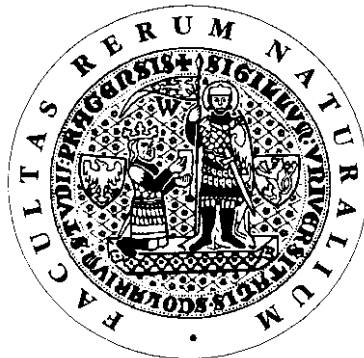


**Univerzita Karlova v Praze**  
**Přírodovědecká fakulta**

Klinická a toxikologická analýza



**Zuzana Srchová**

**Testování nového bezkontaktního vodivostního  
detektoru pro kapilární elektroforézu**

**Testing of a new contactless conductivity detector for  
capillary electrophoresis**

Bakalářská práce

Vedoucí závěrečné práce: doc. RNDr. Pavel Coufal, Ph.D.

Praha 2011

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 24.8. 2011

Podpis

## **Poděkování**

Touto cestou bych chtěla poděkovat především svému vedoucímu bakalářské práce doc. RNDr. Pavlu Coufalovi, Ph.D. za jeho odbornou pomoc a vedení, ochotu, trpělivost a slova povzbuzení, čímž výrazně podpořil vypracování této práce.

Práce na tomto projektu byla finančně podporována výzkumným záměrem MSM0021620857 Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky.

## **Abstrakt**

Tato práce se zabývá testováním základních parametrů bezkontaktního vodivostního detektoru pro kapilární elektroforézu. Snahou bylo najít oblast, kde závislost výsledného signálu na koncentraci je lineární, určit hranici citlivosti detektoru a ověřit, zda je detektor schopen poskytovat reprodukovatelné výsledky.

## **Klíčová slova**

Bezkontaktní vodivostní detektor, kapilární elektroforéza

## **Abstract**

This work deals with testing of basic parameters of a contactless conductivity detector for capillary electrophoresis. The aim was to find area where the resulting signal dependence on concentration is linear, to determine the threshold sensitivity of the detector and verify that the detector is capable of providing reproducible results.

## **Keywords**

Contactless conductivity detector, capillary electrophoresis

## Obsah

<b>1</b>	<b>Teoretický úvod</b> .....	<b>- 8 -</b>
1.1	Kapilární elektromigrační metody .....	- 8 -
1.2	Kapilární elektroforéza .....	- 9 -
1.2.1	Elektroforetická pohyblivost (mobilita) .....	- 9 -
1.2.2	Elektroosmotický tok .....	- 10 -
1.2.3	Zařízení pro CE .....	- 12 -
1.2.4	Využití kapilární elektroforézy .....	- 15 -
1.3	Vodivostní detektory .....	- 15 -
1.3.1	Kontaktní vodivostní detektor .....	- 16 -
1.3.2	Bezkontaktní vodivostní detektor .....	- 17 -
<b>2</b>	<b>Cíl práce</b> .....	<b>- 19 -</b>
<b>3</b>	<b>Experimentální část</b> .....	<b>- 20 -</b>
3.1	Použité chemikálie a přístroje .....	- 20 -
3.1.1	Příprava roztoků .....	- 20 -
3.1.2	Přístrojové vybavení .....	- 20 -
3.2	Kalibrační závislost KCl, oblast linearit CCD .....	- 21 -
3.3	Měření roztoků CsCl a CsNO <sub>3</sub> .....	- 23 -
3.3.1	Závislost ploch píků na koncentraci CsCl a CsNO <sub>3</sub> .....	- 24 -
3.3.2	Závislost výšek píků na koncentraci CsCl a CsNO <sub>3</sub> .....	- 26 -
3.4	Stanovení LOD a LOQ .....	- 27 -
3.5	Reprodukovatelnost výsledků .....	- 29 -
<b>4</b>	<b>Závěr</b> .....	<b>- 31 -</b>
<b>5</b>	<b>Použité zdroje</b> .....	<b>- 32 -</b>

## Použité zkratky

CCD	bezkontaktní vodivostní detektor
CE	kapilární elektroforéza
CZE	kapilární zónová elektroforéza
EOF	elektroosmotický tok
LIF	laserem indukovaná fluorescence
LOD	limit detekce
LOQ	limit stanovitelnosti
MEKC	micelární elektrokinetická kapilární chromatografie
PTFE	polytetrafluorethylen
TRIS	2-amino-2-hydroxymethylpropan-1,3-diol
UV	ultrafialová oblast
VIS	oblast viditelného spektra

## Použité symboly

$E$	intenzita elektrického pole
$F_e$	elektrická síla
$F_f$	třecí síla
$L$	délka kapiláry
$m$	elektroforetická pohyblivost (mobilita)
$m_{eo}$	elektroosmotická mobilita
$r$	poloměr iontu
$t_{mig}$	migrační čas
$U$	napětí
$v$	rychlost pohybu v elektrickém poli
$\zeta$	elektrokinetický potenciál
$\varepsilon$	dielektrická konstanta
$\eta$	viskozita prostředí

## Seznam obrázků

- Obr. 1 Schéma zařízení pro kapilární elektroforézu
- Obr. 2 Schéma hydrodynamického dávkování
- Obr. 3 Schéma dávkování rozdílem hladin
- Obr. 4 Schéma elektrokinetického dávkování
- Obr. 5 Schéma bezkontaktního vodivostního detektoru
- Obr. 6 Kalibrační závislost signálu CCD na koncentraci roztoků KCl
- Obr. 7 Kalibrační závislost signálu CCD na vodivosti roztoků KCl
- Obr. 8 Kalibrační závislost plochy píku na koncentraci CsCl
- Obr. 9 Kalibrační závislost plochy píku na koncentraci CsNO<sub>3</sub>
- Obr. 10 Kalibrační závislost výšky píku na koncentraci CsCl
- Obr. 11 Kalibrační závislost výšky píku na koncentraci CsNO<sub>3</sub>
- Obr. 12 Limit detekce
- Obr. 13 Limit stanovitelnosti

# 1 Teoretický úvod

## 1.1 Kapilární elektromigrační metody

Kapilární elektromigrační metody jsou moderní, stále se rozvíjející a perspektivní separační techniky. V současnosti se stále více používají jako doplněk jiných separačních metod, především chromatografických. Kapilární elektromigrační metody se označují společným názvem „vysokoúčinná kapilární elektroforéza“ (HPCE). Do metod HPCE řadíme všechny elektromigrační separační techniky, které jsou prováděné v kapilárním uspořádání.

Název kapilární elektromigrační metody vychází z principu těchto moderních separačních technik, kdy se ionty pohybují různou rychlostí v elektrickém poli, a tím dochází k jejich separaci. Při této metodě se uplatňuje celá řada výhod, mezi ně patří jednoduché přístrojové vybavení, malá spotřeba vzorku a potřebných činidel (nano- až pikolitrové objemy), velká separační účinnost, rychlá analýza, rychlá optimalizace separačních podmínek a z toho vyplývající nízké náklady na provoz. Mezi jejich hlavní nevýhody patří především malá reprodukovatelnost a nízká citlivost.

Rozdílné techniky kapilárních elektroforetických separací mohou být vykonané pomocí standardního kapilárního vybavení. Příčinou rozdílných typů separace může být fakt, že kapilární elektroforézy byly vyvinuty kombinací mnoha elektroforetických a chromatografických technik. Z tohoto důvodu můžeme kapilární elektromigrační metody rozdělit do šesti základních skupin: kapilární zónová elektroforéza, kapilární gelová elektroforéza, micelární elektrokinetická kapilární chromatografie, elektrochromatografie v naplněných kapilárách, kapilární izoelektrické fokusování a kapilární izotachoforéza. Dělení se provádí na základě přítomného média v kapiláře a dle způsobu separace.

Kapilární elektromigrační metody jsou často používaným nástrojem v dnešních moderních analytických laboratořích. Jedná se o metody univerzální, stále se zlepšuje jejich vybavení, chemikálie, vyvíjejí se. Očekává se další rozvoj separačních medií, která budou zvyšovat účinnost a selektivitu separací, miniaturizace zařízení, zlepšující se citlivost metod a možnost uplatnění v dalších aplikacích [1-3].



## 1.2 Kapilární elektroforéza

Kapilární elektroforéza (CE) je analytická technika, která dovoluje rychlou a efektivní separaci nabitých částic přítomných v malém objemu vzorku [3]. Při kapilární elektroforéze se uplatňují dva základní jevy: elektroforetická pohyblivost a elektroosmotický tok neboli elektroosmóza.

### 1.2.1 Elektroforetická pohyblivost (mobilita)

Rychlost pohybu nabitých částic v kapalném prostředí ve stejnosměrném elektrickém poli o dané intenzitě lze vyjádřit rovnicí (1):

$$v = m \cdot E \quad (m \cdot s^{-1}) \quad (1)$$

kde  $m$  je elektroforetická pohyblivost,  $E$  představuje intenzitu elektrického pole.

Intenzitu elektrického pole  $E$  vyjádříme jako podíl napětí mezi elektrodami  $U$  a celkovou délkou kapiláry  $L$ .

$$E = \frac{U}{L} \quad (V \cdot m^{-1}) \quad (2)$$

Rovnoměrný pohyb iontů v roztoku je dán působením elektrické síly  $F_e$  a třecí silou  $F_f$ , které působí proti sobě.

$$F_e = -F_f \quad (3)$$

$$F_e = q \cdot E \quad (4)$$

kde  $q$  je celkový náboj iontu. Třecí sílu lze vyjádřit pomocí Stockesova zákona.

$$F_f = -6\pi\eta r v \quad (5)$$

kde  $\eta$  je viskozita prostředí,  $r$  značí poloměr iontu.

