

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie

Nepřímá UV detekce pro analýzu organických molekul

kapilární elektroforézou

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:

Bc. Matěj Horný

Studijní obor:

Chemie

Vedoucí práce:

doc. RNDr. Jan Petr, PhD.

Olomouc 2023

Prohlášení

Prohlášení:

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

Souhlasím s tím, aby má práce byla zpřístupněna v knihovně Katedry analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci a v informačním systému Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci

Podpis

Poděkování

Úvodem bych chtěl poděkovat svému vedoucímu diplomové práce doc. RNDr. Janu Petrovi, PhD. za jeho cenné rady, vstřícnost a pozitivní přístup při zpracování této diplomové práce.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora: Matěj Horný

Název práce: Nepřímá UV detekce pro analýzu organických molekul kapilární elektroforézou

Typ práce: diplomová

Pracoviště: Katedra analytické chemie

Vedoucí práce: doc. RNDr. Jan Petr, PhD.

Rok odevzdání práce: 2023

Abstrakt:

Tato práce se zabývá vývojem vhodného základního elektrolytu pro analýzu anorganických iontů ve spojení kapilární elektroforézy (CE) s hmotnostní spektrometrií s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS) v módu nepřímé detekce. Cílem bylo především nalezení vhodného složení základního elektrolytu, jeho koncentrace, pH a studium vlivu dalších přídavných látek. Pro nastavení těchto parametrů základního elektrolytu bylo využito teoretického modelování v programu Peakmaster, který z vložených dat spočítá mobility analytů a systémových zón. Následně byly experimentálně ověřeny ty podmínky, u kterých nedocházelo k interferenci systémové zóny se zónami analytů.

Klíčová slova: CE, ICP-MS, Peakmaster, nepřímá UV detekce

Počet stran: 58

Počet příloh: 0

Jazyk: Čeština

Bibliographical identification

Author's first name and surname: Matěj Horný

Title: Indirect UV detection for analysis of organic molecules with capillary electrophoresis

Type of thesis: master's

Department: Department of Analytical Chemistry

Supervisor: doc. RNDr. Jan Petr, PhD.

The year of submission: 2023

Abstract:

This master's thesis deals with the development of a suitable background electrolyte for the analysis of inorganic ions by capillary electrophoresis (CE) with inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) using an indirect detection approach. The aim was to find a suitable composition of the background electrolyte, its concentration, pH and study the effect of other additives. To set these background electrolyte parameters, theoretical modeling was performed in the Peakmaster program, which calculates mobilities of analytes and system zones from the entered data. Subsequently, those conditions, in which there was no interference of the system zones with the analyte zones, were experimentally tested

Keywords: CE, ICP-MS, Peakmaster, indirect UV detection

Number of pages: 58

Number of appendices: 0

Language: Czech

Obsah

1. Úvod.....	8
2. Teoretická část	9
2.1. Kapilární elektroforéza (CE)	9
2.1.1 Kapilární zónová elektroforéza (CZE)	10
2.1.2 Micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC)	18
2.1.3 Kapilární isoelektrická fokusace (CIEF)	21
2.1.4 Kapilární izotachoforéza (CITP)	23
2.2. Detektory v kapilární elektroforéze	24
2.2.1 UV/VIS detekce	26
2.2.2 Laserem indukovaná fluorescence.....	27
2.2.3 Ampérometrická detekce	28
2.2.4 Vodivostní detekce	29
2.2.5 Hmotnostně spektrometrická detekce (MS detekce)	29
2.2.6 Nepřímá UV detekce	29
3. Experimentální část.....	31
3.1. Použité chemikálie a přístroj	31
4. Výsledky a diskuze	32
4.1. Chroman draselný	33
4.2. Molybdenan draselný	37
4.3. Molybdenan draselný a kyselina ftalová	40
4.4. Molybdenan draselný s kyselinou benzensulfonovou a β -alanin.....	47
5. Závěr	53

Seznam použitých zkratek

CE-kapilární elektroforéza

ICP-MS-hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem

CZE- kapilární zónová elektroforéza

EOF-elektroosmotický tok

BGE-základní elektrolyt

MEKC-micelární elektrokinetická chromatografie

CMC-kritická micelární koncentrace

SDS-dodecyl síran sodný

SF-stacionární fáze

MF-mobilní fáze

CIEF-kapilární isoelektrická fokusace

CITP-kapilární izotachoforéza

TE-koncový elektrolyt

LE-vedoucí elektrolyt

AK-aminokyseliny

LIF-laserem indukovaná fluorescence

MS-hmotnostní spektrometrie

1. Úvod

Tato práce se zabývá vývojem analytické metody pro spojení kapilární elektroforézy s hmotnostní spektrometrií s indukčně vázaným plazmatem. Pro tyto účely bylo potřeba nalézt vhodné složení základního elektrolytu. Především bylo potřeba nalézt vhodné pH, koncentraci a příslušná aditiva, která zajistí vhodné vlastnosti systému z hlediska pufrování. Pro tyto účely bylo využito i teoretického modelování v programu Peakmaster (verze 5.4.), který sloužil k zjištění mobility systémových zón. Z programu byly poté vybrány pravděpodobně nejvhodnější podmínky pro separaci v CE, které by byly zároveň vhodné pro spojení s ICP-MS. Z tohoto důvodu bylo potřeba uvažovat všechny okolnosti, které mají vliv na dané spojení i elektroforetickou separaci, tj. koncentrace základního elektrolytu, jeho schopnost pufrovat a zároveň při jakém pH nebude systémová zóna interferovat se zónami analytů. Všechny vybrané podmínky byly následně experimentálně otestovány při separaci modelových analytů složených z chloridů (ve formě NaCl) a chlorečnanů (ve formě KClO₃). Systémy, které měly pozitivní výsledky a vhodné vlastnosti, byly poté vybrány k budoucímu použití pro separaci ve spojení CE-ICP-MS.

2. Teoretická část

2.1. Kapilární elektroforéza (CE)

Kapilární elektroforéza je separační metoda s širokým polem působnosti. Během posledních let se ukázala její důležitost v kontrole léčiv a také je využívána jako metoda první volby při analýze enantiomerů a vakcín. Díky její vysoké účinnosti a univerzálnosti je zajímavá její aplikace v situacích, kde je finanční omezení na provedení analýzy. Další velice důležitou charakteristikou je nízká spotřeba rozpouštědel a vzorků a také její šetrnost k životnímu prostředí. [1,2]

Nicméně kapilární elektroforéza má i své problémy. Jedním z hlavních problémů je udržení nízkého elektrického pole, aby bylo zamezeno Jouleovu teplu, které zvyšuje teplotu kapiláry. Problémem není zvýšení teploty, ale její nerovnoměrné rozložení skrz kapiláru a rozdíl teploty mezi stěnami kapiláry a jejím středem. Tuto skutečnost popisuje následující rovnice: [3]

$$\Delta T \sim E^2 \cdot \kappa \cdot r^2 \quad (1)$$

kde E odpovídá intenzitě elektrického pole, κ odpovídá vodivosti roztoku a r je průměr kapiláry. Rozdíl teplot vede k rozdílným migračním rychlostem mezi teplejším středem a chladnějšími oblastmi u stěn kapiláry a tím i k rozšíření píků. Chlazení dokáže do určité míry zmírnit účinky Jouleova tepla. [3]

Základní „migrační“ elektroforetická rovnice je:

$$v = \mu \cdot E \quad (2)$$

kde v odpovídá rychlosti analytu a μ odpovídá jeho elektroforetické mobilitě. Proto, aby bylo dosaženo vysokých rychlostí a tím i rychlých separací je nezbytné pracovat za vysoké intenzity elektrického pole. Důležitým úkolem je najít způsob, jak „zvýšit“ elektrické pole za současného udržení rozumného příkonu, kterým se považuje 1 W/m. Proud a elektrické pole jsou k sobě přímo úměrné: [4]

$$I \sim E \cdot r^2 \cdot \kappa \quad (3)$$

Rovnice 1 a 3 silně poukazují na potřebu snižovat vnitřní průměr kapiláry, aby bylo dosaženo vysoké intenzity elektrického pole bez znatelného zvýšení proudu. Kvůli těmto skutečnostem se obvykle požívají kapiláry s vnitřním průměrem 25-100 μm . Typicky je dosahováno proudu 5-30 μA při intenzitě elektrického pole 100-1000 V/cm kapiláry. Dalším

faktorem ovlivňujícím proud je vodivost kapalného média, přes které migrují ionty vzorku. Proto jsou doporučovány pufrы s nízkou vodivostí např.: zwitterionty. Pokud se zvolí vhodné podmínky analýz, je možné dosáhnout separační účinnosti až několik stovek tisíc teoretických pater. [4,5]

2.1.1 Kapilární zónová elektroforéza (CZE)

V kapilární zónové elektroforéze separované ionty migrují v roztoku důsledkem elektrického pole. K separaci dochází na základě rozdílů v migračních rychlostech iontů analytu. V CZE je separační kapilára naplněna pufrem. Aplikací napětí v podélném směru dojde k vytvoření elektrického pole E s konstantní silou. Analyty jsou rozděleny na základě rozdílů ve velikosti a/nebo náboje. Funkce retenčního času se získá charakterizací dvou parametrů: pozice maxima koncentrace distribuční funkce, kterou reprezentuje migrační čas t_m analytů a šířka zóny, vyjádřena standardním rozptylem σ , způsobena původní šířkou a disperzí analytů. [4,6]

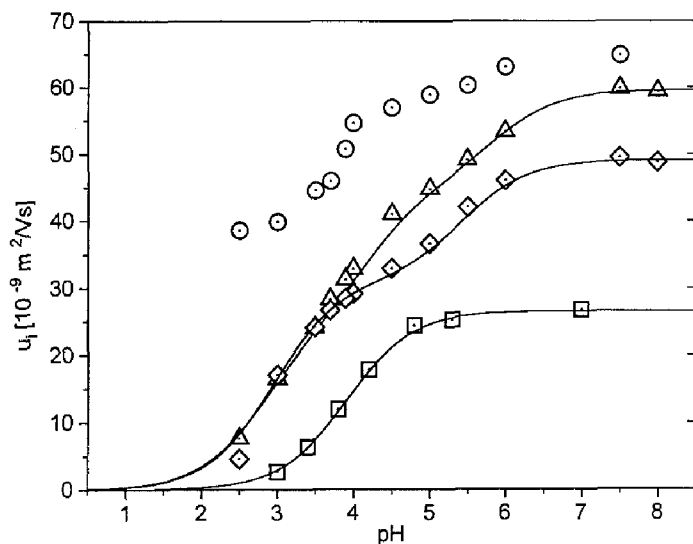
2.1.1.1. Kapilární zónová elektroforéza bez přítomnosti elektroosmotického toku

Nabitý analyt migruje díky vlivu elektrického pole s elektroforetickou rychlostí v , které je v závislosti se silou elektrického pole podle rovnice 3. Iontová mobilita μ závisí na velikosti a náboji separované částice, na druhu rozpouštědla a na teplotě. Za podmínky nekonečně zředěného roztoku to je charakteristická veličina (konstanta) pro daný analyt. Nicméně v reálných elektroforetických separacích se pohybují koncentrace v určitých mezích, a proto iontová mobilita závisí i na koncentraci elektrolytu. [4]

Faktorem, kterým lze ovlivnit separaci je pH. U mnoha slabých elektrolytů nemusí dojít k úplné disociaci vlivem pH. Ionty budou pouze částečně ionizovány díky ustanovení rovnováhy mezi kyselou a bazickou formou. Poté je efektivní mobilita určena stupněm ionizace α : [4, 7]

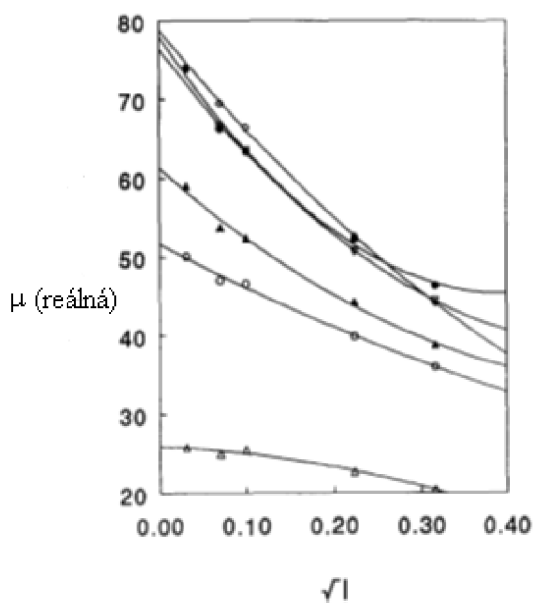
$$\mu_{eff,i} = \mu_{0,i} \cdot f_i \cdot \alpha \quad (4)$$

kde $\mu_{0,i}$ odpovídá absolutní mobilitě, kterou by látka měla v případě nekonečného zředění, f_i je korekční faktor pro odchylky od nekonečně zředěného roztoku. Závislost efektivní mobility na pH pufru lze vidět na obr.1. (○-benzenhexakarboxylová kyselina; △-1,2,3-benzotrikarboxylová kyselina; ◇-1,2-benzodikarboxylová kyselina; □-3,5-dimethoxybenzoová kyselina). Protolýza a komplexace jsou jedny z nejúčinnějších způsobů jak upravit efektivní mobilitu v CZE. Nicméně nejen pH, ale i změny v aktuálních mobilitách a změny v pKa mohou ovlivnit efektivní mobilitu. [4, 7]



Obr. 1. Závislost efektivní mobility na pH, Převzato z W. Friedl, E. Kenndler, 1994 [7]

Tyto děje nastávají buď změnou iontové síly nebo výměnou části nebo celého vodného prostředí za organické rozpouštědlo. Závislost efektivní mobility na odmocnině z iontové síly lze vidět na obr.2. [8]



Obr.2. Závislost efektivní mobility na odmocnině z iontové síly, Převzato z W. Friedl, et. al, 1995 a upraveno [8]

Dalším faktorem, kterým je možné ovlivnit iontovou mobilitu je pKa, jež silně závisí na povaze rozpouštědla (použití vodného prostředí vs. použití organických rozpouštědel). Obecně lze tvrdit, že rozpouštědla zvyšují pKa kyselin a do určité míry pozměňují i pKa bází. Posun pKa konjugovaných bází HB^+ , odvozených od bází B, je rozdílný oproti posunu neutrálních kyselin HA. Předpokládá se, že rozpouštědlo, které stabilizuje proton H^+ , stabilizuje také do určité míry konjugované kyseliny HB^+ . Tento efekt je výrazně odlišný

pro neutrální kyseliny HA. Organická rozpouštědla mají mnohem menší schopnost solvatovat anionty než voda. Výsledná destabilizace aniontů vede ke zvýšení pKa. Nicméně tato možnost ovlivnění hodnot pKa organickým rozpouštědlem je výhodná, protože je možné upravit separovatelnost látek pouhým přidáním organického rozpouštědla do vody a tím mírně změnit hodnotu pKa. [4, 9]

Aby se analyty v kapiláře rozdělily, musí mít rozdílný migrační čas t_m po průchodu kapilárou od jejího začátku po místo detekce. Tato skutečnost lze vyjádřit následující rovnicí: [10]

$$t_{m,i} = \frac{L_d \cdot L_t}{\mu_{eff,i} \cdot V} \quad (5)$$

kde L_d odpovídá délce kapiláry po detektor, L_t odpovídá celkové délce kapilára a V je vložené napětí. [10]

Rozšiřování píků během migrace analytů kapilárou je důsledek podélné difúze, která nastává kvůli koncentračnímu gradientu vzorku ve směru elektrického pole, jež způsobuje difúzní hmotnostní tok. Další faktory přispívající k rozšiřování píků jsou Jouleovo teplo, rozdílná vodivost mezi základním elektrolytem a vzorkem vedoucí k elektroforetické disperzi, adsorpce na stěny kapiláry a různé migrační dráhy způsobené stočením kapiláry. Možnost jak popsat individuální příspěvky k celkovému rozšíření píků je založena na výšce teoretického patra. V tomto případě závisí výška teoretického patra na součtu všech příspěvků rozptylu a délce kapiláry po detektor podle rovnice: [4]

$$H = \frac{\sigma_x^2}{L_d} \quad (6)$$

kde σ_x^2 odpovídá celkovému rozptylu daným součtem všech příspěvků rozptylu: [4]

$$\sigma_x^2 = \sum \sigma_{extr}^2 + \sigma_{dif}^2 + \sigma_{joule}^2 + \sigma_{konc}^2 + \sigma_{ads}^2 + \sigma_{stočení}^2 \quad (7)$$

kde σ_{extr}^2 odpovídá mimokolonovým příspěvkům, σ_{dif}^2 odpovídá příspěvku difúze, σ_{joule}^2 odpovídá příspěvku Jouleova tepla, σ_{konc}^2 odpovídá příspěvkům rozdílné vodivosti, σ_{ads}^2 odpovídá příspěvkům adsorpce a $\sigma_{stočení}^2$ odpovídá příspěvku stočení kapiláry. [4]

Existují tři typy dávkování vzorku do kapiláry. Elektrokinetické dávkování, kdy se vzorek do kapiláry nadávkuje vložením el. pole před samotnou separací, elektroosmóza a pneumatické dávkování, kdy se vzorek do kapiláry dostane použitím tlaku nebo vakua. První dvě možnosti produkují čtyřúhelníkový koncentrační profil toku, pokud pomíne tepelné

efekty, v posledním případě dochází k dávkování laminárním proudem, který produkuje parabolický profil toku. [4, 11]

Rozšiřování píků nastává i ve stočených kapilárách důsledkem různých migračních drah, kde se liší dráha látek, které migrují u vnějšího okraje kapiláry oproti těm, které migrují u vnitřního okraje kapiláry. Tento rozdíl, s_d závisí na počtu okruhů, n_c a na poloměru kapiláry, R_c [12]

$$s_d = (2n_c + 1) \cdot 2\pi \cdot R_c \quad (8)$$

Rozdíl v délce migračních drah poté způsobuje rozšíření píků, které se dá vyjádřit rozptylem $\sigma_{stočeni}^2$ [13]

$$\sigma_{stoč}^2 = \frac{s_d^2}{16} \quad (9)$$

Efekt stočení kapiláry na rozšiřování píků je významný především v případech, kdy jsou kapiláry stočeny do okruhu s velmi malým poloměrem. K tomuto dochází při CZE na mikročipech. [13]

Při nástřiku vzorku na jednom konci kapiláry dochází k vytvoření koncentračního gradientu v podélném směru. Gradient chemického potenciálu způsobuje tok hmoty v tomto směru podle Fickova zákona. Statický přístup k tomuto problému je založen na modelu výšky teoretického patra, kdy příspěvek podélné difúze k rozšíření píků je možné popsat následně: [4, 14]

$$H_{dif,i} = \frac{2D_i \cdot L_t}{\mu_{eff,i} \cdot V} \quad (10)$$

Nicméně vhodnější je popsat separaci počtem teoretických pater N než jejich výškou: [4, 14]

$$N = \frac{L}{H} \quad (11)$$

Z rovnic 10 a 11 lze vyčíst, že pokud budeme zvyšovat napětí, bude se zvyšovat i rychlost separace a v tom případě bude zbývat i méně času na rozšiřování píků podélnou difúzí. Ukázalo se, že je vhodnější popisovat účinnost separace jako počet pater na volt. [15,16]

$$\frac{N_{dif,i}}{V_d} = \frac{\mu_{eff,i}}{2D_i} \quad (12)$$

kde V_d napětí mezi místem nástřiku a místem detekce. Oba parametry charakterizují transportní proces: efektivní mobilita, tok hmoty gradientem el. potenciálu; difúzní koeficient, tok hmoty gradientem chemického potenciálu. Aplikací Nernstova-Einsteinova zákona lze dokázat, že počet teoretických pater není závislý na difúzním koeficientu (pouze pokud jsou přítomny malé ionty s malou iontovou silou základního elektrolytu). [15,16]

$$N_{diff,i} = \frac{z_i \cdot V_d \cdot F}{2R \cdot T} \quad (13)$$

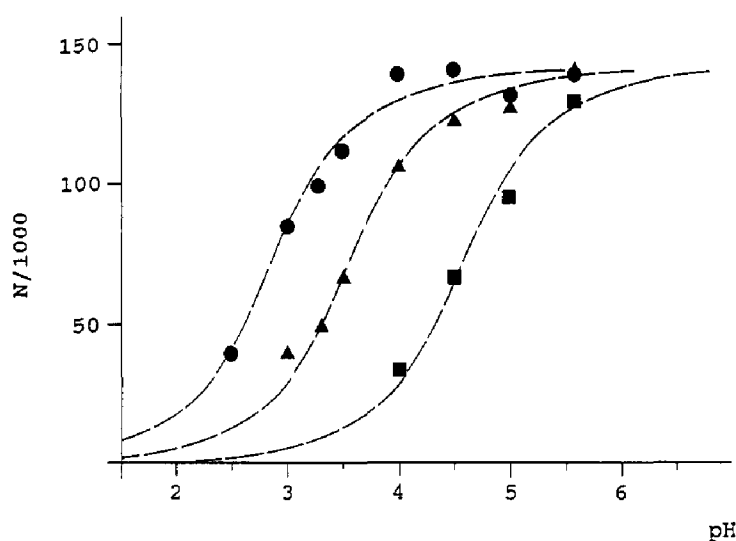
Z rovnice 13 je možné usuzovat, že na rozšiřování píků mají vliv pouze dva parametry (kromě teploty), náboj analytu a napětí. Po dosazení konstant F a R při 25 °C bude rovnice 13 vypadat následovně: [4, 16]

$$N_{diff,i} \approx 20 \cdot z_i \cdot V_d \quad (14)$$

V případě slabých jednosytných kyselin je počet nábojů dán stupněm disociace α . Poté by rovnice 14 vypadala takto: [17]

$$N_{diff,i} \approx \frac{20V_d}{1+10^{pK_a-pH}} \quad (15)$$

To znamená existenci závislosti počtu pater na pH základního elektrolytu. Tvar závislosti N na pH je podobný tvaru titrační křivky, kdy vrchol odpovídá hodnotě N z rovnice 15 pro vysoké pH (rovno $20 V_d$). Tuto závislost lze vidět na obr.3. (● -2,3-dihydroxybenzoová kyselina;▲-2,3-dimethoxybenzoová kyselina;■-4-dimethoxybenzoová kyselina). V polovině této křivky je hodnota N rovna $10 V_d$ (zároveň je pH rovno pK_a příslušné kyseliny). Se snižujícím se pH se snižuje i počet teoretických pater. [17]



