

UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy

MODIFIKACE KAPILÁRNÍ STĚNY GRAFENEM PRO SEPARAČNÍ APLIKACE

Diplomová práce

Aneta Ptáčková

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Lukáš Lochman, Ph.D.

Hradec Králové, 2021

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové 30.8.2021

Podpis:

Poděkování

Ráda bych poděkovala PharmDr. Lukášovi Lochmanovi, Ph.D. za odborné konzultace k teoretické i praktické části mé diplomové práce. Především děkuji za jeho vstřícnost, trpělivost, cenné rady a čas, který mi věnoval. Dále děkuji Katedře farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy za možnost vypracování této práce. Tato práce byla vypracována za podpory projektu SVV 260 547.

ABSTRAKT

UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy

Kandidát: Aneta Ptáčková

Školitel: PharmDr. Lukáš Lochman, Ph.D.

Název diplomové práce: Modifikace kapilární stěny grafenem pro separační aplikace

Kapilární elektroforéza (CE) je vysoce účinná separační metoda. Látky se rozdělují na základě jejich odlišné pohyblivosti v elektrickém poli. Uspořádání měření CE lze upravit různými způsoby, např. kapilární elektrochromatografie nebo micelární elektrokinetická kapilární chromatografie. Předpokládá se, že modifikace vnitřní stěny kapiláry pomůže zlepšit separační účinnost a selektivitu.

Grafen je uhlík s hexagonálním dvoudimenzionálním uspořádáním atomů v hybridizaci sp^2 . Grafen se jeví jako vhodný materiál pro separační aplikace díky svým vynikajícím vlastnostem jako je např. velký povrch a afinita k aromatickému kruhu pomocí π - π interakcí. Naše práce je zaměřena na modifikaci kapilární stěny grafenem. Jednou z metod je modifikace kapilární stěny metodou Layer-by-Layer neboli vrstvením různě nabitých látek pomocí elektrostatických sil. Další metodou je chemická cesta využívající kovalentní interakce. Pro modifikaci povrchu byly použity různé polymery a grafen.

Separací účinnost a selektivita modifikovaných kapilár byla sledována na modelových směsích analytů, např. parabenů, nitrofenolů a dalších. Získané výsledky byly srovnány s komerční nepotaženou kapilárou. Byla pozorována delší interakce analytů s povrchem a zlepšená separace.

Klíčová slova: Kapilární elektroforéza, grafen oxid, Layer-by-Layer modifikace

ABSTRACT

CHARLES UNIVERSITY

FACULTY OF PHARMACY IN HRADEC KRÁLOVÉ

Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmaceutical Analysis

Candidate: Aneta Ptáčková

Supervisor: PharmDr. Lukáš Lochman, Ph.D.

Title of thesis: Modification of capillary wall by graphene for separation applications

Capillary electrophoresis (CE) is a highly efficient separation method. Substances are separated due to their different mobility in an electric field. The CE modes of operation can be modified in different ways, e.g. capillary electrochromatography or micellar electrokinetic capillary chromatography. Modification of the inner wall of the capillary is believed to help improve separation efficiency and selectivity.

Graphene is carbon with a hexagonal structure in form of two-dimensional sp^2 single-atom-thick sheets. Graphene seems to be a suitable material for separation application due to its excellent properties such as large surface area and affinity to aromatic ring through π - π interactions. Our work is focused on the modification of the capillary wall by graphene. One of the methods of capillary wall modification is the Layer-by-Layer method via layering of differently charged substances bounded by electrostatic forces. Another method is chemical coating employing covalent interactions. Different combinations of polymers and graphene were used for surface modification.

Separation efficiency and selectivity of modified capillaries were studied on the model mixtures of analytes e.g. parabens, nitrophenols and others. Obtained results were compared with commercial unmodified capillary. Longer interactions of analytes with the surface and improved separation were observed.

Keywords: Capillary electrophoresis, Graphene Oxide, Layer-by-Layer modification

OBSAH

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	8
ÚVOD.....	9
1 TEORETICKÁ ČÁST	10
1.1 Kapilární zónová elektroforéza.....	10
1.1.1 Elektroforetická pohyblivost.....	11
1.1.2 Elektroosmotický tok.....	13
1.1.3 Účinnost separace v kapilární elektroforéze	18
1.2 Instrumentace kapilární elektroforézy	22
1.2.1 Kapilára	23
1.2.2 Dávkování vzorku.....	23
1.2.3 Detekce	24
1.3 Separační módy v kapilární elektroforéze	27
1.3.1 Micelární elektrokinetická kapilární chromatografie	27
1.3.2 Kapilární elektrochromatografie.....	28
1.4 Grafen	30
1.5 Modifikace kapilární stěny.....	32
1.5.1 Nekovalentní modifikace	33
1.5.2 Vrstvení, LbL	33
1.5.3 Modifikace chemickou cestou.....	34
2 CÍLE PRÁCE.....	37
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	38
3.1 Přístrojové vybavení.....	38
3.2 Použité chemikálie	39
3.3 Příprava disperze grafenu, roztoků polymerů a aminopropylsilanu.....	41
3.4 Příprava pufrů	42
3.5 Příprava vzorků pro měření.....	43

3.6	Příprava kapilár s modifikovaným povrchem.....	45
3.6.1	Modifikace kapilární stěny metodou LbL	45
3.6.2	Modifikace kapilární stěny chemickou cestou.....	47
3.7	Ověřovací experiment – příprava.....	49
3.8	Metoda měření na kapilární elektroforéze.....	51
4	VÝSLEDKY A DISKUSE.....	52
4.1	Modifikované kapiláry pro kapilární elektroforézu	52
4.1.1	Modelová směs analytů – parabeny	54
4.1.2	Modelová směs analytů – nitrofenoly	55
4.1.3	Modelová směs analytů – nitroaniliny.....	56
4.1.4	Modelová směs analytů – látky s aromatickým kruhem.....	57
4.1.5	Modelová směs analytů – puriny	59
4.2	Ověřovací experiment – výsledky	60
5	ZÁVĚR.....	62
6	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	64
7	SEZNAM OBRÁZKŮ.....	67
8	SEZNAM TABULEK.....	69

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

3-AMDS	3-aminopropyldiethoxymethylsilan
APTES	3-aminopropyltriethoxysilan
APTMS	3-aminopropyltrimethoxysilan
BGE	roztok základního elektrolytu (background electrolyte)
CE	kapilární elektroforéza (capillary electrophoresis)
CEC	kapilární elektrochromatografie (capillary electrochromatography)
CZE	kapilární zónová elektroforéza (capillary zone electrophoresis)
DGO	disperze grafen oxidu
EOF	elektroosmotický tok (electroosmotic flow)
GO	oxidovaná forma grafenu (graphen oxide)
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (high-performance liquid chromatography)
LbL	vrstvení – metoda potahování vnitřní stěny kapiláry (Layer-by-layer)
MEKC	micelární elektrokinetická kapilární chromatografie (micellar electrokinetic capillary chromatography)
MeOH	methanol
OT-CEC	otevřená tubulární kapilární elektrochromatografie (open tubular capillary electrochromatography)
PAH	poly(allylamin hydrochlorid)
PDDA	poly(diallyldimethylammonium chlorid)
PEI	polyethylenimin
UV/VIS	ultrafialové a viditelné záření

ÚVOD

Kapilární elektroforéza (CE) patří mezi elektromigrační separační metody. Vznikla během třicátých let dvacátého století, kdy elektrochemik Arne Tiselius odseparoval proteiny na základě jejich rozdílné pohyblivosti v elektrickém poli. [1,2] CE nachází uplatnění v oblasti chemie, farmacie, biochemie, a také v zemědělství a potravinářství. [3]

V poslední době byly zaznamenány snahy o zvýšení separační účinnosti CE. Jedním z možných přístupů k zajištění vyšší separační účinnosti je modifikace povrchu kapilární stěny. V tomto případě je možné využít metodu Layer-by-Layer (LbL, vrstvení) nebo modifikaci povrchu kapiláry chemickou cestou. [4,5] Modifikací povrchu kapiláry může dojít například ke zvětšení povrchu kapiláry, ovlivnění elektroosmotického toku (EOF) či umožnění nových interakcí s analytem, což může dále žádoucím způsobem ovlivnit separační účinnost. [4,6] Pro modifikaci povrchu se používají nejčastěji látky typu polymeru nebo nanočástic. Mezi novými látkami se jako velmi nadějný kandidát jeví grafen, a to především díky výhodným fyzikálně-chemickým vlastnostem jako je jeho velký povrch a chemická stabilita. Hexagonální uspořádání atomů uhlíku v grafenu pak přispívá ke vzniku π - π interakcí s látkami obsahujícími aromatický kruh. [4,5,6]

V této diplomové práci se zaměříme na modifikaci kapilární stěny metodou LbL nebo chemickou cestou. Grafen se bude vázat na kapilární stěnu potaženou vrstvou polymeru nebo aminopropylsilanu. Používanými polymery pro LbL budou poly(diallyldimethylammonium chlorid) (PDDA), poly(allylamin hydrochlorid) (PAH) a polyethylenimin (PEI). V případě modifikace chemickou cestou bude použit aminopropylsilan 3-aminopropyltriethoxysilan (APTES).