Dosazením rovnic (4) a (5) do vztahu (3) a jeho úpravou dostaneme vztah (6):

$$m = \frac{v}{E} = \frac{q}{6\pi\eta r} \quad (6)$$

Ze vztahu (6) je vidět, že pohyblivost je přímo úměrná náboji iontu a nepřímo úměrná poloměru iontu a viskozitě prostředí.

Je známo více druhů pohyblivostí dle typu elektrolytu, v němž se ionty pohybují. Silné elektrolyty mají pohyblivost aktuální, která je závislá na iontové síle a teplotě a dále limitní pohyblivost, jež se stanovuje při nekonečném zředění roztoku. Slabé elektrolyty mají pohyblivost efektivní, která je vztažená k iontové síle, pH elektrolytu a teplotě separačního prostředí [2].

### 1.2.2 Elektroosmotický tok

Nachází-li se roztok elektrolytu v křemenné kapiláře, dochází ke specifickému uspořádání iontů na rozhraní povrchu kapiláry a příslušného roztoku elektrolytu. Podle elektrostatických zákonů systém k sobě přibližuje částice opačně nabitě. Vzniká tak elektrická dvojvrstva. Vznik elektrické dvojvrstvy je podpořen adsorpcí jednoho druhu iontů na povrchu kapiláry nebo disociací silanolových skupin, jež jsou součástí vnitřního povrchu křemenné kapiláry. V části, která směřuje do kapalně fáze (difuzní část), zůstává přebytek volného náboje, na stěně se vytváří část elektrické dvojvrstvy a v blízkosti této stěny vzniká potenciálový rozdíl. Potenciálový rozdíl mezi vnějším a vnitřním rozhraním difuzní vrstvy se označuje jako elektrokinetický potenciál, jinak také nazýván zeta potenciál. Vložíme-li do elektrického obvodu s křemennou kapilárou naplněnou elektrolytem napětí, ionty se začnou pohybovat směrem k opačně nabitě elektrodě a v důsledku vnitřního tření v kapalině je také do pohybu uveden celý objem roztoku. Tento mechanický pohyb se nazývá elektroosmotický tok (EOF). EOF unáší všechny přítomné ionty v kapiláře stejnou rychlostí směrem ke katodě. Významně ovlivňuje celkovou rychlost přítomných iontů, účinnost a dobu trvání analýzy.

Rychlost elektroosmotického toku je přímo úměrná intenzitě elektrického pole ( $E$ ) a elektroosmotické mobilitě ( $m_{eo}$ ).

$$v_{eo} = m_{eo} \cdot E \quad (m \cdot s^{-1}) \quad (7)$$

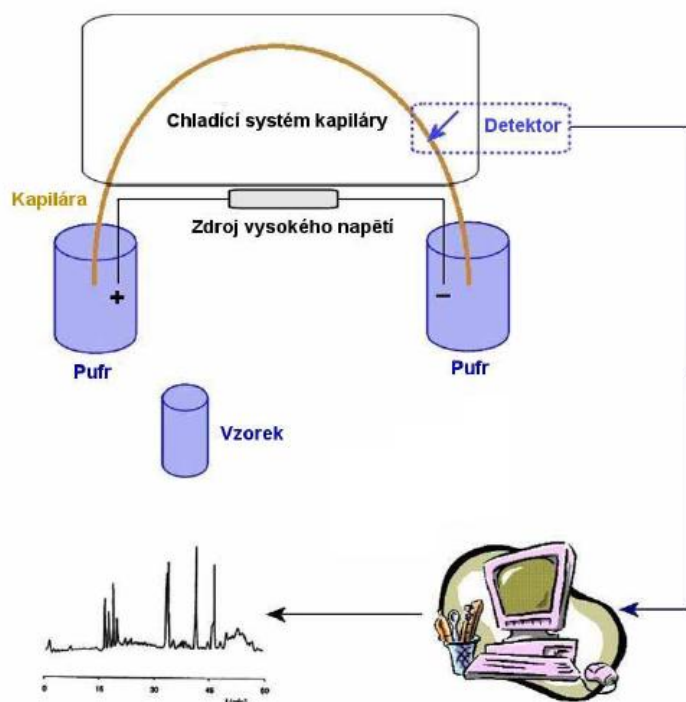
Elektroosmotickou mobilitu je možno ještě vyjádřit:

$$m_{eo} = \frac{\varepsilon \zeta}{\eta} \quad (m^2 \cdot V^{-1} \cdot s^{-1}) \quad (8)$$

kde  $\zeta$  značí elektrokinetický potenciál,  $\varepsilon$  je dielektrická konstanta roztoku a  $\eta$  je viskozita roztoku.

Elektroosmotická mobilita závisí na velikosti náboje na vnitřní stěně kapiláry. Elektroosmotický tok je tak silný, že i anionty jsou obvykle unášeny směrem ke katodě. Neutrální částice se budou pohybovat rychlostí pouze elektroosmotického toku, neboť nemají žádný náboj. Ionty kladně i záporně nabitě podléhají rychlosti pohybu elektroosmotického toku, ale zároveň k jejich pohybu bude přispívat vlastní elektroforetická rychlost. Rychlost elektroosmotického toku je ovlivněna celou řadou parametrů. Největší vliv na rychlost elektroosmotického toku má bezpodmínečně pH separačního elektrolytu a jeho koncentrace. EOF bude pomalý, jestliže k separaci použijeme kyselé tlumivé roztoky (např. fosforečnanový o pH = 2, citrátový o pH = 3 či 5 nebo octanový o pH = 5). Naopak v neutrálních a zásaditých tlumivých roztocích (např. fosforečnanový o pH = 7 či 13, TRIS o pH = 8 nebo tetraboritanový o pH = 9) je EOF vysoký. Obecně platí, že čím vyšší bude pH tlumivého elektrolytu uvnitř kapiláry, tím větší bude negativní náboj na vnitřní stěně kapiláry, a tím rychlejší elektroosmotický tok budeme pozorovat. Jak již bylo řečeno, na ovlivnění EOF má svůj podíl také koncentrace separačního elektrolytu. Vyšší koncentrace separačního elektrolytu způsobuje snížení zeta potenciálu elektrické dvojvrstvy a vede k pomalejšímu toku. Naopak rychlý tok nastane tehdy, pokud budeme pracovat s tlumivými roztoky o nižší koncentraci [1, 2].

### 1.2.3 Zařízení pro CE

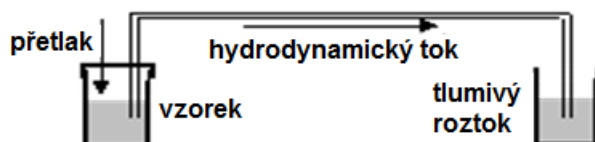


**Obrázek 1** Schéma zařízení pro kapilární elektroforézu; převzato z [4].

Zařízení pro kapilární elektroforézu se skládá z několika částí, jak naznačuje **obrázek 1**. Obsahuje zdroj stejnosměrného vysokého napětí, ke kterému jsou připojeny platinové elektrody. Anoda je ponořena do vstupní nádoby, katoda do nádoby výstupní. Obě nádoby jsou naplněny tlumivým roztokem a jsou propojeny separační kapilárou. Vnitřní průměr kapiláry se nejčastěji pohybuje v rozmezí 25 až 100  $\mu\text{m}$ . Vnější průměr má obvykle 375  $\mu\text{m}$ . Materiál kapiláry bývá nejčastěji tavený křemen nebo teflon (PTFE). Je-li kapilára z křemene, je vnější povrch kapiláry potažen vrstvou polyimidu, který zajišťuje její pružnost a odolnost vůči zlomení. Dalšími částmi zařízení jsou dávkovací systém, detektor, zařízení pro udržování konstantní teploty, počítač a zapisovač.

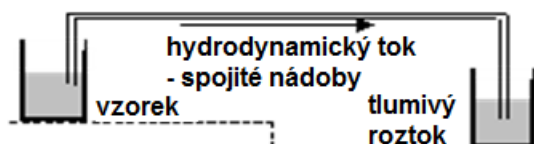
Před zahájením dávkování vzorku je nutno naplnit vstupní a výstupní nádobku vhodným elektrolytem a poté připojit separační napětí (např. 20 kV) na elektrody, které jsou ponořené v těchto nádobkách po dobu několika minut. Při vložení napětí dochází ke stabilizaci EOF, dochází k výměně iontů mezi vnitřním povrchem kapiláry a elektrolytem, čímž vnitřní povrch kapiláry dospěje do rovnováhy s daným použitým elektrolytem. Roztok vzorku v nádobce je

dávkován do konce kapiláry nacházející se u elektrody (anoda) v podobě krátké zóny. Dávkování lze provádět třemi základními způsoby. Jedním z nich je dávkování hydrodynamické, kde se využívá přívodu stlačeného vzduchu po dobu několika sekund nad hladinu vzorku poté, co se nádobka se vzorkem vzduchotěsně uzavře, čímž dojde k nadávkování vzorku do kapiláry, jak je patrné z **obrázku 2**.