Obr. 3. Závislost počtu teoretických pater na pH jednosytných kyselin, převzato z E. Kennler, Ch. Schwer 1991 [17]

Teplu generované během migrace iontů způsobuje parabolický teplotní gradient v příčném směru uvnitř kapiláry. I přesto, že nárůst teploty může být značný, rozdíl mezi středem a stěnami kapilár zůstává poměrně nízký, především díky vnějšímu chlazení. Největší teplotní gradient připadá mezi vnější stěnu kapiláry a okolí. Mobilita se zvyšuje přibližně o 2-3 % na °C a tato závislost může být vyjádřena následující rovnicí: [18]

$$f_t = \frac{1}{\mu} \cdot \frac{d\mu}{dT} \quad (16)$$

Speciální případ deformace píků je triangulace. Nastává, pokud je koncentrace vzorku výrazně vyšší než koncentrace základního elektrolytu a mobility vzorku a protiiontu základního elektrolytu se liší. Nicméně deformace píků bude tím menší, čím menší bude koncentrace vzorku. [4]

Míra separace je popsána rozlišením, které v sobě zahrnuje efekt migrace i disperze. Rovnice vyjadřující rozlišení se skládá ze selektivity a účinnosti a je vyjádřena takto: [4, 19, 20]

$$R_{ji} = \frac{1}{4} \cdot \frac{\Delta\mu}{\mu} \cdot \sqrt{N} \quad (17)$$

Počet teoretických pater neovlivňuje lineárně rozlišení, protože se nachází pod odmocninou. Nicméně selektivita je mnohem více citlivá i na mírné změny. I velmi malá změna pH základního elektrolytu v okolí pKa analytu může vést k výrazné změně rozdílů efektivních mobilit separovaných analytů, kdy je dosaženo jejich rozlišení. Proto z těchto důvodů rozlišení závisí na následujících parametrech: konstanty R a F, parametry přístroje V a T a parametry analytu μ_{akt} , pK_a , α a z . Nicméně jediné parametry, které můžeme experimentálně ovlivnit je stupeň disociace α a s tím spojený náboj z . Hlavními parametry, kterými můžeme optimalizovat rozlišení je zvýšení napětí, které ale můžeme zvyšovat pouze do určité hodnoty a může nastat i obrácený efekt vlivem Jouleova tepla. Selektivitu lze ovlivnit pH přizpůsobením efektivních mobilit separovaných látek. A pH také ovlivňuje účinnost změnou náboje separovaných látek. [4, 19, 20]

2.1.1.2. Kapilární zónová elektroforéza s přítomností elektroosmotického toku

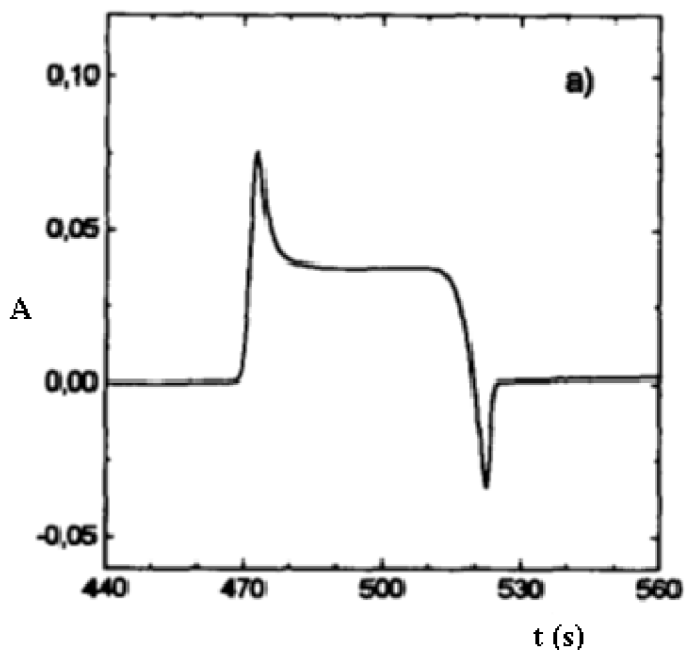
Elektroosmotický tok (EOF) je způsoben zformováním el. dvojvrstvy na rozhraní pevné a kapalně fáze. V křemenné kapiláře, obvykle používané v CZE, je pevný povrch negativně nabit díky protolýze silanolových skupin a díky specifické adsorpci iontů. Negativní náboj povrchu je vyvážen kladnými ionty v difúzní vrstvě kapaliny. V momentě

působení podélného el. pole E se nad difúzní vrstvou vytvoří objemová síla $E \cdot \rho$, která vyjadřuje hustotu el. náboje ρ . V důsledku tohoto jevu se difúzní vrstva pohybuje a tento pohyb je zesilován skrz celý roztok díky viskozitě. Pokud je použita kapilára s vnitřním průměrem (i.d.) do 100 μm , je dosaženo konstantní rychlosti v řádu milisekund (ms) po aplikaci napětí. Tato rychlost je závislá na síle použitého el. pole. Elektrický potenciál dvojvrstvy se nazývá zeta potenciál (ζ) a silně závisí na pH použitého pufru. Při vysokém pH, kdy jsou silanolové skupiny plně disociovány dosahuje ζ potenciál hodnot kolem 120 mV. Závislost elektroosmotické rychlosti je závislá na ζ potenciálu a v tom případě i na pH. Tato závislost je dána rovnicí Helmholtz-Smoluchowski: [4]

$$v_{eo} = - \frac{\varepsilon \cdot \zeta \cdot E}{\eta} \quad (18)$$

kde ε vyjadřuje permitivitu a η dynamickou viskozitu v difúzní dvojvrstvě. Hodnoty těchto veličin se mohou v celkovém roztoku lišit od těch v dvojvrstvě kvůli orientaci dipolárních molekul rozpouštědla v blízkosti nabitého povrchu. Důležité je, že elektroosmotická rychlost nezávisí na poloměru kapiláry. Díky tomuto můžou mít různě široké kapiláry stejnou el. osmotickou rychlost při zachování stejného ζ potenciálu. [4]

Vektor el. osmotické rychlosti působí na všechny částice v kapiláře. Elektricky neutrální složky se pohybují ke katodě přesně s touto rychlostí. V tomto případě se neutrální částice pohybují díky EOFu. K určení el. osmotické mobility v CZE se používá neutrální marker. Nicméně se mohou projevit nepravidelnosti základní linie nebo systémové píky při použití UV detektoru. Tyto nedokonalosti mohou být způsobeny mobilitním nebo pH gradientem, které jsou charakteristické např. pro izotachoforézu nebo izoelektrickou fokusaci, tepelnou nestálostí nebo se mohou objevit v důsledku koncentrační hranice mezi vzorkem a základním elektrolytem. V CZE je neutrální marker rozpuštěn ve vodě nebo v pufru, a proto má tato zóna menší koncentraci iontů než BGE. Když dojde k nadávkování vzorku do kapiláry, vytvoří se koncentrační hranice mezi méně koncentrovaným roztokem elektrolytu obsahující marker a BGE. Při aplikaci el. pole začnou tyto zóny i hranice migrovat díky el. osmóze a el. foréze. Neutrální marker se pohybuje přesně s elektroosmotickou rychlostí. Původní zóna vzorku také migruje se stejnou rychlostí jako EOF, ale koncentrační hranice mezi zónou iontů vzorku a BGE mohou podlehnout další migraci. Výsledkem je různá migrační rychlost neutrálního markeru a tzv „demixing“ zón vzorku. „Demixing“ zóny neutrálního markeru a koncentrační hranice se projeví jako pozitivní a negativní pík v UV detektoru. Tento „demixing“ lze vidět na obr. 4. [4, 21-23]



Obr. 4. Elektroforegram „demixingu“ neutrálního markeru a zóny vzorku, převzato z K. Kenndler-Blackholm et. al 1996 a upraveno [23]

Přebytkový náboj v difúzní části dvojvrstvy je elektricky řízen v podélném směru po aplikaci el. pole v téže směru. Díky viskozitě roztoku je tento pohyb přenášen do celého roztoku, který se pohybuje konstantní rychlostí mimo difúzní vrstvu v krátkém čase. Poté je celkový objem kapiláry unášen EOFem ke katodě. Efektivní tloušťka difúzní vrstvy β , kterou je myšlena šířka vrstvy kapaliny, jež přiléhá ke stěně kapiláry, aniž by se pohybovala, přispívá k rozšiřování piků. Za obvyklých podmínek je možné příspěvek k výšce teoretického patra zanedbat. Nicméně, pro objemné látky s malým difúzním koeficientem (např.: viry nebo proteiny) a nízkou koncentrací BGE, se může příspěvek k výšce teoretického patra pohybovat ve stejných řádech jako příspěvek podélné difúze. [4, 24]

Difúze, tepelné vlivy a přesycení kapiláry způsobují disperzi během migrace zóny vzorku kapilárou. EOF má přímý vliv na disperzi způsobenou těmito procesy. Se zvyšujícím se EOFem se snižuje redukovaná mobilita kationtů. Důsledkem je zvýšená celková mobilita kationtů a tím je snížen celkový strávený čas zóny v kapiláře, a proto zbývá méně času na rozmývání zón. U aniontů je situace obráceně. Se zvyšujícím se EOFem se zvyšuje i redukovaná mobilita aniontů. Následně se zvyšuje i strávený čas zóny v kapiláře, a proto mají disperzní procesy vliv na separaci delší dobu. Nicméně pokud se bude EOF zvyšovat až nad efektivní mobilitu aniontů, dojde k migraci aniontů ke katodě po obrácení polarity napětí. Důsledkem je snížení migračního času. [4, 25]

Selektivita je definována jako rozdíl mobilit vztažený k průměrné mobilitě. Pro kationty se střední mobilita bude zvyšovat se zvyšujícím se EOFem, ale bude se snižovat jejich selektivita. Rozlišení je možné vyjádřit jako poměr rozdílu migračních časů dvou látek k šířce jednoho píku: [4, 26]

$$R_{ji} = \frac{t_{m,j} - t_{m,i}}{\sigma_{t,i}} \quad (19)$$

Substitucí t a σ dostaneme jednodušší rovnici rozlišení, která sice nezahrnuje šířku druhého píku, ale nezahrnuje také průměrné difúzní koeficienty a mobility: [4, 26]

$$R_{i,j} = (r_{i,j} - 1) \cdot \sqrt{N_i} \quad (20)$$

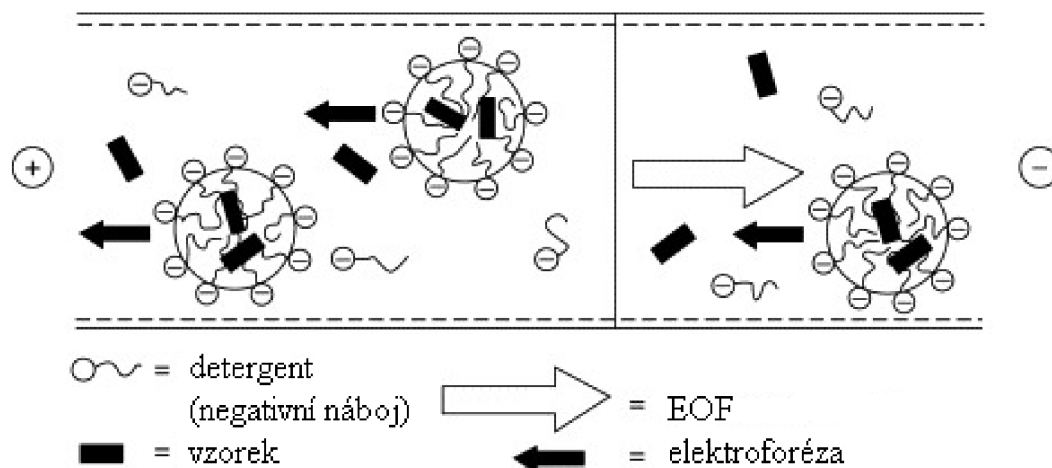
kde $r_{i,j}$ je koeficient selektivity. Pro kationty, kde je redukovaná mobilita vždy nižší při aplikaci EOFu, dochází vždy ke snížení rozlišení, i přestože se zvyšuje účinnost. Ztráta selektivity překompenzovává nárůst účinnosti. Aplikace EOFu (směrem ke katodě) vždy vede ke snížení rozlišení oproti případu bez EOFu. Ztráta rozlišení je tím vyšší, čím menší jsou efektivní mobility separovaných látek a čím vyšší je efektivní mobilita EOFu. Pro anionty je nárůst rozlišení možný. Pokud se mobilita EOFu bude blížit mobilitám aniontů, bude nárůst rozlišení strmý, ale současně dojde k prodloužení migračních časů. Pokud bude mobilita EOFu dvakrát vyšší než mobility aniontů, bude rozlišení stejné jako v případě bez EOFu. Nicméně mohou být separovány anionty s velmi malými mobilitami bez ztráty rozlišení a za mnohem kratších separačních časů než za podmínek bez EOFu. [4, 26]

2.1.2. Micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC)

Micelární elektrokinetická chromatografie kombinuje chromatografii a elektroforézu. V současnosti se využívá ve farmaceutické analýze a také v potravinářské a klinické analýze a analýze životního prostředí. Hlavní výhodou je, že je to jediná elektroforetická technika, kterou lze separovat jak neutrální částice, tak i nabitě ionty. Separace neutrálních látek MEKC je dosažena použitím surfaktantů v BGE. Při koncentracích nad kritickou micelární koncentraci (CMC) vznikají micely. To jsou kulaté částice s hydrofobním ocasem směřujícím ke středu a nabitou hlavou směřující ven z molekuly. [27]

Surfaktanty a micely jsou obvykle nabitě a migrují s nebo proti EOFu. Aniontové surfaktanty jako dodecylsulfát sodný (SDS) migrují k anodě, což je v opačném směru k EOF. Jelikož je EOF obecně rychlejší než rychlost migrace micel v neutrálním nebo

bazickém pH, dochází k pohybu ve směru EOF. Během elektroforetické migrace se látky ze vzorku rozdělují mezi micely a BGE na chromatografickém principu díky hydrofobním a elektrostatickým interakcím. Micely se chovají jako stacionární fáze (SF) v chromatografii, ale dochází k jejich pohybu. Schematicky lze vidět separaci na obr.5. [27, 28]



Obr. 5. Schematické znázornění separace v MEKC, převzato z G. Hancu et. al, 2012 a upraveno [29]

V případě neutrálních látek dochází k ovlivnění separace jen na základě afinity k micelám. Čím silnější je interakce mezi vzorkem a micelou, tím delší je migrační čas, protože micela unáší látky proti EOFu. Pokud vzorek není v kontaktu s micelou je unášen pouze EOFem. Čím hydrofobnější molekula, tím silnější je její interakce s micelou a tím více je zadržována v kapiláře. Na tomto principu je založena separace neutrálních látek v MEKC. Tento separační mechanismus neutrálních látek může být popsán modifikací chromatografických rovnic. Poměr množství látky v micelách a v mobilní fázi (MF), kapacitní faktor, je dán následující rovnicí: [27]

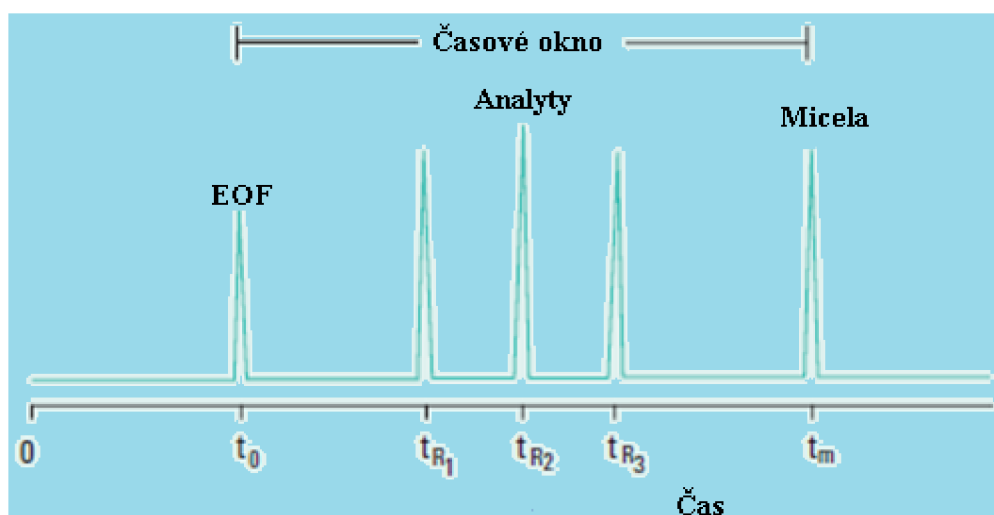
$$k' = \frac{(t_r - t_0)}{t_0 \cdot (1 - \frac{t_r}{t_m})} = K \cdot \left(\frac{V_S}{V_M} \right) \quad (21)$$

kde t_r je retenční čas analytu, t_0 je retenční čas analytu nezadržovaného micelou, t_m je retenční čas micely, K je rozdělovací konstanta, V_S je objem micelární fáze a V_M je objem MF. Pokud by se t_m blížilo nekonečnu a micely by se stávaly opravdovou SF, nabyla by rovnice stejné podoby jako při chromatografických separacích. Rozlišení dvou látek v MEKC může být popsáno následovně: [27, 30]

$$R = \left(\frac{N^{1/2}}{4} \right) \cdot \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \cdot \left(\frac{k_2'}{k_2' + 1} \right) \cdot \left(\frac{1 - \frac{t_0}{t_m}}{1 + \frac{t_0}{t_m}} \right) \quad (22)$$

Z této rovnice lze vyčíst, že rozlišení může být zlepšeno optimalizací účinnosti, selektivity nebo kapacitního faktoru. Nejjednodušším způsobem je upravení koncentrace surfaktantu. Obecně se kapacitní faktor zvyšuje se zvyšující se koncentrací surfaktantu. Nicméně při použití iontových surfaktantů o vysoké koncentraci může dojít ke zvýšení proudu. [27, 30]

V MEKC dochází k eluci látek mezi časy t_0 (EOF) a t_m (migrace micel). Rozlišení je zlepšeno rozšířením tohoto časového okna. Při separaci neutrálních látek se všechny eluují mezi časy t_0 a t_m . Hydrofilní látky, které neinteragují s micelami se eluují s EOFem a látky, které jsou kompletně zadržovány micelami se eluují s nimi. Schematické znázornění elektroforegramu je na obr. 6. Přestože časové okno je obvykle úzké je kapacita pík vysoká díky vysoké účinnosti. Proto se používají podmínky, které rozšiřují časové okno. Těmi jsou přiměřené EOF a micely s vysokou mobilitou. [27]



Obr. 6. Schematický elektroforegram v MEKC, převzato z B. Gas et. al 2018 a upraveno [27]

Selektivita může být ovlivněna změnou fyzikálních vlastností micel, jako je jejich velikost, náboj a geometrie. Použitím různých surfaktantů může dojít k výrazným změnám podobným těm při změně SF v chromatografii. Surfaktanty mohou být aniontové, kationtové, neiontové, zwitteriontové anebo jejich směs. V každé kategorii se samozřejmě může měnit délka alkylového řetězce. Selektivita může být také měněna koncentrací pufru, pH, teplotou, přidávkem aditiv jako jsou kovové ionty nebo chirální selektory. [27]

