

Univerzita Karlova v Praze  
Přírodovědecká fakulta

Katedra fyzikální a makromolekulární chemie



DISERTAČNÍ PRÁCE

**Softwarové prostředky pro optimalizaci základních  
elektrolytů v elektroforéze**

**Vlastimil Hruška**

Praha 2008

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem tuto disertační práci ani její podstatnou část nepoužil k získání jiného nebo stejného akademického titulu. Dále, že jsem ji vypracoval samostatně, pod vedením školitele Prof. RNDr. Bohuslava Gaše, CSc.

V Praze dne.....

.....

podpis

Klíčová slova

Kapilární zónová elektroforéza

lineární model elektromigrace

softwarová implementace modelů elektromigrace

rovnice kontinuity

systemový přík

PeakMaster 5

Simul 5

# OBSAH

<b>1. PŘEDMLUVA .....</b>	<b>5</b>
<b>2. LINEARIZACE ELEKTROFORETICKÉHO PROBLÉMU.....</b>	<b>6</b>
<b>3. SOFTWARE PRO ELEKTROFORETICKÉ VÝPOČTY A SIMULACE.....</b>	<b>10</b>
3.1. PROGRAM PEAKMASTER 5 .....	10
3.2. PROGRAM SIMUL 5 .....	12
3.3. NOVÉ VLASTNOSTI VÝVOJOVÉ VERZE PROGRAMU SIMUL 5 .....	13
<b>4. SYSTÉMOVÉ PÍKY: PREDIKCE A EXPERIMENT .....</b>	<b>15</b>
<b>5. ZÁVĚR.....</b>	<b>20</b>
<b>6. LITERATURA.....</b>	<b>21</b>
<b>7. SEZNAM PUBLIKACÍ AUTORA.....</b>	<b>23</b>
<b>8. PŘÍLOHA: PUBLIKACE.....</b>	<b>24</b>

## 1. Předmluva

Tato disertační práce je založena na souboru 10 článků publikovaných v recenzovaných časopisech, ve kterých jsem spoluautor nebo hlavní autor. V doprovodném komentáři k těmto článkům je krátce rozebrána jejich náplň a je přidáno několik ilustrativních příkladů z publikovaných prací nebo doprovodné informace a obrázky. Tyto články jsou očíslovány římskými číslovkami I až X a jsou seřazeny chronologicky od nejstarší práce po nejnovější.

Témata obsažená v této disertační práci byla vypracována na Katedře fyzikální a makromolekulární chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze.

Rád bych poděkoval svému školiteli Prof. RNDr. Bohuslavu Gašovi, CSc. a také všem mým kolegům za jejich cenné rady a vytvoření příjemného pracovního prostředí.

## 2. Linearizace elektroforetického problému

Elektroforéza je separační metoda založená na pohybu nabitých látek v roztoku v elektrickém poli. Podle daného experimentálního uspořádání a vlastností některých složek systému můžeme elektroforézu rozdělit do několika typických módů. Základním módem je kapilární zónová elektroforéza (CZE), jejíž jednoduché experimentální uspořádání je vhodným výchozím bodem pro teoretický popis elektroforetického procesu. Separační prostředí (kapilára nebo čip) je vyplněno základním elektrolytem neboli separačním pufrem (BGE), do kterého se vpraví vzorek se separovanými látkami (analyty). Po aplikaci elektrického pole s typickou intenzitou desítek kV/m se analyty začnou dělit na základě rozdílné elektroforetické rychlosti (mobility). Na konci separačního prostoru jsou detekovány a výsledkem separace je grafický záznam, elektroferogram (také elektroforeogram). Řada teoretických poznatků ze zónové elektroforézy může být přenesena i do ostatních módů, jakými jsou například izotachoforéza (ITP), gelová elektroforéza, micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC), elektrochromatografie v naplněných kapilárách (CEC) a izoelektrická fokusace (IEF).

Rozsáhlý přehled znalosti v teorii elektromigrace do počátku devadesátých let je uveden v knize „*The Dynamics of Electrophoresis*“ [1]. Je tam čerpáno z prací Biera, Moshera a Thormanna, kteří se významně podíleli na numerických implementacích elektroforetických systémů. Poppe ve svých člancích uvádí ucelený model elektromigrace a zabývá se jevem systémových píků [2, 3] a tvaru píku analytu v předávkovaných systémech [4]. Beckers, Boček a Gebauer a se v mnoha svých pracích zabývají mimo jiné složením zón analytů, symetrií píků analytů a systémovými píky [5, 6, 7].

Naše laboratoř se v teorii elektromigrace začala angažovat už v sedmdesátých a osmdesátých letech, kdy byla elektromigrace modelována na hybridních počítačích v pracích Gaše a Fidlera [8, 9]. Matematický model popisoval elektromigrační a difúzní pohyb a byl aplikován na izotachoforézu. Později jsme analyzovali elektromigraci ovlivněnou teplotními efekty [10]. Vyvinuli jsme první počítačový program, který byl schopen simulovat elektroforetické separace na osobních počítačích a podali jsme vysvětlení několika rušivých jevů doprovázejících elektromigraci [11]. Později jsme program rozšířili pro modelování migrace slabých jednosytných elektrolytů v kyselé nebo zásadité oblasti pH [12]. Na základě prací Poppeho [2, 4] jsme formulovali lineární model elektromigrace pro silné [13], slabé jednosytné elektrolyty [14] a později pro vícesytné elektrolyty a obecné amfolyty [1].

Základní děje, které určují chování elektroforetického systému ve vodném prostředí, jsou:

- **autoprotolýza vody** popsána rovnovážnou konstantou vody  $K_w$  ( $pK_w$ ) a udává vztah mezi koncentrací hydroxoniových a hydroxidových iontů,
- **disociační rovnováhy** popsané disociačními konstantami  $K_{i,z}$  ( $pK_{i,z}$ ), které definují zastoupení jednotlivých iontových forem s nábojem  $z$   $i$ -té látky v daném pH,

- makroskopická **podmínka elektroneutrality**, která zaručuje elektroneutralitu roztoku. Je to vazná podmínka využívaná pro určení koncentrace hydroxoniových iontů (pH),
- **elektromigrace iontů** v roztoku v přítomnosti elektrického pole. Konstanta úměrnosti mezi rychlostí iontu a intenzitou elektrického pole je elektroforetická mobilita  $u_{i,z}$  pro iontovou formu s nábojem  $z$   $i$ -té látky
- a soustava parciálních diferenciálních **rovníc kontinuity**, které vyjadřují látkovou bilanci a popisují vývoj koncentračních profilů jednotlivých látek v čase. Pro případ lineárního modelu se uvažuje pouze elektromigrace.

Linearizace řídicích rovnic (rovníc kontinuity) je základní matematický přístup při hledání řešení dynamických systémů, protože poskytuje nejjednodušší možné vyjádření, ale přesto stále zachycuje podstatu studovaného jevu.

V elektroforéze a dalších separačních technikách je základním (neporušeným) stavem homogenně naplněný prostor separačním médiem (nejčastěji roztok pufru). Typické experimentální uspořádání, které lze řešit pomocí linearizace, je CZE a jí podobné elektroforetické módy, kde je vzorek dávkován do homogenního systému (MEKC, volná gelová elektroforéza atd.). Zde je celý separační prostor uniformně vyplněn základním elektrolytem (BGE) a nástřik vzorku způsobuje v systému lokalizovanou poruchu, která tím, jak se složení vzorku blíží složení BGE, může vymizet (nulová porucha). Složení BGE je tedy srovnávací složení systému, vůči kterému se linearizace provádí a složení vzorku je počáteční porucha dynamického diferenciálního systému.

