

UNIVERZITA KARLOVA  
Přírodovědecká fakulta

---

Studijní program: Analytická chemie



Bc. Kateřina Čokrtová

SEPARACE LÁTEK TVOŘÍCÍCH KAPALNÉ KRYSTALY  
POMOCÍ BEZVODÉ KAPILÁRNÍ ELEKTROKINETICKÉ  
CHROMATOGRAFIE

Separation of liquid crystal forming substances using  
non-aqueous capillary electrokinetic chromatography

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Tomáš Křížek, Ph.D.

Praha 2019

## **Prohlášení**

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

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

V Praze dne 17. května 2019

Bc. Kateřina Čokrtová

## Abstrakt

Kapalné krystaly jsou látky široce využívané v elektronice, lékařství a dalších oborech. Analytické separace jsou důležité v oblasti vývoje nových kapalných krystalů pro kontrolu čistoty syntetizovaných látek. Analýza vzorku je důležitá pro zjištění přítomnosti nečistot pocházejících ze syntézy i pro zjištění chirální čistoty látky.

Látky tvořící kapalné krystaly neobsahují snadno ionizovatelné funkční skupiny, což vylučuje jejich separaci v kapilární zónové elektroforéze. Elektrokinetická chromatografie je metoda, při které se do základního elektrolytu přidává vhodný surfaktant. Látky bez náboje pak interakcí s elektricky nabitým surfaktantem získávají efektivní náboj, čímž může docházet k separaci, pokud s přidaným surfaktantem interagují rozdílně. Dalším problémem komplikujícím analýzu je velmi nízká rozpustnost analytů ve vodě. Separace v této práci byly proto prováděny v bezvodém prostředí acetonitrilu.

Za zmíněných podmínek však byla pozorována nízká opakovatelnost migračních časů látek. Proto byly při následných měřeních využívány kapiláry s různě pokrytou vnitřní stěnou. Úpravou povrchu by mělo dojít ke zlepšení opakovatelnosti migračních časů. Bylo testováno několik druhů pokrytí kapiláry. Nejprve bylo testováno dynamické pokrytí, kdy byla kapilára před sérií měření promyta vodným roztokem hydroxyethylcelulosy. Následně bylo testováno, jestli má vliv na migrační časy, pokud je kapilára promyta před každým měřením. Testována byla také kapilára dynamicky pokrytá polybrenem a poté komerční permanentně pokryté kapiláry.

Na základě zjištěných hodnot opakovatelnosti mobility elektroosmotického toku byly vybrány vhodné podmínky měření. Vzorky byly analyzovány v bezvodém prostředí acetonitrilu s přísadkou hexadecyltrimethylamonium chloridu o koncentraci  $40 \text{ mmol dm}^{-3}$  a octovou kyselinou o koncentraci  $10 \text{ mmol dm}^{-3}$ . Křemenná kapilára byla před měřením promývána 1 M kyselinou chlorovodíkovou po dobu 3 minut. U některých vzorků se podařilo separovat nečistoty od syntetizované látky či separovat její isomery.

**Klíčová slova:** kapalné krystaly, bezvodá kapilární elektroforéza, elektrokinetická chromatografie, elektroosmotický tok

## Abstract

Liquid crystals are widely used in electronics, medicine and other fields. Analytical separations are important in the development of new liquid crystals to control the purity of synthesized substances. The sample analysis is important for detection of impurities formed during synthesis and for determination of chiral purity of the substance.

Liquid crystal-forming substances cannot be separated by capillary zone electrophoresis due to the absence of readily ionizable groups. Electrokinetic chromatography is a method in which a suitable surfactant is added to the background electrolyte. The uncharged substances then interact with the electrically charged surfactant to obtain an effective charge. Separation can occur if they interact differently with the added surfactant. Another problem complicating the analysis is the very low solubility of analytes in water. Separations in this work were therefore carried out under non-aqueous conditions in acetonitrile.

However, under these conditions a poor repeatability of the migration times of the substances was observed. Therefore, capillaries with differently coated inner walls were used in subsequent measurements. Surface modification should improve the repeatability of migration times. Several types of capillary coating have been tested. Dynamic coating was tested first - the capillary was flushed with an aqueous solution of hydroxyethylcellulose before a series of measurements. Subsequently, the effect of flushing before each measurement was tested. Capillary permanently coated with polybrene and commercial permanently coated capillaries have also been tested.

Based on measured EOF repeatability appropriate measurement conditions were chosen. Samples were analyzed in acetonitrile with addition of hexadecyltrimethylammonium chloride at a concentration of 40 mM and acetic acid at 10 mM concentration. The silica capillary was flushed with 1 M hydrochloric acid for 3 minutes before each measurement. It was possible to separate impurities from synthesized analytes in some samples.

**Key words:** liquid crystals, non-aqueous capillary electrophoresis, elektrokinetic chromatography, electroosmotic flow

## **Poděkování**

Chtěla bych poděkovat svému školiteli RNDr. Tomáši Křížkovi, Ph.D. za odborné vedení, poskytnuté konzultace a trpělivost při vypracování této diplomové práce. Poděkování také patří Fyzikálnímu ústavu Akademie věd ČR za poskytnutí nově syntetizovaných látek tvořících kapalně krystaly.

Děkuji svým rodičům a sourozencům za veškerou podporu po dobu studia.

# Obsah

<b>1 Úvod a teoretická část.....</b>	<b>9</b>
1.1 Cíle práce .....	9
1.2 Kapalné krystaly .....	9
1.3 Micelární elektrokinetická chromatografie.....	10
1.4 Bezvodá kapilární elektroforéza .....	12
1.5 Bezvodá micelární elektrokinetická chromatografie .....	12
1.6 Elektroosmotický tok.....	13
1.7 Metody měření elektroosmotického toku .....	14
1.8 Pokrytí vnitřní stěny kapiláry .....	16
1.8.1 Dynamické pokrytí kapiláry .....	16
1.8.2 Permanentní pokrytí .....	18
<b>2. Experimentální část .....</b>	<b>20</b>
2.1 Chemikálie .....	20
2.2 Látky tvořící kapalné krystaly .....	21
2.3 Instrumentace.....	22
2.4 Příprava roztoků.....	23
2.5 Postup měření .....	24
2.5.1 Separace látek tvořících kapalné krystaly - první experimenty.....	24
2.5.2 Opakovatelnost měření .....	24
2.5.2.1 Promytí hydroxyethylcelulosou.....	24
2.5.2.2 Pokrytí kapiláry polybrenem .....	25
2.5.2.3 Komerční pokryté kapiláry .....	25
2.5.3 Měření elektroosmotického toku .....	25
2.5.4 Analýza vzorků za zvolených podmínek.....	27
<b>3. Výsledky a diskuze .....</b>	<b>28</b>
3.1 Volba základního elektrolytu.....	28
3.2 Separace látek tvořících kapalné krystaly - první experimenty.....	29
3.3 Opakovatelnost migračního času .....	31

3.3.1	Promytí hydroxyethylcelulosou.....	31
3.3.2	Pokrytí kapiláry polybrenem .....	34
3.3.3	Kapilára CEP .....	35
3.3.4	Kapilára PVA .....	36
3.3.5	Srovnání nárůstu migračních časů.....	37
3.4	Mobilita elektroosmotického toku.....	38
3.5	Koncentrace CTAC .....	41
3.6	Promývání kapiláry kyselinou chlorovodíkovou.....	43
3.7	Analýza vzorků za zvolených podmínek.....	44
3.7.1	Látka ZL 8/5 S.....	44
3.7.2	Látka 12 PHB <sup>2</sup> AL.....	47
3.7.3	Látka UDBN.....	48
3.7.4	Látka ZL 10/6 S.....	49
3.7.5	Látka ZL 12/10 S.....	50
<b>4.</b>	<b>Závěr.....</b>	<b>51</b>
<b>5.</b>	<b>Použitá literatura .....</b>	<b>52</b>

## Použité zkratky a symboly

CMC	kritická micelární koncentrace (critical micelle concentration)
CTAB	hexadecyltrimethylamonium bromid
CTAC	hexadecyltrimethylamonium chlorid
DDAB	didodecyldimethylamonium bromid
EOF	elektroosmotický tok (electroosmotic flow)
HEC	hydroxyethylcelulosa
LCD	displej na bázi tekutých krystalů (liquid crystal display)
MO	mesityloxid
PVA	polyvinylalkohol
PVDF	polyvinylidendifluorid
SDS	dodecylsírán sodný (sodium dodecyl sulfate)
$E$	intenzita elektrického pole
$\varepsilon$	permitivita rozpouštědla
$l_D$	délka kapiláry k detektoru
$l_C$	celková délka kapiláry
$m_{EF}$	elektroforetická mobilita
$m_{EOF}$	mobilita elektroosmotického toku
$m_{zd}$	zdánlivá mobilita látky
$\eta$	dynamická viskozita prostředí
$t_A$	migrační čas analytu
$t_{MO}$	migrační čas mesityloxidu
$t_R$	relativní migrační čas
$t_U$	doba vkládání napětí
$v_{EOF}$	rychlost elektroosmotického toku
$U$	vložené napětí
$\zeta$	zeta potenciál - elektrokinetický potenciál
12 PHB <sup>2</sup> AL	4-({[1-oxo-1-(pentyloxy)propan-2-yl]oxy}karbonyl)fenyl-4-(dodecyloxy)benzoát
UDBN-m	4'-[(2-methyloktanoyl)oxy]-[1,1'-bifenyl]-4-yl 2,4-dimethyl-3-(undeka-10-en-1-yloxy)benzoát
UDBN-p	4'-[(2-methyloktanoyl)oxy]-[1,1'-bifenyl]-4-yl 3,5-dimethyl-4-(undeka-10-en-1-yloxy)benzoát
ZL 8/5	4-({[1-oxo-1-(pentyloxy)propan-2-yl]oxy}karbonyl)fenyl 4'-(oktyloxy)-[1,1'-bifenyl]-4-karboxylát
ZL 10/6	4-({[1-(hexyloxy)-1-oxopropan-2-yl]oxy}karbonyl)fenyl 4'-(decyloxy)-[1,1'-bifenyl]-4-karboxylát
ZL 12/10	4-({[1-(decyloxy)-1-oxopropan-2-yl]oxy}karbonyl)fenyl 4'-(dodecyloxy)-[1,1'-bifenyl]-4-karboxylát



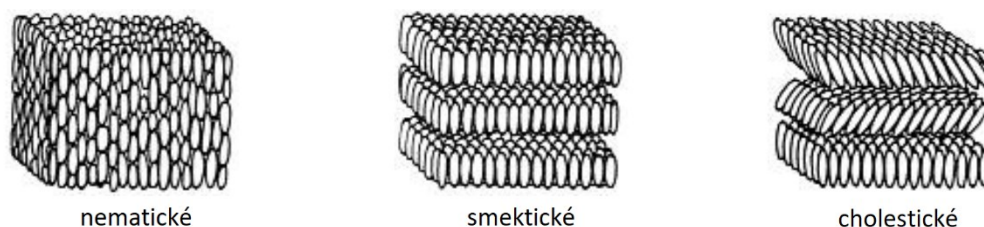
# 1 Úvod a teoretická část

## 1.1 Cíle práce

V této práci je cílem vyvinout metodu pro kontrolu čistoty látek tvořících kapalně krystalové fáze pomocí kapilární elektroforézy. Protože jde o látky bez náboje, budou separovány metodou elektrokinetické chromatografie, kdy se do základního elektrolytu přidává povrchově aktivní látka.

## 1.2 Kapalně krystalové fáze

Kapalně krystalové fáze jsou organické látky, které vytvářejí v roztoku mezomorfní fázi [1]. Jsou tekuté podobně jako kapaliny, ovšem vykazují vnitřní uspořádání jako pevné látky. Pozorováním lze vidět texturu, kdy každá její část odpovídá doméně, jejíž molekuly se liší svojí orientací. Kapalně krystalové fáze se dělí podle uspořádání na nematkové, cholesterické a smektické (Obr. 1).



Obr. 1 Vnitřní uspořádání molekul v kapalném krystalu - nematkové, smektické a cholesterické. Převzato a upraveno z [2].

V nematkových krystalcích jsou molekuly uspořádány do jednoho směru, ale netvoří se vrstvy. Druhým případem je smektické uspořádání krystalů do vrstev s přesně definovanými mezerami. U cholesterického jsou osy molekul ve vrstvách uspořádány rovnoběžně, ale vůči molekulám v sousedních vrstvách jsou pootočené. Vnějšími působeními fyzikálních sil se může měnit vnitřní uspořádání a tím vlastnosti kapalných krystalů.

Při působení elektrického pole se mění propustnost světla, toho se využívá v displejích na bázi kapalných krystalů (LCD) [2]. Cholestické kapalně krystalové krystaly jsou citlivé na teplotu, v závislosti na teplotě se mění barva odraženého světla. Změna je znatelná už při rozdílu 0,01 °C, proto se využívají v lékařství jako citlivý indikátor teploty lidské tkáně při napadení nemocí.

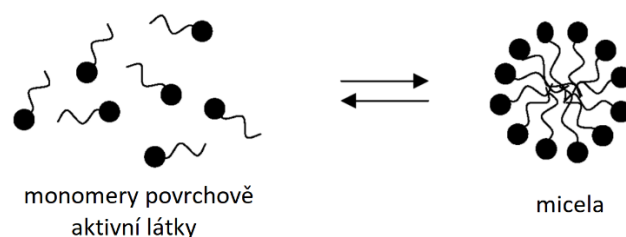
K separaci a stanovení složek kapalných krystalů se používá vysokoúčinná kapalinová chromatografie či superkritická fluidní chromatografie. Vojtylové a kol. [3] se podařilo pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie separovat enantiomery nových ortokonických antiferoelektrických kapalných krystalů. Byly použity polysacharidové chirální stacionární fáze na bázi dvou různých chirálních selektorů.

Separace enantiomerů pomocí superkritické fluidní chromatografie (SFC) dosáhli Vaňkátová a kol. [4]. Mobilní fází byl oxid uhličitý s využitím alkoholu jako kosolventu, chirální stacionární fází byl derivát amylosy (3,5-dimethylfenylkarbamát). Vaňkátové se podařilo metodou SFC i UHPLC separovat enantiomery některých z látek [5], které jsou předmětem měření v této diplomové práci. V obou metodách využívá jako chirální selektor tris(3,5-dimethylfenylkarbamát). Studovanými látkami jsou deriváty kyseliny mléčné, jde o feroelektrické termotropní kapalně krystalové krystaly.

Kapilární elektroforéza, která je založena na jiném separačním principu než HPLC a SFC, by mohla být také využita pro separaci látek tvořících kapalně krystalové krystaly, a tak by byla jejich komplementární metodou.

### **1.3 Micelární elektrokinetická chromatografie**

Elektroneutrální látky se v kapilární zónové elektroforéze pohybují stejnou rychlostí odpovídající rychlosti elektroosmotického toku (EOF) [6] a tak není možné od sebe elektroneutrální látky separovat. Proto byla vyvinuta metoda micelární elektrokinetické chromatografie, při které je do základního elektrolytu přidávána povrchově aktivní látka. Pokud je látka přidána v dostatečné koncentraci, tj. vyšší, než je kritická micelární koncentrace (CMC), molekuly surfaktantu agregují a vytváří kulové útvary zvané micely. Na povrchu micely jsou hydrofilní konce molekul, do středu micely vedou hydrofobní řetězce (Obr. 2).

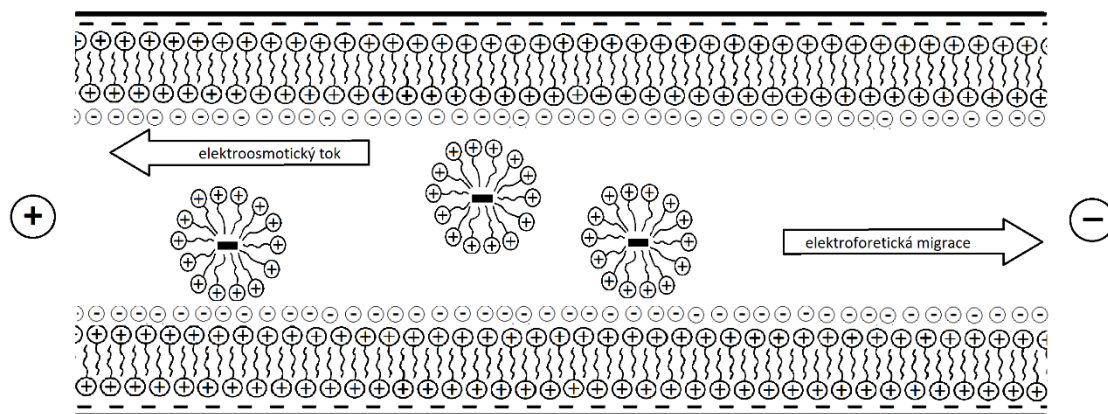


Obr. 2 Schématické znázornění rovnováhy mezi volnými monomery surfaktantu a tvorbou micely. Plné kroužky představují hydrofilní konce molekul, dovnitř micely z nich směřují hydrofobní řetězce. Převzato z článku [7] a upraveno.

Jde o takzvanou pseudostacionární fázi, protože analyty se mohou rozdělovat mezi polárním prostředím vně micel a nepolárním prostředím uvnitř. Analyty s rozdílnou polaritou se rozdílnou měrou zadržují uvnitř micel, což vede k rozdílné rychlosti jejich výsledného pohybu.

Nejčastěji používaným surfaktantem je dodecylsírán sodný (SDS), jde o aniontový surfaktant [8]. Látky se během separace rozdělují mezi hydrofobní vnitřek micel a hydrofilní základní elektrolyt. Micely migrují směrem k anodě, EOF má opačný směr.

Při použití kationtového surfaktantu migrují micely ke katodě, dynamickým pokrytím vnitřní stěny kapiláry se otáčí směr EOF (Obr. 3). Někdy se vkládá napětí s opačnou polaritou [9], pokud rychlost elektroosmotického toku nabývá vyšších hodnot než rychlost elektroforetické migrace. (Princip vzniku EOF je blíže vysvětlen na straně 13, kapitola 1.6).



Obr. 3 Průřez kapilárou znázorňující jevy, ke kterým dochází, když je do základního elektrolytu přidán kationtový surfaktant.

Aby mohl být analyt stanoven, musí být rozpustný v použitém roztoku základního elektrolytu. Při separacích hydrofobních látek může dojít k solubilizaci analytů díky přítomnosti surfaktantu v základním elektrolytu. Další možností je přidavek jiných aditiv, například organických rozpouštědel [10]. Přidání organického rozpouštědla má i další pozitivní vliv na separace v kapilární elektroforéze [11]. S přidavkem některých organických rozpouštědel se zlepšuje rozlišení píků. Pokud je ovšem látka velmi hydrofobní a přidavek organického rozpouštědla ani přítomnost surfaktantu nestačí, řešením může být využití metody bezvodé kapilární elektroforézy.