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Kapilární zónová elektroforéza

Kapilární zónová elektroforéza (CZE) je široce využívaná separační metoda, která rozděluje nabité látky na základě jejich rozdílné pohyblivosti ve stejnosměrném elektrickém poli. Řadíme ji mezi nejjednodušší a nejvíce používaný mód CE. [1,3,7] K separaci látek dochází na základě dvou základních principů. Jedná se o elektroforetickou pohyblivost a EOF (viz kapitola 1.1.1 a 1.1.2). [7]

V CZE separace látek probíhá v křemenných kapilárách, které jsou naplněné roztokem základního elektrolytu (BGE) umožňujícím elektrickou vodivost v systému. [2,8,9] Konce kapiláry jsou společně s elektrodami ponořené do nádob s BGE. Pokud se na elektrody vloží konstantní stejnosměrné napětí, vytvoří se elektrické pole, ve kterém se pohybují nabitě částice. Kladně nabitě částice se pohybují k záporně nabitě katodě, záporně nabitě částice ke kladně nabitě anodě. [2,7,8] Rychlost částic je určena elektroforetickou pohyblivostí dané částice a EOF. Při základním uspořádání v pozitivním módu je směr EOF ve směru od anody (kladně nabitá elektroda) ke katodě (záporně nabitá elektroda). V tomto módu unáší EOF analyty směrem ke katodě a díky jejich rozdílné rychlosti dochází k jejich separaci. V průběhu separace se složky vzorku snadno rozdělují do jednotlivých zón, které jsou dále detekovány pomocí detektoru. [2,8,10,11] Během jedné analýzy dochází současně k separaci kationtů i aniontů. Neutrální látky touto metodou nelze separovat, neboť jsou unášeny společně s EOF. [1,9]

Mezi výhody CZE patří jednoduchá příprava vzorků, malá spotřeba vzorků a činidel, rychlost analýzy a vysoká účinnost. [3,8,12] Vysoká separační účinnost je charakterizována počtem teoretických pater, které se pohybují v hodnotách 10^5 až 10^6 . Další výhodou CZE je detekce prováděná přímo v kapiláře díky vypálenému detekčnímu okénku. [3,13,14] Mezi nevýhody CZE můžeme zařadit nižší citlivost a horší reprodukovatelnost oproti vysokoúčinné kapalinové chromatografii (HPLC). [3,12]

1.1.1 Elektroforetická pohyblivost

Elektroforetická pohyblivost je veličina popisující rychlost pohybu nabitě částice v elektrickém poli a je pro určitou částici charakteristická. Vlivem větší elektroforetické pohyblivosti jsou nabitě částice urychlovány, zatímco částice s menší elektroforetickou pohyblivostí jsou zpomalovány. Tímto způsobem dochází k oddělení iontů. Rychlost iontu v je dle *Rovnice 1* dána součinem elektroforetické pohyblivosti μ_e a intenzity elektrického pole E . [7,8,11]

$$v = \mu_e E \quad \text{Rovnice 1}$$

Na nabitou částici v elektrickém poli působí elektrická síla F_e , která částici uvádí do pohybu. Tato síla je přímo úměrná náboji iontu q a intenzitě elektrického pole E (*Rovnice 2*). [7,8,13]

$$F_e = q E \quad \text{Rovnice 2}$$

V opačném směru k této síle působí třecí síla, která tento pohyb brzdí. Tuto sílu definuje Stokesův zákon (*Rovnice 3*):

$$F_f = -6 \pi \eta r v \quad \text{Rovnice 3}$$

η je viskozita roztoku

r je poloměr iontu

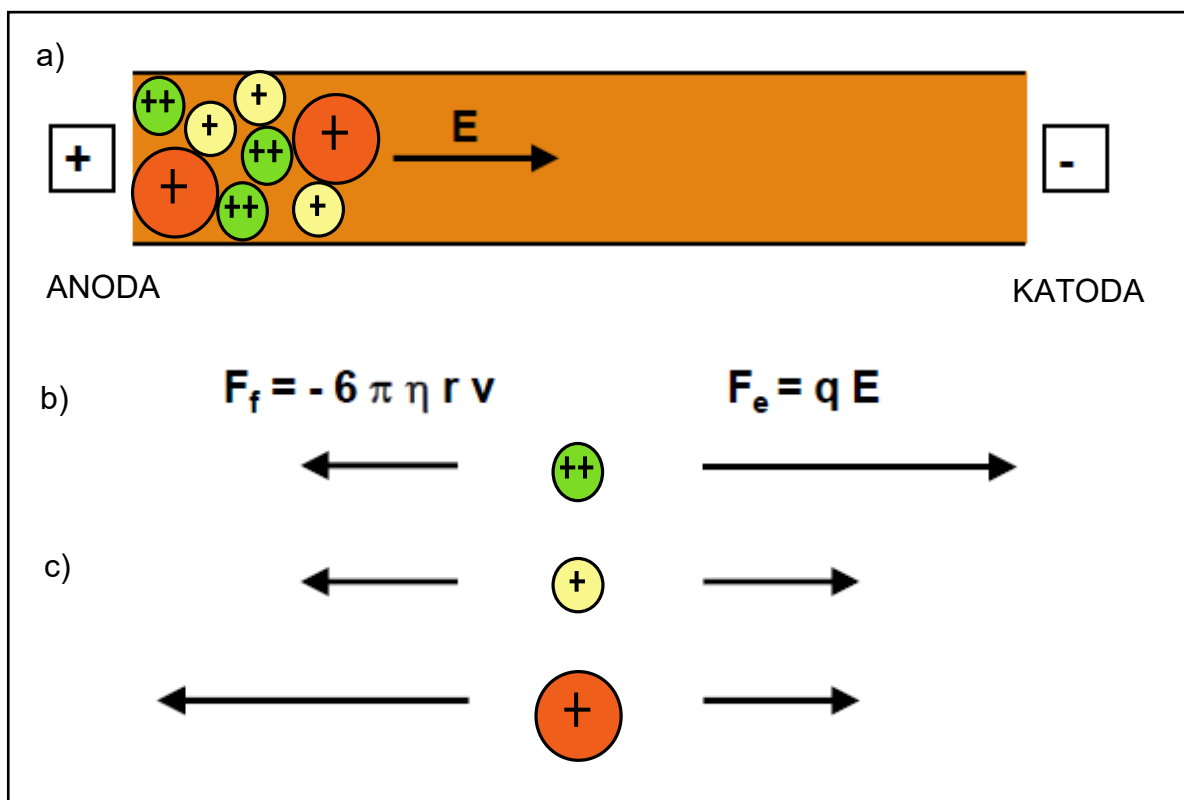
v je rychlost iontu. [7,8]

Pokud je elektrická síla a třecí síla v rovnováze, pak nastává stav, kdy se nabitě částice pohybují stejnou rychlostí. [7,8] V tomto případě se *Rovnice 2* a *Rovnice 3* vzájemně rovnají a platí následující vztah:

$$q E = 6 \pi \eta r v. \quad \text{Rovnice 4}$$

Po dosazení *Rovnice 1* do *Rovnice 4* lze vyjádřit následující vztah pro elektroforetickou pohyblivost:

$$\mu_e = \frac{q}{6 \pi \eta r}. \quad \text{Rovnice 5}$$



Obrázek 1 Dělení iontů dle působení elektrické a třecí síly. V tomto obrázku je a) zobrazen stav iontů před dělením v pozitivním módu (pohyb ve směru od anody ke katodě), b) zobrazena elektrická a třecí síla působící na různě nabitě částice, c) zobrazeno dělení iontů dle velikosti elektrické a třecí síly (třecí síla se odečítá od síly elektrické, protože ji brzdí). Nejrychleji se pohybují malé vícenásobně nabitě ionty. (převzato a upraveno z [15])

