UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Fakulta přírodovědecká

Katedra analytické chemie

STUDIUM MOBILITY KYSELINY BORITÉ POMOCÍ KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZY

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Jméno autora: Kristýna Jarčíková

Vedoucí práce: doc. RNDr. Jan Petr, Ph.D.

Studijní obor: Chemie

Rok: 2016/2017

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou v seznamu použité literatury.

Souhlasím s tím, že práce je prezenčně zpřístupněna v knihovně Katedry analytické chemie, Přírodovědecké Fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne …….....

……..

Vlastnoruční podpis

Poděkování

Chtěla bych poděkovat zejména mému vedoucímu doc. RNDr. Janu Petrovi, Ph.D., nejen za jeho odborné vedení, cenné rady a pomoc při získávání experimentálních výsledků, ale především za jeho čas, ochotu a pozitivní přístup.

Dále bych chtěla poděkovat svým rodičům, kteří mi umožnili studovat na vysoké škole a celé své rodině, která mě při studiu vždy podporovala. Nemalé poděkování patří také mému příteli za jeho trpělivost a podporu po dobu mého studia.

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora	Kristýna Jarčíková
Název práce	Studium mobility kyseliny borité pomocí kapilární elektroforézy
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra analytické chemie
Vedoucí práce	doc. RNDr. Jan Petr, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2017
Klíčová slova	Kapilární elektroforéza, kyselina boritá, mobilita
Počet stran	35
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor´s first name and surname	Kristýna Jarčíková
Title	Study of mobility of boric acid by capillary electrophoresis
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of Analytical Chemistry
Supervisor	doc. RNDr. Jan Petr, Ph.D.
The year of presentation	2017
Keywords	Capillary electrophoresis, boric acid, mobility
Number of pages	35
Number of appendices	0
Language	Czech

Abstrakt

V této práci je popsáno měření mobility kyseliny borité pomocí kapilární elektroforézy a její chování v různých prostředích. Práce se zabývá zjišťováním mobility v závislosti na pH a poté také v závislosti na přídavku různých aditiv. Cílem práce bylo změřit hodnoty jednotlivých mobilit kyseliny borité a s jejich pomocí lepé porozumět chování kyseliny borité v různých prostředích.

Abstract

This work describes measurements of the mobility of boric acid by capillary electrophoresis and boric acid behavior in different electrolytes. The thesis deals with the determination of mobility in dependence on pH and then also with the addition of various additives. The aim of the work was to measure the values of individual boric acid mobilities and to better understand the behavior of boric acid in different environments.

OBSAH

1. ÚVOD 1

2. TEORETICKÁ ČÁST 2

2.1 Kapilární elektromigrační metody 2

2.1.1 Úvod do kapilárních elektromigračních metod 2

2.1.2 Historie 2

2.1.3 Princip 3

2.1.4 Elektroosmotický tok (EOF) 4

2.1.5 Instrumentace kapilárních elektromigračních metod 6

2.1.6 Rozdělení kapilárních elektromigračních metod [1] 7

2.1.6.1 Kapilární zónová elektroforéza 8

2.1.6.2 Kapilární gelová elektroforéza 8

2.1.6.3 Micelární elektrokinetická kapilární chromatografie 9

2.1.6.4 Elektrochromatografie v naplněných kapilárách 9

2.1.6.5 Kapilární izoelektrická fokusace 10

2.1.6.6 Kapilární izotachoforéza 11

2.1.6.7 Bioafinitní kapilární elektroforéza 11

2.2 Elektroforetická mobilita 11

2.2.1 Měření elektroforetické rychlosti a mobility 12

2.2.2 Faktory ovlivňující elektroforetickou mobilitu 13

2.2.2.1 Náboj solutu 15

2.2.2.2 Velikost solutu 15

2.2.2.3 Hodnota pH 15

2.3 Běžné pufry využívající se v kapilární elektroforéze 16

2.3.1 Borátový pufr 16

2.3.2 Využití a význam kyseliny borité v kapilární elektroforéze 16
2.3.3 Reakce borátu se sacharidy 17
2.3.3.1 Základy výměny bor-diol 17
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST 19
3.1 Materiál 19
3.1.1 Chemikálie 19
3.1.2 Příprava elektrolytů 19
3.2 Instrumentace a experimentální podmínky 19
3.3 Laboratorní pomůcky 20
4. VÝSLEDKY A DISKUZE 21
4.1 Cíl práce 21
4.2 Volba kyseliny borité 21
4.3 Měření mobility v závislosti na pH 23
4.4 Přídavky aditiv 25
5. ZÁVĚR 32
6. LITERATURA 33
7. SEZNAM ZKRATEK 35

1. ÚVOD

Kapilární elektroforéza je v poslední době čím dál více používaná moderní separační technika. Je to především z důvodu malého potřebného množství vzoru k analýze, vysoké rychlosti analýzy a také díky její vysoké účinnosti separace. Kyselina boritá patří mezi nejčastěji užívané bazické elektrolyty v kapilární elektroforéze. Zároveň je známá svojí schopností vytvářet komplexy např. s vicinálními dioly, a proto se hodně používá i v případě separací strukturně podobných hydroxo-sloučenin, např. cukrů. Její předností je i její relativně malá vlastní mobilita v širokém rozmezí pH, a proto může být využita např. k online prekoncentračním metodám. Pochopení a detailní popsání těchto dějů v kapilární elektroforéze s sebou ale nese požadavek na znalost vlastní mobility kyseliny borité v těchto prostředích. A právě měření mobility kyseliny borité v některých používaných prostředích v složitějších metodách kapilární elektroforézy je náplní této práce.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Kapilární elektromigrační metody

2.1.1 Úvod do kapilárních elektromigračních metod

V dnešní době nazýváme kapilární elektromigrační metody souhrnným názvem vysokoúčinná kapilární elektroforéza HPCE („high-performance capillary electrophoresis“). Tyto metody využívají k dělení látek odlišné pohyblivosti iontů ve stejnosměrném elektrickém poli [1]. Vlastní dělení probíhá v kapilárách o určitém vnitřním průměru (několik desítek mikrometrů). Tyto kapiláry jsou zhotoveny zpravidla z taveného křemene, ale mohou být vyrobeny i z jiných materiálů, např. PTFE. Kapilární elektromigrační metody vynikají malou spotřebou vzorku a činidel potřebných k separaci, vysokou rychlostí analýzy, krátkou dobou potřebnou k optimalizaci podmínek, a především svou vysokou účinností separace (stovky tisíc až miliony teoretických pater) [1,2].

2.1.2 Historie

Kapilární elektroforéza byla definována jako diferenciální pohyb nabitých částic podle přitažlivosti nebo odporu v elektrickém poli. Elektroforézu jako separační techniku poprvé popsal Tiselius v roce 1937. K separaci sérových proteinů použil metodu tzv. pohyblivého rozhraní („moving boundary“), kterou také sám popsal. Dnes ji známe pod pojmem zónová elektroforéza. Za svůj příspěvek k analýze proteinů obdržel roku 1948 Nobelovu cenu [3].

Samotný vývoj elektroforézy započal až v padesátých letech, kdy byla elektroforéza použita pro separaci aminokyselin a také anorganických iontů. V průběhu času byly objeveny také další elektromigrační metody: izoelektrická fokusace a izotachoforéza. Tyto metody jsou založeny na odlišných principech a mohou být pro různé praktické účely kombinovány. Rozdíl mezi metodami můžeme pozorovat podle prostředí, která se v nich kdysi používala. V začátcích elektroforézy byl k separaci používán papír. Škrobový gel byl Smithiesem použit jako médium poprvé roku 1955. O dva roky později použil Kohn pro elektroforézu acetát

celulózy jako nosič. Teprve na začátku devadesátých let dvacátého století byly Jorgensonem a Lukacsovou zavedeny do elektroforézy kapiláry [4].

2.1.3 Princip

Princip elektroforézy spočívá v migraci elektricky nabitých částic ve stejnosměrném elektrickém poli. Vkládáním konstantního stejnosměrného napětí mezi elektrody se vytvoří elektrické pole. V případě zónové elektroforézy je prostředí mezi elektrodami tvořeno základním elektrolytem a tím je zajištěna dostatečná elektrická vodivost v celém systému. Do určitého místa tohoto systému poté vkládáme vzorek. Dochází k migraci, kdy kationty migrují k záporně nabitému pólu, anionty ke kladně nabitému pólu a neutrální částice či molekuly zůstávají nehybné. Vlivem rozdílné pohyblivosti složek vzorku se v průběhu separace vytvářejí oddělené zóny jednotlivých složek [5].

Důležitou veličinou elektromigračních separačních metod je elektroforetická pohyblivost (mobilita), μ_m, která charakterizuje rychlost pohybu určité nabité částice v elektrickém poli o jednotkové intenzitě. Je definována vztahem:

$$\mu_m = v/E \ (m^2V^{-1}s^{-1}) \qquad (1)$$

kde v je rychlost pohybu ($m^2V^{-1}s^{-1}$) v elektrickém poli o intenzitě E ($V\ m^{-1}$).

Intenzita pole v kapiláře (E) je dána podílem napětí U a její délkou L. Můžeme ji také vypočítat jako podíl procházejícího elektrického proudu prostředím o specifické vodivosti:

$$E = U/L = I/\kappa \qquad (2)$$

kde I je elektrický proud a κ specifická vodivost.

Výsledný rovnoměrný pohyb iontů v roztoku je výsledkem působení dvou sil, kdy ion s nábojem q je uváděn do pohybu sílou elektrického pole F_e:

$$F_e = q \cdot E \tag{3}$$

Proti tomuto pohybu působí tzv. frikční síla prostředí F_f charakterizována Stokesovým zákonem:

$$F_f = -6\pi\eta r v \tag{4}$$

kde r je efektivní poloměr iontu (včetně solvatačního obalu), v rychlost pohybu iontu a η viskozita prostředí.