**Obrázek 2** Schéma hydrodynamického dávkování; převzato z [5] a upraveno.

Druhý možný způsob využívá principu spojených nádob. Přetlaku dosáhneme zvednutím nádoby se vzorkem o potřebnou výšku vzhledem k výstupní nádobce. Přetlak tak natlačí malé množství vzorku do vstupního konce kapiláry. Jedná se o dávkování rozdílem hladin, viz **obrázek 3**.



**Obrázek 3** Schéma dávkování rozdílem hladin; převzato z [5] a upraveno.

Třetí typ dávkování, znázorněný na obrázku 4, se označuje jako dávkování elektrokinetické, kde je nutné vkládat napětí mezi elektrody. Vlivem napětí dochází k EOF, čímž dojde k nasátí vzorku. Nastává zvýšené dávkování kationtů, které se snaží migrovat svými elektroforetickými rychlostmi směrem do kapiláry a jsou tedy zvýhodněny. Naopak dochází k znevýhodnění aniontů, které se snaží migrovat opačným směrem, tedy z kapiláry do nádoby se vzorkem. Tímto vzniká odlišné složení vzorku vstupujícího do kapiláry a vzorku v nádobce. Tento způsob dávkování je jednoznačně diskriminační a umožňuje zvýhodnění pro jeden druh iontů, proto se považuje hydrodynamické dávkování za spolehlivější variantu [1].



**Obrázek 4** Schéma elektrokinetického dávkování; převzato z [5] a upraveno.

Po nadávkování vzorku a spuštění analýzy se ionty začnou pohybovat separační kapilárou směrem ke katodě, až dorazí do detektoru, kde jsou zaznamenány. Mezi nejčastěji využívané detekční systémy v kapilární elektroforéze patří absorpční fotometrický detektor, který pracuje v ultrafialové a viditelné oblasti spektra. Svazek paprsků je soustředěn přes kapiláru na monochromátor, detektor a vyhodnocovací zařízení. Vyhodnocovací zařízení pak udává závislost absorbance na vlnové délce a čase. Tento typ detekce je tedy vhodný pro analýzu látek, které jsou schopny absorbovat záření v dané oblasti spektra. Jak již bylo úvodem řečeno, kapilára je potažena na svém povrchu vrstvou polyimidu, která je špatně propustná pro daný typ záření. Tato žlutě až hnědě zbarvená vrstva se musí odstranit v místě průchodu světelného paprsku. Odstranění vrstvy se provádí spálením v plameni nebo elektrickým obloukem a následným omytím spálené vrstvy vhodným alkoholem. Na kapiláře tak dojde k vytvoření detekčního okénka. V tomto místě je kapilára průhledná a velmi křehká. Projde-li zóna analytu detekčním okénkem, absorbuje záření při zvolené vlnové délce, detektor zónu zaznamená a na záznamu analýzy, který se odborně označuje jako elektroferogram, dojde k vytvoření píku odpovídajícího absorbující zóně. Elektroferogram je tedy závislost signálu detektoru (absorbance, vodivosti, intenzity iontů) na migračním čase. Jeden z nejcitlivějších detektorů je detektor založený na laserem indukované fluorescenci (LIF) používaný pro látky vykazující fluorescenci. Kapilární elektroforéza může být také spojena s detektorem s diodovým polem nebo s hmotnostním spektrometrem, pomocí nichž můžeme získat další informace o analyzovaných látkách. Pro elektrochemicky aktivní látky používáme citlivou elektrochemickou detekci, jejíž základ tvoří ampérmetrický detektor. Poslední zmiňovaný typ detekčního systému je vodivostní, založený na rozdílné elektrické vodivosti analytů a základního elektrolytu, který je podrobně popsán v kapitole 1.3 [1, 6].

#### 1.2.4 Využití kapilární elektroforézy

Kapilární elektroforéza má širokospektrální využití v mnoha odvětvích, jednak v oborech chemických, biomedicínských a farmaceutických, ale své místo uplatňuje i v potravinářském průmyslu. V průmyslu je možné analýzu provádět přímo za pochodu výrobního procesu a mít tak stálou kontrolu nad výrobou. Možnosti využití lze nastínit rozdělením do několika základních kategorií. První skupinu představují malé ionty. Především se jedná o stanovení anorganických iontů a jiných nabitých látek s nízkou molekulovou hmotností. Ionty se nejčastěji stanovují kapilární iontovou analýzou. Metoda je kombinací kapilární elektroforézy malých iontů s nepřímou detekcí v oblasti UV a VIS spektra. Další kategorií jsou léky a přírodní produkty. Provádí se kontrola čistoty, degradace při skladování a složení pro zajištění shodnosti s referenčním standardem. Dále velkou skupinu tvoří aminokyseliny, peptidy a bílkoviny. Většina přírodních aminokyselin vykazuje malou absorpční vlnovou délku UV záření. Nejvíce citlivá metoda pro zjištění zastoupení aminokyselin je založena na derivatizaci s fluorescenčním činidlem. Důležitou roli v mnoha výzkumech a průmyslu představují sacharidy a jejich deriváty. Sacharidy vykazují nízkou absorpci UV záření, proto detekce nederivatizovaných cukrů je omezena na nanogramová množství. Hlavním problémem při elektroforetické analýze většiny sacharidů je jejich neutrální charakter. Použitím boritanového tlumivého roztoku lze cukry konvertovat na aniontové boritanové komplexy. Výhodou vzniklých komplexů je také zvýšení absorpce v UV spektru. Poměrně velkou skupinu stanovení dále představují nukleotidy, oligonukleotidy a nukleové kyseliny. Nukleotidy jsou látky negativně nabitě v celém spektru pH. Snadno se analyzují metodou CZE nebo MEKC. Oligonukleotidy a nukleové kyseliny jsou stanovitelné pomocí gelové separace v rozsahu pH 8 až 9. CE má vysoký potenciál pro analýzu komplexních vzorků jako jsou fermentační půdy, biologické kapaliny a vzorky potravin. Analýza se snadno automatizuje a krátké analytické časy dovolují analýzu v reálném čase. Příprava vzorku může být redukována na centrifugaci nebo zředování. Dále je ještě možné analyzovat chirální molekuly, herbicidy a látky se sulfonovými skupinami [3, 7].

### 1.3 Vodivostní detektory

Vodivostní detektory jsou založeny na měření elektrické vodivosti. Vodivostní detekce je metodou univerzální. Má všestranné použití díky své vysoké citlivosti, hodí se jednak pro

malé nabité organické látky, ale také pro detekci malých anorganických iontů. Ty vykazují ze všech iontů největší vodivost a zároveň mají vliv na analytický signál vodivostního detektoru. Výhodou vodivostních detektorů je přímé získání elektrického signálu. U jiných běžných detektorů se získaný signál převádí na elektrický, čímž dochází ke zkreslení výsledku, vyššímu systémovému šumu a je nutné mít k dispozici vhodné zařízení pro převedení signálu. Další nespornou výhodou vodivostních detektorů je jednoduché přístrojové vybavení. V porovnání se spektrometrickým detektorem nepotřebuje vodivostní detektor ke své činnosti zdroj UV záření, monochromátor a optické zařízení. Základ vodivostního detektoru tvoří dvě kovové elektrody, zdroj elektrického napětí a elektronický obvod. Nevýhodou je, že vysoké napětí nutné ke spuštění analýzy může rušit signál detektoru. Vodivostní detektory se vyskytují ve dvou základních uspořádáních – kontaktní a bezkontaktní [8-10].

### **1.3.1 Kontaktní vodivostní detektor**

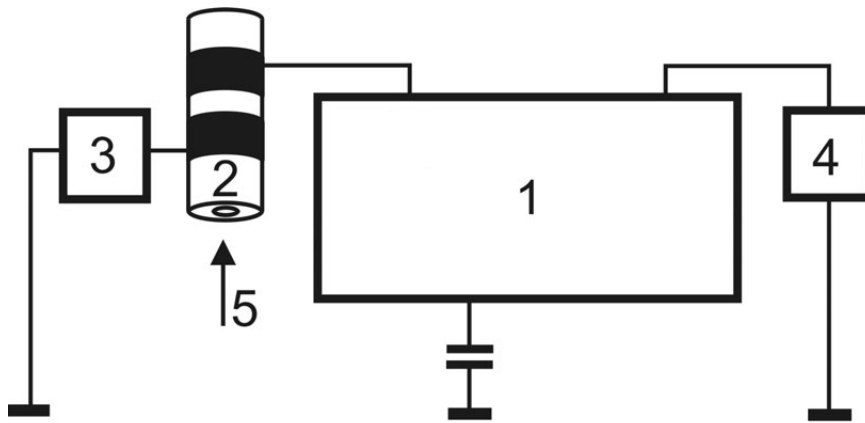
Kontaktní vodivostní detektor má elektrody v přímém kontaktu s měřeným roztokem. Důvodem, proč se tato kontaktní vodivostní technika příliš nepoužívá má své opodstatnění. Elektrody musí být menší, než je vnitřní průměr kapiláry, vzhledem k jejich zasunutí do příslušné kapiláry. Elektrody je také nutné umístit do dostatečné vzdálenosti od konce kapiláry, aby nedošlo k ovlivnění separačním napětím. Vlivem tohoto uspořádání dochází k negativním jevům. Jedním z nich je reakce vzorku s elektrodami vlivem průchodu proudu, jako je adsorpce iontů na povrchu elektrody, uvolňování iontů z elektrod, pasivace elektrod. Další nežádoucí účinek je vzájemné ovlivňování elektrického separačního pole s měřeným signálem, neboť vzdálenost elektrod od ústí kapiláry je vždy kompromisem mezi mírou vlivu separačního pole a velikostí detekční cely, která určuje rozmytí separovaných zón. Tyto jevy způsobují značné potíže a dochází tak k nízké reprodukovatelnosti získaného signálu. Uvedeným problémům je možné částečně zabránit vhodným geometrickým uspořádáním detektoru, avšak tyto detektory jsou konstrukčně složité. Úplného odstranění předchozích jevů se dosáhlo při použití bezkontaktního vodivostního detektoru [8-11].



