán elektroferogram, který byl v části zobrazené na Obr. 9 naprosto pravidelný. Je tedy možné, že byl rušivými vlivy ovlivněn velice málo nebo vůbec.

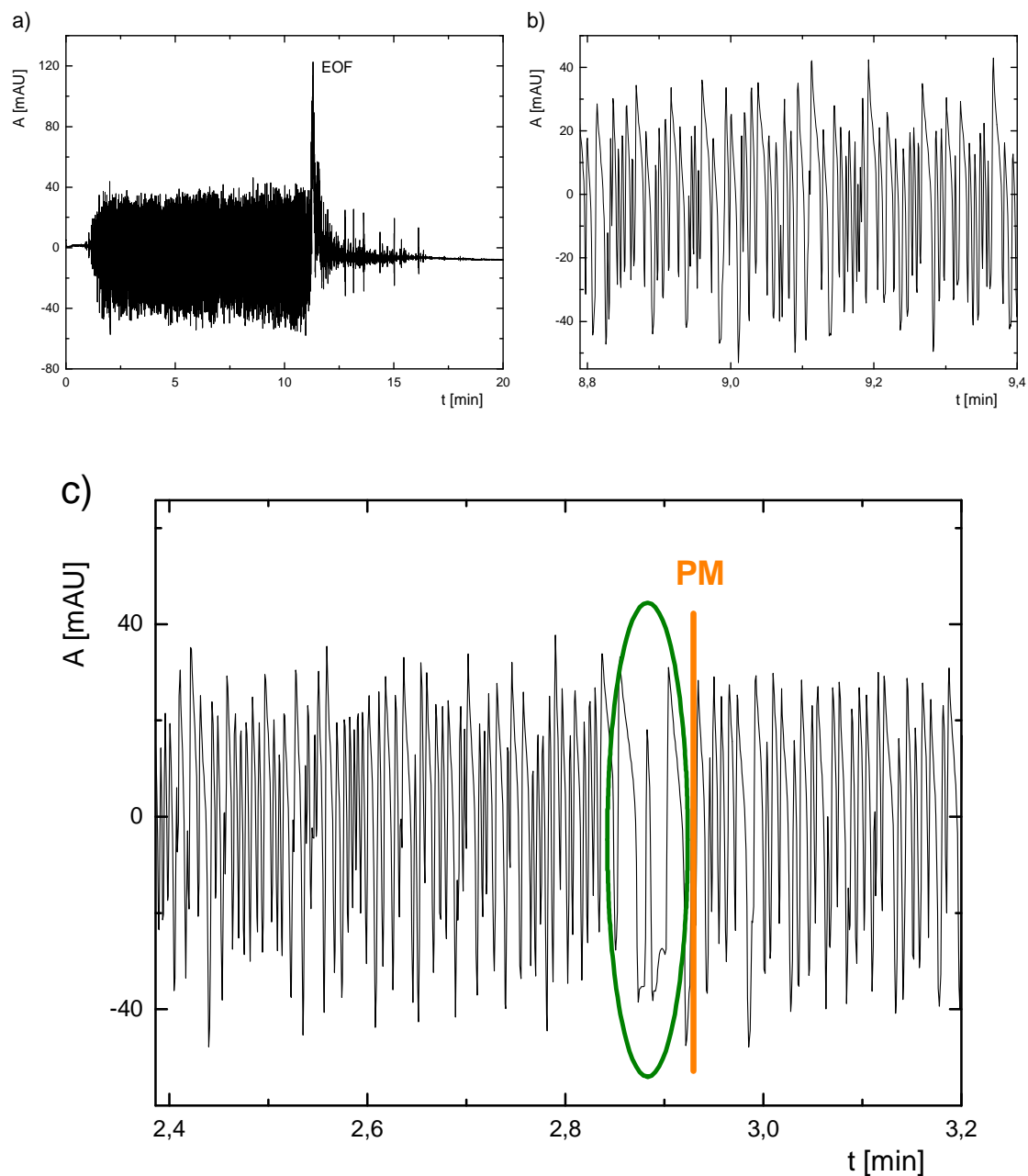


Obr. 9 Část elektroferogramu s pravidelnými oscilacemi naměřená u systém 0,935 mM GMP, 1,066 mM kyselina fosforečná, 2,650 mM Na⁺; vzorek: 0,888 mM GMP, 1,013 mM kyselina fosforečná, 2,518 mM Na⁺, 5 mM thiomocovina; napětí -20kV, L_{celk} = 50cm, L_{det} = 41,5 cm (UV detekce 214 nm).

4.4.2 Systém kyselina maleinová, kyselina citrónová a Na⁺

Dalším zkoumaným systémem byl elektrolyt složený z kyseliny maleinové, kyseliny citrónové a Na⁺. Opět byly připraveny oscilující systémy o dvou různých iontových silách. Jako první byl měřen systém s větší iontovou silou o složení 5,000 mM kyselina maleinová, 2,000 mM kyselina citrónová a 10,600 mM Na⁺. Tato hodnota koncentrace sodných iontů je poněkud mimo vypočtený interval koncentrací, kde je eigenmobilita systému komplexní (viz