Z výše uvedené Rovnice 5 vyplývá, že elektroforetická pohyblivost iontu je závislá na celkovém náboji, tvaru a velikosti částice a také viskozitě roztoku. To znamená, že malé vícenásobně nabitě ionty se pohybují rychleji než ionty velké s jedním nábojem (Obrázek 1). [8,9,12] Elektroforetickou pohyblivost mohou dále ovlivňovat vlastnosti BGE (typ elektrolytu, iontová síla, hodnota pH, přidavek organických modifikátorů nebo tenzidů). [11,13]

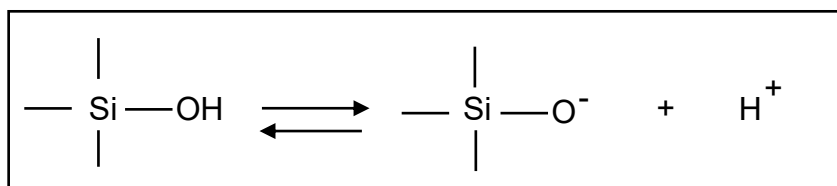
Elektroforetická pohyblivost je fyzikální konstanta určená při úplné ionizaci analytu v nekonečně zředěných roztocích. Odišuje se od efektivní elektroforetické pohyblivosti, která se stanovuje experimentálně. V roztocích slabých elektrolytů jsou přítomny vedle sebe nabitě (disociované) a nenabitě (nedisociované) molekuly. Vztah mezi nimi je dán stupněm disociace α_i , který určuje podíl nabitých částic. Vlivem vhodně zvoleného pH se částice disociují

a ovlivňují tak efektivní elektroforetickou pohyblivost. Ta je definována dle *Rovnice 6* jako součin stupně disociace α_i a elektroforetické pohyblivosti μ_e . [3,7]

$$\mu_{eff} = \alpha_i \mu_e \quad \text{Rovnice 6}$$

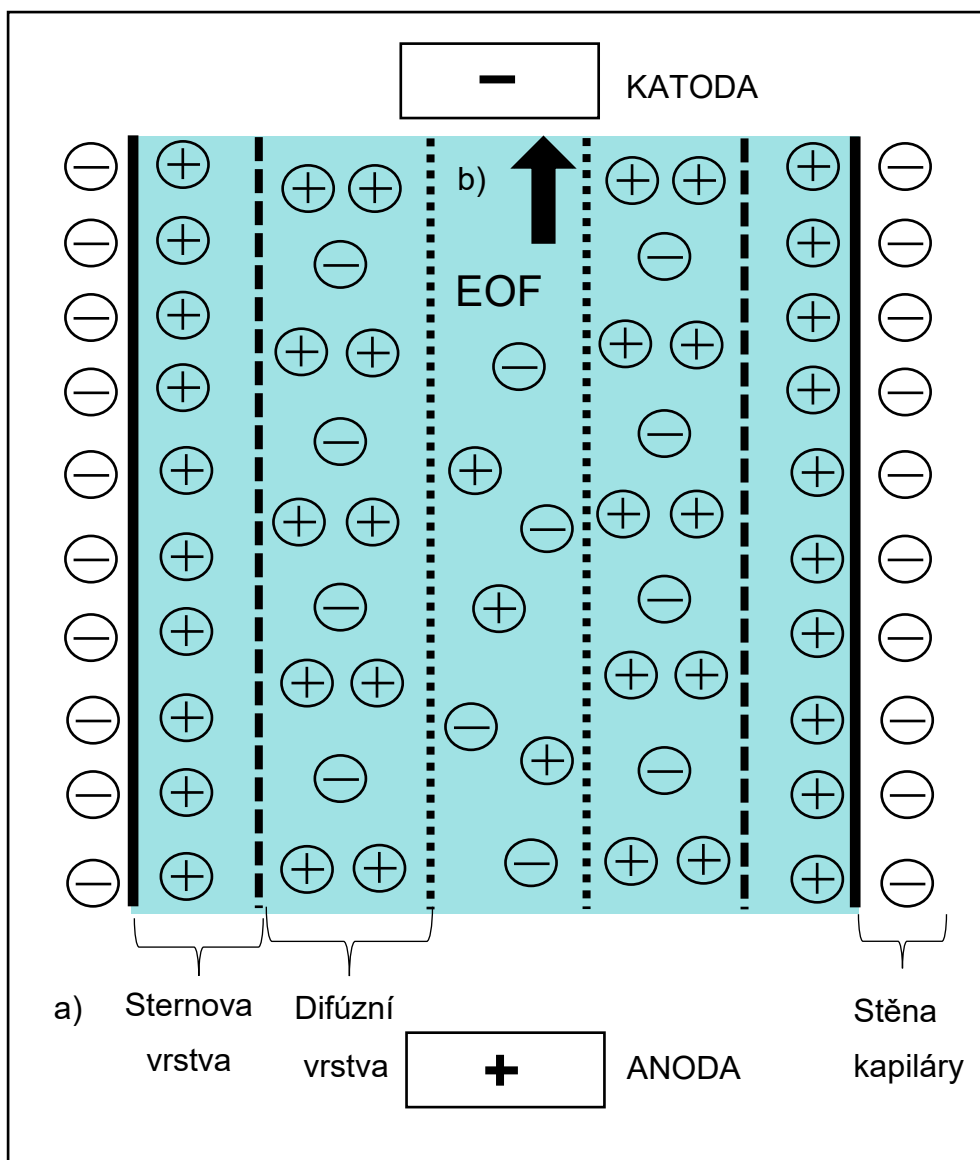
1.1.2 Elektroosmotický tok

EOF je definovaný jako spontánní tok kapaliny v kapiláře vznikající v elektrickém poli po vložení elektrického napětí mezi elektrody. Umožňuje během jedné analýzy odseparovat kationty i anionty. [3,7,9]



Obrázek 2 Disociace silanolových skupin. Na tomto obrázku je zobrazena disociace silanolových skupin při $\text{pH} > 3$. (převzato z [7])

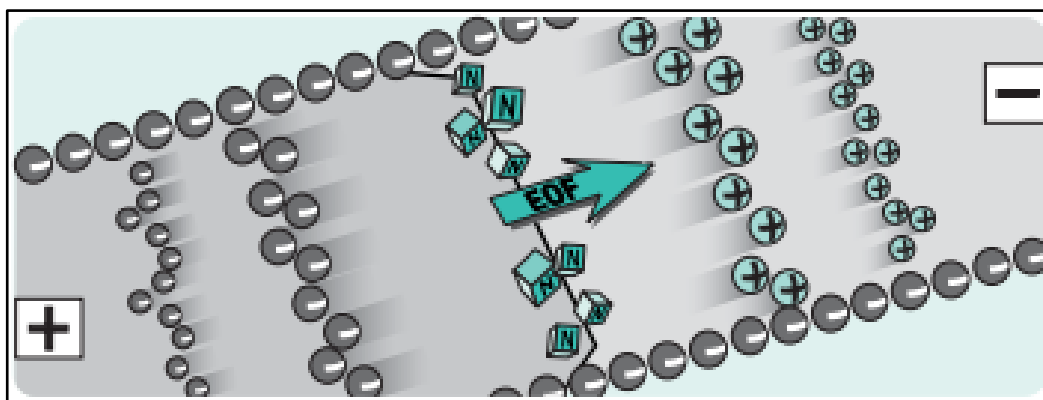
EOF vzniká v křemenných kapilárách s malým vnitřním průměrem ($< 100 \mu\text{m}$) vlivem působení elektrického pole. Křemenná kapilára obsahuje na svém vnitřním povrchu silanolové skupiny, které lze při $\text{pH} > 3$ BGE disociovat (*Obrázek 2*). Vlivem disociace těchto skupin se na vnitřní stěně kapiláry vytváří negativní náboj. [3,9,11] Tento negativní náboj přitahuje vrstvu kovových iontů z BGE, které u stěny kapiláry vytváří elektrickou dvojvrstvu. Vrstva kationtů vzdálenější od středu kapiláry se nazývá Sternova vrstva. [3,7,16] Blíže středu kapiláry se hromadí kationty tvořící tzv. difúzní vrstvu, která je pohyblivá. Na rozhraní těchto dvou vrstev se vytváří elektrokinetický potenciál neboli zeta potenciál. [7,8,13] Po aplikaci napětí se v pozitivním módu začnou kationty difúzní vrstvy pohybovat směrem ke katodě. Kationty této vrstvy jsou obaleny molekulami vody. Díky této vlastnosti s sebou difúzní vrstva unáší ostatní ionty roztoku a dochází tak k toku celého obsahu v kapiláře. Tento pohyb je nazýván jako EOF (*Obrázek 3*). [3,7,8,12]