#### **1.4 Bezvodá kapilární elektroforéza**

Metoda bezvodé kapilární elektroforézy se využívá pro separaci látek nerozpustných ve vodě [12]. Voda je nejčastěji využívaným rozpouštědlem. Je vhodná pro rozpouštění nabitých látek kvůli své vysoké permitivitě. Je však nevhodná pro rozpouštění lipofilních látek. Pro takové látky jsou vhodnou alternativou organická rozpouštědla. Ta ovšem musí také splňovat některá kritéria, aby byla vhodná pro použití v kapilární elektroforéze. V organickém rozpouštědle musí být rozpustné veškeré složky základního elektrolytu [13]. Nemělo by být hořlavé, toxické ani reaktivní, také se pohlíží na jeho cenu a pro praktičnost má být kapalné při pokojové teplotě. Jeho relativní permitivita, která popisuje sílu interakcí mezi ionty, by měla nabývat hodnot kolem 30. Také je preferována nízká dynamická viskozita, která umožňuje rychlejší migraci analytů. Žádné organické rozpouštědlo nespĺňuje všechny parametry ideálního rozpouštědla. V praxi jsou nejčastěji používanými organickými rozpouštědly methanol a acetonitril a jejich směsi.

#### **1.5 Bezvodá micelární elektrokinetická chromatografie**

Chemické a fyzikální vlastnosti bezvodých rozpouštědel se výrazně liší od vlastností vody, a proto mohou být využity k optimalizaci separací v kapilární elektroforéze [11]. Použitím organického rozpouštědla jako rozpouštědla základního

elektrolytu lze ovlivnit relevantní parametry separace, toto je již podrobně prozkoumané téma v kapilární elektroforéze [14–16].

Ovšem obecně se předpokládalo, že v bezvodém prostředí se ani při vysoké koncentraci surfaktantu nevytvářejí micely. Dodecylsírán sodný však může tvořit stabilní micely v podmínkách, kdy je rozpouštědlem základního elektrolytu formamid. CMC v tomto případě dosahuje přibližně třikrát vyšších hodnot, než je tomu ve vodném prostředí [17]. Je to z důvodu vysoké hustoty kohezní energie formamidu [10].

Pro analýzu aktivních látek v léčivé rostlině Chen a kol. [18] vyvinuli metodu, ve které se využívá pro separaci cholát sodný rozpuštěný v methanolu. Zvolili koncentraci 111 mM cholátu. Tato hodnota je kompromisem mezi zlepšením rozlišení píků, rostoucím Joulovým teplem a rozšiřováním píků s rostoucí iontovou silou základního elektrolytu.

Nozal a kol. využili agregaci neutrálního surfaktantu pro zlepšení rozlišení separace nabitých látek [19]. Rozpouštědlem základního elektrolytu byl *N,N*-dimethylformamid nebo *N,N*-dimethylacetamid, jako surfaktanty byly využívány kapronát sodný, laurát sodný a palmitát sodný.

Přidaná pseudostacionární fáze nevytváří vždy micely, přesto ale může docházet k mobilizaci a separaci analytů, pokud analyty interagují s volnými molekulami surfaktantu.

## 1.6 Elektroosmotický tok

Elektroosmotický tok je jev, který vzniká disociací silanolových skupin na vnitřní stěně křemenné kapiláry [20]. Na stěně vzniká záporný náboj, který je kompenzován kationty ze základního elektrolytu, čímž vzniká nepohyblivá elektrická dvojvrstva, tzv. Sternova dvojvrstva. K této nepohyblivé dvojvrstvě jsou přitahovány další volné kationty z roztoku, které tvoří pohyblivou (difuzní) vrstvu. Na rozhraní pohyblivé a nepohyblivé vrstvy se ustavuje elektrokinetický potenciál zvaný zeta potenciál. Zeta potenciál závisí na míře deprotonace silanolů, adsorpci iontů na povrch a iontové síle pufru [21]. Po vložení napětí mezi konce kapiláry je difuzní vrstva tažena ke katodě a s sebou strhává díky malému průměru kapiláry veškerý roztok tímto směrem. Proto je v kapilární elektroforéze možné stanovit vedle sebe kationty a anionty

zároveň, pokud mobilita elektroosmotického toku převyšuje elektroforetickou mobilitu aniontů. Rychlost elektroosmotického toku  $v_{EOF}$  je dána rovnicí

$$v_{EOF} = m_{EOF} \cdot E$$

kde  $E$  je intenzita vkládaného stejnosměrného elektrického pole a  $m_{EOF}$  je mobilita elektroosmotického toku, která je vyjádřena takto

$$m_{EOF} = \frac{\varepsilon \cdot \zeta}{\eta}$$

Kde  $\varepsilon$  je permitivita rozpouštědla,  $\zeta$  je zeta potenciál,  $\eta$  je dynamická viskozita rozpouštědla.

Hodnota mobility EOF musí být stanovena správně, protože je klíčová pro správný výpočet elektroforetické mobility. Hodnota elektroforetické mobility se využívá pro identifikaci látek. Zdánlivá mobilita  $m_{zd}$  odpovídá součtu mobility elektroosmotického toku  $m_{EOF}$  a mobility elektroforetické  $m_{EF}$ .

$$m_{zd} = m_{EOF} + m_{EF}$$

Míra disociace silanolových skupin je závislá především na pH základního elektrolytu. Běžně se využívá pH 3-8, při kterém mobilita EOF převyšuje elektroforetickou mobilitu veškerých iontů. EOF lze ovlivnit změnou složení základního elektrolytu, změnou hodnoty vkládaného napětí či úpravou vnitřního povrchu kapiláry [20].

## 1.7 Metody měření elektroosmotického toku

Nejběžnějším způsobem zjištění rychlosti EOF je pomocí přidavku elektroneutrální látky do vzorku [22]. Po vložení napětí mezi konce kapiláry se má taková látka pohybovat rychlostí EOF. Zóna neutrálního markeru je detekována pomocí UV-Vis či vodivostního detektoru. Avšak ukazuje se, že tento způsob není v některých případech vhodný, protože neutrální látka může interagovat se složkami základního elektrolytu a tím získávat vlastní elektroforetickou mobilitu [23]. Podle druhu iontů základního elektrolytu se liší mobility takovýchto neutrálních markerů a ukazuje se, že marker interaguje i s malými ionty základního elektrolytu. Křížek a kolektiv ukázali, že

dochází k rozdílné mobilizaci dvou různých běžně používaných neutrálních markerů EOF, thiomočoviny a dimethylsulfoxidu [24]. Mobilita jednotlivých markerů se také liší v přítomnosti různých aniontů v základním elektrolytu [25]. Jako marker se dá použít i roztok barviva, kdy jsou kapiláry spojeny skličky a čas průchodu barviva je sledován mikroskopem a zaznamenáván pomocí CCD kamery [26].

Pro nepřetržité sledování hodnoty EOF vyvinuli Lee a kol. [27] metodu, při které se do základního elektrolytu přidává kontinuálně roztok fluorescenčního barviva v části aparatury před detektorem. EOF způsobuje ředění tohoto barviva a sledováním intenzity fluorescence lze sledovat změny EOF.

Mobilitu EOF lze také zjistit monitorováním procházejícího proudu [28]. Výstupní nádoba a kapilára jsou plněny základním elektrolytem a vstupní nádoba je plněna stejným druhem základního elektrolytu ovšem o nižší koncentraci. Mezi konce kapiláry je vkládáno napětí, a když roztok o nižší koncentraci doputuje na rozhraní kapiláry a výstupní nádoby, dochází k poklesu sledovaného proudu. Rozdíl v koncentracích roztoků nemusí být příliš velký. Huang uvádí, že stačí rozdíl koncentrací kolem 5 %.

## 1.8 Pokrytí vnitřní stěny kapiláry

Je několik důvodů pro modifikaci stěny kapiláry při elektroforéze. EOF je často nestabilní. Pokrytím kapiláry lze zvýšit jeho opakovatelnost a tím pádem i opakovatelnost migračních časů látek. EOF je pokrytím obvykle potlačován, či je otáčen jeho směr. Změnou směru EOF se dosahuje většího rozlišení píků či rychlejších analýz [21].

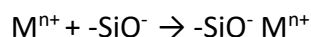
Pokrytím vnitřního povrchu kapiláry je také eliminována adsorpce látek obsažených v základním elektrolytu nebo ve vzorku [29]. Kromě toho, zda má být EOF potlačen nebo obrácen, je dalším důležitějším faktorem rozhodujícím o vhodnosti pokrytí jeho stabilita v rozsahu pH základního elektrolytu, který je zapotřebí pro separaci analytů [30].

### 1.8.1 Dynamické pokrytí kapiláry

Jde o častý způsob úpravy stěn kapiláry. Dynamické pokrytí vnitřních stěn kapiláry je jednoduchý a levný způsob k dosažení stabilního EOF. Do základního elektrolytu jsou přidány příměsi, které upravují náboj stěny. Interakce mezi molekulami příměsí a stěnou kapiláry jsou nekovalentní, jde pouze o adsorpční sekundární interakce. Iontovou výměnou na silanolových skupinách dochází ke změně náboje stěny a tím i hodnoty zeta-potenciálu. Snížením záporného náboje silanolových skupin se lze také zbavit nežádoucího efektu adsorpce kladně nabitých analytů na stěnu kapiláry [31].

#### Dvojmocné kovové ionty

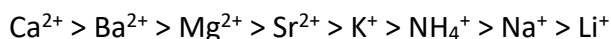
Některé kationty asociují se silanolovými skupinami podle této zobecněné rovnice:



Prítomnost kationtů v kompaktní dvojvrstvě snižuje efektivní náboj, tím je zeta-potenciál nižší a EOF nabývá menších hodnot.



Chen a Pietrzyk [32] při svých měřeních, kdy separovali směs alkansulfonátů a alkylsulfátů došli k tomuto pořadí vlivů kationtů základního elektrolytu na rychlost EOF.



Nejmenší vliv mají jednomocné ionty, a naopak nejčastěji se využívají dvojmocné kationty, které snižují mobilitu EOF výrazněji.

Dvojmocné ionty kovů alkalických zemin byly přidávány v koncentraci 1 mmol dm<sup>-3</sup> ve formě chloridu. Jednomocné ionty byly přidávány do základního elektrolytu v koncentraci 20 mmol dm<sup>-3</sup>, a přesto na změnu elektroosmotického toku měly menší vliv. Dokonce při pokusech zjistili, že přidávkem chloridu hlinitého v koncentraci pouze 0,5 mmol dm<sup>-3</sup> se směr výsledného pohybu separovaných látek kapilárou obrátil.

### **Surfaktanty**

Přidání povrchově aktivní látky do základního elektrolytu může mít hned několik výhod. Při dostatečné koncentraci kationtového surfaktantu se na stěně vytváří micelární dvojvrstva, na níž se teprve vytváří elektrická dvojvrstva ovšem s opačným nábojem (Obr. 3 na straně 13). Další funkcí takové vrstvy je, že eliminuje adsorpci separovaných látek, například bílkovin [33].

Často využívanými kationickými surfaktanty jsou hexadecyltrimethylamonium bromid (CTAB) a hexadecyltrimethylamonium chlorid (CTAC). Běžně používaný je také didodecyldimethylamonium bromid (DDAB), který má dva hydrofobní řetězce a podle Li a kol. [34] jde o efektivnější pseudostacionární fázi. Oproti CTAB jsou časy analýzy kratší, dosahuje se vyšší účinnosti separace a spotřeba surfaktantu je nižší.

Pro pokrytí kapiláry se také využívají polymerní neionické surfaktanty, jako je poly(n-undecyl-a-D-glukopyranosid) [35] či polyoxyethylen ether (Brij-35) [36].

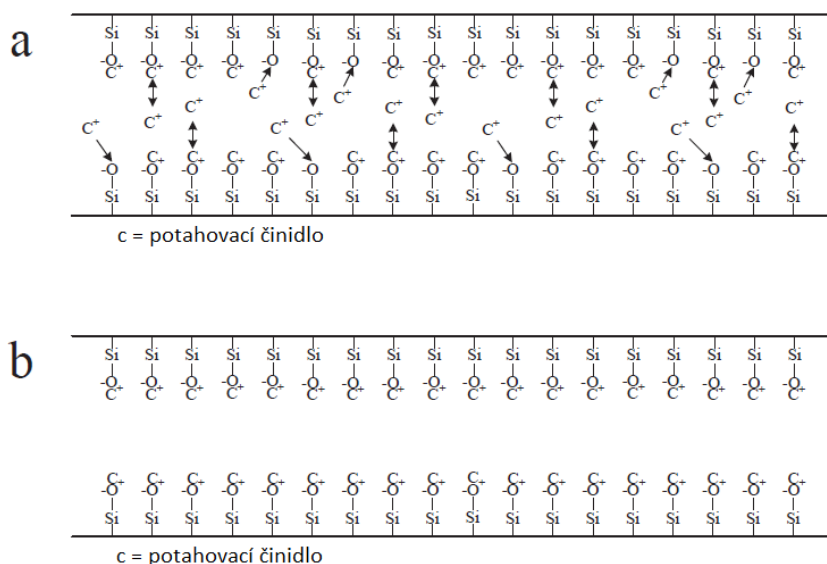
### **Polymery**

Adsorpcí nabitého polymeru také lze měnit velikost a směr EOF. Dosáhnout obrácení směru lze pokrytím kapiláry silně kationtovými polymery, jako jsou například polyamin [37], poly(dimethyldiallylammonium chlorid) (PDMAC) [38] či dimethrinbromid (polybren) [39].

Pro snížení či eliminaci EOF se také využívá neutrálních polymerů, které zvyšují hydrofilicitu povrchu kapiláry. Pro maskování silanolových skupin a tím potlačení EOF se například využívají některé deriváty celulosy [30], jako je hydroxypropylcelulosa, hydroxyethylcelulosa (HEC) [40] či hydroxypropylmethylcelulosa. Poly(vinylalkohol) (PVA) se na stěnu kapiláry váže silněji ve srovnání s HEC, a proto se s jeho využitím zlepšuje stabilita EOF. Dalšími používanými neutrálními polymery jsou polyethylenoxid, polyvinylpyrrolidon či polyakrylamid.

### 1.8.2 Permanentní pokrytí

Permanentní pokrytí je založeno na kovalentní vazbě nebo fyzikální adsorpci mezi činidlem a stěnou kapiláry. Jde o dobrý způsob, jak eliminovat EOF a interakce analytu s kapilárou. Protože dynamický povrch vyžaduje občasnou regeneraci a činidlo tvořící povrch musí být přidáváno do základního elektrolytu, což je v některých případech ekonomicky náročné, upřednostňuje se někdy permanentní pokrytí. Pokrytí, kdy je vrstva fyzikálně adsorbovaná – elektrostaticky, hydrofobními interakcemi či vodíkovými vazbami – se upřednostňuje před kovalentním pokrytím pro jednoduchost regenerace kapiláry. Ve srovnání s dynamickým povrchem není třeba do základního elektrolytu přidávat udržovací činidla. Rozdíl mezi dynamickým a adsorbovaným permanentním pokrytím ilustruje obrázek (Obr. 4).



Obr. 4 Průřez křemennou kapilárou. Zobrazení rozdílu mezi dynamickým pokrytím (a) a fyzikálně adsorbovaným permanentním pokrytím (b). Převzato a upraveno z [41]

Příprava kovalentně vázané vrstvy, již se dosáhne celistvého odolného pokrytí kapiláry polymerem, má několik kroků: Předúprava, zavedení dvojných vazeb na stěnu kapiláry, a nakonec navázání polymeru na připravenou mezivrstvu. Postup jako první popsal Hjertén [42].

Nejdříve je stěna opláchnuta a aktivována leptáním kyselinou chlorovodíkovou či louhováním hydroxidem sodným [30]. Navázání polymeru je zde prováděno pomocí bifunkčního činidla, methakryloxypropyl-trimethoxysilanu, jehož jedna funkční skupina reaguje se silanoly stěny a druhá pak s monomery akrylamidu, které následně polymerizuje. V modifikovaných metodách se využívá nový polymer methakryloxypropylhydrosiloxan jako mezivrstva, která účinně pokrývá nezreagované silanoly. Nevýhodou využití silanu pro deaktivaci křemenného povrchu je hydrolytická nestabilita při vyšším pH. To může být při analýze některých proteinů, kdy náboj proteinu závisí na hodnotě pH, omezující faktor. Proto Cobb a kol. [43] vyvinuli metodu navázání polymeru, kdy jsou vazby Si-O-Si nahrazeny za využití Grignardových činidel vazbami Si-C.

Vrchní polymerní vrstva však může být navázána i bez mezivrstvy. Polymery mohou být vázány aplikováním tepla nebo jiným vlivem. To platí například pro polyvinylalkohol (PVA) či polysacharidy.

Někdy ve vrstvě polymeru dochází k porušení či k nenavázání polymeru na poškozenou část kapiláry, proto je někdy do základního elektrolytu navíc přidáván stejný polymer o malé molekulové hmotnosti, který eventuálně doplňuje nedostatek kovalentně vázaného polymeru.

Pro statické pokrytí se z neutrálních polymerů vytvářejících hydrofilní povrch využívá poly(akrylamid), poly(etylenoxid), polyvinylalkohol, epoxypolymery, deriváty celulosy, jako je hydroxyethylcelulosa, poly(vinylpyrrolidon) či dextransy [30].