Stejně jako v chromatografii mohou přidané organické aditiva ovlivňovat interakci látek s micelami. Přidáním aditiv jako je methanol, acetonitril nebo 2-propanol do BGE v koncentracích od pár procent až do 50 % se může dosáhnout zeslabení hydrofobních interakcí mezi micelou a analytem. Díky tomuto je umožněna rychlejší kinetika interakcí. [27]

Surfaktanty také interagují se stěnou kapiláry a mají důležitý vliv na EOF i na interakci mezi analytem a stěnou. Směr migrace analytu a micely je proměnlivý a závisí na náboji micely a na síle EOFu. Obvykle je používáno vysoké pH, aby byl udržen rozumný EOF a směr separace. [27]

Velice důležitý faktor, který je potřeba kontrolovat je teplota. Ta výrazně ovlivňuje CMC a distribuční koeficient. Zvýšení teploty vede ke zvýšení CMC a tím ke snížení koncentrace micel v BGE. Distribuční koeficient se snižuje se zvyšující se teplotou. [27]

2.1.3. Kapilární isoelektrická fokusace (CIEF)

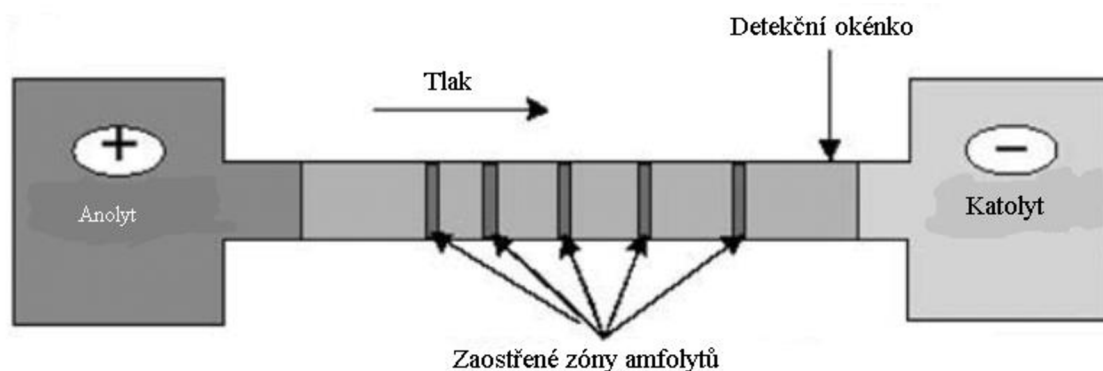
Tato metoda je zaostřovací typ kapilární elektroforézy, při které se analyty (obvykle proteiny) separují na základě rozdílné hodnoty izoelektrického bodu (pI). Kapilára je naplněna roztokem amfolytů a proteinů. Po aplikaci el. pole dojde k vytvoření gradientu pH. Proteiny se zaostří do úzkých zón na základě jejich hodnot pI. [31]

Amfolyty jsou amfoterní sloučeniny, které mohou existovat jako anionty nebo kationty v závislosti na pH roztoku. Isoelektrický bod je pH, při kterém je amfolyt neutrální. Pod tímto pH amfolyt existuje jako kationt a nad tímto pH jako aniont. Roztok amfolytů obsahuje směs sloučenin s různými hodnotami pI a ty poté mohou vytvořit gradient pH v kapiláře. Roztok amfolytů se obvykle skládá z látek obsahující amino a karboxylovou skupinu a jejich koncentrace se pohybuje okolo 1 %. [31]

Vialka obsahující katodu je ponořena v katolytu (zásaditý roztok) a vialka obsahující anodu je ponořena v anolytu (kyselý roztok). Anolyt by měl mít pH nižší než pI nejkyselějšího amfolytu a katolyt by měl mít pH vyšší než je pI nejbazičtějšího amfolytu. Po aplikaci el. pole začnou amfolyty migrovat kapilárou. Pokud předpokládáme pH roztoku amfolytů 7,6 budou pozitivně nabitě amfolyty s pI nad 7,6 migrovat ke katodě a amfolyty s pI pod 7,6 budou migrovat k anodě. Pokud amfolyt s pI 9,5 migruje do katolytu, dojde k jeho změně náboje na negativní a migruje zpět do kapiláry. Amfolyty migrují kapilárou, dokud každý z nich nedojde do místa, kde se pH roztoku rovná jejich pI. Takhle je vytvořen gradient pH. Mírného gradientu pH dosáhneme požitím většího množství amfolytů, které budou mít rovnoměrně rozmístěné hodnoty pI. Kyselina fosforečná (0,02M) se obvykle používá jako anolyt a hydroxid sodný (0,02M) jako katolyt. [31]

Separace probíhá naplněním kapiláry směsí amfolytů a vzorku. Po aplikaci napětí vzorek i amfolyty migrují kapilárou, dokud nedojdou do místa, kde se pH roztoku rovná jejich pI. Takto je dosaženo rovnovážného stavu, který je indikován snížením proudu ke

konstantní hodnotě. Pokud analyt migruje z místa, kde je neutrální, do místa s jiným pH dojde k jeho nabití a migruje zpět do zóny kde je neutrální. Takto dochází k zaostření analytů do velice úzkých zón. Schematicky lze vidět princip separace na obr. 7. Čím více amfolytů s různými hodnotami pI se nachází v roztoku, tím užší jsou zóny i výsledné píky. Kapiláry jsou upraveny obvykle polyakrylamidem nebo methylcelulózou, aby nevznikal EOF a k separaci docházelo pouze na základě rozdílných hodnot pI. EOF by zamezil vytvoření stabilních úzkých zón. Jelikož je celá kapilára naplněna roztokem vzorku jsou dávkovány větší objemy vzorku než v CZE nebo MEKC. Pomocí CIEF můžeme analyzovat i velice zředěné roztoky, díky vytvoření úzké koncentrované zóny vzorku. V případě analýzy proteinů může docházet k jejich precipitaci. Zabránit precipitaci lze použitím detergentů.[31-33]



Obr. 7. Schematické znázornění CIEF, převzato z Ch. Henry, 2006 a upraveno [34]

Po vytvoření zaostřených zón dojde k pohybu zón vzorku i amfolytu. Zóny jsou protlačeny kapilárou a detektorem, aby bylo dosaženo elektroferogramu. Jelikož detektorem procházejí i amfolyty je výhodné, aby nebyly vidět detektorem. [34]

Jednou z možností jak protlačit látky kapilárou je použití hydrodynamického toku. Může se provést pomocí HPLC čerpadla. Pokud je možnost dávkovat tlakem, může být použit i tento mód. Hydrodynamické protlačení není vhodné pro kapiláry naplněné gelem, protože gel má vysoký odpor proti protlačení nebo může dojít k vytlačení gelu z kapiláry.[33]

Další možností je elektroforetické protlačení. Proveďte se vyměněním anolytu za katolyt. Pokud je katolytem NaOH a anolytem kyselina fosforečná a dojde k vyměnění anolytu za NaOH při aplikaci napětí, hydroxylové ionty budou migrovat k anodě. Během pohybu hydroxyly kapilárou dochází k postupnému ztitrování iontů vzorku a amfolytu. Ionty dostanou záporný náboj a migrují rovněž k anodě. Sodné ionty u anody migrují ke katodě,

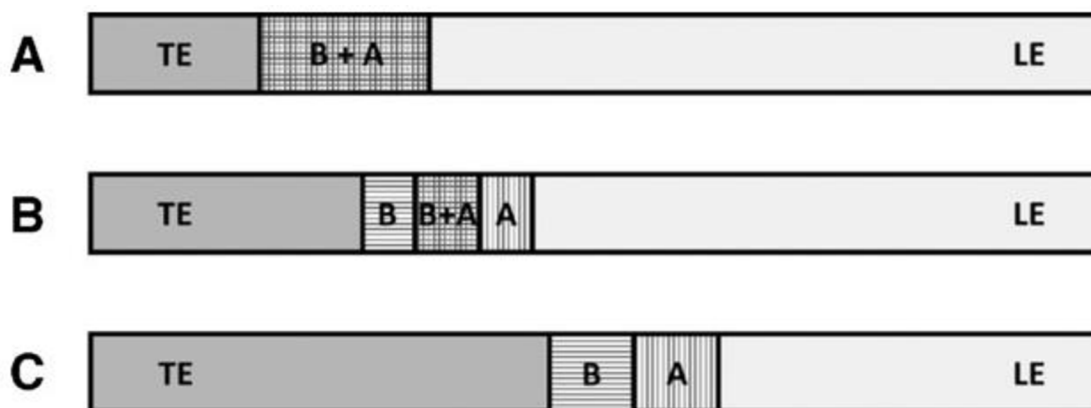
ale nezpůsobují změnu pH, a proto neinterferují s migrací amfolytu a vzorku. Tento elektroforetický způsob může být použit i pro kapiláry naplněné gelem. [33]

Podobně může být protlačení provedeno přidáním soli ke katolytu nebo anolytu a aplikovat el. pole. Když sůl obsahující jakýkoliv jiný kation než proton je přidána k anolytu dochází k mobilizaci směrem k anodě. Přidáním soli obsahující aniont rozdílný hydroxylovému ke katolytu dojde k mobilizaci směrem ke katodě. [35]

Největší využití má CIEF v separaci proteinů. Nicméně metoda může být použita pro jakýkoliv typ analytů, pokud mají rozdílné pI a může být dosaženo gradientu pH, který pokrývá rozmezí pI vzorku. [31]

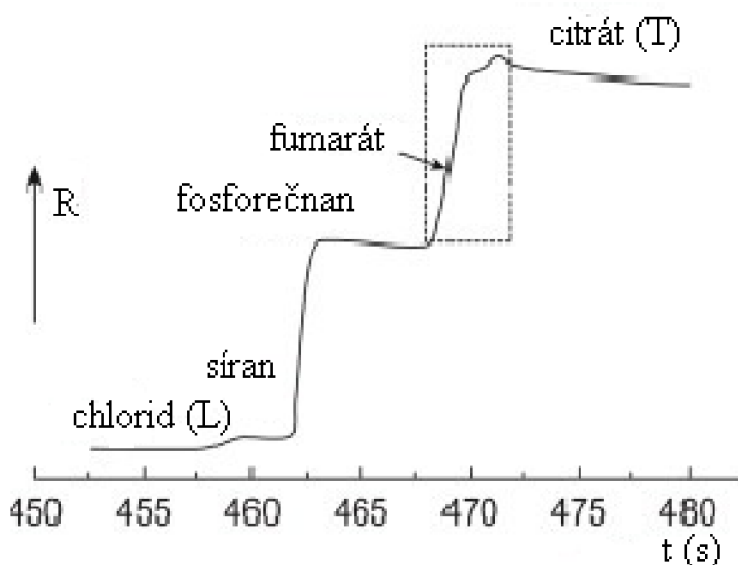
2.1.4. Kapilární izotachoforéza (CITP)

V kapilární izotachoforéze se všechny zóny pohybují stejnou rychlostí. Ve všech různých případech je možné separovat kationty i anionty, ale ne zároveň. V CITP separaci je vzorek nadávkován mezi dva pufrů. První z nich je vedoucí a obsahuje ionty, které mají vyšší mobilitu než kterýkoli jiný analyzovaný iont. Druhý z nich je koncový a obsahuje ionty o nižší mobilitě, než mají ionty vzorku. Při separaci aniontů mohou být jako vedoucí pufr použity chloridové ionty a jako terminující pufr haptanoátové ionty. Roztok vedoucího elektrolytu je připojen k anodě a roztok terminujícího elektrolytu je připojen ke katodě. Schematicky lze princip separace vidět na obr.8. (TE-koncový elektrolyt, LE-vedoucí elektrolyt, A a B-složky vzorku). V části A je znázorněn začátek separace. V části B lze vidět průběh separace, kdy se vytvořily samostatné zóny vzorku A a B, ale stále zůstává i jejich smě A+B. V části C je již vyobrazen konec separace. [36]



Obr. 8. Princip CITP, Převzato z V. Datinská et. al 2019 [37]

Po aplikaci elektrického pole v CITP migrují ionty vzorku stejně jako v CZE. Každý podle své vlastní pohyblivosti. Rozdíly v těchto migračních časech se projeví vytvořením na sebe navazujících zón. Nejrychlejší zóna migruje těsně za vedoucím pufrem a nejpomalejší migruje těsně před terminujícím pufrem. Po vytvoření zón, a tedy i samotné separaci, se poté všechny ionty pohybují stejnou rychlostí. Příklad elektroferogramu je na obr. 9. Důvodem, proč se ionty hýbou stejnou rychlostí je ten, že el. pole je slabší pro analyty o vyšší mobilitě a silnější pro méně mobilní ionty. [36]



Obr. 9. Příklad elektroferogramu, převzato a upraveno podle [38]

Po dosažení rovnovážného stavu v CITP migruje každá zóna vzorku v zóně těsně sevřené mezi dalšími zónami o nižší a vyšší mobilitě. Přechod mezi zónami je ostrý. Pokud by analyt migroval do zóny o vyšší mobilitě, nižší el. pole by snížilo jeho mobilitu až by se vrátil zpět do své zóny. Rozdílem oproti CZE je skutečnost, že zóny se eluují těsně za sebou a není mezi nimi žádná zóna pufry nebo elektrolytu. [36]

2.2. Detektory v kapilární elektroforéze

Detekce v CE přináší množství výzev v podobě nízkých objemů píků, vysoké účinnosti píků a omezeného času na detekci analytů. Díky širokému využití CE došlo k vývoji řady detekčních metod, kterými je možné detegovat nanolitrové a menší objemy analytů. Mnoho jich bylo vyvinuto z metod pro HPLC, tak aby splňovaly striktnější nároky na detekci. Příkladem je fluorescenční detekce, kdy konvenční HPLC systémy používají lampu, ale v CE se používá výhradně laser, kvůli náročnému zaostření nekoherentního zdroje na kapiláru. [36]

Důležitým faktorem je výběr typu detekce z množství možných typů. Mnoho různých typů molekul, iontových i neiontových, bylo úspěšně analyzováno CE. Od malých anorganických molekul přes aminokyseliny (AK), peptidy až po proteiny nebo DNA. Je možné analyzovat i různé matrice jako říční vodu, krev, moč, tkáň, a potraviny. S potenciálními interferenty musí být vždy počítáno před analýzou. Z tohoto vyplývá, že nejdůležitějšími faktory jsou vlastnosti analytu, matrice vzorku a požadované detekční limity. Pokud je obtížné detekovat analyt dostupnými metodami je možné jej derivatizovat před kolonou, na koloně nebo po průchodu kapilárou. Dalšími faktory jsou, jestli je detekční metoda dostupná komerčně nebo je třeba ji připravit „in-house“ a samozřejmě také celková cena typu detekce. [36]

Obvyklým typem detekce je UV/VIS. Dalšími typy detekce jsou fluorescenční detekce, laserem indukovaná fluorescence (LIF), ampérometrie, vodivostní detekce, spojení CE s hmotnostní spektrometrií (MS) a nepřímá UV detekce. Charakteristiky těchto metod lze vidět na tabulce. 1. [39]

Tabulka 1. Tabulka detekčních metod v CE

Metoda	Limit detekce (mol)	Koncentrační limit detekce (mol/l)
UV/VIS	10^{-12} - 10^{-15}	10^{-5} - 10^{-7}
Fluorescence	10^{-15} - 10^{-17}	10^{-7} - 10^{-9}
LIF	10^{-18} - 10^{-20}	10^{-9} - 10^{-12}
Ampérometrie	10^{-18} - 10^{-19}	10^{-10} - 10^{-11}
Vodivostní detekce	10^{-15} - 10^{-16}	10^{-6} - 10^{-7}
Hmotnostní spektrometrie	10^{-16} - 10^{-17}	10^{-8} - 10^{-9}
Nepřímá UV	10-100 krát nižší než přímá	10-100 krát nižší než přímá

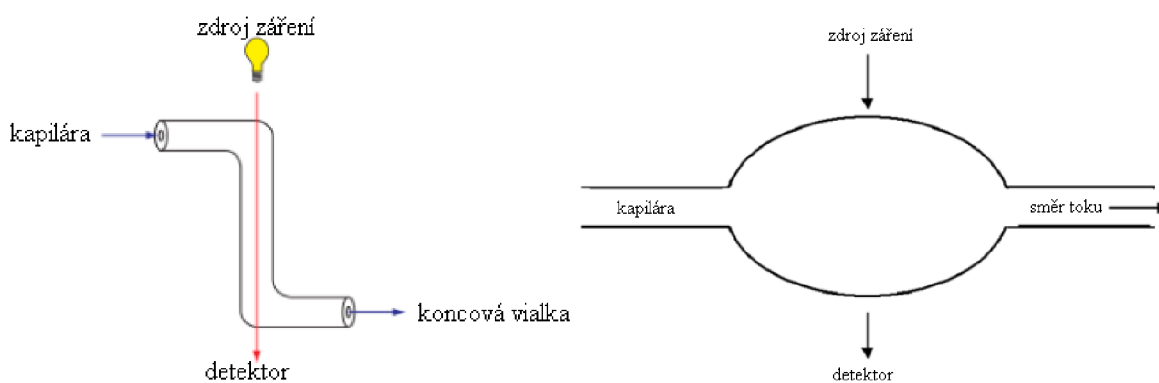
převzato z H. H. Lauer et. al 2014 [27]

Z tabulky lze vyčíst, že nejlepší limity detekce má LIF, nicméně tato technika je velice nákladná a stejně jako fluorescence je potřeba derivatizace vzorku. Ampérometrická detekce má také úctyhodné limity detekce, jen je vhodná pro elektroaktivní látky. Téměř univerzální využití má UV/VIS detekce, ale má horší hodnoty limitu detekce. Kompletně univerzální pro potřeby CE je vodivostní detekce. Hmotnostní spektrometrie (MS) je také výborná metoda pro detekci látek z CE. Výrazným problémem je ovšem rozhraní mezi CE a MS, které je velice komplikované. [36]

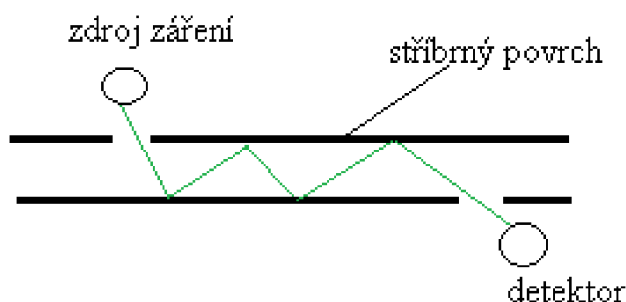
2.2.1. UV/VIS detekce

Tento typ detektoru je široce používán v CE díky jeho snadnější aplikovatelnosti. Detekce je prováděna v kapiláře, aby byl zachován detekční objem v nanolitrech. V tomto případě se odstraní malá část polyimidové vrstvy buď spálením nebo seškrábáním. Tato část kapiláry poté slouží jako detekční cela. Nicméně délka tohoto detekčního okénka se pohybuje mezi 50-100 μm , což omezuje limit detekce v jednotkách koncentrace kvůli malým objemům požívaných v CE. Hmotnostní detekční limity jsou stejné nebo lepší oproti těm dosažených v HPLC. [36]

Existuje mnoho různých způsobů jak prodloužit délku detekčního okénka, aby byla zlepšena citlivost metody. Jednou z možností je ohnout kapiláru do tvaru Z (tzv. Z cela). Tímto způsobem je možné prodloužit absorpční dráhu až na 10 násobek jejího průměru. Zvětšení absorpční dráhy může ovšem vést ke snížení účinnosti píků a tím i rozlišení. V některých případech jsou použity speciální čočky, které jsou umístěny mezi mezi zdroj a Z celu a mezi Z celu a detektor. Tyto čočky zlepšují citlivost fokusací světla do cely a poté na detektor. Další možností prodloužení absorpční dráhy je vytvoření bubliny na konci kapiláry. V komerčních přístrojích má pro kapiláru s i.d. 50 μm bublina i.d. 150 μm . Schematicky jsou tyto možnosti znázorněny na obr. 10. Poslední možností je prodloužení absorpční dráhy záření odrazem od stěn kapiláry. Stěny na konci kapiláry jsou pokryty vrstvou stříbra. Záření ze zdroje se poté mnohonásobně odrazí od vrstvy stříbra a tím se výrazně prodlouží jeho ušlá dráha. Toto schéma je vyobrazeno na obr. 11. [36]



Obr. 10. Schéma Z cely a bublinové cely, převzato z D. A. Skoog et. al 2018 a upraveno [36]



Obr. 11. Schéma cely s mnohonásobným odrazem

2.2.2. Laserem indukovaná fluorescence

Stejně jako v HPLC, fluorescenční detekce zvyšuje citlivost a selektivitu pro fluoreskující analyty nebo analyty po derivatizaci. LIF dovoluje detekci až 10 zeptomolů nebo 6000 molekul. [36]