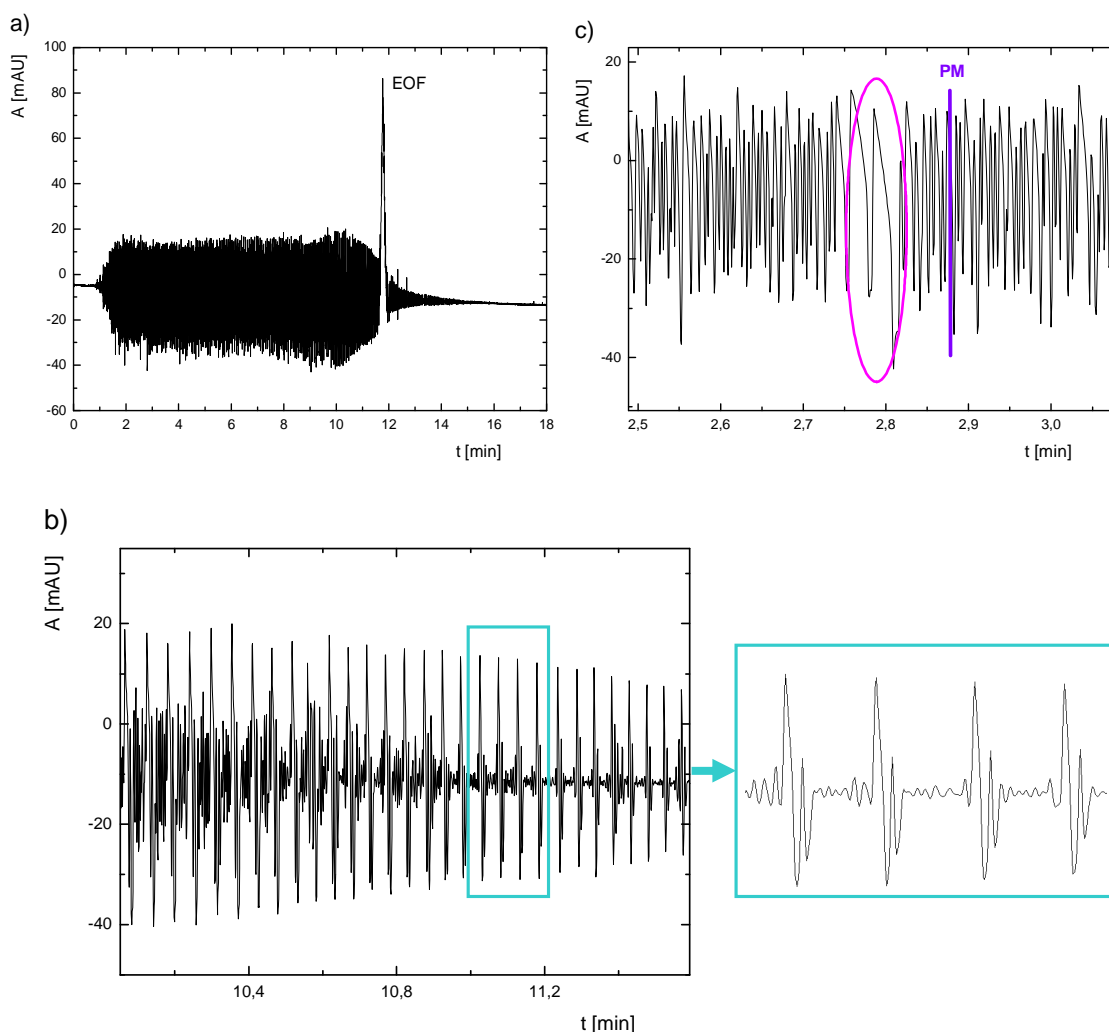
Tab. 2), ale tato odchylka může být způsobena již zmíněným přepočtem limitních iontových mobilit a pK_a konstant na aktuální hodnoty iontové síly nebo ne zcela přesnými hodnotami mobilit a pK_a konstant v databázi PM. Vzorkem byl opět zředěný základní elektrolyt (na 95%) s 5 mM thiomočovinou. Roztok o takovém složení osciloval a jeho celý elektroferogram je vidět na Obr. 10a. Jeho zvětšená část na Obr. 10b ukazuje, že ne všechny kmity dosahují stejné amplitudy a pokud tento obrázek porovnáme s Obr. 8b, kde je zvětšena přibližně stejně velká část elektroferogramu pro systém GMP, kyselina fosforečná a Na^+ , zjistíme, že systém kyselina maleinová, kyselina citrónová a Na^+ poskytuje oscilace s větší frekvencí. Toto pouhé vizuální porovnání může být vzhledem k odlišné elektroforetické rychlosti a případného EOF zavádějící, i přesto, že u obou experimentů byla stejná intenzita elektrického pole. Vypočítáme-li však pro oba tyto případy šířku jedné periody, dostáváme u systému na Obr. 8b 1,25 mm a pro systém na Obr. 10b hodnotu 0,56 mm. Tyto hodnoty tedy potvrdily předběžný úsudek na základě vizuálního srovnání elektroferogramů. Na Obr. 10c je dobře patrná zeleně zakroužkovaná mezera ve vzoru oscilací a její poloha velmi dobře odpovídá předpovědi PM (oranžová čára).



Obr. 10 a) Celkový elektroferogram BGE: 5,000 mM kyselina maleinová, 2,000 mM kyselina citrónová, 10,600 mM Na⁺; vzorek: 4,750 mM kyselina maleinová, 1,900 mM kyselina citrónová, 10,070 mM Na⁺, 5 mM thiomocovina; napětí -20kV, $L_{\text{celk}} = 50$ cm, $L_{\text{det}} = 41,5$ cm (UV detekce 214 nm); b) zvětšená část stejného elektroferogramu ukazuje vzor s nestejnou amplitudou; c) zvětšená část elektroferogramu v místě systémové poruchy. Oranžová čára značí PeakMasterem vypočítanou pozici, zeleně zakroužkována je porucha ve vzoru oscilací, udávající systémovou poruchu.

Nestejná, částečně chaotická amplituda jednotlivých kmitů je vlastností tohoto systému a tento jev byl ještě patrnější u systému s menší iontovou silou, 4,000 mM kyselina maleinová, 1,136 mM kyselina citrónová a 7,450 mM Na⁺.

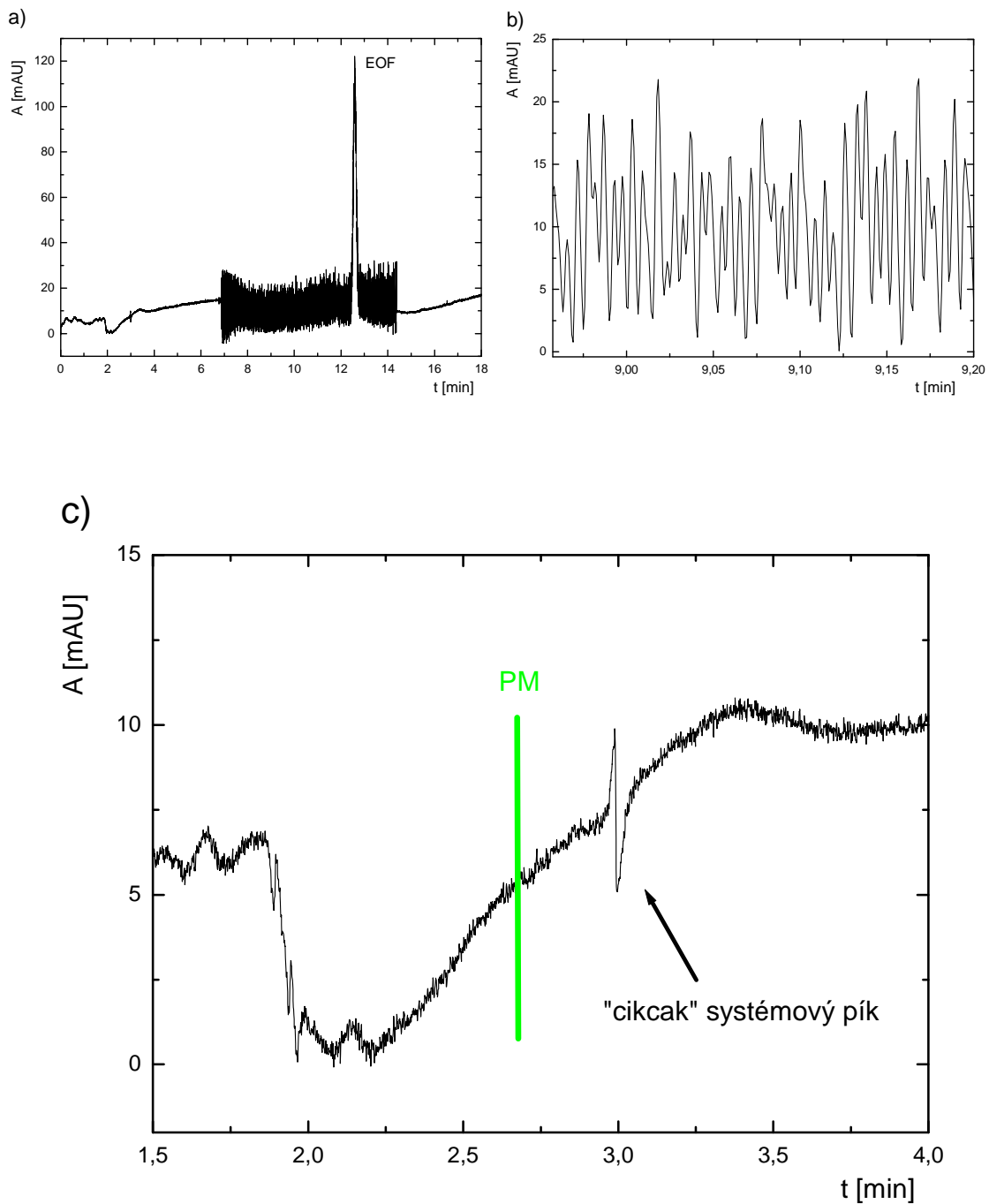
Celkový elektroferogram se na první pohled moc nelišil (Obr. 11a), ale jeho zvětšené části odhalily vzory, kde se v pravidelných rozestupech objevují kmity s velkou amplitudou a v jejich okolí jsou oscilace jako by tlumeny (Obr. 11b). Na tomto obrázku je i detailní zvětšení vyznačené části elektroferogramu. Při proměřování tohoto systému se mezi jednotlivými měřeními zpomaloval EOF, lze tedy předpokládat, že se tak dělo i během jednoho měření a tím lze také vysvětlit malou odchylku předpovědi PM od reálné polohy poruchy na Obr. 11c.