## 2. Experimentální část

### 2.1 Chemikálie

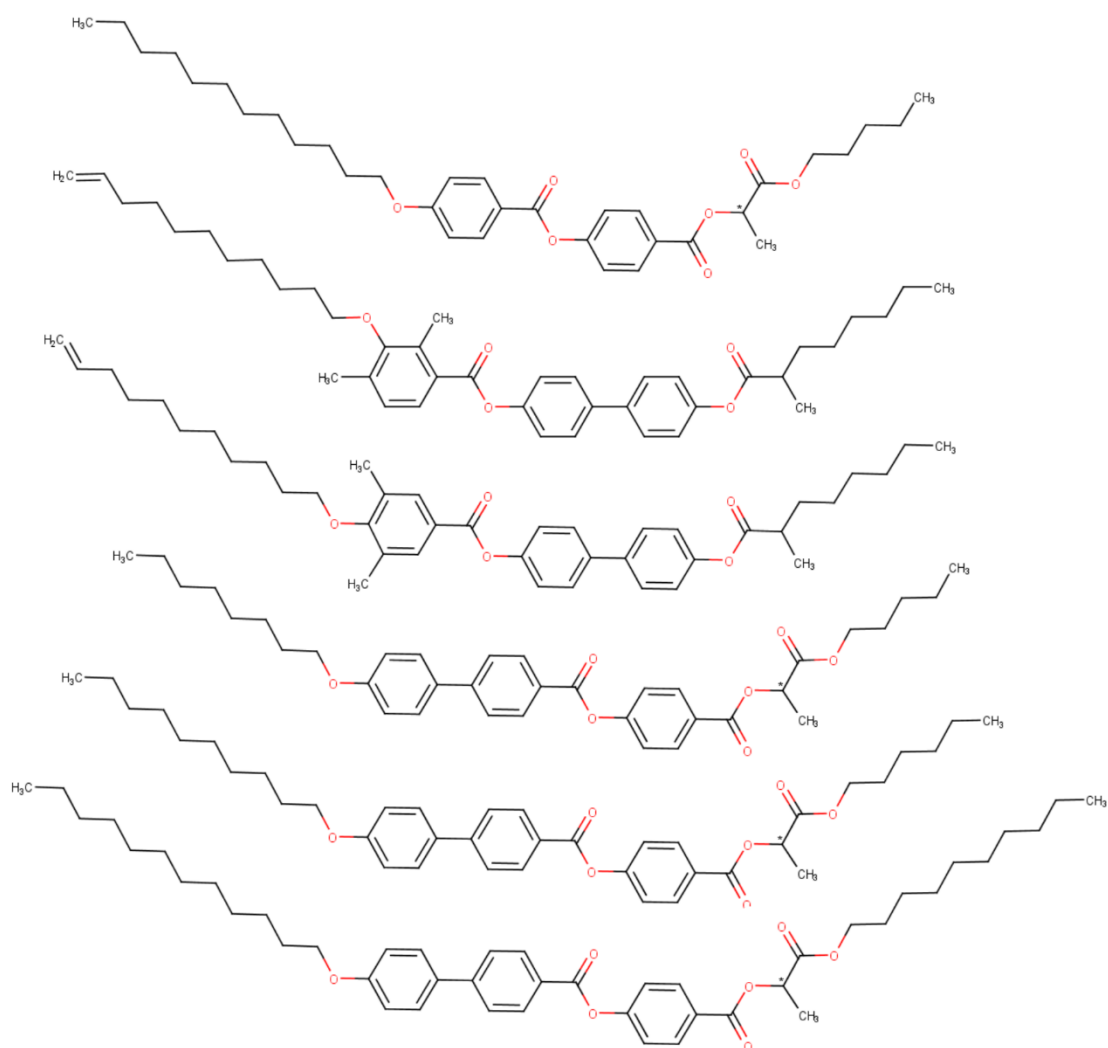
Pro přípravu roztoku základního elektrolytu byl použit acetonitril  $\geq 99,9\%$  firmy Sigma-Aldrich, octová kyselina 99% p. a. společnosti Lach-Ner Neratovice, hexadecyltrimethylamonium chlorid 25% (w/w) ve vodě firmy Sigma-Aldrich, USA. Jako referentní látka byl používán mesityloxid p. a. (MO) dodávaný firmou Lach-ner Neratovice a deionizovaná voda.

K promývání křemenné kapiláry byla používána hydroxyethylcelulosa firmy Ashland, USA a kyselina chlorovodíková 35% p. a. firmy Lach-Ner Neratovice.

K pokrytí kapiláry dále sloužil hexadimethrin bromid  $\geq 95\%$  firmy Sigma-Aldrich, USA.

Hydroxid sodný p. a. byl od firmy Lach-Ner Neratovice.

## 2.2 Látky tvořící kapalně krystalné krystaly



Obr. 5 Molekuly zkoumaných látek tvořících kapalně krystalné krystaly v pořadí 12 PHB<sup>2</sup>AL, UDBN-m, UDBN-p, ZL 8/5, ZL 10/6 a ZL 12/10. Místa s optickou izomerií jsou označena hvězdičkou. Molekuly vytvořeny v programu MarvinSketch [44].

Nově syntetizované látky tvořící kapalně krystalické fáze, které byly studovány v této práci, jsou označeny zkratkami:

12 PHB <sup>2</sup> AL	4-({[1-oxo-1-(pentyloxy)propan-2-yl]oxy}karbonyl)fenyl-4-(dodecyloxy)benzoát
UDBN-m	4'-[2-methyloktanoyl]oxy]-[1,1'-bifenyl]-4-yl 2,4-dimethyl-3-(undeka-10-en-1-yloxy)benzoát
UDBN-p	4'-[2-methyloktanoyl]oxy]-[1,1'-bifenyl]-4-yl 3,5-dimethyl-4-(undeka-10-en-1-yloxy)benzoát
ZL 8/5	4-({[1-oxo-1-(pentyloxy)propan-2-yl]oxy}karbonyl)fenyl 4'-(oktyloxy)-[1,1'-bifenyl]-4-karboxylát
ZL 10/6	4-({[1-(hexyloxy)-1-oxopropan-2-yl]oxy}karbonyl)fenyl 4'-(decyloxy)-[1,1'-bifenyl]-4-karboxylát
ZL 12/10	4-({[1-(decyloxy)-1-oxopropan-2-yl]oxy}karbonyl)fenyl 4'-(dodecyloxy)-[1,1'-bifenyl]-4-karboxylát

Látky byly laskavě poskytnuty Fyzikálním ústavem Akademie věd ČR. Od jedné látky byl k dispozici vždy vzorek čistý a vzorek s menší čistotou (Tab. 1). U látky značené UDBN byl jeden vzorek s isomerem majícím alkoxylovou skupinu v poloze meta, druhý vzorek látky značené UDBN byla směs isomerů meta a para.

Tab. 1 Analyzované vzorky. Vzorky byly v různých čistotách. Uvedené hodnoty čistot byly poskytnuty pracovníky provádějícími syntézu.

	čistota látky	
	12 PHB <sup>2</sup> AL	99 %
UDBN	m	m:p (73:26)
ZL 8/5 S	čistá	76 %
ZL 10/6 S	99 %	72 %
ZL 12/10 S	99 %	59 %

## 2.3 Instrumentace

Měření probíhala na přístroji Agilent CE 7100 firmy Agilent Technologies, Německo. Křemenná kapilára byla s vnitřním průměrem 50  $\mu\text{m}$ , délkou 50,0 cm a efektivní délkou 41,5 cm firmy Polymicro Technologies, USA. Kapiláry pokryté polymerem CEP a polyvinylalkoholem (PVA) byly zakoupeny komerčně od firmy Agilent Technologies, Německo. Kapilára CEP je s vnitřním průměrem 75  $\mu\text{m}$ ,

celková délka 79,0 cm, efektivní délka 70,5 cm. Kapilára PVA s vnitřním průměrem 50  $\mu\text{m}$ , celkovou délkou 64,5 cm a efektivní délkou 56,0 cm.

Pro přípravu roztoků látek tvořících kapalně krystalné fáze byly použity váhy Sartorius 2004 MP firmy Sartalex, Ústí nad Labem s přesností vážení na 0,01 mg. Pro přípravu ostatních roztoků byly použity analytické váhy Precisa 262 SMA-FR s přesností vážení na 0,1 mg firmy Precisa Gravimetrics AG, Švýcarsko či předvážky ViBRA firmy Shinko Denshi, Japonsko.

Základní elektrolyt byl filtrován injekční stříkačkou přes 0,45  $\mu\text{m}$  polyvinylidendifluoridový (PVDF) filtr.

## 2.4 Příprava roztoků

Roztoky základního elektrolytu byly připraveny smícháním zvoleného množství octové kyseliny a 25% vodného roztoku hexadecyltrimethylamonium chloridu v acetonitrilu.

Látky tvořící kapalně krystalné fáze byly pro předběžné experimenty rozpouštěny v koncentraci přibližně 0,1  $\text{mg cm}^{-3}$  v acetonitrilu. Po zvolení vhodných podmínek byly připraveny jejich roztoky o dané koncentraci v základním elektrolytu obsahujícím 10  $\text{mmol dm}^{-3}$  octovou kyselinu a CTAC v koncentraci 25  $\text{mmol dm}^{-3}$  či 40  $\text{mmol dm}^{-3}$ . Tyto zásobní roztoky byly pro dávkování vždy ještě dvakrát ředěny základním elektrolytem. Mesityloxid byl připraven v koncentraci 10  $\text{mg cm}^{-3}$  v acetonitrilu, pro analýzu byl vždy ještě desetkrát ředěn základním elektrolytem.

Roztok hydroxyethylcelulosity byl připraven vodný v koncentraci 0,1 % (w/v). Roztok hexadimethrinbromidu byl připraven v koncentraci 5 % (w/v) ve vodě.

Pro promývání kapilár byl připraven vodný roztok hydroxidu sodného o koncentraci 0,1  $\text{mol dm}^{-3}$  a kyselina chlorovodíková v koncentracích 0,1  $\text{mol dm}^{-3}$  a 1  $\text{mol dm}^{-3}$ .

## **2.5 Postup měření**

### **2.5.1 Separace látek tvořících kapalně krystal - první experimenty**

Byla připravena křemenná kapilára o vnitřním průměru 50  $\mu\text{m}$  v délce 50,0 cm (efektivní délka 41,5 cm). Před každým měřením byla kapilára 2 minuty promývána základním elektrolytem. Dávkován byl směsný vzorek obsahující analyty, kterými jsou látka 12 PHB<sup>2</sup>AL v koncentraci 0,05  $\text{mg cm}^{-3}$  a referenční látka mesityloxid o koncentraci 1,0  $\text{mg cm}^{-3}$ . Látky byly na tyto koncentrace ředěny základním elektrolytem. Směsný vzorek byl dávkován hydrodynamicky tlakem 5 kPa po dobu 3 sekund. Poté bylo vkládáno napětí 30 kV pozitivní polaroty. Po ukončení měření byla kapilára promyta po dobu 1 minuty čistým acetonitrilem. Kapilára byla termostatována na 25 °C vzduchem, elektroferogram byl snímán při vlnové délce 254 nm.

### **2.5.2 Opakovatelnost měření**

#### **2.5.2.1 Promytí hydroxyethylcelulosou**

##### **Promytí před prvním měřením**

Křemenná kapilára byla promývána po dobu 1 minuty acetonitrilem, 2 minuty vodou, 3 minuty 0,1 % roztokem hydroxyethylcelulosy, následně 2 minuty vodou, 2 minuty acetonitrilem a 2 minuty základním elektrolytem. Dávkován byl mesityloxid v koncentraci 1,0  $\text{mg cm}^{-3}$  v základním elektrolytu. Dávkování bylo hydrodynamické tlakem 5 kPa po dobu jedné sekundy. Po nadávkování vzorku bylo vkládáno napětí 30 kV pozitivní polaroty. Měření bylo opakováno pětkrát. Zaznamenány byly migrační časy mesityloxidu z elektroferogramu snímaného při vlnové délce 254 nm. Měření bylo opakováno pětkrát.

##### **Promytí před každým měřením**

Pětkrát bylo opakováno také měření, kdy byl výše popsán postup promývání kapiláry opakován před každým měřením.



### 2.5.2.2 Pokrytí kapiláry polybrenem

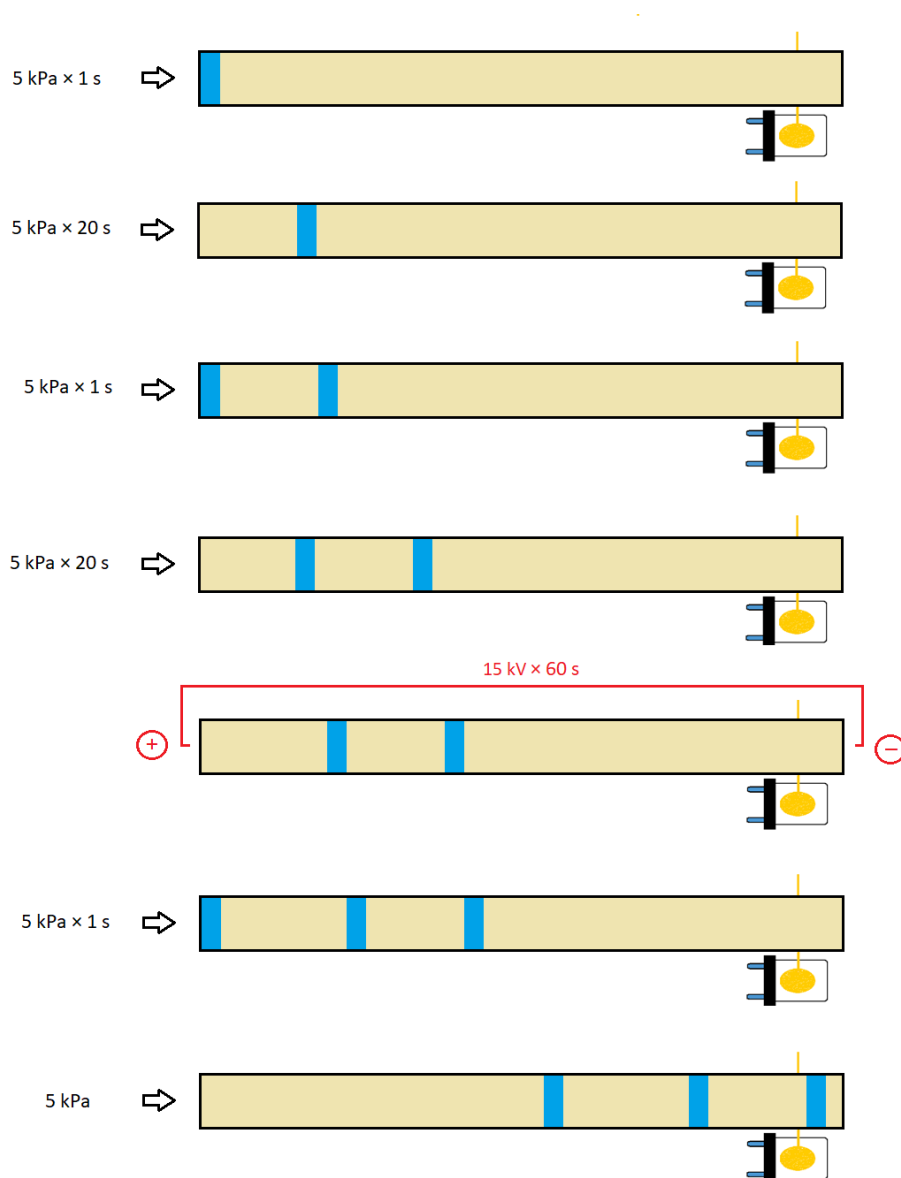
Pro pokrytí kapiláry polybrenem byl použit postup popsany Katayamou a kol. [45]. Křemenná kapilára o celkové délce 50,0 cm (efektivní 8,5 cm) byla promývána roztokem 0,1 M NaOH po dobu 40 minut. Následně byla šestkrát promyta vodou po dobu vždy 3 minut. Kapilára byla promývána 20 minut 5% roztokem hexadimethrinbromidu (polybren). Mezi konce kapiláry ponořené do tohoto roztoku bylo vloženo napětí 3 kV pozitivní polarity na dobu 20 minut. Následně byla kapilára promyta 3 minuty vodou. Dávkován byl mesityloxid v koncentraci  $1,0 \text{ mg cm}^{-3}$  v základním elektrolytu. Dávkování bylo hydrodynamické tlakem -5 kPa po dobu 3 sekund. Vkládáno bylo napětí 30 kV negativní polarity. Měření tedy probíhalo na tzv. „krátkém konci kapiláry“ – mezi detektorem a výstupním koncem. Měření bylo opakováno pětkrát.

### 2.5.2.3 Komerční pokryté kapiláry

Použita byla kapilára CEP s vnitřním průměrem 75  $\mu\text{m}$ , celková délka 79,0 cm, efektivní délka 70,5 cm a kapilára PVA s vnitřním průměrem 50  $\mu\text{m}$ , celkovou délkou 64,5 cm a efektivní délkou 56,0 cm. Dávkován byl mesityloxid v koncentraci  $1,0 \text{ mg cm}^{-3}$  po dobu 1 sekundy tlakem 5 kPa. Vkládáno bylo napětí 30 kV pozitivní polarity. CEP kapilára byla po použití promývána methanolem a vodou. Kapilára PVA byla promývána acetonitrilem a následně vzduchem. Měření byla opakována pětkrát.

## 2.5.3 Měření elektroosmotického toku

Měření EOF bylo prováděno metodou dle Vigha a Williamse [46]. Jako neutrální marker byla použita zóna vody, která poskytla při vlnové délce 254 nm negativní signál. Po promytí kapiláry základním elektrolytem, kterým je acetonitril obsahující octovou kyselinu v koncentraci  $10 \text{ mmol dm}^{-3}$  a různou koncentraci CTAC, byla dávkována první zóna vody hydrodynamicky tlakem 5 kPa po dobu 1 sekundy. Následně byla vialka s vodou nahrazena vialkou se základním elektrolytem a první zóna byla zasunuta dále do kapiláry tlakem 5 kPa po dobu 20 sekund. Následně byla obdobně dávkována a zasunuta druhá zóna vody. Poté bylo vkládáno napětí 15 kV po dobu 60 sekund. Následně byla dávkována poslední třetí zóna vody. Nakonec byly všechny tři zóny vody mobilizovány tlakem 5 kPa z kapiláry skrz detektor (Obr. 6).



Obr. 6 Postup měření pro zjištění mobility elektroosmotického toku. Měření probíhala v 50,0 cm dlouhé křemenné kapiláře (efektivní délka 41,5 cm). Základním elektrolytem byl acetonitril obsahující 10 mM octovou kyselinu a různé koncentrace CTAC. Jako neutrální marker byla použita zóna vody.

Mobilita EOF byla počítána podle vztahu:

$$\mu_{\text{EOF}} = \frac{(t_3 - 2t_2 + t_1) \cdot l_D \cdot l_C}{t_U \cdot t_3 \cdot U}$$

Označení  $t_1$  je doba od začátku mobilizace tlakem, kdy byla detekována první zóna vody,  $t_2$  značí druhou zónu a  $t_3$  třetí zónu dávkovanou až po vložení napětí,  $U$  je hodnota vkládaného napětí a  $t_U$  je doba, po kterou bylo napětí vkládáno. Označení  $l_D$  je délka kapiláry k detektoru a  $l_C$  je celková délka kapiláry. Měření byla opakována pětkrát.

## 2.5.4 Analýza vzorků za zvolených podmínek

Poslední měření probíhala v křemenné kapiláře za zvýšené koncentrace CTAC. Jeho koncentrace v základním elektrolytu byla  $40 \text{ mmol dm}^{-3}$ , koncentrace octové kyseliny zůstala  $10 \text{ mmol dm}^{-3}$ . Před každým měřením byla kapilára promývána 1 minutu 1 M kyselinou chlorovodíkovou. Kapilára byla následně promyta po dobu 2 minut základním elektrolytem. Dávkovány byly jednotlivé vzorky obsahující látky tvořící kapalně krystaly rozpuštěné v základním elektrolytu. Rozpuštěny byly v koncentracích v rozmezí  $0,2\text{-}1,0 \text{ mg cm}^{-3}$ . Dále byly ředěny dvakrát a dávkovány zároveň s mesityloxidem o koncentraci  $1,0 \text{ mg cm}^{-3}$ . Dávkování bylo hydrodynamické tlakem  $5 \text{ kPa}$  po dobu jedné sekundy. Vkládané napětí mělo hodnotu  $20 \text{ kV}$ .