### 1.3.2 Bezkontaktní vodivostní detektor

První práce s bezkontaktním vodivostním detektorem v elektromigračních metodách byla provedena roku 1980 Gašem a jeho spolupracovníky [12]. Koaxiální uspořádání bezkontaktní vodivostní cely bylo zavedeno roku 1998 Zemannem a jeho spolupracovníky [13]. Nejčastější aplikace jsou v kapilární a čipové elektroforéze, ale dále také v kapalinové chromatografii a průtokové injekční analýze. Vzhledem k relativně nízkým pracovním frekvencím (desítky až stovky kHz) a nenáročnosti na přístrojové vybavení je bezkontaktní vodivostní detektor možné zkonstruovat v laboratořích bez hlubších znalostí elektroniky, a proto je hojně využíván. Mezi hlavní výhody bezkontaktního uspořádání jednoznačně patří nepřímý styk elektrod s analyzovaným roztokem, závislost signálu na vodivosti a elektrické permitivitě analyzovaného roztoku.

Konstrukce, jak je patrné z **obrázku 5**, je tvořena dvěma válcovými elektrodami (šířka 2 až 50 mm), které jsou umístěny souose s kapilárou v určité vzdálenosti od sebe (0,4 až 2,5 mm) a nepřicházejí do přímého kontaktu s analyzovaným roztokem, který prochází kapilárou. Pro určení správné šířky elektrod byla definována „efektivní šířka elektrod“, jejíž hodnota je závislá na vzdálenosti elektrod, frekvenci napětí a vodivosti roztoku uvnitř kapiláry. Obecně platí, že citlivost detektoru málo závisí na geometrické šířce elektrod až do okamžiku, kdy je tato šířka menší než šířka efektivní. Elektrodou pak nemůže protékat proud odpovídající vodivosti roztoku. S rostoucí vzdáleností elektrod klesá citlivost detekce, ovšem při příliš malé vzdálenosti vzrůstá přenos signálu mezi elektrodami mimo roztok v kapiláře (vzduchem, stěnou kapiláry), což se projeví zvýšeným šumem detektoru. Elektrody bývají vyrobeny z ocelových trubiček. Aby nedocházelo ke snižování citlivosti detektoru, je vhodné zajistit co nejmenší mezeru mezi elektrodou a vnější stěnou kapiláry. Vstupní elektroda je spojena s generátorem, který vytváří střídavé napětí se sinusovým průběhem. Elektrický proud se dostává z elektrody přes kapilární stěnu do roztoku. Velikost proudu pronikajícího do roztoku je ovlivňována vodivostí roztoku. Vodivost závisí na složení roztoku. Když doputuje vzorek k elektrodě, změní se vodivost roztoku mezi elektrodami. Poté proud z roztoku proniká do snímací elektrody, která je spojena se záznamovým zařízením [8-10].



**Obrázek 5** Schéma bezkontaktního vodivostního detektoru; převzato z [10].

1- Elektronický obvod, 2- detekční cela, 3- generátor sinusového napětí, 4- záznamové zařízení, 5- vstup zkoumaného roztoku.

Parametry bezkontaktního vodivostního detektoru lze ovlivňovat kromě konstrukčního uspořádání i velikostí vstupního napětí a jeho frekvencí. Změna elektrických vlastností detektoru je snazší, a proto se využívá častěji pro ovlivnění jeho parametrů. Parametry detektoru jsou vždy závislé na konkrétní aplikaci a musí se odladit při provádění dané analýzy [8, 9].

## 2 Cíl práce

Úkolem této bakalářské práce bylo otestovat bezkontaktní vodivostní detektor (CCD) pro kapilární elektroforézu s cílem získat informace o citlivosti, limitu detekce (LOD), limitu stanovitelnosti (LOQ) a reprodukovatelnosti s následným statistickým zpracováním výsledků. Měření se prováděla s roztoky obsahujícími ionty cesia. Zároveň se sledovala kalibrační závislost chloridu draselného.

## 3 Experimentální část

### 3.1 Použité chemikálie a přístroje

#### 3.1.1 Příprava roztoků

*Roztok chloridu cesného (CsCl) o koncentraci  $1 \cdot 10^{-3}$  mol/l* byl připraven navážením 8 mg CsCl (čistý, Lachema, Brno, ČR) na analytických vahách s následným rozpuštěním v destilované vodě na celkový objem 50 ml v odměrné baňce.

*Roztok dusičnanu cesného (CsNO<sub>3</sub>) o koncentraci  $1 \cdot 10^{-3}$  mol/l* byl připraven navážením 9,7 mg CsNO<sub>3</sub> (čistý, > 99 %, Fluka, Buchs, Švýcarsko) na analytických vahách s následným rozpuštěním v destilované vodě na celkový objem 50 ml v odměrné baňce.

*Pufř skládající se z 20mM kyseliny octové (čistý, Lachema, Brno, ČR) a 10mM hydroxidu litného (minimálně 99 %, Sigma, St. Louis, MO, USA)* byl připraven odvážením 0,04196 g LiOH a k tomu přidáno 0,113 ml CH<sub>3</sub>COOH o hustotě 1,060 g/ml a doplněno destilovanou vodou do 100 ml odměrné baňky.

*Roztoky chloridu draselného (KCl)* byly k dispozici v potřebných koncentracích v laboratoři.

#### 3.1.2 Přístrojové vybavení

- Zařízení pro kapilární elektroforézu <sup>3D</sup>CE model 7100 (Agilent Technologies, Waldbronn, SRN)

Součástí přístroje je UV detektor s diodovým polem a CCD. Vzdálenost mezi detektory je 6,5 cm. Měření je možné provádět oběma detektory současně.

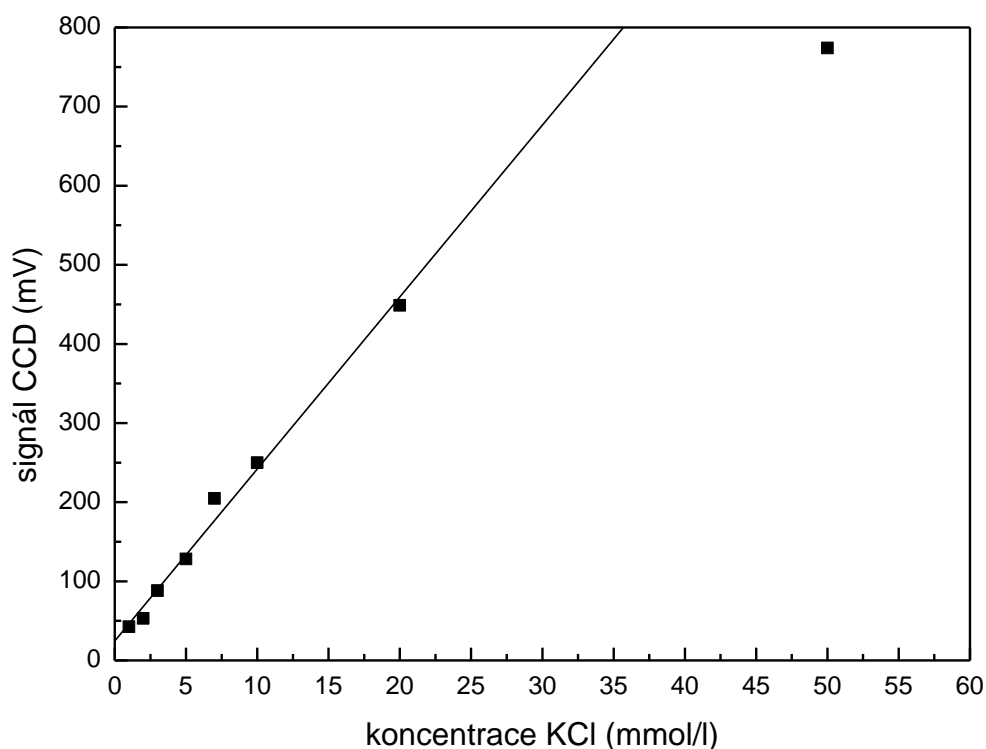
- Separální křemenná kapilára (vnitřní průměr 75 μm, vnější průměr 375 μm, celková délka 80 cm, efektivní délka 65 cm; Caco, Bratislava, Slovenská republika)
- Bezkontaktní vodivostní detektor (Admet, Praha, Česká republika)

Dvě kovové válcové elektrody o délce 4 mm jsou umístěné kolem kapiláry za sebou s izolační mezerou 1 mm, takže celková délka sondy činí 9 mm. Vnitřní průměr elektrod je 400 μm. Elektrody jsou napojeny na zdroj vysokofrekvenčního napětí o frekvenci 1,8432 MHz a s amplitudou 44 V<sub>eff</sub>. Elektronické zařízení vyhodnocuje vysokofrekvenční proud v obvodu, který závisí na odporu roztoku elektrolytu

přítomného v mezeře mezi elektrodami. Mezi elektrodami je umístěn kovový disk, který je uzemněn a zabraňuje přímé kapacitní vazbě mezi elektrodami. Detektor je společně s elektronickým zařízením uspořádán do kazety, která se vkládá do přístroje pro CE. Výstupní signál je analyzován prostřednictvím počítačového softwaru Chemstation.