Z rovnosti těchto opačně orientovaných sil ($F_e = -F_f$) lze odvodit:

$$\mu_m = v/E = q/6\pi\eta r \tag{5}$$

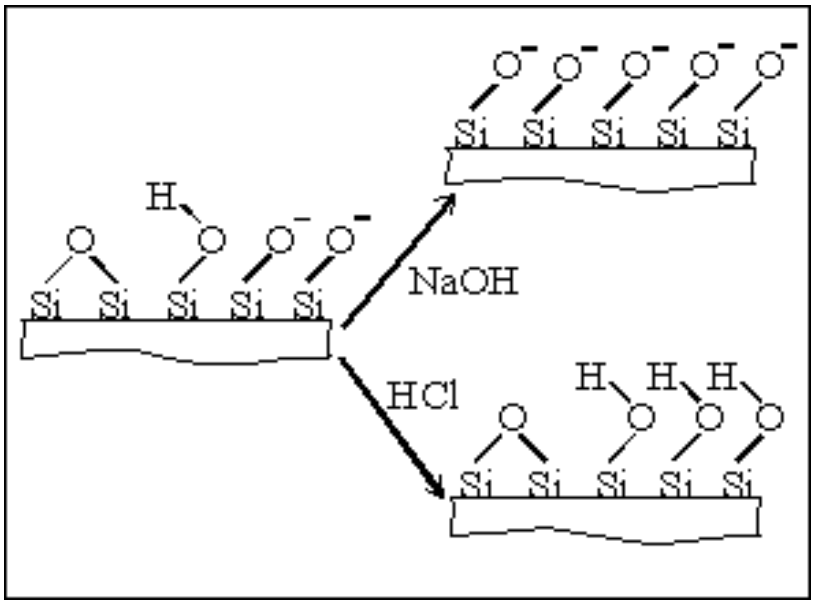
Pohyblivost iontu je přímo úměrná jeho náboji a nepřímo úměrná jeho poloměru a viskozitě roztoku [6].

2.1.4 Elektroosmotický tok (EOF)

Častým jevem, který se v elektromigračních metodách vyskytuje, je elektroosmotický tok neboli elektroosmóza. Roztok pufru se pohybuje kapilárou pod vlivem vloženého elektrického pole mezi elektrody na koncích kapiláry [7]. Tento transportní jev je způsoben tzv. elektrickou dvojvrstvou, která vzniká na rozhraní pevné a kapalné fáze u vnitřní stěny kapiláry.

V případě nejčastěji používaných křemenných kapilár, dochází k disociaci silanolových skupin (viz. Obr.1), které jsou v kontaktu s roztoky o vyšším pH. Tím se vytvoří záporný náboj stěny kapiláry. Přitažením vrstvy kovových iontů základního elektrolytu ke stěně kapiláry vzniká stabilní elektrická dvojvrstva (tzv. Sternova vrstva). Je-li zavedeno napětí, dochází k migraci kationtů, které se nacházejí blíže středu kapiláry (tvoří difúzní vrstvu).

Tyto kationty migrují ke katodě. Silně hydratované kationty H^+ vyvolají společně s asociovanými molekulami vody tok celého roztoku směrem k detektoru umístěného před katodou. Tento tok je tak silný, že spolu s kationty nese ke katodě také anionty. V závislosti na elektroforetické pohyblivosti se nabité částice mohou pohybovat rychleji (kationty) nebo pomaleji (anionty). Neutrální částice se pohybují rychlostí elektroosmotického toku [5,8].



Obr.1: *Disociace silanolových skupin na vnitřní stěně křemenné kapiláry [2]*

Velikost elektroosmotického toku závisí na náboji kapiláry, viskozitě elektrolytu a elektrické permitivitě elektrolytu:

$$\mu_{EOF} = \varepsilon\zeta/\eta \qquad (6)$$

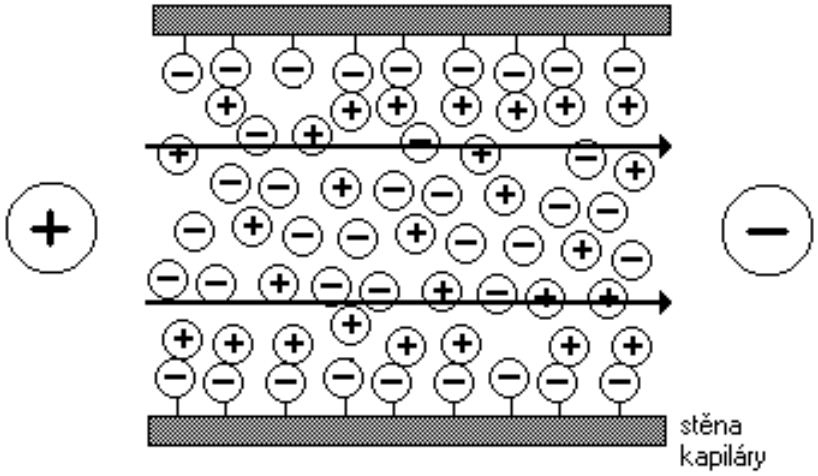
kde ε je permitivita elektrolytu, ζ je zeta potenciál (elektrostatický potenciál vzniklý v důsledku náboje na povrchu kapiláry) a η je viskozita roztoku [9].

Rovnice pro lineární rychlost elektroosmotického toku se určuje z napětí a délky kapiláry. Má tvar:

$$v_{EOF} = \mu_{EOF}E = \mu_{EOF}U/L \qquad (7)$$

Za účasti elektroosmotického toku (viz. Obr.2) mají nabité částice zdánlivou pohyblivost μ_z, která je součtem pohyblivosti elektroosmotického toku a pohyblivosti elektroforetické. Elektroforetická pohyblivost, která má stejný směr jako elektroosmotický tok, má znaménko kladné (kationty). V případě elektroforetické pohyblivosti, která má opačný směr jako elektroosmotický tok, má záporné znaménko (anionty). Platí vztah:

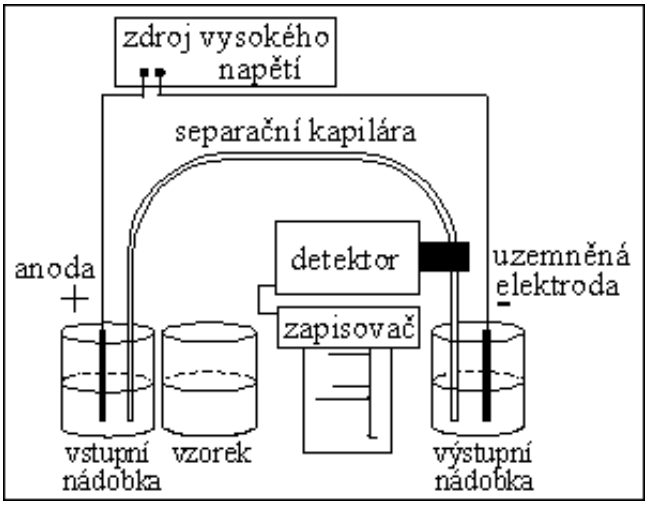
$$\mu_z = \mu_m + \mu_{EOF} \tag{8}$$



Obr.2: *Schéma elektroosmotického toku v křemenné kapiláře [10]*

2.1.5 Instrumentace kapilárních elektromigračních metod

Základní zařízení pro kapilární elektromigrační metody (viz. Obr.3) se skládá: ze zdroje stejnosměrného vysokého napětí, dvou nádobek na tlumivý roztok udržovaných na stejné úrovni, které obsahují anodický a katodický roztok, ze dvou elektrod (katody a anody) ponořených do nádobek s tlumivým roztokem a připojených ke zdroji napětí, z kapiláry (obvykle bývá křemenná), kdy oba konce kapiláry jsou umístěny v nádobkách s tlumivým roztokem, kterým je naplněná i kapilára. Vnitřní průměr této kapiláry bývá menší než 100 μm (obvykle 50 resp. 75 μm) a délka kapiláry bývá 30-80 cm. Dále je potřeba vhodný dávkovací systém, detektor, termostatový systém, který je schopen udržovat konstantní teplotu uvnitř kapiláry a vyhodnocovací zařízení (počítač s vhodným softwarem) [2,11].



Obr.3: *Schéma zařízení kapilárních elektromigračních metod [12]*.

2.1.6 Rozdělení kapilárních elektromigračních metod [1]

Kapilární elektromigrační metody zahrnují celkem sedm základních módů. Tyto módy se od sebe liší především médiem v kapiláře, které je přítomno během separace a také celkovým mechanismem separace. Metody dělíme na:

1. Kapilární zónová elektrofotréza (CZE)
2. Kapilární gelová elektroforéza (CGE)
3. Micelární elektrokinetická kapilární chromatografie (MEKC)
4. Elektrochromatografie v naplněných kapilárách (CEC)
5. Kapilární izoelektrické fokusování (CIEF)
6. Kapilární izotachoforéza (CITP)
7. Bioafinitní kapilární elektroforéza (BACE)

2.1.6.1 Kapilární zónová elektroforéza

Kapilární zónová elektroforéza se ukázala být účinným způsobem pro analýzu mnoha druhů vzorků, včetně vzorků biologického původu s komplexní matricí [13]. Tato metoda patří spolu s plynovou chromatografií (GC) a vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC) k nejpoužívanějším analytickým separačním metodám. Je to především z důvodu své vysoké rychlosti analýzy, účinnosti dosahující až miliónů teoretických pater, malého objemu vzorku potřebného k analýze, malé spotřebě elektrolytů a tím i nízkými náklady spojenými s průběhem analýzy [14]. Jedná se o nejjednodušší elektromigrační techniku, která je použitelná pro separace a stanovení anorganických i organických látek, jejichž molekuly mohou nést kladný nebo záporný náboj. Je vhodná pro separaci a stanovení iontů, které se od sebe liší molekulovou hmotností, tvarem a nábojem.

Experiment probíhá tak, že na počátku je velmi krátký úsek kapiláry (řády mm) naplněn roztokem vzorku. Vstupní konec kapiláry je umístěn do nádobky se vzorkem a po určité době je vytvořen určitý rozdíl hladin mezi roztokem vzorku a roztokem nosného elektrolytu. Po zavedení zóny vzorku do kapiláry, dojde k opětovnému zavedení vstupního konce do elektrodové nádobky a k systému je připojené stejnosměrné elektrické pole. Složky vzorku, se v kapiláře pohybují různými elektroforetickými pohyblivostmi směrem k detektoru a na tomto principu jsou poté od sebe oddělovány [6].

2.1.6.2 Kapilární gelová elektroforéza

Jedná se o techniku, která bývá používána v molekulární biologii pro separaci velkých biomolekul, jako jsou proteiny a nukleové kyseliny. Za účelem oddělení proteinů na základě velikosti, musí být nejprve provedena denaturace, což znamená nasycení dodecylsulfátem sodným. Separace látek se provádí v prostředích vykazujících tzv. sítový efekt [3].

Z důvodu, že elektroforéza ve volné kapiláře často pro drobné rozlišení nedostačuje, se separace provádí v kapilárách naplněných roztokem gelu. Již zmíněný sítový efekt rozděluje molekuly unášené přes gel k detektoru podobně jako v gelové permeační chromatografii [5].

