

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE



Libor Veis

Počítačová simulace elektromigrace

Vedoucí bakalářské práce:

Prof. RNDr. Bohuslav Gaš, CSc.

Konzultant:

Mgr. Vlastimil Hruška

Studijní program: Chemie

Mým rodičům, Martinovi a Danuše

Radost z uvažování a z chápání je nejkrásnějším darem přírody.

ALBERT EINSTEIN

Poděkování

Rád bych poděkoval svému školiteli Prof. RNDr. Bohuslavu Gašovi, CSc. za péči, kterou mi během dosavadního studia věnoval, za rady i trpělivost při práci na tomto zajímavém tématu.

Velké díky též patří Mgr. Vlastimilovi Hruškovi za poskytnutí mnoha cenných rad a připomínek týkajících se této práce. Dále bych rád poděkoval Doc. RNDr. Evě Tesařové, CSc. za její rady a pomoc. Děkuji Martinovi za pomoc s programem \LaTeX .

Svým rodičům děkuji za podporu, kterou mi poskytovali nejen během mého dosavadního studia.

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval samostatně, pod vedením školitele Prof. RNDr. Bohuslava Gaše, CSc., a že jsem všechny použité prameny řádně citoval.

Jsem si vědom 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 4.6.2016



Obsah

1	Seznámení s problematikou elektromigrace	1
1.1	Elektroforéza	1
1.2	Obecné principy elektroforézy	1
1.3	Základní experimentální uspořádání elektroforézy	4
2	Počítačová simulace elektromigrace	7
2.1	Počítačová simulace elektromigrace - přehled	7
2.2	Simulační programy vyvinuté v naší laboratoři	13
2.3	Simul 5.0	14
3	Cíle práce	20
4	Praktická část	21
4.1	Provedené simulace a jejich diskuse	21
4.1.1	Simulace "sweepingu"	21
4.1.2	Simulace prekoncentrace kyseliny benzoové	24
5	Závěr	29

Seznam použitých zkratk

DNA	deoxyribonukleová kyselina
CZE	kapilární zónová elektroforéza
ITP	izotachoforéza
CGE	kapilární gelová elektroforéza
EKC	elektrokinetická kapilární chromatografie
IEF	izoelektrická fokusace
CEC	elektrochromatografie v naplněných kapilárách
BACE	bioafinitní kapilární elektroforéza
EOF	elektroosmotický tok
BGE	základní elektrolyt
SDS	dodecylsulfát sodný
UV	ultrafialová oblast světla

Kapitola 1

Seznámení s problematikou elektromigrace

1.1 Elektroforéza

Elektroforéza je separační metoda, která využívá migrace nabitých částic v elektrickém poli. Její schématické znázornění je zobrazeno na obrázku 1.1. Pomocí této metody lze separovat malé anorganické i organické ionty, nabité látky polymerního charakteru (fragmenty DNA, bílkoviny) nebo dokonce chromozómy, mikroorganismy, či celé buňky. Například gelová elektroforéza je téměř jediná technika využívaná v genomice a proteomice pro složité separace, kde je potřeba dělit tisíce různých látek. V posledních letech došlo k velkému rozvoji kapilárních technik a technik využívajících mikročipů.

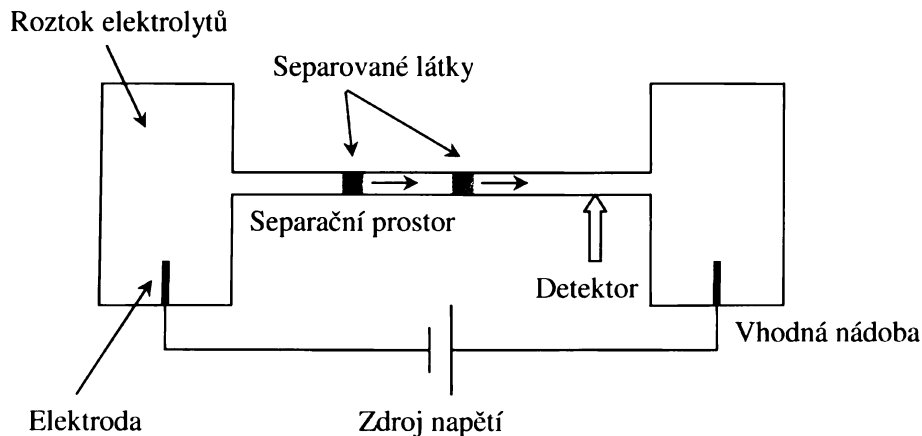
Elektroforéza v sobě zahrnuje mnoho jednotlivých separačních technik. Kritérií k jejich dělení je několik. Můžeme je například dělit podle prostorového uspořádání: elektroforéza v trubici, v kapiláře, na desce, či na čipu. Další možné kritérium je příslušné separační prostředí: roztok, více roztoků, gel, rozhraní více gelů atd. Jestliže jsou do separačního prostředí přidány další látky s určitou funkcí, mluvíme o tzv. aditivech. Aditivy mohou být povrchově aktivní látky, chirální selektory atd.

Mezi konkrétní používané techniky řadíme: kapilární zónovou elektroforézu (CZE), kapilární izotachoforézu (ITP), kapilární gelovou elektroforézu (CGE), elektrokinetickou kapilární chromatografii (EKC), kapilární izoelektrickou fokusaci (IEF), elektrochromatografii v naplněných kapilárách (CEC), bioafinitní kapilární elektroforézu (BACE). Některé z nich budou podrobněji popsány dále.

1.2 Obecné principy elektroforézy

O obecných principech elektroforézy pojednávají například práce [1, 2].

Jestliže umístíme i -tou částici s nábojovým číslem z do elektrického pole o intenzitě E , působí na ni síla elektrického pole F_e :



Obrázek 1.1: Obecné schéma elektroforetického přístroje.

$$F_e = zeE, \quad (1.1)$$

kde e je elementární náboj ($1,602 \cdot 10^{-19} C$). Pohyb vyvolaný působením této síly je brzděn frikční silou prostředí. Pokud má daný ion poloměr r , pak velikost frikční síly F_f můžeme vyjádřit Stokesovým zákonem:

$$F_f = 6\pi\eta r v_i, \quad (1.2)$$

kde v_i je rychlost pohybu iontu a η je viskozita prostředí. Jedná se o síly stejného směru, ale opačné orientace. Ve velmi krátké době ($10^{-13} - 10^{-10}$ s) dojde k vyrovnání obou sil:

$$F_f = F_e \quad (1.3)$$

a částice se začne pohybovat konstantní rychlostí. Velikost rychlosti je úměrná intenzitě elektrického pole E :

$$v_i = \text{sgn}(z)u_i E, \quad (1.4)$$

kde u_i je nezáporná veličina nazývaná iontová mobilita. Ze vztahu (1.3) s použitím rovnice (1.4) můžeme odvodit:

$$u_i = \frac{|z|e}{6\pi\eta r}. \quad (1.5)$$

Z této rovnice vyplývá, že iontová mobilita je přímo úměrná náboji iontu a nepřímo úměrná jeho poloměru a viskozitě roztoku. Iontové mobility jsou charakteristiky jednotlivých iontů, které jsou vztažené k danému prostředí a teplotě. Mobility iontů silných elektrolytů vztažené k dané iontové síle a teplotě se nazývají aktuální mobility. Mobility

iontů v nekonečném zředění se nazývají limitní mobility. Limitní iontové mobility pro teplotu 25°C jsou tabelované chemické konstanty.

Pokud bychom se zabývali migrací slabých elektrolytů, je zřejmé, že mobility takových látek budou závislé na stupni disociace a tudíž na pH prostředí. Mobilita slabých elektrolytů vztahovaná k danému pH, teplotě a iontové síle se nazývá efektivní mobilita. Efektivní mobilitu i -té komponenty roztoku lze vyjádřit:

$$u_{eff,i} = \sum_{z=n_i}^{p_i} \text{sgn}(z) u_{i,z} \alpha_{i,z} = \frac{v_i}{E}. \quad (1.6)$$

V této rovnici je $u_{i,z}$ aktuální mobilita dané iontové formy (s nábojovým číslem z) komponenty i a součet probíhá přes všechny iontové formy. Molární zlomek iontové formy s nábojovým číslem z , $\alpha_{i,z}$ spočítáme:

$$\alpha_{i,z} = \frac{c_{i,z}}{c_i}, \quad (1.7)$$

zde $c_{i,z}$ je koncentrace příslušné iontové formy a c_i je analytická koncentrace i -té komponenty. Celkovou elektroforetickou rychlost i -té komponenty značíme v_i (viz. rovnice 1.6).

K celkovému pohybu iontů často přispívá také elektroosmóza. Povrch křemenných kapilár je tvořen silanolovými skupinami (OSi-OH), které se ve vodě chovají jako slabá kyselina a disociují. Na stěnách je vázaný náboj, který je ve vrstvě roztoku u stěn kompenzován volnými ionty. Elektrické pole působí na tento přebytek volného náboje a uvede vrstvu do pohybu. Ta poté strhne celý průřez roztoku, čímž způsobí tok celého objemu kapiláry. Chování elektroosmotického toku (EOF) je velmi závislé na složení roztoku.

Základní charakteristikou roztoku je experimentálně dostupná veličina nazývaná specifická vodivost κ :

$$\kappa = F(u_{HCH} + u_{OHCOH} + \sum_{i=1}^N \sum_{z=n_i}^{p_i} |z| u_{i,z} c_{i,z}). \quad (1.8)$$

Součet probíhá přes všechny komponenty roztoku (je jich N) a v případě, že se jedná o slabé elektrolyty vyskytující se ve více iontových formách, pak i přes všechny tyto formy. První dva příspěvky odpovídají iontům rozpouštědla (H^+ a OH^- iontům).

V případě, že známe specifickou vodivost vodiče a proudovou hustotu j (proud vztahovaný na jednotku plochy), dokážeme určit intenzitu elektrického pole z Ohmova zákona:

$$j = \kappa E. \quad (1.9)$$

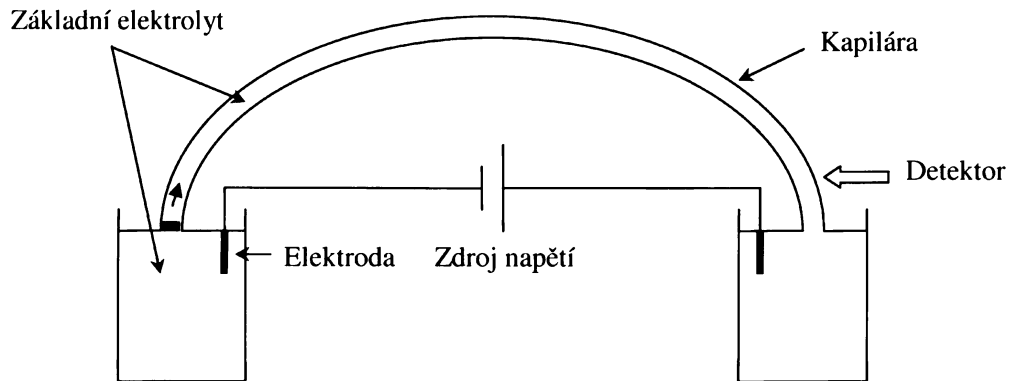
Podrobněji bude teorie týkající se elektromigrace popsána ve druhé kapitole (oddíl 2.3).