V elektroforetickém systému  $N$  složek systému linearizujeme soustavu  $N$  diferenciálních rovnic kontinuity, které můžeme přepsat do maticové formy:

$$\frac{\partial \mathbf{c}}{\partial t} = - \frac{j}{k_{\text{BGE}}} \mathbf{M} \times \frac{\partial \mathbf{c}}{\partial x} \quad (1)$$

kde  $\mathbf{c}$  je sloupcový vektor analytických koncentrací  $N$  složek systému, které jsou funkcí času,  $t$ , a polohy,  $x$ . Podíl veličin proudové hustoty,  $j$ , a vodivosti,  $k_{\text{BGE}}$ , který označuje intenzitu elektrického pole v neporušeném BGE, dává matici systému  $\mathbf{M}$  rozměr elektroforetické mobility. Parciální diferenciální rovnice (1) má jednoduché řešení: je to sada rovnic tzv. postupných vln, které jsou matematickým vyjádřením elektroforetických zón [13]:

$$w_i(x, t) = w_i^{\text{in}} \left( x - \frac{j}{k_{\text{BGE}}} I_i t \right) \quad (2)$$

kde  $w_i(x, t)$  je funkce popisující  $i$ -tou elektroforetickou zónu,  $w_i^{\text{in}}(x)$  je počáteční podmínka a  $I_i$  je vlastní číslo matice  $\mathbf{M}$  s rozměrem mobility (eigenmobility). Zóny si zachovávají počáteční tvar nástřiku a každá se šíří z místa nástřiku svoji vlastní rychlostí (mobilitou), která přísluší jednomu

vlastnímu číslu matice  $\mathbf{M}$ . Každý analyt tvoří jednu zónu, jejíž mobilita  $I$ , daná maticí  $\mathbf{M}$ , je totožná s efektivní mobilitou analytu v daném pH. Další vlastní čísla, jejichž počet odpovídá počtu složek BGE, jsou mobility (eigenmobility) systémových zón (píků). Do vlastností těchto zón teoreticky přispívají všechny složky BGE a nelze je tedy ztotožnit s konkrétní složkou. Systémové zóny jsou složeny z poruch koncentrací obecně všech složek BGE. Velikost (amplituda) těchto poruch je dána složením nástřiku (počáteční poruchou systému) a vlastními vektory příslušející daným vlastním číslům [VI]. Zóny analytů jsou v tomto ohledu zcela obdobné až na to, že mají v zóně navíc nenulovou koncentraci svého analytu. Tyto poruchy koncentračních profilů BGE pak umožňují detekovat systémové zóny i analytů s nedostatečnou přímou odezvou v detektoru pomocí technik nepřímé nebo univerzální detekce. Nejčastější používaný způsob nepřímé detekce je UV/VIS fotometrická detekce, ve které je obvykle jedna složka BGE aktivní při vlnových délkách UV nebo viditelného záření. Příklad univerzální detekce, kde všechny složky systému přispívají do signálu detektoru, je například bezkontaktní vodivostní detektor (CCD), který používáme v naší laboratoři [15].

Většina základních elektrolytů má tu vlastnost, že obsahuje jednu nebo dvě stacionární systémové mobility ( $\lambda = 0$ ). Po dosažení nulové hodnoty  $I$  do rovnice (2) získáme stacionární funkci, která je nezávislá na čase. Tyto funkce se nazývají regulační funkce nebo konzervační zákony (např. Kohlrauschova regulační funkce) a o jejich typech pojednává námi napsané review [VII]. V tomto review se také diskutují elektroforetické systémy bez regulační funkce a navíc formulujeme nové regulační funkce pro systémy s jednou slabou vícesytnou látkou a amfolytem. V obou systémech může být libovolný počet slabých jednomocných látek nebo silných elektrolytů s libovolnou valencí.

Vzájemným vynásobením pravého sloupcového a levého řádkového vlastního vektoru daného vlastního čísla získáme matici amplitud,  $\mathbf{P}$ , jejíž prvky jsou směrnice závislosti poruchy BGE v dané zóně na počátečních poruchách ve vzorku [I, VI]. Tedy každá ( $i$ -tá) zóna má příslušnou matici amplitud  $\mathbf{P}_i$  a každý její  $j$ -tý řádek obsahuje směrnice poruch v  $j$ -té složce systému. V Table 1 je příklad matic amplitud pro systém fosforečnanového BGE, ve kterém byly složky zadávány v tomto pořadí: 6 mM NaOH, 5 mM kyselina fosforečná a kyselina octová jako analyt.

**Table 1:** Matice amplitud pro systém složený z 6 mM Na<sup>+</sup> (NaOH), 5mM kyseliny fosforečné a analytu kyseliny octové. První řádek matic amplitud přísluší směrnícím poruch v profilu Na<sup>+</sup>, druhý přísluší ke kyselině fosforečné a třetí ke kyselině octové. Obdobně sloupce přísluší ve stejném pořadí počátečním poruchám ve vzorku. Vypočítáno v programu PeakMaster 5.2 s korekcí na iontovou sílu. SP označuje systémový pík (zónu).

Analyt (k. octová) ( $-38,8 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$ )	Anionický SP ( $-45,1 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$ )	Stacionární SP ( $0,0 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$ )
$\begin{pmatrix} 0 & 0 & 0,190 \\ 0 & 0 & -0,961 \\ 0 & 0 & 1 \end{pmatrix}$	$\begin{pmatrix} 0,445 & -0,534 & -0,598 \\ -0,463 & 0,555 & 0,622 \\ 0 & 0 & 0 \end{pmatrix}$	$\begin{pmatrix} 0,555 & 0,534 & 0,408 \\ 0,463 & 0,445 & 0,340 \\ 0 & 0 & 0 \end{pmatrix}$



Zatímco řádky matice příslušejí jednotlivým poruchám v složkách systému v dané zóně, sloupce jsou propojeny s poruchami ve vzorku. Je-li například složení vzorku: 7 mM Na<sup>+</sup> (porucha +1 mM), 4,5 mM kyselina fosforečná (porucha -0,5 mM) a 0,8 mM kyselina octová (porucha +0,8 mM), bude kupříkladu výsledná porucha kyseliny fosforečné (druhá složka) v zóně anionického systémového píku s mobilitou  $-45,1 \times 10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$  následující:  $-0,463*1 + 0,555*(-0,5) + 0,622*0,8 = -0,243$ .

Matice amplitud v Table 1 také ilustrují některé jejich charakteristické vlastnosti:

- Matice amplitud příslušející analytu má pouze jeden nenulový sloupec, čehož přímým důsledkem je přímá úměra mezi poruchou koncentračního profilu BGE v zóně analytu (odezva v detektoru) a koncentrací analytu ve vzorku.
- U všech systémových zón jsou prvky v řádcích připadajícím analytům nulové, protože v systémové zóně je vždy koncentrace všech analytů nulová, tudíž se v nich nemohou tvořit nenulové poruchy.
- Alespoň jedna stacionární systémová zóna má zpravidla všechny koeficienty kladné.

Pomocí prvků matic amplitud můžeme vypočítat směrnici odezvy při určitém druhu detekce na množství analytu ve vzorku. V případě nepřímé UV/VIS detekce se tato směrnice označuje TR (*transfer ratio*) [16, 17] a je totožná s příslušným prvkem v matici amplitud daného analytu. Díky tomu, že jsou obecně známé vztahy pro vodivost roztoku a pro elektroforetickou rychlost analytu a jejich derivace podle koncentrací jednotlivých složek systému [I], tak můžeme v kombinaci s příslušným prvkem matice amplitud vypočítat další dvě charakteristické veličiny pro analyt – jeho směrnici odezvy ve vodivostním detektoru ( $b_x$ ) [18] a míru působení elektromigrační disperze na zónu analytu ( $S_x$ , *relative velocity slope*) [19].