Obr. 11 a) Celkový elektroferogram BGE: 4,000 mM kyselina maleinová, 1,136 mM kyselina citrónová, 7,450 mM Na⁺; vzorek: 3,800 mM kyselina maleinová, 1,079 mM kyselina citrónová, 7,078 mM Na⁺, 5 mM thiomocovina; napětí -20kV, L_{celk} = 50 cm, L_{det} = 41,5 cm (UV detekce 214 nm); b) zvětšená část stejného elektroferogramu ukazuje pravidelný vzor oscilací, detailně je zvětšena modře orámovaná část; c) stejný elektroferogram v místě systémové poruchy. Fialová čára značí PeakMasterem vypočítanou pozici reálné části systémové poruchy, růžově zakroužkována je mezera ve vzoru oscilací, reálná porucha.

4.4.3 Systém kyselina chromová, kyselina ftalová a Cs⁺

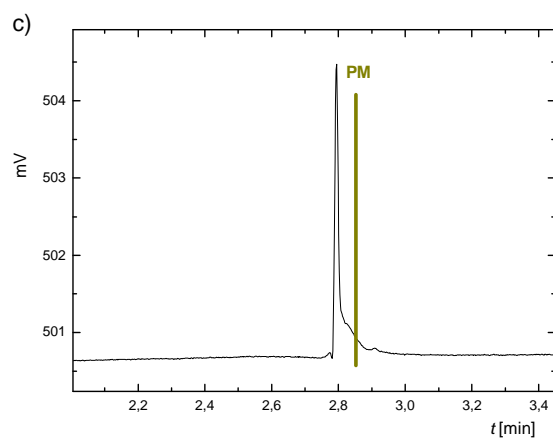
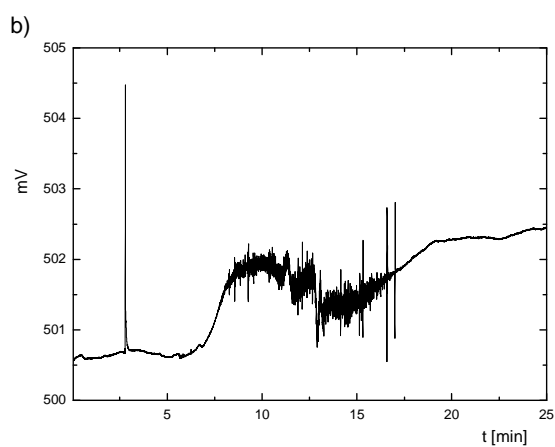
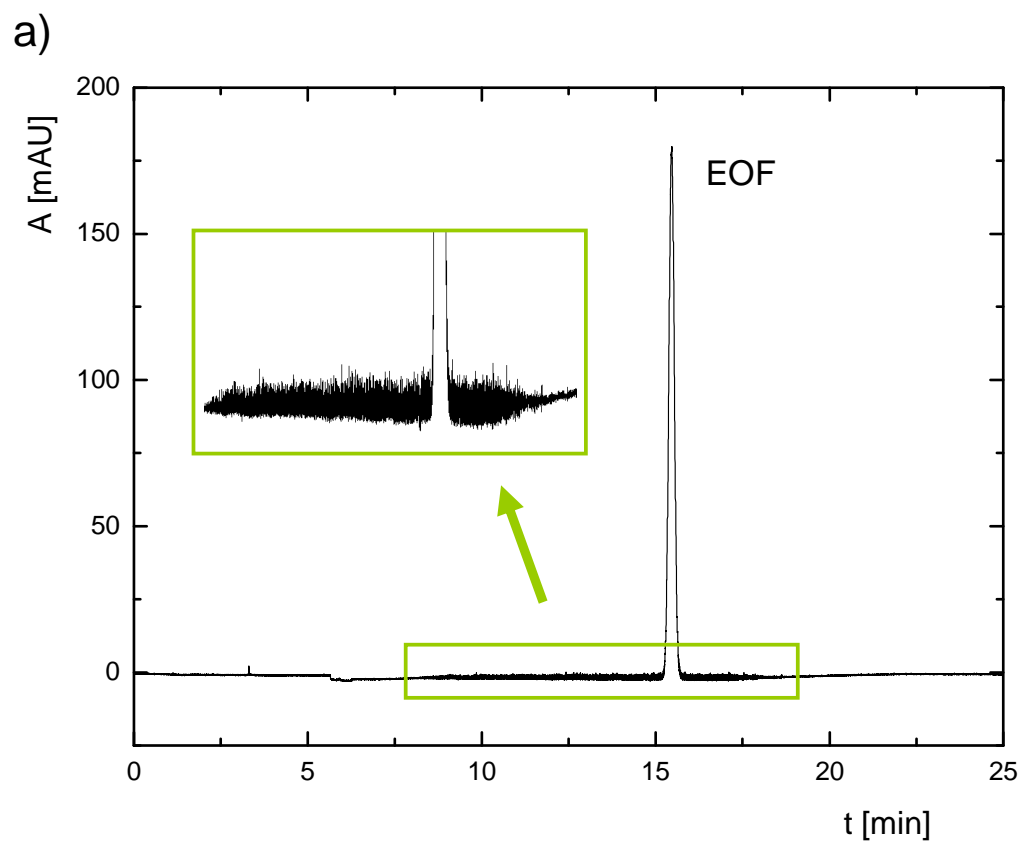
Tento systém byl zkoumán jen s malou nadějí na úspěch, protože chromany jsou v roztoku v rovnováze s dichromany, v závislosti na pH. Rovnováha je ve prospěch dichromanů posunuta až v kyselém pH, přesto lze očekávat, že i při pH = 6, kdy se teoreticky očekávalo oscilační chování, budou v elektrolytu přítomny také dichromany. Podle dostupných údajů v literatuře [59] má kyselina dichromová téměř shodné hodnoty mobilit jako kyselina chromová, hodnoty pK_a konstanty se už poněkud liší. Přesto největším problémem zůstává neznámá koncentrace obou složek v roztoku, protože chromany přechází na dichromany v poměru 2:1. Tato úvaha také vedla k úpravě doposud používaného postupu, kdy variabilní složkou nebyl kation, tedy Cs⁺ (jak je uvedeno v Tab. 2), ale byla zvolena fixní koncentrace cesných iontů a variabilní složkou byla kyselina chromová. Systém se podařilo „rozoscilovat“ až při složení 4,414 mM kyselina chromová, 2,734 mM kyselina ftalová a 9,662 mM Cs⁺, tedy až tehdy, kdy byla koncentrace kyseliny chromové o 1 mM větší než teoretická hodnota (Tab. 2). Dávkovaným vzorkem byl porušený základní elektrolyt (na 95% původní koncentrace) s 5 mM thiomocovinou. Systém začal oscilovat vždy až po několika minutách a oscilace se udržely jen chvíli a následně ustaly (Obr. 12a). Je možné že se tak dělo proto, že se elektrolýzou postupně pozměnilo složení základního elektrolytu, které se tak dostalo do oblasti, ve které již systém nemá komplexní eigenmobilitu. Vzor oscilací nebyl příliš pravidelný, jak je vidět na Obr. 12b. Tím, že systém neosciloval od samého začátku, není systémová porucha v místě oscilací. Jedná se ale o systém se dvěma anionickými eigenmobilitami, které mají, pokud se nacházíme velmi blízko oscilující oblasti, téměř stejnou velikost a dá se tedy očekávat tzv. „cikcak“ pík (způsobený interakcí dvou systémových zón). Tento pík byl na uvedeném elektroferogramu dobře patrný (Obr. 12c). Předpověď pozice systémového píku nemusí v tomto případě příliš korespondovat s realitou, protože do PM byly zadány teoretické koncentrace z Tab. 2. Přesto se pík jen o málo opožďoval za teoretickou předpovědí.