1.3 Základní experimentální uspořádání elektroforézy

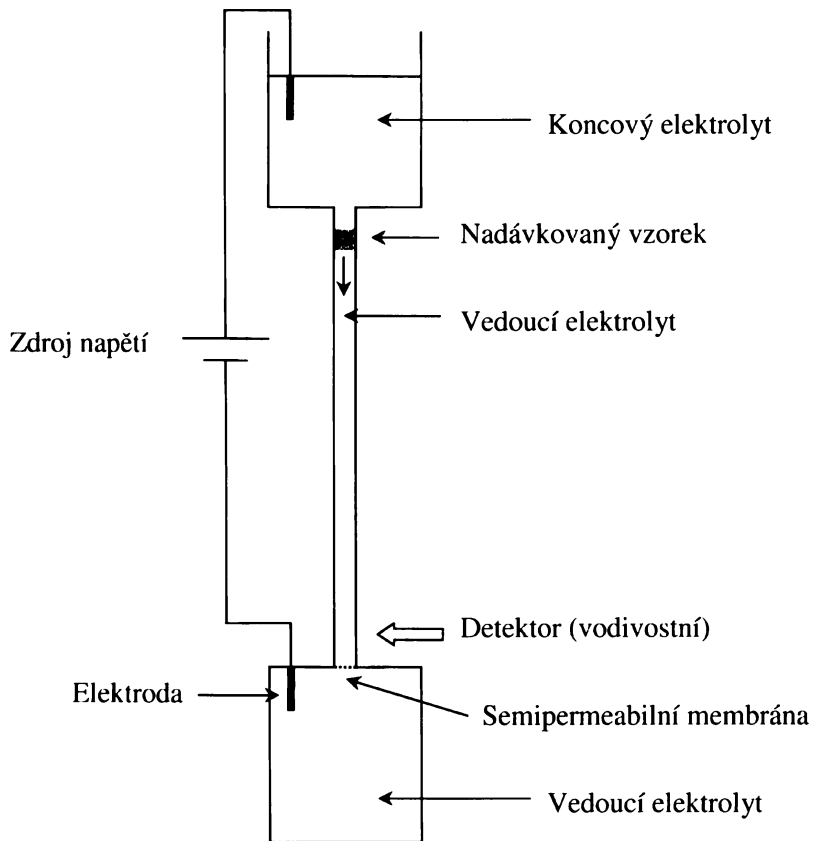
Kapilární zónová elektroforéza (CZE) je, jak název napovídá, kapilární technika. Její schematické znázornění je zobrazeno na obrázku 1.2. Kromě toho, že celá separace probíhá v tenké kapiláře (vnitřní průměr bývá 20-100 μm), jsou pro toto uspořádání charakteristické dvě věci. Za prvé je celý separační systém naplněn homogenním roztokem nazývaným základní elektrolyt (*background electrolyte*, BGE), za druhé je vzorek dávkován nejlépe v menším množství na jednom konci kapiláry. Separované látky se dělí na základě různých elektroforetických rychlostí v daném prostředí. Je zřejmé, že cílem každého analytického chemika je najít takové prostředí (BGE), ve kterém se elektroforetické rychlosti jednotlivých separovaných látek budou co nejvíce lišit. Je vhodné dávkovat vzorky v malém množství, protože vzorek pak prakticky nemění vodivost základního elektrolytu a rovnice popisující migrace látek lze považovat za lineární. Tvary píků jednotlivých látek, které jsou rozmnývány difuzí, nabývají Gaussovských tvarů. V případě dávkování velkého množství vzorku může docházet k významnějším změnám ve vodivosti v oblasti dávkovaného vzorku. V tomto případě nelze rovnice považovat za lineární a jejich nelinearita se projeví fenoménem elektromigrační disperze. Výsledné píky látek nabývají trojúhelníkovité tvary. Kapilární uspořádání také zaručuje dobrý odvod Jouleova tepla, což dovoluje použít vysokých intenzit elektrického pole a zvýšit tak účinnost a rychlost separací. Nejčastějšími detektory pro CZE jsou UV absorpční detektory.

Izotachoforéza (ITP) je elektroforéza realizovaná v diskontinuálním systému elektrolytů. Schematické znázornění ITP je zobrazeno na obrázku 1.3. Vzorek iontů určených k separaci (kationty nebo anionty) se dávkuje mezi tzv. vedoucí a tzv. koncový elektrolyt. Tyto elektrolyty musí být voleny tak, aby mobility separovaných iontů byly menší než mobility příslušných iontů (kationtu, či aniontů) ve vedoucím elektrolytu a zároveň větší než mobility iontů v koncovém elektrolytu. Protion vedoucího elektrolytu se volí tak, aby měl pufrací kapacitu při daném pH separace (protion koncového elektrolytu může být víceméně libovolný). V ideálním případě se po určité době od aplikace stejnosměrného elektrického pole ustaví ustálený (stacionární) stav. Při tomto stavu putují ionty stejnou rychlostí v oddělených zónách vyrovnané podle velikostí svých mobilit. Zóny jsou odděleny ostrými rozhraními, které jsou udržovány tzv. samozaostřovacím efektem. K detekci iontů se v případě ITP nejčastěji používá vodivostní detektor. Výsledný elektroferogram systému, který dosáhl ustáleného stavu, má klasický stupňovitý průběh. Výška stupně odpovídá kvalitě separované látky a délka je úměrná kvantitě. Koncentrace iontů univalentních elektrolytů nebo multivalentních silných elektrolytů v jejich zónách lze zjistit pomocí Kohlrauschovy regulační funkce.

Izoelektrická fokusace (IEF) je technika používaná pro separace amfoterních látek, zejména proteinů. Schematické znázornění ITP je zobrazeno na obrázku 1.4. Tato metoda je založená na principu separace látek s rozdílnými izoelektrickými body (pI) v uměle vytvořeném pH gradientu. Tento gradient může být vytvořen na speciálních gelových matricích nebo také přímo v roztoku v kapiláře. V tom případě se k jeho generování

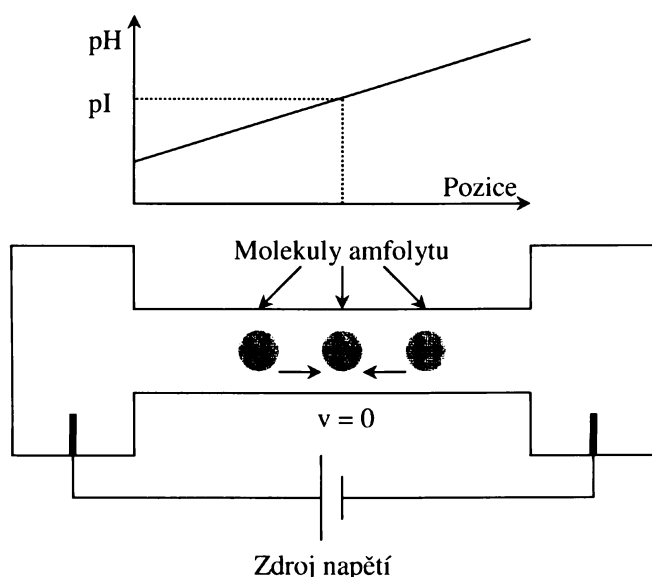


Obrázek 1.2: Schematické znázornění uspořádání kapilární zónové elektroforézy. Délka křemenné kapiláry je typicky 10 - 100 cm.



Obrázek 1.3: Schematické znázornění uspořádání izotachoforézy.

používá směs mnoha nosných amfolytů majících různé izoelektrické body. Separované látky migrují kapilárou rychlostí, která je úměrná jejich náboji. V případě, že dosáhnou místa s pH odpovídajícím jejich pI, celková elektroforetická rychlost je nulová a látka se v tomto místě kumuluje. Dochází tedy k fokusaci látek na místa, kde pH odpovídá jejich pI. Pohyb obsahu kapiláry směrem k detektoru se realizuje použitím tlaku případně změnou elektrolytů v elektrodočných nádobkách.



Obrázek 1.4: Schematické znázornění uspořádání izoelektrické fokusace.

Při micelární elektrokinetické chromatografii (MEKC) se do separačního systému přidává pseudostacionární fáze reprezentovaná micelami. Micely tvoří povrchově aktivní látky např. molekuly dodecylsulfátu sodného (SDS). Mají hydrofobní jádro tvořené alifatickými řetězci a hydrofilní obal nabitých sulfátových skupin. Protože jsou nabité, pohybují se v elektrickém poli. S micelami mohou interagovat neutrální látky a vytvářet přechodné komplexy (ty jsou samozřejmě v elektrickém poli také pohyblivé). Analyty tedy mohou být separovány, jestliže se liší jejich interakční konstanty s micelami.

Kapitola 2

Počítačová simulace elektromigrace

2.1 Počítačová simulace elektromigrace - přehled

V posledních letech se počítačová simulace stala nedílnou součástí teoretického výzkumu prakticky ve všech vědních disciplínách. Stejně tak je tomu i v případě teoretického studia elektroforetických separací. Velký rozvoj počítačových simulací byl umožněn obrovským rozvojem počítačových technologií obecně. Především kapilární zónová elektroforéza a izotachoforéza se staly velmi populárními ve smyslu porovnávání teoretických předpovědí s experimenty. Je to dáno především tím, že experimenty jsou většinou snadno proveditelné a reprodukovatelné a tím, že matematický aparát popisující děje při těchto technikách probíhající je relativně jednoduchý. Velká výhoda oproti například chromatografickým metodám je ta, že dokážeme přesně formulovat matematické rovnice popisující probíhající děje a k jejich řešení potřebujeme jen malý počet vstupních dat. To, že tyto rovnice jsou parciální diferenciální rovnice druhého řádu a že je dokážeme obecně řešit jen numericky, je jistá daň, kterou za tyto výhody musíme zaplatit.

Počítačovými simulacemi elektromigrace se zabývalo mnoho autorů. Já vycházím z obecného dělení softwaru pro simulaci elektromigrace, které ve svých článcích [3, 4, 5] prezentuje Reijenga. Programy rozděluje na tzv. "steady state" a dynamické. Prvně jmenované obsahují ve svých výpočtech nejruznější aproximace a neřeší numericky polybové diferenciální rovnice. Tyto programy jen na základě zjednodušení simulují výsledný elektroferogram. Naproti tomu dynamické programy jsou založeny na řešení diferenciálních rovnic a podávají kompletní náhled do dynamiky probíhajících dějů. Je zřejmé, že oba typy programů mají jisté výhody i nevýhody. Programy simulující jen výsledný elektroferogram jsou daleko jednodušší na ovládání, jejich výpočet není příliš náročný na výkon počítače a ve velmi krátké době (zlomky vteřin) nám poskytnou cennou informaci o elektroforetickém systému. Programy tohoto typu jsou velmi vhodné pro optimalizaci separačních podmínek konkrétního experimentu nebo pro tréninkové účely (právě v takovém kontextu o nich ve svých pracích Reijenga píše) a jsou určeny především pro analytickou praxi. Mohou se však s úspěchem použít jen v případech, kdy jsou splněny podmínky použitých aproximací (nejsou tedy obecně použitelné) a neposkytují nám náhled do dy-

namiky probíhajících dějů. Oproti tomu dynamické programy jsou obecně použitelné, lze s nimi simulovat jakýkoliv mód elektroforézy (CZE, ITP, IEF..., záleží pouze na formulaci počátečních a okrajových podmínek), a informují nás o dynamice probíhajících dějů. Tyto programy jsou náročnější na ovládání (uživatel musí mít alespoň základní znalost numerického algoritmu) a především na výkon počítače, takže se s nimi obvykle simuluje jen malá část separace.

Přestože se problematikou počítačových simulací elektromigrace zabývalo a zabývá relativně mnoho autorů, programů, které by byly dostupné koncovému uživateli, je velmi málo. Většina autorů implementuje matematický model formou počítačového programu, který používají pro teoretické studium nejrůznějších fenoménů elektromigrace. Veřejně dostupné jsou programy Reijengy a dalších [4, 5, 6, 7], které jsou nabízeny komerčně. Pro nekomerční účely jsou na internetové adrese [8] dostupné programy typu freeware vyvinuté na naší fakultě v laboratoři prof. Gaše.

Skupina autorů kolem Reijengy se intenzivně zabývala otázkami počítačových simulací. Vytvořili "steady state" programy simulující nejen elektroforetické separace, ale také chromatografické separace. Tyto programy nesou názvy GCSIM (simulace plynové chromatografie), HPLCSIM (simulace vysoce účinné kapalinové chromatografie), MECSIM (simulace micelární elektrokinetické chromatografie), HPCESIM (simulace kapilární zónové elektroforézy). Vytvořili také dynamický program pro simulace kapilární zónové elektroforézy a izotachoforézy [9].