Nejčastěji používaným gelem v kapilární gelové elektroforéze je polyakrylamid. Ten lze připravit uvnitř separační kapiláry radikálovou polymerací akrylamidu a bis-akrylamidu. Abychom předešli problémům s chemickými gely (tj. gel, v němž jsou póry matrice

vytvořeny vzájemným sesíťováním lineárních řetězců polymeru kovalentními vazbami), lze použít gely fyzikální, které vytvářejí póry matrice pouze vzájemným propletením či překrytím lineárních polymerních řetězců v roztoku (tzn. bez vzájemných kovalentních vazeb). Příklady těchto gelů jsou agarosa, methylcelulosa, polyethylenglykol atd. Jejich výhodou je především nízká viskozita [2].

2.1.6.3 Micelární elektrokinetická kapilární chromatografie

Tato metoda kombinuje prvky chromatografie a elektroforézy. Je vhodná především pro analýzu neutrálních molekul hydrofobní i hydrofilní povahy. Do roztoku základního elektrolytu se přidává látka, která má schopnost tvořit micely. Tato látka má povahu tenzidu nebo mýdla, tzn. je povrchově aktivní. Nejčastěji používaný je dodecylsíran sodný (aniontový tenzid). Po přidání látky se molekuly tenzidu začnou shlukovat do kulovitých útvarů-micel. Dojde k vytvoření micelární fáze. Povrch micely je nabitý a putuje v elektrickém poli kapiláry jako kterákoliv jiná nabitá částice.

Neutrální vzorek, který se nadávkuje do kapiláry, nemůže sám putovat v elektrickém poli, ale může dojít k interakci s micelami, které jsou rozprostřeny kolem něj. Každá jednotlivá složka vzorku může interagovat různě. Tím, že je každá složka unášena micelami, získají vlastní pohyb, který umožní jejich separaci [2,15].

2.1.6.4 Elektrochromatografie v naplněných kapilárách

Tato separační metoda slouží k dělení neutrálních molekul a iontů. Kombinuje elektroforetický a chromatografický separační mechanismus. Při analýze se používá křemenná kapilára, která mívá průměr desítky až stovky mikrometrů. Kapilára je naplněna vhodnou stacionární fází a její konce jsou ponořeny do nádobek s fází mobilní. V těchto nádobkách jsou ponořené také elektrody [2].

Princip metody spočívá v tom, že pohyb mobilní fáze je realizován elektroosmotickým tokem, který je vyvolán stejnosměrným elektrickým polem. Tohle pole je připojeno k oběma ponořeným koncům kapiláry. Vkládané stejnosměrné napětí má hodnotu několika desítek kV. Ionty a molekuly analytu jsou unášeny mobilní fází směrem k detektoru a zároveň je brzdí

interakce se stacionární fází. Separace neutrálních analytů probíhá na základě jejich rozdílných retenčních faktorů. Ty udávají míru interakce příslušného analytu se stacionární fází.

Elektrochromatografie v naplněných kapilárách získává uplatnění hlavně z důvodu své vysoké separační účinnosti (možnost použití menších částic sorbentu), jednoduché přípravě monolitických separačních kolon a využití pro nabité i neutrální analyty. Lze ji využít především při analýze léčiv, opticky a biologicky aktivních látek (proteiny, štěpy ribonukleových kyselin) [2,6].

2.1.6.5 Kapilární izoelektrická fokusace

Kapilární izoelektrická fokusace (CIEF), je metoda využívána pro separaci amfolytů. V průběhu separace se zde uplatňuje kromě elektroforetické pohyblivosti iontů i gradient pH prostředí elektrického pole.

Amfolyty jsou látky, které obsahují kladnou i zápornou skupinu. Jejich molekuly mohou existovat ve formě jak kladné, tak záporné nebo neurální. Podobu, v jaké se molekula nachází, může zásadně ovlivnit pH prostředí. Mezi typické amfolyty patří aminokyseliny, peptidy a proteiny.

Amfolyt je v elektricky neutrální formě právě v takovém prostředí, které má určité pH. Tato hodnota pH se rovná izoelektrickému bodu pI daného amfolytu. V případě, že je pH prostředí vyšší než izoelektrický bod, převládá záporná forma amfolytu, v opačném případě převládá forma kladná [5,16].

Základem této metody je kapilára naplněna pufry s pH gradientem, který je během separace stálý. Po zavedení vzorku na konec kapiláry a vložení napětí, začnou amfolyty migrovat k dané elektrodě do té doby, než se pI bude rovnat pH. V této chvíli se složka stane nenabitou a zastaví svou migraci. Vytvoří se úzké zóny vzorku. Aby se zóny dostaly k detektoru, je potřeba do kapiláry aplikovat tlak nebo přidat sůl do jednoho ze zásobníků na nosný elektrolyt. Další možností je přidat do jednoho zásobníku bázi nebo do druhého kyselinu [17,18].

2.1.6.6 Kapilární izotachoforéza

Kapilární izotachoforéza patří mezi nejstarší elektromigrační metody. Pro neutrální molekuly není použitelná, naopak je vhodná k separaci iontů. V kapilární izotachoforéze migrují všechny analyzované látky stejnou rychlostí. Odtud angl. název „isotachophoresis“, kde „iso“ znamená stejné a „tacho“ rychlost.

Metoda separuje analyty s nábojem na základě rozdílných elektroforetických pohyblivostí. K tomu používá separační kapiláry, které negenerují elektroosmotický tok. Jedná se především o PTFE-kapiláry. Tato technika je jedinou používající dva typy elektrolytů. Tyto elektrolyty nazýváme vedoucí (leading) a koncový (terminating) [2,18].

Vzorek se poté dávkuje mezi ně. Jakmile dojde ke spuštění separačního napětí, nastane migrace všech aniontů ze vzorku a také z koncového a vedoucího elektrolytu směrem k anodě (detektoru). Zároveň dojde k separaci aniontů a tvorbě úzkých zón na základě jejich rozdílných elektroforetických pohyblivostí. Je tedy zřejmé, že první zóna vzorku procházející detektorem obsahuje analyty s největší mobilitou a poslední s mobilitou nejnižší [19].

2.1.6.7 Bioafinitní kapilární elektroforéza

K imobilizaci ligandů jsou využívány polyakrylamidové gely, které selektivně zpomalují vybrané složky směsi analyzovaných látek. Bioafinitní elektroforéza je stále častěji prováděna v kapilárním uspořádání a je založena na kombinaci biospecifických interakcí (např. interakce typu enzym-inhibitor, hormon-receptor) s elektroforetickou migrací analyzovaných látek. Jedná se o stále více používanou metodu [6].

2.2 Elektroforetická mobilita

Jak již bylo zmíněno, elektroforetická mobilita je rychlost pohybu částice v elektrickém poli o jednotkové intenzitě. Na začátku separace jsou částice v jednom místě. Poté se v průběhu separace dostávají do popředí nabité částice, které mají větší pohyblivost a opožďují se částice s menší pohyblivostí. Tímto způsobem dochází k jejich oddělení [5].

2.2.1 Měření elektroforetické rychlosti a mobility

Migrační čas, t_m, je doba, kterou potřebuje ion, aby prošel od startu k detektoru. Je dán efektivní délkou kapiláry a rychlostí pohybu. Pozorovanou elektroforetickou rychlost v (cm/s), můžeme stanovit takto:

$$v = l / t_m \tag{9}$$

kde l je efektivní délka kapiláry od vstupu k detektoru.

Rychlost pohybu závisí na elektroforetické pohyblivosti (mobilitě) jednotlivých molekul, na použitém elektrolytu a také na použitém napětí. Je však ovlivněna také velikostí a tvarem částic, hodnotou pH elektrolytu a jeho koncentrací. Elektroforetickou mobilitu můžeme vypočítat z rovnice (1), přičemž:

$$E = U/L \tag{10}$$

Z výše uvedeného dostaneme následující rovnici:

$$\mu_m = l \cdot L/t_m \cdot U \tag{11}$$

kde U je napětí, l je efektivní délka kapiláry, L je celková délka kapiláry, E je intenzita elektrického pole a t_m migrační čas [7,20].

Podobně jako v případě iontů, lze spočítat i rychlost elektroosmotického toku. Platí vztah:

$$v_{EOF} = l/t_{EOF} \tag{12}$$

kde t_{EOF} je migrační čas markeru elektroosmotického toku.

Analogicky lze vypočítat také elektroosmotickou mobilitu z následujícího vztahu:

$$\mu_m = l \cdot L/t_{EOF} \cdot U \tag{13}$$

Jak již bylo popsáno, ion se v elektrickém poli pohybuje díky své vlastní mobilitě a je zároveň unášen elektroosmotickým tokem. Jeho pozorovaná mobilita (zdánlivá) se poté vypočte jako vektorový součet mobilit:

$$\mu_{app} = \mu_m + \mu_{EOF} \tag{14}$$

Pokud chceme vypočítat elektroforetickou mobilitu v prostředí s elektroosmotickým tokem, pak musíme použít následující vzorec:

$$\mu_m = \mu_{app} - \mu_{EOF} \tag{15}$$

Když tedy dosadíme z předchozích vztahů, dostaneme rovnice:

$$\mu_m = l \cdot L/t_m \cdot U - l \cdot L/t_{EOF} \cdot U \tag{16}$$

$$\mu_m = l \cdot L/U \cdot (1/t_m - 1/t_{EOF}) \tag{17}$$

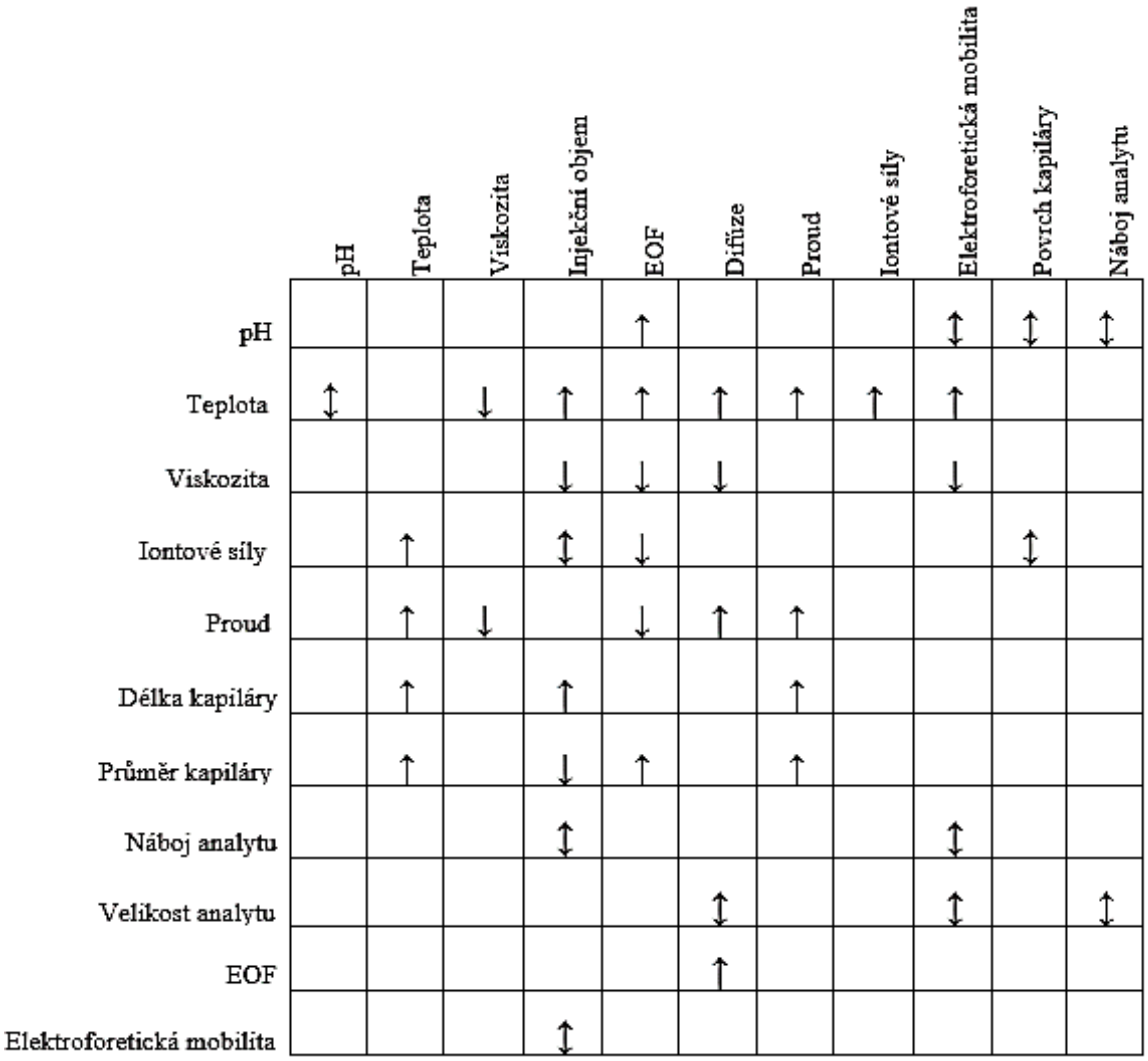
Vztah (17) se používá k určení mobility daného iontu v daném prostředí.

Pro měření elektroosmotického toku se využívají tzv. markery. Jsou to látky, které jsou neutrální (mají náboj roven nule), a proto jsou unášeny k detektoru pouze elektroosmotickým tokem. Nelze je tedy separovat, ale využívá se jich jako tzv. značkovačů k určení rychlosti elektroosmotického toku. Jako marker se obvykle používá aceton, mesityl oxid (MSO), dimethylsulfoxid (DMSO) nebo voda [21,22].

2.2.2 Faktory ovlivňující elektroforetickou mobilitu

Z rovnice (5) je patrné, že vše, co má vliv na náboj nebo velikost rozpuštěné látky a viskozitu pufru ovlivní elektroforetickou mobilitu. Některé parametry ovlivňují jak elektroforetickou pohyblivost, tak elektroosmotický tok. Například, změnou pH pufru se může měnit stupeň ionizace rozpuštěné látky, a tudíž také náboj, a zároveň i elektroosmotický tok. Mimo jiné, vše, co způsobuje změnu viskozity pufru, jako je například změna teploty nebo přidání organického rozpouštědla, bude mít také vliv jak na elektroforetickou mobilitu, tak na elektroosmotický tok [7, 18].

Tabulka 1: *Vztahy mezi parametry v kapilární elektroforéze (šipka nahoru značí nárůst parametru, šipka dolů jeho pokles a šipka nahoru i dolů značí vliv pro oba směry) [23]*



Z Tabulky 1 je patrné, že různé faktory se mohou v kapilární elektroforéze navzájem různě ovlivňovat. Např. se zvyšující se teplotou roste elektroosmotický tok i elektroforetická mobilita. Přesně naopak to platí u viskozity. S rostoucí viskozitou klesá elektroosmotický tok i elektroforetická mobilita [23].

2.2.2.1 Náboj solutu

Při určování náboje ionizovaného solutu je velmi důležitá hodnota pH pufru. Pohyblivost záporně nabitých solutů je tím vyšší, čím vyšší je hodnota pH. Je to z toho důvodu, že existují při vyšším pH v převážně v záporné formě. Jakmile se pH snižuje, většina negativního náboje se neutralizuje a mobilita klesá.

V případě kladně nabitých látek bude s rostoucí mobilitou klesat pH [7, 16].

2.2.2.2 Velikost solutu

Není mnoho způsobů, jak změnit velikost daného solutu. Jednou z možností je změna jeho stupně hydratace a zároveň tedy i změna velikosti. Bylo zjištěno, že přídavek methanolu do pufru zlepšuje separaci jodidu a chloridu, a také azidu s chloristanovými anionty. Kdyby k přídavku methanolu nedošlo, anionty by nebyly odděleny. Např. při srovnání jodidu a chloridu způsobí přídavek methanolu do pufru změnu stupně hydratace. Hydratační enthalpie jsou pro jodid 331 kcal/mol a pro chlorid 348 kcal/mol. Z toho vyplývá, že voda by se měla snadněji odštěpovat z jodidu. Proto přídavek methanolu způsobí zvýšení mobility jodidu v důsledku snížení jeho velikosti [7].

2.2.2.3 Hodnota pH

Všechny analyty chovající se jako slabé kyseliny nebo zásady mají elektroforetickou pohyblivost iontů silně závislou na pH použitého elektrolytu. Největší elektroforetickou mobilitu bude vykazovat daná slabá zásada nebo kyselina v takovém pufru, jehož pH má takovou hodnotu, při níž je látka kyselé povahy plně disociována a látka bazické povahy plně protonizována. To znamená, že jsou látky převedeny na svůj konjugovaný anion, či kation který vykazuje elektroforetickou migraci.

V separačním tlumivém roztoku o takovém pH, ve kterém je slabá kyselina plně protonizovaná anebo zásada plně deprotonizovaná budou mít analyty nulovou elektroforetickou mobilitu. Zásada i kyselina jsou tedy v pufu ve formě svých neutrálních molekul bez náboje [2].

2.3 Běžné pufry využívající se v kapilární elektroforéze

Pufrů využívajících se v elektroforéze je celá řada. Liší se od sebe především použitelností pro prostředí o různých hodnotách pH a také transparentností pro UV/VIS detekci absorbance. Mezi nejčastěji používané pufry patří fosfátový, acetátový, MES, CAPS a v neposlední řadě také borátový pufr.

Vhodným pufrem pro alkalické prostředí je borátový, který lze použít v rozmezí pH 8,1 - 10,1. Další vhodnou volbou by byl CAPS, který je použitelný v rozmezí pH 9,7 - 11,1. Mezi pufry vhodné pro kyselé prostředí patří fosfátový (1,1 - 3,1) nebo acetátový (3,8 - 5,8) pufr [3].

2.3.1 Borátový pufr

Základem měření pomocí kapilární elektroforézy je pracovat s jednoduchými a univerzálními pufry, které pokrývají určité rozmezí pH. Aby se snížil účinek vyčerpání pufru, je dobré volit pufr s takovou hodnotou pH, která je blízká jeho hodnotě pK. To zajistí, že dojde k vytvoření stabilního elektroosmotického toku. V případě, že musím použít bazický pufr, bude první volbou pufr borátový. Vývoj metody spočívá v tom, že nejprve vyzkoušíme tři pufry – fosfátový o pH 2,5, fosfátový o pH 7 a borátový o pH 9. Sledujeme, zdali došlo k zaznamenání píků. Pokud ano, tak dále zjišťujeme, zda je solut unášen elektroosmotickým tokem. Pokud ano, následuje optimalizace. V případě, že nejsou zaznamenány žádné píky, zkontrolujeme koncentraci a poté také rozpustnost [3,8].

2.3.2 Využití a význam kyseliny borité v kapilární elektroforéze

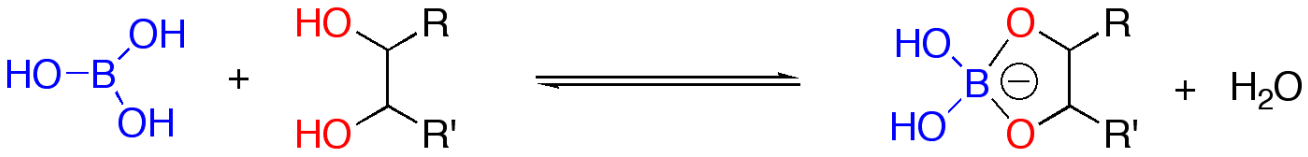
Jedním z důvodů využití kyseliny borité v kapilární elektroforéze je, že tris báze i boritan jsou při požadované hodnotě pH po určitou dobu bez náboje, což snižuje jejich elektroforetickou pohyblivost. Snížená pohyblivost iontů pufru umožní tlumivému roztoku vystupovat ve vysokých koncentracích, což je následně přínosem pro pufrační kapacitu a stabilitu vzorků, aniž by docházelo k příliš vysoké vodivosti [24].

Často využívaná bývá také tzv. methanolická kyselina boritá. Přídavek methanolu vytváří nevodné prostředí což přispívá k lepšímu rozlišení studovaných látek [25].

2.3.3 Reakce borátu se sacharidy

První náznaky interakce boru a polylolů zaznamenal Biot ve své studii týkající se optické rotace. V roce 1832 bylo pozorováno, že optická rotace kyseliny vinné se mění v přítomnosti kyseliny borité. O století později byla interakce kyselin boru s monosacharidy studována podrobněji. Roku 1913 Böeseken uvedl, že přítomnost glukózy zvyšuje kyselost roztoků kyseliny borité. Téměř o dalších padesát let později byly zkoumány interakce kyseliny borité a fenylborité s jednoduchými dioly (ethylenglykol) a monosacharidy (glukóza, fruktóza).

Produkt kyseliny a diolu se nazývá boronátový ester a je analogický s karboxylovými estery. Tyto interakce jsou výhodné v základních rozmezích pH, kde je ester ve formě tetraedru (Obr.4). Ve vodných roztocích může být výměna kyselin boru a ligandů složitá a různorodá v závislosti na pH [7,26].