### 3. Software pro elektroforetické výpočty a simulace

Elektroforéza je flexibilní technika s řadou módů (CZE, IEF, ITP), které mohou být realizovány v různých experimentálních konfiguracích (kapilára, čip, plošný gel). Proto je vývoj teorie, simulačních algoritmů a simulačních programů důležitý pro hlubší porozumění elektroforetických dějů, získávání experimentální konstant a optimalizaci technik [1, 20, 21, 22, 23, 24]. V naší laboratoři jsme k tomuto účelu mimo jiné vyvinuli programy PeakMaster a Simul, které jsou volně dostupné na naší internetové stránce [25]. Oba programy vyžadují vstupní konstanty definující složky elektroforetického systému (acidobazické disociační konstanty a elektroforetické mobility) a počáteční rozložení koncentrací. Oba také umožňují korekci vstupních konstant na iontovou sílu [26] a obsahují rozsáhlou databázi vstupních dat, která je založená na Hirokawově databázi [27].

Vývoj teorie a její uplatnění v simulačních programech má zásadní přínos pro praxi – experimentátorovi se naskýtá možnost si otestovat a optimalizovat experiment pomocí počítače a tím ušetřit náklady na experimenty i čas strávený hledáním vhodných složek BGE (technika „dry-lab“). Je samozřejmé, že správnost výpočtů závisí na míře souhlasu teoretického modelu elektroforézy s realitou. Při vážnějším nesouhlasu simulace s experimentem ale také získáváme důležitou informaci – rozdíl mezi experimentem a simulací je výsledkem jednoho nebo více jevů, které byly zanedbány nebo dokonce doposud nejsou známy a tedy získáváme indicii, že tyto efekty hrají významnou roli a mohou být identifikovány. Podobný význam mají simulační programy pro výuku elektroforézy.

#### 3.1. Program PeakMaster 5

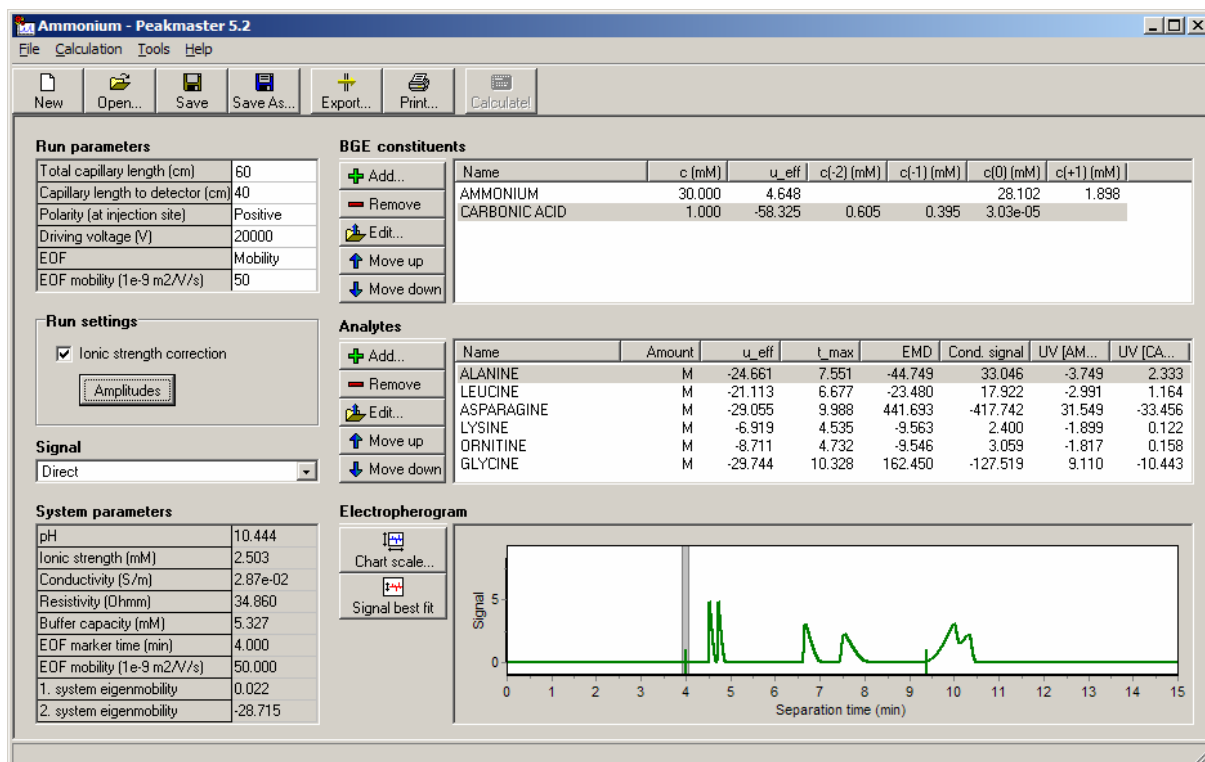
Linearizace elektroforetického problému [I] byla v naší skupině implementována do programu PeakMaster 5 [II, III], který slouží k návrhu pufrujících roztoků a optimalizaci separace zónové elektroforézy. Je to uživatelsky nenáročný program, který obsahuje rozsáhlou databázi disociačních konstant a elektroforetických mobilit běžných látek, pomocí které lze velmi rychle prozkoumat a optimalizovat zvolený roztok.

Po zadání složení BGE program poskytne uživateli podrobnou charakteristiku acidobazických a elektroforetických vlastností roztoku:

- pH, iontová síla, specifická vodivost a odpor a pufrční kapacitu roztoku
- efektivní mobility složek BGE a analytů, zastoupení iontových koncentrací
- mobility systémových zón
- odezvy analytů při nepřímé UV/VIS detekci (TR), vodivostní detekci ( $b_x$ ) a míra působení elektromigrační disperze ( $S_x$ )

Tyto data mohou být výsledně vizualizovány vykreslením formou elektroferogramu, jehož výstup může uživatel upřesnit pomocí zadání polaritv elektrod, velikosti vloženého napětí, celkové a detekční vzdálenosti a velikost a směr elektroosmotického toku. Pozice systémových píkú v elektroferogramu jsou znázomněny svislými čarami a píky analytů jsou vykresleny pomocí HVL funkce, která umí zachytit i změnu tvaru vlivem elektromigrační disperze [28]. Ve verzi programu 5.2 je přidáno nové okno „Amplitudes“, které zpracovává vliv složení vzorku na složení elektroforetických zón [VI].