Obr. 12 a) Celkový elektroferogram BGE: 4,414 mM kyselina chromová, 2,734 mM kyselina ftalová, 9,662 mM Cs⁺; vzorek: 4,193 mM kyselina chromová, 2,597 mM kyselina ftalová, 9,179 mM Cs⁺, 5 mM thiomocovina; napětí -20kV, L_{celk} = 50 cm, L_{det} = 41,5 cm (UV detekce 214 nm); b) zvětšená část stejného elektroferogramu ukazuje vzor oscilací; c) detail elektroferogramu v místě systémového „cickak“ píku. Zelená čára značí PeakMasterem vypočítanou pozici.

4.4.4 Systém kyselina octová, kyselina citrónová a Na⁺

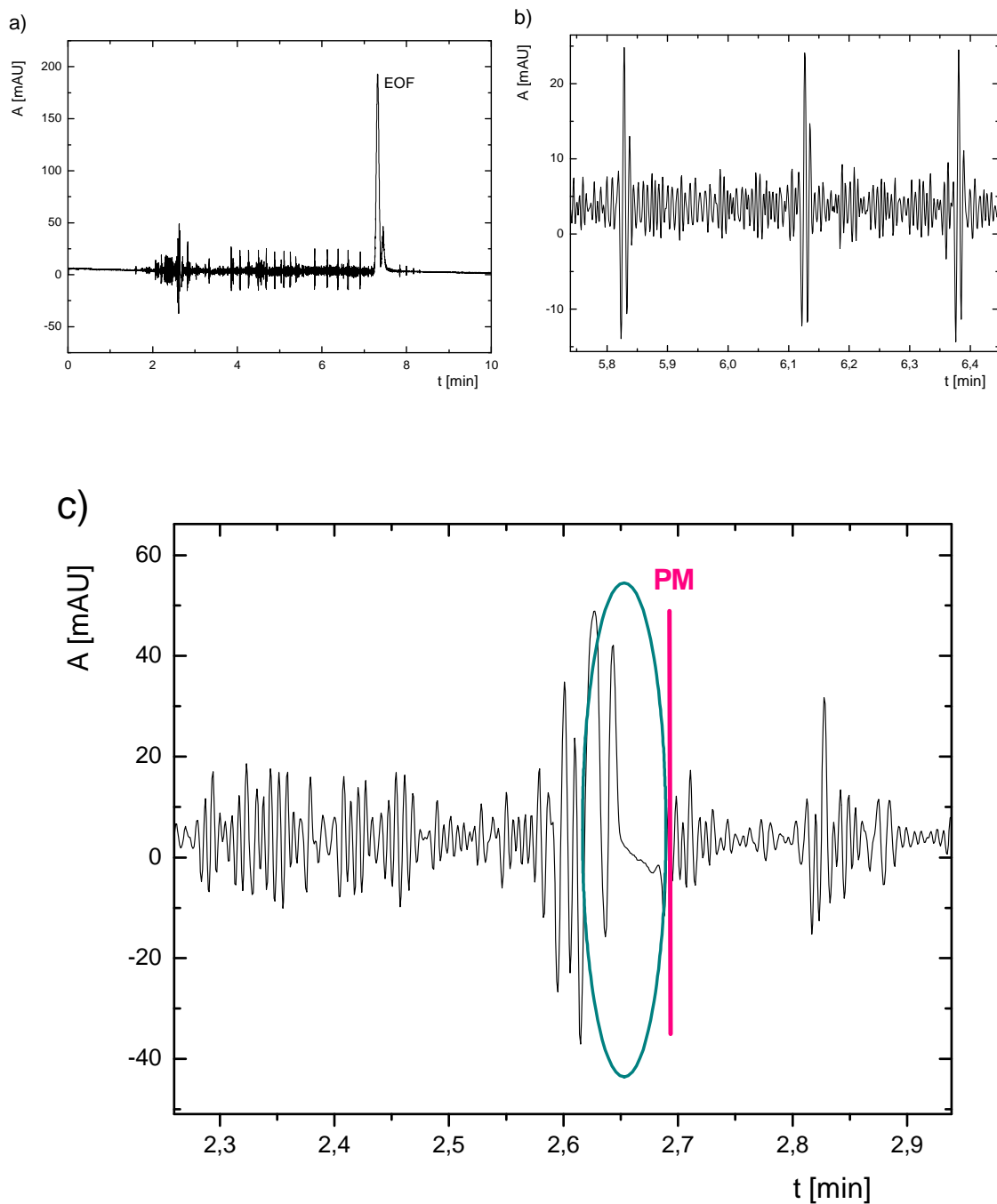
„Rozoscilování“ tohoto systému bylo velkým úspěchem, protože je složen z chemikálií běžně používaných v elektroforéze. Tento systém se od ostatních zkoumaných systémů odlišuje tím, že je kombinací kyseliny jednosytné a vícesytné. Také má nejmenší poměr šířky intervalu ku c_{MAX} pro sodné ionty (Tab. 2) a bylo tedy nutné pracovat co nejpřesněji, což se dlouhou dobu nedařilo. Nakonec měření systému 2,152 mM kyselina octová, 1,906 mM kyselina citrónová a 6,760 mM Na⁺ prokázalo oscilace a poskytlo elektroferogramy ukázané na Obr. 13. První je záznam z DAD detektoru při 191 nm (Obr. 13a), ale protože ani jedna složka není výrazně absorbující v UV části spektra a oscilace jsou zde špatně viditelné, je uveden ještě záznam z detektoru vodivostního (Obr. 13b). Záznam z DAD detektoru byl použit pro výpočet mobility EOF, která pak byla dosazena do PM, aby mohla být vypočítána teoretická pozice systémového píku na vodivostním záznamu (hnědá čára na Obr. 13c). Stejně jako u předešlého systému, začínají oscilace až po několika minutách. Systémový pík zde nemá tvar cikcak, ale velmi dobře souhlasí s předpovědí PM, jedná se o dva překrývající se systémové píky. Dávkovaný vzorek měl tentokrát porušený poměr složek, což bylo zajištěno přidávkem sodných iontů do zředěného základního elektrolytu a obsahoval také 5 mM thiomocovinu.



