

UNIVERZITA KARLOVA
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Kateřina Čokrtová

VLIV ANIONTŮ ZÁKLADNÍHO ELEKTROLYTU
NA MARKERY ELEKTROSMOTICKÉHO TOKU
V KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZE

Effect of background electrolyte anions on markers
of electroosmotic flow in capillary electrophoresis

Bakalářská práce

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

Praha 2017

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 19. května 2017

Kateřina Čokrtová

Abstrakt

Mobilita elektroosmotického toku je v kapilární elektroforéze důležitou veličinou, protože její hodnota je potřebná pro stanovení efektivní elektroforetické mobility analytů. Ta se používá při elektroforetickém stanovení fyzikálně-chemických konstant, jako jsou disociační konstanta nebo konstanta stability komplexů, kromě toho je však důležitá i v analytické chemii, neboť na hodnotě efektivní mobility je založena identifikace analytů. Nejčastějším způsobem měření elektroosmotického toku je přidávek neutrální látky do vzorku. I neutrální látka však může získat elektroforetickou mobilitu díky interakcím se složkami základního elektrolytu. Tím může dojít k nepřesnému stanovení hodnoty rychlosti elektroosmotického toku.

Cílem práce bylo proměřit mobilitu několika běžně i méně používaných markerů v základním elektrolytu obsahujícím různé anionty a nalézt vhodné kombinace marker – anion, při kterých nedochází k velkým chybám v měření.

Proměřena byla relativní mobilita osmi markerů v čistém základním elektrolytu a v základním elektrolytu obsahujícím sůl zkoumaného aniontu – chlorid sodný, chloristan sodný či síran sodný. Relativní mobilita byla vždy vztažena k mobilitě thiomocoviny. Jako základní elektrolyt byl použit acetátový pufr. Zkoumanými markery byly: formamid, *N*-methylformamid, *N,N*-dimethylformamid, akrylamid, *N,N*-dimethylakrylamid, *N*-methylacetamid, mesityloxid, dimethylsulfoxid.

Vypočtené relativní mobility markerů dosahovaly v přítomnosti různých aniontů v základním elektrolytu rozdílných hodnot. Hodnoty relativních mobilit markerů se nejvíce lišily v přítomnosti chloristanových aniontů, naopak nejmenší rozdíly byly pozorovány v přítomnosti síranových aniontů. Na sérii amidových markerů byl dobře patrný vliv stupně jejich methylace na naměřenou relativní mobilitu. Dále bylo zjištěno, že vliv jednotlivých aniontů poměrně dobře koreluje s jejich postavením v Hofmeisterově řadě.

Při experimentu, kdy byly separovány běžné konzervační látky – sorbová, benzoová a 4-hydroxybenzoová kyselina – se ukázalo, že hodnoty elektroforetických mobilit získané při měření v acetátovém pufru s použitím různých markerů se mohou lišit o více než 10 %. Může tak docházet k chybné identifikaci látek.

Klíčová slova: Kapilární elektroforéza, elektroosmotický tok, marker

Abstract

Mobility of the electroosmotic flow is an important quantity in capillary electrophoresis because its value is needed to determine the effective electrophoretic mobility of analytes. The effective electrophoretic mobility is used for electrophoretic determination of physico-chemical constants, such as dissociation constants or stability constants, but it is also important in analytical chemistry because identification of analytes is based on the value of the effective mobility. The most common way to measure electroosmotic flow is to add a neutral substance to the sample. However, the neutral substance can gain electrophoretic mobility due to interactions with the components of the background electrolyte. This may cause an inaccurate determination of the velocity of the electroosmotic flow.

The aim of this work was to measure the mobility of several common and less frequently used markers in the background electrolyte containing different anions and to find suitable marker – anion combinations in order to avoid major measurement errors.

Relative mobility of eight markers in the pure background electrolyte and in the background electrolyte containing a salt of the studied anion – sodium chloride, sodium perchlorate or sodium sulphate – was measured and related mobility of thiourea. Acetate buffer was used as the background electrolyte. Studied markers were: formamide, *N*-methylformamide, *N,N*-dimethylformamide, acrylamide, *N,N*-dimethylacrylamide, *N*-methylacetamide, mesityloxide, dimethylsulfoxide.

The calculated relative mobilities of the markers were different in the presence of different anions in the background electrolyte. Differences between the relative mobilities of individual markers were largest in the presence of perchlorate anions and smallest in the presence of sulphate anions. On a series of amide markers, it was observed that degree of their methylation influences their relative mobilities. It was further found out that the influence of the tested anions correlates rather well with their position in the Hofmeister's series.

In an experiment where three common food preservatives were separated – sorbic, benzoic and 4-hydroxybenzoic acid – it was found that the values of electrophoretic mobilities obtained by measurement in acetate buffer using different markers may vary by more than 10 %. This can lead to misidentification of the analytes.

Key words: Capillary electrophoresis, electroosmotic flow, marker

Poděkování

Chtěla bych poděkovat svému školiteli RNDr. Tomáši Křížkovi, Ph.D. za odborné vedení, poskytnuté konzultace a trpělivost při vypracování této bakalářské práce. Také děkuji svým rodičům a sourozencům za veškerou podporu po dobu studia.

Obsah práce

1. Úvod a teoretická část.....	8
1.1. Cíle práce	8
1.2. Kapilární zónová elektroforéza.....	8
1.3. Elektroforetická mobilita	10
1.4. Elektroosmotický tok.....	11
1.4.1. Metody měření elektroosmotického toku	12
1.5. Mobilizace markerů elektroosmotického toku	13
2. Experimentální část	15
2.1. Měření relativních mobilit markerů elektroosmotického toku	15
2.1.1. Chemikálie	15
2.1.2. Instrumentace	15
2.1.3. Postup přípravy roztoků	16
2.1.4. Postup měření.....	16
2.2. Separace konzervačních látek	18
2.2.1. Chemikálie	18
2.2.2. Instrumentace	18
2.2.3. Postup přípravy roztoků	18
2.2.4. Postup měření.....	19
3. Výsledky a diskuze	20
3.1. Měření relativních mobilit markerů elektroosmotického toku	20
3.1.1. Vliv přítomnosti chloristanových iontů	23
3.1.2. Vliv přítomnosti chloridových iontů.....	25
3.1.3. Vliv přítomnosti síranových iontů	26
3.1.4. Postavení aniontů v Hofmeisterově řadě	26
3.2. Vliv mobilizace markerů na výpočet hodnoty elektroforetické mobility a identifikaci analytů	27
4. Závěr.....	30
5. Použitá literatura	31

Použité zkratky a symboly

AA	akrylamid
BGE	základní elektrolyt (background electrolyte)
CZE	kapilární zónová elektroforéza (capillary zone electrophoresis)
DMAA	<i>N,N</i> -dimethylakrylamid
DMFA	<i>N,N</i> -dimethylformamid
DMSO	dimethylsulfoxid
EM	elektroforetická mobilita
EOF	elektroosmotický tok (electroosmotic flow)
FA	formamid
MEKC	micelární elektrokinetická kapilární chromatografie
MO	mesityloxid
MP	mez pozorovatelnosti
NMA	<i>N</i> -methylacetamid
NMFA	<i>N</i> -methylformamid
SDS	dodecylsírán sodný
TM	thiomočovina
UV-Vis	ultrafialová a viditelná oblast spektra elektromagnetického záření
E	intenzita elektrického pole
ε	dielektrická konstanta rozpouštědla
I	iontová síla
l_c	celková délka kapiláry
l_d	délka kapiláry k detektoru
μ_{EM}	elektroforetická mobilita
μ_{rel}	relativní elektroforetická mobilita
μ_{EOF}	mobilita elektroosmotického toku
η	dynamická viskozita prostředí
q	náboj iontu
r	poloměr hydratovaného iontu
t	migrační čas látky
t_K	migrační čas kyseliny
t_M	migrační čas markeru
t_{TM}	migrační čas thiomočoviny
t_U	doba, po kterou bylo vkládáno napětí
U	vložené napětí
v	rychlost pohybu látky
ζ	zeta potenciál - elektrokinetický potenciál

1. Úvod a teoretická část

1.1. Cíle práce

Přesné měření mobility elektroosmotického toku je velmi důležité, protože její hodnota je dále využívána při různých fyzikálně-chemických výpočtech a při identifikaci analytů v analytické chemii.

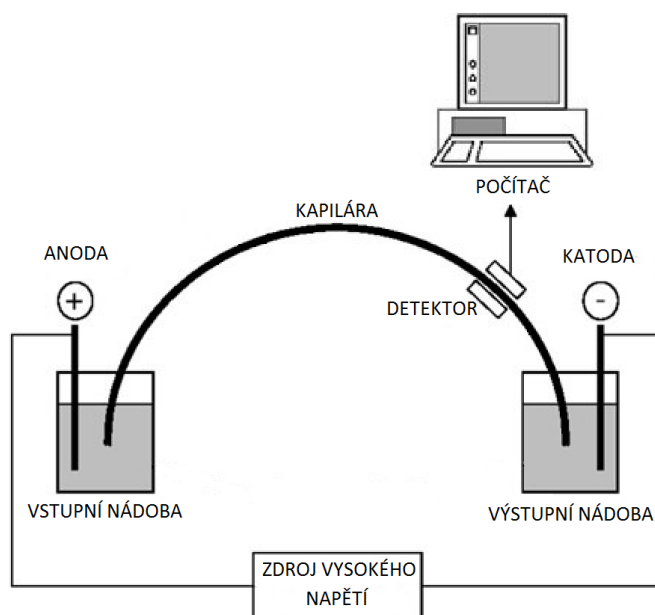
V této práci budou proměřeny relativní mobility běžných i méně používaných markerů elektroosmotického toku. Základním elektrolytem bude acetátový pufr míchaný se sodnými solemi různých kyselin. Budou vyvozeny závěry o vlivu aniontů základního elektrolytu na mobilitu neutrálních látek. Sledovány budou trendy ve změnách vypočítaných relativních mobilit markerů. Dále budou diskutovány vhodné volby markerů pro různé druhy základního elektrolytu.