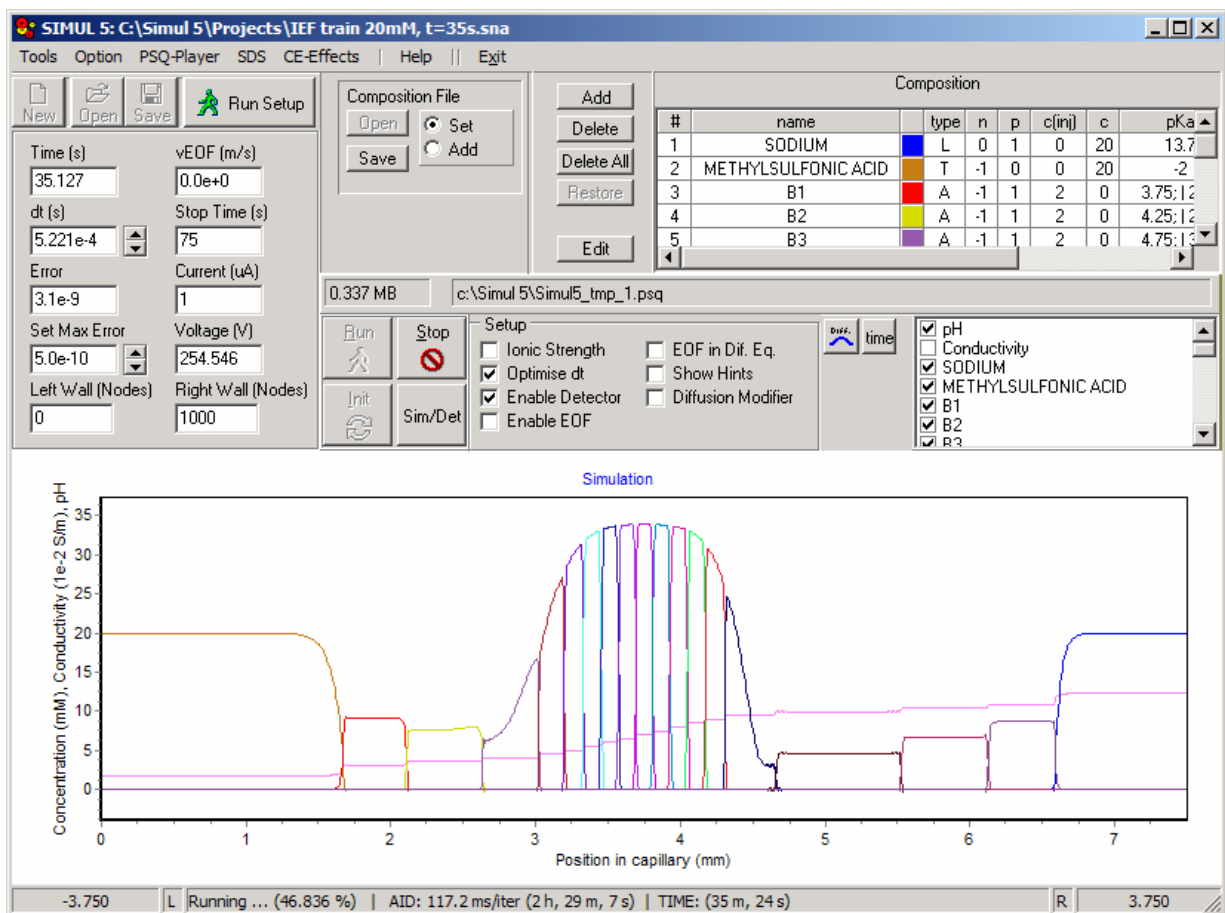
Program PeakMaster 5 můžeme použít na nalezení vhodného složení BGE pro CZE z hlediska dobré separace, odezvy detektoru nebo elektromigrační disperze. Také je využíván ke zjištění počtu a předpokládaných pozic systémových píkú. To nám může napovědět, jaký může být jejich dopad na výsledek optimalizované separace. Takovýto příklad je ve Figure 1, kde je zkoumán dopad kontaminace roztoku amoniaku, který je použit jako BGE, uhličitanyými ionty na separaci některých aminokyselin. V článku [IX] popisujeme možnost užití programu k převedení experimentálně stanovených iontových mobilit korigovaných na disipaci Jouleova tepla na limitní iontové mobility (hodnoty při nulové iontové síle). Tento postup lze jednoduše aplikovat na slabé jednomocné nebo silné vícemocné elektrolyty.



**Figure 1:** Okno programu PeakMaster 5.2. Příklad použití programu. Elektroferogram zobrazuje přímou detekci některých aminokyselin v roztoku amoniaku (MS kompatibilní BGE). Testuje se kontaminace BGE uhličitanyými ionty, která způsobí vytvoření nového systémového píku. Ten svojí přítomností v oblasti detekce analytů výrazně zvýší elektromigrační disperzi analytů.

### 3.2. Program Simul 5

Program Simul 5 [V] řeší dynamický jednodimenzionální model elektromigrace [29] numericky a tudíž poskytuje přesné řešení daného modelu pro libovolné počáteční uspořádání bez nutnosti zanedbání nelineárního chování, jako je tomu u programu PeakMaster 5. Výsledkem simulace jsou koncentrační profily všech zadaných složek a na nich závislých veličin (pH, vodivost, iontová síla, intenzita elektrického pole). Hlavní okno programu je ukázáno ve Figure 2. Základní verze programu je uveřejněna na stránkách naší skupiny [25].



**Figure 2:** Hlavní okno programu Simul 5. Simulace IEF 17 amfolytů, na které působí izotachoforetický efekt způsobený migrací krajních (elektrodoých) iontů (tzv. *ITP train*).

Mnoho elektroforetických módů je určeno svým specifickým počátečním uspořádáním (rozložení koncentrací, typy složek, okrajové podmínky atd.), proto k zadání počátečního stavu slouží několik základních i pokročilých nástrojů. Stejně jako program PeakMaster i tento program obsahuje databázi látek s disociačními konstantami a elektroforetickými mobilitami, což umožňuje rychlé zadání složení systému. Základní způsob spočívá v tom, že se zadá počáteční rozložení jednotlivých složek (analyte, BGE, leading, terminating). Takto lze jednoduše sestavit simulace CZE, ITP a IEF, jejichž koncentrační profily jsou typicky složeny ze tří segmentů (částí s různou koncentrací).

Pokročilé nástroje pro nastavení počátečních koncentračních profilů umožňují rozdělit simulační prostor na libovolný počet segmentů, ve kterých je možné nadefinovat nejen určité koncentrace složek, ale i různé hodnoty jejich disociačních konstant a elektroforetických mobilit, což například umožňuje simulaci rozhraní roztok/gel.

Významnou výhodou programu je to, že program průběžně vykresluje simulovaná data a tím umožňuje uživateli náhled a vizuální kontrolu průběhu simulace. To je užitečné především při zadávání simulace, kdy se často metodou „pokus-omyl“ hledají nejvhodnější simulační podmínky a parametry. Program Simul 5 je uživatelsky náročnější než program PeakMaster 5, ale díky komplexnosti programu uživatel naopak získává detailní náhled do vývoje elektroforetických systémů, který umožňuje hlubší pochopení chování reálného problému.

### 3.3. Nové vlastnosti vývojové verze programu Simul 5

Vývoj programu Simul 5 je jednou z hlavních náplní této disertační práce, proto vývojová verze programu obsahuje řadu vylepšení, které výrazně rozšiřují použitelnost programu:

*Akcelerátor výpočtu.* Je to nový algoritmus založený na nahrazení výpočtově náročné algebraické podmínky elektroneutrality. Algebraická rovnice je nahrazena její diferenciální formou, která popisuje vývoj pH (koncentrace vodíkových iontů) v čase a prostoru.

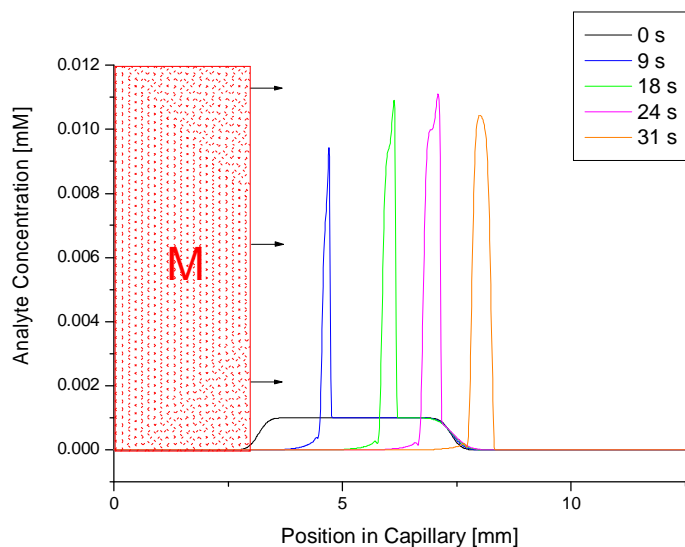
*Pufující membrány.* Program umožňuje zadat složku, která je zcela imobilizovaná a tím simuluje přítomnost pH pufujících membrán pro simulaci techniky IET (*isoelectric trapping*) [30, 31]. Membránu může tvořit libovolný počet složek. Jejich koncentrační profil je v čase neměnný, pouze se zúčastňují acido-bazických rovnováh.