Obr. 13 BGE: 2,152 mM kyselina octová, 1,906 mM kyselina citrónová, 6,760 mM Na⁺; vzorek: 2,044 mM kyselina octová, 1,811 mM kyselina citrónová, 6,596 mM Na⁺, 5 mM thiomocovina; napětí -20kV, $L_{\text{celk}} = 50,3$ cm, $L_{\text{det1}} = 41,8$ cm (UV detekce 191 nm), $L_{\text{det2}} = 35,3$ cm (k vodivostnímu detektoru); a) UV záznam s málo patrnými oscilacemi, přibližena zeleně ohraničená oblast; b) vodivostní záznam stejného měření; c) porovnání pozice dvou překrývajících se systémových píků s předpovědí PM (hnědá čára).

4.4.5 Systém kyselina maleinová, kyselina ftalová a Na⁺

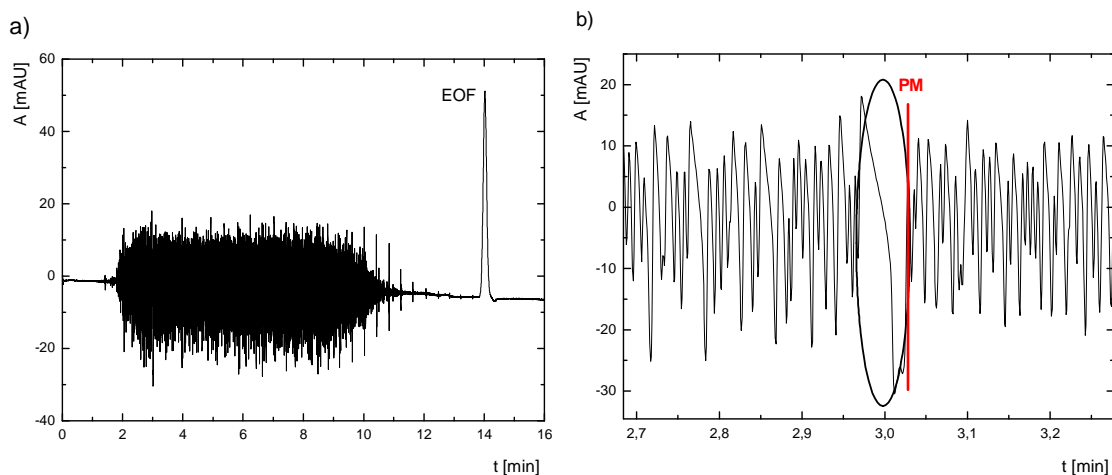
V tomto systému vystupují složky, které se již objevily v předešlých systémech, proto zde můžeme najít již známé vzory, které se však mírně odlišují. Celkový elektroferogram na Obr. 14a pro systém 3,995 mM kyselina maleinová, 1,232 mM kyselina ftalová a 7,533 mM Na⁺ vypadá zdánlivě odlišně od všech ostatních, které byly zobrazeny v předešlých kapitolách. Na Obr. 14b, kde je zvětšená část získaného elektroferogramu, však vidíme, že se jedná o podobný vzor jako pro systém kyselina maleinová, kyselina citrónová, Na⁺ při nižší iontové síle (kapitola 4.4.2, Obr. 11b). Jen kmity s velkou amplitudou jsou od sebe mnohem více vzdáleny. Pozice systémové poruchy je ve velmi dobré shodě s teoretickou předpovědí (Obr. 14c). Dávkovaný vzorek byl zředěný základní elektrolyt (na 95% původní koncentrace) s přidavkem sodných iontů a 5 mM thiomocoviny.



Obr. 14 a) Celkový elektroferogram BGE: 3,995 mM kyselina maleinová, 1,232 mM kyselina ftalová, 7,533 mM Na^+ ; vzorek: 3,795 mM kyselina maleinová, 1,170 mM kyselina ftalová, 7,296 mM Na^+ , 5 mM thiomocovina; napětí -20kV , $L_{\text{celk}} = 50,3$ cm, $L_{\text{det}} = 41,8$ cm (UV detekce 214 nm); b) zvětšená část stejného elektroferogramu ukazuje vzor oscilací; c) stejný elektroferogram v místě systémové poruchy v oscilačním vzoru (zakroužkovaná). Růžová čára značí pozici vypočítanou pomocí PM.

4.4.6 Kvarterní systém

Zkombinováním složek, které již byly použity v předešlých systémech, byl nalezen také jeden čtyřsložkový systém. Složkami byly kyselina citrónová, kyselina maleinová, kyselina fosforečná a Na^+ . I tento systém v experimentech osciloval. Na Obr. 15 je elektroferogram pro složení 1,455 mM kyselina citrónová, 1,919 mM kyselina maleinová, 1,485 mM kyselina fosforečná a 7,196 mM Na^+ . Složení dávkovaného vzorku je uvedeno v popisu pod obrázkem. Na celkovém elektroferogramu jsou ke konci oscilací opět zřetelné kmity s výrazně větší amplitudou (Obr. 15a). Pozice systémové poruchy ve vzoru oscilací opět velmi dobře odpovídala její teoretické pozici (Obr. 15b). Jelikož má systém čtyři složky, má rovněž čtyři eigenmobility, tedy čtyři systémové zóny. Jedna eigenmobilita je blízká nula, dvě jsou komplexně sdružené a jsou zodpovědné za oscilace. Čtvrtá systémová zóna, taktéž anionická, nebyla ve vzoru oscilací patrná. Teoretická pozice této zóny byla 3,6 min.



Obr. 15 a) Celkový elektroferogram BGE: 1,455 mM kyselina citrónová, 1,919 mM kyselina maleinová, 1,485 mM kyselina fosforečná, 7,196 Na^+ ; vzorek: 1,382 mM kyselina citrónová, 1,823 mM kyselina maleinová, 1,411 mM kyselina fosforečná, 6,991 mM Na^+ , 5 mM thiomocovina; napětí -20kV , $L_{\text{celk}} = 49,8$ cm, $L_{\text{det}} = 41,3$ cm (UV detekce 214 nm); b) stejný elektroferogramu v místě systémové poruchy v oscilačním vzoru (zakroužkovaná). Červená čára značí pozici vypočítanou PM.

4.4.7 „Neoscilující“ systémy

Ne všechny experimenty byly úspěšné a některé teoreticky předpovězené systémy se „rozoscilovat“ nepodařilo. Byly to systémy:

- kyselina chromová
kyselina fosforečná
Cs⁺
- GMP
kyselina uhličitá
Na⁺
- kyselina 4-hydroxybenzoová
kyselina uhličitá
Na⁺

U prvního systému je neúspěch připisován již zmíněné rovnováze chroman-dichroman (kap. 4.4.3). Druhé dva systémy obsahují kyselinu uhličitou. Protože se nám experimentálně nepodařilo najít oscilace v systémech, které obsahují právě uhličitany, je pravděpodobné, že hodnoty mobilit obou iontových forem uhličitany v databázi PM, $46,1 \times 10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ a $71,8 \times 10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$, nejsou správné. Může to být způsobeno systematickou chybou při stanovování těchto mobilit. BGE pohlcuje CO₂ ze vzduchu a obsahuje tedy uhličitany - pokud BGE obsahuje ionty vzorku, tak stanovená mobilita je systémová a nerovná se mobilitě analytu pro nekontaminovaný BGE.