Obrázek 3 Vznik EOF v základním uspořádání (pozitivní mód). Na tomto obrázku je a) zobrazena Sternova a difúzní vrstva, b) zobrazen vznik EOF probíhající ve směru od anody ke katodě. (převzato a upraveno z [7,8])

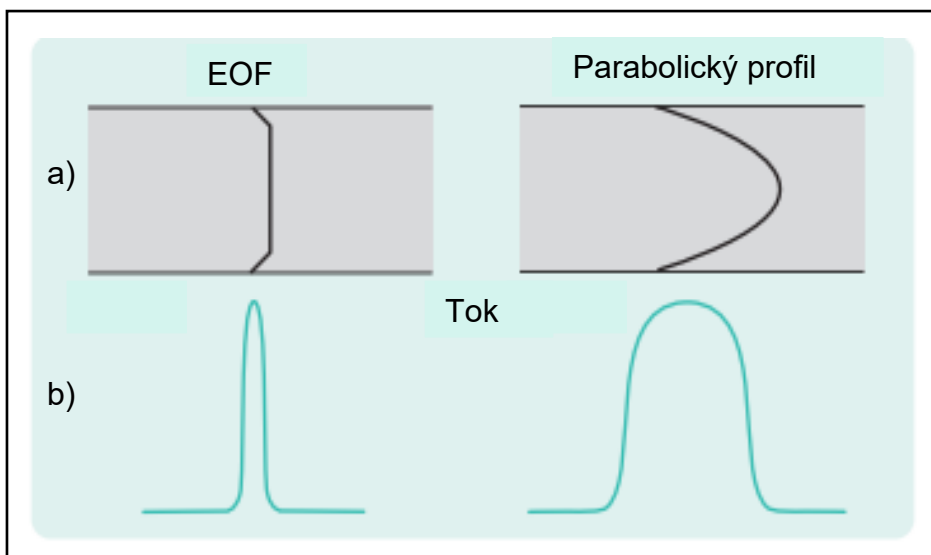
Jak již bylo řečeno, EOF umožňuje separaci kationtů i aniontů během jedné analýzy (Obrázek 4). [2,3] V pozitivním módu máme záporně nabitý povrch uvnitř kapiláry a EOF probíhá ve směru od anody ke katodě. Neutrální látky se pohybují ve stejném směru jako EOF a mají s EOF stejnou rychlost. [3,7,12] Kationty se pohybují ve stejném směru jako EOF a jsou EOF urychlovány. I anionty se pohybují stejným směrem jako EOF, protože jejich elektroforetická pohyblivost je menší než rychlost EOF. EOF tedy anionty zpomaluje. V běžných

podmínkách v pozitivním módu probíhá separace látek v pořadí: kationty – neutrální látky – anionty. [3,7,9]



Obrázek 4 Rozdílná separace látek vlivem působení EOF uvnitř kapiláry. Na tomto obrázku je zobrazen EOF v pozitivním módu (směr EOF od anody ke katodě). V tomto uspořádání dochází k separaci látek v pořadí malé částice se silným kladným nábojem – velké částice s kladným nábojem – neutrální částice – velké částice se záporným nábojem – malé částice se silným záporným nábojem. (převzato z [8])

Vlivem EOF vzniká v kapiláře plochý rychlostní profil. EOF je rovnoměrně rozložen po celé délce stěny kapiláry, a proto je rychlost průtoku ve všech částech stejná. Složky roztoku se proto pohybují stejnou rychlostí a díky tomu dochází k minimálnímu rozšiřování zón a lepší symetrii píků. [3,7,9] Oproti tomu u HPLC, kde se pro pohyb kapaliny využívá čerpadlo, vzniká parabolický profil. V tomto případě se kapalina ve středu průřezu kapiláry pohybuje rychleji než kapalina u stěny kapiláry. Složky roztoku se pohybují různými rychlostmi, a proto dochází k rozšiřování zón. [3,7,8] Na *Obrázku 5* je zobrazeno proudění s plochým a parabolickým profilem.



Obrázek 5 Plochý rychlostní profil (CE) a profil parabolický (HPLC). V tomto obrázku je a) zobrazeno proudění s plochým a parabolickým profilem, b) znázorněny odpovídající píky analytu, které se liší ve tvaru píku dle typu proudění (vlevo užší pík v CE). (převzato z [8])

Velikost EOF lze vypočítat dle následujícího vzorce:

$$\mu_{EOF} = \frac{\varepsilon \zeta}{\eta} \quad \text{Rovnice 7}$$

ε je relativní permitivita

ζ je zeta potenciál

η je viskozita. [8]

Z tohoto vzorce vyplývá, že EOF je závislý na náboji kapiláry, viskozitě BGE a relativní permitivitě. K dalšímu ovlivnění EOF dochází na základě vlastností BGE (pH, koncentrace, přídavek aditiv), změny napětí či teploty. [8,10,13] Zeta potenciál je určen povrchovým nábojem na kapilární stěně. Tento potenciál je závislý na pH, a proto se velikost EOF mění s pH BGE. [8] Při vysokém pH (pH > 9) jsou všechny silanolové skupiny ionizované a EOF je proto nejsilnější. Vlivem nízkého pH (pH < 4) je EOF malý, protože disociace silanolových skupin je malá. [7,8,10] K dalšímu ovlivnění EOF dochází na základě koncentrace BGE. S rostoucí koncentrací nebo iontovou silou BGE dochází ke snížení zeta potenciálu a zpomalení EOF. [8,13]

EOF můžeme ovlivnit také přidávkem aditiv. Aditiva jsou látky, které se přidávají do BGE za účelem zlepšení některých vlastností (rozpuštěnost látek, ovlivnění selektivity, změna mechanismu separace). Může se jednat např. o organická rozpouštědla (např. methanol, acetonitril), povrchově aktivní látky (např. anionický dodecylsírán sodný nebo žlučové kyseliny, kationický cetyltrimethylammonium bromid) nebo v případě optických izomerů o chirální selektory (např. cyklodextriny, Crown-ethery). Přidávkem organického rozpouštědla do BGE dochází ke změně EOF, obvykle dochází k jeho snížení. [8,11,13] K dalšímu ovlivnění EOF dochází např. při modifikaci kapilární stěny pomocí polymeru nebo povrchově aktivní látky. Pokud dojde k vazbě polymeru (např. polyakrylamidu) na vnitřní kapilární stěnu, dojde k zablokování (potlačení) EOF. Pokud se do BGE přidá povrchově aktivní látka (kationický tenzid cetyltrimethylammonium bromid) v koncentraci nižší, než je kritická micelární koncentrace, EOF se obrátí a začne se pohybovat ve směru od katody k anodě. Separace látek pak bude probíhat při vložení záporného napětí v opačném pořadí: anionty – neutrální látky – kationty. [8,13,14]

EOF lze dále ovlivnit vloženým napětím nebo teplotou. Při vložení vyššího napětí na elektrody dochází ke zvýšení rychlosti EOF a zkrácení času analýzy. S vyšším napětím se však vytváří i vyšší proud, který způsobuje tvorbu Jouleova tepla (viz kapitola 1.1.3). Se zvyšující se teplotou dochází ke zvýšení EOF, neboť klesá viskozita BGE. [8,11]

Rychlost nabitě částice neboli zdánlivá pohyblivost je určena součtem elektroforetické a elektroosmotické pohyblivosti. [8,13] Tyto pohyblivosti mohou mít stejný nebo opačný směr dle náboje částice. V pozitivním módu EOF má kladně nabitá částice elektroforetickou pohyblivost ve stejném směru jako elektroosmotickou pohyblivost. V případě záporně nabitě částice jsou tyto pohyblivosti v opačném směru. [7,11] Zdánlivá pohyblivost se vypočítá pomocí migračního času podle *Rovnice 8*. Migrační čas je čas potřebný k pohybu iontu od místa nástřiku k místu detekčního okénka. [8,13]