Relativní migrační čas analytu  $t_R$  je počítán ze vzorce

$$t_R = \frac{t_A}{t_{MO}}$$

kde  $t_A$  je migrační čas analytu,  $t_{MO}$  je migrační čas referentní látky, kterou je mesityloxid.

### 3. Výsledky a diskuze

#### 3.1 Volba základního elektrolytu

Protože zkoumané látky tvořící kapalně krystalické fáze jsou ve vodě prakticky nerozpustné, byla testována jejich rozpustnost na koncentrační hladině  $1 \text{ mg cm}^{-3}$  v jiných rozpouštědlech. Zatímco v methanolu nebyl vzorek 12 PHB<sup>2</sup>AL dostatečně rozpustný, podařilo se ho rozpustit ve 100% acetonitrilu.

Protože jsou všechny analyty látky, které nemají snadno ionizovatelné funkční skupiny, byla pro separaci zvolena metoda elektrokinetické chromatografie. Byla hledána vhodná povrchově aktivní látka. Běžně používaný dodecylsírany sodný (SDS) je v acetonitrilu nerozpustný. Proto byl zvolen hexadecyltrimethylamonium chlorid (CTAC), jehož rozpustnost je pro další pokusy dostatečná. Bylo ověřeno, že elektrolyt musí obsahovat pouze čistý acetonitril. I mírným naředěním vodou dochází k vysrážení analytů. Získané poznatky o rozpustnosti 12 PHB<sup>2</sup>AL a surfaktantů shrnuje Tab. 2.

Tab. 2 Shrnutí rozpustnosti 12 PHB<sup>2</sup>AL jako zástupce analytů a surfaktantů ve vodě, acetonitrilu a jejich směsi.

	voda	acetonitril	50 % acetonitril
$1 \text{ mg cm}^{-3}$ 12 PHB <sup>2</sup> AL	x	√	x
$20 \text{ mmol dm}^{-3}$ SDS	√	x	√
$20 \text{ mmol dm}^{-3}$ CTAC	√	√	√

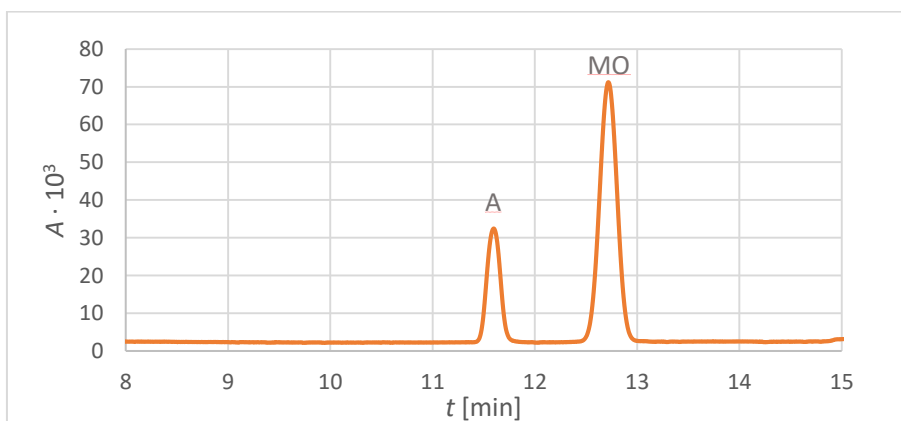
Byl hledán vhodný pufr, který by zajistil stabilní hodnotu pH. Nejdříve byl připraven pufr smícháním octové kyseliny a amoniaku. Ovšem po přidavku surfaktantu CTAC dochází ke vzniku sraženiny. Zřejmě zde vzniká bílá sraženina chloridu amonného. Byla tedy snaha nahradit tento pufr jiným pufrem. Tris(hydroxymethyl)aminomethan je v acetonitrilu nerozpustný, není tedy vhodný pro zvolené podmínky. Pokud byl

přípraven pufr přidáním triethylaminu, docházelo rovněž ke vzniku sraženiny po přidavku CTAC.

Závěr z těchto experimentů byl, že jako základní elektrolyt bude využíván acetonitril s přidavkem octové kyseliny v koncentraci  $10 \text{ mmol dm}^{-3}$  a CTAC v koncentraci  $25 \text{ mmol dm}^{-3}$ . Za těchto podmínek jsou všechny složky BGE i analyty dostatečně rozpustné, přítomnost slabé kyseliny zajišťuje úpravu pH a jeho částečnou stabilizaci. Vzhledem k tomu, že analyty neobsahují slabě kyselé ani bazické funkční skupiny a použitý surfaktant je solí silné zásady, nemělo by pH základního elektrolytu mít velký vliv na separaci.

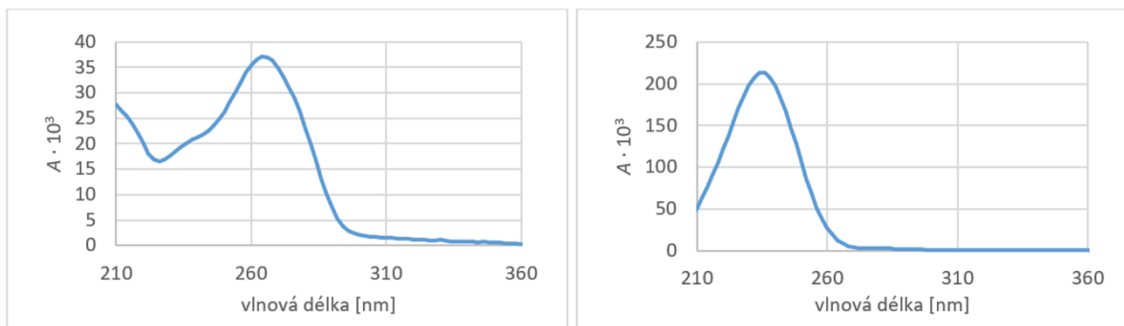
### 3.2 Separace látek tvořících kapalně krystaly - první experimenty

Při prvních pokusech separovat látky tvořící krystaly se ukázalo, že dávkovaný analyt je detekovatelný při použití přímé UV detekce při vlnové délce  $254 \text{ nm}$ , což je v souladu s přítomností několika aromatických kruhů v jeho struktuře. Interakcí dávkovaných látek s CTAC dochází k jejich separaci od přidaného mesityloxidu. Vzhledem k tomu, že zdánlivá elektroforetická mobilita analytu byla vyšší než zdánlivá elektroforetická mobilita mesityloxidu, je zřejmé, že nenabitý analyt interagoval s kationtovým detergentem, čímž získal elektroforetickou mobilitu vyšší než mesityloxid. Píky jsou symetrické (Obr. 7). Faktor symetrie píku látky  $12 \text{ PHB}^2\text{AL}$  je  $0,96$ ; faktor symetrie píku mesityloxidu je  $0,97$ .



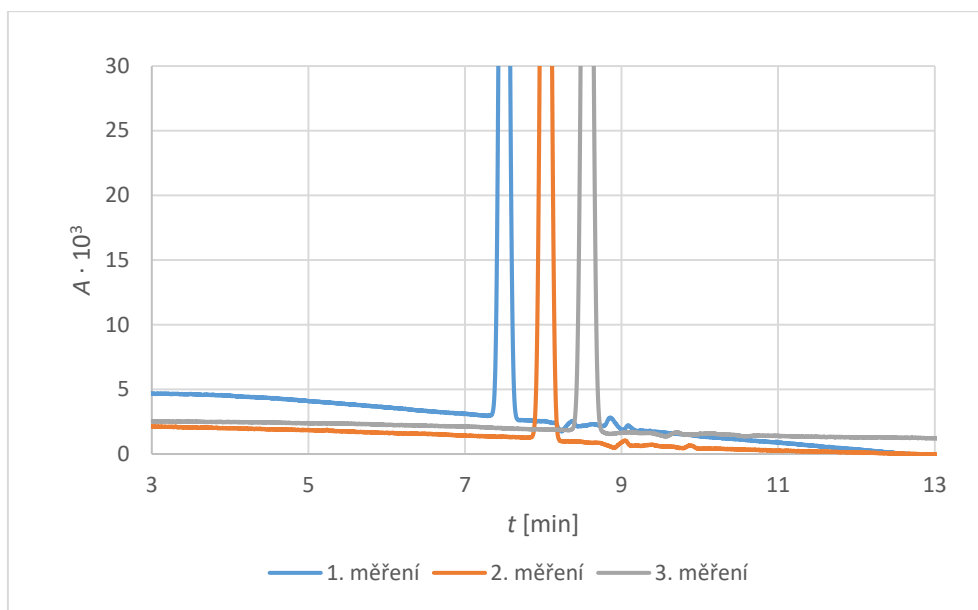
Obr. 7 Elektroferogram získaný při dávkování vzorku obsahujícího přibližně  $0,05 \text{ mg cm}^{-3}$   $12 \text{ PHB}^2\text{AL}$  (označeno A) a mesityloxid (označeno MO) v koncentraci  $1,0 \text{ mg cm}^{-3}$ . Dávkování bylo hydrodynamické tlakem  $5 \text{ kPa}$  po dobu  $3 \text{ sekund}$ . Základním elektrolytem byl acetonitril s  $10 \text{ mM}$  octovou kyselinou a  $25 \text{ mM}$  CTAC. Vkládané napětí  $30 \text{ kV}$ , pozitivní polarita. Měření probíhalo v křemenné kapiláře s vnitřním průměrem  $50 \mu\text{m}$ , o celkové délce  $50,0 \text{ cm}$ , efektivní délce  $41,5 \text{ cm}$ . Vlnová délka detekce  $254 \text{ nm}$ .

Absorpční spektra dávkované referentní látky mesityloxiidu a látky tvořící kapalné krystaly se velmi liší, proto je snadné píky identifikovat na základě spekter zaznamenaných v průběhu separace detektorem s diodovým polem (Obr. 8).



Obr. 8 Absorpční spektra 12 PHB<sup>2</sup>AL (vlevo) a mesityloxiidu (vpravo). Získáno při dávkování smíšeného vzorku 12 PHB<sup>2</sup>AL o koncentraci přibližně 0,05 mg cm<sup>-3</sup> a mesityloxiidu o koncentraci 1,0 mg cm<sup>-3</sup>. Základním elektrolytem byl acetonitril s přidavkem octové kyseliny (10 mM) a CTAC (25 mM). Vkládané napětí 30 kV, pozitivní polarita. Absorpční spektrum látky 12 PHB<sup>2</sup>AL odečteno v čase 11,60 minut. Spektrum mesityloxiidu odečteno v čase 12,72 minut.

V průběhu dalších experimentů se ukázalo, že migrační časy látek u po sobě jdoucích měření se velmi lišily. Ještě větším problémem bylo, že s každým dalším měřením migrační čas narůstal. Pro ověření byla měření opakována s dávkováním pouze mesityloxiidu (Obr. 9). Důvodem byla úspora analytů, které byly dostupné ve velmi omezeném množství. Migrační čas mesityloxiidu s každým měřením narůstá o více než 5 %. Tento experiment naznačil, že problémem je nízká opakovatelnost mobility EOF, která pak ovlivňuje zdánlivé mobility všech ostatních látek. V průběhu jednotlivých měření docházelo pravděpodobně k nevratným procesům u stěn kapiláry.



Obr. 9 Elektroferogramy získané při dávkování mesityloxydu v koncentraci  $1,0 \text{ mg cm}^{-3}$ . Dávkování bylo hydrodynamické tlakem  $5 \text{ kPa}$  po dobu  $3 \text{ sekund}$ . Základním elektrolytem byl acetonitril s  $10 \text{ mM}$  octovou kyselinou a  $25 \text{ mM}$  CTAC. Vkládané napětí  $30 \text{ kV}$ , pozitivní polarita. Měření probíhalo v křemenné kapiláře s vnitřním průměrem  $50 \text{ }\mu\text{m}$ , o celkové délce  $50,0 \text{ cm}$ , efektivní délce  $41,5 \text{ cm}$ . Elektroferogramy snímány při vlnové délce  $254 \text{ nm}$ .

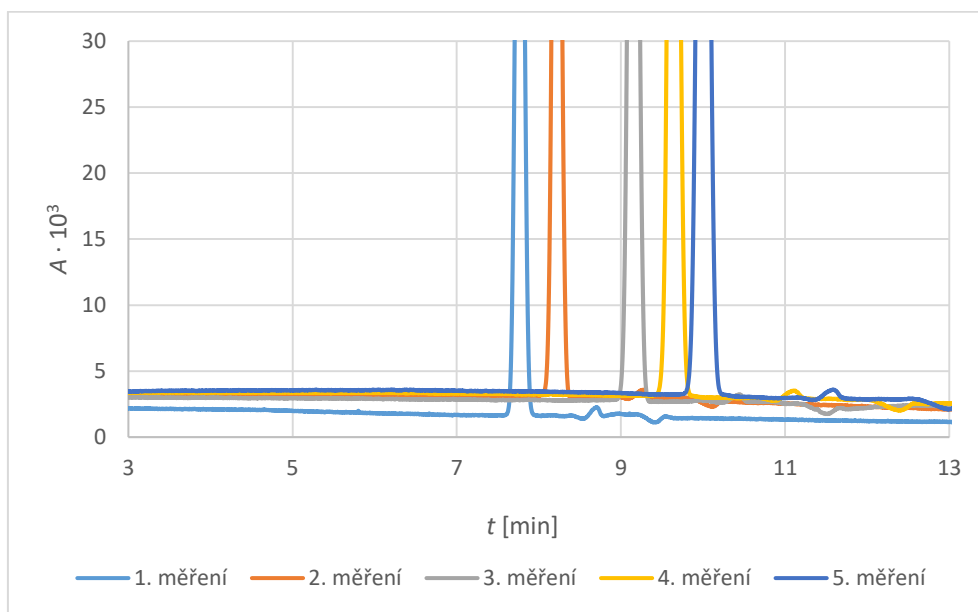
### 3.3 Opakovatelnost migračního času

Kvůli zjištěné nízké opakovatelnosti migračních časů byly hledány jiné podmínky, při kterých by byl EOF opakovatelný. Vzhledem k tomu, že rychlost EOF a tím pádem i jeho stabilita závisí především na stavu vnitřní stěny kapiláry, byly testovány různé způsoby pokrytí stěn a promývací procedury.

#### 3.3.1 Promytí hydroxyethylcelulosou

V domnění, že nestabilitu EOF způsobuje nereprodukovatelná adsorpce CTAC na stěnu kapiláry, bylo rozhodnuto, že při dalších měřeních bude kapilára promývána roztokem hydroxyethylcelulosy (HEC), která vytváří fyzikální dynamické pokrytí stěny kapiláry, aby se zlepšila opakovatelnost a následně reprodukovatelnost migračních časů dávkovaných látek.

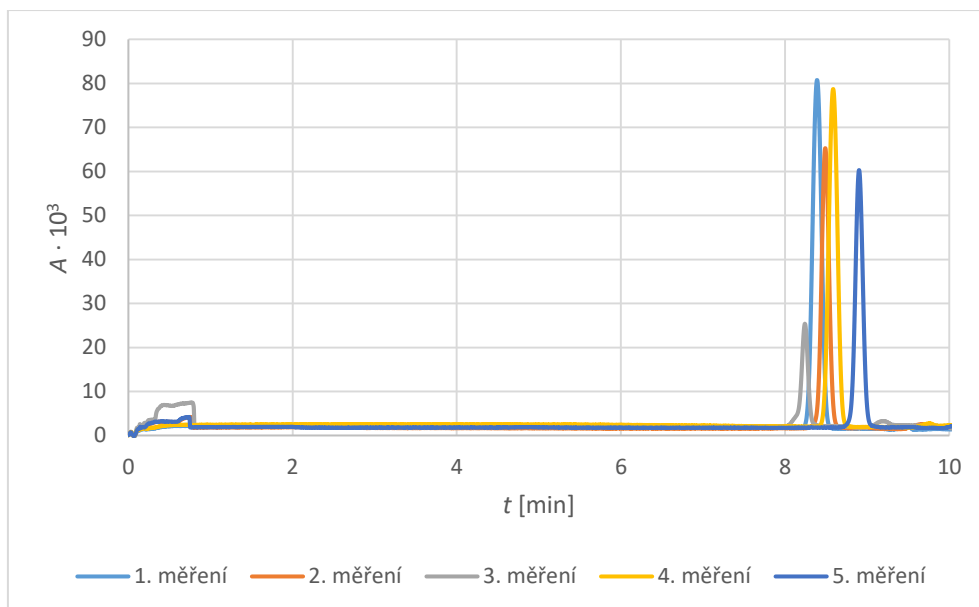
HEC je ovšem v acetonitrilu nerozpustná, proto byl připraven 0,1 % (w/v) vodný roztok a kapilára byla promyta před začátkem série měření nejprve vodou, následně vodným roztokem HEC, pak opět vodou, acetonitrilem, a nakonec základním elektrolytem. Tak bylo zajištěno, že omezená rozpustnost HEC v acetonitrilu nebude působit problémy. Ovšem i při tomto ošetření vnitřní stěny kapiláry se s každým dalším měřením stále prodlužovala doba migrace mesityloxiidu (Obr. 10).



Obr. 10 Elektroferogramy získané při dávkování mesityloxiidu v koncentraci  $1,0 \text{ mg cm}^{-3}$ . Dávkování bylo hydrodynamické tlakem  $5 \text{ kPa}$  po dobu  $3 \text{ sekund}$ . Základním elektrolytem byl acetonitril s  $10 \text{ mM}$  octovou kyselinou a  $25 \text{ mM}$  CTAC. Vkládané napětí  $30 \text{ kV}$ , pozitivní polarita. Měření probíhalo v křemenné kapiláře s vnitřním průměrem  $50 \text{ }\mu\text{m}$ , o celkové délce  $50,0 \text{ cm}$ , efektivní délce  $41,5 \text{ cm}$ . Kapilára byla promyta před prvním měřením série  $0,1\%$  (w/v) vodným roztokem hydroxyethylcelulosity. Elektroferogramy snímané při vlnové délce  $254 \text{ nm}$ .