V článcích [6, 7] je představen zmíněný počítačový program HPCESIM. Jedná se o rychlý "steady state" simulační program dovolující grafickou ilustraci několika efektů ovlivňujících výsledný elektroferogram kapilární zónové elektroforézy. Vstupními daty do programu jsou: a) *vlastnosti analytů*: pK_a konstanty, limitní iontové mobility pro teplotu 25°C, b) *instrumentální parametry*: délka kapiláry, vnitřní průměr kapiláry, tloušťka stěny kapiláry, zeta potenciál, teplota chlazení, napětí, polarita, c) *vlastnosti základního elektrolytu*: pH, iontová síla, efektivní mobility iontů. Grafický výstup simuluje výsledný elektroferogram. Program byl napsán v prostředí QuickBasicu a podporuje možnost síťového spuštění (proto je vhodný pro pedagogické účely). Obsahuje v sobě databázi analytů s jejich pK_a konstantami a limitními iontovými mobilitami [10, 11, 12], takže usnadní práci uživateli. Při zadávání stačí vybrat látku ze seznamu. Simuluje se tzv. lineární mód elektroforézy. Předpokládá se, že se analyty vzájemně neovlivňují a pohybují se v homogenním prostředí tvořeném základním elektrolytem. Teoretický model je založený na výpočtech migrace a disperze jednotlivých látek. Pro uzavřené systémy se migrační čas látky t_m počítá podle vzorce:

$$t_m = \frac{L_d}{Eu_{ef}}, \quad (2.1)$$

kde L_d je délka kapiláry k detektoru, E je intenzita elektrického pole (počítaná z vkládaného napětí a celkové délky kapiláry) a u_{ef} je efektivní mobilita analytu vztahovaná ke konkrétnímu pH, iontové síle a teplotě. U otevřených systémů se přidá příspěvek elektroosmotického

toku. Zajímavá je především korekce efektivních mobilit na konkrétní teplotu, která se provádí iteračním procesem. Nejprve se spočítá hodnota proudu s hodnotou specifické vodivosti pro teplotu chlazení, poté se spočítá teplota s příspěvkem disipované energie (konkrétní vzorce viz. článek [6]), následně se upraví hodnota specifické vodivosti (teplotní závislost 2,5% na 1°C) a znovu se provádí výpočet proudu. Jakmile hodnota specifické vodivosti splní konvergenční kritérium, výpočet se zastaví. Hodnoty efektivních mobilit všech analytů se upraví na konečnou hodnotu teploty. Vzorce pro korekce efektivních mobilit analytů na konkrétní iontovou sílu lze nalézt ve zmíněném článku. Model popisující disperzi je založen na modelu teoretických pater. Všechny zohledněné faktory mající vliv na disperzi píků látek jsou považovány za nezávislé. Celková výška teoretického patra H je počítána jako součet dílčích výšek teoretických pater jednotlivých faktorů H_i :

$$H = \sum_i H_i. \quad (2.2)$$

Uvažovány jsou vlivy dávkování vzorku, difuze, termální disperze, disperze způsobené elektroosmotickým tokem, elektromigrační disperze. K výpočtům vlivu těchto jevů jsou použity vzorce vyskytující se v literatuře (konkrétně viz. článek [6]). Je však třeba připomenout, že program v sobě obsahuje určitá zanedbání a aproximace. Například není uvažován vliv adsorpčních efektů vedoucích k nesymetrickým píkům, předpokládá se, že analyty se během separace vzájemně neovlivňují, mobility jsou brány jako závislé na teplotě, pK_a konstanty nikoliv.

V článku [7] jsou porovnány výsledky programu HPCESIM s experimenty a prezentován vliv jednotlivých faktorů na výsledný elektroferogram. Je zde například předveden vliv doby dávkování vzorku na rozlišení píků analytů a také rozdíl mezi dávkováním z vody a z konkrétního pufru. Současně je demonstrován vliv elektroosmózy (ovlivňuje celkovou dobu migrace), pH (ovlivní selektivitu i účinnost), či iontové síly. Výsledky experimentu jsou konfrontovány s výsledky simulací.

Program byl později rozšířen o možnost simulací chirálních separací v kapilární zónové elektroforéze [4]. V případě těchto simulací musí uživatel do programu navíc zadat koncentraci chirálního selektoru, konstanty tvorby komplexu s chirálním selektorem neiontové a iontové formy analytu, relativní rozdíly mezi těmito konstantami obou optických izomerů, mobilitu komplexu analyt-selektor, poměr enantiomerů ve směsi, parametry týkající se změny mobilit komponent roztoku se změnou viskozity způsobenou přidáním chirálního selektoru. Výpočet výsledných mobilit a migračních časů je opět založen na jednoduchém "steady state" modelu, který pro výpočet mimo jiné předpokládá malé množství analytů ve srovnání s chirálním selektorem. V případě znalosti potřebných parametrů může být tento program vhodný nástroj například pro stanovení optimální koncentrace chirálního selektoru. Implementace programu HPCESIM pro operační systém MS Windows nese název CESIGHT a jejím tvůrcem je Martens.

Reijenga a další také vytvořili dynamický program pro simulace CZE a ITP. Tento program je představen v práci [9], kde jsou také relativně podrobně diskutovány jednotlivé

výpočetní algoritmy pro numerické řešení parciálních diferenciálních rovnic, které migrace látek popisují, metodou sítí. V článku jsou popisovány jejich výhody i nevýhody z hlediska nežádoucích numerických oscilací. Postupně jsou prezentovány metody implicitní i explicitní a metody kombinované. Pro výpočty derivací podle prostorové proměnné jsou předvedeny: symetrické diferenční vzorce ("central difference scheme"), "upwind scheme" nebo "higher order scheme". Posledně jmenované jsou vhodné pro simulace velmi strmých koncentračních gradientů. Jak již bylo zmíněno, programem lze simulovat CZE i ITP, záleží jen na počáteční konfiguraci. V programu je možno vybrat výpočetní algoritmus, který lze během výpočtu měnit. Kapilára může být libovolně dlouhá, výpočet se provádí jen v určité oblasti. Testovacím kritériem pro správnost výpočtu je zákon zachování hmoty (v každém časovém kroku probíhá srovnání analytických koncentrací jednotlivých komponent s počátečními koncentracemi). Autoři hodnotí výpočetní algoritmy použité pro simulaci ITP, která dosáhne rovnovážného stavu, také porovnáváním s předpověďmi vytvořenými použitím Kohlrauschovy regulační funkce. Jako velmi výhodné se pro simulaci ITP ukázalo použít na začátek simulace implicitní výpočetní metody, symetrické diferenční vzorce, při přechodu k rovnovážnému stavu použít explicitní výpočetní metody s "higher order scheme".

Další skupina, která se významně podílela na rozvoji počítačové simulace elektromigrace je skupina autorů kolem Thormanna. Kniha s názvem: "The Dynamics of Electrophoresis" [13], jejímiž autory jsou Mosher, Saville a Thormann obsahuje mnoho důležitých informací týkajících se dynamiky elektroforézy. Jedna kapitola pojednává přímo o počítačové simulaci, dále je zde uveden rozsáhlý přehled znalostí v problematice elektromigrace do počátku devadesátých let. Je čerpáno především z prací Biera, Moshera a Thormanna. Tito autoři vyvinuli vlastní dynamický simulační program založený na principech elektroneutrality, zákona zachování hmoty a náboje. Matematický model je jednodimenzionální a mobility jednotlivých komponent roztoku jsou považovány jako nezávislé na iontové síle a teplotě (předpokládají se izotermické podmínky). Vstupními daty do programu jsou: počáteční rozložení koncentrací jednotlivých komponent, příslušné pK_a konstanty a limitní iontové mobility, velikost konstantní proudové hustoty, či napětí, délka kapiláry a její segmentace. Výstupem je: profil koncentrací jednotlivých komponent, profil pH, profil specifické vodivosti, proudová hustota jako funkce času. Program dovoluje používat až 150 konstituentů, které mohou být jednomocné slabé kyseliny, či báze nebo biprotní amfolyty. Autoři však program nezveřejňují (v článku [14] je zmíněno, že práce s programem může být prezentována v domovských laboratořích na Univerzitě v Bernu a Tasmanii). Jejich poslední práce se zabývají simulací prekoncentrace slabých bází s využitím pohyblivého pH rozhraní [14] a simulací dynamiky izoelektrické fokusace [15, 16].

V článku [14] se autoři věnují problematice prekoncentrace slabých bází. Zaměřují se na dynamiku procesu fokusace slabých bází na pohyblivém pH rozhraní. Jedná se o čistě teoretickou práci a jako prostředek k simulacím byl použit již dříve zmíněný počítačový program. Dále je zde diskutován vliv solí, konkrétně NaCl na schopnost prekoncentrace

slabých bází. Slabé báze se fokusují na pohyblivém pH rozhraní tvořeném z jedné strany pufrům o nízkém pH (2,85) a z druhé strany dávkovacím pufrům o vyšším pH (8,6). Oba pufry jsou složeny z kyseliny mravenčí a mravenčanu sodného. Během separace střídá pufr o nízkém pH pufr o vyšším pH v oblasti původní dávkovací zóny, způsobuje protonizaci analytů (slabé báze) a jejich pohyb k pomaleji se pohybujícímu pH rozhraní. Jakmile dosáhnou jeho přední strany, tedy oblasti pufru o vyšším pH, kumulují se zde, protože jejich rychlost v tomto prostředí je v ideálním případě velmi malá. Autoři zmiňují tři možné situace a předvádějí je na vlastních simulacích. První a také ideální situace nastane, jestliže rychlost analytu v pufru o nižším pH ($v_{A,E}$) je větší než rychlost pohybujícího se pH rozhraní (v_B) a ta větší než rychlost analytu v dávkovacím pufru o vyšším pH ($v_{A,S}$). V takovém případě nastává fokusace analytů popsaná výše. Jestliže $v_B > v_{A,E} > v_{A,S}$, potom protonizací urychlené analyty nedostihnou rychlé pH rozhraní a nemůže docházet k jejich koncentraci. V posledním případě, když $v_{A,E} > v_{A,S} > v_B$, pak jakmile urychlené analyty dostihnou pH rozhraní, nenakumulují se zde, ale předbíhají ho, a nedochází k významnému nakoncentrování. Autoři ve svých simulacích demonstrují vliv pK_a konstant slabých bází a jejich iontových mobilit na prekoncentraci. Dále je v článku prokázáno, že přidavek NaCl do dávkovacího pufru (pufr o vyšším pH) způsobí zpomalení pohybu pH rozhraní a dovolí tak nakoncentrovávat i slabší báze, či báze s nižšími iontovými mobilitami. Zpomalení pohybu pH rozhraní také snižuje délku kapiláry potřebnou pro separaci. Autoři se snažili o simulace s reálnými hodnotami proudových hustot, proto 50 mm simulované části kapiláry rozdělili na 20 000 segmentů a použili konstantní napětí 2000 V (to odpovídá velikosti intenzity elektrického pole 400 V/cm). Proudové hustoty odpovídaly hodnotám 17 000-23 000 A/m². Každá simulace však za takových podmínek trvala 5 dní a datové soubory přesahovaly velikost 450 MB.

V pracích [15, 16] se autoři věnují problematice izoelektrické fokusace. V článku [15] je simulacemi přiblížena dynamika této techniky (prezentované simulace se blíží realitě: k vytvoření pH gradientů typu pH 3-10 bylo použito 140 nosných amfolytů, použitá intenzita elektrického pole byla 300 V/cm). Ustavení pH gradientu nosnými amfolyty lze obecně rozdělit do dvou fází. První fáze se nazývá fáze separační. Při této fázi dojde k separaci nosných amfolytů a k vytvoření pH gradientu. Tento gradient však není zcela stabilní. K jeho stabilizaci dojde až v druhé fázi, tzv. stabilizační. Jelikož výsledný dynamický rovnovážný stav je difuzně kontrolovaný, je tato fáze mnohonásobně delší nežli fáze separační (obvykle trvá okolo 8000 minut). Autoři svými simulacemi dokazují, že tento stav není ve standardním laboratorním experimentu (kde se navíc ještě přidává vliv elektroosmózy a teplotní jevy) z důvodu dlouhého času dosažitelný. Dále je zde sledován vliv pK_a konstant a iontových mobilit nosných amfolytů na ustavování rovnovážného stavu. Obecný závěr prezentovaný v článku říká, že změny vedoucí ke snížení vodivosti systému (zvýšení rozdílu mezi pK_a konstantami jednotlivých biprotonních amfolytů, snížení jejich iontových mobilit) vedou ke snížení odezvy nosných amfolytů na elektrické pole a tudíž je čas potřebný k ustavení rovnovážného stavu delší. Izoelektrickou fokusací a jevy v ní

se vyskytujícími (například tzv. "plateau fenomén" typický pro rovnovážný stav nosných amfolytů s izoelektrickými body vyššími než 9 a nižšími než 5) se autoři dosti podrobně věnují v práci [13].