Součástí experimentální části bude ukázka separace směsi analytů. S použitím hodnot migračních časů dvou různých markerů budou vypočítány hodnoty elektroforetických mobilit separovaných látek a bude posouzena míra vlivu druhu markeru na vypočtenou hodnotu elektroforetické mobility analytu.

1.2. Kapilární zónová elektroforéza

Kapilární zónová elektroforéza (CZE) je separační metoda. Schéma uspořádání přístroje je na obrázku [Obr. 1].

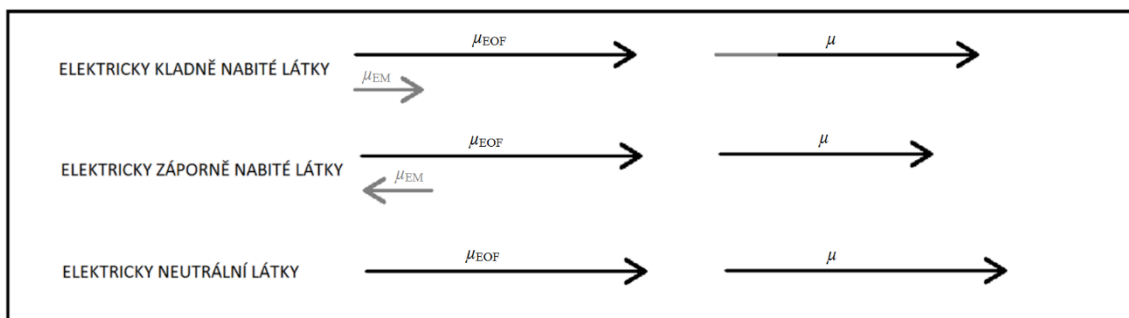
Metoda se řadí mezi metody elektromigrační stejně jako izoelektrická fokusace, agarosová a polyakrylamidová gelová elektroforéza, SDS-elektroforéza či bioafinitní elektroforéza [1]. Látky se dělí na základě různé mobility v elektrickém poli. Rychlost pohybu látky v elektrickém poli závisí na její elektroforetické mobilitě (EM) a na elektroosmotickém toku kapaliny v nemodifikované křemenné kapiláře.



Obr. 1 Schéma uspořádání přístroje pro kapilární zónovou elektroforézu. Nádobky i kapilára jsou plněny základním elektrolytem. Na elektrody je vkládáno vysoké napětí. Dávkované látky migrují kapilárou a u výstupního konce kapiláry jsou detekovány. Převzato z [2] a upraveno.

Díky jevu zvanému elektroosmotický tok (EOF) lze separovat kationty i anionty během jednoho měření [Obr. 2]. Mobilita elektricky kladně nabitých látek je dána součtem mobility EOF v nemodifikované křemenné kapiláře a elektroforetické mobility. Mobilita elektricky záporně nabitých látek se rovná rozdílu mobility EOF a elektroforetické mobility. Mobilita látky je vyjadřována touto rovnicí [3]:

$$\mu = \mu_{EM} + \mu_{EOF}$$



Obr. 2 Rychlost pohybu látky závisí na elektroforetické mobilitě látky μ_{EM} a na mobilitě elektroosmotického toku μ_{EOF} . Výsledná mobilita látky je označena μ .

Neutrální látky v kapilární zónové elektroforéze obvykle nelze separovat, protože mají totožnou nulovou elektroforetickou mobilitu. Pro jejich separaci lze použít metodu MEKC (micelární elektrokinetická kapilární chromatografie), při které se do

základního elektrolytu přidávají povrchově aktivní látky, které shluknutím vytvářejí micely. Různou afinitou neutrálních látek k micelám dochází k jejich rozdílné rychlosti pohybu [4].

Výstupní informací z měření kapilární zónovou elektroforézou je elektroferogram. Migrační čas látky je kvalitativní informací, plocha píku je informací kvantitativní. Díky častým problémům s reprodukovatelností EOF se však k identifikaci látek mnohdy nepoužívá přímo hodnota migračního času, ale vypočtená hodnota efektivní mobility analytu.

1.3. Elektroforetická mobilita

Elektroforetická mobilita je vyjádřena podílem rychlosti pohybu látky v elektrickém poli (v) a intenzity elektrického pole (E) [1]:

$$\mu_{EM} = \frac{v}{E} \text{ [m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}\text{]}$$

Kde se intenzita elektrického pole rovná poměru vloženého napětí (U) a celkové délky kapiláry (l_c):

$$E = \frac{U}{l_c} \text{ [V m}^{-1}\text{]}$$

A rychlost pohybu je dána následujícím vztahem, kde l_d je efektivní délka kapiláry, tedy délka kapiláry k místu detekce, t je migrační čas látky:

$$v = \frac{l_d}{t} \text{ [m s}^{-1}\text{]}$$

Dále uvedený vztah ukazuje, že mobilita látky je přímo úměrná náboji iontu (q) ale klesá s rostoucím poloměrem hydratovaného iontu (r) a s rostoucí dynamickou viskozitou roztoku (η):

$$\mu_{EM} = \frac{q}{6 \pi \eta r} \text{ [m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}\text{]}$$

Kladně nabitě ionty se pohybují účinkem vloženého napětí směrem ke katodě, ionty záporně nabitě směrem k anodě.

1.4. Elektroosmotický tok

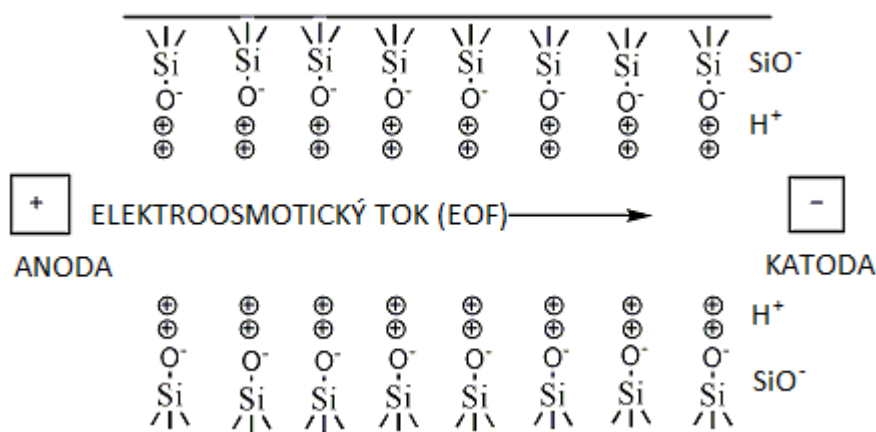
Elektroosmotický tok je transportní jev způsobený disociací silanolových skupin na stěně křemenné kapiláry [1]. Rychlost EOF je úměrná míře disociace silanolových skupin. Přípravou základního elektrolytu o vyšším pH lze dosáhnout vyšší rychlosti EOF. Na rozhraní stěny kapiláry a základního elektrolytu vzniká disociací silanolových skupin a naadsorbováním kationtů z roztoku Sternova nepohyblivá elektrická dvojvrstva [Obr. 3]. Vytváří se zde také difúzní vrstva s převahou kationtů. Na rozhraní nepohyblivé a difúzní vrstvy vzniká elektrokinetický potenciál, zeta potenciál ζ , který je určen hustotou náboje na vnitřní stěně kapiláry. Difúzní vrstva je účinkem vloženého napětí unášena ke katodě, a tímto směrem s sebou nese veškerou kapalinu v kapiláře.

Elektroosmotický tok, pokud je kapilára rovnoměrně nabitá, je jednotný v celém průřezu kapiláry vyjma tenké elektrické dvojvrstvy [3]. Mobilita EOF je dána Helmholtz-Smoluchowskiho rovnicí:

$$\mu_{\text{EOF}} = \frac{\varepsilon E \zeta}{4 \pi \eta}$$

Kde ε je dielektrická konstanta rozpouštědla, E je intenzita vloženého elektrického pole, ζ je zeta potenciál, η je dynamická viskozita rozpouštědla.

Díky EOF lze analyzovat zároveň kationty i anionty, pokud mobilita EOF převyšuje elektroforetickou mobilitu aniontů, tedy pokud $|\mu_{\text{EOF}}| > |\mu_{\text{EM}}|$.



Obr. 3 Průřez kapilárou, schéma znázorňující vznik elektroosmotického toku. Převzato z [5] a upraveno.

Mobilita EOF je důležitou veličinou, protože její hodnota je potřebná pro stanovení efektivní elektroforetické mobility látek, která je využívána pro jejich identifikaci v analytické chemii nebo pro stanovení fyzikálně-chemických konstant, jako je konstanta stability komplexů [6, 7].