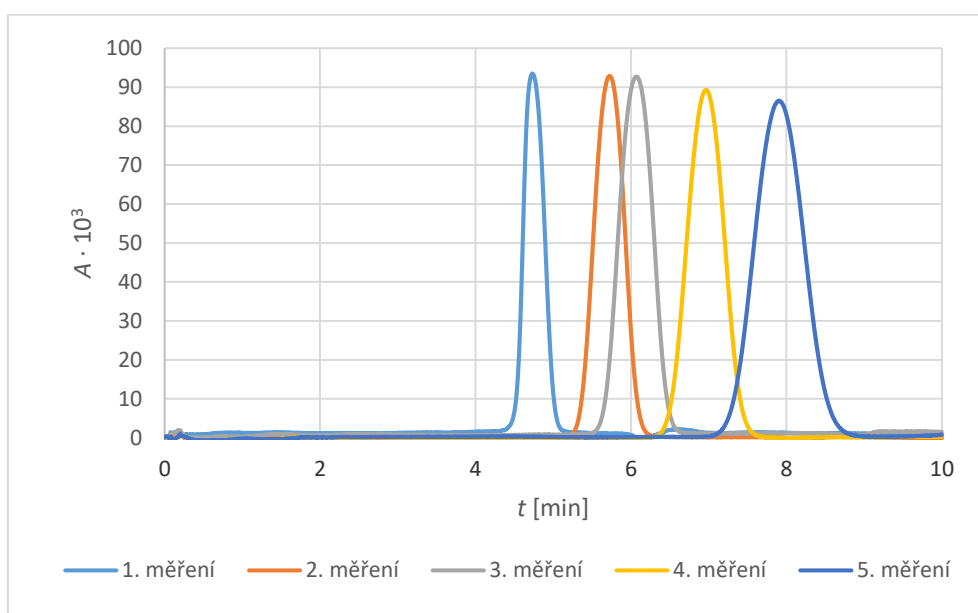
Následně se ukázalo, že pokud je kapilára promývána roztokem hydroxyethylcelulosity před každým měřením, migrační časy se sice také postupně prodlužují, ale méně než při jednorázovém promytí kapiláry před sérií měření (Obr. 11).



Obr. 11 Elektroferogramy získané při dávkování mesityloxidu v koncentraci  $1,0 \text{ mg cm}^{-3}$ . Dávkování bylo hydrodynamické tlakem  $5 \text{ kPa}$  po dobu  $3 \text{ sekund}$ . Základním elektrolytem byl acetonitril s  $10 \text{ mM}$  octovou kyselinou a  $25 \text{ mM}$  CTAC. Vkládané napětí  $30 \text{ kV}$ , pozitivní polarita. Měření probíhalo v křemenné kapiláře s vnitřním průměrem  $50 \text{ }\mu\text{m}$ , o celkové délce  $50,0 \text{ cm}$ , efektivní délce  $41,5 \text{ cm}$ . Kapilára byla promyta před každým měřením  $0,1\%$  (w/v) vodným roztokem hydroxyethylcelulosity. Elektroferogramy snímány při vlnové délce  $254 \text{ nm}$ .

### 3.3.2 Pokrytí kapiláry polybrenem

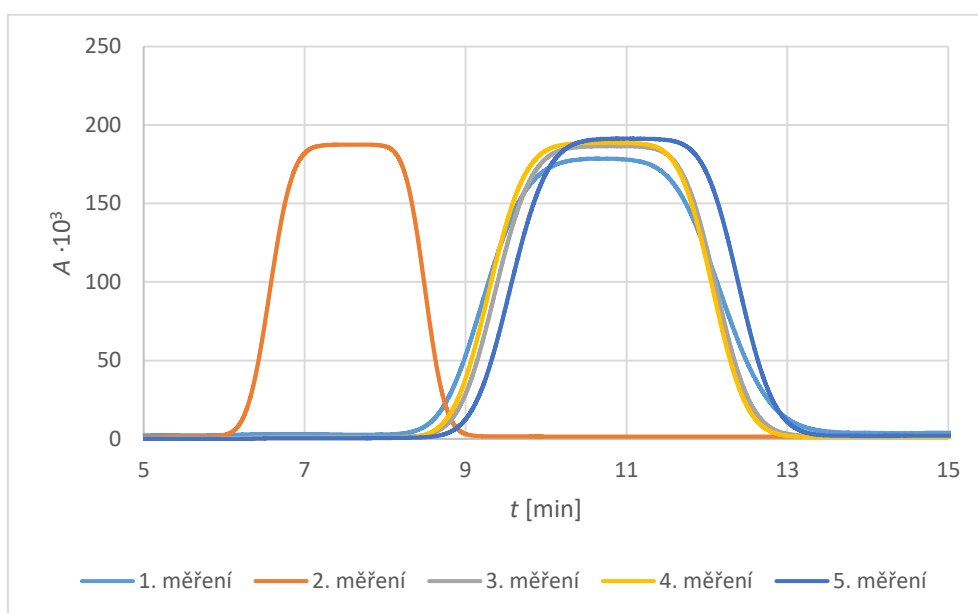
Dalším testovaným postupem bylo pokrytí kapiláry silně kladně nabitým polymerem polybren. Kapilára byla pokryta postupem podle Katayamy [45]. Protože měření při dávkování mesityloxiidu na vstupním konci kapiláry trvala neúměrně dlouho, bylo měření prováděno na tzv. krátkém konci kapiláry. Vzorek byl tedy dávkován na konci kapiláry blíže k detektoru. Pro úspěšné měření v tomto uspořádání musela být také změněna polarita vkládaného napětí. U měření, která probíhala po sobě, stále docházelo k prodlužování migračního času dávkované látky (Obr. 12).



Obr. 12 Elektroferogramy získané při dávkování mesityloxiidu v koncentraci  $1,0 \text{ mg cm}^{-3}$  z krátkého konce kapiláry (efektivní délka 8,5 cm). Dávkování bylo hydrodynamické tlakem 5 kPa po dobu 3 sekund. Základním elektrolytem byl acetonitril s 10 mM octovou kyselinou a 25 mM CTAC. Vkládané napětí 30 kV, pozitivní polarita. Měření probíhalo v křemenné kapiláře s vnitřním průměrem  $50 \mu\text{m}$ , o celkové délce 50,0 cm. Vkládané napětí 30 kV, negativní polarita. Elektroferogramy snímané při vlnové délce 254 nm.

### 3.3.3 Kapilára CEP

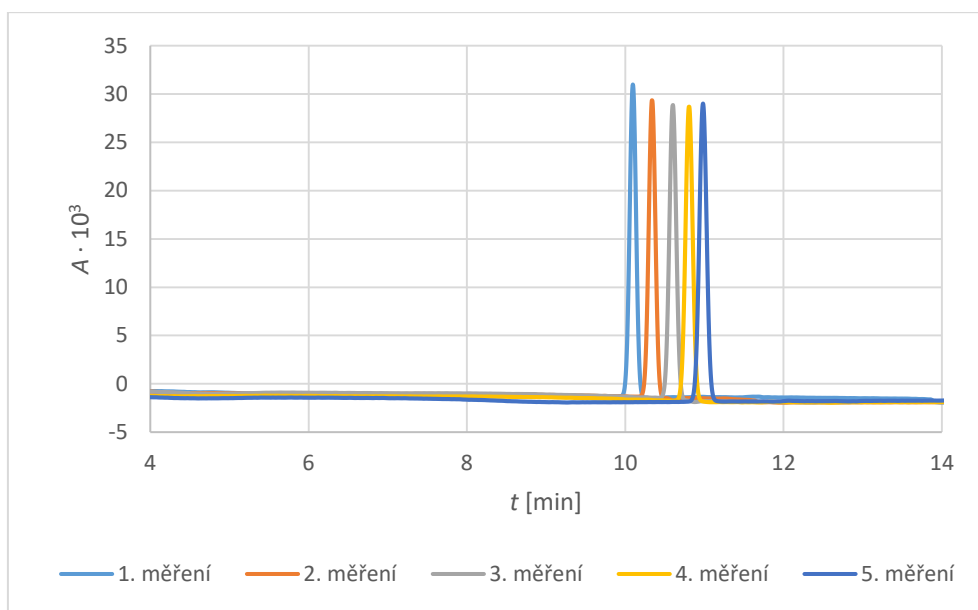
Byla testována také komerční pokrytá kapilára. Kapilára má na stěně vrstvu vázaného polymeru. Předpokládalo se, že bude docházet k menším rozdílům v absorpci látek základního elektrolytu. Protože při dávkování z dlouhého konce kapiláry trvala analýza dlouho, byla měření prováděna z krátkého konce podobně jako v případě kapiláry pokryté polybrenem. Ukázalo se (Obr. 13), že migrační časy se s výjimkou jednoho měření shodují. Plochý tvar vrcholu píku je způsoben předávkováním kapiláry vzorkem.



Obr. 13 Elektroferogramy získané při dávkování mesityloxiidu v koncentraci  $1,0 \text{ mg cm}^{-3}$  z krátkého konce kapiláry. Dávkování bylo hydrodynamické tlakem 5 kPa po dobu 3 sekund. Základním elektrolytem byl acetonitril s 10 mM octovou kyselinou a 25 mM CTAC. Vkládané napětí 15 kV, pozitivní polarita. Měření probíhalo v CEP kapiláře s vnitřním průměrem  $75 \mu\text{m}$ , o celkové délce 79,0 cm, efektivní délce 8,5 cm. Elektroferogramy snímány při vlnové délce 254 nm.

### 3.3.4 Kapilára PVA

Kapilára CEP pocházela ze starších zásob pracoviště. Při poptávce u výrobce se však ukázalo, že tato kapilára se již nevyrobí. Pro nedostupnost kapiláry CEP na trhu byla testována ještě kapilára PVA, která byla výrobcem doporučena jako alternativa. Jde o kapiláru, která má na stěně kovalentně vázaný polyvinylalkohol. V této kapiláře se dosáhlo velmi dobrých výsledků, migrační časy narůstají s každým dalším měřením o méně než 3 %, ale stále je sledován trend nárůstu migračních časů (Obr. 14).

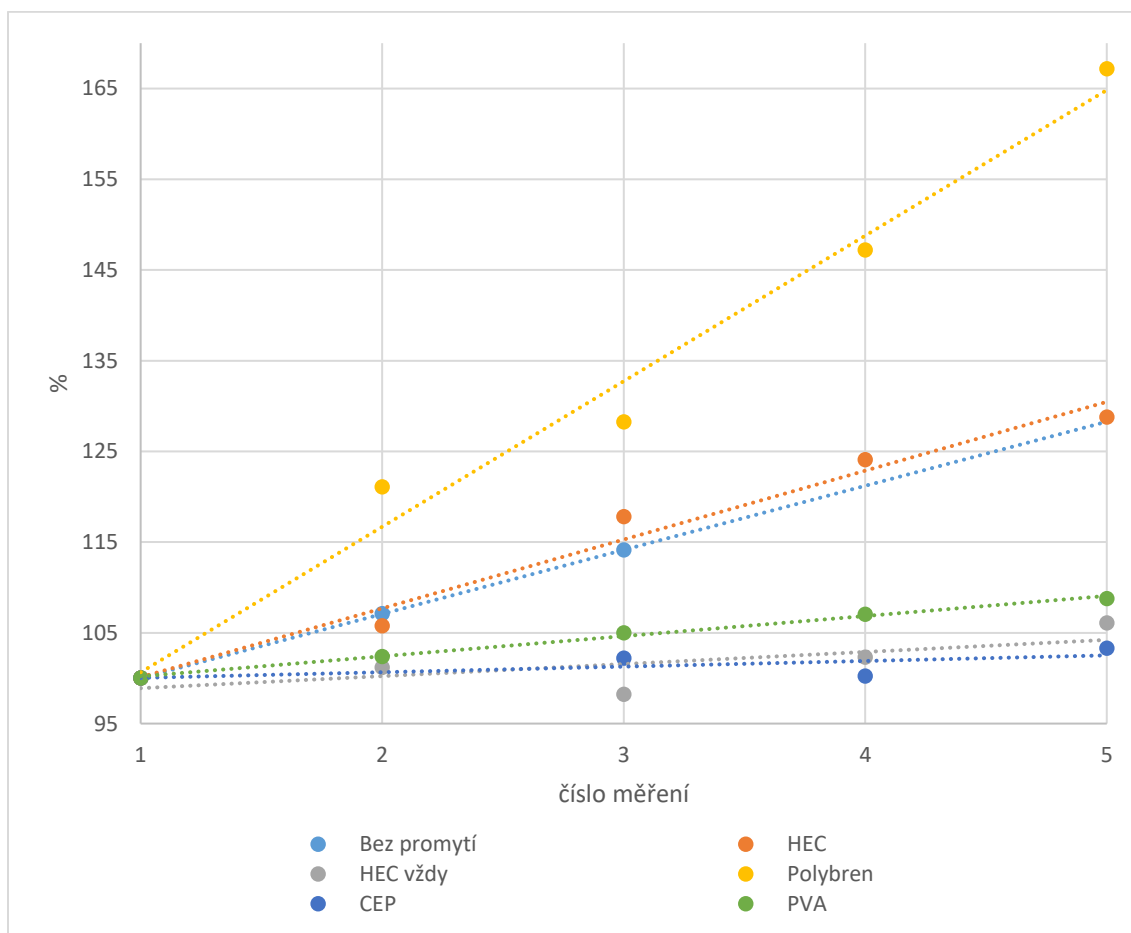


Obr. 14 Elektroferogramy získané při dávkování mesityloxiidu v koncentraci  $1,0 \text{ mg cm}^{-3}$ . Dávkování bylo hydrodynamické tlakem  $5 \text{ kPa}$  po dobu  $3 \text{ sekund}$ . Základním elektrolytem byl acetonitril s  $10 \text{ mM}$  octovou kyselinou a  $25 \text{ mM}$  CTAC. Vkládané napětí  $30 \text{ kV}$ , pozitivní polarita. Měření probíhalo v PVA kapiláře s vnitřním průměrem  $50 \text{ }\mu\text{m}$ , o celkové délce  $64,5 \text{ cm}$ , efektivní délce  $56,0 \text{ cm}$ . Elektroferogramy snímány při vlnové délce  $254 \text{ nm}$ .

### 3.3.5 Srovnání nárůstu migračních časů

Výsledky měření za různých podmínek byly vyneseny do grafu, který ukazuje procentuální nárůst migračních časů při po sobě jdoucích měřeních.

Z grafu (Obr. 15) lze vyčíst, že nejmenší nárůst časů vychází pro kapiláru CEP (během pěti měření o 3 %). Při promývání HEC před každým měřením také nedochází k velkému nárůstu migračních časů (během pěti měření o 6 %). Poslední z trojice pokrytí, která poskytují relativně stabilní migrační časy, je PVA. Při použití promytí HEC před sérií měření je výsledek podobný jako v případě měření s nepokrytou kapilárou. Pokrytí kationtovým polymerem polybren poskytuje výrazně horší výsledky než měření bez pokrytí, v tomto případě se migrační čas během pěti měření zvýšil o více než 65 %.

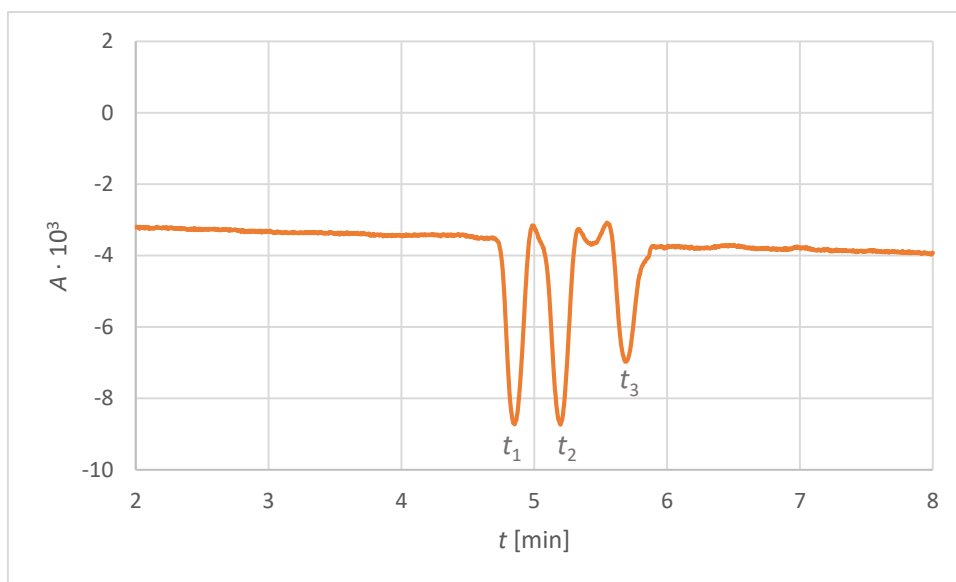


Obr. 15 Vynesení migračních časů po sobě jdoucích měření. Svislá osa ukazuje, o kolik procent narůstají časy. Migrační čas naměřený při prvním měření odpovídá 100 %.

### 3.4 Mobilita elektroosmotického toku

Pozorovaná nízká opakovatelnost migračních časů obou analytů je pravděpodobně dána nestabilitou EOF. Při dosavadních měřeních mohla nepolární část molekuly mesityloxiidu interagovat s alkylovými řetězci surfaktantu, a tak pravděpodobně nebyla měřena čistě mobilita EOF. Pro detailnější prozkoumání chování systému bylo však vhodné měřit právě mobilitu EOF bez vlivu dalších interakcí. K měření byla tedy jako marker použita voda. Měření byla prováděna za různých podmínek. Byla měřena mobilita EOF v nepokryté křemenné kapiláře a dále v kapilárách, které poskytly pozitivní výsledky v předchozích experimentech - křemenné kapiláře s promýváním HEC a v kapiláře PVA.

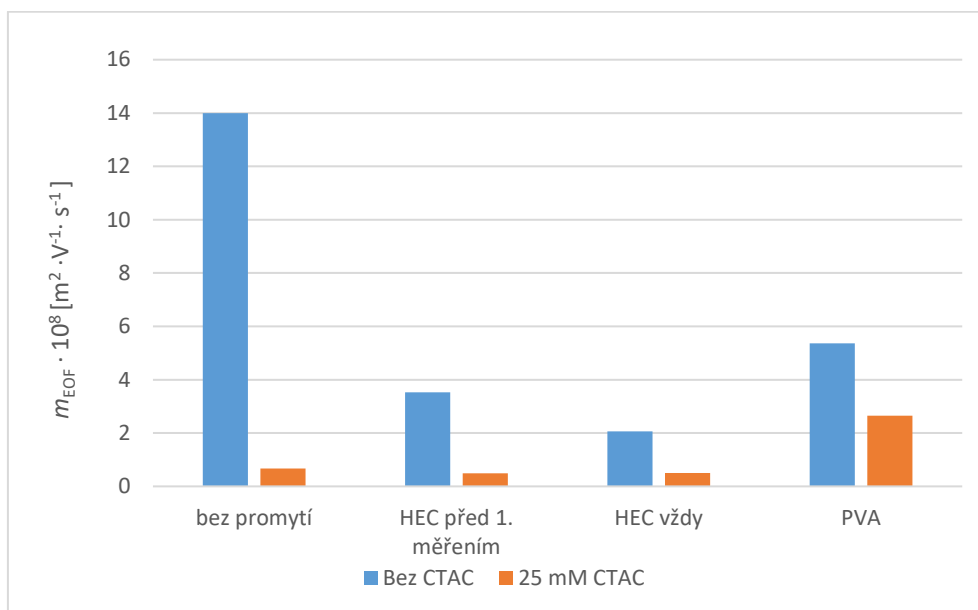
Měřeními byly získány záznamy, ze kterých byly odečítány časy, kdy zóny vody mobilizované tlakem prošly detektorem (Obr. 16).