Práce [16] se zabývá studiem izoelektrické fokusace proteinů. Autoři používají výše zmíněný simulační program pro teoretické studium separace a výsledky simulací porovnávají s výsledky experimentů. V případě simulace separace proteinů jsou potřeba dva vstupní parametry: difuzní koeficient proteinu (sloužící k výpočtu hydrodynamického poloměru proteinu) a tabulková závislost celkového náboje proteinu na pH. Pomocí těchto parametrů program počítá efektivní mobilitu proteinů.

Další skupina, která se podílela na rozvoji počítačové simulace elektromigrace, je skupina autorů kolem Doseho. V práci [17] představují svůj simulační program, který využívají ke studiu dynamiky elektromigrace [18]. Opět se jedná o jednodimenzionální simulační program, komponentami roztoků mohou být jen silné elektrolyty. Ani tento model neuvažuje teplotní efekty. Model je stejně jako modely ostatních autorů založen na principu zachování hmoty a náboje a principu elektroneutality. Kapilára je rozdělena na N segmentů a diferenciální rovnice popisující pohyb iontů jsou řešeny metodou sítí. Pro výpočet derivací podle prostorové proměnné jsou použity symetrické diferenční vzorce. Na začátku a na konci kapiláry jsou fiktivní rezervoáry s konstantními koncentracemi všech látek, které se nezahrnují do výpočtů, jen jsou jejich hodnoty použity k výpočtu derivací v sousedních segmentech. Výsledkem simulace může být profil koncentrace jakékoliv látky v čase nebo elektroferogram (časová závislost koncentrací všech látek v konkrétním bodě) v libovolném bodě (simuluje detektor v libovolné pozici). Implementovaný algoritmus sleduje, v jakých segmentech se hodnoty prvních i druhých derivací rovnají nule, tyto segmenty jsou označeny jako inaktivní (nedochází ke změnám koncentrací) a není v nich nadbytečně počítána intenzita elektrického pole, či změna koncentrace. Kontrola inaktivity je prováděna v každém výpočetním kroku. Program byl napsán v programovacím jazyku FORTRAN. V práci [17] autoři prezentují výsledky simulací provedených tímto programem, tj. simulace lineárního i nelineárního módu CZE i simulace ITP. Článek [18] se věnuje simulacím distorze pík analytů v základním elektrolytu složeném ze dvou druhů koiontů (všechny elektrolyty jsou silné).

Otázkami simulací elektromigrace se zabývali také Ermakov a další. V práci [19] představují vlastní dynamický simulátor. Jejich model je schopný simulovat separace slabých univalentních kyselin a bází. Opět se jedná o jednodimenzionální model nezahrnující teplotní efekty a předpokládající homogenitu obsahu kapiláry ve vertikálním směru (kolmém na směr migrace). Ve zmíněné práci autoři prezentují simulace ITP slabých jednosytných kyselin. Nejprve jsou stanoveny podmínky stability rozhraní zón a předpovědi simulací, které jsou posléze dokázány samotnými simulacemi. V článku je ukázáno, že v závislosti na složení vedoucího elektrolytu je možno rozdělit dvě slabé kyseliny v obou možných pořadích, případně rozdělení nedosáhnout a získat tzv. "mixed zone". Dělení závisí jen na pH pufru vedoucího elektrolytu. Ermakov se ve svých dalších pracích zabýval ITP v ky-

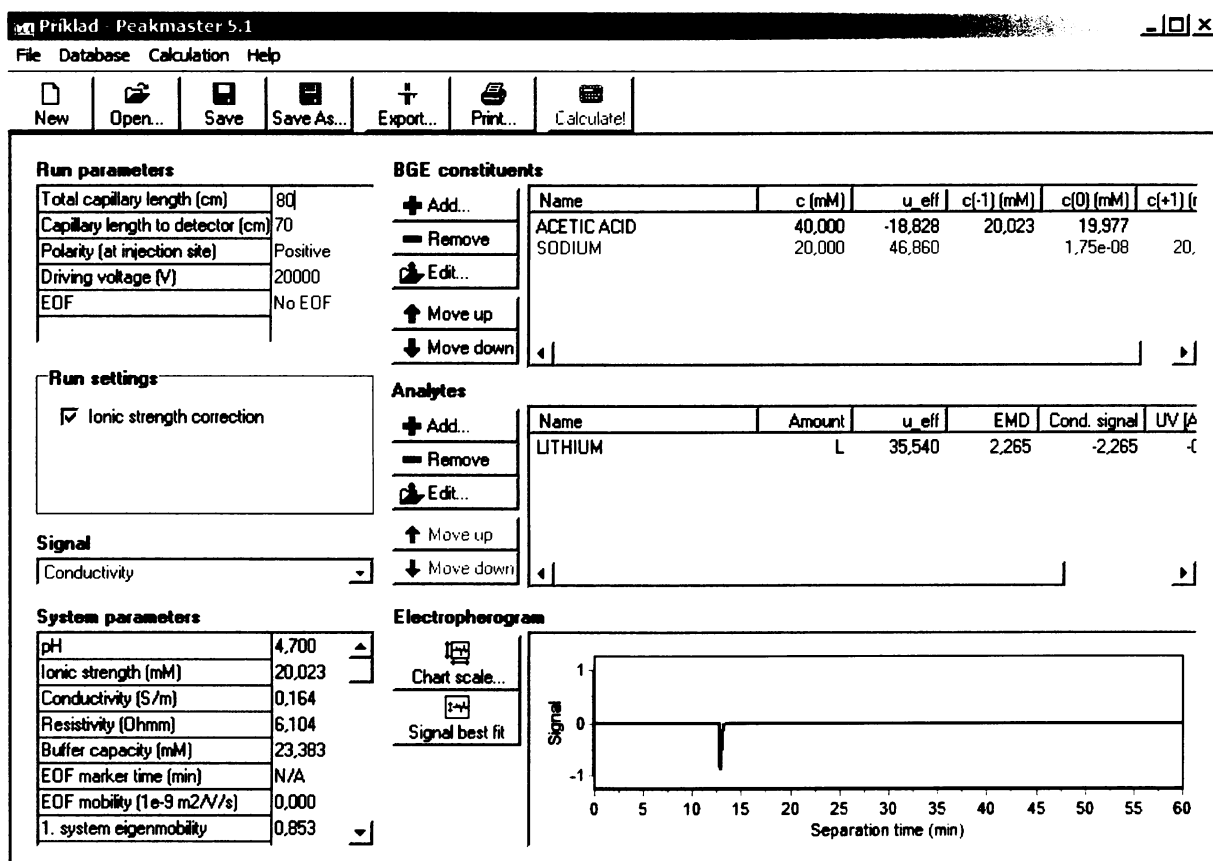
selých a bazických oblastech [20], porovnáváním numerických algoritmů řešících soustavy diferenciálních rovnic [21] nebo také simulací migrace v mikrokanálech [22].

2.2 Simulační programy vyvinuté v naší laboratoři

Jak již bylo zmíněno, simulační programy vyvinuté na naší fakultě v laboratoři profesora Gaše zaujímají mezi ostatními simulátory elektroforézy jedinečné místo. Programy PeakMaster a Simul jsou totiž dopracované do uživatelsky příjemné formy (hlavní formuláře obou programů viz. obrázky 2.1 a 2.2) a jsou na internetové adrese [8] nabízeny zdarma pro nekomerční užití.

Program PeakMaster je díky snadné obsluze a velké rychlosti výpočtů určen především pro analytickou praxi. Tento program nesimuluje dynamiku probíhajících procesů, ale jen výsledný elektroferogram. Velkou předností oproti jiným programům je schopnost určovat mobility všech systémových zón (eigenzón). Skupina profesora Gaše navázala na Poppeho, který vypracoval metodu, ve které linearizoval rovnice elektromigrace a ukázal, že jejich řešení vede k maticovému problému vlastních čísel ("eigenvalue problem"). Vytvořili matematický model založený na linearizovaných rovnicích popisujících elektromigraci a pojmenovali vlastní čísla matice, které mají význam mobilit, eigenmobilitami. Dále ukázali, že eigenzóny (zóny pohybující se s příslušnými eigenmobilitami) lze rozdělit do dvou druhů. První z nich se pohybují stejnou rychlostí jako analyty (změny v koncentraci komponent základního elektrolytu, které doprovázejí pohyb analytů). Druhý typ jsou tzv. systémové eigenzóny. Ty se pohybují v kapiláře nezávisle na přítomnosti analytů a je-li použita nepřímá nebo vodivostní detekce, mohou zkomplikovat detekci analytů. Svě výsledky prezentovali v sérii článků zakončených prací představující zmíněný program PeakMaster [23]. Vstupními daty do programu jsou: koncentrace jednotlivých komponent základního elektrolytu a množství analytů, příslušné limitní iontové mobility, pK_a konstanty (k dispozici je databáze Hirokawových dat [10, 11, 12]), délka kapiláry, délka kapiláry k detektoru, polarita, napětí, mobilita EOF a výběr typu detekce (k dispozici jsou přímá pro konkrétní analyt, nepřímá pro konkrétní složku základního elektrolytu a vodivostní). Výsledkem je nejen elektroferogram, ale také vypočítané některé důležité hodnoty, např. mobility všech systémových zón, pH nebo pufrační kapacita roztoku, velikost elektromigrační disperze analytů. Je třeba připomenout, že program PeakMaster lze využít jen v případech simulace CZE, kdy množství analytu nadávkovaného do prostředí základního elektrolytu je relativně malé ve srovnání s množstvím základního elektrolytu, protože jen tehdy je linearizace rovnic popisujících elektromigraci ospravedlnitelná. Poslední verze programu (verze 5.2) představená v práci [24] dokáže ze znalosti experimentálního uspořádání počítat všechny parametry nejen píků odpovídajících jednotlivým analytům, ale také systémových píků.

Problematikou systémových zón se zabývalo mnoho autorů. V článku [25] je uveden přehled znalostí o systémových zónách.



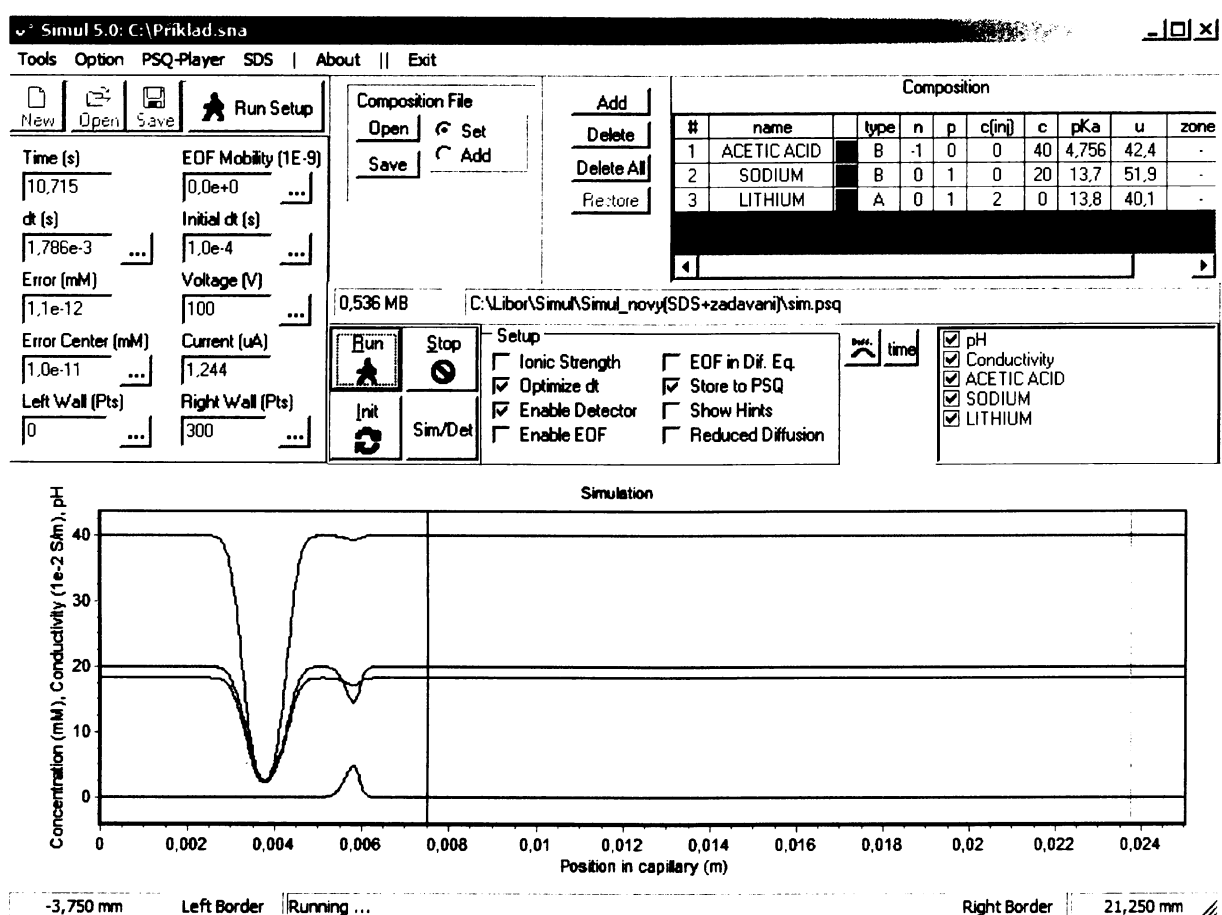
Obrázek 2.1: Hlavní formulář programu PeakMaster (verze 5.1).