### 3.2 Kalibrační závislost KCl, oblast linearity CCD

Pomocí roztoků KCl se zjišťovala kalibrační závislost a následně oblast linearity CCD. Důvod použití tohoto roztoku spočívá v jeho mnoha výhodách. Jedná se o primární standard, který je dobře definovatelný a zároveň draselné a chloridové ionty mají stejnou pohyblivost, proto se dává přednost jeho využití před chloridem sodným (NaCl), který se nepoužívá z důvodů menší pohyblivosti sodných iontů proti draselným. Roztoky KCl mění dobře vodivost se změnou koncentrace a jsou stále v čase. Kalibrační roztoky KCl byly v laboratoři k dispozici v koncentracích 1, 2, 3, 5, 7, 10, 20, 50 mM.



**Obrázek 6** Kalibrační závislost signálu CCD na koncentraci roztoku KCl. Separační kapilára, 75  $\mu$ m x 80 cm / 65 cm, doba měření 2 min.

Na **obrázku 6** je znázorněna kalibrační závislost signálu CCD na koncentraci KCl. Tuto závislost popisuje rovnice přímky ve tvaru:

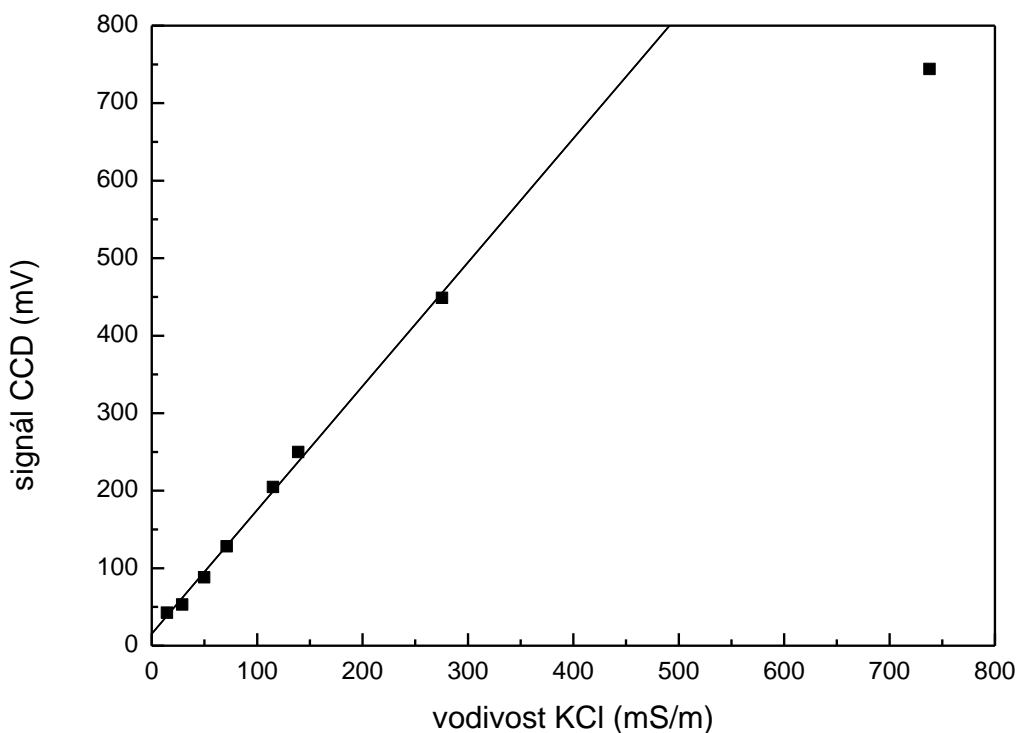
$$\text{signál (y)} = (24,663 \pm 8,918) + (21,730 \pm 0,973) \cdot \text{koncentrace (x)},$$

kteřá odpovídá proloženému úseku, kde je závislost signálu CCD na koncentraci KCl lineární. Korelační koeficient  $r$  nabývá hodnoty 0,995. Lineární oblast této závislosti se nachází v rozsahu koncentrací KCl od 0 do 20 mmol/l. Hodnota koncentrace 50 mmol/l neleží v lineární části, naměřený signál pro tuto koncentraci nejevil známky linearitu. Z grafu je tedy patrné, že oblast, ve které signál CCD vykazuje linearitu, by se měl pohybovat v rozsahu 0 až 450 mV, což odpovídá koncentracím KCl v rozsahu 0 až 20 mmol/l.

Úvodem této kapitoly byla již také zmíněna změna vodivosti s měnící se koncentrací. U příslušných roztoků KCl o dané koncentraci byla konduktometricky změřena jejich vodivost v laboratoři. Hodnoty vodivostí se nacházejí v **tabulce 1**. Následně byl ze získaných údajů sestrojen graf závislosti signálu CCD na naměřených vodivostech KCl, který je znázorněn na **obrázku 7**.

**Tabulka 1** Naměřené hodnoty vodivostí roztoků KCl pro různé koncentrace.

KCl [mmol/l]	vodivost [mS/m]
1	14,50
2	28,89
3	49,70
5	71,10
7	115,10
10	139,10
20	275,40
50	738,00



**Obrázek 7** Kalibrační závislost signálu CCD na vodivosti roztoků KCl.

Rovnice přímky pro tuto závislost má tvar:

$$\text{signál (y)} = (15,356 \pm 4,972) + (1,597 \pm 0,038) \cdot \text{vodivost (x)}.$$

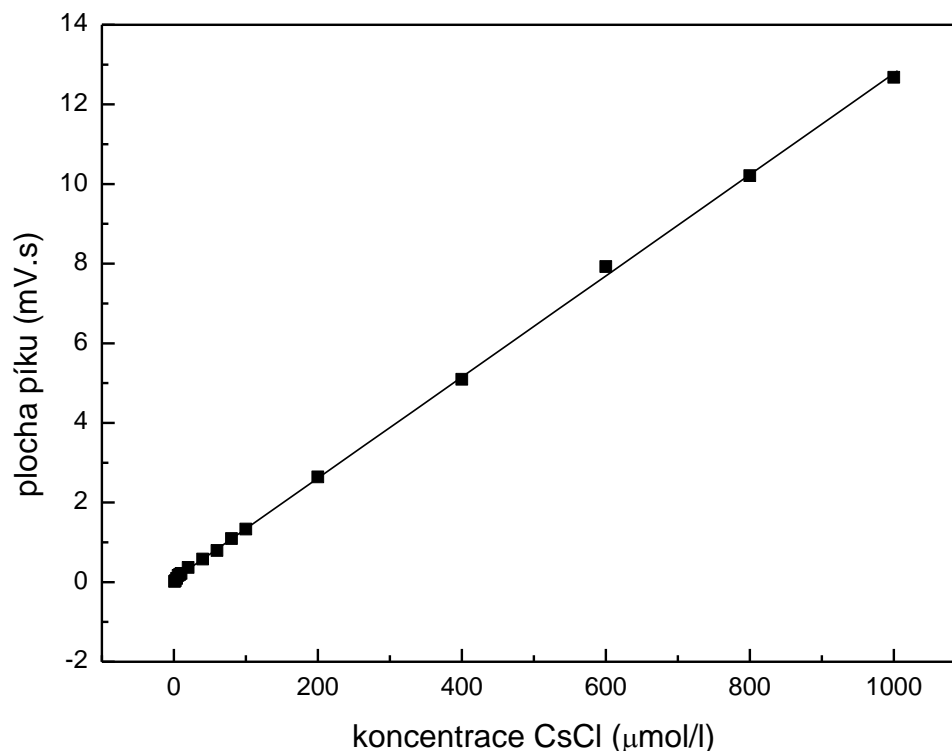
Opět byla proložena pouze v lineární části, tedy bez posledního bodu naměřené vodivosti odpovídající hodnotě 738 mS/m. Korelační koeficient  $r$  je 0,999, tedy hodnota blízká se jedné. V grafu je vidět podobná lineární závislost jako na **obrázku 6**. I zde se ověřovala linearita detektoru, tedy v jakém rozsahu vodivostí je možno pracovat v dalším měření. Oblast, kdy signál CCD vykazuje linearitu, odpovídá rozsahu přibližně od 0 do 450 mV, což odpovídá naměřeným vodivostem v rozsahu 0 až 280 mS/m.