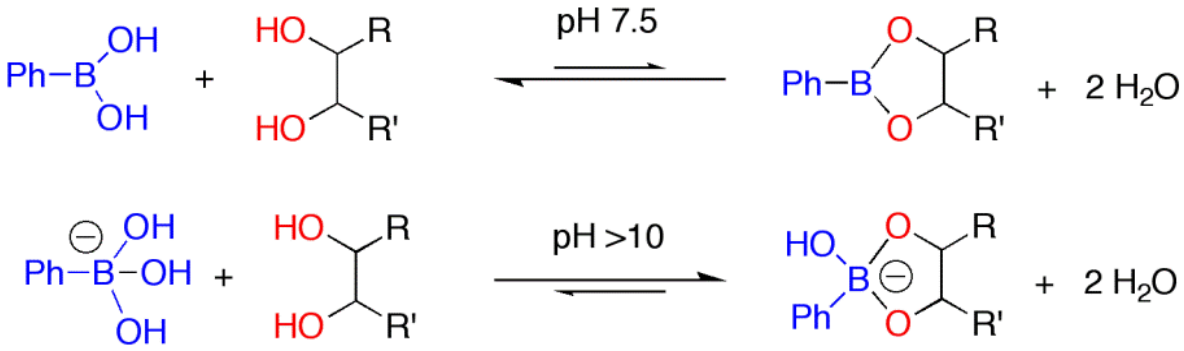
Obr.4: *Interakce kyseliny borité a vicinálního diolu sacharidu [26]*

2.3.3.1 Základy výměny bor-diol

Obecně existují dvě skupiny organoboronů kyseliny borité, které mohou při ztrátě vody tvořit s dioly estery. Jedná se o boronovou kyselinu, kde je jedna hydroxylová skupina kyseliny borité nahrazena uhlíkem a borinovou kyselinu, kde se dvě hydroxidové skupiny nahradí substituenty na bázi uhlíku.

Borité a boronové kyseliny mohou tvořit buď neutrální nebo aniontové estery v závislosti na hodnotě pH. Vazba s dioly kyselin boru je upřednostňována v zásaditém prostředí, přičemž esterifikace bóru hydroxokarboxylových kyselin je výhodnější v prostředí kyselém. Borinové kyseliny mohou tvořit pouze aniontové estery při dehydratační kondenzaci s diolem nebo dvojmocným ligandem. Kyseliny borité se mohou také vyskytovat ve formě aniontu, tetraedrického diesteru s dioly a příbuznými dvojmocných ligandy. Boronáty mohou

tvořit neutrální estery v nepolárních rozpouštědlech, ve vodě mají tendenci tvořit aniontové boronátové estery (Obr.5). Tvorba boronátového esteru není upřednostňována v blízkosti fyziologické hodnoty pH. Ester se za silně kyselých podmínek štěpí [26].



Obr. 5: *Výměna diolu s fenylboronovou kyselinou při různé hodnotě pH [26]*

Výzkum interakce boru a glukózy se stále vyvíjí. V současné době je mnoho úsilí věnováno pro rozvoj receptorů na bázi boru u složitějších oligosacharidů. Tyto receptory by mohly najít významné uplatnění při diagnostice rakoviny nebo infekčních onemocnění, cílenou dopravu léčiv na postižené místo nebo v případě porozumění biochemických úloh na povrchů sacharidů. Schopnost kyseliny borité rozlišit navzájem podobné polyloly ať už stereoselektivně nebo chemoselektivně z ní dělá jasnou volbu pro upevnění receptorů syntetického uhlovodíku [27,28].

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál

3.1.1 Chemikálie

Jako základní (nosný) elektrolyt byl použit borát sodný, fosfát sodný, MES, CHES, CAPSO, AMP, MOPS, uhličitan sodný a pro testování reakcí s aditivy methanol a glukóza. Všechny chemikálie byly zakoupeny od firmy Sigma – Aldrich (St. Louis, USA) v čistotě p.a. Použitá voda byla deionizovaná (dosaženo přístrojem Direct-Q 3 od firmy Millipore (Billerica, MA, USA)).

3.1.2 Příprava elektrolytů

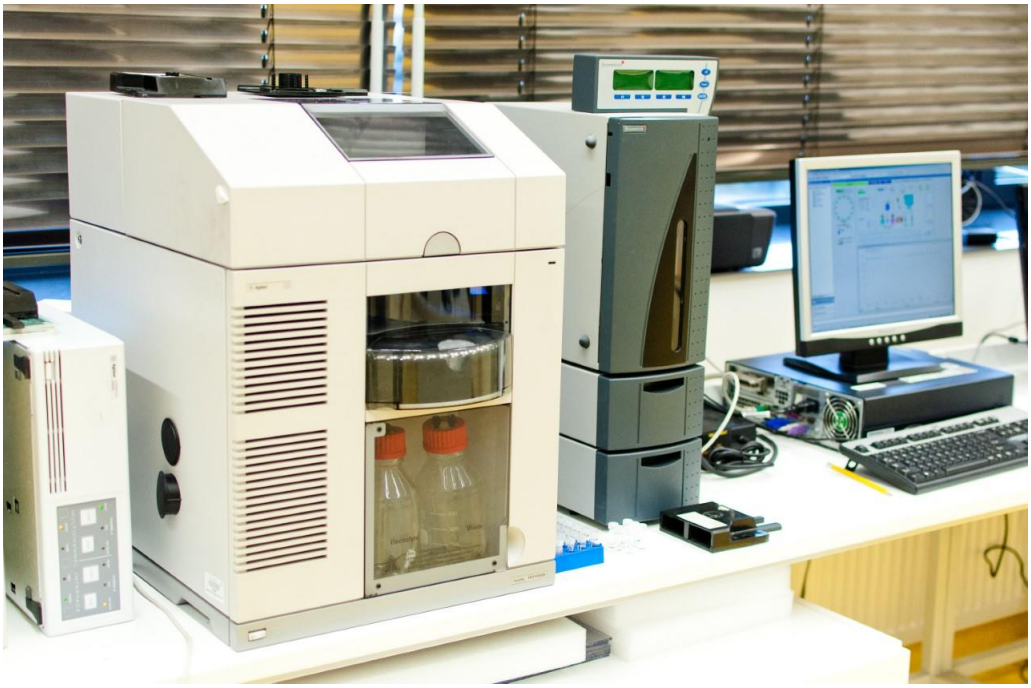
Jednotlivé pufry byly připraveny rozpuštěním odpovídajícího, vypočítaného množství látky v deionizované vodě. Za stálého míchání byly jednotlivé roztoky titrovány hydroxidem sodným o koncentraci 50 % a 10 % (w/w) nebo pevným histidinem až na požadovanou hodnotu pH, přičemž hodnota pH byla průběžně sledována pomocí pH-metru. Všechny připravené elektrolyty byly uchovávány v lednici při teplotě 4 °C.

3.2 Instrumentace a experimentální podmínky

Všechna měření byla prováděna na přístroji pro kapilární elektroforézu HP^{3D}CE s bezkontaktním vodivostním detektorem (Agilent Technologies, Waldbronn, Německo) (Obr.6). Signál (0-1 V) z vodivostního detektoru byl zpracován dvoukanálovým A / D převodníkem Agilent 35900E (Agilent Technologies). Byla použita PTFE-kapilára s vnitřním průměrem 50μm. (MicroSolv Technology, Eatontown, NJ, USA), jejíž celková délka byla 33,5 cm. Efektivní délka kapiláry UV detektoru byla 25 cm a k CCD detektoru 18,5 cm. Kazeta s kapilárou byla pomocí termostatu temperována na 25 °C. Aplikované separační napětí bylo 10 kV. Vzorky byly dávkovány po dobu 10 s a při tlaku 50 mbar.

Kapilára byla promývána každý den na začátku měření po dobu 10 minut roztokem 0,1 M NaOH. Následně byla promývána deonizovanou vodou po dobu 10 minut a pufrem

po dobu dalších 10 minut. Veškeré proplachování kapiláry bylo prováděno tlakem 940 mbar. Všechny analýzy byly opakovány 3x.



Obr.6: *Fotografie přístroje HP^{3D}CE Agilent Technologies*

3.3 Laboratorní pomůcky

Mezi další použité pomůcky patřily analytické váhy, kádinky, odměrné baňky se zátkami, automatické pipety se špičkami, magnetické míchadlo, pH-metr, nálevky, tyčinky, navažovací lodičky, špachtle, lžičky, vialky s víčky a mikrozkumavky typu eppendorf.

4. VÝSLEDKY A DISKUZE

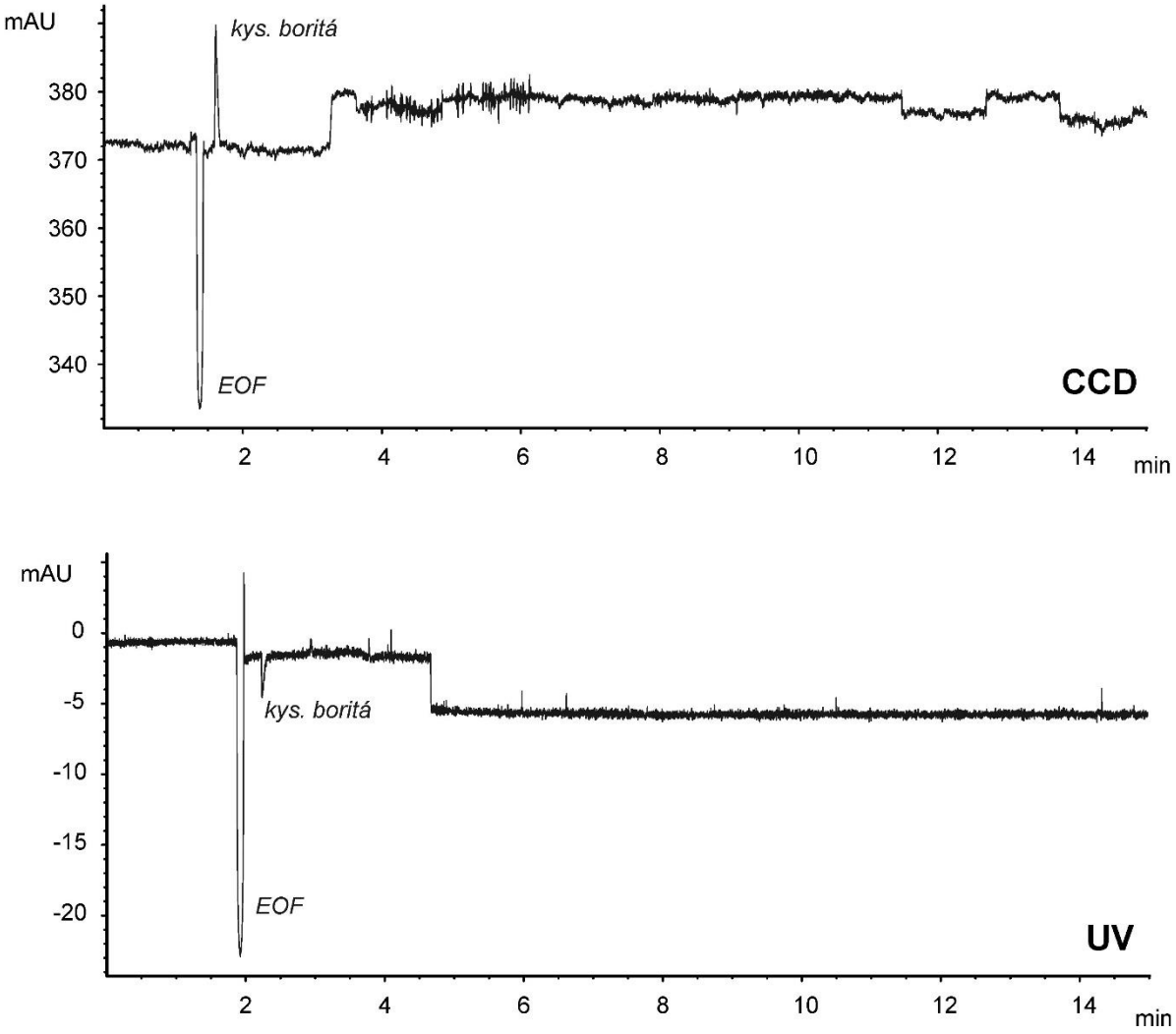
4.1 Cíl práce

Cílem této práce bylo změřit hodnoty mobilit kyseliny borité v různých prostředích užívaných v kapilární elektroforéze.