Vzorec pro výpočet zdánlivé pohyblivosti iontu:

$$\mu_a = \frac{l}{t_a E} = \frac{lL}{t_a V}$$

Rovnice 8

$\mu_a = \mu_e + \mu_{EOF}$ (součet elektroforetické a elektroosmotické pohyblivosti)

V je aplikované napětí

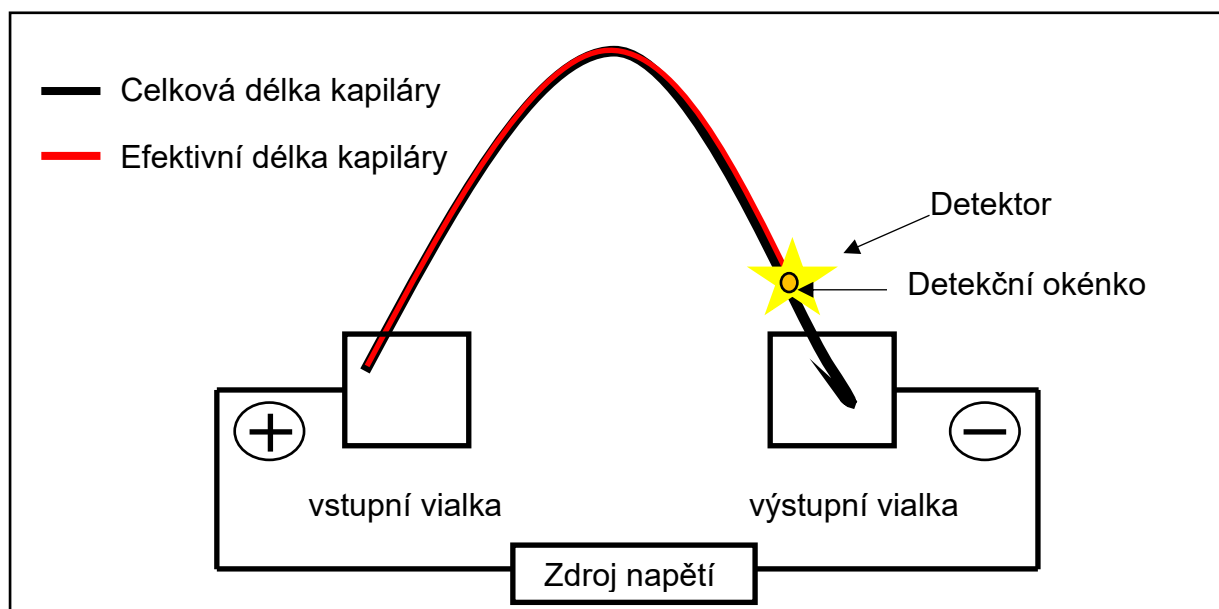
l je efektivní délka kapiláry

L je celková délka kapiláry

t_a je migrační čas (analyzovaného iontu)

E je intenzita elektrického pole. [8,13]

Na kapiláře jsou pro potřeby výpočtů parametrů měřeny dvě základní délky – efektivní délka a celková délka kapiláry (Obrázek 6). Vzdálenost od místa nástřiku do vzdálenosti detekčního okénka je nazývána jako efektivní délka a je kratší než celková délka kapiláry. [8]



Obrázek 6 Schématický náčrt efektivní a celkové délky kapiláry

1.1.3 Účinnost separace v kapilární elektroforéze

V CE se snažíme o zajištění vysoké separační účinnosti, minimálního rozšiřování zón a krátké doby analýzy. Pro srovnání účinnosti sledujeme

migrační čas a tvar píku (šířku a výšku) analytu. Z těchto kritérií se dají dále vypočítat parametry pro hodnocení separační účinnosti. Jedná se například o počet teoretických pater, výškový ekvivalent teoretického patra, rozlišení nebo faktor symetrie píku. [7,8,13]

Jak již bylo řečeno, jedním ze sledovaných kritérií v CE je šířka a výška píku analytu. Pro dosažení vysoké separační účinnosti je nutné získávat úzké a vysoké píky s minimálním rozšiřováním zón. Jednou z výhod CE je získávání píků s lepší symetrií v porovnání s HPLC. Díky EOF, který má plochý rychlostní profil, máme lepší symetrii píků. (viz kapitola 1.1.2). [3,8]

Výpočet parametrů pro hodnocení separační účinnosti

Počet teoretických pater

V tomto procesu dochází dle teorie k opakovanému vytváření rovnováhy. Po ustálení rovnováhy se vytvoří oddělené patro a proces se opakuje. Podle počtu těchto pater se hodnotí účinnost separace kapiláry. [13,17] Při vyšším počtu teoretických pater se získávají úzké píky a účinnost separace stoupá. [8,13] Počet teoretických pater lze vypočítat pomocí *Rovnice 9*:

$$N = 5,54 \left(\frac{t_a}{w_{1/2}} \right)^2 \quad \text{Rovnice 9}$$

t_a je migrační čas

$w_{1/2}$ je šířka píku v polovině jeho výšky. [11]

Výškový ekvivalent teoretického patra

V některých případech se pro hodnocení účinnosti využívá výškový ekvivalent teoretického patra H , který se vypočítá dle *Rovnice 10*. [13,17]

$$H = \frac{l}{N} \quad \text{Rovnice 10}$$

l je efektivní délka kapiláry

N je počet teoretických pater. [17]

Rozlišení

Dalším parametrem je rozlišení R_S , které je definováno jako míra separace dvou píků. Popisuje rozdělení neboli vzdálenost dvou píků a vypočítá se podle *Rovnice 11*. [11,18]

$$R_S = 2 \frac{t_2 - t_1}{w_2 + w_1} \quad \text{Rovnice 11}$$

t_1 a t_2 jsou migrační časy

w_1 a w_2 jsou šířky píků na základní linii. [18]

Faktor symetrie píku

Faktor symetrie píku A_S je dalším hodnoceným parametrem a vypočítá se dle *Rovnice 12*. Jedná se o faktor, který hodnotí změnu tvaru píku. V nejlepším případě bychom měli získávat pravidelné píky. V praxi však dochází ke změně tvaru píku a píky nejsou symetrické. [11,17]

$$A_S = \frac{w_{0,05}}{2d} \quad \text{Rovnice 12}$$

$w_{0,05}$ je šířka píku v jedné dvacetině jeho výšky

d je vzdálenost mezi kolmicí spuštěnou z vrcholu píku a vzestupnou částí píku v jedné dvacetině jeho výšky. [11]

Faktory ovlivňující účinnost separace

Mezi faktory, které ovlivňují účinnost separace v CE, patří především Jouleovo teplo, molekulární difúze nebo adsorpce vzorku na kapilární stěnu. [10,13]

Jouleovo teplo

Jouleovo teplo vzniká průchodem vyššího elektrického proudu kapilárou po vložení vyššího napětí na elektrody. Pokud nedochází k účinnému odvádění vzniklého tepla, může dojít ke snížení účinnosti separace a reprodukovatelnosti výsledků. [8,10,13] Způsobem, jak zabránit vzniku Jouleova tepla je zajistit účinné chlazení nebo odvod tepla. V praxi se pro redukci tepla nejčastěji používá chlazení vzduchem nebo chladicí kapalinou. [8,13,14]

Molekulární difúze

Dalším důvodem vedoucím k rozšiřování zón v CE je molekulární difúze složek analytu při průchodu kapilárou. Molekulární difúze ovlivňuje počet teoretických pater N , jak je znázorněno v *Rovnici 13*. V případě malých molekul je difúzní koeficient větší, a proto je počet teoretických pater nižší. Oproti tomu velké molekuly mají malý difúzní koeficient, a proto mají větší počet teoretických pater (řádově 10^6). Molekulární difúze je u velkých molekul velmi malá. [7,8,13]

$$N = \frac{(\mu_e + \mu_{EOF})U}{2D} \quad \text{Rovnice 13}$$

μ_e je elektroforetická pohyblivost

μ_{EOF} je elektroosmotická pohyblivost

U je aplikované napětí

D je difúzní koeficient. [7]