4.4.8 Robustnost oscilujícího systému

Možný výskyt nečistot a cizích iontů v roztocích základních elektrolytů nás přivedl na myšlenku ověřit, jak je oscilující systém na přítomnost těchto dalších iontů citlivý, tedy jak je takový systém robustní. Pro tyto experimenty byl vybrán systém 5,000 mM GMP, 5,000 mM kyselina fosforečná a 14,200 mM Na⁺, protože tento systém se v předchozích experimentech ukázal být velmi spolehlivým. V programu PM byly vypočítány teoretické přídatky každého jednotlivého testujícího iontu k tomuto systému, které právě způsobí, že systém

přestane oscilovat (tedy přestane mít komplexní eigenmobility). Testujícími ionty byly jednotlivě uhličitany, chloridový, šťavelanový anion a lithný kation. Poté byly namíchány základní elektrolyty se zvyšujícími se přídávky daného iontu a bylo experimentálně sledováno, zda systém ještě osciluje či už nikoliv. Získané výsledky jsou shrnuty v Tab. 3.

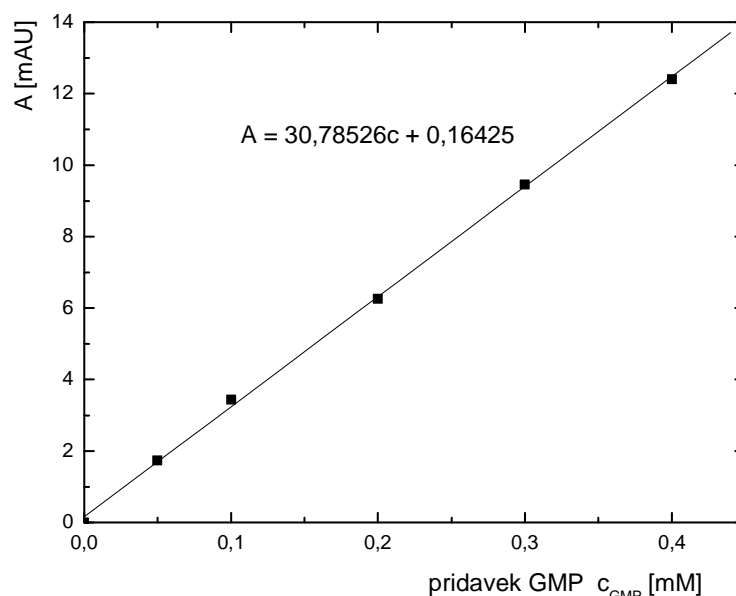
Tab. 3 Programem PM vypočítané přídávky uvedených iontů, které právě znemožní oscilace, experimentálně zjištěné hodnoty a poměr experimentálních hodnot ku teoretickým, vyjádřený v procentech.

testující iont	přídavek-PeakMaster	přídavek-experiment	% exp./PM
CO_3^{2-}	0,45 mM	1,50 mM	333
Li^+	0,86 mM	0,84 mM	97,7
Cl^-	1,00 mM	0,70 mM	70,0
Ac^-	0,88 mM	0,60 mM	68,2
$(\text{COO})_2^{2-}$	0,47 mM	0,37 mM	78,7

Pokud uvažujeme, že základní elektrolyt již nějaké nečistoty v podobě cizích iontů obsahuje, pak je logické, že k potlačení oscilací ve skutečnosti stačí menší přídávky zkoumaného cizího iontu. Proto je přirozené, že hodnoty poměru experimentálního přídávku ku přídávku teoretickému vyjádřené v procentech jsou menší než 100%. Jak je vidět v Tab. 3, je tomu tak u téměř všech iontů. Jedinými ionty, kterých bylo v reálném experimentu k potlačení oscilací potřeba přidat více jak trojnásobek teoretické hodnoty, byly uhličitany. To opět nasvědčuje tomu, že hodnoty mobilit pro uhličitany nemusejí být v databázi PM uvedeny správně, jak již bylo zmíněno v předešlé kap. 4.4.7.

4.4.9 Porovnání amplitudy oscilací se simulací

V simulačním programu Simul [56] (kap. 2.4.1) lze simulovat chování roztoků elektrolytů v elektrickém poli. Měl by tedy být schopen simulovat i vlastnosti oscilujícího systému. Simulaci je samozřejmě zapotřebí provést v módu, který provádí korekci všech parametrů (konstant pK , mobilit) na iontovou sílu, aby výsledky simulace co nejlépe odpovídaly skutečnosti. Protože výstupem Simulu jsou prostorové distribuce koncentrací složek elektrolytu, bylo vhodné vybrat takový systém, který má pouze jednu složku absorbující v UV oblasti spektra a umožní tedy experimentálně změřený UV signál při zvolené vlnové délce nakalibrovat. Pro tento účel dobře posloužil systém 0,935 mM GMP, 1,066 mM kyselina fosforečná a 2,805 mM Na^+ , kde v UV oblasti absorbuje pouze GMP. Kalibrace signálu probíhala tak, že základní elektrolyt o uvedeném složení byl protlačován kapilárou až do ustálení základní linie signálu detektoru. Ta byla vynulována a následně byla kapilára promývána elektrolyty s definovanými přídávky GMP a vždy po ustálení základní linie byla odečtena absorbance. Získaná kalibrační křivka pro vlnovou délku 214 nm je na Obr. 16.



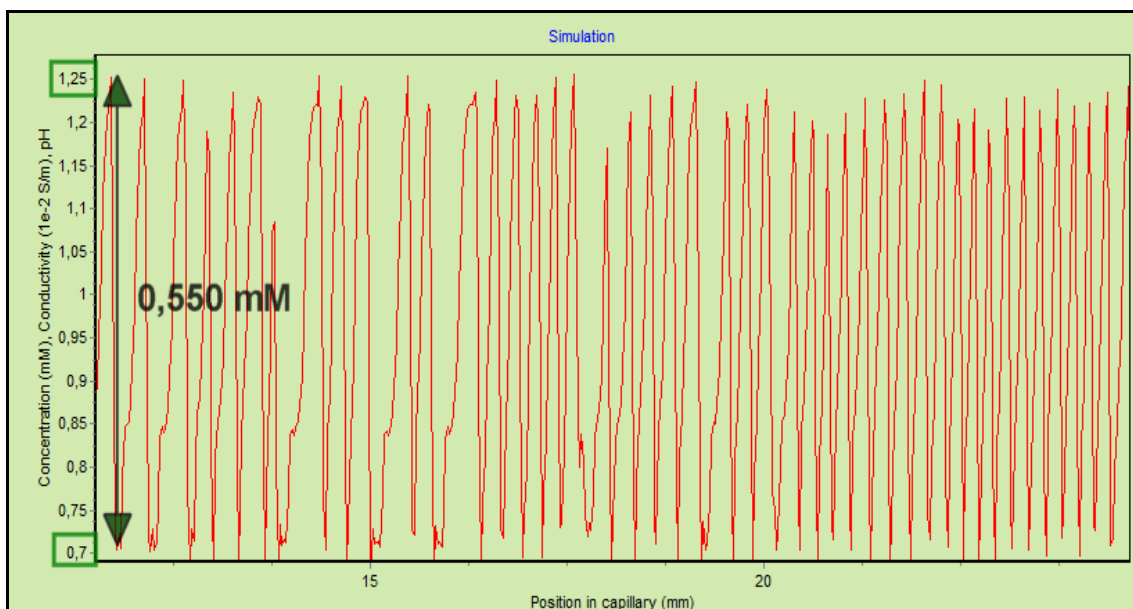
Obr. 16 Kalibrační křivka. Kalibrace UV signálu 214 nm.