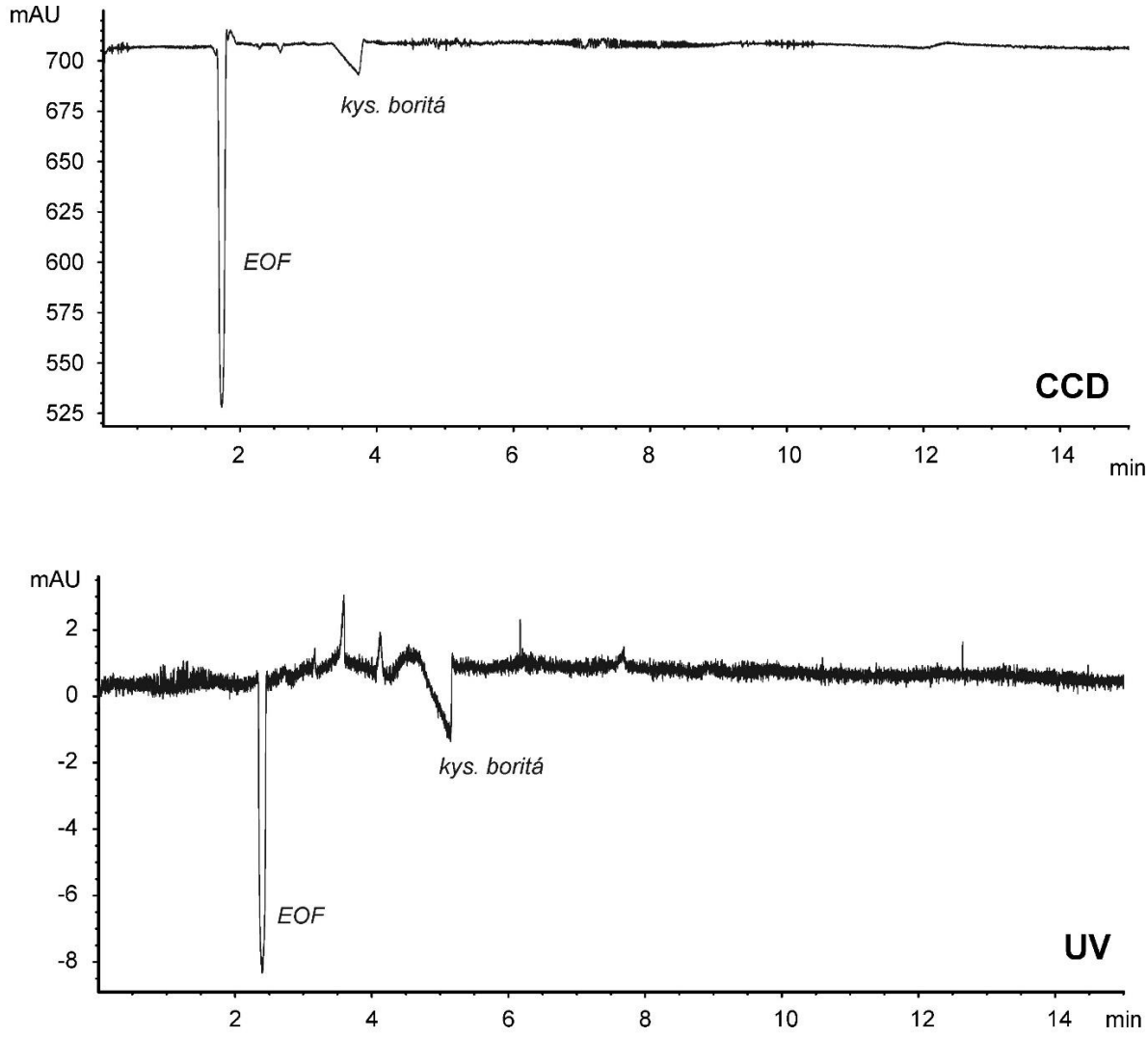
4.2 Volba kyseliny borité

Kyselina boritá byla zvolena z důvodu jejího častého užití jakožto bazického elektrolytu v kapilární elektroforéze. Mezi její přednosti patří generace rychlého elektroosmotického toku a tím zkrácení doby analýzy, neabsorbuje ve viditelné a ultrafialové oblasti spektra tudíž umožňuje citlivou UV detekci analytů. Navíc se používá pro separaci mnoha látek i v případě pufrů s organickými aditivy, případně pro chirální separace. Určení její mobility může sloužit k objasnění některých separačních mechanismů, případně může být využito pro matematické simulace separačních dějů v konkrétních prostředích.

Mobilita kyseliny borité byla měřena pomocí bezkontaktní vodivostní detekce, kdy je ze záznamu patrný pík kyseliny borité i pík markeru elektroosmotického toku (vody), viz obrázky níže (Obr.7 a 8). Na těchto obrázcích je vidět i záznam v UV detektoru, který byl použit pro pilotní verifikaci migračních dat, nicméně nebyl dále používán pro vyhodnocování mobilit. Z takto získaných dat byly vypočteny hodnoty efektivních mobilit kyseliny borité. Nejprve byla proměřena mobilita kyseliny borité v závislosti na pH, pak byla studována mobilita kyseliny borité v různých prostředích (s přídavky různých aditiv).



Obr.7: *Ukázka měření mobility kyseliny borité s použitím bezkontaktního vodivostního detektoru (CCD) a UV detektoru při použití uhličitanu sodného, pH 10,0, jako pufru*



Obr.8: *Ukázka měření mobility kyseliny borité s použitím bezkontaktního vodivostního detektoru (CCD) a UV detektoru při použití pufru CHES, pH 9,0*

4.3 Měření mobility v závislosti na pH

Při měření hodnoty mobilit kyseliny borité jsem zkoušela proměřovat elektrolyty s různými hodnotami pH. Jak je známo, hodnoty disociačních konstant kyseliny borité jsou pKa_1 9,14, pKa_2 12,74 a pKa_3 13,8 [29]. Pro ověření disociační konstanty jsem měřila mobilitu v rozmezí pH 6,0 – 10,5. V rozmezí pH 6,0 – 8,5 jsem nezaznamenala žádnou odezvu, resp. na záznamech nebyl patrný žádný pík, který by bylo možné identifikovat jako kyselinu boritou. Pravděpodobně migrovala s elektroosmotickým tokem, tj. její signál byl

maskován signálem vody jakožto markeru EOF. Až při pH vyšším než 8,5 se kyselina boritá na záznamech objevila. V tabulce 2 jsou shrnuty použité elektrolyty s výsledky měření mobilit borátu.

Tabulka 2: *Použité elektrolyty a výsledky měření efektivní mobility kyseliny borité*

Elektrolyt	**Efektivní mobilita kyseliny borité (10^{-9} $m^2V^{-1}s^{-1}$)**
MES pH 6,0	Neměřitelná
Fosfát/NaOH pH 7,5	Neměřitelná
MOPS pH 8,0	Neměřitelná
CHES pH 9,0	-9,5 ± 0,5
CHES pH 9,5	-17,3 ± 0,6
CHES pH 10,0	-29,7 ± 1,2
CHES pH 10,5	-32,4 ± 1,8

*všechny pufry byly připraveny o stejné iontové síle 50 mM, výsledky jsou uvedeny jako aritmetický průměr hodnot z pěti měření s odpovídající směrodatnou odchylkou

Z tabulky 2 je zřejmé, že kyselina boritá začíná mít vlastní mobilitu (začíná disociovat) od pH 9,0, což je v souladu s uvedenou hodnotou pKa1 9,14 [29].

Jelikož je použitý „biologický pufr“ CHES známý svojí možností interagovat s jinými molekulami, byla dále měřena mobilita kyseliny borité v různých pufrech o stejném zásaditém pH (10,0). Jako modelové pufry byly vybrány CAPSO, AMP a uhličitanový pufr. Tabulka 3 ukazuje výsledky.

Tabulka 3: *Použité elektrolyty (se zásaditým pH) a naměřené hodnoty efektivní mobility kyseliny borité*

Elektrolyt	**Efektivní mobilita kyseliny borité (10^{-9} $m^2V^{-1}s^{-1}$)**
CHES pH 10,0	-29,7 ± 1,2
CAPSO pH 10,0	-30,3 ± 1,0
AMP pH 10,0	-29,8 ± 1,6
Uhličitan sodný pH 10,0	-30,7 ± 0,6
Uhličitan sodný pH 9,0	-10,5 ± 0,4

*všechny pufry byly připraveny o stejné iontové síle 50 mM, výsledky jsou uvedeny jako aritmetický průměr hodnot z pěti měření s odpovídající směrodatnou odchylkou

Je patrné (Tab.3), že hodnoty efektivní mobility kyseliny borité jsou shodné ve všech studovaných prostředích (liší se jen statistickou chybou). Nicméně směrodatná odchylka (přesnost měření) byla nejnižší za použití uhličitanového pufru, proto byl tento vybrán pro další měření.