Adsorpce vzorku na kapilární stěnu

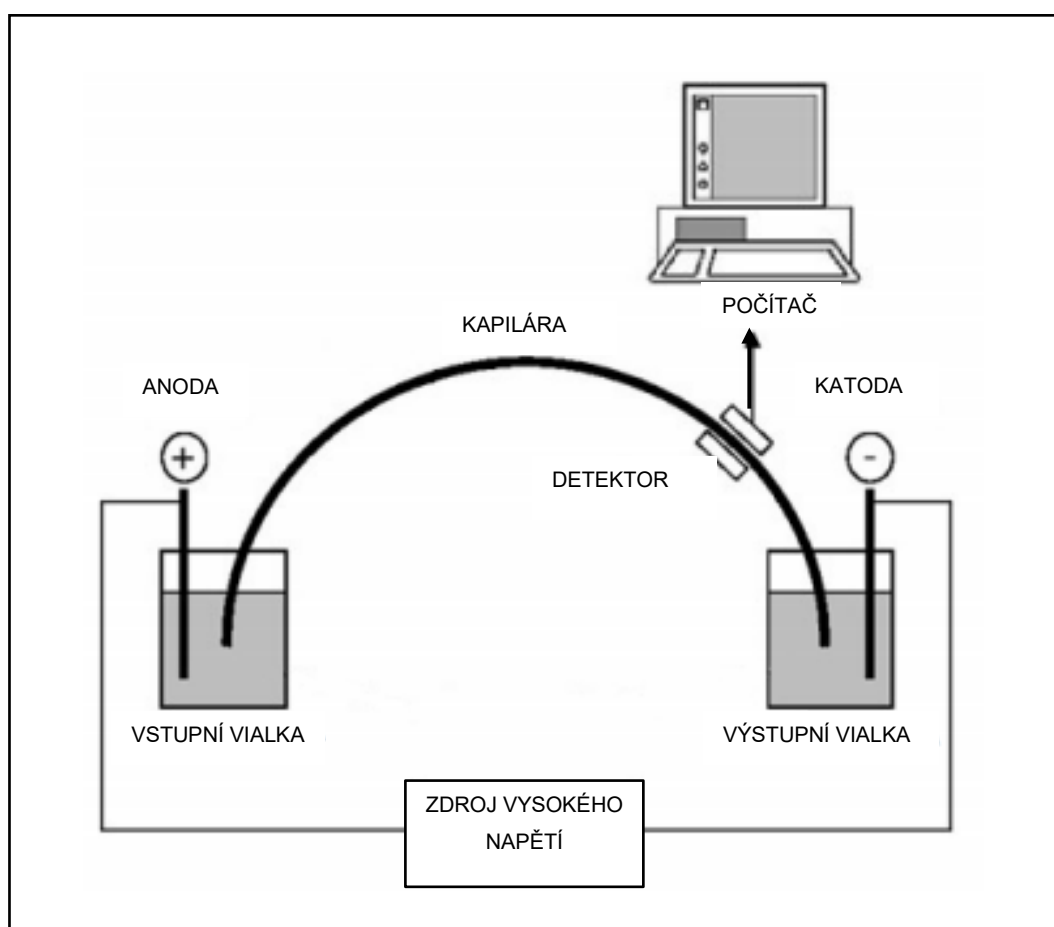
Zvýšená interakce analytu s kapilární stěnou je v CZE nežádoucím jevem. Díky adsorpci může dojít ke snížení účinnosti separace, ke změně tvaru píku či ztrátě analytu. Adsorpci lze zamezit úpravou pH BGE nebo modifikací vnitřní stěny kapiláry (pomocí polymeru nebo povrchově aktivní látky). [8,13,14]

Dávkování vzorku

Dávkování vzorku je dalším faktorem, který ovlivňuje výslednou účinnost separace. Při nastříknutí vzorku, který vytvoří startovní zónu o délce několik mm, dochází ke snížení separační účinnosti. Aby se zabránilo snížené účinnosti, je nutné nastříkovat malé objemy vzorku (1–50 nl). Nastříkuje se proto obvykle délka zóny vzorku odpovídající 1 až 2 % celkové délky kapiláry. [7,13,14]

1.2 Instrumentace kapilární elektroforézy

- Zdroj stejnosměrného vysokého napětí
- Dvě vialky (vstupní a výstupní) s BGE
- Dvě elektrody ponořené do BGE, které jsou připojené ke zdroji napětí
- Separační kapilára
- Detektor
- Termostat
- Propojení s počítačem
- Software pro měření a vyhodnocování dat (*Obrázek 7*) [10]



Obrázek 7 Schématický nákres CE (převzato z [9])

CE je charakteristická svým jednoduchým přístrojovým uspořádáním. [8] Oba konce kapiláry jsou společně s elektrodami ponořeny do nádob (vialek), které obsahují BGE. Kapilára je naplněna BGE. [3,8,16] Dávkování vzorku probíhá tak, že se vstupní vialka vymění za vialku se vzorkem. Poté se

do kapiláry nadávákuje malý objem vzorku jednou z níže popsaných metod (viz kapitola 1.2.2). Po navrácení vstupní vialky se na elektrody aplikuje vysoké napětí, které vytváří elektrické pole. Většinou je voleno napětí v rozsahu 5 až 30 kV. [3,7,8,13] Po aplikaci napětí na elektrody začíná ve vytvořeném elektrickém poli separační proces. Jednotlivé analyty začínají v elektrickém poli migrovat na základě své elektroforetické pohyblivosti a také díky EOF probíhajícímu v kapiláře. Tyto analyty jsou unášeny do detektoru, z kterého získáme elektroforegram neboli závislost odezvy detektoru na čase. [2,3,7] Z elektroforegramu lze získat informace o migračním čase analytu nebo o ploše či výšce píku analytu. Celý systém je propojen s počítačem, který obsahuje software pro měření a vyhodnocování dat. [2,3,12]

1.2.1 Kapilára

Nejčastěji používaným materiálem pro výrobu kapilár je tavený křemen, dále sklo nebo teflon. Povrch kapilár je potažený ochrannou vrstvou polyimidu, který zajišťuje pružnost a mechanickou odolnost kapiláry. Samotná kapilára bez vrstvy polyimidu je velmi křehká a je s ní obtížná manipulace. Obvykle se používají kapiláry s celkovou délkou 10–100 cm, s vnitřním průměrem 25–150 μm . Nejčastěji používané průměry jsou 50 a 75 μm . [3,7,8]

Na trhu jsou dostupné kapiláry, které lze zkrátit na požadovanou délku, nebo kapiláry s již požadovanou délkou. U některých typů detekcí je nutné na kapiláře vypálit detekční okénko, např. v případě detekce v ultrafialové a viditelné oblasti záření (UV/VIS). Vyrábějí se také kapiláry s definovanou délkou a již předpřipraveným detekčním okénkem. Samotná kapilára je při měření uložena v cartridge pro CE a termostatovaném prostoru, který udržuje konstantní teplotu. [11,19]

1.2.2 Dávkování vzorku

Do kapiláry jsou dávkovány velmi malé objemy vzorku (1–50 nl) a zóna vzorku tvoří 1–2 % celkové délky kapiláry. Vzorky se většinou aplikují na konec kapiláry, který je vzdálenější od detektoru (vstupní konec). Pokud probíhá EOF ve směru od anody ke katodě, pak se provádí nástřik na anodovém konci. Existuje několik metod dávkování vzorku do systému CE. [3,7,10,14]

Dávkování lze provést těmito způsoby:

- Hydrodynamické dávkování patří mezi nejčastěji používané a vzorek se do kapiláry zavádí působením tlaku. [7,10] Konec kapiláry je ponořen do vialky se vzorkem a na tuto vialku je aplikován zvýšený tlak, čímž dojde k nástřiku vzorku do kapiláry. [3,7,14]
- Hydrostatické dávkování je založeno na spojitých nádobách. Konec kapiláry je opět ponořen do vialky se vzorkem. Následně dochází ke zvednutí vialky vzhledem k výstupní vialce a pomocí hydrostatického tlaku dojde k nastříknutí vzorku do kapiláry. [3,7,14]
- Elektrokinetické dávkování je založeno na aplikaci elektrického napětí, které je vloženo mezi vialku se vzorkem a výstupní vialku s BGE. Díky vzniklému elektrickému poli začínají jednotlivé analyty migrovat z roztoku vzorku směrem do kapiláry. Touto metodou mohou být dávkovány pouze látky s nábojem, látky bez náboje tímto způsobem dávkovat nelze. Nevýhodou tohoto dávkování je nerovnoměrné rozložení analytů. [3,7,14] Jednotlivé analyty migrují do kapiláry na základě svých elektroforetických pohyblivostí, a proto dochází k upřednostňování mobilnějších iontů na úkor méně mobilních. Elektrokinetický nástřik se využívá převážně při nástřiku viskóznějších materiálů a gelů. [3,14]