1.4.1. Metody měření elektroosmotického toku

Nejčastějším způsobem měření rychlosti EOF je přidavek elektricky neutrální látky do dávkovaného vzorku [8]. Tento tzv. marker by se měl pohybovat po vložení vnějšího napětí mezi konce kapiláry rychlostí odpovídající rychlosti EOF, kterou lze snadno zjistit z jeho migračního času. Pro detekci zón analytů i markeru se používá UV-Vis detektor či detektor vodivosti.

Další možností, jak zjistit rychlost EOF, je sledování proudu v systému kapilární zónové elektroforézy [9]. Při tomto způsobu měření EOF je vstupní nádoba plněna stejným základním elektrolytem, ovšem má nižší koncentraci než roztok, kterým plníme kapiláru a výstupní nádoba. Pokud tento roztok doputuje ke konci kapiláry, dochází k celkové změně odporu kapaliny v kapiláře a sledujeme změnu v záznamu proudu. Tato metoda není přesná, protože rychlost EOF je funkcí koncentrace základního elektrolytu a ta v tomto případě není konstantní. Ovšem Huang a kol. ukázali, že při malém rozdílu koncentrací není změna rychlosti EOF statisticky významná. Tento způsob měření je jednoduchý, není potřeba žádný speciální roztok či detektor.

Vážení přírůstku elektrolytu ve výstupní vialce je také způsobem měření EOF [10]. Tato metoda má dobrou reprodukovatelnost ovšem nelze zachytit aktuální změny hodnoty EOF.

Stevens a Cortes využili při práci metodu, kdy vstupní vialka je plněna základním elektrolytem s přídavkem toluenu [11]. Po aplikování stejnosměrného napětí po dobu vždy několika minut je přeměřována UV absorbance roztoku ve výstupní vialce oproti čistému základnímu elektrolytu. Poté je výstupní vialka znovu plněna základním elektrolytem, vkládá se napětí a opět se přeměřuje absorbance. Postup se opakuje, dokud absorbance nenabyde vyšší hodnoty než slepý vzorek. Zvýšení absorbance značí přítomnost toluenu v roztoku. Autoři využívali také metodu zjištění

rychlosti EOF pomocí měření výšky hladiny ve výstupní vialce. Tato metoda je méně přesná, ale jednoduchá.

Lze také dávkovat místo běžného elektricky neutrálního markeru EOF roztok barviva. Kuhr a kol. sestavili aparaturu, ve které jsou kapiláry spojeny pomocí mikroskopických sklíček, kde je procházející kapalina sledována mikroskopem. Toto spojení je sledováno pomocí vysokorychlostní kamery [12].

Ani jedna z výše uvedených metod měření rychlosti EOF neposkytuje informaci o aktuálních změnách EOF, k dispozici jsou jen informace o průměrné rychlosti EOF. Metodu, která dokáže zaznamenat aktuální změny v rychlosti EOF vymysleli Lee a kol. [13]. Jde o metodu, při které je využito fluorescenční barvivo. Ke konci separační kapiláry je připojen rezervoár s roztokem barviva. Po obarvení prošlého roztoku probíhá detekce fluorescenčním detektorem. Nicméně složitost metody a nároky na instrumentaci vyloučily tuto metodu z rutinního použití.

1.5. Mobilizace markerů elektroosmotického toku

Metoda měření EOF přidavkem elektroneutrální látky je stále nejčastěji používanou metodou. Mobilita EOF se dá snadno zjistit z migračního času markeru. Při této metodě se předpokládá, že marker se pohybuje rychlostí EOF a zjištěná hodnota rychlosti EOF se pak využívá k výpočtu elektroforetických mobilit nabitých látek. Ukazuje se však, že neutrální látky se nepohybují přesně rychlostí EOF, protože získávají i svoji elektroforetickou mobilitu. V literatuře byly publikovány studie mobilizace velkých neutrálních molekul, jako jsou polymery nebo cyklická antibiotika [14-16], ukazuje se však, že ionty v roztoku interagují i s malými neutrálními molekulami a tím je mobilizují. S nepřesným změřením rychlosti EOF pak získáváme výpočty další nepřesné hodnoty. Síla interakce s neutrální látkou používanou jako marker EOF se pro různé ionty liší a proto se liší i mobilita, kterou markery v roztocích různých solí získají [17].

Ve své studii ukázali Křížek a kol., že elektroforetická mobilita dvou běžně používaných markerů EOF, thiomocoviny a dimethylsulfoxidu, nabývá různých nenulových hodnot [17]. Proměřovali mobilitu markerů v souboru aniontů

Hofmeisterovy řady. Proměřili také mobilitu *N*-methylacetamidu, který obsahuje peptidovou vazbu, a proto se využívá jako jednoduchý model proteinu.

Měření mobilizace markerů jsou v této práci prováděna upravenou metodou, kterou vymysleli Williams a Vigh [18]. V této metodě byl analyzovaný kation tlakem dávkován zároveň s elektroneutrálním markerem, obě látky se po vložení napětí dělí do zón. Po skončení doby vložení napětí je tlakem dávkován neutrální marker. Poté je systém mobilizován tlakem a zóny jsou detekovány. Z migračních časů je pak počítána hodnota rychlosti EOF a elektroforetické mobility kationtu. Výhodou tohoto měření je, že lze změřit i velmi nízké hodnoty elektroforetických mobilit a EOF. Je vhodná také pro analýzu dvou nebo více látek, které mají velmi rozdílné hodnoty elektroforetických mobilit. Touto metodou lze analyzovat kationty i anionty v jediném měření bez ohledu na velikost nebo směr EOF.

2. Experimentální část

2.1. Měření relativních mobilit markerů elektroosmotického toku

2.1.1. Chemikálie

Pro přípravu acetátového pufru byly použity octová kyselina 99 % p. a. společnosti Lach-Ner Neratovice a hydroxid sodný p. a. firmy Penta Praha. Pro přípravu roztoků solí byly použity chlorid sodný p. a., síran sodný p. a. a chloristan sodný p. a. dodávané firmou Lach-Ner Neratovice.

Jako markery byly použity formamid p. a. (FA), *N,N*-dimethylformamid p. a. (DMFA), *N*-methylformamid p. a. (NMFA), akrylamid p. a. (AA), *N,N*-dimethylakrylamid p. a. (DMAA), *N*-methylacetamid p. a. (NMA), mesityloxid p. a. (MO), dimethylsulfoxid p. a. (DMSO) dodávané firmou Lach-ner Neratovice.

2.1.2. Instrumentace

Měření byla prováděna na přístroji Agilent CE 1600 firmy Agilent Technologies, Německo. Pro měření byla zvolena nemodifikovaná křemenná kapilára s vnitřním průměrem 50 μm firmy Polymicro Technologies, USA. Celková délka kapiláry byla 80,0 cm, délka kapiláry k detekčnímu okénku činila 71,5 cm. Kapilára byla termostatována na 25 °C vzduchem, vzorek byl dávkován hydrodynamicky (5 kPa \times 5 s). Přístroj byl vybaven UV-Vis detektorem s diodovým polem. K vyhodnocení byly použity hodnoty absorbancí při 200, 214 a 254 nm.

Látky pro přípravu roztoků markerů a solí byly naváženy na analytických vahách Precisa 262 SMA-FR firmy Precisa Gravimetrics AG, Švýcarsko, s přesností 0,1 mg. Pro přípravu roztoků NaOH byly použity předvážky ViBRA firmy Shinko Denshi, Japonsko.

Při přípravě pufru bylo pH měřeno přístrojem 3540 pH & Conductivity meter firmy Jenway, Velká Británie.

2.1.3. Postup přípravy roztoků

V programu PeakMaster 5.3 [19] bylo vypočítáno potřebné množství octové kyseliny pro požadovaný pufr o iontové síle 250 mmol l^{-1} , $\text{pH} = 4,5$. Koncentrace octové kyseliny je 590 mmol l^{-1} , koncentrace hydroxidu sodného 250 mmol l^{-1} . Odměřené množství kyseliny bylo naředěno deionizovanou vodou a titrováno 10 mol l^{-1} roztokem hydroxidu sodného až do $\text{pH} = 4,5$. Při titraci bylo pH sledováno pH -metrem.

Roztoky solí byly připraveny navážením příslušného množství soli a rozpuštěním v deionizované vodě. Roztoky chloridu sodného, chloristanu sodného a síranu sodného byly připraveny o různých koncentracích ovšem o stejné hodnotě iontové síly $I = 250 \text{ mmol l}^{-1}$.