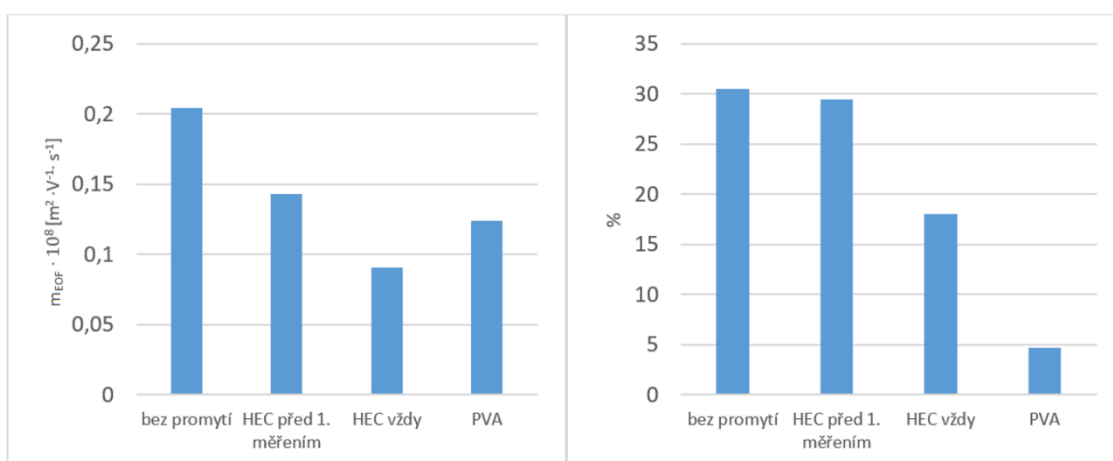
Obr. 16 Záznam z měření mobility EOF. Měření probíhalo v křemenné kapiláře o délce 50,0 cm (efektivní délka 41,5 cm). Základním elektrolytem byl acetonitril s 10 mM octovou kyselinou a 40 mM CTAC. Dávkována byla voda. Detekce probíhala při vlnové délce 254 nm.

Nejprve byla měřena mobilita bez obsahu CTAC v základním elektrolytu. Mobilita EOF za všech vybraných podmínek dosahuje vysokých hodnot, což je dáno nižší viskozitou acetonitrilu ve srovnání s vodou (rovnice pro výpočet mobility EOF na straně 14, kapitola 1.6). S přidáním CTAC do základního elektrolytu dochází za všech podmínek k silnému poklesu mobility EOF, v žádném z případů však nedochází

k jeho obrácení, jak by tomu bylo v případě vodného roztoku základního elektrolytu. To je zřejmě způsobeno sníženou tendencí molekul surfaktantu tvořit dvojvrstvu na povrchu kapiláry a měnit tak znaménko jeho náboje. V prostředí acetonitrilu zřejmě dochází pouze k adsorpci vrstvy surfaktantu na povrch kapiláry a druhá vrstva surfaktantu k první vrstvě nepřisedá. K procentuálně nejmenšímu poklesu po přidavku CTAC dochází v PVA kapiláře (Obr. 17).



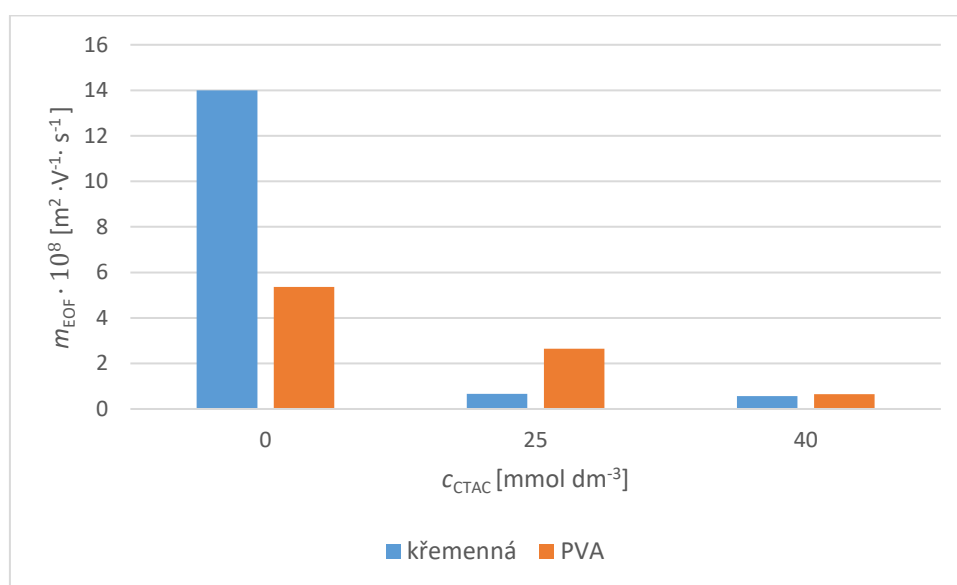
Obr. 17 Mobilita EOF za různých podmínek – křemenná kapilára bez promývání, křemenná kapilára s promytím HEC před prvním měřením, s promytím před každým měřením a kapilára pokrytá PVA. Vyneseny průměry pěti měření.



Obr. 18 Směrodatné odchylky měření při 25 mM koncentraci CTAC v základním elektrolytu. V grafu vlevo vyneseny absolutní směrodatné odchylky. V grafu vpravo relativní směrodatné odchylky v procentech.

Z uvedených grafů směrodatných odchylek měření (Obr. 18) se ukazuje, že měření v PVA kapiláře probíhají s dobrou opakovatelností. Relativní směrodatná odchylka mobility EOF je v této kapiláře nejmenší (méně než 5 %). Měření s promýváním hydroxyethylcelulosou před sérií experimentů nedosahují výrazně lepší opakovatelnosti než měření bez promývání. Zde se relativní směrodatná odchylka pohybuje kolem 30 %. Při promývání HEC před každým měřením se opakovatelnost do jisté míry zvyšuje (relativní směrodatná odchylka 18 %). Vzhledem k nutnosti promývání kapiláry vodou před a po promytí HEC se promývání tímto činidlem před každou analýzou stává neúměrně časově náročným. Proto probíhala další měření pouze bez promývání a v kapiláře PVA.

Byla proměřena mobilita EOF za různých koncentrací CTAC. S rostoucí koncentrací CTAC je mobilita EOF v kapiláře PVA potlačována a již při koncentraci  $40 \text{ mmol dm}^{-3}$  dochází k jejímu potlačení na jednotky procent původní hodnoty (Obr. 19).

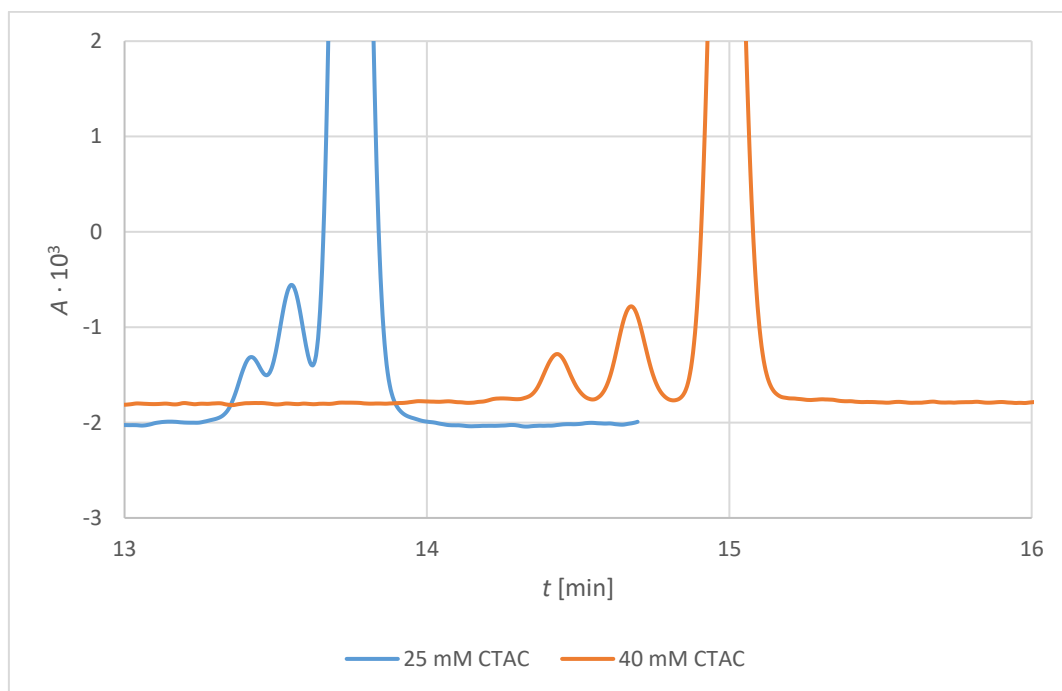


Obr. 19 Závislost mobility EOF na koncentraci CTAC při měření v křemenné kapiláře a v kapiláře PVA. Vyneseny průměry pěti měření.



### 3.5 Koncentrace CTAC

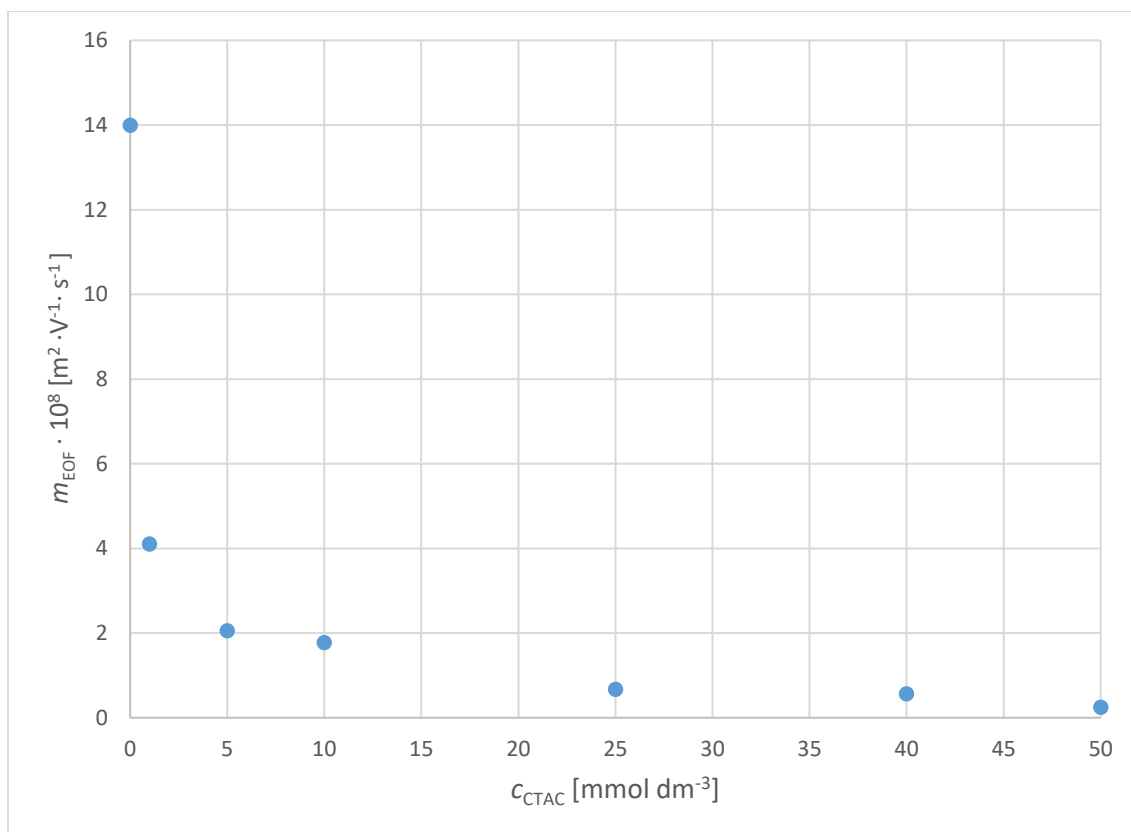
Vyšší koncentrace CTAC by měla mít za následek zvětšení rozdílů v mobilitě jednotlivých analytů. Během měření v PVA kapiláře bylo tedy testováno, zda se změní rozlišení píků u vzorku UDBN-m:p (73:26), pokud bude koncentrace CTAC v základním elektrolytu zvýšena (Obr. 20). Rozlišení prvního a druhého píku se zvýšilo z hodnoty 1,33 na 2,04 a rozlišení píku druhého a třetího z hodnoty 1,84 na 2,70. Proto bude v dalším měření používána vyšší koncentrace CTAC, 40 mmol dm<sup>-3</sup>. Další zvyšování koncentrace CTAC by bylo problematické vzhledem k nárůstu iontové síly, s ním spojeným nárůstem proudu procházejícího kapilárou a zvýšenému riziku přehřívání roztoku v kapiláře.



Obr. 20 Elektroferogramy zaznamenané při dávkování vzorku označeného UDBN-m:p (73:26) o koncentraci přibližně 0,5 mg cm<sup>-3</sup> a mesityloxydu o koncentraci 1,0 mg cm<sup>-3</sup> z dlouhého konce PVA kapiláry celkové délky 64,5 cm, efektivní délky 56,0 cm. Základním elektrolytem byl acetonitril s 10 mM octovou kyselinou a 25 mM či 40 mM CTAC. Vkládané napětí 20 kV, pozitivní polarita. Elektroferogram snímáný při vlnové délce 254 nm.

Při měření v PVA kapiláře se zdařilo jen několik analýz vzorků. Základní linie byla při dalších měřeních nestabilní, což mohlo být způsobeno degradací pokrytí kapiláry.

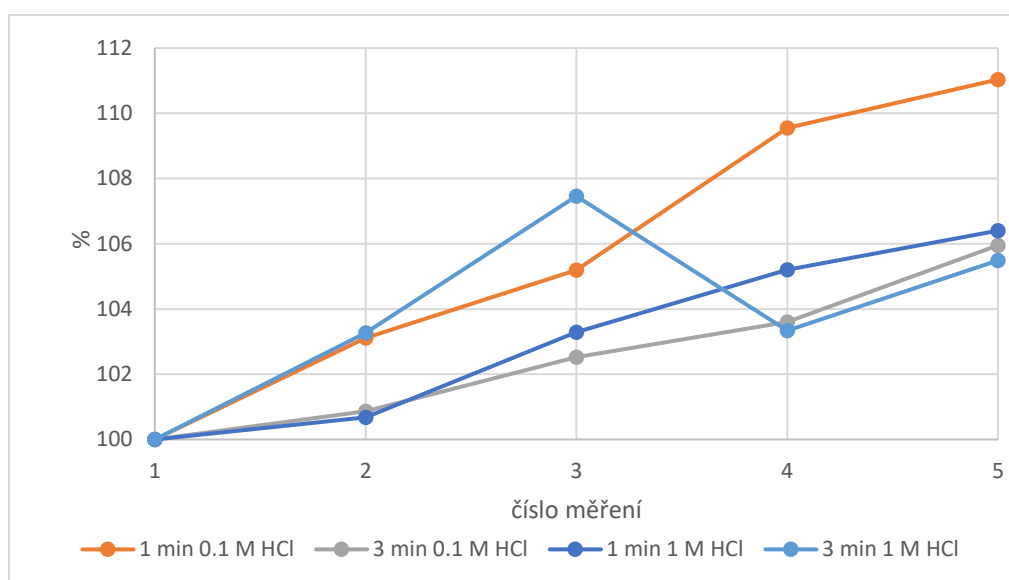
Vzhledem k nákladnosti komerčně pokrytých kapilár byla proto další měření přesunuta zpět do běžné křemenné kapiláry. Byla proměřena závislost mobility EOF na koncentraci CTAC v základním elektrolytu. Je vidět že mobilita EOF s rostoucí koncentrací CTAC klesá, ovšem od koncentrace 40 mM již nedochází k velkým změnám (Obr. 21). To je zřejmě způsobeno tím, že stěna kapiláry je při této koncentraci již CTAC prakticky nasycena a další nárůst koncentrace již nemá na stav stěny kapiláry velký vliv. Proto byla koncentrace 40 mmol dm<sup>-3</sup> CTAC v základním elektrolytu zvolena jako dostatečná pro další měření s ohledem na rostoucí proud s rostoucí iontovou silou základního elektrolytu.



Obr. 21 Mobilita EOF v křemenné kapiláře v závislosti na koncentraci CTAC v rozsahu 0-50 mmol dm<sup>-3</sup>. Měření mobility EOF probíhala podle postupu, kdy jsou postupně dávkovány tři zóny vody. Měření probíhala v křemenné kapiláře 50,0 cm (41,5 cm efektivní délka), základním elektrolytem byl acetonitril s 10 mM octovou kyselinou a různou koncentrací CTAC.

### 3.6 Promývání kapiláry kyselinou chlorovodíkovou

Na základě informací z literatury bylo také testováno, zda nedojde ke zvýšení opakovatelnosti migračních časů, pokud je kapilára před každým měřením promývána kyselinou chlorovodíkovou. Podle článku [47] stačí promytí 0,1 M kyselinou chlorovodíkovou ve vodě po dobu 30 s. Ovšem po vyzkoušení různých koncentrací a délek promytí se ukázalo, že nejvhodnější je promytí 1 M kyselinou chlorovodíkovou po dobu 180 s. Migrační čas mesityloxiu nemá excelentní opakovatelnost, ale nedochází k neustálému nárůstu migračních časů, nýbrž k jejich kolísání kolem jisté střední hodnoty (Obr. 22). Migrační časy látek kolísají v jednotkách procent, což je možné eliminovat vztahením migračního času analytu k migračnímu času referenční látky – mesityloxiu.