Signál fluorescence analytů je vždy měřen s určitým pozadím. Toto pozadí je způsobeno rozptylem signálu na stěnách kapiláry, fluoreskujícími nečistotami v roztoku a Raleigho a Ramanovým rozptylem. Aby byl snížen rozptyl je potřeba odfiltrovat interferující vlnové délky emitujícího záření. Šum pozadí je určující faktor dosažení možného koncentračního limitu detekce. Tento detekční limit může být až o 3 řády nižší než ten dosažitelný detekcí absorbance. [27]

Jelikož záření laseru o vysoké intenzitě může být zaostřeno na 1 bod na kapiláře, který slouží jako optická cela s malým detekčním objemem. Nevýhoda tohoto malého objemu může být vyvážena zvýšením intenzity excitačního záření na detekčním okénku. Další výhodou laseru je poskytování monochromatického záření, které umožňuje optimální selektivitu při excitaci. [40]

Pro aplikace LIF nemusí být výkon laseru vysoký. Dostatečný je výkon o několika mW k dosažení potřebné selektivity. Se zvyšujícím se výkonem se nijak výrazně nezvyšuje poměr signálu k šumu. Toto je způsobeno saturací fluoreskujících sloučenin, které při zvýšení výkonu neposkytují vyšší signál. Druhým faktorem může být fotodegradace fluoreskujících analytů. Absorpce fotonů fotosenzitivními sloučeninami může vést k rozkladu této molekuly. Pokud k tomuto dochází je zapotřebí použít excitační záření o nižší intenzitě. Dalším faktorem ovlivňujícím poměr S/N při zvýšení intenzity je nestabilita signálu laseru, jelikož signál i šum pozadí jsou úměrné intenzitě excitovaného záření. [27]

Fluorescence je poměrně vzácná vlastnost látek, a proto by nebylo možné použít tento typ detekce pro široké spektrum látek. Nicméně byla připravena řada látek, které je

možné použít k předkolonové derivatizaci nefluoreskujících látek. Mezi tyto látky patří o-ftalaldehyd (OPA), carboxyaldehyd (CBQCA), 9-fluorenylmethyl chloroformát (FMOC), anthryldiazomethan (ADAM), benzoin a mnohé další. [27]

Předkolonová derivatizace z HPLC se obvykle aplikuje i v CE. Jen v neobvyklých případech byla vyvinuta speciální činidla pro CE. Jedním z důvodů je vhodnost detekce derivovaného analytu LIF, aby vlnová délka excitovaného záření byla kompatibilní s čarami spektra laseru. Dalším z důvodů je požadavek na elektroforetické vlastnosti derivovaných látek. [27, 41]

2.2.3. Ampérometrická detekce

Ampérometrickou detekcí je měřen proud při oxidaci nebo redukci elektroaktivních analytů na povrchu pracovní elektrody. Během oxidace dochází ke zvyšování oxidačního čísla analytu, při redukci dochází ke snižování oxidačního čísla analytu. Na základní elektrolyt, který se nachází mezi pracovní a referenční elektrodou, je vložen potenciál. Tento potenciál způsobuje oxidaci nebo redukci. Elektrolyt je vodivý roztok, který obsahuje rozpuštěné ionty. Proud, který teče pracovní elektrodou je úměrný počtu vyměněných elektronů a tím také i koncentraci. V oxidačním módu je na pomocnou elektrodu vložen negativní potenciál. Toto způsobuje pozitivní rozdíl potenciálů na pracovní elektrodě oproti referenční, a proto jsou elektrony přitahovány k pracovní elektrodě. V redukčním módu je na pomocnou elektrodu vložen kladný potenciál. [31]

Většina aplikací ampérometrické detekce v CE je dělána s analyty, které je možné oxidovat. Pro detekci v redukčním módu je potřeba odstranit kyslík z BGE. Kyslík lze snadno redukovat při potenciálu -0,4 V a nižším. Detektor je potřeba oddělit od kapiláry, protože pokud by byl vystaven elektrickému poli, mohl by se zvyšovat šum pozadí. Tohoto je možné dosáhnout použitím porézního skleněného kloubu nebo porézní grafitovou trubicí. Rozhraní kapiláry a porézního kloubu je ponořeno do koncové vialky obsahující katodu. Porézní kloub dovoluje, aby proud tek l přes kapiláru do katody a zároveň, aby i el. pole bylo aplikováno pouze na kapiláře. K detekci dochází na konci kapiláry bez interference použitého potenciálu. [31, 42, 43]

Ampérometrická detekce je často používána v případech, kdy nelze látku detegovat pomocí absorbance nebo fluorescence. Mezi tyto látky patří převážně katecholaminy a sacharidy. Látky, které nelze snadno oxidovat nebo redukovat, je možné derivatizovat činidly, jež z nich udělají látky elektroaktivní. [42, 44]

2.2.4. Vodivostní detekce

Základem detekce vodivosti je změna elektrické vodivosti roztoku, ve kterém jsou přítomny ionty. Vodivostní detektor má dvě elektrody v cele, na které je vložen vysokofrekvenční střídavý potenciál. Eluent z kapiláry protéká mezi elektrodami a v momentě, kdy do cely vstoupí ionty, dochází k poklesu odporu roztoku a tím ke zvýšení vodivosti. V CE byl rovněž využit vodivostní detektor na konci kapiláry. Tento detektor se skládá z mikroelektrody z platinového drátku, která je ve velice těsném kontaktu se separační kapilárou. Celý tento systém je ponořen do nádoby s pomocnou elektrodou, která také slouží jako katoda při CZE. Mezi koncem kapiláry a elektrodou je malý prostor, který zvyšuje mimokolonový objem a způsobuje rozšiřování píků. [31, 45]

Ve vodivostní detekci v CZE existuje přímý vztah mezi plochou píku a migračním časem. Proto pokud používáme interní standart, není potřeba připravovat kalibrační křivku. Šum pozadí je úměrný signálu pozadí a vodivost je přímo úměrná koncentraci. Čím koncentrovanější BGE tím vyšší šum. Z tohoto důvodu je poté obtížné analyzovat stopová množství látek. [31, 46]

2.2.5. Hmotnostně spektrometrická detekce (MS detekce)

Velice malé objemové průtoky v elektroforéze, které jsou obvykle menší než 1 $\mu\text{l}/\text{min}$, jsou vhodné pro spojení s MS detekcí. Je možné zavést eluent z kapiláry rovnou do iontového zdroje MS. Nejčastějším ionizačním zdrojem a rozhraním pro zavádění vzorků z CE do MS je elektrosprej. Je zapotřebí, aby byly v CE použity těkavé pufrů, protože v MS musí dojít k jejich odpaření. Hlavní využití našlo spojení CE/MS v analýze proteinů, DNA fragmentů a peptidů. [36]

2.2.6 Nepřímá UV detekce

Nepřímá UV detekce se používá pro látky s nízkým molárním absorpčním koeficientem, které je obtížné detekovat bez derivatizace. Pro analýzu se používá složka pufru, která obsahuje vhodný chromofor (někdy též UV sonda nebo UV próba). Na detektoru se objevuje konstantní odezva způsobená absorbujícím pufrům. Pokud detektorem prochází analyt, dochází k poklesu signálu v důsledku nízké nebo téměř žádné absorbance analytu. Ten je poté určen z poklesu absorbance. Nepřímá UV detekce je univerzální detekční metoda. Jako látka obsahující chromofor se pro detekci aniontů obvykle používají chromany, ftaláty, kyselina pyromelitová a bromkrezolová zeleň. Pro kationty se používá chinin a malachitová zeleň. [47-51]

Hlavním kritériem výběru UV próby je to, že by měl mít stejnou mobilitu jako ostatní látky, protože by jinak mohlo dojít ke vzniku asymetrických píků. Chroman a kyselina pyromelitová mají mobility, které jsou stejné jako několik anorganických iontů. UV próba by měla mít také vysoký molární absorpční koeficient při dané vlnové délce, aby došlo k výraznému poklesu absorbance při detekci analytu. Rovněž by UV próba měla silně absorbovat záření o vlnové délce, kde neabsorbuje analyt, proto tato vlnová délka může být poté využita k detekci. [31, 48, 52]

Koncentrace UV próby se volí tak, aby byla dosažena určitá rovnováha mezi poměrem S/N a lineárním dynamickým rozsahem. Čím vyšší koncentrace, tím vyšší signál šumu. Z tohoto důvodu by se neměly používat vysoké koncentrace. Nicméně snižování koncentrace UV próby vede ke snížení lineárního dynamického rozsahu. Rovněž by koncentrace UV próby měla být alespoň 100krát vyšší než koncentrace analytu, aby byla zachována symetrie píků. Obvykle se používají koncentrace 2-10 mM chromoforu. [31, 47, 48, 52]

3. Experimentální část

Cílem této práce bylo nalezení vhodného pufru a vhodných podmínek pro analýzu modelových anorganických iontů (Cl^- a ClO_3^-) pomocí spojení CE-ICP-MS s využitím modelování v programu Peakmaster. Mezi podmínky, jež byly zkoumány, patřilo pH pufru, koncentrace pufru, aditiva pufru a jejich koncentrace a vložené napětí. Nejprve bylo zásadní najít vhodné podmínky pro analýzu na samostatné CE, aby bylo poté možné vyzkoušet tyto podmínky ve spojení s ICP-MS. Analýza těchto iontů je významná v analýze různých léčiv, jelikož mnoho léčiv je ve formě hydrochloridu a spojení s ICP-MS by poskytlo dodatečnou informaci.

3.1. Použité chemikálie a přístroj

Pro přípravu pufrů byly použity K_2CrO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$, K_2MoO_4 (vše Sigma Aldrich), jako aditiva byly použity kyselina benzensulfonová (Sigma Aldrich), kyselina ftalová (Penta), β -alanin a CTAB (Sigma Aldrich). Jako modelové analyty byly použity NaCl, KClO_3 a KClO_4 (vše Sigma Aldrich). Na titraci na dané pH byl použit KOH (Penta) a pH bylo měřeno pH metrem. Separace probíhala na přístroji Agilent 7100 CE (Agilent) s detektorem s diodovým polem; snímáno bylo celé spektrum, vyhodnocováno bylo při vlnových délkách 200, 210 a 215 nm.

Pro separace byla použita křemenná kapilára (Polymicro) o vnitřním průměru 50 μm , vnějším průměru 363 μm , délce 33 cm a efektivní délce 24,5 cm. Před prvním použitím byla kapilára kondicionována promytím 0,1 mol/l hydroxidem sodným po dobu 10 minut a deionizovanou vodou (Millipore, 18 $\text{M}\Omega\text{cm}$) po dobu 10 minut. Mezi analýzami byla kapilára promývána 0,1 mol/l NaOH 2 minuty, deionizovanou vodou 2 minuty a puftrem po dobu 3 minut.

Pracovní elektrolyty byly připravovány navážením vypočteného množství pevné látky a jejím rozpuštěním v deionizované vodě. V případě úpravy pH bylo toto následně upravováno titrací roztokem KOH za kontinuálního měření pH pomocí pH metru (WTW). Aditiva byla přidávána do pufru po titraci pH. CTAB byl použit pro obrácení směru EOF, a to v koncentraci 10 mg/ml. Zásobní roztok NaCl, KClO_3 a KClO_4 byl připraven o koncentraci 10^{-2} mol/l v pufru a byl dále ředěn podle potřeby.

4. Výsledky a diskuze

Cílem této práce bylo nalézt vhodný pufr a podmínky pro analýzu modelových anorganických iontů obsahujících chlor (chloridy, chlorečnany, případně chloristany) pro jejich analýzu ve spojení CE-ICP-MS. Tyto ionty byly vybrány jako modelové z toho důvodu, že neposkytují dostatečnou odezvu v ICP-MS (nicméně teoreticky by je bylo možné pomocí ICP-MS sledovat pomocí izotopů ^{35}Cl a ^{37}Cl), ale zároveň je možné je separovat pomocí CE za použití nepřímé UV detekce. Pokud by byly v dostatečně velké koncentraci, mohly by sloužit jako testovací metoda pro použití nepřímé ICP-MS detekce pro budoucí analýzu např. malých organických kyselin. Nicméně pro optimalizaci byla nejprve využita klasická UV (nepřímá) detekce.

CE-UV metody pro analýzu Cl^- , ClO_3^- a ClO_4^- s využitím nepřímé detekce byly již mnohokrát publikovány [53, 54]. Jako nejdůležitější se jeví využít správného vizualizujícího iontu (UV próby) a obrácení směru EOF, nejčastěji pomocí kationtového tenzidu. Z pohledu ICP-MS je nutné, aby v roztoku byl přítomen vizualizující ion, který bude dostatečně „viditelný“ v ICP-MS. Naštěstí, standardní UV proubou pro nepřímou detekci je chroman, který je použitelný i v případě analýzy zmíněných anorganických iontů. Z tohoto důvodu bylo jako první studováno využití chromanu jako základního elektrolytu. Na druhou stranu, tradiční koncentrace chromanu v nepřímé UV detekci jsou v rozmezí kolem 5 – 20 mM, což je z pohledu ICP-MS extrémní hodnota, která by vedla k zanešení iontového zdroje a neopakovatelnosti jakýchkoliv analýz. Koncentrace, které by byly z pohledu ICP-MS použitelné se pohybují v řádech cca 10^{-6} mol/l (dochází ještě k ředění eluentu z CE pomocnou kapalinou). Nicméně tyto koncentrační hladiny nejsou zase schůdné z pohledu simultánní UV nepřímé detekce (kterou by bylo dobré zařadit do spojení „pro kontrolu“). Z tohoto pohledu tedy bylo uvažováno o možnosti využití směsných elektrolytů obsahujících dvě UV próby (jednu pro ICP-MS obsahují kov a jednu pro UV detekci, která bude pro ICP-MS „neviditelná“, např. nebude obsahovat kov).

Na základě pilotních experimentů bylo zjištěno, že v případě použití nepřímé UV detekce a systému chromanu se na záznamech poměrně hodně vyskytují tzv. systémové zóny, což jsou zóny, které odpovídají migraci různých rozhraní v elektroforéze, blíže viz např. [55-57]. Tyto systémové zóny mohou rušit vlastní detekci tím, že překrývají zóny analytů, případně znesnadňují identifikaci píků. Naštěstí existuje volně dostupný software (Peakmaster) [58], který na základě řešení rovnic popisujících elektromigraci, predikuje mobility analytů i mobility systémových zón (tzv. eigenmobility). Z tohoto důvodu byl tento

software využít pro studium migrace zvolených analytů v modelových elektrolytových systémech.

4.1. Chroman draselný

Jak již bylo uvedeno, nejprve proběhlo modelování v programu Peakmaster (verze 5.4.), aby bylo zjištěno, které podmínky by měly být nejvhodnější k separaci z hlediska možné interference systémovou zónou. Zejména se jedná o vliv pH a koncentrace BGE. Výsledky modelování s vlivem pH jsou v tabulce 2 a výsledky modelování s vlivem koncentrace BGE jsou v tabulce 3 a 4. Jako analyty byly zvoleny Cl^- , ClO_3^- a ClO_4^- , rovněž byla vypočtena mobilita CrO_4^{2-} (mobilita vizualizujícího iontu by měla být podobná jako mobility analytů). Hodnoty pH byly nastavovány změnami koncentrace H_2CrO_4 a KOH v programu Peakmaster, tak aby bylo v roztoku přítomno stále 10 mM K_2CrO_4 (v případě tab. 2). Mobilita další systémové zóny blízka nule není zaznamenána.

Tabulka 2. Tabulka hodnot získaných modelováním v Peakmasteru

pH	eigenmobilita	Cl^-	ClO_3^-	ClO_4^-	CrO_4^{2-}
2,115	165,48	-71,92	-30,01	-63,13	-51,31
2,405	207,65	-72,39	-36,95	-63,57	-52,59
2,800	255,26	-72,71	-43,19	-63,87	-53,45
3,375	279,76	-72,89	-47,25	-64,03	-53,91
4,056	122,27	-72,94	-48,54	-64,08	-54,10
4,339	16,80	-72,95	-48,71	-64,09	-54,19
4,554	-30,85	-72,95	-48,78	-64,10	-54,28
4,755	-50,90	-72,96	-48,83	-64,10	-54,42
5,064	-61,63	-72,96	-48,88	-64,11	-54,78
5,532	-63,18	-72,97	-48,93	-64,13	-56,02
6,001	-60,37	-72,99	-48,98	-64,16	-58,63
6,472	-57,25	-72,99	-49,02	-64,18	-62,29
7,022	-55,23	-73,00	-49,04	-64,19	-65,64
7,498	-54,63	-73,00	-49,05	-64,19	-66,99
8,077	-55,39	-73,00	-49,05	-64,19	-67,57
8,549	-63,18	-73,00	-49,05	-64,19	-67,72
9,081	-110,17	-73,00	-49,05	-64,20	-67,77
9,612	-156,83	-73,00	-49,05	-64,19	-67,78
10,054	-163,62	-73,00	-49,04	-64,19	-67,77
10,571	-161,70	-73,00	-49,02	-64,17	-67,74
11,045	-153,95	-72,93	-48,97	-64,12	-67,62

hodnoty mobilit v $10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$

Z této tabulky vyplývá, že v rozmezí pH cca. 5-9 má systémová zóna mobilitu (eigenmobilitu) mezi mobilitami analytů tzn., že může dojít k interferenci s analyty. Zároveň

je vidět, že mobility chloridů a chloristanů se příliš neliší z důvodů jejich velice nízkých hodnot pKa. Naopak v případě chlorečnanů je vidět určitý posun díky pKa kyseliny kolem 2 (dle databáze programu Peakmaster). Rovněž je vidět změna mobility vizualizujícího kationtu (chromanu). Nicméně obecně by bylo možné chroman použít pro všechny zmíněné systémy.

Tabulka 3. Tabulka vlivu koncentrace na systémovou zónu

c K₂CrO₄ (mol/l)	pH	iontová síla	eigenmob.
200	9,393	599,82	-48,49
100	9,334	299,91	-64,63
50	9,272	149,95	-80,96
25	9,199	74,968	-95,51
10	9,081	29,982	-110,17
5	8,975	14,988	-117,69
1	8,689	2,995	-126,69
0,1	8,225	0,298	-129,50
0,01	7,735	0,029	-122,40

hodnoty mobilit v $10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$

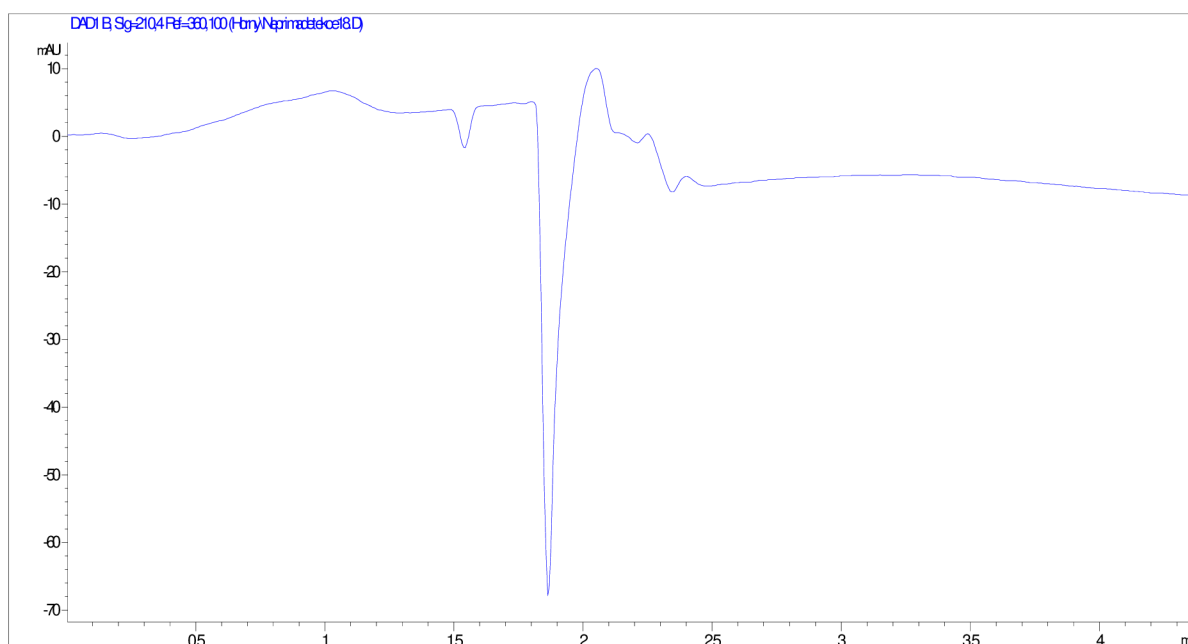
Tabulka 4. Tabulka vlivu koncentrace na systémovou zónu 2

c K₂CrO₄ (mol/l)	pH	iontová síla	1. eigenmobilita	2. eigenmobilita
0,001	7,281	0,003	8,72	-71,76
0,0001	7,047	0,0004	68,40	-54,32
0,00001	7,005	0,0001	76,13	-72,22

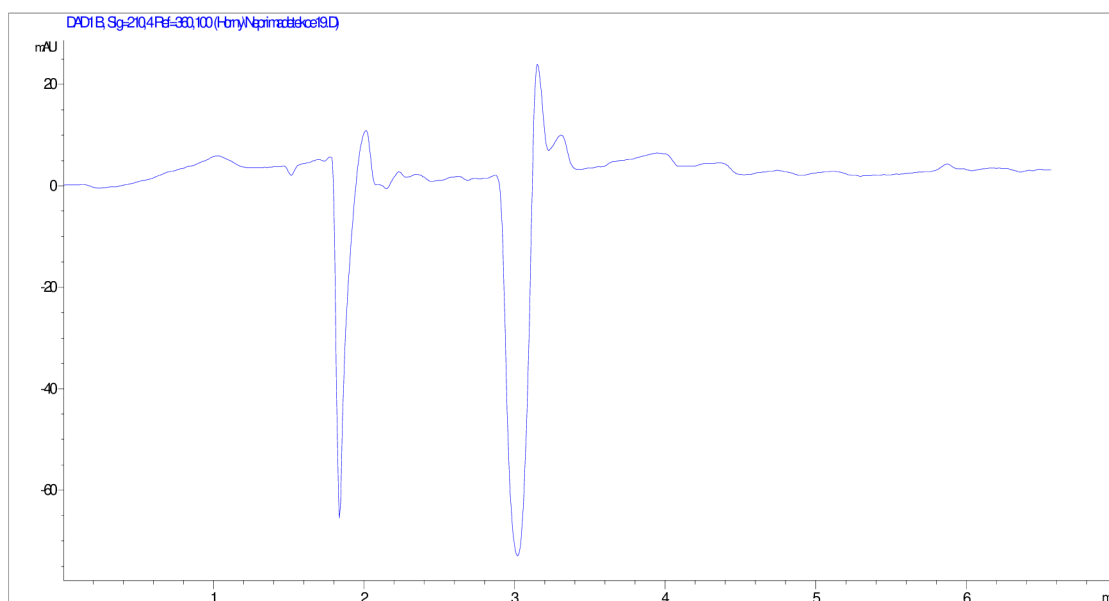
hodnoty mobilit v $10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$

Z výsledku modelování lze vidět, že se snižující se koncentrací K₂CrO₄ dochází, jak k úpravě pH a tím i k úpravě mobility systémové zóny (druhá systémová zóna má mobilitu blízkou nule, Tab. 3), tak v případě velmi nízkých koncentrací k „mobilizaci“ druhé systémové zóny – objevují se dvě systémové zóny, každá se svojí vlastní poměrně velkou mobilitou. Toto je zásadní poznatek, protože někdy jsou systémové zóny používány v praxi jako markery EOFu. V praxi to znamená, že se nadávkuje voda, případně zředěný elektrolyt a v nepřímé UV detekci se pozoruje negativní pík, který by měl odpovídat migraci neutrálních látek („vody“). Toto platí nicméně pouze pro vyšší koncentrace chromanu, kdy jedna ze systémových zón má mobilitu blízkou nule. V případě velmi malých koncentrací (Tab. 4) by byl pík „vody“ viděn v oblasti neodpovídající neutrálním látkám.