2.3 Simul 5.0

Dynamický simulátor elektroforézy nese název Simul. Program Simul zaujímá v této práci důležité postavení, proto bude probrán podrobněji. Poslední verze byla představena v článku [26]. V době psaní této bakalářské práce Mgr. Vlastimil Hruška rozšiřoval tuto verzi a vytvářel uživatelsky příjemnější prostředí. Program dokáže pracovat s libovolným počtem multivalentních elektrolytů a amfolytů. Jedná se o mocný nástroj pro simulaci elektroforézy v jakémkoliv módu (CZE, ITP, IEF, ...). Navíc dokáže uvažovat vliv iontové síly na mobilitu a aktivitu jednotlivých iontů. Mezi jeho typické použití patří: vyšetřování systémových zón, simulace prekoncentrací, rezonance, optimalizace experimentů atd. "Silným" se stává zejména ve spolupráci s programem PeakMaster. Na rozdíl od něj je však ovládání tohoto programu poněkud složitější, proto je určen především pro zkušenější uživatele.

Matematický model implementovaný do softwareové podoby je jednodimenzionální (uvažuje se pouze axiální prostorová proměnná x) a vychází z rovnice kontinuity, rovnováhy autoprotolýzy vody a disociačních rovnováh jednotlivých komponent roztoku a rovnice elektroneutality. Základy uvedeného matematického modelu jsou následující:

Látkový tok i -té látky J_i vyjadřuje její látkové množství prošlé jednotkovou plochou za jednotku času:



Obrázek 2.2: Hlavní formulář programu Simul (verze 5.0).

$$J_i = \frac{1}{A} \frac{\partial n_i}{\partial t}. \quad (2.3)$$

Použité symboly mají obvyklý význam: A - plocha, n_i - látkové množství i -té látky, t - čas. Jestliže se i -tá komponenta roztoku může vyskytovat v několika formách, pak pro celkový látkový tok i -té komponenty J_i můžeme napsat:

$$J_i = \sum_{z=n_i}^{p_i} J_{i,z}, \quad (2.4)$$

kde $J_{i,z}$ jsou látkové toky jednotlivých forem komponenty a součet probíhá přes všechny tyto formy. V matematickém modelu implementovaném do programu Simul jsou uvažovány tři příspěvky k látkovému toku: konvekce, difuze a elektromigrace:

$$J_{i,z} = J_{i,z}^{konv} + J_{i,z}^{dif} + J_{i,z}^{mig}. \quad (2.5)$$

Pro látkový tok z -té formy i -té komponenty roztoku způsobený konvenkcí $J_{i,z}^{konv}$ můžeme psát:

$$J_{i,z}^{konv} = c_{i,z} v_{konv}, \quad (2.6)$$

kde v_{konv} je rychlost konvekce. Konvekce, tedy tok roztoku jako celku, může být způsobena například elektroosmotickým tokem ($v_{konv} = v_{EOF}$), rozdílem výšek hladin roztoků v elektrodových nádobkách, působením tlaku, atd. Pro látkový tok z -té formy i -té komponenty roztoku způsobený difúzí $J_{i,z}^{dif}$ platí:

$$J_{i,z}^{dif} = -D_{i,z} \frac{\partial c_{i,z}}{\partial x}, \quad (2.7)$$

kde $D_{i,z}$ je difuzní koeficient příslušné formy i -té komponenty. Pro elektromigrační příspěvek k látkovému toku z -té formy i -té komponenty roztoku $J_{i,z}^{mig}$ platí:

$$J_{i,z}^{mig} = \text{sgn}(z) c_{i,z} u_{i,z} E. \quad (2.8)$$

Kdybychom z rovnic (2.4), (2.5), (2.6), (2.7) a (2.8) dosadili do rovnice kontinuity pro i -tou komponentu:

$$\frac{\partial c_i}{\partial t} = -\frac{\partial J_i}{\partial x}, \quad (2.9)$$

dostali bychom:

$$\frac{\partial c_i}{\partial t} = \frac{\partial}{\partial x} \sum_{z=n_i}^{p_i} (D_{i,z} \frac{\partial c_{i,z}}{\partial x} - \text{sgn}(z) c_{i,z} u_{i,z} E) - v_{EOF} \frac{\partial c_i}{\partial x}. \quad (2.10)$$

Jestliže je v roztoku celkem N komponent, potom máme takových rovnic právě N . Pokud známe jednotlivé látkové toky, pak pro proudovou hustotu platí:

$$j = F \left[\sum_{i=1}^N \sum_{z=n_i}^{p_i} (z J_{i,z}) + J_H - J_{OH} \right]. \quad (2.11)$$

Zde jsou stejně jako v rovnici (1.8) odděleny příspěvky všech komponent roztoku a iontů rozpouštědla. Příspěvek konvekce k proudové hustotě je vlivem rovnice elektroneutality nulový. Dosazením z rovnic (2.5), (2.6), (2.7) a (2.8) do rovnice (2.11) a vyjádřením intenzity elektrického pole získáme:

$$E = \frac{j}{\kappa} - \frac{F}{\kappa} \left(-D_H \frac{\partial c_H}{\partial x} + D_{OH} \frac{\partial c_{OH}}{\partial x} - \sum_{i=1}^N \sum_{z=n_i}^{p_i} z D_{i,z} \frac{\partial c_{i,z}}{\partial x} \right). \quad (2.12)$$

Z této rovnice vyplývá, že intenzita elektrického pole v roztocích elektrolytů není jen prostý podíl proudové hustoty a specifické vodivosti, jak by tomu bylo podle Ohmova zákona (1.9), ale obsahuje ještě další příspěvek (druhý člen na pravé straně této rovnice). Tento příspěvek je způsoben různě velkou difúzí jednotlivých iontů. Celková proudová hustota je jako potřebný vstupní údaj do rovnice (2.12) buď zadaná (v případě módu konstantního proudu, používá se často pro simulace ITP), nebo se počítá z celkového vkládaného napětí děleného resistivitou elektrolytu integrovanou podél celé kapiláry (mód konstantního napětí). Příslušný mód si vybírá uživatel.

Koncentrace jednotlivých forem konkrétní komponenty roztoku jsou spolu spojeny řadou disociačních rovnováh. Pro ně můžeme psát:

$$\begin{aligned} K_{i,z} &= \frac{c_{i,z-1}c_H}{c_{i,z}}, z = 1, 2, \dots, p_i, i = 1, 2, \dots, N, \\ K_{i,z} &= \frac{c_{i,z}c_H}{c_{i,z+1}}, z = -1, -2, \dots, n_i, i = 1, 2, \dots, N. \end{aligned} \quad (2.13)$$

$K_{i,z}$ značí kyselé disociační konstanty, p_i a n_i jsou nejvyšší a nejnižší limity disociace dané látky. Koncentrace hydroxidových a vodíkových iontů jsou spojeny rovnicí:

$$K_W = c_H c_{OH}, \quad (2.14)$$

kde K_W je iontový produkt vody. V práci [27] je prezentováno, jak lze z rovnic (2.13) elegantním způsobem vyjádřit veličinu $\alpha_{i,z}$ jako funkci c_H (tedy vlastně pH). Poslední důležitou rovnicí je rovnice elektroneutality ($G(c_H)$ funkce):

$$c_H - c_{OH} + \sum_{i=1}^N \sum_{z=n_i}^{p_i} z c_{i,z} = 0. \quad (2.15)$$

V této rovnici je při znalosti analytických koncentrací jednotlivých komponent roztoku neznámá pouze c_H , protože koncentrace $c_{i,z}$ lze vyjádřit pomocí c_i a $\alpha_{i,z}$, viz. rovnice (1.7) a $\alpha_{i,z}$ je závislé pouze na c_H . Rovnice (2.15) se v programu Simul (ale také v programu PeakMaster) využívá k výpočtům pH.

Použitý matematický model je založený na rovnicích (1.8), (2.10), (2.12 - 2.15). V těchto rovnicích však není uvažován vliv iontové síly. Pokud uživatel v programu zapne korekci na iontovou sílu, potom se v každém časovém kroku a pro každý bod kapiláry v numerickém výpočtu upravují hodnoty iontových mobilit na příslušnou iontovou sílu s použitím Onsager-Fuossovy teorie a hodnoty koncentrací za účelem získání aktivit s použitím Debye-Hückelovy teorie.

Výsledné parciální diferenciální rovnice jsou řešeny numericky. Jsou sestaveny z rovnic (1.8), (2.10) a (2.12). Kapilára je rozdělena na n segmentů délky Δx ($\Delta x = L/n$, L je délka kapiláry), derivace podle prostorové proměnné jsou počítány pomocí symetrických diferenčních vzorců z koncentračního profilu známého v čase t :

$$\begin{aligned} \frac{\partial c(x)}{\partial x} &\sim \frac{c(x+1) - c(x-1)}{2\Delta x}, \\ \frac{\partial^2 c(x)}{\partial x^2} &\sim \frac{c(x+1) - 2c(x) + c(x-1)}{\Delta x^2}. \end{aligned} \quad (2.16)$$

Dojde tedy k nahrazení původních N parciálních diferenciálních rovnic typu (x, t) na nN obyčejných diferenciálních rovnic typu (t) . Časové diferenciální rovnice jsou řešeny metodou prediktor-korektor, tímto způsobem jsou získávány koncentrační profily v čase $t + dt$. Numerická metoda probíhá ve dvou krocích. Nejdříve prediktor odhadne novou

- Rozdělení kapiláry na n segmentů, počáteční koncentrační profil látky i : c_i .
- V každém bodě výpočet kořenů G -funkce Newtonovou metodou. Zisk c_H ! Grafický výstup - pH.
- Z hodnot c_H výpočet koncentračního profilu všech forem látky i : $c_{i,z}$.
- Jestliže se jedná o mód konstantního napětí, je potřeba spočítat také proudovou hustotu. Výpočet specifické vodivosti v každém bodě (grafický výstup - specifická vodivost), převod na resistivitu, proudová hustota je spočtená jako celkové napětí dělené resistivitou elektrolytu integrovanou podél celé kapiláry.
- Zisk koncentračního profilu látky i : c_i v čase $t + dt$: v každém bodě řešení soustavy nN obyčejných diferenciálních rovnic. Grafický výstup - c_i .

atd.

Obrázek 2.3: Schéma posloupnosti výpočtů v programu Simul.

hodnotu a tu pak korektor opraví. Rozdíl mezi predikcí a korekcí je využit k odhadu chyby kroku výpočtu, který slouží k automatické úpravě hodnoty dt . Počet bodů v kapiláře musí uživatel nastavit dostatečně velký, aby nedocházelo ke zřetelným numerickým oscilacím. Obrázek 2.3 znázorňuje posloupnost výpočtů v programu Simul.