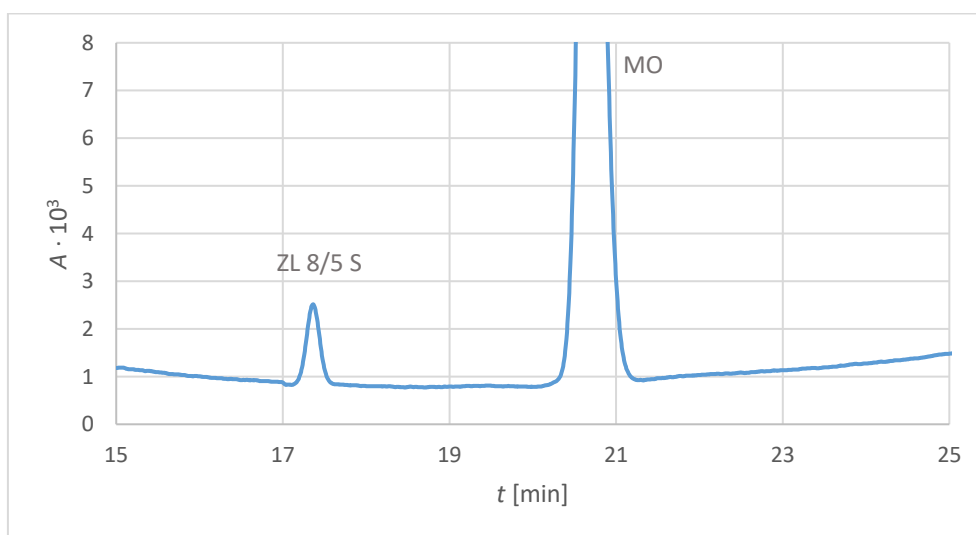
Obr. 22 Migrační čas dávkovaného mesityloxiu v po sobě jdoucích měřeních. Před měřením byla kapilára promývána po různě dlouhou dobu kyselinou chlorovodíkovou o různých koncentracích. Svislá osa ukazuje, o kolik procent narůstají časy. Migrační čas v prvním měření odpovídá 100 %.

### 3.7 Analýza vzorků za zvolených podmínek

Získané krystaly rozpuštěné v elektrolytu 40 mM CTAC a 10 mM octové kyselině v acetonitrilu byly dávkovány v koncentraci v rozmezí 0,1 – 0,5 mg/ml. Zařazením promytí kyselinou chlorovodíkovou před každým měřením se dosahuje analýz trvajících do 30 minut.

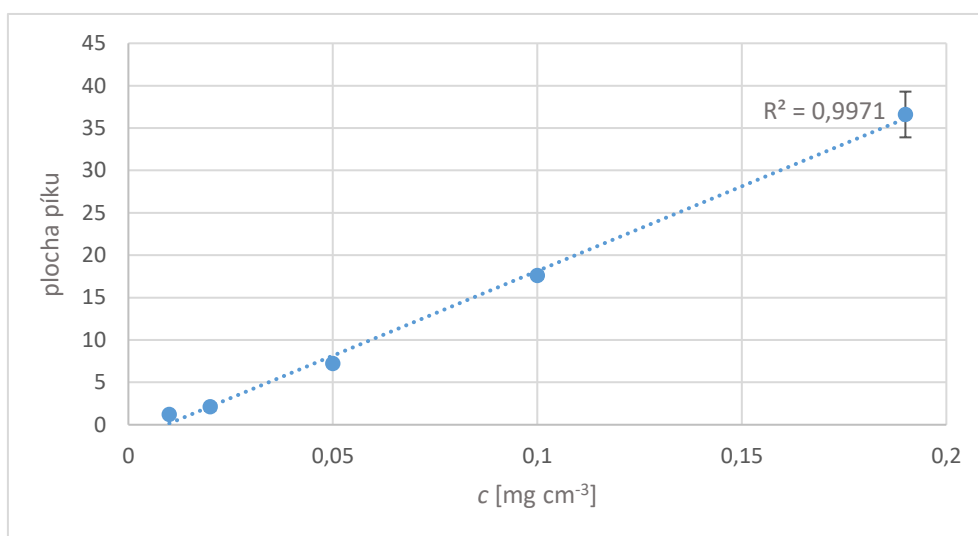
#### 3.7.1 Látka ZL 8/5 S

U vzorků obsahujících látku ZL 8/5 S byl dostupný vzorek čistý a vzorek se 76% obsahem této látky. Elektroferogram při dávkování čistého vzorku zaznamenal podle předpokladu 2 píky – syntetizované látky a mesityloxiidu (Obr. 23). Migrační čas analytu byl 17,36 min se směrodatnou odchylkou 1,04 (6,0 %). Relativní migrační čas analytu vztažený k migračnímu času referentní látky je 0,838 se směrodatnou odchylkou měření 0,010 (1,2 %) přičemž měření byla opakována pětkrát. Je tedy zřejmé, že problém opakovatelnosti migračních časů lze použitím relativního migračního času úspěšně vyřešit. Relativní směrodatná odchylka plochy píku ZL 8/5 S je 6 % při pěti měřeních.



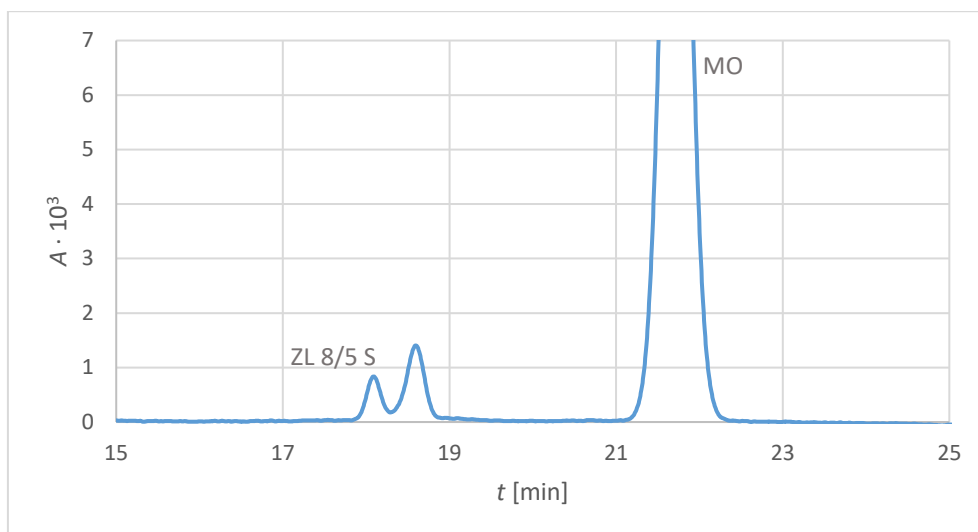
Obr. 23 Elektroferogram zaznamenaný při dávkování vzorku označeného ZL 8/5 S o koncentraci  $0,1 \text{ mg cm}^{-3}$  s mesityloxiidem o koncentraci  $1,0 \text{ mg cm}^{-3}$  z dlouhého konce kapiláry celkové délky 50,0 cm, efektivní délky 41,5 cm. Základním elektrolytem byl acetonitril s 10 mM octovou kyselinou a 40 mM CTAC. Vkládané napětí 20 kV, pozitivní polarita. Elektroferogram snímáný při vlnové délce 254 nm.

U čistého vzorku byla proměřena kalibrační závislost analytu ZL 8/5 S (Obr. 24). Mez detekce je  $0,009 \text{ mg cm}^{-3}$ . Mez kvantifikace je  $0,031 \text{ mg cm}^{-3}$ . Jde o lineární závislost, kterou lze použít pro kvantifikaci analytu v dalším vzorku. Mez detekce byla stanovena jako koncentrace, která poskytne plochu píku odpovídající trojnásobku standardní chyby úseku kalibrační závislosti. Mez kvantifikace byla stanovena jako koncentrace, která poskytne plochu píku odpovídající desetinásobku standardní chyby úseku kalibrační závislosti.



Obr. 24 Kalibrační přímka analytu ZL 8/5 S.

U vzorku ZL 8/5 S 76 % byla separována od analytu nečistota (Obr. 25). Relativní migrační čas prvního píku je 0,834; proto byl identifikován jako analyt ZL 8/5 S. Směrodatná odchylka relativních migračních časů při pěti měřeních je 0,002 (0,1 %).

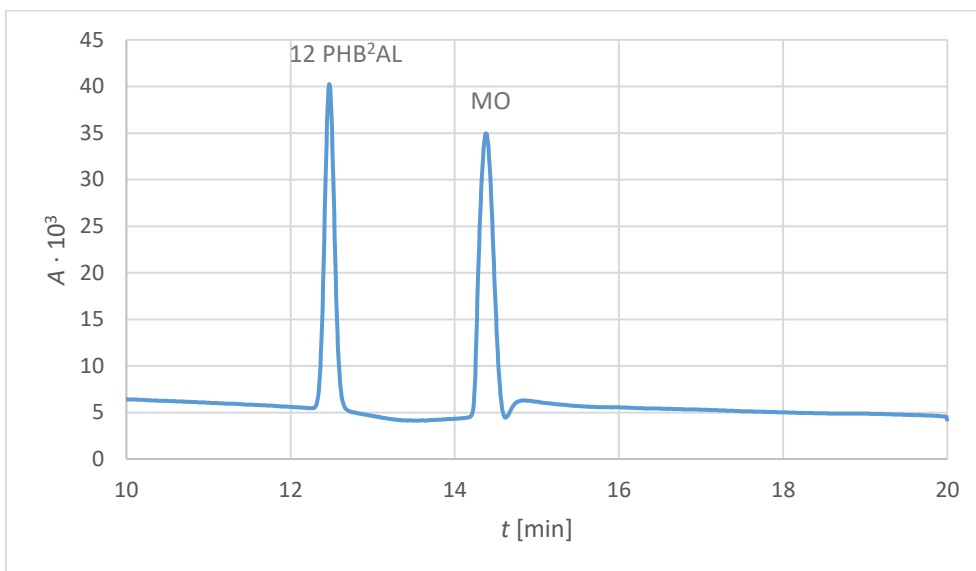


Obr. 25 Elektroferogram zaznamenaný při dávkování vzorku označeného ZL 8/5 S 76 % o koncentraci  $0,1 \text{ mg cm}^{-3}$  s mesityloxidem o koncentraci  $1,0 \text{ mg cm}^{-3}$  z dlouhého konce kapiláry celkové délky 50, 0 cm, efektivní délky 41,5 cm. Základním elektrolytem byl acetonitril s 10 mM octovou kyselinou a 40 mM CTAC. Vkládané napětí 20 kV, pozitivní polarita. Elektroferogram snímáný při vlnové délce 254 nm.

Z rovnice kalibrační přímky byla vypočtena koncentrace ZL 8/5 S ve vzorku s nižší čistotou. Obsah analytu ve vzorku s nižší čistotou byla stanovena na 48 % (w/w) se směrodatnou odchylkou 5 % (w/w).

### 3.7.2 Látka 12 PHB<sup>2</sup>AL

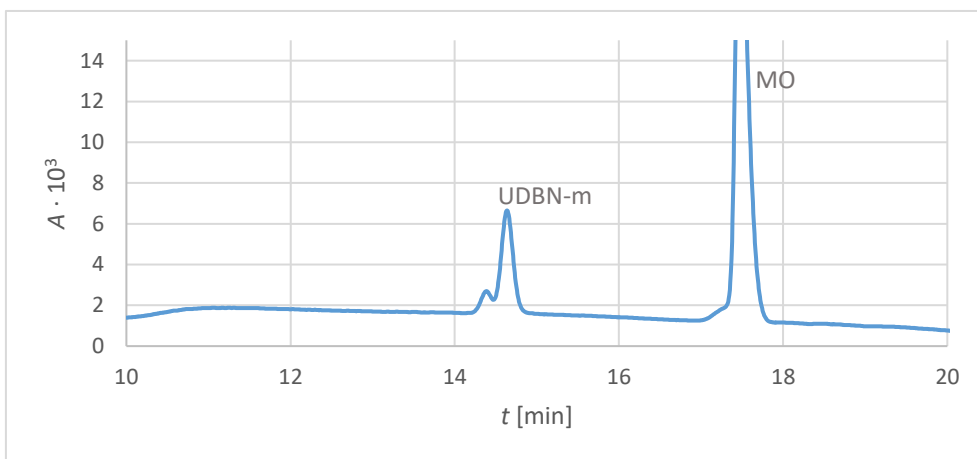
Při analýze vzorku 12 PHB<sup>2</sup>AL 99 % s přidavkem mesityloxiidu jsou viditelné dva píky (Obr. 26). U vzorku značeného 12 PHB<sup>2</sup>AL málo čistý došlo také pouze k separaci analytu 12 PHB<sup>2</sup>AL od mesityloxiidu. Nebyly tedy separovány nečistoty ani isomery této látky.



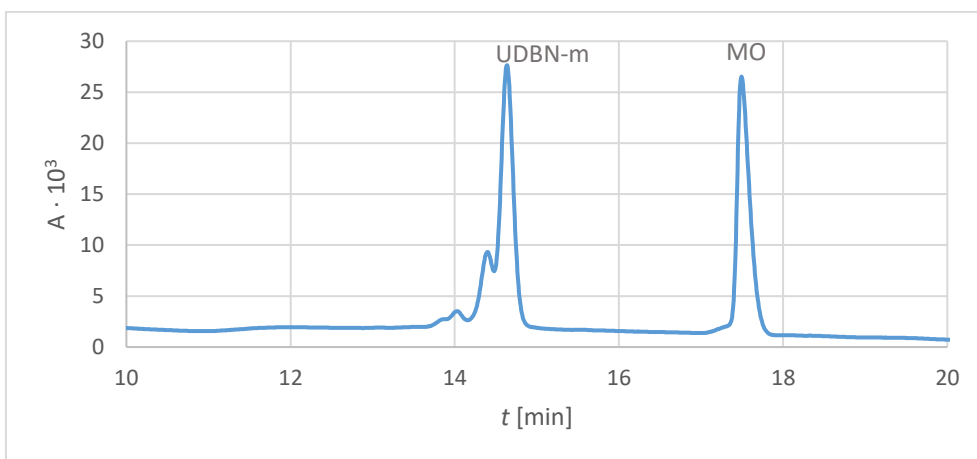
Obr. 26 Elektroferogram zaznamenaný při dávkování vzorku označeného 12 PHB<sup>2</sup>AL 99 % o koncentraci 0,5 mg cm<sup>-3</sup> a mesityloxiidu o koncentraci 1,0 mg cm<sup>-3</sup> z dlouhého konce kapiláry celkové délky 50,0 cm, efektivní délky 41,5 cm. Základním elektrolytem byl acetonitril s 10 mM octovou kyselinou a 40 mM CTAC. Vkládané napětí 20 kV, pozitivní polarita. Elektroferogram snímáný při vlnové délce 254 nm.

### 3.7.3 Látka UDBN

Byly analyzovány oba dva získané vzorky. Při prvotních pokusech bylo při dávkování vzorku UDBN-m vidět, že je vzorek čistý, v elektroferogramech byl jen jeden pík. Při dalších měřeních se objevil zdvojený pík. Druhý pík v pořadí (Obr. 27) patří podle relativních migračních časů zřejmě právě analytu UDBN-m. U elektroferogramu při dávkování isomerické směsi se objevilo více píků (Obr. 28). Analytu UDBN-m zde odpovídá nejvyšší pík.



Obr. 27 Elektroferogram zaznamenaný při dávkování vzorku označeného UDBN-m o koncentraci  $0,1 \text{ mg cm}^{-3}$  a mesityloxiu o koncentraci  $1,0 \text{ mg cm}^{-3}$  z dlouhého konce kapiláry celkové délky 50, 0 cm, efektivní délky 41,5 cm. Základním elektrolytem byl acetonitril s 10 mM octovou kyselinou a 40 mM CTAC. Vkládané napětí 20 kV, pozitivní polarita. Elektroferogram snímáný při vlnové délce 254 nm.

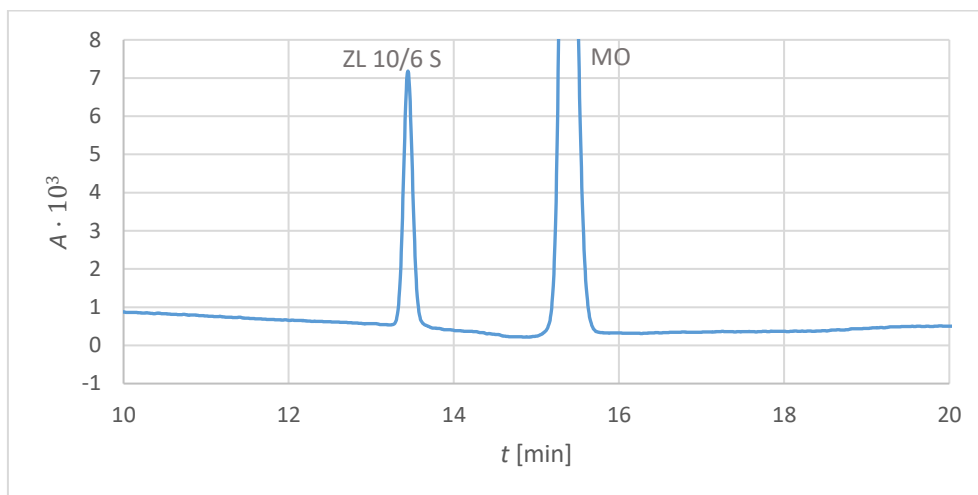


Obr. 28 Elektroferogram zaznamenaný při dávkování vzorku označeného UDBN-m:p 73:26 o koncentraci  $0,5 \text{ mg cm}^{-3}$  a mesityloxiu o koncentraci  $1,0 \text{ mg cm}^{-3}$  z dlouhého konce kapiláry celkové délky 50, 0 cm, efektivní délky 41,5 cm. Základním elektrolytem byl acetonitril s 10 mM octovou kyselinou a 40 mM CTAC. Vkládané napětí 20 kV, pozitivní polarita. Elektroferogram snímáný při vlnové délce 254 nm.

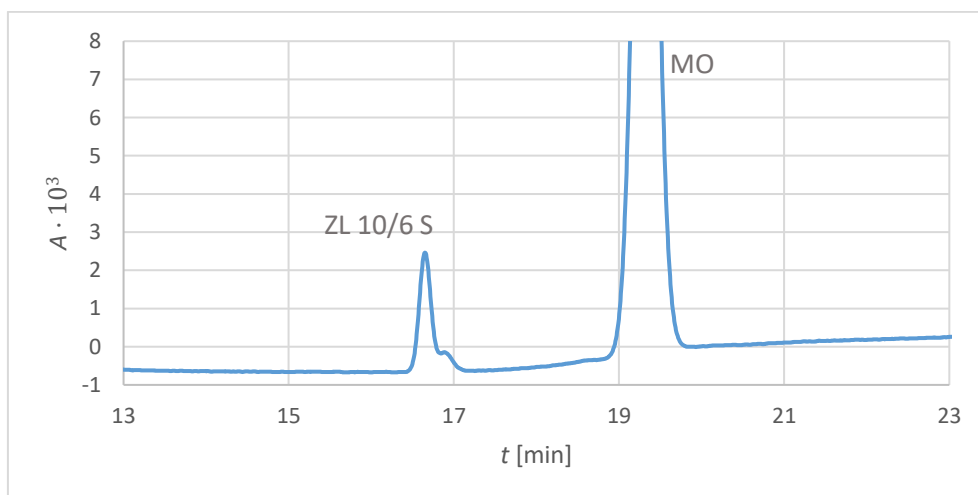


### 3.7.4 Látka ZL 10/6 S

Elektroferogram vzorku s uvedenou čistotou 99 % vyšel podle předpokladu (Obr. 29). První pík odpovídá analytu ZL 10/6 S, druhý pík je přidávaný mesityloxid. U vzorku s nižší čistotou byla částečně separována nečistota, ale s nízkým rozlišením píků, rozlišení píků je 1,38 (Obr. 30).