*Elektrody.* Jako jeden z parametrů simulace je možné zadat nepropustnou okrajovou podmínku pro všechny látky. Ionty migrující k tomuto okraji se na něm kumulují zatímco protiionty okraj opouštějí, což formálně vystihuje elektrodové reakce tvorby kyslíku a na opačném konci tvorby vodíku. Toto také umožňuje sledovat změnu pH v okolí elektrod. Tato vlastnost programu udržuje množství všech složek v simulačním prostoru konstantní, jež je nezbytné pro některé isoelektrické simulace (IEF, IET), které je potřeba simulovat do vyšších časů.

*Míchání segmentů.* Je to možnost promíchávání (homogenizace) segmentů s volitelnou rychlostí, kde rychlost znamená dobu nebo počet výpočtových kroků potřebných k tomu, aby se segment zcela homogenizoval. Implementace míchání je nutná při simulacích IET systémů.

*Micelární mód a komplexotvorné rovnováhy.* Program umožňuje definovat složku, která bude po překročení kritické micelární koncentrace (CMC) tvořit micely s určitým agregačním číslem. Dále je možné simulovat komplexotvorné rovnováhy těchto micel nebo obecného ligandu (speciální případ micely při volbě nulové CMC a agregačního čísla 1) s další látkou bez ohledu

na její náboj. Ve Figure 3 je ukázán simulovaný příklad metody „*sweeping*“, která je založena na mobilizaci neutrálního analytu čelem fronty micel. Tím dochází k postupnému nakoncentrování vzorku, jehož míra závisí na síle komplexace látky s micelou.



**Figure 3:** Simulace metody *sweeping*. Neutrální analyt je mobilizován čelem fronty micel (M, červená barva). Simulace je zaznamenána v různých časech (časy a barvy viz legenda obrázku).

*Pseudo-2D simulace.* Je to nepravá dvojdímenzionální simulace, která umožňuje zadat různé průřezy (příčné plochy) podél separačního kanálu v případech, kdy uživatel nepotřebuje získat radiální koncentrační profily látek. Zvýšení průřezu se používá k simulaci elektrodových nádobek, které jsou zpravidla širší než separační kanál (jak u kapilární tak u čipové elektroforézy). Toto rozšíření průřezu stabilizuje výpočet při simulaci elektrod jako okrajové podmínky.

## 4. Systémové píky: predikce a experiment

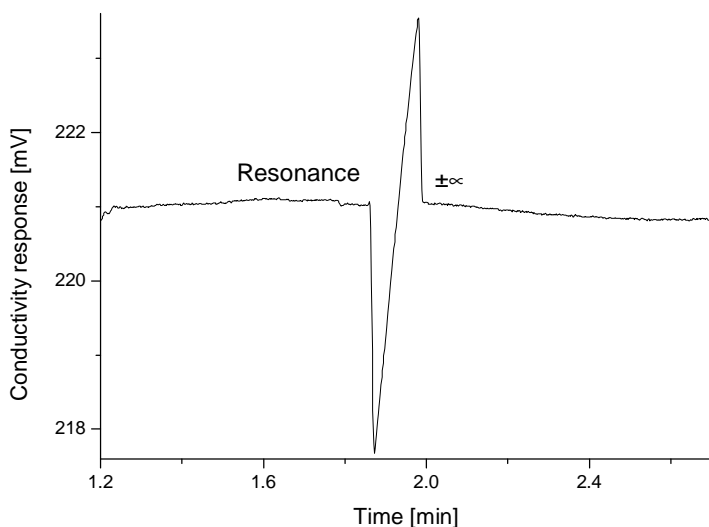
Základní elektrolyt (BGE) je roztok slabých nebo silných elektrolytů s případným přidavkem dalších složek (modifikátorů) a hraje nejvýznamnější roli při elektroforetické separaci, protože zajišťuje vhodné pH, elektrickou vodivost a pufrální kapacitu separačního prostředí. Stejně jako jednotlivý analyt, každá složka základního elektrolytu vnáší do chování elektromigračního systému nový stupeň volnosti [2, 32], který se projeví jako samostatná zóna v kapiláře a pík v elektroferogramu. Tento fakt je již dlouho znám a to především z chromatografie a je obecně označován pojmem „systémový pík“. Vlastnosti tohoto píku, především jeho elektroforetickou mobilitu, nelze ztotožnit s mobilitou žádné složky základního elektrolytu, protože je obecně výslednicí vlastností všech složek základního elektrolytu, tedy celého systému. Odtud pochází přívlastek „systémový“. Systémová zóna je porucha v koncentracích základního elektrolytu v kapiláře, proto ji lze detekovat pouze metodou citlivou na složky BGE (např. nepřímá fotometrická detekce nebo vodivostní detekce). Studií systémových píků se zabývalo mnoho autorů jak v chromatografii, tak elektroforeze [3, 7, 32, 33, 34, 35].

Přítomnost systémových píků v elektroferogramu je často spojena s vážnými nepříjemnostmi, např. kvůli možnosti jejich záměny za analyty nebo nečistoty, pokud se vyskytují v oblasti detekce analyzovaných látek. Tomu ale lze často předejít již okamžikem návrhu separačního systému použitím simulačních programů. Na druhou stranu, systémové píky mohou mít také pozitivní přínos – nedávno jsme pomocí teorie elektromigrace a programu PeakMaster našli unikátní využití vlastností systémových píků pro stanovení kritické micelární koncentrace (CMC) micel, přítomných v BGE [X]. Metoda je založena na matematickém závěru z lineární teorie, že při překročení CMC se skokovitě změní mobilita některých systémových píků. Velká výhoda této metody je, že oproti většině ostatních metod, kde se při překročení CMC změní pouze směrnice závislosti sledované veličiny na koncentraci detergentu, se v této metodě při překročení CMC detekuje skok v pozici píku.

Linearizaci elektromigračního pohybu můžeme použít i pro sledování vzájemné pozice a křížení dvou elektroforetických zón (analytu nebo systémové zóny) v závislosti na libovolném parametru, který ovlivňuje jejich pozice (mobility), např. pH nebo koncentrace některé složky. Pro dvě vlastní čísla matice systému ( $\mathbf{M}$ ) a tedy i pro dvě mobility zón je známo, že může dojít k třem typickým případům vzájemného křížení [36].

První typ je příčné křížení (*transversal crossing*). V případě příčného křížení zón dvou analytů dochází z hlediska lineární teorie k jejich pouhému překryvu. Pokud se ale kříží zóna analytu se systémovou zónou, nastane v průsečíku mobilit zón k jevu zvaném resonance [13]. Spojené zóny analytu a systémového píku vytvoří ve všech koncentračních profilech složek BGE esovitý tvar zóny (překmit), jehož amplituda roste s časem. Tento útvar je pak pozorován při detekci citlivé na složky BGE [III, VI]. Naopak samotný koncentrační profil analytu podléhá anomální disperzi