Poté byl proveden experiment a rozkmit oscilací odečtený v absorpčních jednotkách byl přepočítán pomocí získané lineární závislosti na změnu koncentrace GMP. V programu Simul byly simulovány oscilace stejného systému (Obr. 17) a oba výsledky byly porovnány. Oba tyto výsledky, teoretický a experimentální, byly ve velmi dobré shodě.

Rozkmit oscilací vyjádřený v změně koncentrace GMP:

experiment: 0,515 mM

Simul: 0,550 mM



Obr. 17 Simulace systému 0,935 mM GMP, 1,066 mM kyselina fosforečná a 2,805 mM Na⁺ v programu Simul. Červená křivka je simulovaný profil GMP, rozkmit je 1,250 - 0,700 = 0,550 mM.

5 Závěr

Z přehledu literatury je zřejmé, že teoretický popis problematiky systémových píků se ubíral dvěma směry. Ve srovnání s přístupem řešení hmotnostních bilancí na pohyblivých rozhraní se zdá být správnější popis zvaný lineární teorie elektromigrace, který byl schopen osvětlit veškeré jevy týkající se výskytu, pozice i intenzity systémových píků a jejich interakce s píky analytů. Mimo to, tento přístup také předpověděl některá nová chování základních elektrolytů (například systémy bez stacionárního píku). Teoretické předpovědi vděčí za objevení také oscilují elektrolyty. Jsou to elektrolyty s komplexní hodnotou eigenmobility.

Podařilo se splnit cíle této práce:

1) V programu PeakMaster, který byl pro naše potřeby upraven, byly nalezeny potenciálně oscilující systémy (tedy systémy s komplexní eigenmobilitou) a bylo optimalizováno jejich složení tak, aby imaginární složka komplexní eigenmobility byla pro daný systém co největší.

2) U osmi vybraných systémů bylo oscilační chování experimentálně prokázáno. Ve třech případech systémy neoscilovaly.

3) Ke srovnání teorie a experimentu byla využita pozice systémové zóny, která se ve vzoru oscilací projevuje jako malá mezera v tomto vzoru. Teoretická pozice této zóny byla vypočítána opět v programu PeakMaster. Všechny experimentální výsledky byly z tohoto hlediska ve velmi dobré shodě s teoretickou předpovědí. Bylo potvrzeno, že celý vzor oscilací se kapilárou pohybuje rychlostí určenou reálnou částí komplexní eigenmobility. Dále byla testována robustnost oscilací ve vybraném systému a porovnávána experimentálně získaná amplituda oscilací s amplitudou získanou simulací v programu Simul. I v tomto případě bylo dosaženo dobré shody.

Nejen rychlost pohybu oscilací, ale i amplituda a perioda oscilací se zdají být charakteristikami systému a studium těchto parametrů zůstává podnětem k další práci.

Literatura

- [1] <http://www.natur.cuni.cz/~gas>
- [2] Poppe, H.: Secondary equilibria and their interaction with chromatographic transport. *J. Chromatogr.* **506**, 45-60 (1990)
- [3] Poppe, H.: Overloading and interaction phenomena in electrophoretic separations. *Anal. Chem.* **64**, 1908-1919 (1992)
- [4] Longworth, L. G.: Moving boundary studies on salt mixtures. *J. Am. Chem. Soc.* **67**, 1109-1119 (1945)
- [5] Alberty, R. A.: Moving boundary systems formed by weak electrolytes. Theory of simple systems formed by weak acids and bases. *J. Am. Chem. Soc.* **72**, 2361-2367 (1950)
- [6] Beckers, J.L.: Calculation of the composition of sample zones in capillary zone electrophoresis I. Mathematical model, *J. Chromatogr. A* **693**, 347-357 (1995)
- [7] Beckers, J.L.: Calculation of the composition of sample zones in capillary zone electrophoresis II. Simulated electropherograms, *J. Chromatogr. A* **696**, 285-294 (1995)
- [8] Beckers, J. L.: Calculation of the composition of sample zones in capillary zone electrophoresis III. Weak bases and the application of background electrolytes with two co-ions. *J. Chromatogr. A* **741**, 265-277 (1996)
- [9] Beckers, J.L.: Calculation of the composition of sample zones in capillary zone electrophoresis IV. Weak acids and system characteristics, *J. Chromatogr. A* **764**, 111-126 (1997)
- [10] Gebauer, P.; Boček, P.: Predicting peak symmetry in capillary zone electrophoresis: The concept of the Peak Shape Diagram. *Anal. Chem.* **69**, 1557-1563 (1997)
- [11] Gebauer, P.; Čáslavská, J.; Thormann, W.; Boček, P.: Prediction of zone patterns in capillary zone electrophoresis with conductivity detection. Concept of the zone conductivity diagram. *J. Chromatogr. A* **772**, 63-71 (1997)
- [12] Beckers, J. L.: Transfer ratio in indirect UV detection in capillary zone electrophoresis. A mathematical approach. *J. Chromatogr. A* **844**, 321-331 (1999)
- [13] Beckers, J. L.: Peak deformation in cationic analysis caused by system zones. *Electrophoresis* **22**, 2684-2690 (2001)
- [14] Gebauer, P.; Borecká, P.; Boček, P.: Predicting peak symmetry in capillary zone electrophoresis. Background Electrolytes with two co-ions: Schizophrenic zone broadening and the role of system peaks. *Anal. Chem.* **70**, 3397-3406 (1998)
- [15] Beckers, J.L.; Gebauer, P.; Boček, P.: System zones in capillary zone electrophoresis. *Electrophoresis* **22**, 3648-3658 (2001)
- [16] Mikkers, F. E. P.: Concentration distributions in capillary zone electrophoresis: CZE in a spreadsheet. *Anal. Chem.* **69**, 333-337 (1997)
- [17] Bruin, G. J. M.; van Asten, A. C.; Xu, X.; Poppe, H.: Theoretical and experimental aspects of indirect detection in capillary electrophoresis. *J. Chromatogr.* **608**, 97-107 (1992)
- [18] Poppe, H.: System peaks and non-linearity in capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **831**, 105-121 (1999)
- [19] Sellmayer, H.; Poppe, H.: Position and intensity of system (eigen) peaks in capillary zone electrophoresis. *J. Chromatogr. A* **960**, 175-185 (2002)
- [20] Štědrý, M.; Jaroš, M.; Gaš, B.: Eigenmobilities in background electrolytes for capillary zone electrophoresis. I. System eigenpeaks and resonance in system with strong electrolytes. *J. Chromatogr. A* **960**, 187-198 (2002)
- [21] Štědrý, M.; Jaroš, M.; Včeláková, K.; Gaš, B.: Eigenmobilities in background electrolytes for capillary zone electrophoresis. II. Eigenpeaks in univalent weak electrolytes. *Electrophoresis* **24**, 536-547 (2003)
- [22] 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)
- [23] 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)