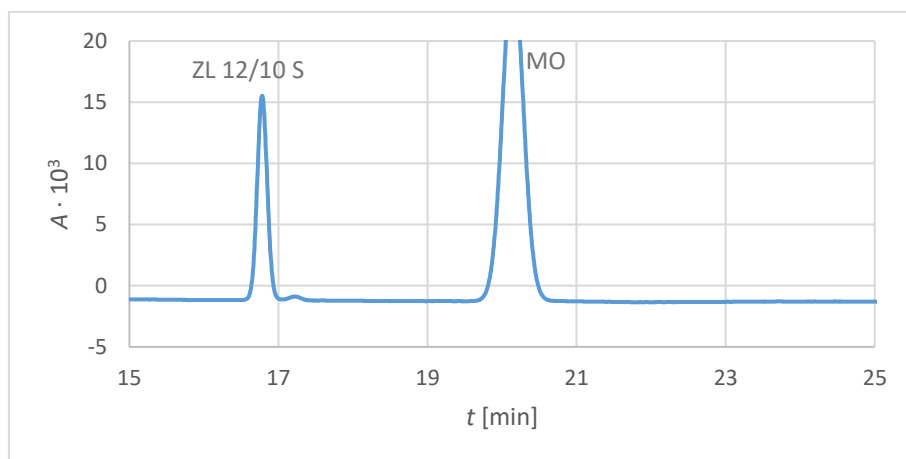
Obr. 29 Elektroferogram zaznamenaný při dávkování vzorku označeného ZL 10/6 S 99 % o koncentraci  $0,5 \text{ mg cm}^{-3}$  s mesityloxidem o koncentraci  $1,0 \text{ mg cm}^{-3}$  z dlouhého konce kapiláry celkové délky 50, 0 cm, efektivní délky 41,5 cm. Základním elektrolytem byl acetonitril s 10 mM octovou kyselinou a 40 mM CTAC. Vkládané napětí 20 kV, pozitivní polarita. Elektroferogram snímáný při vlnové délce 254 nm.



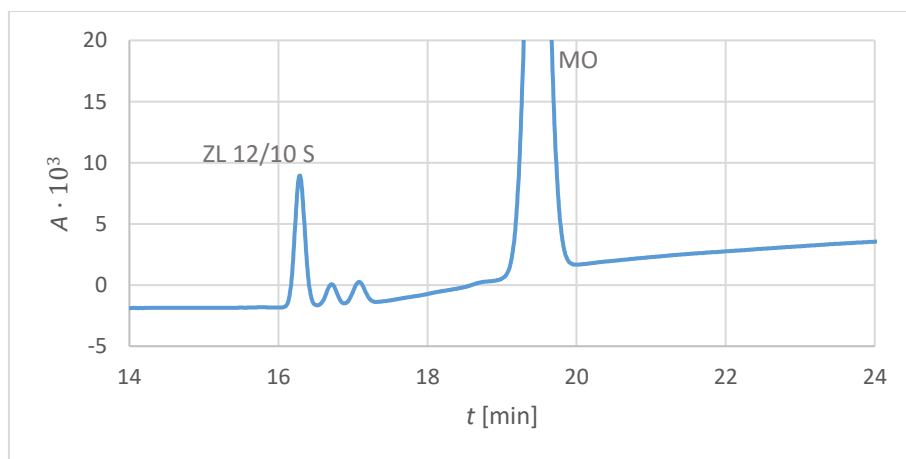
Obr. 30 Elektroferogram zaznamenaný při dávkování vzorku označeného ZL 10/6 S 72 % o koncentraci  $0,5 \text{ mg cm}^{-3}$  s mesityloxidem o koncentraci  $1,0 \text{ mg cm}^{-3}$  z dlouhého konce kapiláry celkové délky 50, 0 cm, efektivní délky 41,5 cm. Základním elektrolytem byl acetonitril s 10 mM octovou kyselinou a 40 mM CTAC. Vkládané napětí 20 kV, pozitivní polarita. Elektroferogram snímáný při vlnové délce 254 nm.

### 3.7.5 Látka ZL 12/10 S

U vzorku ZL 12/10 S 99 % byly analyt a referentní mesityloxid separovány. U vzorku ZL 12/10 S 59 % se separovalo hned několik nečistot (Obr. 32). Podle relativního migračního času odpovídá zkoumanému analytu první pík. Rozlišení píků je dostatečné. Rozlišení píku analytu a píku druhého v pořadí je 2,84 a rozlišení dalších dvou píků je 2,30.



Obr. 31 Elektroferogram zaznamenaný při dávkování vzorku označeného ZL 12/10 S 99 % o koncentraci  $0,5 \text{ mg cm}^{-3}$  s mesityloxidem o koncentraci  $1,0 \text{ mg cm}^{-3}$  z dlouhého konce kapiláry celkové délky 50,0 cm, efektivní délky 41,5 cm. Základním elektrolytem byl acetonitril s 10 mM octovou kyselinou a 40 mM CTAC. Vkládané napětí 20 kV, pozitivní polarita. Elektroferogram snímáný při vlnové délce 235 nm.



Obr. 32 Elektroferogram zaznamenaný při dávkování vzorku označeného ZL 12/10 S 59 % o koncentraci  $0,5 \text{ mg cm}^{-3}$  s mesityloxidem o koncentraci  $1,0 \text{ mg cm}^{-3}$  z dlouhého konce kapiláry celkové délky 50,0 cm, efektivní délky 41,5 cm. Základním elektrolytem byl acetonitril s 10 mM octovou kyselinou a 40 mM CTAC. Vkládané napětí 20 kV, pozitivní polarita. Elektroferogram snímáný při vlnové délce 235 nm.

## 4. Závěr

Byly hledány podmínky měření pro separaci látek ve vzorcích nově syntetizovaných látek tvořících kapalně krystaly. Protože jde o elektroneutrální ve vodě nerozpustné látky, byla pro separaci zvolena metoda elektrokinetické chromatografie v bezvodém prostředí. Měření probíhala v prostředí acetonitrilu, ve kterém jsou všechny složky vzorků a přidané složky základního elektrolytu dostatečně rozpustné. Protože migrační časy látek u po sobě jdoucích měření narůstaly, byla měření opakována ještě v různě pokrytých kapilárách. V různě pokrytých kapilárách byla měřena mobilita EOF a počítána opakovatelnost měření. Nejlepších výsledků bylo dosaženo s komerční pokrytou kapilárou PVA. U ní se však projevila nestabilita pokrytí za použitých experimentálních podmínek. Problém nárůstu migračních časů byl nakonec vyřešen v nepokryté křemenné kapiláře promýváním kyselinou chlorovodíkovou zařazeným před každým měřením.

Při průběžných separacích se ukázalo, že zvýšením koncentrace CTAC dochází k lepšímu rozlišení píků, takže byla koncentrace zvýšena z původních  $25 \text{ mmol dm}^{-3}$  na  $40 \text{ mmol dm}^{-3}$ .

Nakonec byly analyzovány všechny získané vzorky. Pro analyt ZL 8/5 S byla proměřena kalibrační závislost. Bylo ukázáno, že tato závislost je lineární a použitelná ke kvantifikaci analytu. S využitím kalibrační závislosti byl stanoven obsah analytu v méně čistém vzorku stejné látky. Také u dalších vzorků došlo k separaci látek a na základě relativního migračního času bylo možné identifikovat pík odpovídající syntetizované látce. U vzorku obsahujícího směs isomerů látky UDBN došlo také k separaci, ovšem nelze identifikovat, jaký pík odpovídá isomeru UDBN-p a které píky odpovídají jiným nečistotám. Velmi dobrý výsledek poskytla metoda v případě vzorku ZL 12/10 S o nízké čistotě. Při analýze tohoto vzorku byly od analytu na základní linii separovány hned dvě nečistoty.

Závěrem je možné konstatovat, že vyvinutá metoda je v současné formě použitelná pro kontrolu čistoty dvou ze zkoumaných látek. Pro bezproblémovou využitelnost pro kontrolu čistoty dalších nově syntetizovaných kapalných krystalů vyžaduje další optimalizaci.

## 5. Použitá literatura

- [1] Gennes P.G.; Prost J.: *The Physics of Liquid Crystals*. 2. přepracované vydání, New York; Oxford University Press (1993)
- [2] Reichl J.; Všetická M.: Encyklopedie Fyziky *fyzika.jreichl.com* [online, přístup získán 26. 2. 2019]
- [3] Vojtylová T.; Żurowska M.; Milewska K.; Hamplová V.; Sýkora D.: Chiral HPLC and physical characterisation of orthoconic antiferroelectric liquid crystals. *Liquid Crystals* **43**, 1244-1250 (2016)
- [4] Vaňkátová P.; Kalíková K.; Kubičková A.: Ultra-performance supercritical fluid chromatography: A powerful tool for the enantioseparation of thermotropic fluorinated liquid crystals. *Analytica Chimica Acta* **1038**, 191-197 (2018)
- [5] Vaňkátová P.; Kubičková A.; Cigl M.; Kalíková K.: Ultra-performance chromatographic methods for enantioseparation of liquid crystals based on lactic acid. *Journal of Supercritical Fluids* **146.**, 217-25 (2019)
- [6] Klouda P.: *Moderní analytické metody*. 2. přepracované vydání (2003)
- [7] Rangel-Yagui C. O.; Pessoa A.; Tavares L. C.: Micellar solubilization of drugs. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* **8**, 147-163 (2005)
- [8] Terabe S.; Otsuka K.; Ichikawa K.; Tsuchiya A.; Ando T.: Electrokinetic separations with micellar solutions and open-tubular capillaries. *Analytical Chemistry* **56**, 11-113 (1984)
- [9] Shi W.; Palmer C.P.: On-column sample preconcentration in electrokinetic chromatography by sweeping with polymeric pseudo-stationary phases. *Journal of Separation Science* **25**, 215-221 (2002)
- [10] Lin J. M.; Nakagawa M.; Uchiyama K.; Hobo T.: Determination of critical micelle concentration of SDS in formamide by capillary electrophoresis. *Chromatographia* **50**, 739-744 (1999)
- [11] Lin J. M., Nakagama T.; Okazawa H.; Wu X. Z.; Hobo T.: Separation and determination of some stereoisomers by capillary gel electrophoresis with cyclodextrin incorporated in polyacrylamide gel. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* **354**, 451-454 (1996)
- [12] Kenndler E.: A critical overview of non-aqueous capillary electrophoresis. Part I: Mobility and separation selectivity. *Journal of Chromatography* **1335**, 16-30 (2014)
- [13] Riekkola M. L.: Recent advances in nonaqueous capillary electrophoresis. *Electrophoresis* **23**, 3865-3883 (2002)

- [14] Wright P. B.; Lister A. S.; Dorsey J. G.: Behavior and use of nonaqueous media without supporting electrolyte in capillary electrophoresis and capillary electrochromatography. *Analytical Chemistry* **69**, 3251-3259 (1997)
- [15] Porras S. P.; Kenndler E.: Capillary zone electrophoresis in non-aqueous solutions: pH of the background electrolyte. *Journal of Chromatography* **1037**, 455-465 (2004)
- [16] Porras S. P.; Riekkola M. L.; Kenndler E.: The principles of migration and dispersion in capillary zone electrophoresis in nonaqueous solvents. *Electrophoresis* **24**, 1485-1498 (2003)
- [17] Guo X.; Wang K.; Chen G. H.; Shi J.; Wu X.; Di L. L.; Wang Y.: Determination of strobilurin fungicide residues in fruits and vegetables by nonaqueous micellar electrokinetic capillary chromatography with indirect laser-induced fluorescence. *Electrophoresis* **38**, 2004-2010 (2017)
- [18] Chen A. J.; Li CH.; Gao W. H.; Hu Z. D.; Chen X. G.: Application of non-aqueous micellar electrokinetic chromatography to the analysis of active components in radix *Salviae miltiorrhizae* and its medicinal preparations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **37**, 811-816 (2005)
- [19] Nozal L.; Simonet B. M.; Arce L.; Ríos A.; Valcárcel M.: Use of basic amphiprotic organic solvents containing neutral-surfactant aggregates as pseudostationary phase in non-aqueous capillary electrophoresis. *Analytica Chimica Acta* **560**, 69-76 (2006)
- [20] Kasička V.: Teoretické základy a separační principy kapilárních elektromigračních metod. *Chemické listy* **91**, 320-329 (1997)
- [21] Melanson J. E.; Baryla N. E.; Lucy C. A.: Dynamic capillary coatings for electroosmotic flow control in capillary electrophoresis. *Trends in Analytical Chemistry* **20**, 365-374 (2001)
- [22] Lauer H. H.; McManigill D.: Capillary zone electrophoresis of proteins in untreated fused silica tubing. *Analytical Chemistry* **58**, 166-170 (1986)
- [23] Koval D.; Kašička V.; Zusková I.: Investigation of the effect of ionic strength of Tris-acetate background electrolyte on electrophoretic mobilities of mono-, di-, and trivalent organic anions by capillary electrophoresis. *Electrophoresis* **26**, 3221-3231 (2005)
- [24] Křížek T.; Kubíčková A.; Hladílková J.; Coufal P.; Heyda J.; Jungwirth P.: Electrophoretic mobilities of neutral analytes and electroosmotic flow markers in aqueous solutions of Hofmeister salts. *Electrophoresis* **35**, 617-624 (2014)
- [25] Čokrtová K.: Vliv aniontů základního elektrolytu na markery elektroosmotického toku v kapilární elektroforéze. bakalářská práce, Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta (2017)

- [26] Kuhr W. G.; Licklider L.; Amankwa L.: Imaging of electrophoretic flow across a capillary junction. *Analytical Chemistry* **65**, 277-282 (1993)
- [27] Lee T. T.; Dadoo R.; Zate R. N.: Real-Time Measurement of Electroosmotic Flow in Capillary Zone Electrophoresis. *Analytical Chemistry* **66**, 2694-2700 (1994)
- [28] Huang X. H.; Gordon M. J.; Zare R. N.: Current-monitoring method for measuring the electroosmotic flow rate in capillary zone electrophoresis. *Analytical Chemistry* **60**, 1837-1838 (1988)
- [29] Guo X. F.; Guo X. M.; Wang H.; Zhang H. S.: One step physically adsorbed coating of silica capillary with excellent stability for the separation of basic proteins by capillary zone electrophoresis. *Talanta* **144**, 110-114 (2015)
- [30] Horvath J.; Dolník V.: Polymer wall coatings for capillary electrophoresis. *Electrophoresis* **22**, 644-655 (2001)
- [31] Znaleziona J.; Petr J.; Knob R.; Maier V.; Sevcik J.: Dynamic coating agents in CE. *Chromatographia* **67**, 5-12 (2008)
- [32] Chen S. H.; Pietrzyk D. J.: Separation of sulfonate and sulfate surfactants by capillary electrophoresis - Effect of buffer cation. *Analytical Chemistry* **65**, 2770-2775 (1993)
- [33] Thornton M. J.; Fritz J. S.; Klampfl C. W.: Separation of native amino acids at low pH by capillary electrophoresis. *Journal of High Resolution Chromatography* **20**, 647-652 (1997)
- [34] Li Y. Q.; Liu Q.; Yao S. Z.: Cationic double-chained surfactant as pseudostationary phase in micellar electrokinetic capillary chromatography for drug separations. *Talanta* **75**, 677-683 (2008)
- [35] Harrell C. W.; Dey J.; Shamsi S. A.; Foley J. P.; Warner I. M.: Enhanced separation of antidepressant drugs using a polymerized nonionic surfactant as a transient capillary coating. *Electrophoresis* **19**, 712-718 (1998)
- [36] Rasmussen H. T.; Goebel L. K.; McNair H. M.: Optimization of resolution in micellar electrokinetic chromatography. *Journal of High Resolution Chromatography* **14**, 25-28 (1991)
- [37] Richards M. P.: Application of a polyamine-coated capillary to the separation of metallothionein isoforms by capillary zone electrophoresis. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **657**, 345-355 (1994)
- [38] Stathakis C.; Arriaga E. A.; Lewis D. F.; Dovichi N. J.: Cationic and anionic polymeric additives for wall deactivation and selectivity control in the capillary electrophoretic separation of proteins in food samples. *Journal of Chromatography A* **817**, 227-232 (1998)

- [39] Li M. X.; Liu L.; Wu J. T.; Lubman D. M.: Use of a Polybrene Capillary Coating in Capillary Electrophoresis for Rapid Analysis of Hemoglobin Variants with On-Line Detection via an Ion Trap Storage/Reflectron Time-of-Flight Mass Spectrometer. *Analytical Chemistry* **69**, 2451-2456 (1997)
- [40] Mikuš P.; Maráková K.; Valášková I.; Havránek E.: Determination of amlodipine enantiomers in pharmaceuticals using capillary electrophoresis separation and diode array detection. *Pharmazie* **64**, 76-79 (2009)
- [41] Hajba L.; Guttman A.: Recent advances in column coatings for capillary electrophoresis of proteins. *Trends in Analytical Chemistry* **90**, 38-44 (2017)
- [42] Hjertén S.: High-performance electrophoresis: Elimination of electroendosmosis and solute adsorption. *Journal of Chromatography A*, 191-198 (1985)
- [43] Cobb K. A.; Dolnik V.; Novotny M.: Electrophoretic separations of proteins in capillaries with hydrolytically-stable surface structures. *Analytical Chemistry* **62**, 2478-2483 (1990)
- [44] MarvinSketch [počítačový program], verze 19.9.0 ChemAxon, Budapešť, Maďarsko
- [45] Katayama H.; Ishihama Y.; Asakawa N.: Stable Capillary Coating with Successive Multiple Ionic Polymer Layers. *Analytical Chemistry* **70**, 2254-2260 (1998)
- [46] Williams B. A.; Vigh G.: Fast, Accurate Mobility Determination Method for Capillary Electrophoresis. *Analytical Chemistry* **68**, 1174-1180 (1996)
- [47] Burton D. E.; Powell L. L.; Xi X. B.: Reproducibility of the determination of caffeine in coffee by micellar electrokinetic capillary chromatography. *Journal of Microcolumn Separations* **6**, 5-10 (1994)