### 3.3 Měření roztoků CsCl a CsNO<sub>3</sub>

Ze základního roztoku CsCl o koncentraci  $1 \cdot 10^{-3}$  mol/l byla vytvořena řada koncentrací jeho naředěním ( $1 \cdot 10^{-6}$ ,  $2 \cdot 10^{-6}$ ,  $4 \cdot 10^{-6}$ ,  $6 \cdot 10^{-6}$ ,  $8 \cdot 10^{-6}$ ,  $1 \cdot 10^{-5}$ ,  $2 \cdot 10^{-5}$ ,  $4 \cdot 10^{-5}$ ,  $6 \cdot 10^{-5}$ ,  $8 \cdot 10^{-5}$ ,  $1 \cdot 10^{-4}$ ,  $2 \cdot 10^{-4}$ ,  $4 \cdot 10^{-4}$ ,  $6 \cdot 10^{-4}$ ,  $8 \cdot 10^{-4}$ ,  $1 \cdot 10^{-3}$  mol/l). Doba měření každého naředěného vzorku o dané koncentraci trvala 8 minut. Z výsledného záznamu byl nalezen pík odpovídající cesným iontům. Pomocí aplikace, jež byla součástí záznamového zařízení, byly určeny plocha a výška

píku. Následně byly z těchto údajů vytvořeny grafy závislosti plochy a výšky píku na koncentraci. Stejný postup byl aplikován za použití základního roztoku CsNO<sub>3</sub>.

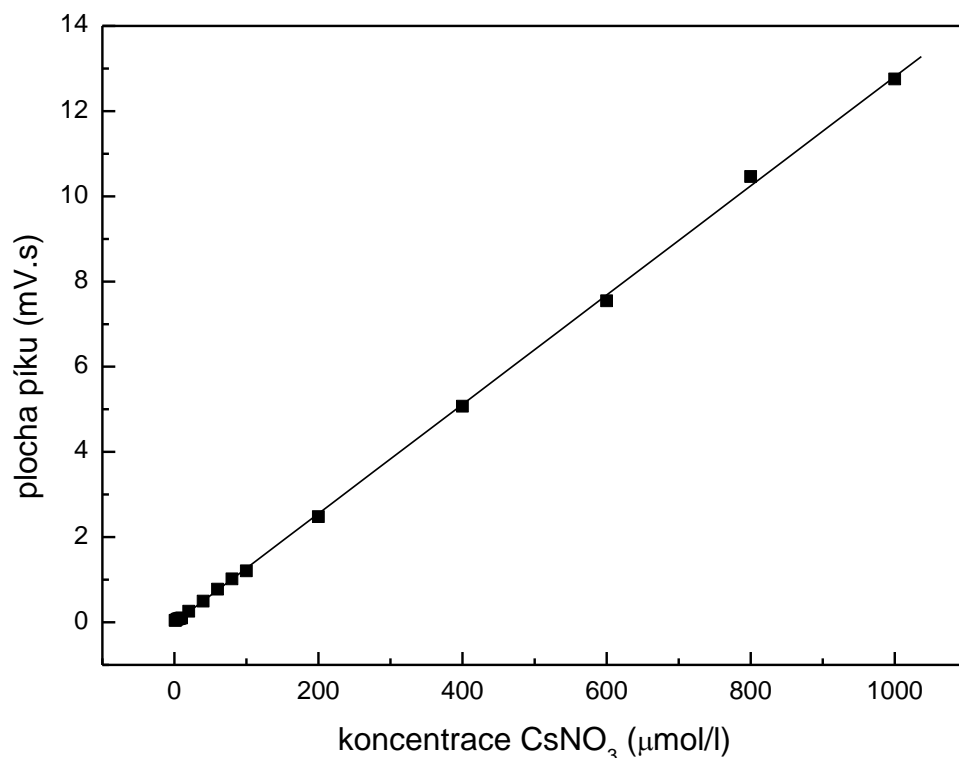
### 3.3.1 Závislost ploch píku na koncentraci CsCl a CsNO<sub>3</sub>



**Obrázek 8** Kalibrační závislost plochy píku na koncentraci CsCl pro bezkontaktní vodivostní detektor. Separáční kapilára, 75 μm x 80 cm / 65 cm; separační pufr, 20 mM CH<sub>3</sub>COOH + 10 mM LiOH; dávkování, 125 mbar.s.

**Obrázek 8** zobrazuje závislost plochy píku na koncentraci chloridu cesného. Kalibrační závislost plochy píku na koncentraci roztoků CsCl je prolovena p mkou. Parametry rovnice p mky této závislosti jsou uvedeny v **tabulce 2**. Linearita této závislosti je patrn  právě z hodnoty korelačního koeficientu, kter  se bl u  k 1,000. Závislost plochy píku na koncentraci roztoků CsCl je tedy line rn  v celém rozsahu, což p bliu n  odpovídá hodnot m koncentrace od 0 do 1000 μmol/l.





**Obrázek 9** Kalibrační závislost plochy píku na koncentraci CsNO<sub>3</sub> pro bezkontaktní vodivostní detektor. Separační kapilára, 75 μm x 80 cm / 65 cm; separační pufr, 20 mM CH<sub>3</sub>COOH + 10 mM LiOH; dávkování, 125 mbar.s.

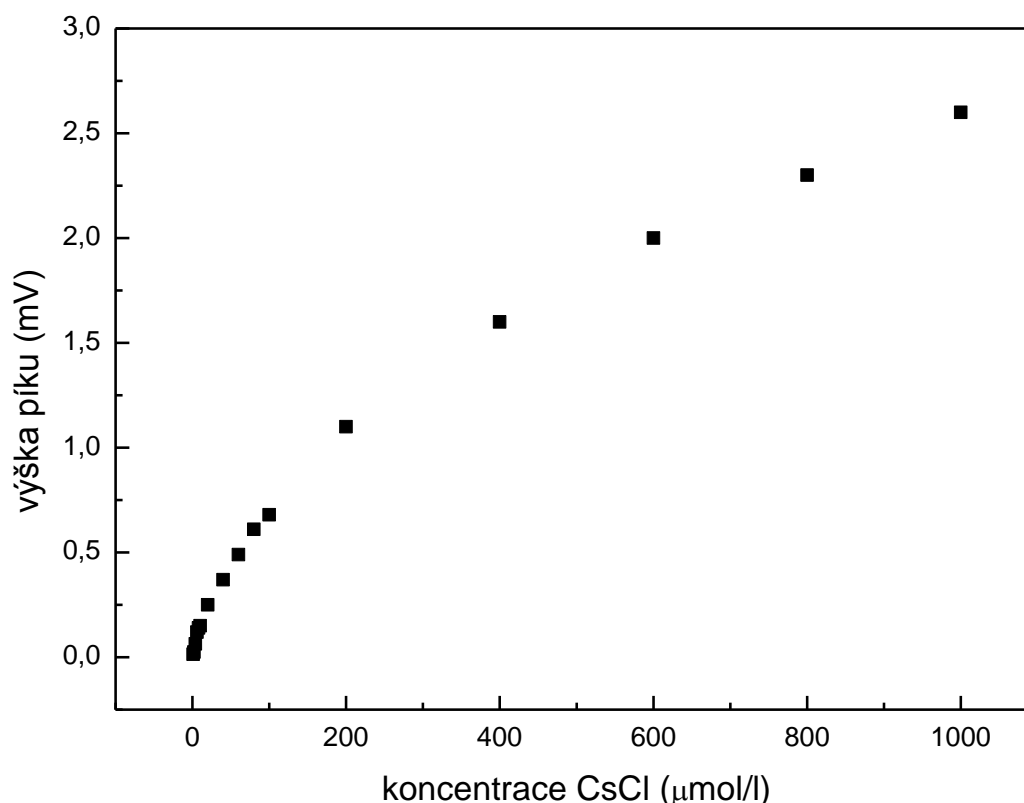
**Obrázek 9** zobrazuje závislost plochy píku na koncentraci dusičnanu cesného. Kalibrační závislost plochy píku na koncentraci roztoků CsNO<sub>3</sub> je také proložena přímkou. Parametry rovnice přímky této závislosti jsou uvedeny v **tabulce 2**. Hodnota korelačního koeficientu  $r$  se i u této závislosti blíží hodnotě 1,000, proto je tato závislost lineární v celém rozsahu, což odpovídá koncentracím CsNO<sub>3</sub> od 0 do 1000 μmol/l.

**Tabulka 2** Parametry kalibračních závislostí (plocha píku vs. koncentrace) se směrodatnými odchylkami SD. Směrnice,  $b$ ; úsek,  $a$ ; korelační koeficient,  $r$ ; lineární dynamický rozsah.

Analyt	$b$ (SD) [mV.s.l / μmol]	$a$ (SD) [mV.s]	$r$	linární dynamický rozsah [mol/l]
CsCl	0,013 (6,202e-5)	0,069 (0,023)	0,9998	$1 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-3}$
CsNO <sub>3</sub>	0,013 (6,254e-5)	-0,012 (0,023)	0,9998	$1 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-3}$

V **tabulce 2** jsou vypsané jednotlivé parametry z rovnice přímky pro analyty CsCl a CsNO<sub>3</sub>, jejich korelační koeficient a rozsah koncentrací, které byly měřeny kapilární elektroforézou s CCD. Oba analyty dosáhly při měření stejné lineární oblasti v rozmezí 0 až 1000 μmol/l, což je dáno hodnotou korelačního koeficientu, který v obou případech nabývá stejné hodnoty. Směrnice jsou také totožné a úseky jednotlivých analytů se od sebe nepatrně liší, ale jsou statisticky významné od nuly, jak bylo ověřeno testem.