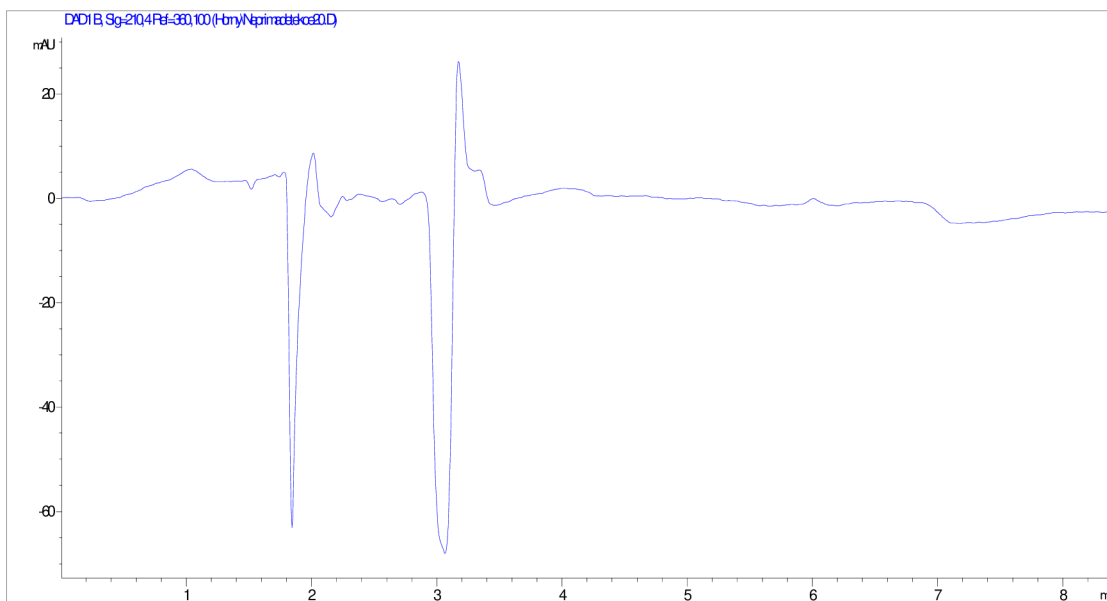
Tyto skutečnosti byly ověřeny separací při pH 9,5; 10,0 a 10,5 v 0,1 mol/l a 10^{-4} mol/l K_2CrO_4 . Při separacích bylo použito napětí -15 kV, které bylo vloženo postupně během první minuty separace. Jako modelové analyty byly použity NaCl a $KClO_3$ v koncentracích 10^{-3} mol/l. Jako modelový analyt nebyl použit $KClO_4$ jelikož při jeho rozpouštění v pufru vznikal zákal (suspenze) a to není vhodné pro dávkování do kapiláry (nerozpuštěné krystalky by mohly ucpat kapiláru). Všechny tyto separace jsou uvedeny v následujících grafech 1-5.



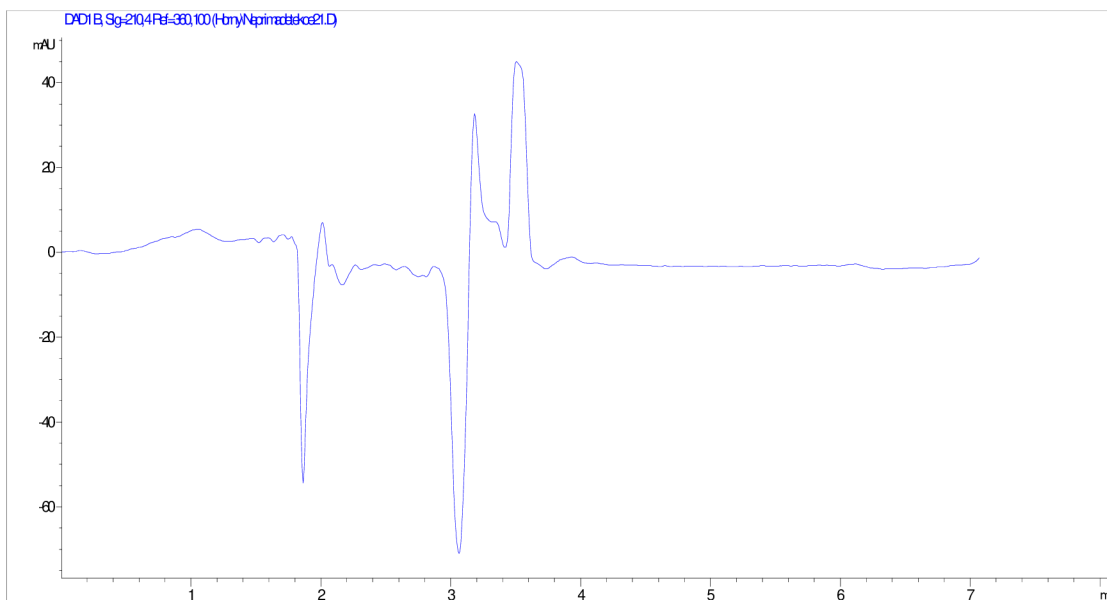
Graf 1 Analýza v 0,1 mol/l K_2CrO_4 pH 9,5



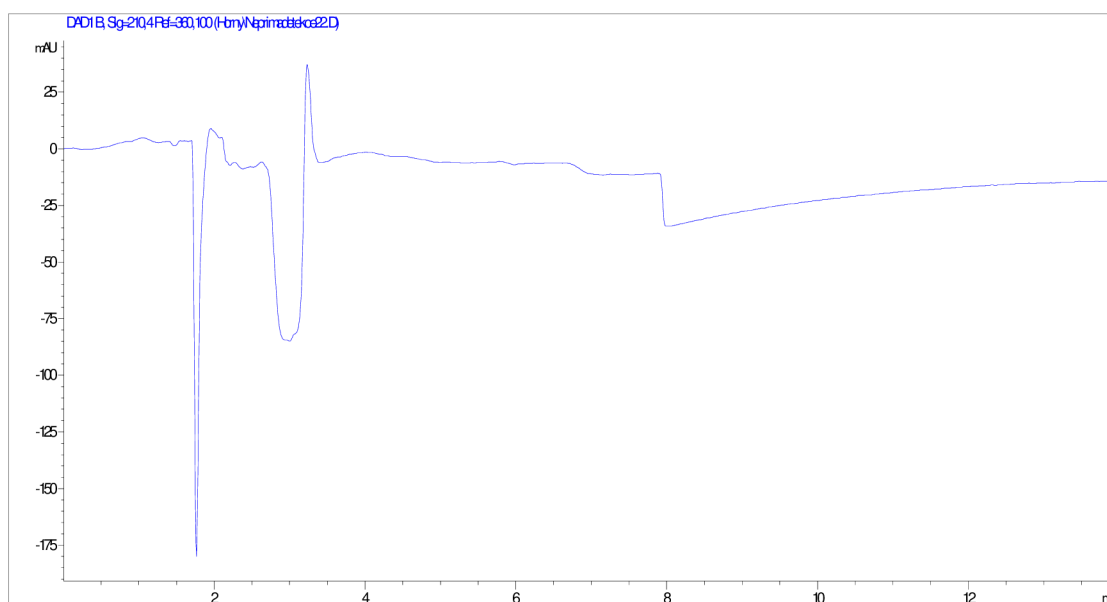
Graf 2. Analýza v 10^{-4} mol/l K_2CrO_4 pH 9,5



Graf 3. Analýza v 10^{-4} mol/l K_2CrO_4 pH 9,5



Graf 4. Analýza v 10^{-4} mol/l K_2CrO_4 pH 10,0



Graf 5 Analýza v 10^{-4} mol/l K_2CrO_4 pH 10,5

Z výsledku separací lze usuzovat na potvrzení předpokladů z výsledků modelování. Na grafech 10^{-4} mol/l K_2CrO_4 lze jasně vidět dvě systémové zóny kolem 2. a 3. minuty.

Nicméně v případě použití směsi chromanu a organického vizualizujícího iontu (pro duální nepřímou ICP-MS a UV detekci) může v ICP-MS dojít k poměrně zásadnímu problému, protože bude docházet k interferenci signálu nejzastoupenějšího ^{52}Cr s $^{40}Ar^{12}C$ [59]. Z tohoto důvodu se jeví použití chromanu dohromady s další organickou UV próbou jako nepříliš vhodné.

Na druhou stranu v 6.B skupině Periodické tabulky prvků se kromě chromu nachází i molybden a molybdenany jsou standardně dostupné látky, které by bylo možné použít místo chromanů. Navíc molybden má šest stabilních izotopů (^{92}Mo , ^{94}Mo , ^{95}Mo , ^{96}Mo , ^{97}Mo , ^{98}Mo) a interference v ICP-MS nepředstavují vážnější problém [60]. Navíc molybdenan byl už dokonce použitý pro nepřímou UV detekci iontů. [61, 62]

4.2. Molybdenan draselný

Znovu bylo provedeno modelování v programu Peakmaster (verze 5.4.) jehož výsledky lze vidět v tabulce 5. Kyselina molybdenová není v databázi programu, a proto byla do programu vložena s odhadem pKa hodnot a hodnot mobilit z literatury [60, 61] – pKa: 3,93 a 4,37; mobility: 71 a 45 (10^{-9} m²V⁻¹s⁻¹). Hodnoty pH byly vypočteny na základě změn koncentrací kyseliny molybdenové a KOH tak, aby bylo v roztoku stále přítomno

nejméně 10 mM K_2MoO_4 . Je opět zaznamenána pouze mobilita jedné systémové zóny, mobilita druhé systémové zóny byla až na pH 4,061 blízka nule (v tomto pH byla mobilita druhé systémové zóny rovna číslu 1,78).

Tabulka 5. Tabulka hodnot pro K_2MoO_4 získaných z Peakmasteru

pH	eigenmobilita	Cl ⁻	ClO ₃ ⁻	ClO ₄ ⁻	MoO ₄ ²⁻
2,905	41,17	-73,96	-45,16	-65,05	-4,17
3,540	11,90	-74,19	-48,81	-65,27	-15,78
4,061	-6,37	-74,23	-49,68	-65,32	-35,54
4,453	-17,27	-73,35	-49,20	-64,52	-48,42
4,998	-28,97	-72,84	-48,91	-64,09	-55,77
5,521	-34,46	-72,71	-48,84	-63,93	-57,63
5,997	-36,37	-72,67	-48,82	-63,90	-58,12
6,570	-37,27	-72,65	-48,81	-63,89	-58,29
6,993	-38,39	-72,65	-48,81	-63,88	-58,33
7,524	-49,08	-72,65	-48,81	-63,88	-58,35
8,023	-101,51	-72,65	-48,81	-63,88	-58,35
8,522	-153,89	-72,65	-48,80	-63,88	-58,35
8,958	-163,84	-72,65	-48,80	-63,88	-58,35
9,573	-165,03	-72,65	-48,80	-63,88	-58,35

hodnoty mobilit v $10^{-9} m^2V^{-1}s^{-1}$

Z dat je vidět, že pH elektrolytu musí být nejméně kolem 4,5 – 5,0, jinak bude mobilita molybdenanu příliš nízká pro jeho efektivní použití jako UV próby. Dále je vidět, že v případě pH 7,5 dochází k interferenci systémové zóny s analyty.

Opět byl zkoumán i vliv koncentrace, jehož výsledky jsou v tabulce 6.

Tabulka 6. Tabulka hodnot pro vliv koncentrací K_2MoO_4 získaných z Peakmasteru

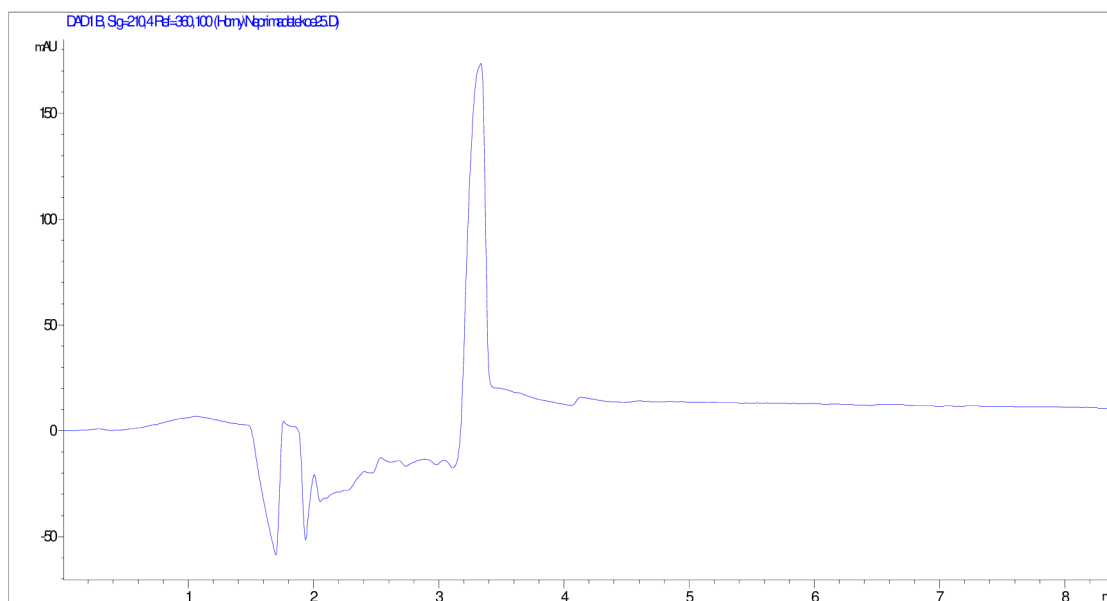
K_2MoO_4	pH	iontová síla	1. eigenmobilita	2. eigenmobilita
200	8,333	599,98	-41,47	—————
100	8,274	299,99	-57,34	—————
50	8,213	150,00	-73,38	—————
25	8,140	75,00	-87,59	—————
10	8,023	30,00	-101,51	—————
5	7,919	15,00	-107,97	—————
1	7,642	3,00	-109,64	—————
0,1	7,250	0,30	-60,08	—————
0,01	7,045	0,03	42,12	-2,24
0,001	7,005	0,00	74,42	-11,65
0,0001	7,001	0,00	76,55	-46,45
0,00001	7,000	0,00	76,24	-67,37

hodnoty mobilit v $10^{-9} m^2V^{-1}s^{-1}$

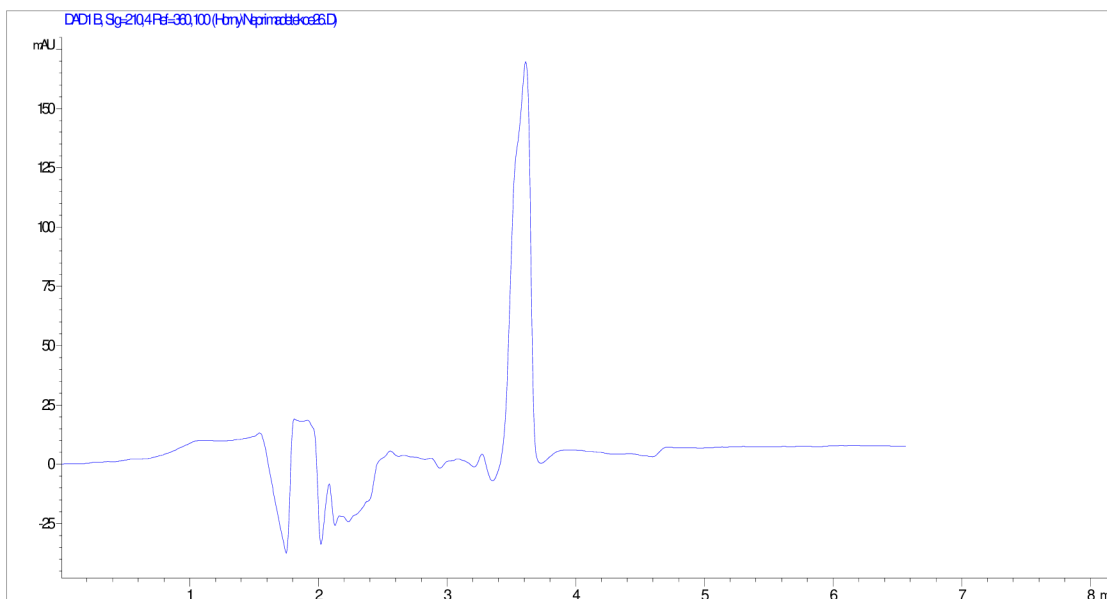
Podobně jako v případě chromanu, i v případě molybdenanu dochází snižováním koncentrace k podstatné změně v pH a následně i k „mobilizaci“ 2. systémové zóny (proškrtnutí v tabulce 6 znamená, že mobilita této zóny je blízká nule). Poměrně zásadní informací je rovněž to, že mobilita 2. systémové zóny je při velmi nízkých koncentracích velmi podobná mobilitám analytů (-49 až $-64 \times 10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$). Mohlo by tedy docházet k interferencím v migraci analytů a systémových zón.

Zároveň systém molybdenanu při velmi alkalických pH již nepufruje, takže experimentální nepřesnosti (např. přítomnost vzdušného CO_2 a jeho vliv na pH pufru, resp. na KOH) mohou hrát naprosto zásadní roli v provedení těchto analýz.