1.2.3 Detekce

Detekce v CE nejčastěji probíhá tzv. on-column, kdy je detekce prováděna přímo v kapiláře. Na kapiláře je vypáleno detekční okénko, přes které dochází k detekci analytu v případě spektrofotometrické detekce. Okénko vzniká vypálením několika milimetrů ochranné vrstvy polyimidu. V CE se aplikují velmi malé objemy vzorků, a proto musí být používané detektory dostatečně citlivé, přesné a spolehlivé. Používají se detektory, které jsou podobné detektorům používaným v HPLC. [3,7,8,10] Mezi nejčastěji používané detektory patří UV/VIS detektor a hmotnostní detektor (CE-MS). Méně používané detektory jsou fluorescenční, konduktometrický a amperometrický [3,10,13] Detektory jsou spojeny s počítačem, který sbírá data a umožňuje jejich vyhodnocení. [7,8]

Nejběžnější metodou detekce je absorpce záření v UV/VIS oblasti. Tento detektor umožňuje detekci látek, které jsou schopné absorbovat záření v oblasti

vlnových délek 200–800 nm. [7,8] Detektory se skládají ze zdroje elektromagnetického záření, které prochází přes monochromátor rozdělující polychromatické záření na několik monochromatických paprsků. Dále se vybere vlnová délka při maximální absorpci analytu a monochromatický paprsek o této vlnové délce prochází měrnou celou. Molekuly analytu absorbují světelné záření a zbývající záření, které nebylo absorbováno, je zachyceno v detektoru. [10,20] Pro měření v CE je nejčastěji používán detektor diodového pole (DAD), který snímá celý rozsah vlnových délek v průběhu času pomocí fotodiod. Výhodou tohoto detektoru je krátká doba měření (řádově sekundy) a proměření celého spektra. V tomto případě prochází světlo ze zdroje elektromagnetického záření přes štěrbinu a měrnou celou, kde se rozkládá na jednotlivé vlnové délky pomocí holografické mřížky. Toto záření dopadá na pole fotodiod tak, že na jednotlivou fotodiodu dopadá pouze určitý rozsah vlnových délek. Díky tomu dochází k proměření celého rozsahu vlnových délek. [8,20,21]

Spojení CE s hmotnostní detekcí je vysoce citlivá a selektivní metoda, která umožňuje kvalitativně i kvantitativně hodnotit analyty. Jedná se o destruktivní metodu. Při spojení CE-MS je vzorek po průchodu kapilárou převeden na ionty v plynné fázi pomocí iontového zdroje. [12,13,17] Jako iontový zdroj se nejčastěji používá elektrosprej nebo chemická ionizace za atmosférického tlaku. Pomocí analyzátoru, který pracuje za vakua, dochází k dělení iontů podle poměru hmotnosti a náboje (m/z). Jako analyzátor se používají např. kvadrupóly (jednoduchý nebo trojitý) či iontové pasti. Následně dochází pomocí detektoru k detekci iontů. Ze získaného hmotnostního spektra lze identifikovat analyty, objasnit jejich struktury a kvantitativně je hodnotit. [17,18]

Další možnou metodou detekce je laserem indukovaná fluorescence (LIF) založená na měření fluorescence (emisního záření) analytu. K excitaci analytu se používá laser. Nevýhodou však je, že tento detektor je omezen na fluoreskující látky a většina látek fluorescenci nevykazuje. [3,10] Méně používanou detekční technikou je vodivostní detekce, která je založená na rozdílné vodivosti zóny analytu a BGE. Z počátku se používaly kontaktní detektory, u kterých se objevovaly problémy s adsorpcí vzorku nebo složek BGE na elektrody. V poslední době se využívají bezkontaktní vodivostní detektory, kdy jsou

elektrody umístěné na povrchu kapiláry a nejsou tak v kontaktu s BGE. Mezi minoritně používanou metodu detekce patří amperometrie, která je založena na detekci analytů podléhajících oxidaci nebo redukci. [10,13,22]

1.3 Separační módy v kapilární elektroforéze

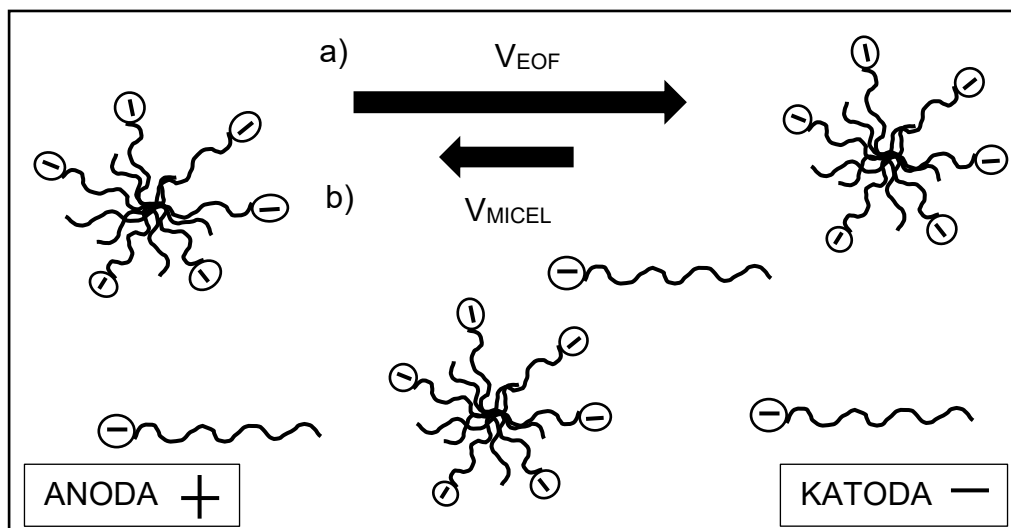
Existuje několik druhů kapilárních elektromigračních metod. Nejčastěji používanou metodou je CZE. Mezi další často používané metody můžeme zařadit micelární elektrokinetickou kapilární chromatografii (MEKC) a kapilární elektrochromatografii (CEC). Další používané metody jsou kapilární izoelektrická fokusace, kapilární izotachoforéza nebo kapilární gelová elektroforéza. V této kapitole bude pozornost zaměřena na příbuzné módy CE – MEKC a CEC. [3,7,8]

1.3.1 Micelární elektrokinetická kapilární chromatografie

MEKC využívá principů elektroforézy a chromatografie pro separaci nabitých i nenabitých látek. [13] V tomto případě je do BGE přidána povrchově aktivní látka (tenzid). Tato látka musí být přidána v koncentraci vyšší, než je kritická micelární koncentrace. Díky tomu začnou molekuly agregovat a vytvářet micely. [2,7,12] Nejčastěji používané tenzidy jsou dodecylsírán sodný (anionický), cetyltrimethylammonium bromid (kationický) nebo cholát sodný (anionický). [3] Micely jsou tvořeny hydrofilním povrchem a hydrofobním jádrem. Při použití dodecylsírán sodného nesou micely záporný náboj a jsou přitahovány k anodě. Na micelu působí EOF, který je ale větší než elektroforetická pohyblivost micel (*Obrázek 8*). Výsledný pohyb micely je tedy stejný s EOF a v pozitivním módu směřuje k detektoru (katodě – záporně nabitá elektroda). Dělení nenabitých látek probíhá podle jejich rozdílných rozdělovacích koeficientů mezi micelami (pseudostacionární fáze) a BGE (mobilní fáze). V případě nabitých látek dochází k separaci podle jejich elektroforetických pohyblivostí i rozdělovacích koeficientů mezi micelami a BGE. [7,9,12,13]