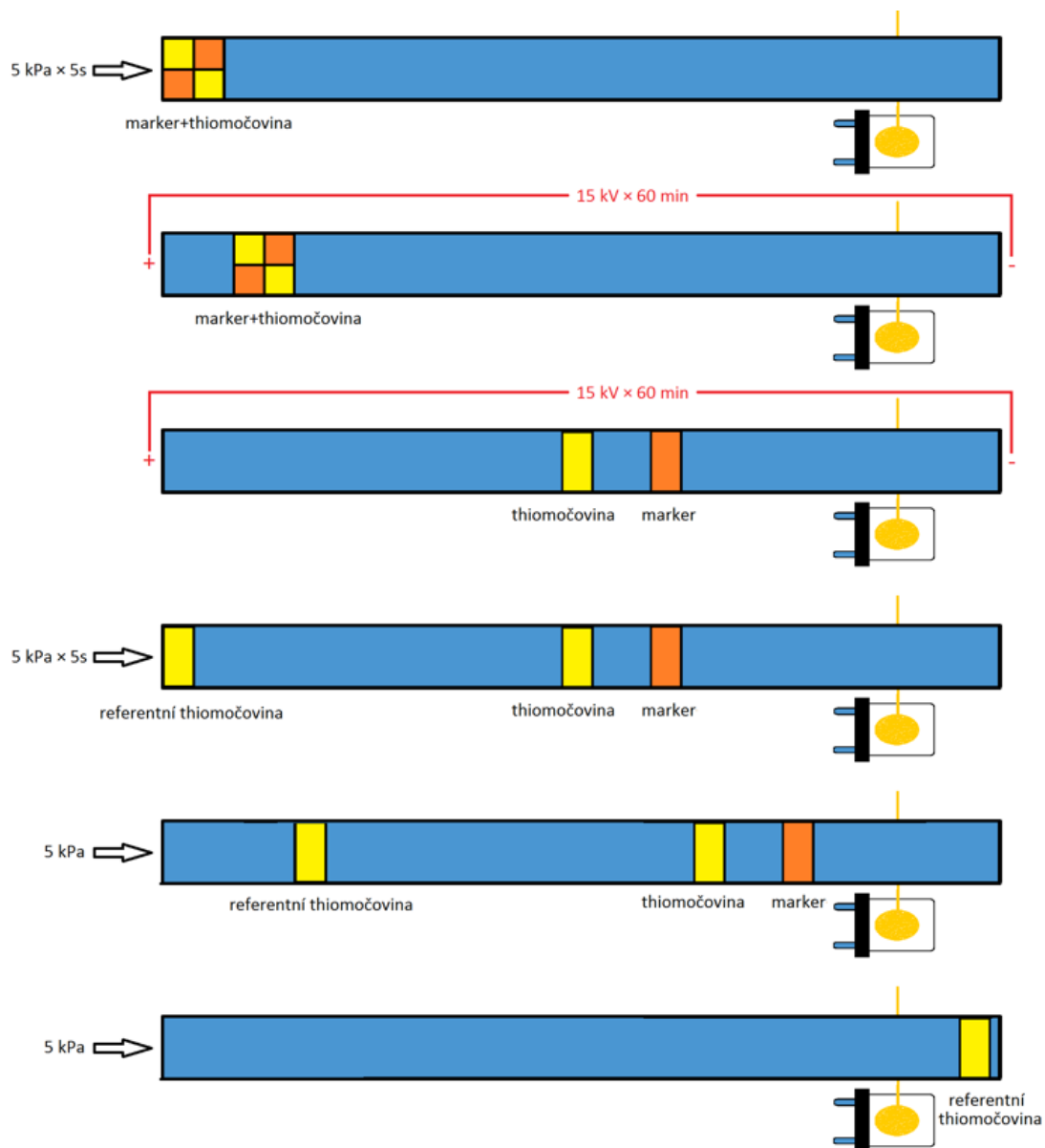
Základní elektrolyt vznikl smícháním acetátového pufru a roztoku chloridu, chloristanu či síranu sodného v poměru objemů 1:4.

Roztoky kapalných markerů byly připraveny zředěním 1:500 (objemový poměr) deionizovanou vodou, roztoky pevných markerů byly připraveny o koncentraci 1 mg ml^{-1} . Před samotným měřením byly dále ředěny, aby koncentrace markeru byla vždy 10 mmol l^{-1} .

2.1.4. Postup měření

Před každým měřením byla kapilára promývána 5 minut 1 mol l^{-1} roztokem hydroxidu sodného, 5 minut deionizovanou vodou a 2 minuty základním elektrolytem. Vzorek obsahující marker a thiomocovinu byl dávkován hydrodynamicky tlakem 5 kPa po dobu 5 sekund. Mezi konce kapiláry bylo vloženo stejnosměrné napětí 15 kV po dobu 60 minut, přičemž každých 15 minut byly měněny vialky se základním elektrolytem. Po této době byl hydrodynamicky dávkován referentní vzorek obsahující thiomocovinu tlakem 5 kPa po dobu 5 sekund. Celý systém byl mobilizován tlakem 5 kPa do doby než zóna markeru, thiomocoviny a referentní thiomocoviny prošly detektorem. Schéma způsobu měření je na obrázku níže [Obr. 4].

Měření byla pro všechny kombinace markerů a aniontů opakována třikrát.



Obr. 4 Schéma způsobu měření relativní mobility markerů elektroosmotického toku.

Relativní mobility markerů byly vypočítány podle rovnice [17]:

$$\mu_{\text{rel}} = \frac{(t_{\text{TM1}} - t_{\text{M}}) l_{\text{d}} l_{\text{c}}}{t_{\text{TM2}} t_{\text{U}} U}$$

Kde t_{TM1} je migrační čas thiomočoviny přidané k markeru [s], t_{M} je migrační čas markeru [s], l_{d} je délka kapiláry k detektoru [m], l_{c} je celková délka kapiláry [m], t_{TM2} je migrační čas referentní thiomočoviny [s], t_{U} je doba, po kterou bylo vkládáno napětí [s], U je hodnota vloženého napětí [V].

2.2. Separace konzervačních látek

2.2.1. Chemikálie

Pro přípravu acetátového pufru byly použity octová kyselina 99 % p. a. společnosti Lach-Ner Neratovice a hydroxid sodný p. a. firmy Penta Praha. Jako markery byly použity formamid p. a. (FA) a mesityloxid p. a. (MO) dodávané firmou Lach-ner Neratovice.

Pro přípravu vzorku byly použity benzoová kyselina p. a. firmy Lach-ner Neratovice, sorbová kyselina p. a. a 4-hydroxybenzoová kyselina p. a. firmy Sigma-Aldrich, USA.

2.2.2. Instrumentace

Měření byla prováděna na přístroji Agilent CE 1600 firmy Agilent Technologies, Německo. Pro měření byla zvolena nemodifikovaná křemenná kapilára s vnitřním průměrem 50 μm firmy Polymicro Technologies, USA. Celková délka kapiláry byla 50,0 cm, délka kapiláry k detekčnímu okénku činila 41,5 cm. Kapilára byla termostatována na 25 °C vzduchem, vzorek byl dávkován hydrodynamicky (5 kPa \times 3 s). Přístroj byl vybaven UV-Vis detektorem s diodovým polem. K vyhodnocení byly použity hodnoty při 200, 214 a 254 nm.

Látky pro přípravu roztoků markerů a roztoků kyselin byly naváženy na analytických vahách Precisa 262 SMA-FR firmy Precisa Gravimetrics AG, Švýcarsko, s přesností 0,1 mg. Pro přípravu roztoků NaOH byly použity předvážky ViBRA firmy Shinko Denshi, Japonsko.

Při přípravě pufru bylo pH měřeno přístrojem 3540 pH & Conductivity meter firmy Jenway, Velká Británie.

2.2.3. Postup přípravy roztoků

Acetátový pufr a roztoky markerů byly připraveny stejně jako pro předchozí měření [kapitola 2.1.3].

Roztoky sorbové, benzoové a 4-hydroxybenzoové kyseliny byly připraveny rozpuštěním příslušného množství kyseliny v deionizované vodě.

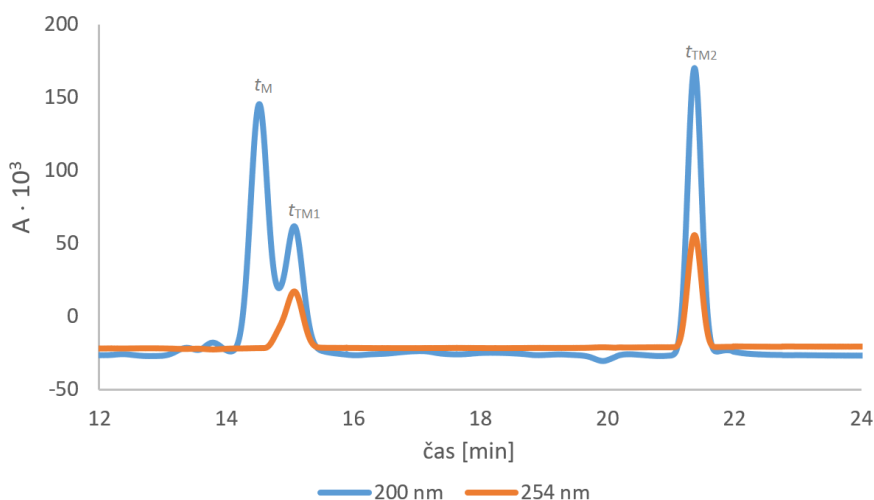
2.2.4. Postup měření

Před každým měřením byla kapilára promývána 3 minuty roztokem základního elektrolytu. Vzorek obsahující oba markery o koncentraci 10 mmol l^{-1} a sorbovou, benzoovou a 4-hydroxybenzoovou kyselinu o koncentracích $0,2 \text{ mg ml}^{-1}$ byl dávkován hydrodynamicky tlakem 5 kPa po dobu 3 sekund. Mezi konce kapiláry bylo vloženo stejnosměrné napětí 15 kV po dobu 20 minut, zároveň byl systém mobilizován tlakem 5 kPa . V tomto případě byla polarita zvolena negativní. Měření bylo prováděno třikrát. K identifikaci píků byla měření prováděna se vzorky, které obsahovaly vždy o jednu složku méně.