4.4 Přídavky aditiv

Jak již bylo naznačeno, dalším úkolem bylo studovat mobilitu kyseliny borité v prostředích s přídavkem různých aditiv. Nejprve byl testován přídavek jedněch z nejčastěji užívaných aminů jakožto složek základních elektrolytů, tj. Tris a TEA. Pak byl testován přídavek Ba^{2+} iontů, které se v kapilární elektroforéze užívají např. na modifikaci vnitřní stěny kapiláry. V těchto případech se zároveň jedná o kationty, které by teoreticky mohly interagovat s aniontem kyseliny borité. Dalším ze studovaných aditiv byl přídavek SDS, který se často používá ve spojení s borátovými pufry v micelární elektrokinetické chromatografii. Výsledky měření jsou uvedeny v tabulce 4.

Tabulka 4: *Použitá aditiva a naměřené hodnoty efektivní mobility kyseliny borité*

Aditivum (pufr uhličitan sodný pH 10,0)	**Efektivní mobilita kyseliny borité (10^{-9} $m^2V^{-1}s^{-1}$)**
Bez aditiva	-30,7 ± 0,6
TEA 0,005 %	-25,0 ± 2,8
Tris, 5 mg/ml	-26,5 ± 0,9
Tris, 20 mg/ml	-22,3 ± 0,6
Ba^{2+}, 10^{-3} mol/l	-25,4 ± 1,0
Ba^{2+}, 10^{-4} mol/l	-24,4 ± 1,0
SDS, 5 mM	-28,7 ± 0,9
SDS, 50 mM	-27,9 ± 0,8

*uhličitanový pufr byl připraven o iontové síle 50 mM, výsledky jsou uvedeny jako aritmetický průměr hodnot z pěti měření s odpovídající směrodatnou odchylkou

Z uvedených dat (Tab.4) je vidět, že přídavek aminů i Ba^{2+} iontů výrazně zpomalil rychlost vlastní migrace kyseliny borité. Aminy by mohly ovlivnit výsledné pH roztoku, nicméně v tomto případě je jejich vliv zanedbatelný (změřené pH se přídavkem nezměnilo). Z tohoto důvodu je možné předpokládat interakci kyseliny borité a vybraných aminů, resp. Ba^{2+} iontů. Přídavek SDS vedl rovněž k malému snížení mobility kyseliny borité, nicméně ne tak zásadnímu jako v předchozích dvou případech.

Dále byl studován přídavek vybraných chirálních selektorů, protože tyto jsou často používány v kapilární elektroforéze v kombinaci s borátovými pufry. Byl studován přídavek hydroxypropyl-β-cyklodextrinu, sulfatovaného β-cyklodextrinu a isopropyl-6-cyklofruktanu (IP-CF6). Všechna tyto aditiva byla vybrána na základě jejich předchozího použití v laboratoři elektromigračních technik na katedře analytické chemie. V případě cyklodextrinů se podařilo změřit pouze jeden přídavek a to koncentraci 5 mg/ml, ostatní studované koncentrace poskytnuly neopakovatelné záznamy, ze kterých nebyla patrna migrace kyseliny

borité. Naopak přídavky IP-CF6 poskytnuli data pro koncentrační rozsah od 1 mg/ml po 10 mg/ml. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 5.

Tabulka 5: *Použití chirálních selektorů a naměřené hodnoty efektivní mobility kyseliny borité*

Aditivum (pufr uhličitan sodný pH 10,0)	**Efektivní mobilita kyseliny borité (10^{-9} $m^2V^{-1}s^{-1}$)**
Bez aditiva	-30,7 ± 0,6
HP-β-CD, 5 mg/ml	-31,7 ± 1,0
S-β-CD, 5 mg/ml	-29,9 ± 0,7
IP-CF6, 1 mg/ml	-30,7 ± 0,8
IP-CF6, 2,5 mg/ml	-30,5 ± 0,6
IP-CF6, 5 mg/ml	-30,0 ± 0,7
IP-CF6, 10 mg/ml	-28,6 ± 0,9

*uhličitanový pufr byl připraven o iontové síle 50 mM, výsledky jsou uvedeny jako aritmetický průměr hodnot z pěti měření s odpovídající směrodatnou odchylkou

Data uvedená v Tab.5 ukazují na to, že v případě použití zmíněných cyklodextrinů i cyklofruktanu nedochází k interakci těchto selektorů a kyseliny borité. Změřené mobility jsou shodné (v rámci experimentální chyby).

Kyselina boritá kromě toho, že se hodně využívá jako bazický elektrolyt, je známá i svojí schopností komplexovat s vicinálními dioly, jak již bylo popsáno v teoretické části této práce. Protože toto představuje zajímavé možnosti nejen pro kapilární elektroforézu, byla studována mobilita kyseliny borité v prostředí glukózy a butan-1,2-diolu. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 6.

Tabulka 6: *Použitá aditiva („dioly“) a naměřené hodnoty efektivní mobility kyseliny borité.*

Aditivum (pufr uhličitan sodný pH 10,0)	**Efektivní mobilita kyseliny borité (10^{-9} $m^2V^{-1}s^{-1}$)**
Bez aditiva	-30,7 ± 0,6
Glukóza, 10^{-6} mol/l	-31,2 ± 0,5
Glukóza, 10^{-5} mol/l	-31,7 ± 0,7
Glukóza, 10^{-4} mol/l	-30,1 ± 0,7
Glukóza, 10^{-3} mol/l	-27,8 ± 0,5
Butan-1,2-diol, 0,0005 %	-30,5 ± 1,3
Butan-1,2-diol, 0,005 %	-30,7 ± 1,2
Butan-1,2-diol, 0,05 %	-31,4 ± 1,2

*uhličitanový pufr byl připraven o iontové síle 50 mM, výsledky jsou uvedeny jako aritmetický průměr hodnot z pěti měření s odpovídající směrodatnou odchylkou

Z tabulky 6 je patrné, že pouze přídavek glukózy o koncentraci 10^{-3} mol/l podstatně ovlivnil mobilitu kyseliny borité. Nižší koncentrace glukózy ani přídavek butan-1,2-diolu se na mobilitě kyseliny borité neprojevily.

Jako poslední byl studován přídavek organického rozpouštědla. Nejprve byl studován přídavek acetonitrilu, methanolu a ethanolu, vše o koncentraci 10 % (v/v). Výsledky jsou uvedeny v tabulce 7.

Tabulka 7: *Přídavek aditiva (organické rozpouštědlo) a naměřené hodnoty efektivní mobility kyseliny borité*

Aditivum (pufr uhličitan sodný pH 10,0)	**Efektivní mobilita kyseliny borité (10^{-9} $m^2V^{-1}s^{-1}$)**
ACN, 10 %	-28,3 ± 0,8
MeOH, 10 %	-26,5 ± 0,9
EtOH, 10 %	-24,3 ± 0,9

*uhličitanový pufr byl připraven o iontové síle 50 mM, výsledky jsou uvedeny jako aritmetický průměr hodnot z pěti měření s odpovídající směrodatnou odchylkou

Získané hodnoty (Tab. 7) jsou významně odlišné (zvláště pro oba testované alkoholy) od hodnoty mobility kyseliny borité bez přídavku aditiva. Díky tomu byly měřeny mobility kyseliny borité pro další koncentrace methanolu i ethanolu, viz tabulka 8 a 9.

Tabulka 8: *Přídavek aditiva (methanol o různých koncentracích) a naměřené hodnoty efektivní mobility kyseliny borité*

Aditivum (pufr uhličitan sodný pH 10,0)	**Efektivní mobilita kyseliny borité (10^{-9} $m^2V^{-1}s^{-1}$)**
MeOH, 5 %	-29,5 ± 1,2
MeOH, 10 %	-26,5 ± 0,9
MeOH, 15 %	-23,4 ± 0,8
MeOH, 20 %	-20,2 ± 1,3

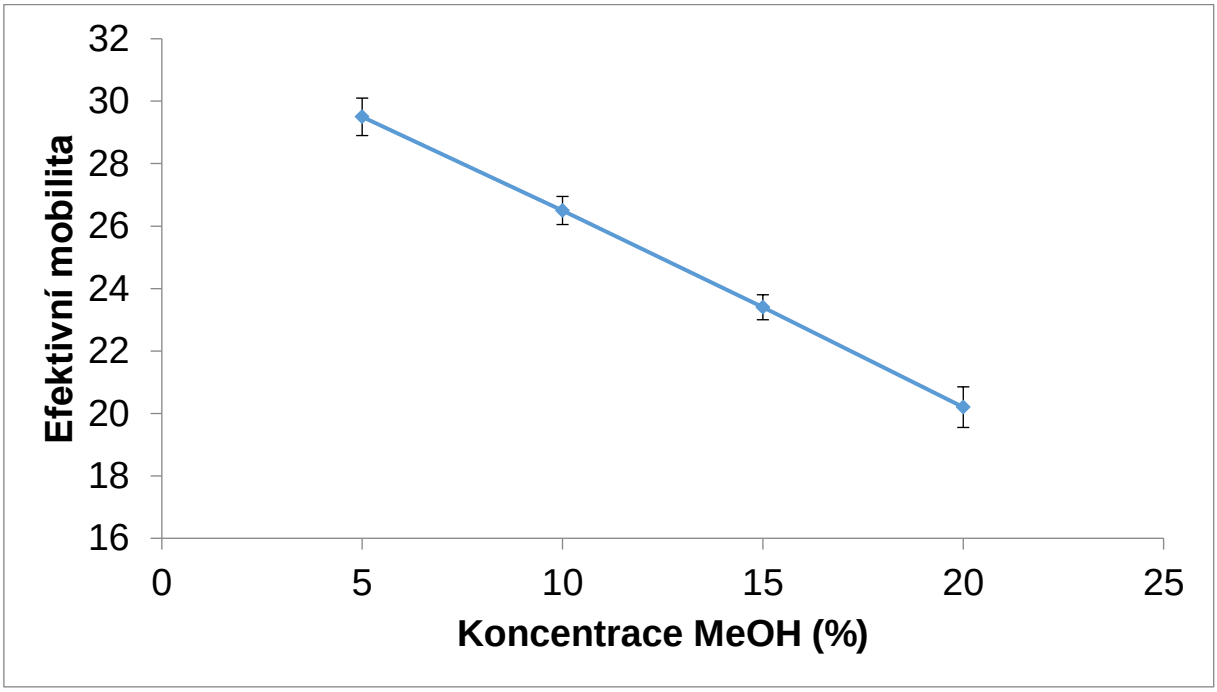
*uhličitanový pufr byl připraven o iontové síle 50 mM, výsledky jsou uvedeny jako aritmetický průměr hodnot z pěti měření s odpovídající směrodatnou odchylkou

Tabulka 9: *Přídavek aditiva (ethanol o různých koncentracích) a naměřené hodnoty efektivní mobility kyseliny borité*