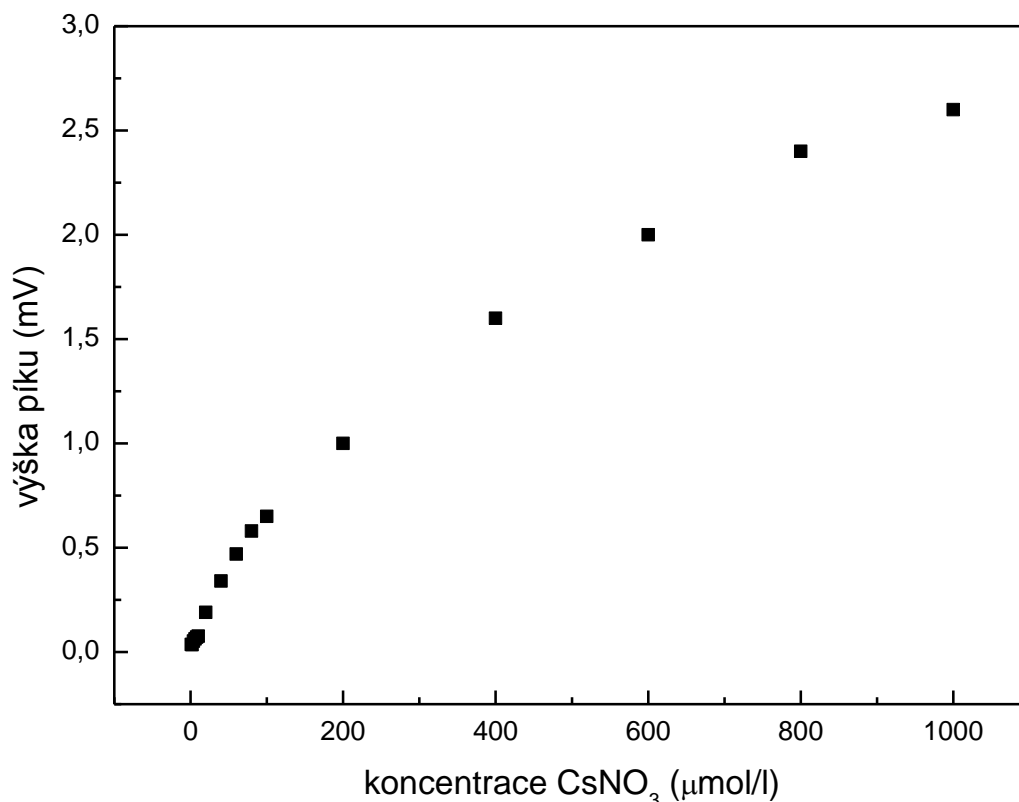
### 3.3.2 Závislost výšek píků na koncentraci CsCl a CsNO<sub>3</sub>



**Obrázek 10** Kalibrační závislost výšky píku na koncentraci CsCl pro bezkontaktní vodivostní detektor. Separační kapilára, 75 μm x 80 cm / 65 cm; separační pufr, 20 mM CH<sub>3</sub>COOH + 10 mM LiOH; dávkování, 125 mbar.s.

Kalibrační závislost výšky píku na koncentracích CsCl zobrazená na **obrázku 10** není lineární v celém rozsahu koncentrací. Lineární část této závislosti přibližně odpovídá hodnotám 4 počátečních bodů, tedy koncentracím  $1 \cdot 10^{-3}$ ,  $4 \cdot 10^{-4}$ ,  $6 \cdot 10^{-4}$ ,  $8 \cdot 10^{-4}$  μmol/l. Je to

dáno tím, že pík se rozšiřuje a při vysokých koncentracích je více rozmytý než při nízkých koncentracích, z toho tedy vyplývá, že výška píku v závislosti na koncentraci lineární není. Stejnou závislost lze pozorovat za použití analytu CsNO<sub>3</sub>, jak demonstruje **obrázek 11**.



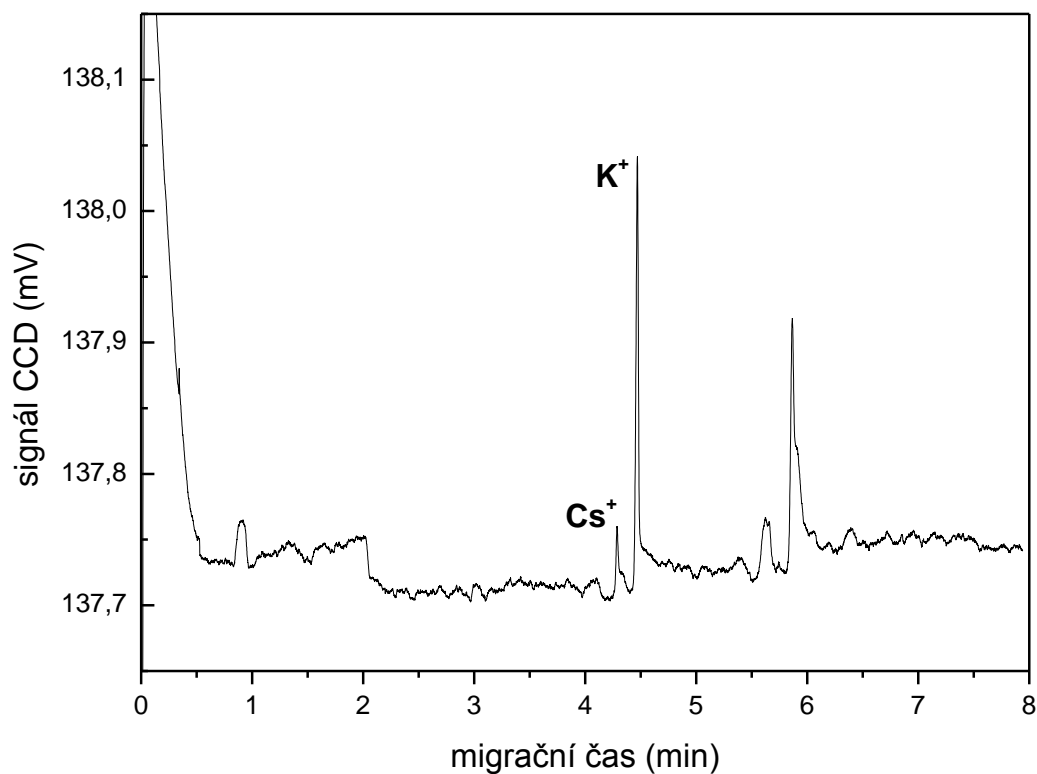
**Obrázek 11** Kalibrační závislost výšky píku na koncentraci CsNO<sub>3</sub> pro bezkontaktní vodivostní detektor. Separační kapilára, 75 μm x 80 cm / 65 cm; separační pufr, 20 mM CH<sub>3</sub>COOH + 10 mM LiOH; dávkování, 125 mbar.s.

### 3.4 Stanovení LOD a LOQ

Další částí bakalářské práce bylo určit limit detekce (LOD) a limit stanovitelnosti (LOQ), tedy zjistit citlivost detektoru. LOD odpovídá nejnižší koncentraci, kdy je ještě schopný detektor tuto koncentraci zaznamenat a vyhodnotit ji ve tvaru píku. LOQ udává nejnižší koncentraci, při které je možno provést kvantitativní vyhodnocení výsledků s danou přesností [14].

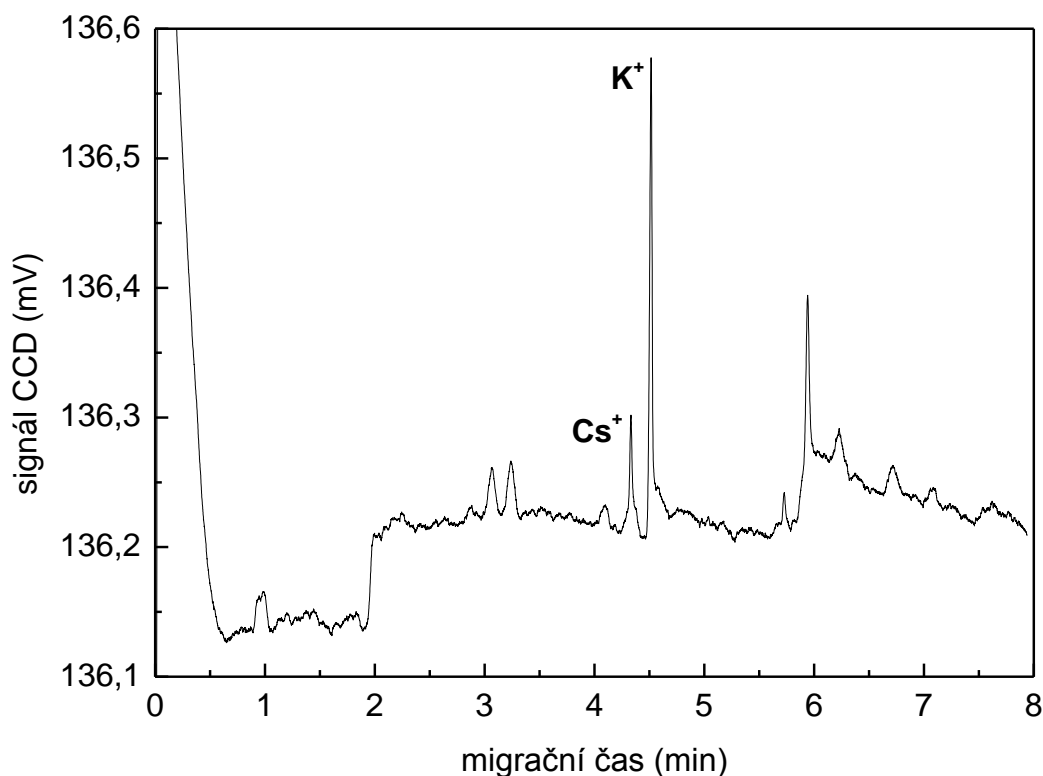
Oba limity byly počítány jako odstup signálu od šumu (S/N). Šum se vypočítal jako rozdíl hodnoty horní výchylky od dolní v jakékoliv části šumu. Signál se počítal jako rozdíl hodnoty vrcholu píku cesného iontu od hodnoty při základně. Následně se z obou hodnot vyjádřil podíl

signálu a šumu. Výsledná hodnota podílu 10 znamená nalezení LOQ a hodnota 3 nalezení LOD.