-
- [24] Hruška, V.; Štědrý, M.; Včeláková, K.; Lokajová, J.: Eigenmobilities in background electrolytes for CZE. V. Intensity (amplitudes) of system peaks. *Electrophoresis* **27**, 4610-4617 (2006)
- [25] Gebauer, P.; Pantůčková, P.; Boček, P.: Analytical expediency of acidic and alkaline background electrolytes in capillary zone electrophoresis: role of system zones in single-co-ion systems. *Anal. Chem.* **71**, 3374-3381 (1999)
- [26] Gebauer, P.; Beckers, J. L.; Boček, P.: Theory of system zones in capillary zone electrophoresis. *Electrophoresis* **23**, 1779-1785 (2002)
- [27] Beckers, J.L.; Boček, P.: The preparation of background electrolytes in capillary zone electrophoresis: Golden rules and pitfalls. *Electrophoresis* **24**, 518-535 (2003)
- [28] Macka, M.; Haddad, P. R.; Gebauer, P.; Boček, P.: System peaks in capillary zone electrophoresis. 3. Practical rules for predicting the existence of system peaks in capillary zone electrophoresis of anions using indirect spectrophotometric detection. *Electrophoresis* **18**, 1998-2007 (1997)
- [29] Beckers, J. L.; Boček, P.: Peaks in capillary zone electrophoresis: Fact or fiction. *Electrophoresis* **20**, 518-524, (1999)
- [30] Kohlrausch, F.: Ueber concentrations-verschiebungen durch electrolyse im innern von lösungen und lösungsgemischen. *Ann. Phys.Chem. (Leipzig)* **62**, 209-239 (1897)
- [31] Dismukes, E. B.; Alberty, R. A.: Weak electrolyte moving boundary systems analogous to the electrophoresis of a single protein. *J. Am. Chem. Soc.* **76**, 191-197 (1954)
- [32] Jovin, T. M.: Multiphasic zone electrophoresis. I. Steady-state moving-boundary systems formed by different electrolyte combinations. *Biochemistry* **12**, 871-879, (1973)
- [33] Gaš, B.; Kenndler, E.: System zones in capillary zone electrophoresis. *Electrophoresis* **25**, 3901-3912 (2004)
- [34] Gaš, B.; Vacík, J.; Zelenský, I.: Computer-aided simulation of electromigration. *J. Chromatogr.* **545**, 225-237 (1991)
- [35] Ermakov, S. V.; Zhukov, M. V.; Capelli, L.; Righetti, P. G.: Isotachophoresis at pH extremes: Theory and experimental validation. *Electrophoresis* **19**, 192-205 (1998)
- [36] Beckers, J. L.: System peaks and disturbances to the baseline UV signal in capillary zone electrophoresis. *J. Chromatogr. A* **662**, 153-166 (1994)
- [37] Beckers, J. L.: UV detection in capillary zone electrophoresis. Peaks or dips - that is the question. *J. Chromatogr. A* **679**, 153-165 (1994)
- [38] Doble, P.; Haddad, P. R.: Use of electrolytes containing multiple co-anions in the analysis of anions by capillary electrophoresis using indirect absorbance detection. *Anal. Chem.* **71**, 15-22 (1999)
- [39] Doble, P.; Macka, M.; Haddad, P. R.: Factors influencing the choice of buffer in background electrolytes for indirect detection of fast anions by capillary electrophoresis. *Electrophoresis* **19**, 2257-2261 (1998)
- [40] Gebauer, P.; Boček, P.: New aspects of buffering with multivalent weak acids in capillary zone electrophoresis: Pros and cons of the phosphate buffer. *Electrophoresis* **21**, 2809-2813 (2000)
- [41] Gebauer, P.; Pantůčková, P.; Boček, P.: Capillary zone electrophoresis in phosphate buffer – known or unknown? *J. Chromatogr. A* **894**, 89-93 (2000)
- [42] Beckers, J. L.; Gebauer, P.; Boček, P.: Why robust background electrolytes containing multivalent ionic species can fail in capillary zone electrophoresis. *J. Chromatogr. A* **916**, 41-49 (2001)
- [43] Beckers, J. L.; Boček, P.: Multivalent weak electrolytes – risky background electrolytes for capillary zone electrophoresis. *Electrophoresis* **23**, 1942-1946 (2002)
- [44] Hruška, V.; Gaš, B.: Kohlrausch regulating function and other conservation laws in electrophoresis. *Electrophoresis* **28**, 3-14 (2007)
- [45] Gaš, B.; Hruška, V.; Dittmann, M.; Bek, F.; Witt, K.: Prediction and understanding system peaks in capillary zones electrophoresis. *J. Sep. Sci.* **30**, 1435-1445 (2007)
- [46] Lokajová, J.; Hruška, V.; Tesařová, E.; Gaš, B.: System peaks in micellar electrophoresis: I. Utilization of system peaks for determination of critical micelle concentration. *Electrophoresis* **29**, 1189–1195 (2008)

-
- [47] Tuckerman, L. S.: Thermosolutal and binary fluid convection as a 2×2 matrix problem. *Physica D* **156**, 325–363 (2001)
- [48] Hruška, V.; Jaroš, M.; Gaš, B.: Oscillating electrolytes. *Electrophoresis* **27**, 513-518 (2006)
- [49] 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)
- [50] Gaš, B.: *Diplomová práce*, Karlova univerzita v Praze, 1975
- [51] Fidler, V.; Vacík, J.; Fidler, Z.: Dynamics of isotachophoretic separation I. Computer simulation. *J.Chromatogr.* **320**, 167-174 (1985)
- [52] Schwer, C.; Gaš, B.; Lottspeich, F.; Kenndler, E.: Computer simulation and experimental evaluation of on-column sample preconcentration in capillary zone electrophoresis by discontinuous buffer systems. *Anal. Chem.* **65**, 2108-2115 (1993)
- [53] Mao, Q.; Pawliszyn, J.; Thormann, W.: Dynamics of capillary isoelectric focusing in the absence of fluid flow: High-resolution computer simulation, experimental validation with whole column optical imaging. *Anal. Chem.* **72**, 5493-5502 (2000)
- [54] Mosher, R. A.; Thormann, W.: High-resolution computer simulation of the dynamics of isoelectric focusing using carrier ampholytes: The post-separation stabilizing phase revisited. *Electrophoresis* **23**, 1803-1814 (2002)
- [55] Thormann, W.; Huang, T. M.; Pawliszyn, J.; Mosher, R. A.: High-resolution computer simulation of the dynamics of isoelectric focusing of proteins. *Electrophoresis* **25**, 324-337 (2004)
- [56] Hruška, V.; Jaroš, M.; Gaš, B.: Simul 5 – Free dynamic simulator of electrophoresis. *Electrophoresis* **27**, 984-991 (2006)
- [57] Gaš, B.; Zuska, J.; Coufal, P.; van de Goor, T.: Optimization of the high-frequency contactless conductivity detector for capillary electrophoresis. *Electrophoresis* **23**, 3520-3527 (2002)
- [58] Gaš, B.; Jaroš, M.; Hruška, V.; Zusková, I.; Štědrý, M.: PeakMaster - A freeware simulator of capillary zone electrophoresis. *LC GC Europe* **18**, 282-288 (2005)
- [59] Hirokawa, T.; Nishimo, M.; Aoki, N.; Kiso, Y.; Sawamoto, Y.; Yagi, T.; Akiyama, J.: Table of isotachophoretic indices I. Simulated qualitative and quantitative indices of 287 anionic substances in the range pH 3–10. *J.Chromatogr.* **271**, D1-D106 (1983)