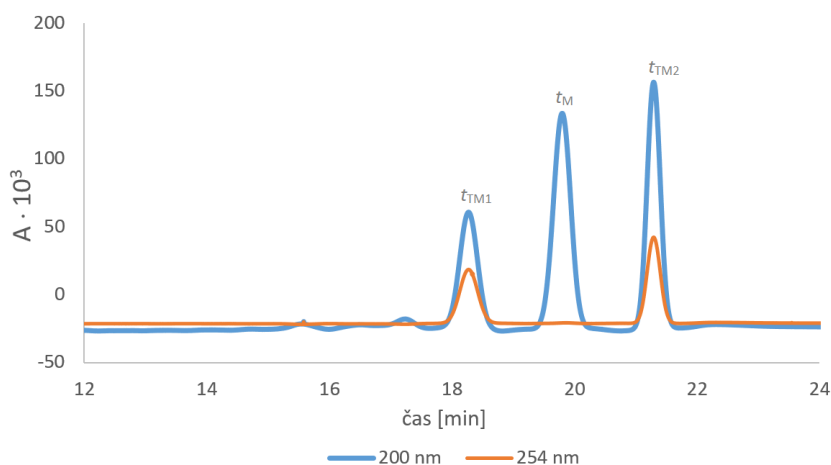
3. Výsledky a diskuze

3.1. Měření relativních mobilit markerů elektroosmotického toku

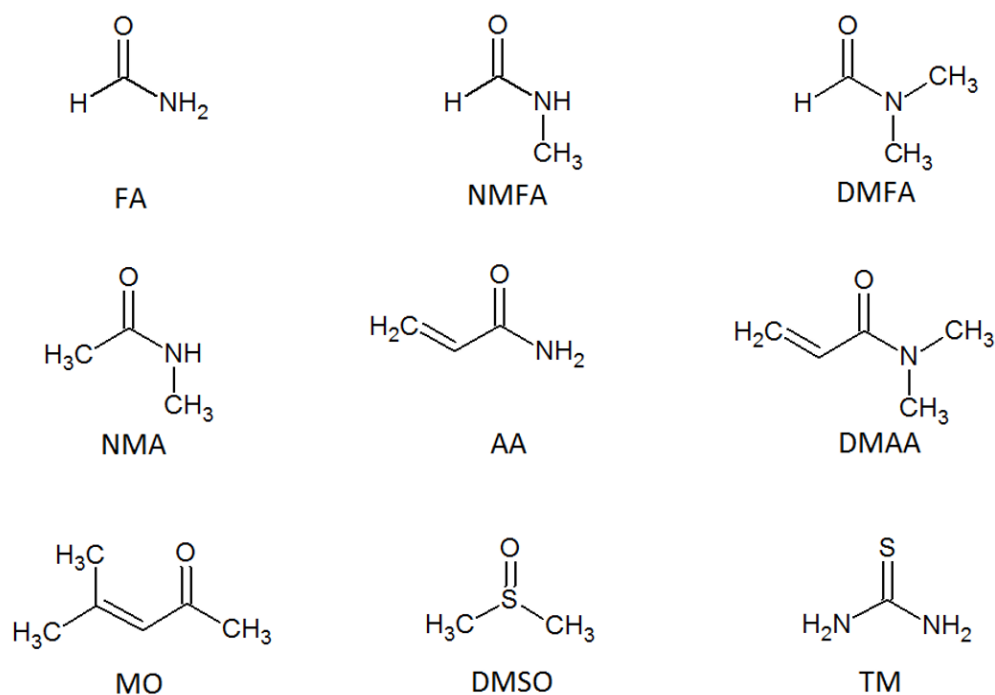
Z každého získaného elektroferogramu byl odečten migrační čas dávkovaného markeru (t_M) a thiomocoviny (t_{TM1}), a migrační čas thiomocoviny dávkované dodatečně (t_{TM2}). Migrační časy byly odečítány z elektroferogramu získaného při 200 nm. Elektroferogramy při 214 nm a 254 nm byly využity pro kvalitativní popis. Čas byl měřen od momentu, kdy bylo poprvé vloženo vnější napětí. Ukázky získaných elektroferogramů jsou na obrázcích [Obr. 5, Obr. 6].



Obr. 5 Elektroferogram při dávkování *N,N*-dimethylakrylamidu. Základní elektrolyt byl acetátový pufr, pH 4,5 míchaný 1:4 s roztokem chloridu sodného, $I = 250 \text{ mmol l}^{-1}$. Relativní mobilita markeru má kladnou hodnotu.



Obr. 6 Elektroferogram při dávkování *N,N*-dimethylakrylamidu. Základní elektrolyt byl acetátový pufr, pH 4,5 míchaný 1:4 s roztokem chloristanu sodného, $I = 250 \text{ mmol l}^{-1}$. Relativní mobilita markeru má v tomto případě hodnotu zápornou.



Obr. 7 Struktury všech proměřovaných markerů a thiomocoviny jako markeru referentního. Markery jsou vyobrazeny v pořadí formamid, N-methylformamid, N,N-dimethylformamid, N-methylacetamid, akrylamid, N,N-dimethylakrylamid, mesityloxid, dimethylsulfoxid, thiomocovina.

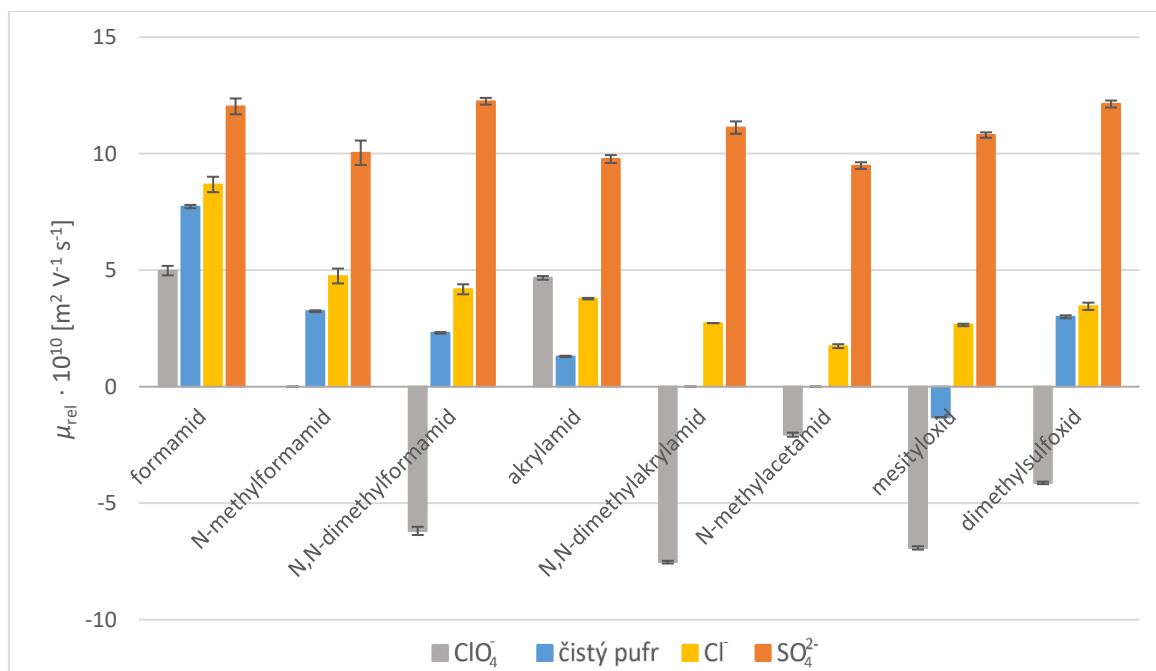
Na obrázku jsou zobrazeny struktury všech proměřovaných markerů [Obr. 7]. Vypočítané hodnoty relativních mobilit markerů v kombinaci s různými anionty obsaženými v základním elektrolytu jsou uvedeny v tabulce [Tab. 1, str. 22]. Výsledné hodnoty jsou vyobrazeny v grafu [Obr. 8, str. 22]. V případě, že zvolený marker prošel detektorem dříve než thiomocovina, je jeho relativní mobilita kladná, což vychází ve většině kombinací marker – anion. Všechny proměřované markery mají ve své struktuře kyslík, který je vysoce elektronegativní a jsou tedy mobilizovány sodnými kationty více než thiomocovina, ve které je kyslíkový atom nahrazen méně elektronegativní sírou. V případě, že marker projde detektorem později než thiomocovina, nabývá relativní mobilita markeru záporné hodnoty. Záporné hodnoty vycházejí s jedinou výjimkou pouze v případě, kdy jsou v základním elektrolytu přítomny chloristanové anionty. Je vidět, že zvolená kombinace markeru a aniontu má na výsledek velký vliv, rozdíl relativních mobilit dosahuje až $2 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Pro lepší orientaci budou v následujících kapitolách jednotlivě diskutovány pozorované trendy.