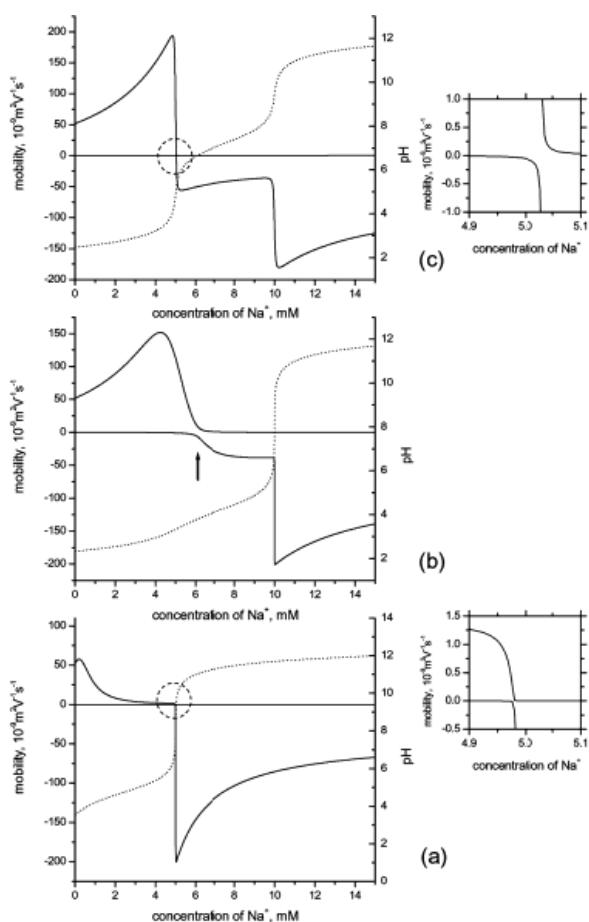
(*schizophrenic zone broadening*) [37], která může až znemožnit přímou detekci vzorku. V těchto případech je nutné optimalizovat složení BGE v programu PeakMaster a tím odstranit tento jev.



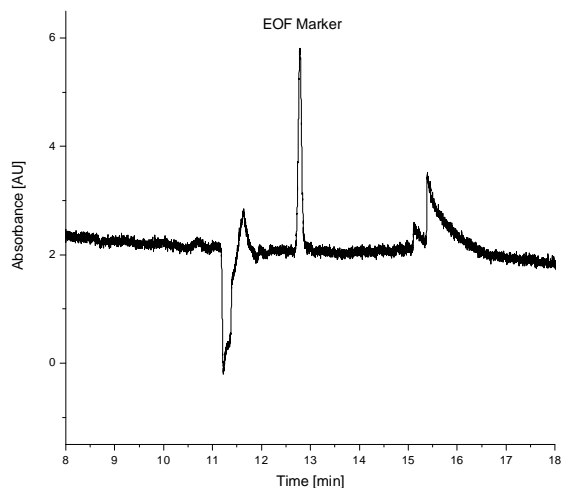
**Figure 4:** Resonance píku analytu (kyselina octová) se systémovým píkem. Detekce pomocí vodivostního detektoru. Složení BGE: 7,15 mM NaOH a 5 mM kyselina fosforečná, pH 7.0. Složení vzorku: 7,15 mM NaOH, 5,0 mM kyselina fosforečná, 0,5 mM kyselina octová a 0,5 mM thiomocovina jako EOF marker. Převzato z [VI], Figure 2, profil R.

Další případy se týkají pouze dvou systémových zón. Z nich nejběžnější je jejich neuskutečněné křížení (*avoided crossing*). V těchto případech se dvě systémové mobility mohou k sobě přiblížit libovolně blízko, ale neprotnou se. Častým případem neuskutečněného křížení je formální přechod systémové mobility ze záporných hodnot do kladných nebo naopak a zároveň zachování jedné téměř nulové hodnoty systémové mobility. Ve Figure 5 jsou tři příklady binárních BGE, u kterých dochází k neuskutečněnému křížení dvou systémových mobilit. Ve výnosu se sleduje závislost dvou systémových mobilit (plná křivka) a pH (přerušovaná křivka) na koncentraci přidaného NaOH do BGE. Zatímco je jedna systémová mobilita vždy blízko nule, druhá postupně přechází z kladných hodnot do záporných. Ale při detailním posledu na křivky vidíme, že k přechodu z kladných hodnot do záporných dochází tak, že kladná systémová mobilita se stane nulovou a původně nulová mobilita se stane zápornou – viz detaily křivek pro Figure 5 (a) a (c). Figure 5 (b) ukazuje speciální případ, kdy k přiblížení hodnot systémových mobilit dochází zpozděle a vzniká interval koncentrací NaOH (nebo ekvivalentní interval pH), v němž obě systémové mobility jsou výrazně nenulové a tudíž systém nemá regulační funkci [I, VII, 38]. Figure 6 ukazuje experimentální záznam takového systému bez stacionárních systémových zón [II]. Jedná se o štavelanový BGE s UV absorbujícím imidazolem okolo hodnoty pH 4. K detekci systémových zón a markeru elektroosmotického toku (EOF marker) byla použita nepřímá UV detekce v koncentračním profilu imidazolu. Vidíme, že oba systémové píky jsou zcela separovány od EOF markeru.



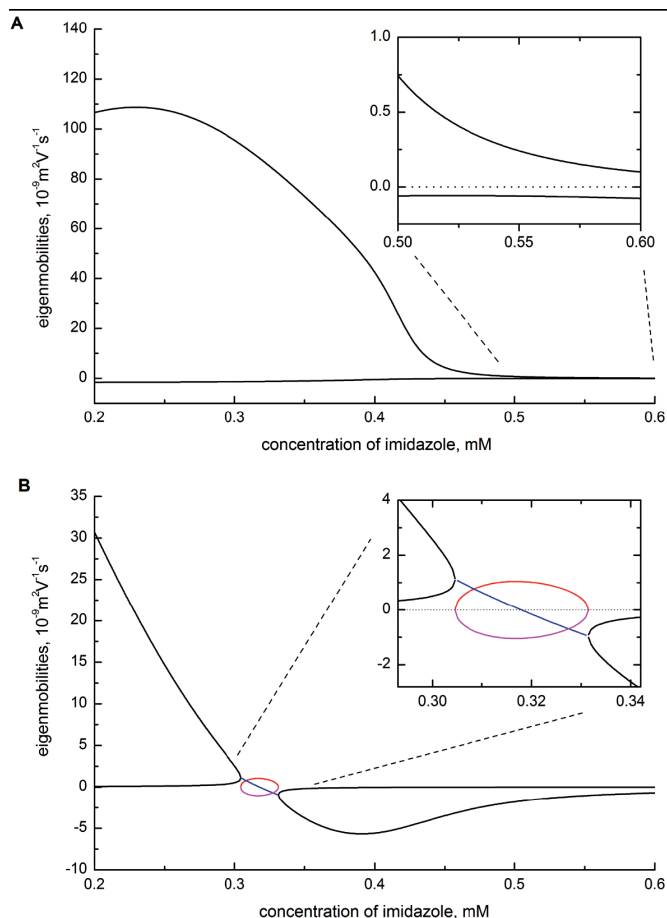


**Figure 5:** Vypočítaná závislost systémových mobilit a pH na koncentraci  $\text{Na}^+$  v binárních roztocích kyseliny (a) octové, (b) šťavelové a (c) fosforečné. Složení: 5 mM koncentrace kyseliny. Plné křivky: systémové mobility, tečkované křivky: pH. Části zakroužkovaných křivek jsou ukázány ve zvětšeném měřítku v pravé části obrázku. Šipka v grafu (b) označuje složení roztoku, který nemá žádné stacionární systémové zóny. Převzato z [I], Figure 1.



**Figure 6:** Experimentální záznam dvou systémových pík v binárním šťavelanovém BGE, který nemá stacionární systémové zóny. Složení: 5,0 mM kyselina šťavelová, 6,4 mM imidazol (pro nepřímou UV detekci při 200 nm), pH 3,7. Vzorek: 4,7 mM kyselina šťavelová, 6,75 mM imidazole, 0,35 mM thiomocovina (UV marker EOF). Napětí:  $-15$  kV. Kapilára pokryta kationickým polymerem (Polybren). Převzato z [II], Figure 2.