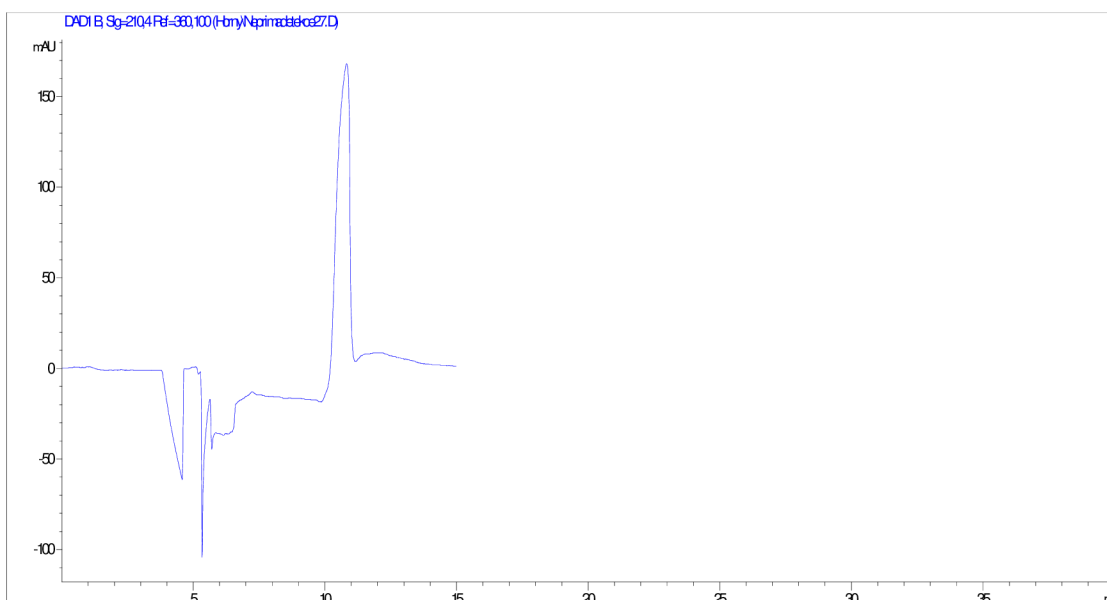
Použitelnost K_2MoO_4 jako BGE byla poté ověřena separací. Byl použit 10mM K_2MoO_4 při pH 9,0; vložené napětí bylo -15 kV během první minuty separace a jako modelové analyty byly použity Cl^- a ClO_3^- . Výsledek separace lze vidět na grafu 6 a 7. Na grafu 8 lze vidět separaci při totožných podmínkách jen bylo změněno vložené napětí na -5 kV .



Graf 6 Analýza v 10mM K_2MoO_4 při pH 9,0; -15KV



Graf 7 Analýza v 10mM K_2MoO_4 při pH 9,0; -15KV



Graf 8 Analýza v 10mM K_2MoO_4 při pH 9,0; -5KV

Separace vycházely v podstatě podle předpokladů získaných z Peakmasteru, ale jak již bylo psáno, mírné změny v koncentracích u 10 mM K_2MoO_4 + KOH vedly k velkým změnám v pH.

4.3. Molybdenan draselný a kyselina ftalová

Dalším krokem v rámci optimalizace složení elektrolytu bylo studium možnosti přídavku organické UV próby do elektrolytu obsahujícího molybdenan. Jako potenciálně vhodná próba se z pohledu elektroforézy jeví kyselina ftalová (pro její časté použití). Výhodou této kyseliny je zároveň, že je ve formě volné kyseliny, takže do systému nepřináší

další kation. Elektrolytový systém na bázi „kyseliny molybdenové“, kyseliny ftalové a KOH bude mít tři systémové zóny, jelikož má tři složky elektrolytu.

Opět bylo provedeno modelování v Peakmasteru. Byly počítány koncentrace 10 mM a 0,001 mM K_2MoO_4 s přidavkem nejméně 10 mM kyseliny ftalové (pKa = 2,95 a 5,41; databáze programu Peakmaster). Výsledky modelování lze vidět v tabulkách 7 a 8. Mobility a pKa hodnoty kyseliny molybdenové byly nastaveny, jak je uvedeno v předchozí kapitole. Změny pH od pH 4,5 byly nastavovány pomocí koncentrace KOH. Při vysokých hodnotách pH dochází opět k velmi malým přidávkům KOH, které mění extrémně pH (molybdenan ani kys. ftalová už nepufují).

Tabulka 7. Výsledky modelování v Peakmasteru pro 10mM K_2MoO_4

c k. ftalová (mM)	pH	1. eigenm	2. eigenm	3. eigenm	Cl ⁻	ClO ₃ ⁻	ClO ₄ ⁻	MoO ₄ ²⁻	k. ftalová
80,000	2,499	59,17	0,00	-1,77	-71,51	-38,23	-62,79	-1,66	-6,79
35,000	2,999	36,73	0,00	-5,92	-71,89	-44,58	-63,14	-5,08	-13,35
20,000	3,500	12,64	-0,28	-19,04	-72,10	-47,12	-63,33	-14,44	-19,36
10,000	4,039	0,73	-7,01	-31,56	-72,35	-48,18	-63,58	-33,84	-23,38
10,000	4,526	0,13	-21,83	-33,93	-71,50	-47,77	-62,82	-47,76	-25,88
10,000	4,993	0,04	-26,90	-40,07	-70,98	-47,45	-62,35	-52,36	-29,55
10,000	5,515	0,01	-25,40	-44,12	-70,57	-47,17	-61,98	-53,33	-34,18
10,000	5,962	0,00	-24,37	-45,10	-70,37	-47,03	-61,80	-53,37	-36,80
10,000	6,475	0,00	-23,88	-45,44	-70,28	-46,96	-61,71	-53,33	-38,14
10,000	7,009	0,00	-23,82	-45,55	-70,24	-46,94	-61,68	-53,32	-38,61
10,000	7,541	0,00	-25,09	-45,78	-70,23	-46,93	-61,67	-53,31	-38,75
10,000	8,052	0,00	-37,31	-45,60	-70,23	-46,93	-61,67	-53,31	-38,79
10,000	8,501	0,00	-45,58	-84,43	-70,23	-46,93	-61,67	-53,31	-38,80
10,000	9,024	0,00	-45,58	-135,27	-70,23	-49,92	-61,67	-53,31	-38,81
10,000	9,514	0,00	-45,58	-143,85	-70,23	-46,92	-61,67	-53,31	-38,81
10,000	10,015	0,00	-45,57	-144,32	-70,23	-46,92	-61,67	-53,30	-38,80
10,000	10,509	0,00	-45,55	-142,76	-70,22	-46,91	-61,66	-53,29	-38,78

hodnoty mobilit v $10^{-9} m^2V^{-1}s^{-1}$

Tabulka 8. Výsledky modelování v Peakmasteru pro 0,001 mM K_2MoO_4

c k. ftalová	pH	1. eigenm	2. eigenm	3. eigenm	Cl ⁻	ClO ₃ ⁻	ClO ₄ ⁻	MoO ₄ ²⁻	k. ftalová
10,000	2,551	74,43	0,00	-1,86	-76,08	-41,45	-67,00	-1,86	-7,81
10,000	3,069	80,82	-0,02	-5,91	-74,90	-47,16	-65,92	-5,91	-15,09
10,000	3,508	53,95	-0,08	-14,62	-74,27	-48,79	-65,34	-14,62	-20,37
10,000	4,019	15,94	-0,49	-33,07	-73,86	-49,33	-64,96	-33,07	-24,09
10,000	4,503	0,24	-21,83	-48,95	-73,52	-49,35	-64,66	-48,96	-26,87
10,000	5,010	0,05	-28,98	-55,50	-73,02	-49,06	-64,21	-55,50	-31,03

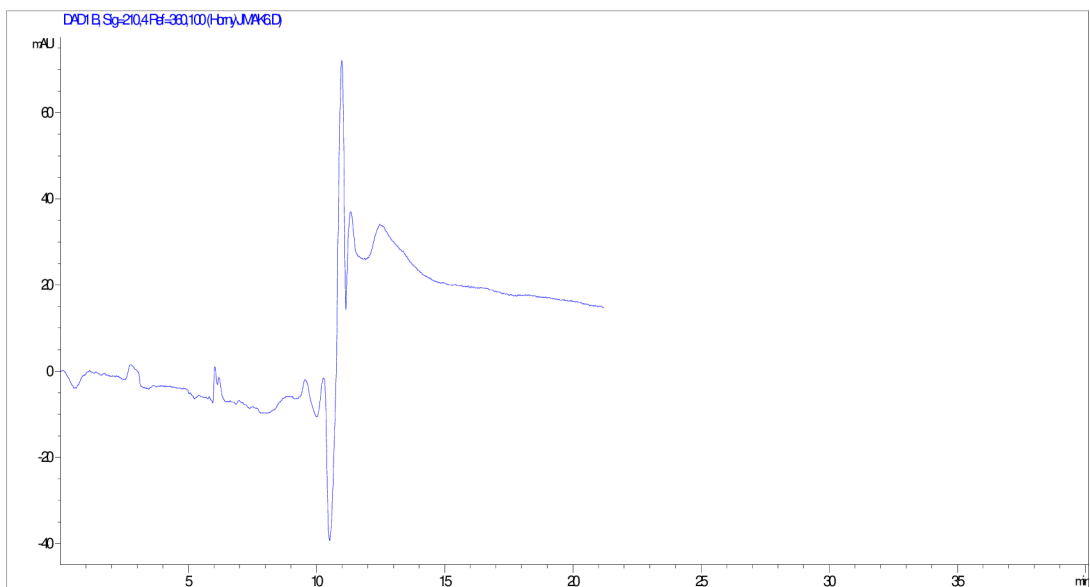
c k. ftalová	pH	1. eigenm	2. eigenm	3. eigenm	Cl ⁻	ClO ₃ ⁻	ClO ₄ ⁻	MoO ₄ ²⁻	k. ftalová
10,000	5,498	0,02	-26,44	-56,63	-72,48	-48,68	-63,72	-56,63	-35,84
10,000	6,004	0,01	-24,54	-56,60	-72,13	-48,43	-63,41	-56,60	-39,20
10,000	6,590	0,00	-23,76	-56,50	-71,98	-48,32	-63,27	-56,50	-40,77
10,000	7,025	0,00	-23,69	-56,47	-71,94	-48,29	-63,24	-56,47	-41,17
10,000	7,502	0,00	-24,67	-56,45	-71,92	-48,28	-63,23	-56,46	-41,32
10,000	7,994	0,00	-34,02	-56,45	-71,92	-48,28	-63,22	-56,45	-41,37
10,000	8,402	0,00	-56,45	-72,29	-71,92	-48,28	-63,22	-56,45	-41,39
10,000	9,007	0,00	-56,45	-149,59	-71,92	-48,27	-63,22	-56,45	-41,40
10,000	9,512	0,00	-56,45	-162,33	-71,91	-48,27	-63,22	-56,45	-41,39
10,000	10,044	0,00	-56,44	-162,37	-71,91	-48,27	-63,22	-56,44	-41,39

hodnoty mobilit v $10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$

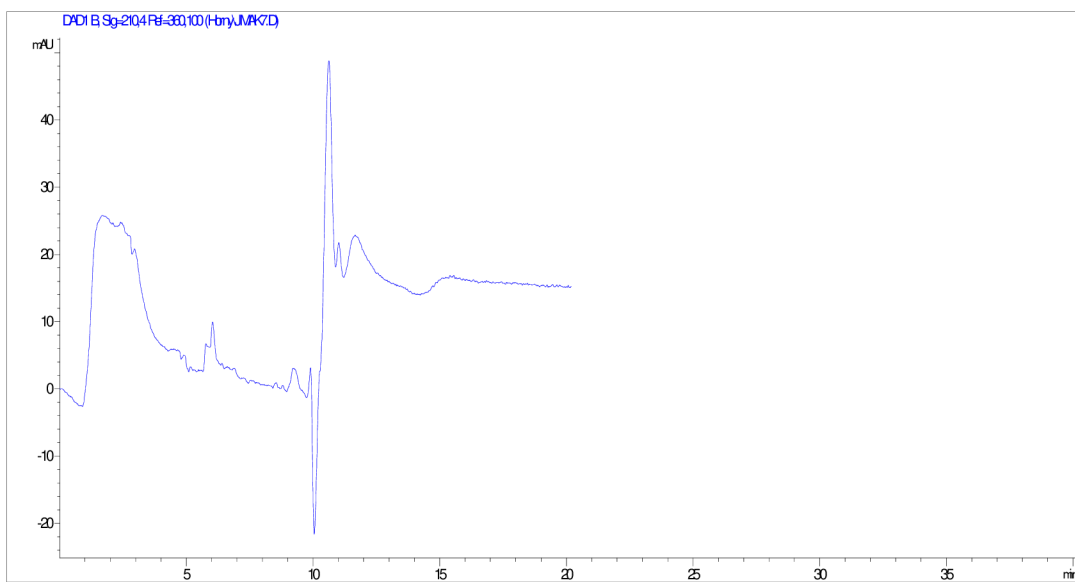
Z výsledků modelování vyplývá pro 10mM K₂MoO₄, že při nízkých pH nejsou mobility vizualizujících ko-iontů dostatečné (ftalát má v celém rozsahu pH menší mobilitu než analyty). Od pH 5,5 je velice podobná mobilita systémové zóny s mobilitou chlorečnanů, takže by mohlo dojít k jejich interferenci. Od pH 9 je jedna mobilita systémové zóny extrémně vysoká, druhá je sice nižší než mobilita chlorečnanu (-45,5 vs. -46,9; $\times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$), nicméně potenciálně by mohlo rovněž dojít k interferenci v případě větších koncentrací. Opět se při vyšších pH nejedná o pufrovaný systém.

Pro 0,001 mM K₂MoO₄ lze předpokládat tyto skutečnosti. Jediné akceptovatelné pH je přibližně 4,0, protože nedochází k interferenci systémových zón a analytů. Od pH 4,5 dochází k interferenci analytů a systémových zón. Do pH 4,0 naopak nejsou mobility vizualizujících iontů dostatečně veliké.

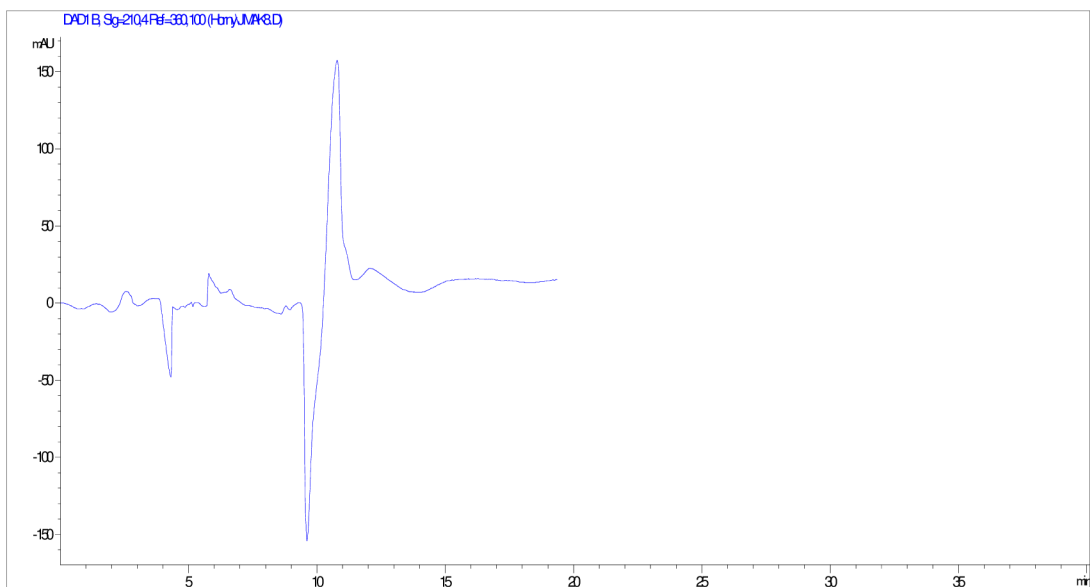
Všechny tyto výše zmíněné předpoklady bylo potřeba ověřit experimentálně. Byl použit BGE 10mM K₂MoO₄ s 10mM kyselinou ftalovou a 0,001mM K₂MoO₄ rovněž s 10mM kyselinou ftalovou. Vložené napětí bylo pro všechny separace -5 kV během první minuty separace. Výsledky separací lze vidět na grafech 9-17.