Tab. 1 Hodnoty relativních mobilit markerů v kombinaci s čistým acetátovým pufrům jako základním elektrolytem a v kombinaci s anionty chloridovými, chloristanovými a síranovými obsaženými v základním elektrolytu ($pH = 4,5$, $I = 250 \text{ mmol l}^{-1}$). Hodnoty relativních mobilit jsou ve tvaru: medián \pm interval spolehlivosti ($\bar{x} \pm L_{1,2}$), $\alpha = 0,05$.

$$\mu_{\text{rel}} \cdot 10^{10} [\text{m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}]$$

MARKER	čistý pufr	Cl^-	ClO_4^-	SO_4^{2-}
formamid	$7,73 \pm 0,18$	$8,68 \pm 0,82$	$4,98 \pm 0,47$	$12,03 \pm 0,78$
N-methylformamid	$3,24 \pm 0,10$	$4,75 \pm 0,77$	< MP	$10,04 \pm 1,34$
N,N-dimethylformamid	$2,31 \pm 0,08$	$4,18 \pm 0,56$	$-6,19 \pm 0,46$	$12,25 \pm 0,34$
akrylamid	$1,30 \pm 0,07$	$3,78 \pm 0,08$	$4,67 \pm 0,20$	$9,77 \pm 0,39$
N,N-dimethylakrylamid	< MP	$2,73 \pm 0,01$	$-7,53 \pm 0,15$	$11,12 \pm 0,68$
N-methylacetamid	< MP	$1,74 \pm 0,19$	$-2,06 \pm 0,23$	$9,49 \pm 0,34$
mesityloxyd	$-1,31 \pm 0,02$	$2,65 \pm 0,13$	$-6,92 \pm 0,17$	$10,80 \pm 0,30$
dimethylsulfoxid	$3,00 \pm 0,16$	$3,45 \pm 0,41$	$-4,13 \pm 0,13$	$12,13 \pm 0,36$

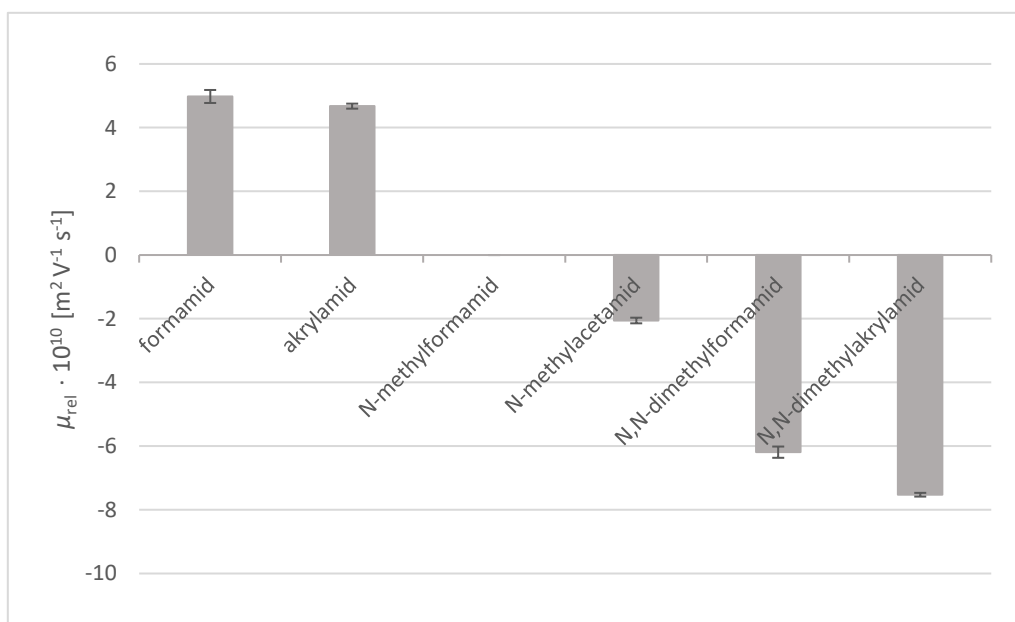
* < MP = hodnoty byly neměřitelné, protože nedošlo k dostatečné separaci markeru a thiomocoviny.



Obr. 8 Hodnoty relativních mobilit markerů vypočítaných oproti thiomocovině jako referentnímu markeru. Měření byla prováděna v čistém acetátovém pufru a poté v pufru v kombinaci se sodnými solemi - s chloridem sodným, chloristanem sodným a síranem sodným ($pH = 4,5$; $I = 250 \text{ mmol l}^{-1}$).

3.1.1. Vliv přítomnosti chloristanových iontů

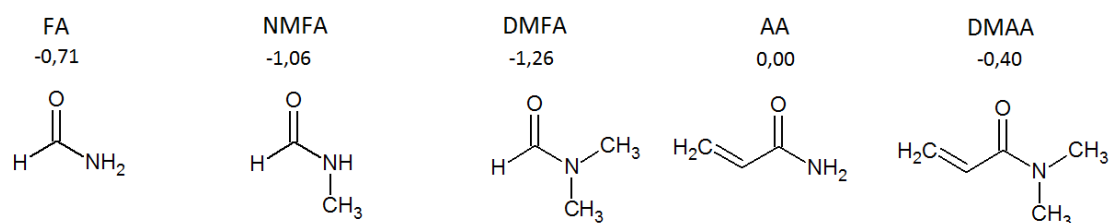
Při měření mobilit markerů v základním elektrolytu obsahujícím chloristanové ionty se výsledky výrazně lišily od výsledků ostatních měření. Téměř pouze při měření v základním elektrolytu obsahujícím chloristanové ionty nabývají vypočítané relativní mobility záporných hodnot, u některých markerů ovšem i zde nabývaly hodnot kladných. Také rozdíly mezi relativními mobilitami jednotlivých markerů byly v přítomnosti chloristanových iontů nejvýraznější. Ve skupině amidů lze dobře sledovat trend v mobilizaci markerů v přítomnosti chloristanových iontů. Pro formamid a akrylamid jsou vypočítané hodnoty relativních mobilit vysoké kladné. Pro *N,N*-dimethylformamid a *N,N*-dimethylakrylamid jsou hodnoty relativních mobilit záporné. V grafu [Obr. 9] jsou vyobrazeny hodnoty relativních mobilit.



Obr. 9 Hodnoty relativních mobilit amidových markerů elektroosmotického toku v přítomnosti chloristanových aniontů v acetátovém základním elektrolytu. ($pH = 4,5$; $I = 250 \text{ mmol l}^{-1}$).

Ukazuje se, že se zvyšující se mírou methylace amidového dusíku nabývají relativní mobility markerů nižších hodnot. S vyšší mírou methylace se zvětšuje nepolární část molekuly a dochází k silnější interakci s chloristanovými anionty. Je známo, že chloristanové anionty interagují silně jak s polárními, tak nepolárními částmi molekul, zatímco interakci ostatních zkoumaných aniontů i sodných kationtů potlačuje

zvyšující se podíl nepolární části povrchu molekuly [17]. Interakce chloristanových iontů s markery zůstává poměrně silná i při vysokém stupni methylace, a proto v jejich případě relativní mobilita nabývá poměrně vysokých záporných hodnot. Z toho důvodu je měření EOF v základních elektrolytech obsahujících chloristany problematické a je vhodné vyhnout se markerům s nepolárními částmi molekul.

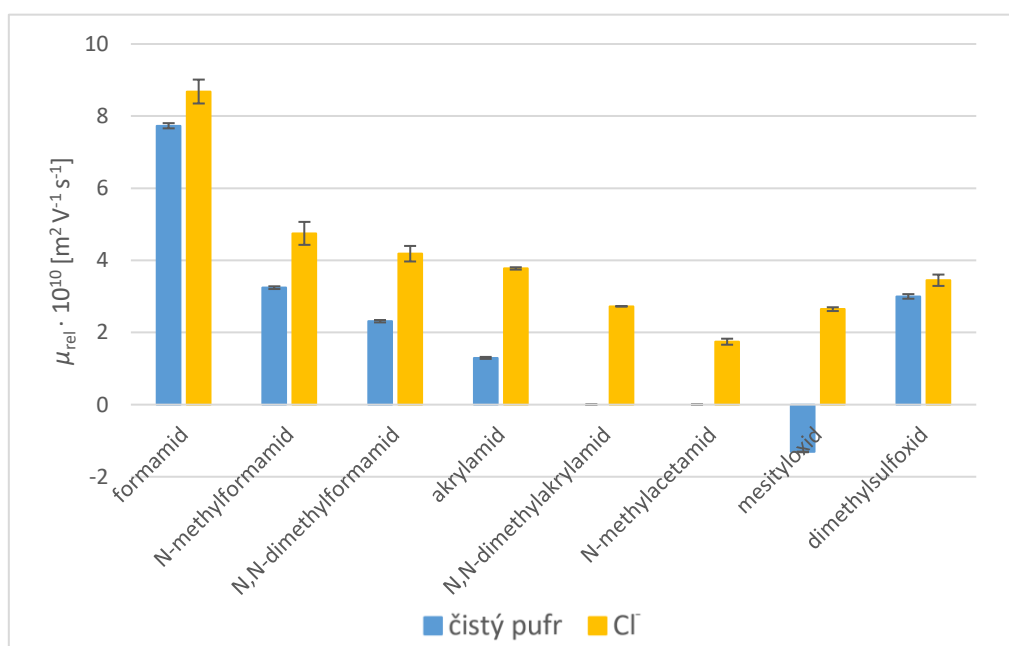


Obr. 10 Molekuly zkoumaných amidů. Pod zkratkou názvu markeru je uvedena hodnota pK_a pro protonizaci atomu kyslíku. Hodnoty pK_a byly vypočítány v programu Marvin [20].