Poslední případ je komplexní křížení (*Complex Crossing*). Složení reálného BGE, u kterého by docházelo k tomuto typu křížení, jsme předpověděli pomocí výpočtu v programu PeakMaster 5 a následně jsme náš předpoklad experimentálně potvrdili [IV]. V těchto systémech dochází k tomu, že při protnutí dvou systémových mobilit přejdou jejich hodnoty z reálných hodnot do hodnot komplexně sdružených. Reálným obrazem tohoto systému jsou oscilační struktury ve všech koncentračních profilech BGE s centrem odpovídajícím reálně hodnotě komplexních mobilit. Ve Figure 7 je vypočítaný výnos dvou systémových mobilit binárního BGE 0,21 mM dikarboxylové kyseliny a variabilní koncentrace imidazolu. Případ (A) je výpočet s kyselinou šťavelovou, která reprezentuje obecný případ neuskutečněního křížení. Druhý případ (B) je výnos kyseliny sebakové, kde existuje jistý interval koncentrací imidazolu, ve kterém dochází ke komplexnímu křížení.



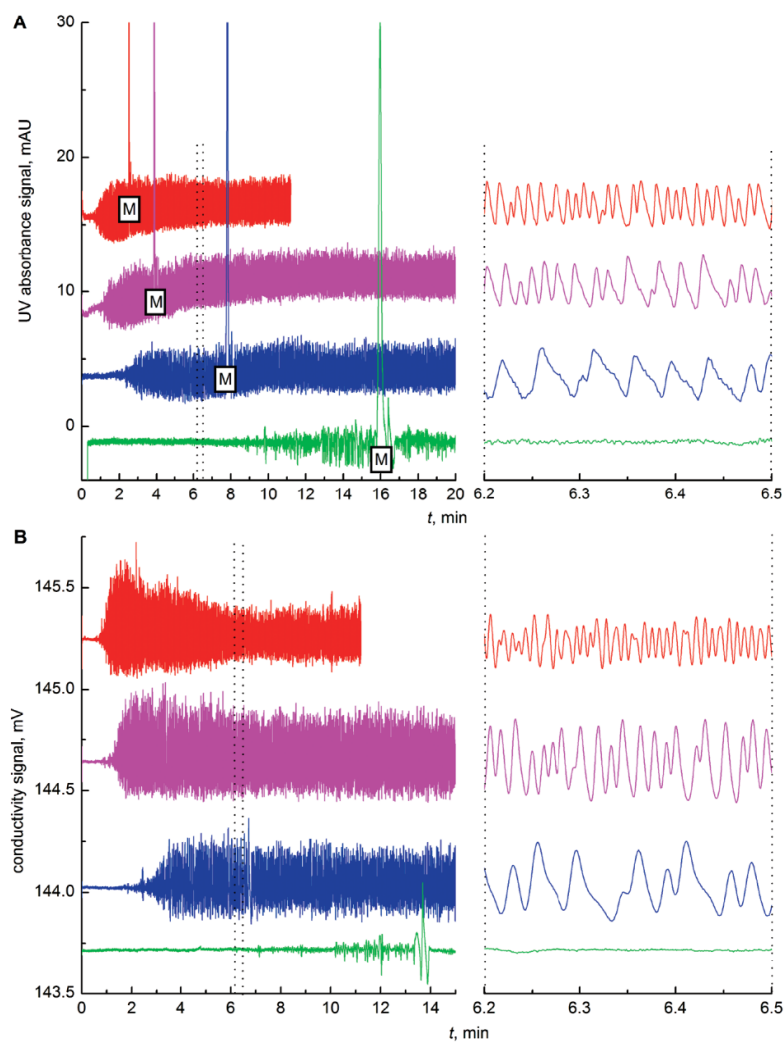
**Figure 7:** Vypočítané systémové mobility pro dva binární BGE obsahující určitou dikarboxylovou kyselinu v koncentraci 0,21 mM a variabilní koncentraci jejího protiiontu imidazolu.

(A) Kyselina šťavelová – klasický případ dvou systémových mobilit, které se neprotnou.

(B) Kyselina sebaková – komplexní křížení. Reálným obrazem komplexně sdružených systémových mobilit jsou oscilace koncentračního profilu.

Barvy křivek: černá – reálné hodnoty, modrá – reálná část komplexních hodnot, červená a fialová – komplexní části. Převzato z [IV], Figure 1.

Experimentální ověření výnosu kyseliny sebakové (B) je ve Figure 8, kde byl měřen střed intervalu koncentrace imidazolu, ve kterém systém osciluje (0,323 mM imidazol). Význam nalezení těchto oscilujících systémů jednak rozšiřuje obecné znalosti elektroforézy, ale především prokazuje správnost matematické formulace elektroforetického problému. Souhrnný pohled na problematiku lineární teorie, systémových píků a experimentálních ověření zmíněných v této kapitole je zpracováno v review [VIII].



**Figure 8:** Experimentální záznam BGE 0,21 mM kyseliny sebakové a 0,323 mM imidazolu.

(A) UV absorpční záznam nepřímé detekce v profilu imidazolu.

(B) korespondující vodivostní záznam. Pozice vodivostního detektoru byla 5,3 cm před UV detektorem.

Napětí: 30 kV (červená), 20 kV (fialová), 10 kV (modrá) a 5 kV (zelená).

Popisek „M“ je EOF marker indikující původní pozici dávkované zóny unášené pouze EOF. Vertikální tečkované úsečky vyznačují zvětšenou oblast umístěnou vpravo. Ukazuje detail oscilací. Převzato z [IV], Figure 3.

## 5. Závěr

Tématem mé disertační práce byl vývoj softwarových prostředků pro optimalizaci základních elektrolytů v elektroforéze, studium systémových píků a obecné teorie elektromigrace. Spolupracoval jsem na interpretaci amplitud a programování výpočetního jádra v programu PeakMaster 5. Hlavní náplní mé práce byl vývoj programu Simul 5. Během mého studia jsem do něj zabudoval mnoho nástrojů, které jsem zde komentoval a které významně rozšiřují jeho aplikaci.

Oba programy jsou s oblibou používány na mnoha univerzitách a pracovištích po celém světě. Především program PeakMaster si získal velmi širokou základnu uživatelů, jak výzkumníků používajících elektroforetické separační metody, tak z dalších analytických disciplín díky rychlému výpočtu pH libovolně složitých roztoků s velmi dobrou korekcí na iontovou sílu.

Dále jsem spolupracoval na nalezení některých reálných systémů, které jsou založeny na linearizaci elektromigračního problému a vlastnostech systémových píků jako například nalezení oscilujících elektrolytů, systémů bez stacionárních systémových zón (tj. bez regulačních funkcí) nebo využití systémových píků v micelárním prostředí ke zjištění kritické micelární koncentrace.