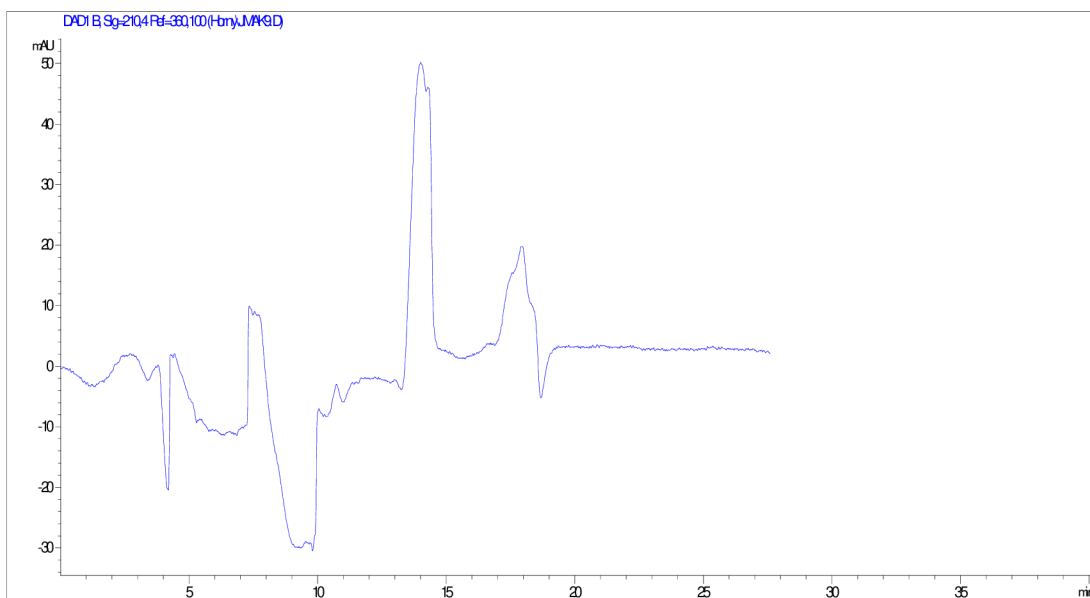
Graf 9. Analýza v 10mM K_2MoO_4 pH 5,5



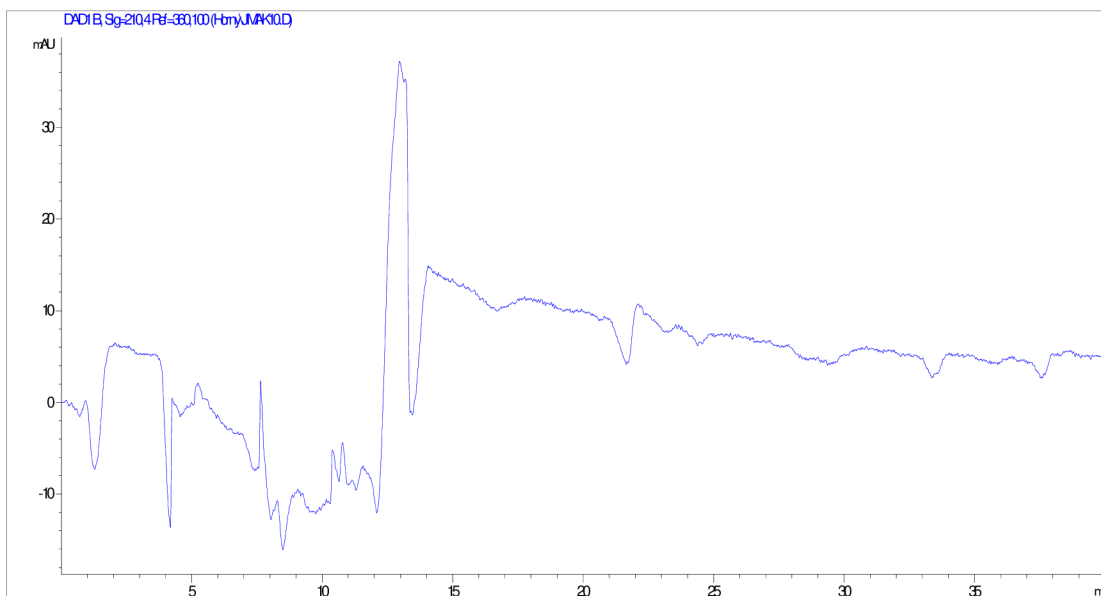
Graf 10. Analýza v 10mM K_2MoO_4 pH 5,5



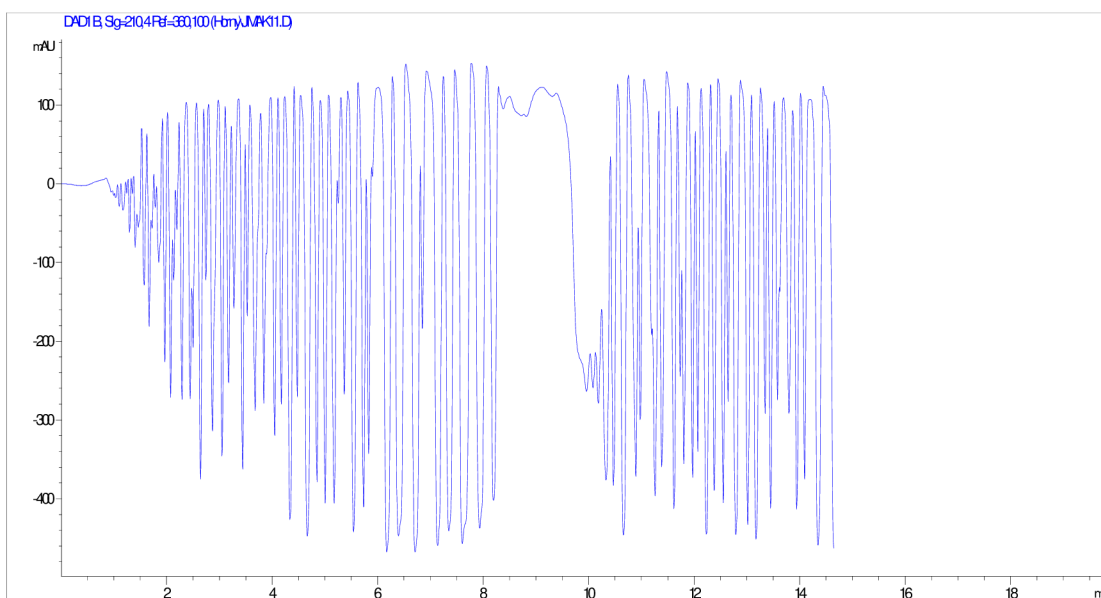
Graf 11. Analýza v 10mM K_2MoO_4 pH 5,5



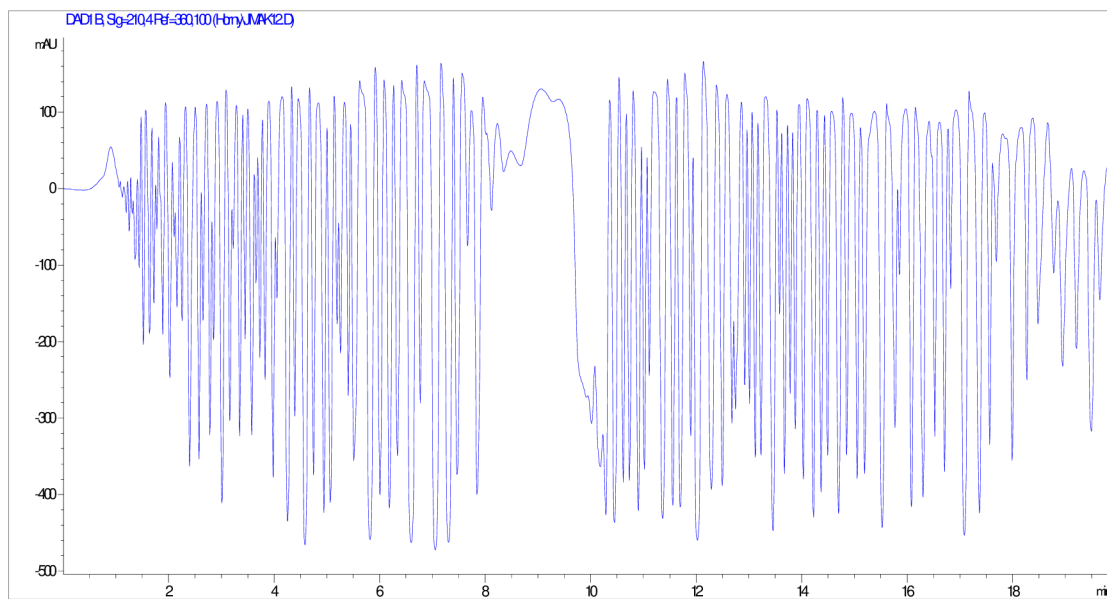
Graf 12. Analýza v 10mM K_2MoO_4 pH 9,5



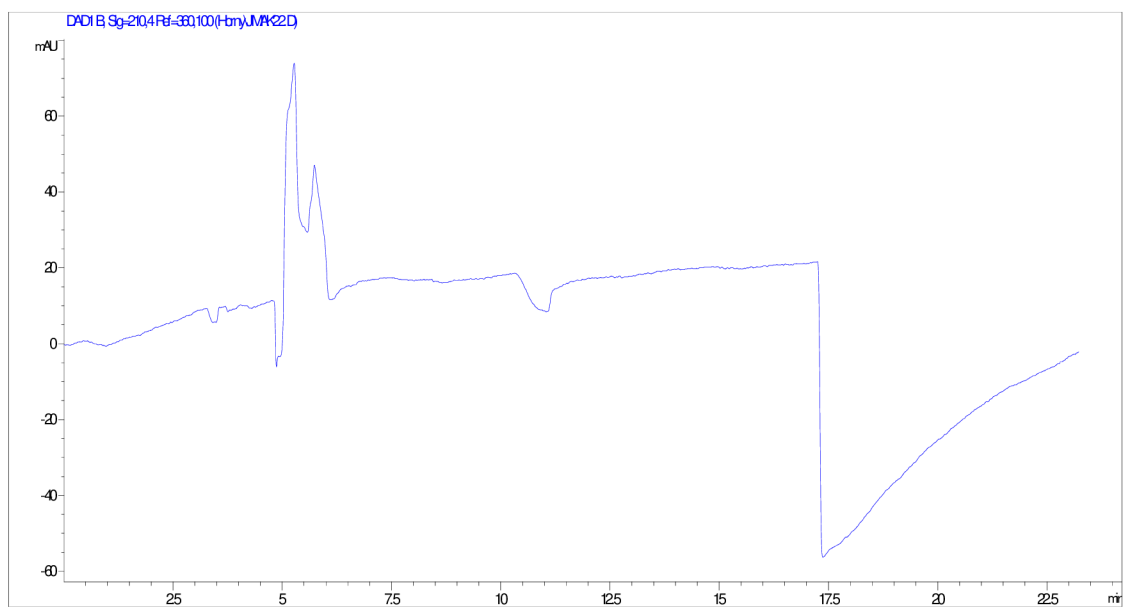
Graf 13. Analýza v 10mM K_2MoO_4 pH 9,5



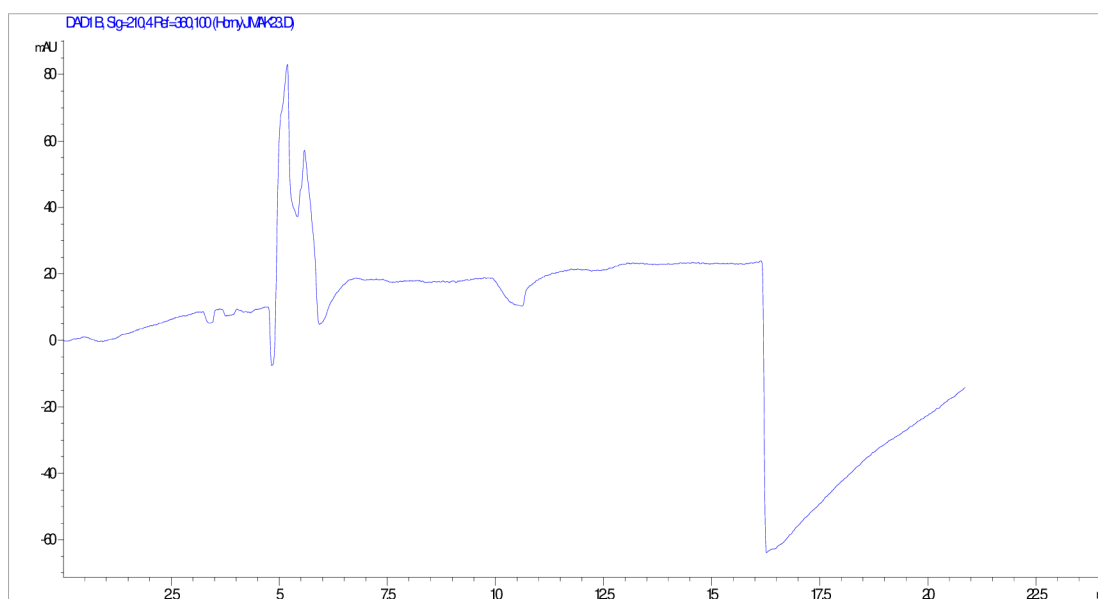
Graf 14. Analýza v 0,001mM K_2MoO_4 pH 8,5



Graf 15. Analýza v 0,001mM K_2MoO_4 pH 8,5



Graf 16. Analýza v 0,001mM K_2MoO_4 pH 4,0



Graf 17. Analýza v 0,001mM K_2MoO_4 pH 4,0

Z výsledků separací lze vidět přibližnou shodu s teoretickým modelováním v Peakmasteru pro 10 mM K_2MoO_4 pH 5,5 i pro 0,001 mM K_2MoO_4 pH 4,0. Nicméně zajímavá je analýza v 0,001 mM K_2MoO_4 pH 8,5, kdy se nepodařilo objasnit příčinu vzniku takového signálu. Ovšem jak lze vidět z výsledků, tato analýza je opakovatelná, tudíž nepředpokládá se nějaká náhodná chyba instrumentace, případně prostředí (např. srážení v elektrolytu, tvorba bublinek apod.). Tudíž je možné, že důvod výsledku této analýzy bude v použitém BGE (procházející proudy byly rovněž opakovatelné, hypoteticky by mohlo jít o tzv. oscilační elektrolyty. [63])

4.4. Molybdenan draselný s kyselinou benzensulfonovou a β -alanin

Z předchozí kapitoly plyne, že pro úspěšnou nepřímou UV-detekci je nutné použití UV próby, která bude mít velmi nízké pKa a zároveň poměrně velkou mobilitu (ideálně jednu pKa hodnotu). Tuto by pak bylo možné zkombinovat s K_2MoO_4 jako ICP-MS próby. Jako dobrá varianta se jeví použití kyseliny benzensulfonové, která má pKa = -2 a mobilitu $-38,7 \times 10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$; (dle databáze programu Peakmaster). Kromě využití jiné UV próby se jeví jako zásadní zajistit i dostatečnou pufrací kapacitu, zejména v bazické oblasti pH. Zde se jako zajímavá alternativa jeví použití β -alaninu, který má pKa hodnoty 3,55 a 10,24.

Na tomto základě bylo provedeno další modelování v programu Peakmaster. Byl vyzkoušen BGE o složení 0,001 mM K_2MoO_4 , 10 mM kyselina benzensulfonová a β -alanin (modifikací přídatku se měnilo pH). Výsledky modelování lze vidět v tabulce 9.

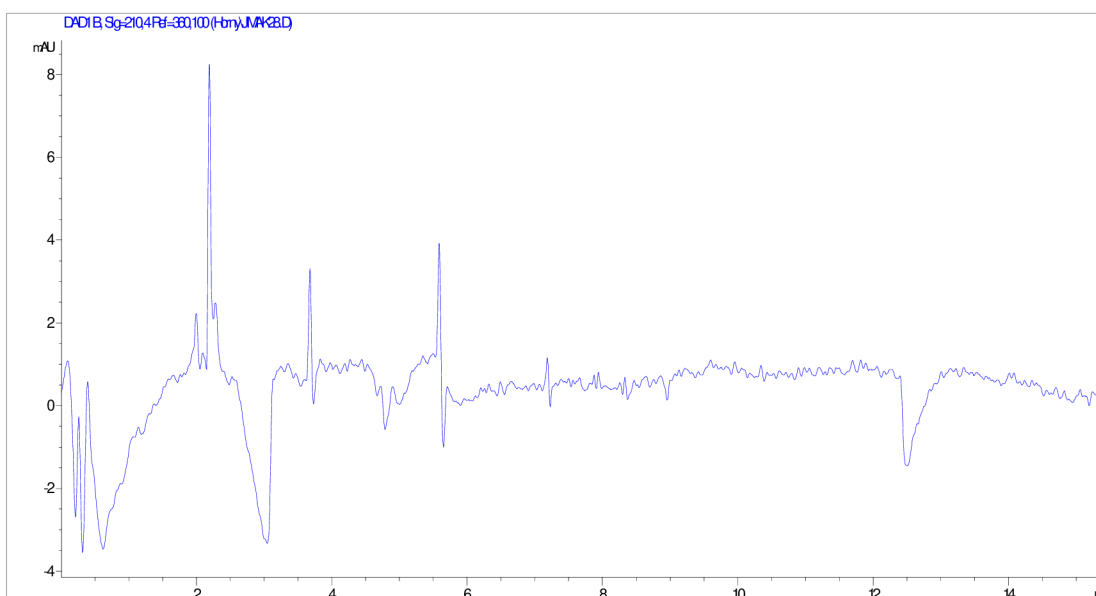
Tabulka 9. Výsledky modelování v peakmasteru pro 0,001mM K₂MoO₄ s kyselinou benzensulfonovou a β- alaninem

c β- alanin (mM)	pH	1. eigenm.	2. eigenm.	3. eigenm.	4. eigenm.	Cl ⁻	ClO ₃ ⁻	ClO ₄ ⁻	MoO ₄ ²⁻	k. benzs.
0,00	2,043	73,13	34,39	0,00	-0,59	-74,16	-28,57	-65,22	-0,59	-35,21
7,00	2,480	86,40	72,00	0,00	-1,60	-74,05	-39,15	-65,13	-1,60	-35,19
12,00	3,000	71,57	52,89	0,00	-5,16	-74,05	-46,10	-65,14	-5,16	-35,20
21,00	3,532	71,36	7,99	0,00	-15,34	-74,07	-48,69	-65,15	-15,34	-35,20
49,00	4,060	71,31	0,80	0,00	-34,75	-74,07	-49,52	-65,16	-34,75	-35,21
120,00	4,506	71,29	0,10	0,00	-49,37	-74,07	-49,75	-65,16	-49,37	-35,21
350,00	4,995	71,28	0,00	-0,01	-56,68	-74,07	-49,84	-65,16	-56,68	-35,21
1100,00	5,500	71,28	0,00	-0,14	-59,09	-74,07	-49,86	-65,16	-59,10	-35,21

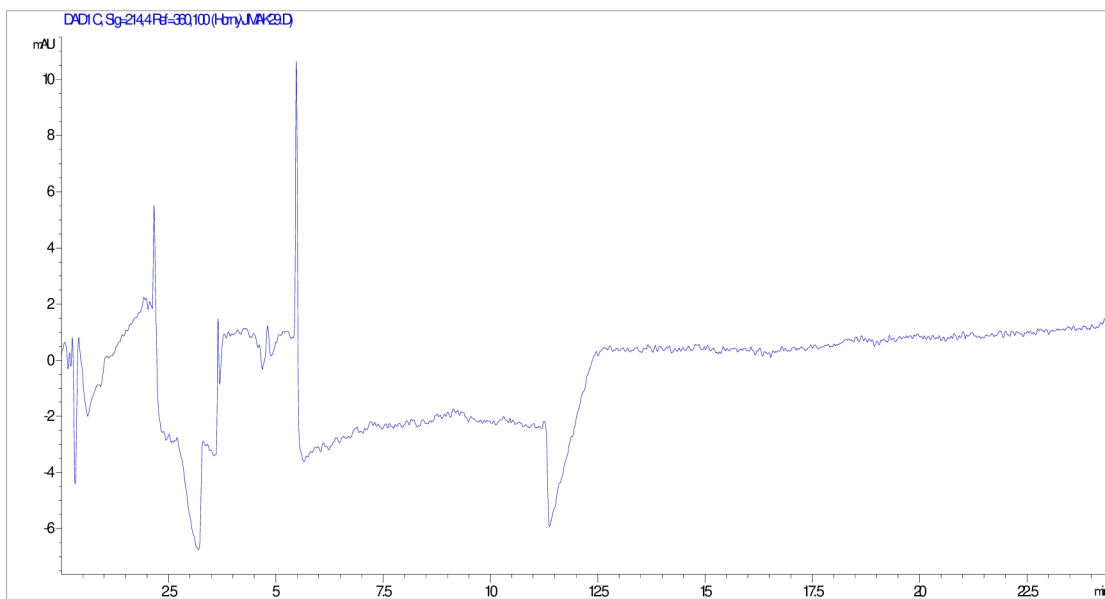
hodnoty mobilit jsou uvedeny v 10⁻⁹ m²V⁻¹s⁻¹

Z tabulky 9 vyplývá, že od pH 4,5 dochází opět k výraznému nárůstu mobility systémové zóny, která tím může interferovat s analyty. Pro dosažení úspěšné separace by bylo vhodné použít pH 4,0, kdy nedochází k interferenci systémových zón s analyty a zároveň jsou mobility vizualizujících iontů dostatečné k detekci anorganických kyselin.

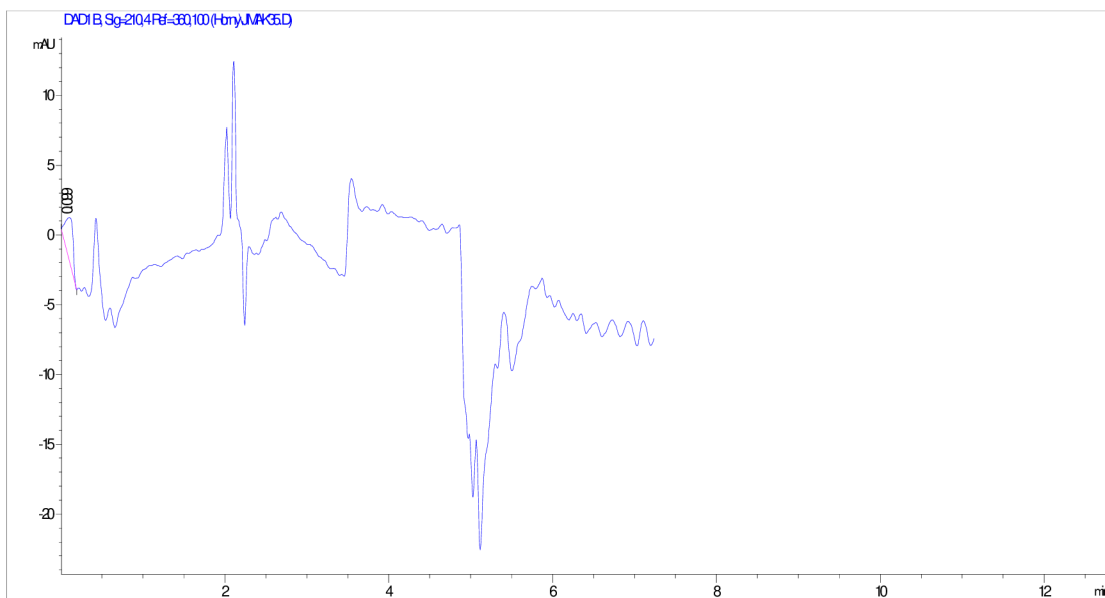
Na základě tohoto modelování byly vyzkoušeny dvě koncentrační hladiny β-alaninu, 25mM při pH 3,76 a 50mM při pH 4,12. Separace v tomto případě proběhly při vloženém napětí -15 kV během první minuty separace. Výsledky separací lze vidět na grafech 18-21.