Vstupními daty do programu jsou: profil počátečních koncentrací jednotlivých látek, vlastnosti látek: pK_a konstanty, limitní iontové mobility všech forem, parametry experimentu: délka kapiláry, napětí, mobilita EOF, pozice detektoru, parametry důležité pro výpočty: počet bodů v kapiláře, požadovaná chyba, počáteční dt , možnost optimalizace dt (prediktor-korektor), zahrnutí EOF do diferenciálních rovnic, použití samotné difuze, pohyb či stálost výpočetních stěn a mnoho dalších. Program ulehčuje uživatelům práci s výsledky, dovoluje uložení průběhu simulace do videosouboru, který je možné kdykoliv v programu spustit (tzv. *PSQPlayer*).

Pro simulace uvedené v této bakalářské práci (kapitola 4.1) byla použita verze programu speciálně upravená Mgr. Vlastimilem Hruškou, která oproti na internetu volně dostupné verzi [8] obsahuje určité nadstavby. První z nich je tzv. micelární mód (příp. "SDS mode"). Tento mód umožňuje simulovat systémy obsahující povrchově aktivní látky typu dodecylsulfátu sodného (SDS) tvořící micely. Uživatel do programu mimo jiné zadává: kritickou micelární koncentraci povrchově aktivních látek, číslo agregace, mobilitu micel, mobilitu komplexu analyt-micela (pro jednotlivé analyty), pK konstantu tvorby komplexu s micelami (pro jednotlivé analyty). Model uvažuje rovnováhy tvorby komplexů neutrálních forem látek (pouze) s micelami. Tyto rovnováhy můžeme popsat rovnicemi:



kde A^0 znázorňuje neutrální formu analytu, M micelu a A^0M komplex analytu s micelou. Program s využitím znalosti analytické koncentrace SDS (případně jiné povrchově aktivní

látky) spočítá v daném čase analytické koncentrace micel ve všech bodech kapiláry (rozdíl koncentrace povrchově aktivní látky a kritické micelární koncentrace dělený číslem agre-gace) a ze soustavy rovnic pro rovnovážné konstanty reakcí (2.17) jednotlivých analytů zjistí, jaké množství konkrétní neutrální látky je v daném čase a místě prostoru ve formě komplexu s micelami. Toto množství analytu se pohybuje s mobilitou zadanou uživatelem.

Další nadstavba spočívá v možnosti simulace jen malé části kapiláry s tím, že program předpokládá zbytek kapiláry naplněný homogenním roztokem složením odpovídající pravému konci malé simulované části. Uživatel pak zadává jak velká je zbývající část kapiláry (tzv. "fake"). Hodnota napětí musí odpovídat napětí vkládanému na celou délku kapiláru (součet délky simulované části a "fake"). Například při simulacích odpovídajícím experimentům, kde byla použita kapilára délky 75 cm, můžeme simulovat jen 5 cm kapiláry s tím, že "fake" je dlouhý 70 cm. Do simulačního programu pak musíme zadat celkové napětí, které bylo při experimentu na 75 cm dlouhou kapiláru vkládáno. Tato úprava se ukázala být naprosto nezbytnou pro simulaci systému, kde vzniká lokální "nevodivá zóna". V případě simulace samotné krátké kapiláry má totiž lokální nevodivost velkou váhu a způsobí významný pokles elektrického proudu.

Program Simul byl stejně jako program PeakMaster napsán v prostředí C++ (Borland C++ Builder 6 Professional) a je určen pro platformu Microsoft Windows.

V práci [28] využívají autoři programu Simul (verze 4) jako nástroje k simulacím a studiu prekoncentrací fenolových derivátů metodou "dynamic pH junction".

Kapitola 3

Cíle práce

1. V rámci rešeršní části práce podat přehled o stavu problematiky počítačové simulace elektromigrace.
2. Představit rozšířenou verzi programu Simul 5.0 (o micelární mód).
3. Simulacemi "sweepingu" prezentovat micelární mód.
4. Pomocí rozšířené verze programu Simul 5.0 nasimulovat prekoncentraci kyseliny benzoové na pH rozhraní dvou různých pufrů a její následný "sweeping" a potvrdit předpoklady vytvořené na základě experimentů.

Kapitola 4

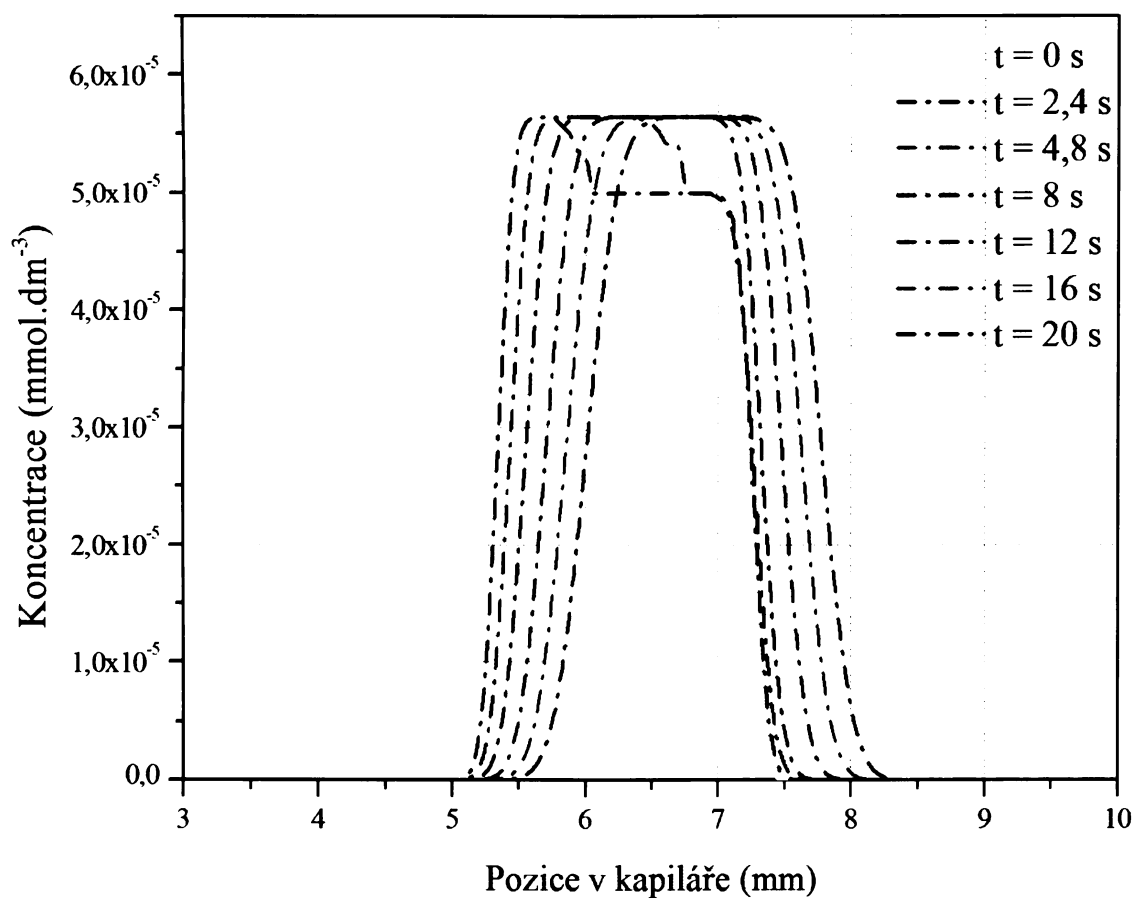
Praktická část

4.1 Provedené simulace a jejich diskuse

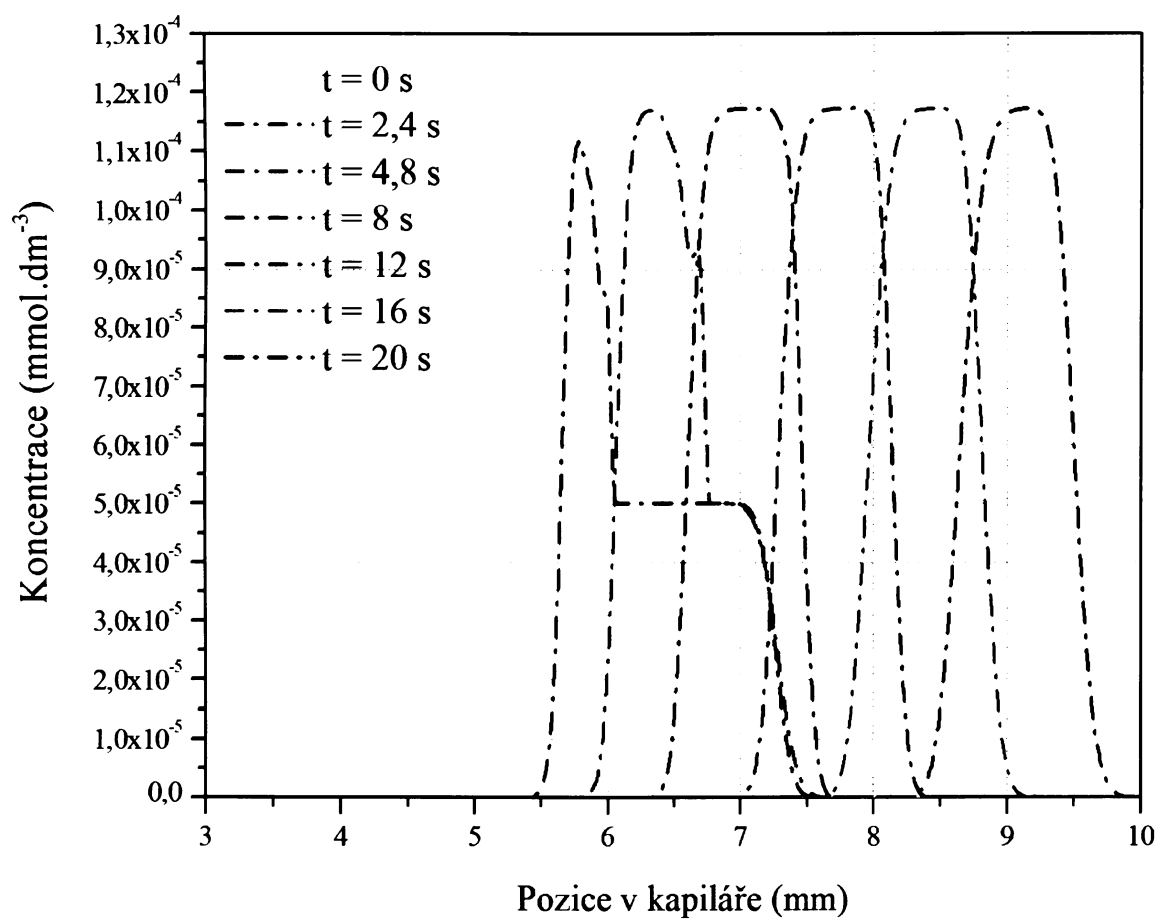
Jedním z cílů této bakalářské práce bylo seznámení s programem Simul a provedení simulace konkrétního elektroforetického systému. Simulace prezentují micelární mód (obrázky 4.1 a 4.2) a prekoncentraci kyseliny benzoové (obrázky 4.3, 4.4 a 4.5). Animace vytvořených simulací jsou přiloženy v multimediální příloze.