## 6. Literatura

- 
- [1] Mosher, R.A, Saville, D.A, Thormann, W., *The Dynamics of Electrophoresis*, VCH, Weinheim, 1992.
- [2] Poppe, H., *J. Chromatogr. A* 1990, 506, 45- 60.
- [3] Sellmeyer, H., Poppe, H., *J. Chromatogr. A* 2002, 960, 175-185.
- [4] Poppe, H., *Anal. Chem.* 1992, 64, 1908-1919.
- [5] Beckers, J.L., *J. Chromatogr. A* 1997, 764, 111-126.
- [6] Gebauer, P., Boček, P., *Anal. Chem.* 1997, 69, 1557-1563.
- [7] Gebauer, P., Borecká, P., Boček, P., *Anal. Chem.* 1998, 70, 3397-3406.
- [8] Gaš, B., *Diplomová práce*, Univerzita Karlova, Praha, 1975.
- [9] Fidler, V., Vacík, J., Fidler, Z., *J. Chromatogr.* 1985, 320, 167-174.
- [10] Gaš, B., *J. Chromatogr. A* 1993, 644, 161-174.
- [11] Gaš, B., Vacík, J., Zelenský, I., *J. Chromatogr.* 1991, 545, 225-237.
- [12] Schwer, Ch., Gaš, B., Lottspeich, F., Kenndler, E., *Anal. Chem.* 1993, 65, 2108-2115.
- [13] Štědrý, M., Jaroš, M., Gaš, B., *J. Chromatogr. A* 2002, 960, 187-198.
- [14] Štědrý, M., Jaroš, M., Včeláková, K., Gaš, B., *Electrophoresis* 2003, 24, 536 – 547.
- [15] Gaš, B., Zuska, J., Coufal, P., van de Goor, T., *Electrophoresis* 2002, 23, 3520-3527.
- [16] Yeung, E.S., Kuhr, W.G., *Anal. Chem.* 1991, 63, 275A-282A.
- [17] Beckers, J.L., *J. Chromatogr. A* 1999, 844, 321-331.
- [18] Mikkers, F.E.P, Everaerts, F.M, Verheggen, T.P.E.M., *J. Chromatogr.* 1979, 169, 1-10.
- [19] Horká, M., Šlais, K., *Electrophoresis* 2000, 21, 2814-2827.
- [20] Ermakov, S.V., Bello, M.S., Righetti, P.G., *J. Chromatogr. A* 1994, 661, 265-278.
- [21] Dose, E.V., Guiochon, G.A., *Anal. Chem.* 1991, 63, 1063-1072.
- [22] Dubský, P., Tesařová, E., Gaš, B., *Electrophoresis* 2004, 25, 733–742.
- [23] Gaš, B., Kenndler, E., *Electrophoresis* 2002, 23, 3817–3826.
- [24] Thormann, W., Mosher, R.A., *Electrophoresis* 2006, 27, 968–983.
- [25] [www.natur.cuni.cz/gas](http://www.natur.cuni.cz/gas)
- [26] Jaroš, M., Včeláková, K., Zusková, I., Gaš, B., *Electrophoresis* 2002, 23, 2667–2677,
- [27] Hirokawa, T., Nishimo, M., Aoki, N., Kiso, Y., et al, *J. Chromatogr.* 1983, 271, D1-D106.
- [28] Erny, G.L., Bergstrom, E.T., Goodall, D.M., Grieb, S., *Anal. Chem.* 2001, 73, 4862-4872.
- [29] Chatterjee, A., *J. Micromech. Microeng.* 2003, 13, 758–767.
- [30] Shave, E., Vigh, E., *Electrophoresis* 2007, 28, 587-589.
- [31] Shave, E., Vigh, E., *Electrophoresis* 2007, 28, 2291-2299.
- [32] Gaš, B., Kenndler, E., *Electrophoresis* 2004, 25, 3901–3912.
- [33] Srbek, J., Coufal, P., Bosáková, Z., Tesařová, E., *J. Sep. Sci.* 2005, 28, 1263-1270.
- [34] Poppe, H., *J. Chromatogr. A* 1999, 831, 105 –121.
- [35] Gebauer, P., Pantůčková, P., Boček, P., *Anal. Chem.* 1999, 71, 3374-3381.
- [36] Tuckerman, L.S., *Physica D* 2001, 156, 325–363.
- [37] Gebauer, P., Borecká, P., Boček, P., *Anal. Chem.* 1998, 70, 3397-3406.
- [38] Malá, Z., Gebauer, P., *Electrophoresis* 2006, 27, 4601-4609.

## Životopis

### Vzdělání:

- 1995-1999 Gymnázium Ústí nad Orlicí
- 1999-2004 fyzikální chemie, magisterské studium, Katedra fyzikální a makromolekulární chemie PřF UK v Praze, diplomová práce „*Matematický a softwarový model elektromigrace*“, školitel Prof. RNDr. Bohuslav Gaš, CSc.
- od r. 2004 fyzikální chemie, PhD. studium, Katedra fyzikální a makromolekulární chemie PřF UK v Praze, téma „*Softwarové prostředky pro optimalizaci základních elektrolytů v elektroforéze*“, školitel Prof. RNDr. Bohuslav Gaš, CSc.

*Oblasti výzkumu:* teorie elektromigrace a její linearizace, počítačová simulace a vývoj programů PeakMaster a Simul, experimentální ověřování teoretických závěrů, čipová elektroforéza.

*Konference:* za posledních 5 let prezentace na 7 mezinárodních konferencích (MSB, ITP a ISSS) formou posteru.

### Stáže:

- Podzim 2005: třítydenní pobyt v Agilent Technologies, Waldbronn, Německo. Vývojové práce na čipové elektroforéze.
- Podzim 2006: dvouměsíční stáž na A&M University, College Station, TX, USA, v laboratoři profesora Gyuly Vigha.

### Hlavní řešitel grantů:

- FRVŠ, č. 733-2006, rok řešení: 2006.
- GAUK, č. 304/2006 B CH, období řešení: 2006 - 2008.

*Softwarové produkty* (status Freeware, dostupný na adrese [www.natur.cuni.cz/gas](http://www.natur.cuni.cz/gas)):

- **Hruška, V.**, Jaroš, M., Gaš, B.: *Simul 5*. Software pro dynamickou simulaci elektroforézy.
- Jaroš, M., Štědrý, M., **Hruška, V.**, Zusková, I., Gaš, B.: *PeakMaster 5*. Software pro popis linearizovaného chování základních elektrolytů v elektroforéze.

## 7. Seznam publikací autora

- I. Štědrý, M., Jaroš, M., **Hruška, V.**, Gaš, B., Eigenmobilities in background electrolytes for capillary zone electrophoresis: III. Linear theory of electromigration, *Electrophoresis* **2004**, *25*, 3071-3079.
- II. Jaroš, M., **Hruška, V.**, Štědrý, M., Zusková, I., Gaš, B., Eigenmobilities in background electrolytes for capillary zone electrophoresis: IV. Computer program PeakMaster, *Electrophoresis* **2004**, *25*, 3080-3085.
- III. Gaš, B., Jaroš, M., **Hruška, V.**, Zusková, I., Štědrý, M., PeakMaster - A freeware simulator of capillary zone electrophoresis, *LC GC EUROPE* **2005**, *18*, 282-288.
- IV. **Hruška, V.**, Jaroš, M., Gaš, B., Oscillating electrolytes, *Electrophoresis* **2006**, *27*, 513-518.
- V. **Hruška, V.**, Jaroš, M., Gaš, B., Simul 5 - Free dynamic simulator of electrophoresis, *Electrophoresis* **2006**, *27*, 984-991.
- VI. **Hruška, V.**, Štědrý, M., Včeláková, K., Lokajová, J., Tesařová, E., Jaroš, M., Gaš, B., Eigenmobilities in background electrolytes for CZE. V. Intensity (amplitudes) of system peaks, *Electrophoresis* **2006**, *27*, 4610-4617.
- VII. **Hruška, V.**, Gaš, B., Kohlrausch regulating function and other conservation laws in electrophoresis, *Electrophoresis* **2007**, *28*, 3-14.
- VIII. Gaš, B., **Hruška, V.**, Dittmann, M., Bek, F., Witt, K., Prediction and understanding system peaks in capillary zone electrophoresis, *J. Sep. Sci.* **2007**, *30*, 1435 - 1445.
- IX. Evenhuis, C.J., **Hruska, V.**, Guijt, R.M., Macka, M., Gas, B., Marriott, P.J., Haddad, P.R., Reliable electrophoretic mobilities free from Joule heating effects using CE, *Electrophoresis* **2007**, *28*, 3759-3766.
- X. 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* **2008**, *29*, 1189-1195.