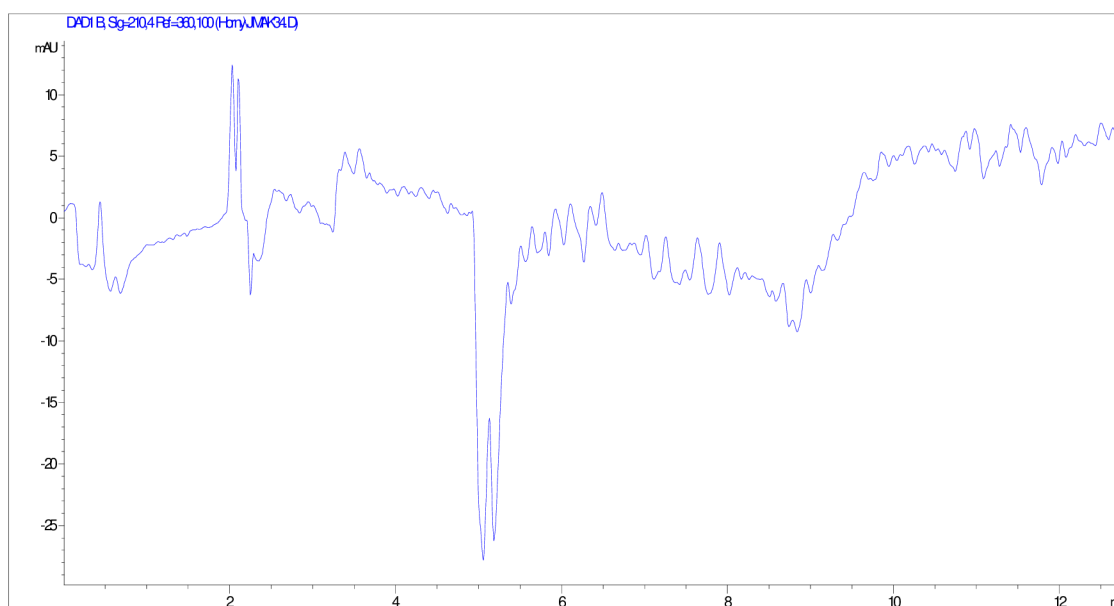
Graf 18. Analýza v 0,001mM K₂MoO₄ s 25mM β- alaninem pH 3,76



Graf 19. Analýza v 0,001mM K_2MoO_4 s 25mM β -alaninem pH 3,76



Graf 20. Analýza v 0,001mM K_2MoO_4 s 50mM β -alaninem pH 4,12

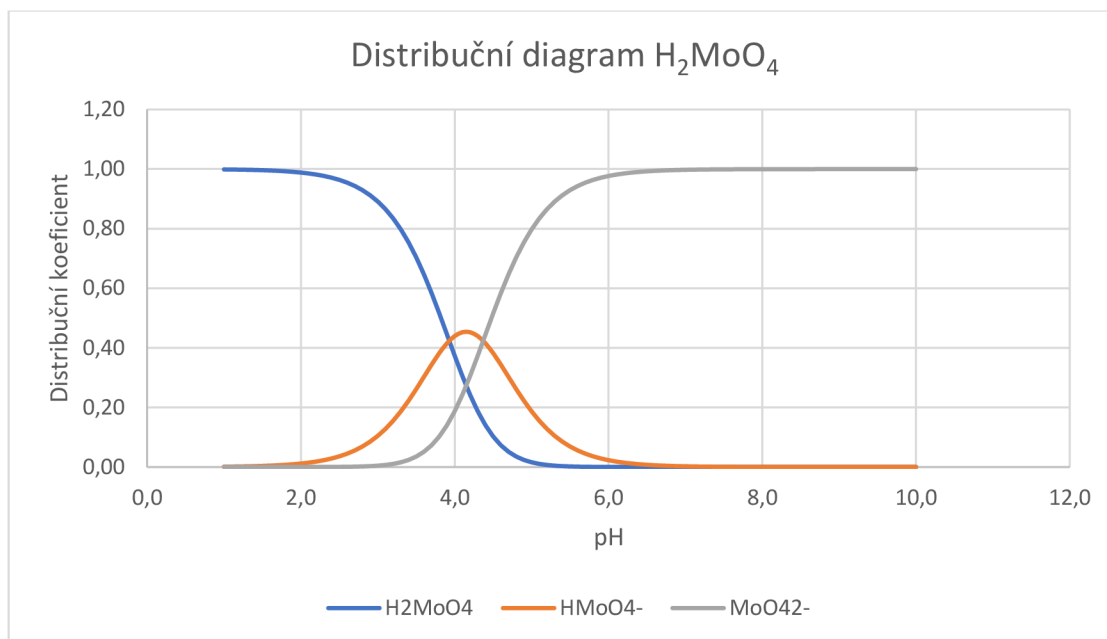


Graf 21. Analýza v 0,001mM K_2MoO_4 s 50mM β -alaninem pH 4,12

Výsledky těchto separací nejsou tak pozitivní jako výsledky separací v předešlých pufrch, pravděpodobně díky nutnosti další optimalizace rychlosti EOF. Nicméně použitý pufr splňuje kritéria použitelnosti v kombinaci s ICP-MS. Zároveň díky přidavku kyseliny benzensulfonové a β -alaninu systém pufruje, což je významná výhoda oproti předcházejícím základním elektrolytům.

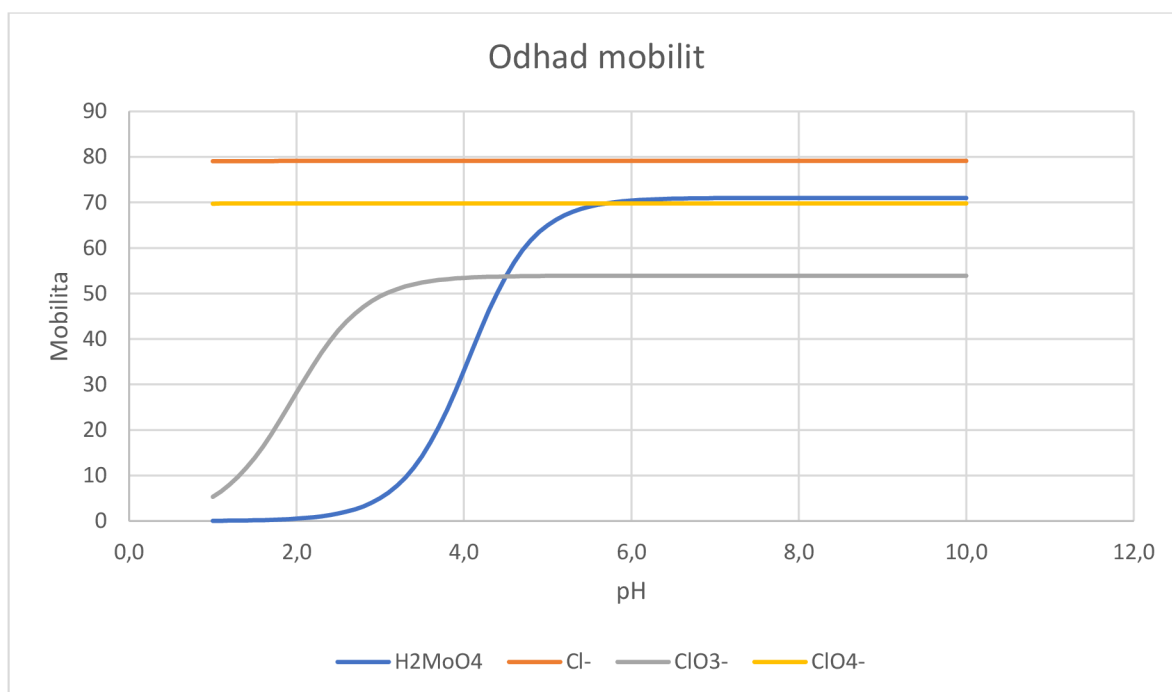
Kromě výše uvedeného je v Tab. 9 pozoruhodná ještě jedna skutečnost – mobility molybdenanu (konc. 0,001 mM) jsou shodné jako mobility 4. systémové zóny. Toto se neprojevuje v případě vyšších koncentrací molybdenanu, nicméně v těchto nízkých koncentracích odpovídá mobilita systémové zóny mobilitě molybdenanu. Teoretické vysvětlení by vyžadovalo hlubší matematickou analýzu rovnic kontinuity popisující daný elektrolytový systém [64] což ale nebylo obsahem této práce.

Nicméně pro obecný problém interference systémové zóny s analyty lze z této závislosti vycházet. Na grafu 22 je uveden distribuční diagram kyseliny molybdenové (výpočet na základě hodnot pKa uvedených dříve: 3,93 a 4,37).



Graf 22. Distribuční diagram H_2MoO_4

Pokud vypočteme odhady mobilit molybdenanu (ze znalostí distribuce forem, viz graf 22, a mobilit jednotlivých forem) a stejně tak odhadneme i mobility zmíněných anorganických kyselin (na základě tabelovaných dat z programu Peakmaster), dostaneme následující graf 23.



Graf 23. Odhad mobilit

Pokud přijmeme tezi, že mobilita molybdenanu je rovna mobilitě systémové zóny, je vidět, že od pH přibližně 4,2 dochází k interferenci nejprve s chlorečnany, následně

s chloristany. Elektrolytový systém pro analýzu chlor-obsahujících anorganických aniontů s velmi nízkou koncentrací molybdenanu by tedy musel pracovat nejvýše okolo pH 4,0. Nicméně toto pH je méně tradiční pro analýzu iontů, takže by bylo nutné ještě studovat efekt rychlosti EOF, a až následně tento systém přenést na CE-ICP-MS.

5. Závěr

Cílem této práce bylo nalézt základní elektrolyt, ve kterém by probíhala separace modelových anorganických iontů v CE a následně by bylo možné spojit CE s ICP-MS. Nejprve bylo třeba nalézt vhodné složení BGE, jeho koncentrace, pH a přídavek dalších aditiv. Pro výběr těch podmínek, které budou vyzkoušeny při separaci na CE bylo použito modelování v programu Peakmaster. Všechny tyto podmínky bylo potřeba optimalizovat s ohledem na budoucí spojení s ICP-MS, kdy určité podmínky, které by byly vhodné pro CE, se jeví jako ne tak vhodné pro ICP-MS.

Bylo dokázáno, že je možné připravit BGE, ve kterém proběhne separace modelových analytů pomocí CE. Nicméně s ohledem na spojení s ICP-MS se jako nejvhodnější jeví BGE o složení 0,001mM K_2MoO_4 s přídavkem 10mM kyseliny benzensulfoftalové a β -alaninem. Takto uspořádaný systém je ovšem ještě v budoucnu nutné otestovat ve spojení s ICP-MS, jestli jsou předpoklady správné.

Seznam použité literatury

- [1] A. Van Schepdael, Capillary electrophoresis as a simple and low-cost analytical tool for use in money-constrained situations, *Trends in Analytical Chemistry* 160 (2023) 116992
- [2] Q. Zhu, G. K. E. Scriba, Analysis of small molecule drugs, excipients and counter ions in pharmaceuticals by capillary electromigration methods – recent developments, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 147 (2018) 425-438.
- [3] F. Foret, L. Krivankova, P. Bocek, *Capillary zone electrophoresis*. VCH, Weinheim, 1993
- [4] Morteza G. Khaledi, *High-performance capillary electrophoresis: theory, techniques and applications*, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1998
- [5] E. Jellum, H. Dollekamp, C. Blessum, Capillary electrophoresis for clinical problem solving: Analysis of urinary diagnostic metabolites and serum proteins, *J. Chromatography B* 683 (1996), 55-65
- [6] R. A. Wallingford, A. G. Ewing, *Capillary electrophoresis*, *Adv. Chromatography* 29 (1989), 1-76
- [7] W. Friedl, E. Kenndler, Limitations of the optimization of the resolution by the buffer pH in capillary zone electrophoresis, *Fresenius J. Anal. Chem.* 348, (1994) 576-582
- [8] W. Friedl, J. C. Reijenga, E. Kenndler, Ionic strength and charge number correction for mobilities of multivalent organic anions in capillary electrophoresis, *J. Chromatography A* 709 (1995) 163-170
- [9] E. Kenndler, P. Jenner, Isotachopheresis in mixed-solvents consisting of water, methanol and dimethylsulfoxide 2. solvation effects on the acid-base and transport properties of cation acids of the ammonium ion type, *J. Chromatography* 390 (1987), 185-197
- [10] J. W. Jorgenson, K. D. Lukacs, Zone electrophoresis in open-tubular glass capillaries, *Anal. Chem.* 53 (1981), 1298-1302
- [11] Z. Krivácsy, A. Gelencsér, J. Hlavay, G. Kiss, Z. Sárvári, Electrokinetic injection in capillary electrophoresis and its application to the analysis of inorganic compounds, *Journal of Chromatography A*, 834 (1999), 21-44
- [12] V. Kasicka, Z. Prusik, B. Gas, M. Stedry, Contribution of capillary coiling to zone dispersion in capillary zone electrophoresis, *Electrophoresis* 16 (1995), 2034-2038
- [13] S. C. Jakobson, R. Hergenröder, L. B. Koutny, R. J. Warmack, J. M. Ramsey, Effects of Injection Schemes and Column Geometry on the Performance of Microchip Electrophoresis Devices, *Anal Chem.* 66 (1994) 1107-1113

- [14] J. W. Jorgenson, K. D. Lukacs, Capillary zone electrophoresis *Science* 222 (1983), 266-272
- [15] J. H. Knox, Thermal effects and band spreading in capillary electro-separation, *Chromatographia* 26 (1988), 329-337
- [16] Ch. Schwer, E. Kenndler, Peak broadening in capillary zone electrophoresis with electroosmotic flow: Dependence of plate number and resolution on charge number, *Chromatographia* 33 (1992), 331-335
- [17] E. Kenndler, Ch. Schwer, Nondependence of Diffusion-Controlled Peak Dispersion on Diffusion Coefficient and Ionic Mobility in Capillary Zone Electrophoresis without Electroosmotic Flow, *Anal. Chem* 63 (1991), 2499-2502
- [18] A. Cifuentes, W. T. Kok, H. Poppe, Capillary electrophoresis using air and helium as cooling fluids, *J. Microcolumn Sep.* 7 (1995), 365-374
- [19] W. G. Kuhr, E. S. Yeung, Optimization of sensitivity and separation in capillary zone electrophoresis with indirect fluorescence detection, *Anal. Chem* 60 (1988), 2642-2646
- [20] S. Wren, Optimization of pH in the electrophoretic separation of 2-, 3-, and 4-methylpyridines, *J. Microcolumn Sep.* 3 (1991), 147-154
- [21] J. L. Beckers, Calculation of the composition of sample zones in capillary zone electrophoresis I. Mathematical model, *J. Chromatography A* 693 (1995) 347-357
- [22] J. L. Beckers, Calculation of the composition of sample zones in capillary zone electrophoresis II. Simulated electropherograms, *J. Chromatography A* 696 (1995) 285-294
- [23] K. Kenndler-Blackholm, S. Popelka, B. Gas, E. Kenndler, Apparent baseline irregularities for neutral markers in capillary zone electrophoresis with electroosmotic flow, *J. Chromatography A* 734 (1996), 351-356
- [24] V. P. Andreev, E. E. Lisin, Investigation of the electroosmotic flow effect on the efficiency of capillary electrophoresis, *Electrophoresis* 13 (1992) 832-837
- [25] J. C. Reijenga, E. Kenndler, Computational simulation of migration and dispersion in free capillary zone electrophoresis: I. Description of the theoretical model, *J. Chromatography* 659 (1994) 403-415
- [26] J. F. K. Huber, Theory of chromatographic process *Fresenius Z. Anal. Chem.* 277 (1975) 341-347
- [27] H. H. Lauer, G. P. Rozing (ed.), *High performance capillary electrophoresis: A Primer*, second ed., Agilent Technologies, Německo 2014
- [28] S. Terabe, K. Otsuka, K. Ichikawa, A. Tsuchiya, T. Ando, Electrokinetic separations with micellar solutions and open-tubular capillaries, *Anal. Chem.* 56 (1984) 111–113

- [29] G. Hancu, A. Rusu, B. Simon, G. Boia, Á. Gyéresi, Simultaneous Separation of Ciprofloxacin, Norfloxacin and Ofloxacin by Micellar Electrokinetic Chromatography, *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 23 (2012) 1889-1894
- [30] S. Terabe, K. Otsuka, T. Ando, Electrokinetic chromatography with micellar solution and open-tubular capillary, *Anal. Chem.* 57 (1985), 834-841
- [31] D. R. Baker, *Capillary electrophoresis*, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1995
- [32] S. Hjerten, High-performance electrophoresis : Elimination of electroendosmosis and solute adsorption, *J. Chromatography* 347 (1985), 191-198
- [33] S. Hjerten, M. Zhu, Adaptation of the equipment for high-performance electrophoresis to isoelectric focusing, *J. Chromatography* 346 (1985), 265-270
- [34] Ch. S. Henry, *Microchip Capillary Electrophoresis: An Introduction*, v knize Ch. Henry, *Microchip Capillary Electrophoresis*, Humana Press, New Jersey, 2006, str. 1-10
- [35] S. Hjerten, J. L. Liao, K. Yao, Theoretical and experimental study of high-performance electrophoretic mobilization of isoelectrically focused protein zones *J. Chromatography* 387 (1987), 127-138
- [36] D. A. Skoog, F. J. Holler, S. R. Crouch, *Principles of instrumental analysis*, Seventh edition, Cengage Learning, Boston, 2018
- [37] V. Datinská, I. Voráčová, U. Schlecht, J. Berka, F. Foret, Recent progress in nucleic acids isotachopheresis, *J. of Separation science* 41 (2018), 2-415
- [38] <https://www.google.com/search?q=capillary+isotachopheresis&sxsrf=APwXEucrYyYwULxGFyxyN536rFxfLZ6Pbw:1681030757509&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=2ahUKEwjViaHJt5z, staženo 15. března 2023>.
- [39] A. G. Ewing, R. A. Wallingford, T. M. Olefirowicz, *Capillary electrophoresis*, *Anal. Chem.*, 61 (1989), 292A–303A
- [40] D. E. Burton, M. J. Sepaniak, M. P. Maskarinec, Analysis of B₆ Vitamers by Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography with Laser-Excited Fluorescence Detection *J. Chrom. Sci.* 24 (1986), 347-351
- [41] A. Gutman, F. T. A. Chen, R. A. Evangelista, N. Cooke, High-Resolution Capillary Gel Electrophoresis of Reducing Oligosaccharides Labeled with 1-Aminopyrene-3,6,8-trisulfonate, *Anal. Biochem.*, 233, (1996), 234-242
- [42] R. A. Wallingford, A. G. Ewing, Amperometric detection of catechols in capillary zone electrophoresis with normal and micellar solutions, *Anal. Chem.* 60 (1988), 258-263

- [43] Y. F. Yik, H. K. Lee, S. F. Y. Li, S. B. Khoo, Micellar electrokinetic capillary chromatography of vitamin B₆ with electrochemical detection, *J. Chromatography* 585 (1991), 139-144
- [44] L. A. Colon, R. Dadoo, R. N. Zare, Determination of carbohydrates by capillary zone electrophoresis with amperometric detection at a copper microelectrode, *Anal. Chem.* 65 (1993), 476-481
- [45] X. Huang, R. N. Zare, S. Sloss, A. G. Ewing, End-column detection for capillary zone electrophoresis, *Anal. Chem.* 63 (1991), 189-192
- [46] X. Huang, J. A. Luckey, M. J. Gordon, R. N. Zare, Quantitative determination of low molecular weight carboxylic acids by capillary zone electrophoresis/conductivity detection, *Anal. Chem.* 61 (1989), 766-770
- [47] P. Jandik, W. R. Jones, Optimization of detection sensitivity in the capillary electrophoresis of inorganic anions, *J. Chromatography* 546 (1991), 431-443
- [48] M. P. Harrold, M. J. Wajtusik, J. Riviello, P. Henson, Parameters influencing separation and detection of anions by capillary electrophoresis, *J. Chromatography* 640 (1993), 463-471
- [49] A. Henshall, M. P. Harrold, J. M. Y. Tso, Separation of inositol phosphates by capillary electrophoresis, *J. Chromatography* 608 (1992), 413-419
- [50] R. Zhang, C. L. Cooper, Y. Ma, Determination of total polyamines in tumor cells by high-performance capillary zone electrophoresis (HPCZE) with indirect photometric detection, *Anal. Chem.* 65 (1993), 704-706
- [51] Y. Xue, E. S. Yeung, Double-beam laser indirect absorption detection in capillary electrophoresis, *Anal. Chem.* 65 (1993), 2923-2927
- [52] F. E. P. Mikkers, F. M. Everaets, T. P. E. M. Verheggen, Concentration distributions in free zone electrophoresis, *J. Chromatography* 169 (1979), 1-10
- [53] V. Pacáková, K. Štulík, Capillary electrophoresis of inorganic anions and its comparison with ion chromatography, *J. Chromatography A* 789 (1997), 169-180
- [54] P. E. Jackson, P. R. Haddad, Capillary electrophoresis of inorganic ions and low-molecular-mass ionic solutes, *Trends in Analytical chemistry* 12 (1993), 231-238
- [55] B. Gaš, E. Kenndler, Electrophoresis and Electrochromatography reviews: Fundamentals, *Electrophoresis* 25 (2004), 3901-3912
- [56] B. Gaš, V. Hruška, M. Dittman, F. Bek, K. Witt, Prediction and understanding system peaks in capillary zone electrophoresis, *J. of separation science* 30 (2007), 1435-1445
- [57] B. Gaš, Electrophoresis: Past, Present and future, *Electrophoresis* 30 (2009), 7-15
- [58] <https://web.natur.cuni.cz/gas/peakmaster.html>, staženo 13. dubna 2023

- [59] K. Tirez, W. Brusten, A. Cluyts, J. Patyn, N. De Brucker, Determination of hexavalent chromium by species specific isotope dilution mass spectrometry and ion chromatography–1,5-diphenylcarbazidespectrophotometry, *J. Anal. At. Spectrom.*, 18 (2003), 922-932
- [60] D. Malinovsky, I. Rodushkin, D. C. Baxter, J. Ingri, B. Öhlander, Molybdenum isotope ratio measurements on geological samples by MC-ICPMS, *International Journal of Mass Spectrometry*, 245 (2005), 94-107
- [61] M. Chovancek, P. Choo, M. Macka, Development of a fully buffered molybdate electrolyte for capillary electrophoresis with indirect detection and its use for analysis of anions in Bayer liquor, *Electrophoresis*, 25 (2004), 437-443
- [62] Y.-S. Fung, K.-M. Lau, Development and validation of analytical methodology using capillary electrophoresis for separation and determination of anions in rainwater, *Talanta*, 45 (1998), 641-656
- [63] M. Riesová, V. Hruška, E. Kenndler, B. Gaš, Electromigration Oscillations Occurring in Ternary Electrolyte Systems with Complex Eigenmobilities, as Predicted by Theory and Ascertained by Capillary Electrophoresis, *J. Phys. Chem. B*, 113 (2009), 12439–12446
- [64] Jan Petr: Osobní sdělení