4.1.1 Simulace "sweepingu"

V prvním případě se jedná o simulaci dynamiky "sweepingu". Jako analyt je použita kyselina benzoová. Její koncentrace je v obou simulacích nastavena na hodnotu $5 \cdot 10^{-5}$ mmol.dm⁻³, šířka injekční zóny je 2 mm. Použitý pufr obsahuje kyselinu fosforečnou v koncentraci 50 mmol.dm⁻³ a hydroxid sodný v koncentraci 30 mmol.dm⁻³. V tomto pufru (pH = 2,43) je kyselina benzoová ($pK_a = 4,203$) disociována jen z 1,62% (výpočty provedeny programem PeakMaster) což znamená, že by se bez přítomnosti micel prakticky nepohybovala. Kyselina je do pohybu uvedena micelami dodecylsulfátu sodného (SDS). Koncentrace SDS nalevo od analytu (viz. příslušná animace v multimediální příloze) je 10 mmol.dm⁻³. Nastavení micelárního módu je pro všechny simulace stejné: mobilita micel - $40 \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$, mobilita komplexu kyseliny benzoové s micelami - $40 \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$, číslo agregace - 64, kritická micelární koncentrace - 0,5 mmol.dm⁻³. Kapilára má délku 25 mm, vnitřní průměr 50 μm (pro všechny simulace stejné) a je rozdělena na 2000 segmentů. Je použito napětí 200 V a záporné polarity. Obrázek 4.1 reprezentuje "sweeping" kyseliny benzoové, je-li pK konstanta tvorby komplexu s micelami nastavena na hodnotu -3. V případě obrázku 4.2 je tato hodnota -4. Hodnota této pK konstanty rovnající se -3 odpovídá 91% neutrální formy kyseliny benzoové ve formě komplexu s micelami, pokud je rovnovážná koncentrace micel 10 mmol.dm⁻³. Hodnota pK konstanty rovnající se -4 pak odpovídá 99% neutrální formy kyseliny benzoové ve formě komplexu. Proces "sweepingu" lze rozdělit do dvou fází. V první dochází k nakoncentrování (doslovnému "nametení" analytu), v druhé pak k pohybu analytu a postupnému rozmývání jeho koncentračního



Obrázek 4.1: Graf "sweepingu" kyseliny benzoové, pK konstanta tvorby komplexu s micelami je -3, ostatní parametry simulace viz. text.



Obrázek 4.2: Graf "sweepingu" kyseliny benzoové, pK konstanta tvorby komplexu s micelami je -4, ostatní parametry simulace viz. text.

profilu vlivem difuze (píky nabývají Gaussovských tvarů). Obrázky 4.1 a 4.2 prezentují, že v případě nižší pK konstanty tvorby komplexu s micelami dochází k většímu nakoncentrování v první fázi a rychlejšímu pohybu analytu, tudíž k menšímu rozmývání píků. Je zřejmé, že pro nakoncentrování jednoho typu analytu je nejvýhodnější co nejnižší pK konstanta. V případě MECK (viz. kapitola 1.3) je žádoucí rozdíl mezi pK konstantami jednotlivých analytů.

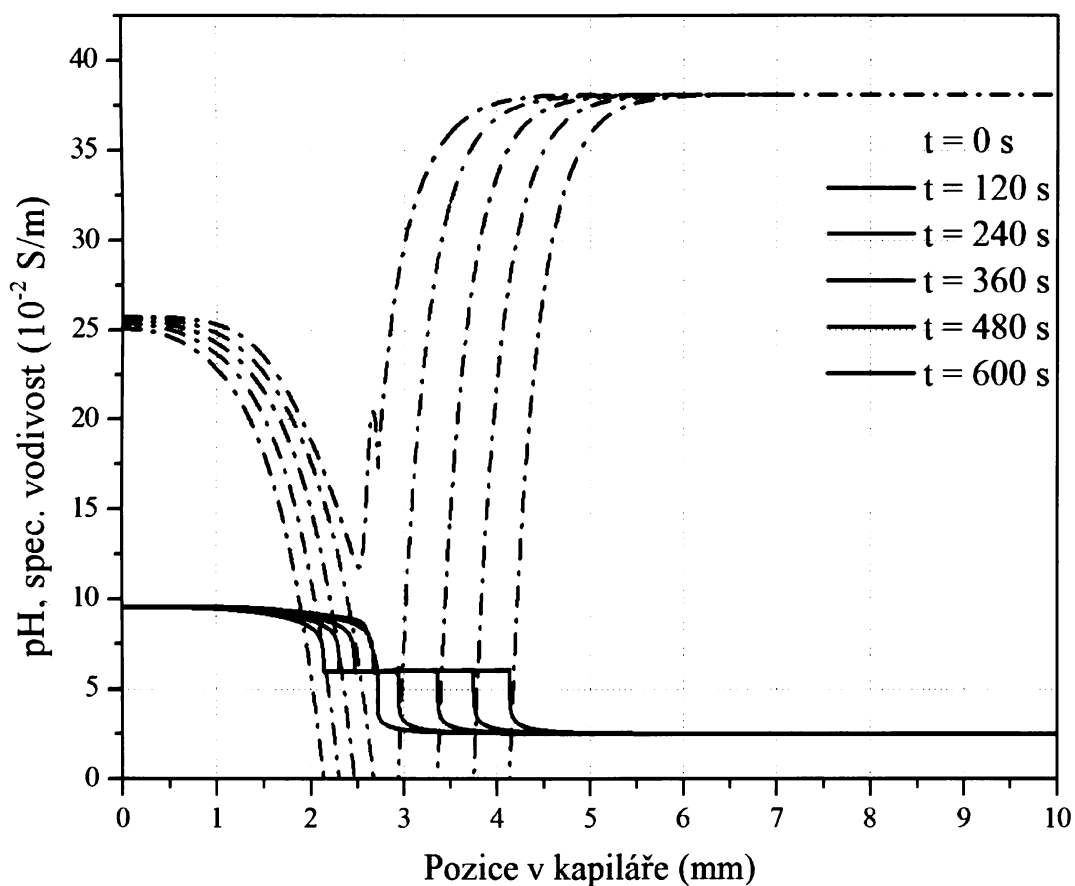
4.1.2 Simulace prekoncentrace kyseliny benzoové

Cílem těchto simulací bylo sledovat dynamiku prekoncentrace kyseliny benzoové na pH rozhraní dvou různých pufrů a následný "sweeping" nakoncentrované kyseliny pomocí micelárního módu. Tyto simulace doplňují experimenty provedené na Palackého univerzitě v Olomouci a měly by být součástí vznikajícího článku.

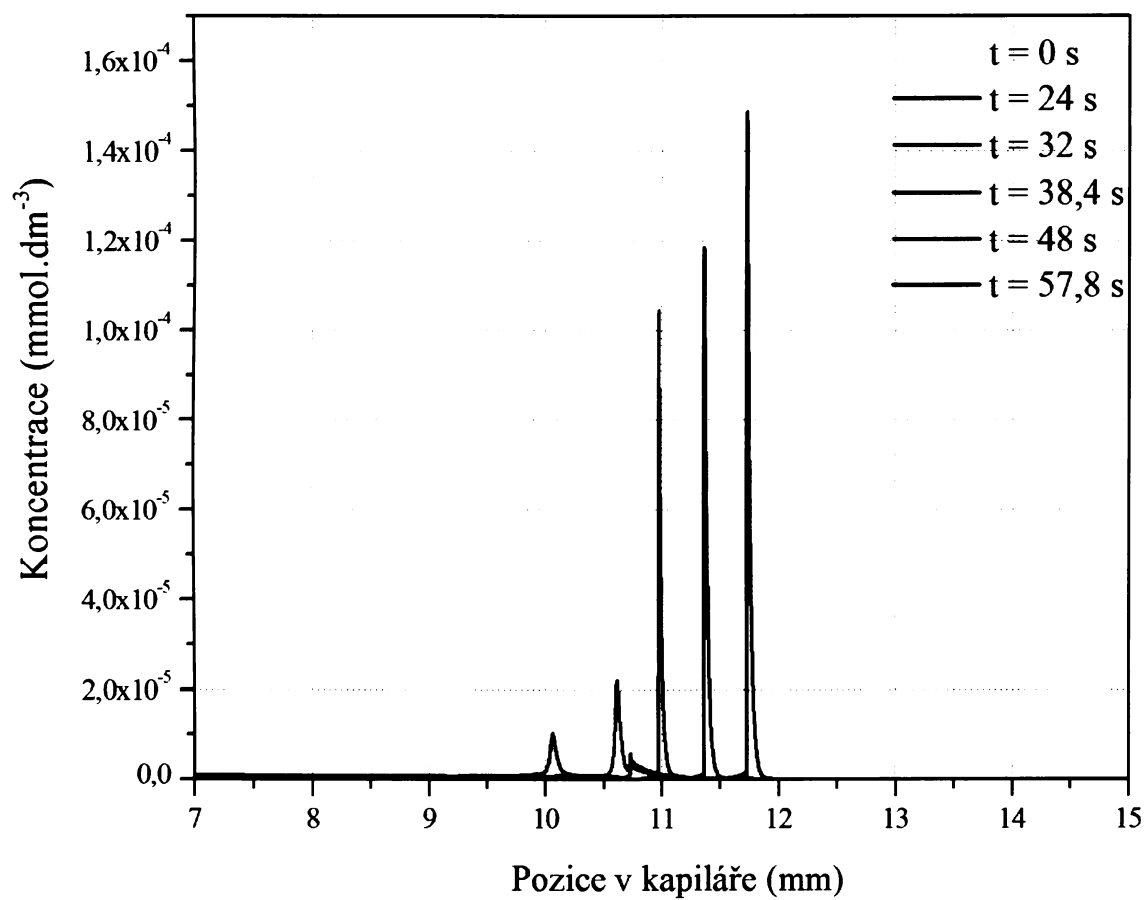
Elektroforéza jakožto účinná analytická separační metoda má samozřejmě také jisté nevýhody. Jednou z nich ve srovnání např. s vysoce účinnou kapalinovou chromatografií je nižší citlivost spektrofotometrické detekce způsobená kratší optickou dráhou v detektoru. Dávkování dovoluje použít jen omezených objemů vzorků, a proto prekoncentrace analytů hraje velmi důležitou roli při snižování detekčního limitu. Bylo vyvinuto mnoho prekoncentračních metod, za zmínku stojí především "field amplified stacking", "transient isotachopheresis", "dynamic pH junction" nebo "sweeping" (pro prekoncentraci nepolárních analytů). Experimenty provedené na Palackého Univerzitě v Olomouci si kladou za cíl předvést novou prekoncentrační techniku založenou na fokusaci analytů na pH rozhraní v kombinaci se "sweepingem". Tato metoda je vhodná např. pro prekoncentraci kyseliny benzoové nebo kyseliny sorbové. Tyto kyseliny se v potravinářství používají jako konzervační látky, proto by této metody mohlo být využito k jejich velmi citlivé detekci. Byly provedeny také experimenty analyzující složení pomerančového džusu nebo slunečnicového oleje.

Jak již bylo zmíněno, lze celou prekoncentraci rozdělit do dvou fází. Pro první bylo předpokládáno, že probíhá na rozhraní vstupní vialky a kapiláry. Na tomto místě se stýkají dva rozdílné elektrolyty. První, kterým je naplněna zbývající část kapiláry, je složen z 50 mmol.dm⁻³ fosfátového pufru o pH 2,5 (koncentrace sodného iontu v simulacích: 32,3 mmol.dm⁻³). Druhý elektrolyt (ve vstupní vialce) se skládá z 50 mmol.dm⁻³ borátového pufru o pH 9,5 (koncentrace sodného iontu v simulacích: 37 mmol.dm⁻³) a analytu, tedy kyseliny benzoové o příslušné koncentraci (pro simulace zvolena koncentrace 10⁻⁶ mmol.dm⁻³). Kyselina benzoová se pohybuje v borátovém pufru, dokud nedorazí na rozhraní s fosfátovým pufrům, kde se zastaví (není zde dále disociována) a dochází k jejímu nakoncentrování. V druhé fázi se vymění vstupní vialka za vialku obsahující stejný fosfátový pufr (pH = 2,5), ve kterém je navíc SDS o příslušné koncentraci (pro simulace zvolena koncentrace 150 mmol.dm⁻³).