**Obrázek 12** Limit detekce CsCl o koncentraci  $1 \cdot 10^{-6}$  mol/l pro bezkontaktní vodivostní detektor. Separační kapilára, 75  $\mu\text{m}$  x 80 cm / 65 cm; separační pufr, 20 mM  $\text{CH}_3\text{COOH}$  + 10 mM LiOH; dávkování, 125 mbar·s.

Z chromatogramu na **obrázku 12** je možné vyčíst, že výška píku je 3x větší než šum a byl tedy nalezen limit detekce pro CsCl, což odpovídá koncentraci  $1 \cdot 10^{-6}$  mol/l. Šum byl  $9,5 \cdot 10^{-3}$  mV, signál má hodnotu 0,03 mV. Odstup signálu od šumu (S/N) se tedy rovná hodnotě 3,16.



**Obrázek 13** Limit stanovitelnosti CsCl o koncentraci  $5 \cdot 10^{-6}$  mol/l pro bezkontaktní vodivostní detektor. Separační kapilára, 75  $\mu\text{m}$  x 80 cm / 65 cm; separační pufr, 20 mM  $\text{CH}_3\text{COOH}$  + 10 mM LiOH; dávkování, 125 mbar·s.

Z **obrázku 13** je možné vyčíst, že výška píku je 10x větší než šum a byl tedy nalezen limit stanovitelnosti pro CsCl, což odpovídá koncentraci  $5 \cdot 10^{-6}$  mol/l. Šum byl  $6 \cdot 10^{-3}$  mV, signál má hodnotu 0,06 mV. Odstup signálu od šumu (S/N) se rovná hodnotě 10,0.

### 3.5 Reprodukovatelnost výsledků

Pro analýzy reprodukovatelnosti výsledků byla použita koncentrace  $5 \cdot 10^{-6}$  a  $5 \cdot 10^{-5}$  mol/l CsCl a  $\text{CsNO}_3$ . Měření se opakovalo desetkrát pro každou látku i koncentraci. Následně byla provedena statistická analýza ploch píků, výšek píků a migračních časů. Výpočet byl proveden přes rozpětí, z toho se následně určila směrodatná odchylka jako součin rozpětí a konstanty, a pak byla vypočtena relativní směrodatná odchylka jako podíl směrodatné odchylky a mediánu.

**Tabulka 5** Relativní směrodatné odchyly naměřených ploch a výšek píků a migračních časů při různých koncentracích CsCl a CsNO<sub>3</sub>.

Analyt	Koncentrace [mol/l]	Relativní směrodatná odchylyka [%]		
		plocha	výška	t <sub>mig</sub>
CsCl	5·10 <sup>-6</sup>	28,4	19,7	1,1
CsCl	5·10 <sup>-5</sup>	3,1	2,1	1,1
CsNO <sub>3</sub>	5·10 <sup>-6</sup>	33,7	32,4	0,5
CsNO <sub>3</sub>	5·10 <sup>-5</sup>	4,4	4,1	0,9

Z **tabulky 5** je možné vidět, že při koncentraci 5·10<sup>-5</sup> mol/l je reprodukovatelnost výsledků velmi dobrá a relativní směrodatné odchyly se pohybují v řádech jednotek %. Při koncentraci 5·10<sup>-6</sup> mol/l se reprodukovatelnost výrazně zhoršuje (relativní směrodatná odchylyka v řádech desítek %), protože se pohybujeme na limitu stanovitelnosti daného analytu pro CCD detektor. Relativní směrodatná odchylyka migračních časů se pohybuje kolem 1% a příliš se nemění se změnou koncentrace, což naznačuje, že ionty dané látky mají konstantní elektroforetickou pohyblivost při jakékoli koncentraci. CsCl poskytuje přesnější výsledky než CsNO<sub>3</sub>.

## 4 Závěr

Testování bezkontaktního vodivostního detektoru přineslo několik zajímavých poznatků. Mezi tyto poznatky patří zjištění citlivosti a linearity detektoru a ověření reprodukovatelnosti výsledků. Nejdříve bylo provedeno měření kalibrační závislosti KCl v různých koncentracích a zjištěna lineární oblast testovaného CCD. Z provedeného měření se došlo k závěru, že lineární oblast detektoru leží v rozmezí koncentrací 1 až 20 mmol/l KCl (naměřené vodivosti pro tyto koncentrace jsou v rozpětí od 14 do 276 mS/m), což odpovídá signálu CCD detektoru v rozsahu 0 až 450 mV. V těchto rozmezích je CCD schopný pracovat a poskytovat reprodukovatelné výsledky v dalších měřeních. Dále byly prováděny analýzy s roztoky obsahujícími cesné ionty, konkrétně s roztoky CsCl a CsNO<sub>3</sub> v různě naředěných koncentracích. Z výsledných grafů (závislosti plochy a výšky píku na koncentracích) bylo zjištěno, že lineárně závislá je pouze plocha píku na koncentraci. Stejného závěru se dosáhlo při analýze obou roztoků. Dalším bodem testování CCD bylo najít jeho citlivost. Limit detekce a stanovitelnosti byly sledovány pouze u roztoku CsCl. Koncentrace CsCl, kdy byl CCD ještě schopen zaznamenat cesné ionty a zobrazit je jako pík o výšce dané definicí, byla  $1 \cdot 10^{-6}$  mol/l. LOQ byl zjištěn při koncentraci  $5 \cdot 10^{-6}$  mol/l. Reprodukovatelnost výsledků se výrazně zhoršuje s klesající koncentrací, což se očekávalo.

## 5 Použité zdroje

- [1] Štulík K. a kolektiv, Analytické separační metody, nakladatelství Karolinum, Praha 2004.
- [2] Kašička V., Teoretické základy a separační principy kapilárních elektro-migračních metod, Chemické listy 91 (1997) , 320-329.
- [3] Li S. F. Y., Capillary electrophoresis: principles, practise and applications, Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam 1992.
- [4] <http://analyt.wz.cz/capillary/capillary1.pdf> [30.4. 2011, 11:04].
- [5] <http://klouda.webpark.cz/mam.htm> [30.4. 2011, 14:15].
- [6] <http://www.pragolab.eu/clanek/129/kapilarni-elektroforeza-2-cast-instrumentace> [1.5. 2011, 09:55].
- [7] Kuhn R., Hoffstetter-Kuhn S., Capillary electrophoresis: Principles and Practice, Springer-Verlag, Berlin 1993.
- [8] Tůma Petr, Bezkontaktní vodivostní detektor pro kapilární elektroforézu, Disertační práce, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze, Praha 2003.
- [9] Novotný Martin, Detektory pro kapilární elektroforézu, Disertační práce, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze, Praha 2005.
- [10] Opekar F., Využití integrovaného obvodu pro středovlnné radiové přijímače v bezkontaktním vodivostním detektoru pro detekci látek v roztoku, Chemické listy, 103 (2009), 839-842.
- [11] Šolínová V., Jelínek I., Opekar F., Kašička V., Stanovení vybraných kationtů v minerálních vodách a infuzním roztoku prokainu kapilární elektroforézou s bezkontaktní vodivostní detekcí, Chemické listy 98 (2004), 191-196.
- [12] Gaš B., Demjanenko M., Vacík J., J. Chromatogr. 192 (1980), 253-257.
- [13] Zemann A. J., Schnell E., Volgger D., Bonn G. K., Anal. Chem, 70 (1998), 563-567.



- [14] [http://www.hplc.cz/Tip/lod\\_loq.htm](http://www.hplc.cz/Tip/lod_loq.htm) [22.5. 2011, 11:50].
- [15] Hamplová A., Coufal P., Bosáková Z., Opekar F., Kubíček V., HPLC separace polykarboxylátových derivátů cyklenu s využitím bezkontaktní vodivostní detekce, *Chemické listy* 102 (2008), 194-199.
- [16] Míka J., Opekar F., Coufal P., Štulík K., A thin-layer contactless conductivity cell for detection in flowing liquids, *Analytica Chimica Acta* 650 (2009), 189-194.
- [17] Coufal P., Zuska J., van de Goor T., Smith V., Gaš B., Separation of twenty underivatized essential amino acids by capillary zone electrophoresis with contactless conductivity detection, *Electrophoresis* 24 (2003), 671-677.
- [18] Gaš B., Zuska J., Coufal P., van de Goor T., Optimization of the high-frequency contactless conductivity detektor for capillary electrophoresis, *Electrophoresis* 23 (2002), 3520-3527.