Jak je patrné z porovnání obrázků [Obr. 9 a 10], trend míry methylace koreluje i s hodnotami pK_a jednotlivých markerů. Hodnota pK_a roste s mírou methylace amidového dusíku. Markery s vyšší hodnotou pK_a se snadněji protonizují, z čehož vyplývá, že rovněž snáze interagují se sodnými kationty a jsou jimi výrazněji mobilizovány. Díky tomu vycházejí jejich hodnoty relativních mobilit kladnější než pro markery EOF mající nižší hodnotu pK_a .

3.1.2. Vliv přítomnosti chloridových iontů

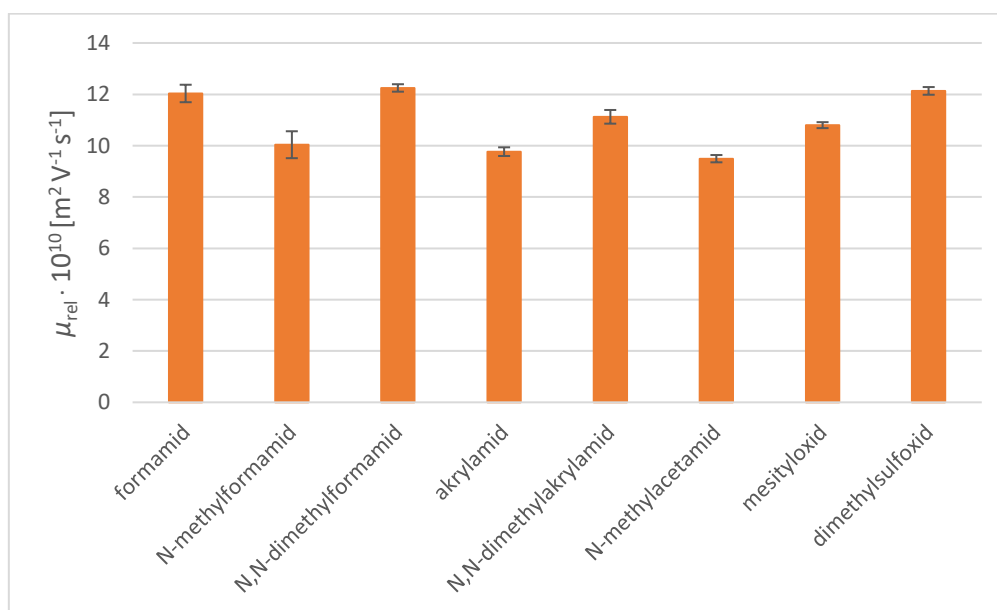
Přítomnost chloridových iontů v základním elektrolytu má také vliv na mobilitu markerů. Vypočítané hodnoty relativních mobilit markerů v přítomnosti chloridových iontů v BGE se příliš neliší od hodnot relativních mobilit markerů při měření s acetátovým pufrům jako základním elektrolytem. Markery interagují s chloridovými ionty obecně slaběji než s ionty acetátovými, tím markery dosahují vyšších hodnot mobilit, protože u nich převládá interakce se sodnými kationty. Relativní mobility ovšem sledují stejný trend, viz graf [Obr. 11]. Rozdíly mobility jsou zde menší, než v případě chloristanových iontů, nejsou však zanedbatelné. U markerů řadících se mezi amidy zde sledujeme v menší míře stejný trend jako v případě měření v přítomnosti chloristanových aniontů. S rostoucí mírou methylace amidového dusíku klesá hodnota relativní mobility markeru.



Obr. 11 Hodnoty relativních mobilit markerů v přítomnosti chloridových iontů v základním elektrolytu. V grafu pro srovnání s hodnotami relativních mobilit markerů při měření, kdy byl základním elektrolytem acetátový pufr. ($pH = 4,5$; $I = 250 \text{ mmol l}^{-1}$).

3.1.3. Vliv přítomnosti síranových iontů

Zvolené markery EOF se síranovými ionty přítomnými v základním elektrolytu zřejmě interagují velmi slabě. Jsou oproti thiomočovinně kladně mobilizovány sodnými kationty a tím jejich relativní mobility nabývají ve všech případech vysokých kladných hodnot. Tomu nasvědčuje i fakt, že hodnoty relativní mobility mezi jednotlivými markery se liší jen velmi málo bez ohledu na stupeň methylace markeru. Graf znázorňující hodnoty relativních mobilit je na obrázku [Obr. 12]. Při měření v BGE se síranovými anionty je tedy nutno vyvarovat se porovnávání mobilit získaných s využitím migračních časů těchto markerů s hodnotami získanými s využitím thiomočoviny jako markeru EOF. Vzájemné porovnávání hodnot získaných s ostatními markery kromě thiomočoviny vede k minimálním chybám.



Obr. 12 Hodnoty relativních mobilit markerů v přítomnosti síranových iontů v základním elektrolytu (acetátový pufr, $pH = 4,5$; $I = 250 \text{ mmol l}^{-1}$).

3.1.4. Postavení aniontů v Hofmeisterově řadě

Hodnoty relativních mobilit markerů [Obr. 8] nabývají v přítomnosti různých aniontů rozdílných hodnot. Ovšem chování dobře odpovídá pozici aniontů v Hofmeisterově řadě [21]. Jde o empiricky zjištěnou řadu iontů, která se původně týká

interakcí iontů s makromolekulami, jako jsou proteiny. Ionty postavené vlevo snižují rozpustnost makromolekul, tyto soli se proto využívají k vysolování proteinů z roztoku. Ionty nacházející se na pravé straně řady mají při přidání do roztoku proteinu efekt opačný, jde o tzv. vsolování.

V Hofmeisterově řadě jsou zkoumané anionty v tomto pořadí:

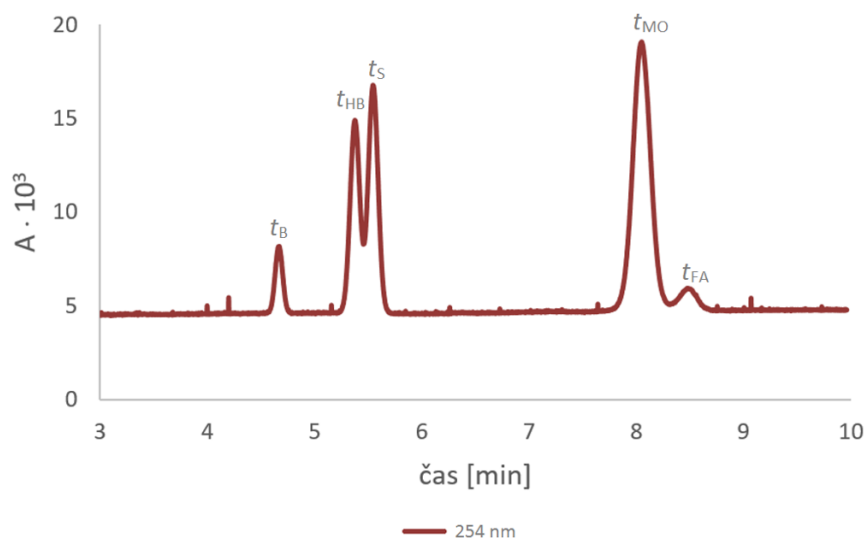


Sírany, které jsou na levé straně řady vykazují výrazně nejslabší interakce se všemi markery. Chloristany, které jsou na pravém konci řady naopak vykazují u všech markerů s výjimkou akrylamidu interakci nejsilnější. Chlorid a octan leží v Hofmeisterově řadě blízko sebe a jejich chování, co se týče mobilizace markerů, je velmi podobné. U námi použitých markerů je interakce s anionty silnější pro acetát než pro chlorid, poměr síly interakce s chloridy a octany se však mezi jednotlivými markery poměrně hodně liší, takže toto převrácení pořadí může být dáno konkrétní volbou markerů.

3.2. Vliv mobilizace markerů na výpočet hodnoty elektroforetické mobility a identifikaci analytů

Pro ilustraci toho, jaký vliv může mít mobilizace markerů na další elektroforetické výpočty byla v acetátovém pufru používaném při předchozích experimentech provedena separace tří běžně používaných a stanovovaných konzervačních látek. Elektroforetické mobility separovaných látek byly vypočítány za použití migračních časů dvou různých markerů EOF. Mobilita EOF je při tak nízké hodnotě pH základního elektrolytu velmi nízká a nepřevyšuje elektroforetickou mobilitu analytů, proto bylo při tomto měření aplikováno napětí záporné polarity. Z časových důvodů byla pro tuto separaci použita kratší kapilára, zároveň byl kvůli nízké mobilitě EOF aplikován po celou dobu analýzy tlak 5 kPa. Separace nebyla nijak optimalizována.

Ze získaných elektroferogramů byly odečteny migrační časy benzoové, 4-hydroxybenzoové a sorbové kyseliny jako analytů a migrační časy mesityloxydu a formamidu jako markerů EOF. Ukázka získaného elektroferogramu je na obrázku [Obr. 13]. Z obrázku je patrné, že i v běžně používaném acetátovém pufru o pH 4,5 může docházet k separaci dvou markerů EOF.