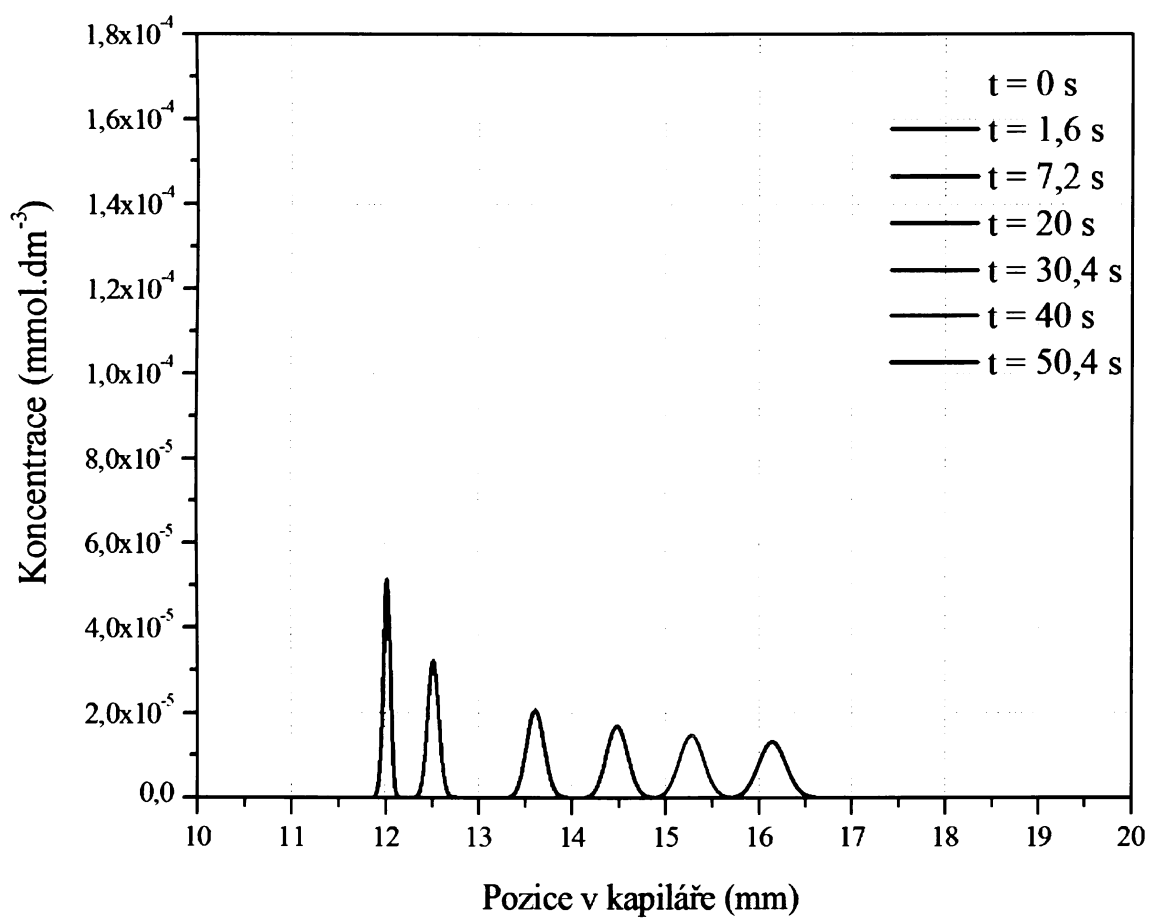
Simulovat oblast rozhraní vialky a kapiláry by bylo velmi obtížné (trojdimenzionální problém), proto jsem rozhraní elektrolytů umístil ve svých simulacích dovnitř kapiláry.



Obrázek 4.3: Graf vzniku v čase se rozšiřující "nevodivé zóny" a prezentace pohybu pH rozhraní. Profil specifické vodivosti představují čerchované křivky, profil pH plné. Délka kapiláry: 10 mm, segmentace kapiláry: 2000 bodů, napětí: 100 V (pro 75 cm dlouhou kapiláru), polarita: záporná, koncentrace komponent elektrolytů viz. text.



Obrázek 4.4: Graf fáze fokusace kyseliny benzoové na pH rozhraní. Parametry simulace viz. text.



Obrázek 4.5: Graf "sweepingu" kyseliny benzoové. Parametry simulace viz. text.

Při takovémto nastavení vzniká díky neutralizační reakci v místě styku obou elektrolytů oblast s velmi nízkou specifickou vodivostí ($\sim 10^{-4} \text{ S.m}^{-1}$), která se navíc v čase rozšiřuje (viz. obrázek 4.3). Tato "nevodivá zóna" způsobuje numerickou nestabilitu simulace. Proto jsem pro simulaci 50 mm dlouhé kapiláry a napětí 1000 V (pro 75 cm dlouhou kapiláru, hodnota napětí je desetkrát nižší, než při experimentech) musel kapiláru rozdělit na 20 000 segmentů. Simulace jedné minuty nakoncentrování kyseliny benzoové při těchto podmínkách trvala přibližně 10 dní (simulováno na počítači: Intel Pentium 3.00GHz, 1.00 GB RAM). Obrázek 4.4 znázorňuje průběh tohoto nakoncentrování. Parametry simulace jsou následovné: délka kapiláry - 50 mm, segmentace - 20 000 bodů, napětí - 1000 V (pro 75 cm dlouhou kapiláru), polarita - záporná, koncentrace komponent elektrolytů viz. výše.

Simulaci "sweepingu" nakoncentrované kyseliny benzoové představuje obrázek 4.5. Parametry simulace jsou následovné: délka kapiláry - 50 mm, segmentace - 20 000 segmentů, napětí - 2500 V (pro 75 cm dlouhou kapiláru), polarita - záporná, koncentrace SDS - 150 mmol.dm^{-3} , pK konstanta tvorby komplexu kyseliny benzoové s micelami - -4, koncentrace ostatních komponent elektrolytů, nastavení micelárního módu viz. výše.

Jak již bylo zmíněno, nelze simulovat přesné podmínky experimentálního uspořádání. Na základě výsledků experimentů (během fáze nakoncentrování kyseliny benzoové na pH rozhraní nedochází k poklesu proudu, tato fáze trvá až 4 hodiny), lze usoudit, že pokud na skutečném rozhraní vzniká oblast se sníženou specifickou vodivostí, probíhá fáze nakoncentrování analytu zřejmě na rozhraní vstupní vialky a kapiláry (přestože simulace prezentují pohybující se pH rozhraní, není při nich počítáno s EOF). V opačném případě by muselo docházet alespoň k malému poklesu proudu, díky vzniku rozšiřující se "nevodivé zóny". Tyto závěry by musely být potvrzeny dalšími experimenty (např. použitím acidobazických indikátorů a sledováním kapiláry v aparaturách toto umožňujících). Pro samotné nakoncentrování kyseliny benzoové není místo pH rozhraní příliš důležité. Důležité je, že simulace potvrzují vznik ostrého pH rozhraní, na kterém se přes jeho pohyb silně fokusuje kyselina benzoová (viz. obrázek 4.4). Simulace "sweepingu" potvrzuje předpovězenou mobilizační fázi (viz. obrázek 4.5). Na této simulaci není patrné další nakoncentrování analytu vlivem pohybu micel. Protože fáze nakoncentrování při simulaci trvala pouze minutu, došlo k nakoncentrování relativně malého množství analytu, ale ke vzniku obrovského koncentračního gradientu. Difuze má při tak velkém koncentračním gradientu rozhodující vliv.

Kapitola 5

Závěr

1. V druhé kapitole je podán přehled o stavu problematiky počítačové simulace elektromigrace. Prostor je věnován pracím autorů skupin kolem Reijengy, Thormanna, Doseho a Ermakova. Hlavní důraz je kladen na počítačový software, který vznikl na naší fakultě, v laboratoři profesora Gaše.
2. Podrobně je představen simulační program Simul (ve verzi 5.0) s dalšími rozšířeními oproti této volně dostupné verzi. Největším rozšířením je tzv. micelární mód umožňující simulovat systémy obsahující povrchově aktivní látky typu dodecylsulfátu sodného (SDS) tvořící micely. Program může být užitečný pro optimalizaci experimentů, při kterých se takové systémy používají.
3. Provedené simulace (obrázky 4.1, 4.2) prezentují zmíněný micelární mód.
4. Ve třetí kapitole jsou představeny výsledky simulací prekoncentrace kyseliny benzoové. Simulace prezentují novou prekoncentrační techniku založenou na fokusaci analytů na pH rozhraní v kombinaci se "sweepingem". Tato metoda se hodí např. pro prekoncentraci kyseliny benzoové nebo kyseliny sorbové. Vytvořené simulace podávají detailní informace o dynamice příslušných dějů a odhalují vznik v čase se rozšiřující oblasti se sníženou specifickou vodivostí ("nevodivá zóna") v jednodimenzionálním přiblížení. Tato zóna i mechanismus jejího vzniku by mohla být zajímavá pro další teoretická studia. Vytvořené simulace jsou v kvalitativním souladu s provedenými experimenty a dokazují obě fáze prekoncentrace kyseliny benzoové i místo samotné prekoncentrace. Simulace doplňují experimenty provedené na Palackého univerzitě v Olomouci a měly by být součástí vznikajícího článku.

Literatura

- [1] Gaš, B., *Electrophoresis: Electrophoresis - Principles*, chapter in the book: Worsfold, P. J., Townshend, A., Poole, C. F., (Eds.), *Encyclopedia of Analytical Science*, 2nd edition, Elsevier, Amsterdam 2004.
- [2] Kašička, V., *Chem. Listy* **91**, 320-329 (1997).
- [3] Reijenga, J. C., Martens, J. H. P. A., Everaerts, F. M., *Electrophoresis* **16**, 2008-2015 (1995).
- [4] Reijenga, J. C., Ingelse, B. A., Everaerts, F. M., *Journal of Chromatography A* **772**, 195-202 (1997).
- [5] Reijenga, J. C., Kee Lee, H., *Journal of Chromatography A* **916**, 25-30 (2001).
- [6] Reijenga, J. C., Kenndler, E., *Journal of Chromatography A* **659**, 403-415 (1994).
- [7] Reijenga, J. C., Kenndler, E., *Journal of Chromatography A* **659**, 417-426 (1994).
- [8] www.natur.cuni.cz/~gas
- [9] Martens, J. H. P. A., Reijenga, J. C., ten Thije Boonkkamp, J. H. M., Mattheij, R. M. M., Everaerts, F. M., *Journal of Chromatography A* **772**, 49-62 (1997).
- [10] Hirokawa, T., Nishino, N., Kiso, Y., *Journal of Chromatography A* **252**, 49 (1982).
- [11] Hirokawa, T., Nishino, M., Aoki, N., Kiso, Y., Sawamoto, T., Yagi, T., Akiyama, J., *Journal of Chromatography A* **271**, D1 (1983).
- [12] Hirokawa, T., Kiso, Y., Gaš, B., Zusková, I., Vacík, J., *Journal of Chromatography A* **628**, 283 (1993).
- [13] Mosher, R. A., Saville, D. A., Thormann, W., *The Dynamics of Electrophoresis*, VCH Publishers, Weinheim 1992.
- [14] Breadmore, M. C., Mosher, R. A., Thormann, W., *Analytical Chemistry* **78**, 538-546 (2006).
- [15] Mosher, R. A., Thormann, W., *Electrophoresis* **23**, 1803-1814 (2002).

-
- [16] Thormann, W., Huang, T., Pawliszyn, J., Mosher, R. A., *Electrophoresis* **25**, 324-337 (2004).
- [17] Dose, E. V., Guiochon, G. A., *Analytical Chemistry* **63**, 1063-1072 (1991).
- [18] Williams, R. L., Childs, B., Dose, E. V., Guiochon, G. A., Vigh, G., *Journal of Chromatography A* **781**, 107-112 (1997).
- [19] Ermakov, S. V., Mazhorova, O. S., Zhukov, M. Y., *Electrophoresis* **13**, 838-848 (1992).
- [20] Ermakov, S. V., Zhukov, M. Y., Capelli, L., Righetti, P. G., *Electrophoresis* **19**, 192-205 (1998).
- [21] Ermakov, S. V., Bello, M. S., Righetti, P. G., *Journal of Chromatography A* **661**, 265-278 (1994).
- [22] Ermakov, S. V., Jacobson, S. C., Ramsey, J. M., *Analytical Chemistry* **72**, 3512-3517 (2000).
- [23] Jaroš, M., Hruška, V., Štědrý, M., Zusková, I., Gaš, B., *Electrophoresis* **25**, 3080-3085 (2004).
- [24] Hruška, V., Štědrý, M., Včeláková, K., Lokajová, J., Jaroš, M., Gaš, B., *Electrophoresis*, in print.
- [25] Gaš, B., Kenndler, E., *Electrophoresis* **25**, 3901-3912 (2004).
- [26] Hruška, V., Jaroš, M., Gaš, B., *Electrophoresis* **27**, 984-991 (2006).
- [27] Hruška, V., *Diplomová práce*, Univerzita Karlova, Praha, (2004).
- [28] Kim, J. B., McKibbin, P. B., Hirokawa, T., Terabe, S., *Analytical Chemistry* **75**, 3986-3993 (2003).