Aditivum (pufr uhličitan sodný pH 10,0)	**Efektivní mobilita kyseliny borité (10^{-9} $m^2V^{-1}s^{-1}$)**
EtOH, 5 %	-26,7 ± 0,5
EtOH, 10 %	-24,3 ± 0,9
EtOH, 15 %	-21,1 ± 0,9
EtOH, 20 %	-18,5 ± 0,7

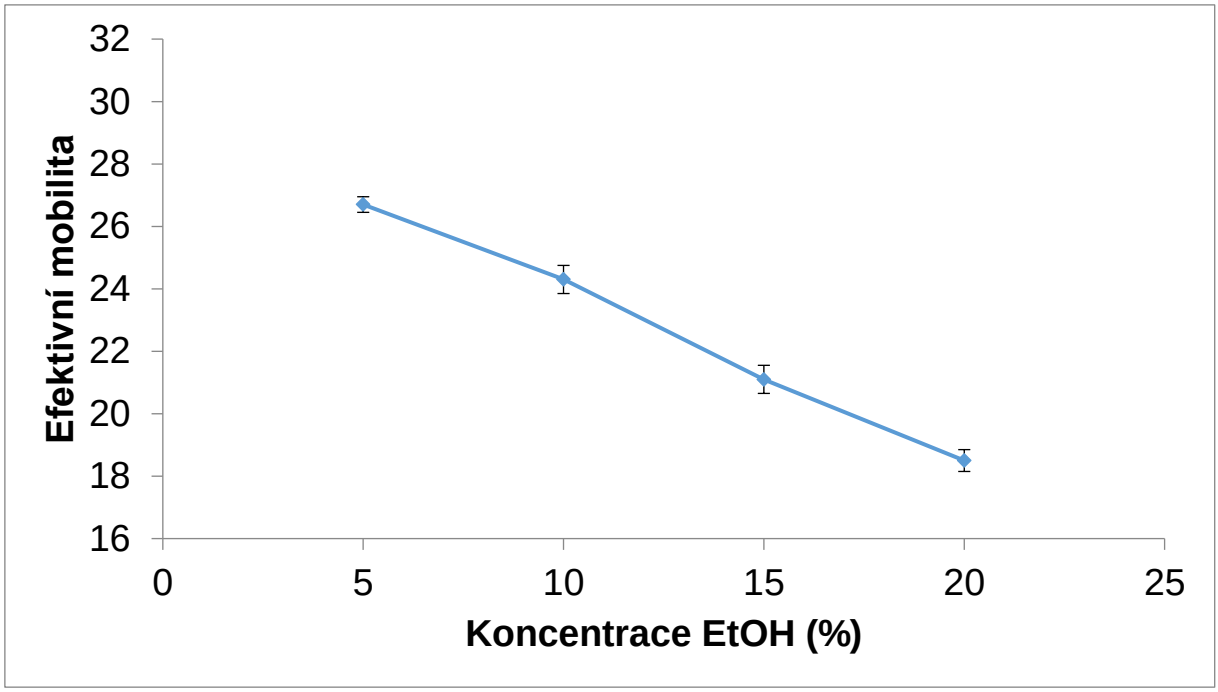
*uhličitanový pufr byl připraven o iontové síle 50 mM, výsledky jsou uvedeny jako aritmetický průměr hodnot z pěti měření s odpovídající směrodatnou odchylkou

Data z tabulky 8 a 9 jsou ještě zobrazeny pro ilustraci graficky na následujících obrázcích 9 a 10.



Obr.9: *Závislost efektivní mobility kyseliny borité na koncentraci methanolu.*

Efektivní mobilita je uvedena v -1.10^{-9} $m^2V^{-1}s^{-1}$



Obr.10: *Závislost efektivní mobility kyseliny borité na koncentraci ethanolu.*

Efektivní mobilita je uvedena v $-1.10^{-9}\ m^2V^{-1}s^{-1}$

Z obrázků 9 a 10 je vidět, že efektivní mobilita kyseliny borité klesá s rostoucí koncentrací methanolu i ethanolu. V případě přídavku vyšších koncentrací se nepodařilo získat opakovatelná data k vyhodnocení.

5. ZÁVĚR

V rámci této práce jsem změřila hodnoty mobilit kyseliny borité pomocí kapilární elektroforézy s bezkontaktním vodivostním detektorem. Nejprve jsem studovala mobility kyseliny borité v závislosti na pH, dále jsem optimalizovala složení základního elektrolytu pro další měření s výsledným uhličitanovým pufrem o pH 10,0. Poté jsem studovala přídavky aditiv, nejprve vybraných aminů, Ba^{2+} a SDS, pak vybraných chirálních selektorů, např. isopropyl-6-cyklofruktanu, dále glukózy, butan-1,2-diolu a v poslední řadě také organických rozpouštědel jako methanolu a ethanolu. Naměřené výsledky mohou mít využití k dalšímu rozvoji a chápání chování kyseliny borité v různých prostředích v kapilární elektroforéze.

6. LITERATURA

[1] Šebestová A.: *Analýza a vyžití magnetických nanočástic v kapilární elektroforéze.* Bakalářská práce, Univerzita Palackého v Olomouci 2013.

[2] Štulík K. a kolektiv: *Analytické separační metody*, Karolinum, Praha 2004.

[3] Heiger D.: *High Performance Capillary Electrophoresis-A Primer*, Agilent Technologies, Germany 2000.

[4] http://faf.vfu.cz/pub-files/ustavy/ustav-chemickych-leciv/vyuka-predmetu/analyticka-chemie-i-ii/separacni-metody---elektroforeza.pdf - staženo 8.3.2017.

[5] Klouda P.: *Moderní analytické metody*, Ostrava 2003.

[6] Kašička V.: *Teoretické základy a separační principy kapilárních elektromigračních metod*, Chem. Listy **91**, 320 (1997).

[7] Baker D. R.*: Capillary electrophoresis*, Techniques in Analytical Chemistry, 1995.

[8] Hayes M. A., Kheterpal I., Ewing A.G.: *Electroosmotic Flow Control and Surface Conductance in Capillary Zone Electrophoresis*, Anal. Chem., **65,** 1993.

[9] Pazourek J.: *Moderní elektroforetické analytické metody*, Karolinum, Praha 2003.

[10] http://biochemie.sweb.cz/x/metody/elektroforeza.htm - staženo 14. 5. 2016.

[11] Piskač P., Chalupová M., Prokopcová Š., Český lékopis, 1997, http://www.lekopis.cz/Kap_2_2_47.htm - staženo 19.5.2016.

[12] http://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/cze.html - staženo 20.5.2016.

[13] Křivánková L., Březková M., Gebauer P., Boček P.: *Importance of the counterion in optimization of a borate electrolyte system for analyses of anions in samples with complex matrices performed by capillary zone electrophoresis,* Electrophoresis, **25**, 3406-3415 (2004).

[14] Tůma P., Opekar F., Jelínek I.: *Vodivostní vláknový detektor pro kapilární elektroforézu*, Chem. Listy **93**, 150 (1999).

[15] Gaš B.: *Kapilární elektroforéza, Separační analytická metoda pro věk mikročipů,* Vesmír **80**, 371 (2001).

[16] Landers J. P.: *Handbook of capillary and microchip electrophoresis and associated Microtechniques*, CRC Press, 2008.

[17] Churáček J. a kolektiv: *Analytická separace látek,* SNTL Praha 1990.

[18] Scoog D. A., Holler F. J., Crouch S. R.: *Principles of Instrumental Analysis,* Sixth Edition, USA 2007.

[19] Everaerts F. M., Beckers J. L., Verheggen T. P. E. M.: *Isotachophoresis: Theory, Instrumentation and applications,* Elsevier Scientific Publishing Company, The Netherlands 1976.

[20] Králová B., Fukal L., Rauch P., Ruml T.: *Bioanalytické metody*, VŠCHT, Praha 2008.

[21] Dolník V.: *Úvod do kapilární elektroforézy,* Brno 1994.

[22] Roblová V.: *Studium interakce chelerythrinu s oligonukleotidy metodou kapilární zónové elektroforézy.* Bakalářská práce, Masarykova univerzita, 2009.

[23] Buszewski B.,Dziubakiewicz E., Szumski M.: *Electromigration techniques: Theory and practice*, Springer Science & Business Media, 2013.

[24] https://www.nationaldiagnostics.com/electrophoresis/article/electrophoresis-buffers-choosing-right-buffer - staženo 4.4.2017.

[25] Maier V., Ranc V., Švidrnoch M., Petr J., Ševčík J., Tesařová E., Armstrong W. D.: *Study on the use of boromycin as a chiral selector in capillary electrophoresis*, Journal of Chromatography A 2012, **1237** ,128–132.

[26] Pappin B., Kiefel M. J., Houston T. A.: *Boron-carbohydrate interaction*,"Carbohydrates - Comprehensive Studies on Glycobiology and Glycotechnology", InTechOpen, 2012.

[27] Houston T. A.: *Developing High-Affinity Boron-Based Receptors for Cell-Surface Carbohydrates*., ChemBiochem. 11: 945-958.

[28] Kamencev M., Yakimova N., Moskvin L., Kuchumova I., Tkach K., Malinina Y.: *Fast isotopic separation of ^{10}B and ^{11}B boric acid by capillary zone electrophoresis*, Electrophoresis 2016, **37**, 3017–3019.

[29] Databáze programu Peakmaster, http://echmet.natur.cuni.cz/.

7. SEZNAM ZKRATEK

AMP	adenosinmonofosfát
BACE	bioafinitní kapilární elektroforéza
CAPS	3-(cyklohexylamino)-propansulfonová kyselina
CCD	vodivostní detektor
CEC	elektrochromatografie v naplněných kapilárách
CGE	kapilární gelová elektroforéza
CIEF	kapilární izoelektrické fokusování
CITP	kapilární izotachoforéza
CZE	kapilární zónová elektroforéza
DMSO	dimethyl sulfoxid
EOF	elektroosmotický tok
GC	plynová chromatografie
HPCE	vysokoúčinná kapilární elektroforéza
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HP-β-CD	hydroxypropyl-β-cyklodextrin
CHES	2-[N-cyklohexylamino]ethansulfonová kyselina
IP-CF6	isopropyl-6-cyklofruktan
MEKC	micelární elektrokinetická kapilární chromatografie
MES	2-(N-morfolino)ethansulfonová kyselina
MOPS	3-(N-morfolino)propansulfonová kyselina
MSO	mesityl oxid
PTFE	polytetrafluorethylen
SDS	dodecylsulfát sodný
S-β-CD	sulfátovaný β-cyklodextrin
TEA	triethanolamin
UV	ultrafialový
VIS	viditelný