Obr. 13 Elektroferogram získaný při dávkování vzorku obsahujícího kyseliny benzoovou, 4-hydroxybenzoovou a sorbovou. Ke vzorku byly přidány markery formamid a mesityloxid. Měření bylo prováděno v acetátovém pufru, pH 4,5, $I = 250 \text{ mmol l}^{-1}$. Napětí 15 kV, tlak 5 kPa. V grafu t_B je migrační čas benzoové kyseliny, t_{HB} 4-hydroxybenzoové kyseliny a t_S sorbové kyseliny. Symboly t_{MO} a t_{FA} značí migrační časy markerů mesityloxiidu a formamidu.

Elektroforetická mobilita kyselin obsažených ve vzorku byla vypočítána podle vzorce:

$$\mu_{EM} = \left(\frac{1}{t_K} - \frac{1}{t_M} \right) \cdot \frac{l_d l_c}{U}$$

Kde t_K je migrační čas kyseliny [s], t_M je migrační čas markeru [s], l_d je délka kapiláry k detektoru [m], l_c je celková délka kapiláry [m] a U je vkládané napětí [V].

Byly vypočítány elektroforetické mobility všech tří analytů, přičemž hodnota EOF byla jednou vypočítána s využitím migračního času mesityloxiidu a podruhé s využitím migračního času formamidu. Vypočítané hodnoty elektroforetických mobilit jsou uvedeny v tabulce [Tab. 2].

Tab. 2 Hodnoty elektroforetických mobilit tří kyselin používaných jako konzervanty. Pro výpočet byly využity hodnoty elektroosmotického toku, které byly vypočítány z migračních časů markerů mesityloxiidu a formamidu. Hodnoty elektroforetických mobilit jsou ve tvaru: medián \pm interval spolehlivosti ($\bar{x} \pm L_{1,2}$), $\alpha = 0,05$. Rozdíl ve výsledcích je uveden v procentech, přičemž hodnota se rovná nárůstu hodnoty elektroforetické mobility, pokud pro výpočet použijeme migrační čas formamidu místo migračního času mesityloxiidu.

$\mu_{EP} \cdot 10^8 \text{ [m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}\text{]}$

MARKER	mesityloxid	formamid	rozdíl
benzoová kyselina	2,074 \pm 0,003	2,222 \pm 0,004	7,1 %
4-hydroxybenzoová kyselina	1,423 \pm 0,005	1,570 \pm 0,007	10,3 %
sorbová kyselina	1,293 \pm 0,005	1,439 \pm 0,007	11,4 %

Při názorném pokusu se ukázalo, že mobilizace markerů má vliv na výsledky dalších výpočtů. Migrační čas markeru se běžně využívá pro výpočet mobility EOF. Ovšem pokud jsou markery různě mobilizovány, vychází rozdílné hodnoty mobility EOF. Hodnota mobility EOF je pak využita pro výpočet elektroforetické mobility analytu.

V tabulce [Tab. 2] lze vidět, že hodnoty elektroforetických mobilit se liší a mohlo by například dojít k chybné identifikaci látek. Rozdíl v elektroforetických mobilitách dosahuje řádu $10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (až 11 % hodnoty elektroforetické mobility), zatímco směrodatná odchylka velmi přesného měření byla v řádu $10^{-11} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (0,1 % hodnoty elektroforetické mobility). Chyba vnesená použitím jiného markeru je statisticky i z praktického hlediska významná, protože o dva řády převyšuje směrodatnou odchylku opakovaných měření. V tomto měření by případně mohlo dojít k záměně píků 4-hydroxybenzoové a sorbové kyseliny.

4. Závěr

V bakalářské práci byly proměřeny mobility zvolených markerů v přítomnosti různých aniontů v základním elektrolytu. Byly vypočítány relativní mobility markerů oproti thiomocovině jako referentnímu markeru.

Ukazuje se, že přidavek různých sodných solí kyselin má vliv na relativní mobility markerů elektroosmotického toku. Největší rozdíly v hodnotách relativních mobilit jednotlivých markerů jsou v přítomnosti chloristanových iontů. Velmi výrazným sledovaným trendem je vliv míry methylace amidového dusíku markeru na jeho mobilizaci. S rostoucí methylací klesá hodnota relativní mobility markeru. S chloridy interagují markery slaběji než s acetátovým iontem, a tím nabývají hodnot relativních mobilit kladnějších než při měření v čistém acetátovém pufru. V přítomnosti síranových iontů nabývají relativní mobility markerů vysokých kladných hodnot, markery tedy s ionty síranovými interagují velmi slabě a u všech převládá mobilizace sodnými kationty.

Pro různé základní elektrolyty je tedy z důvodu mobilizace markerů anionty přítomnými v základním elektrolytu vhodné volit různé markery elektroosmotického toku. Jako vhodné se jeví použít *N,N*-dimethylakrylamid, *N*-methylacetamid či akrylamid v případě použití acetátového pufru jako základního elektrolytu. *N*-methylacetamid je vhodný i pro měření v přítomnosti chloristanových iontů. Pro všechny použité druhy základního elektrolytu je nevhodné použít jako marker elektroosmotického toku formamid.

Na separaci běžných konzervačních látek bylo ukázáno, že při výpočtu efektivních elektroforetických mobilit dochází k chybě, pokud jsou pro výpočet využity migrační časy různých markerů. Rozdíl elektroforetických mobilit dosahuje až 10 %, měření jsou tedy nepřesná. V každém případě je vhodné pro danou sérii měření používat stále stejný marker elektroosmotického toku a dbát zvýšené opatrnosti při změně iontů v základním elektrolytu, pokud se nacházejí na opačných koncích Hofmeisterovy řady.

5. Použitá literatura

- [1] Kašička, V.: Teoretické základy a separační principy kapilárních elektromigračních metod. *Chemické listy* **91**, 320-329 (1997).
- [2] Prince Technologies, <http://www.princetechnologies.eu/products/ce-systems/> [online, přístup získán 28. 3. 2017]
- [3] Ghosal, S.: Fluid mechanics of electroosmotic flow and its effect on band broadening in capillary electrophoresis. *Electrophoresis* **25**, 214-228 (2004).
- [4] Terabe, S.; Otsuka, K.; Ichikawa, K.; Tsuchiya, A.; Ando, T.: Electrokinetic separations with micellar solutions and open-tubular capillaries. *Analytical Chemistry* **56**, 111-113 (1984).
- [5] chem.libretexts.org
https://chem.libretexts.org/LibreTexts/University_of_California_Davis/UCD_Chem_115 [online, přístup získán 7. 4. 2017]
- [6] Štěpánová, S.; Kašička, V.: Capillary electrophoretic methods applied to the investigation of peptide complexes. *Journal of Separation Science* **38**, 2708-2721 (2015)
- [7] Ušelová-Včeláková, K.; Zusková, I.; Gaš, B.: Stability constants of amino acids, peptides, proteins, and other biomolecules determined by CE and related methods: Recapitulation of published data. *Electrophoresis* **28**, 2145-2152 (2007).
- [8] Lauer, H. H.; McManigill, D.: Capillary zone electrophoresis of proteins in untreated fused silica tubing. *Analytical Chemistry* **58**, 166-170 (1986).
- [9] Huang, X.; 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).

- [10] Altria, K. D.; Simpson, C. F.: High voltage capillary zone electrophoresis: Operating parameters effects on electroosmotic flows and electrophoretic mobilities. *Chromatographia* **24**, 527-532 (1987).
- [11] Stevens, T. S.; Cortes, H. J.: Electroosmotic propulsion of eluent through silica based chromatographic media. *Analytical chemistry* **55**, 1365-1370 (1983).
- [12] Kuhr, W. G.; Licklider, L.; Amankwa, L.: Imaging of electrophoretic flow across a capillary junction. *Analytical Chemistry* **65**, 277-282 (1993).
- [13] Lee, T. T.; Dadoo, R.; Zare, R. N.: Real-time measurement of electroosmotic flow in capillary zone electrophoresis. *Analytical Chemistry* **66**, 2694-2700 (1994).
- [14] Ehala, S.; Dybal, J.; Makrlík, E.; Kašička, V.: Capillary affinity electrophoresis and ab initio calculation studies of valinomycin complexation with Na⁺ ion. *Journal of Separation Science* **32**, 597-604 (2009).
- [15] Ehala, S.; Toman, P.; Rathore, R.; Makrlík, E.; Kašička, V.: Affinity capillary electrophoresis and density functional theory employed for the characterization of hexaarylbenzene-based receptor complexation with alkali metal ions. *Electrophoresis* **32**, 981-987 (2011).
- [16] Chatterjee, S. K.; Prokopová, E.; Bohdanecký, M.: Electrophoretic and viscometric studies of the interactions of polymethacrylamide and polyacrylamide with electrolytes in aqueous solutions. *European Polymer Journal* **14**, 665-670 (1987).
- [17] 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).
- [18] Williams, B. A.; Vigh, C.: Fast, accurate mobility determination method for capillary electrophoresis. *Analytical Chemistry* **68**, 1174-1180 (1996).
- [19] Zusková, I.; Gaš, B.; Ušelová-Včeláková, K.: Peakmaster 5.3 [počítačový program, dostupný z <https://web.natur.cuni.cz/gas/>]

- [20] ChemAxon, Budapešť, Maďarsko: Marvin 16.4.11.0 [počítačový program]
- [21] Kunz, W.; Henle, J.; Ninham, B. W.: ‘Zur Lehre von der Wirkung der Salze’ (about the science of the effect of salts): Franz Hofmeister’s historical papers. *Current Opinion in Colloid and Interface Science* **9**, 19-37 (2004).