U hydrofilních látek bez náboje nedochází k interakci s micelou, a proto tyto látky nejsou zadržovány micelami a pohybují se s EOF. Jejich migrační čas je označen jako t_0 . Látky vysoce hydrofobní jsou zcela zadržovány v micelách a mají tedy migrační čas micel t_m . Analyty migrují vždy mezi hodnotami t_0 a t_m . [7,13] Při silnější interakci je analyt více zadržován v micelách a prodlužuje se jeho migrační čas. Separace probíhá za vysokého pH, které zajišťuje dostatečný EOF. Změnou pH, koncentrací BGE nebo přidáním aditiv (např. organická rozpouštědla) lze ovlivnit selektivitu separace. Obvykle při zvýšení $pH > 6$ dochází ke zvýšení EOF a zkrácení času analýzy. Nižší hodnota pH snižuje EOF,

a tím zvyšuje rozlišení a prodlužuje čas analýzy. S vyšší koncentrací BGE obvykle dochází ke snížení EOF a zlepšenému rozlišení. Při přidání organického rozpouštědla dochází k zeslabení interakcí mezi micelami a analytem, což obvykle snižuje migrační čas a selektivitu separace. [7,8,11,13]

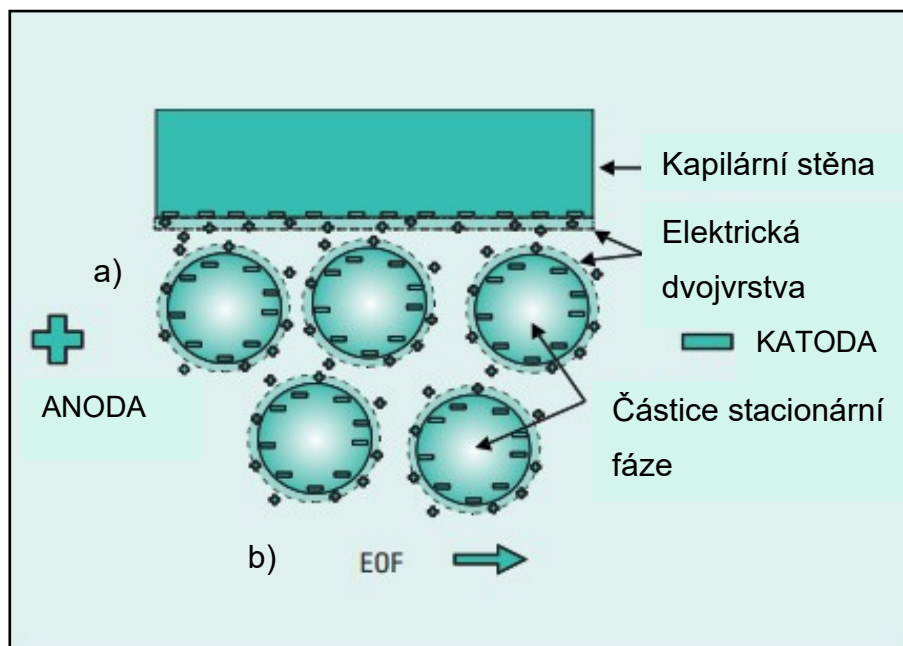


Obrázek 8 Princip MEKC. Na tomto obrázku je a) zobrazena velikost a směr EOF, který probíhá ve směru od anody ke katodě, b) zobrazena velikost a směr elektroforetické pohyblivosti micel. (převzato a upraveno z [7])

1.3.2 Kapilární elektrochromatografie

CEC je separační metoda, která spojuje principy HPLC a CE. [3,16] Toto spojení zajišťuje vysokou účinnost a selektivitu metody. [16] Metoda umožňuje separaci nabitých i neutrálních látek. Velkým přínosem je vysoká účinnost, krátký čas analýzy a malá spotřeba chemikálií. [7,23]

V CEC používáme náplňové nebo povrchově modifikované kapiláry. V případě náplňových kolon je kapilára naplněna mikročásticemi stacionární fáze o velikosti 1,5–5 μm . Pohyb mobilní fáze je zajištěn EOF. Oproti tomu v HPLC se k zajištění pohybu mobilní fáze využívá čerpadlo. [3,7,16] Princip separace je zobrazen na *Obrázku 9*. Po aplikaci napětí vzniká EOF, který se tvoří na vnitřním povrchu kapiláry i na povrchu částic stacionární fáze. K separaci látek dochází díky rozdílným interakcím mezi stacionární a mobilní fází. U nabitých látek dochází k separaci i pomocí elektroforetické pohyblivosti. [3,10]



Obrázek 9 Schéma principu CEC. Na obrázku je a) zobrazeno vytvoření elektrické dvojrstvy na kapilární stěně i na jednotlivých částicích stacionární fáze, b) zobrazen směr EOF, který je v pozitivním módu ve směru od anody ke katodě. (převzato z [8])

V CEC může dojít k řadě modifikací, které vylepší její separaci. Jednou z metod je otevřená tubulární kapilární elektrochromatografie (OT-CEC), kdy vznikají povrchově modifikované kolony. Tyto kolony obsahují modifikovanou tenkou vrstvu stacionární fáze na vnitřní stěně kapiláry. [24,25] V OT-CEC se mobilní fáze pohybuje pomocí EOF. Problémem OT-CEC je nízký fázový poměr mezi stacionární a mobilní fází (pufrem), který omezuje jejich široké použití v analytických aplikacích. [4,25]

1.4 Grafen

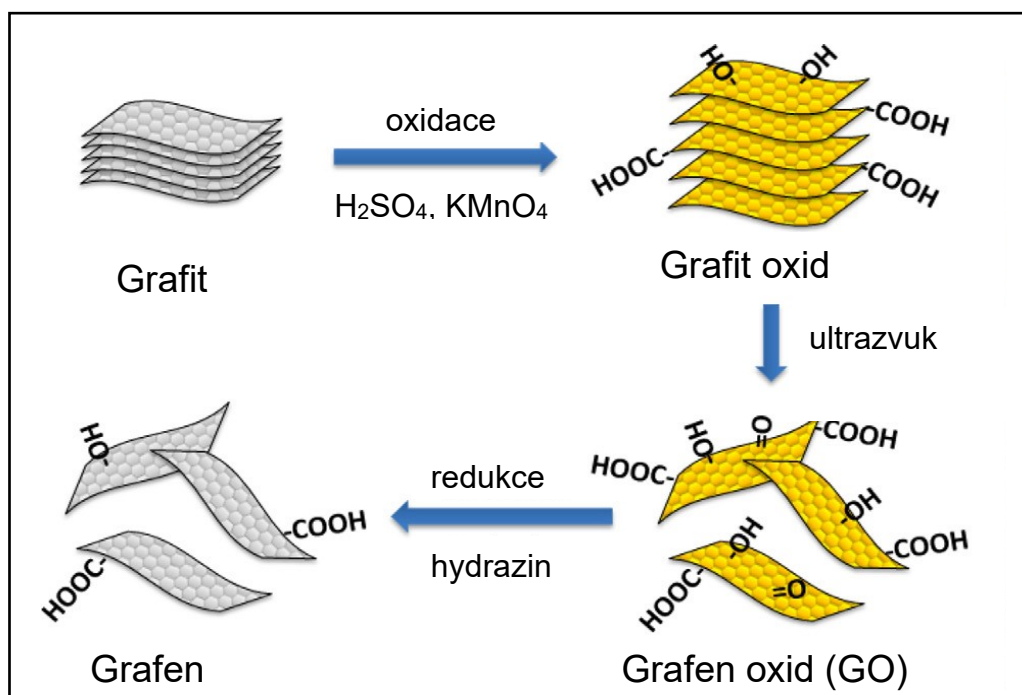
Grafen je 2D materiál, s hexagonálním uspořádáním atomů uhlíku, které se nacházejí v hybridizaci sp^2 . Řadíme ho mezi alotropické formy uhlíku. Mezi další nejznámější formy uhlíku patří diamant, grafit, uhlíkové nanotrubičky a fullereny. [4,26] Rozlišujeme dvě formy grafenu. Jedním z nich je grafen oxid (GO), který ve své struktuře obsahuje více polárních skupin. Jedná se o skupiny s hydrofilním charakterem, jako jsou například karboxylové, hydroxylové, epoxidové skupiny s volným elektronovým párem na kyslíku. Druhou formou je méně polární redukovaný GO. [4,27] Monovrstevná struktura poskytuje grafenu jeho unikátní vlastnosti, díky kterým je v posledních letech intenzivně studován. [4]

Grafen i GO mají vynikající fyzikálně-chemické vlastnosti, díky kterým nachází široké uplatnění v různých odvětvích. Pro svou výbornou elektrickou vodivost, popřípadě elektrochemické vlastnosti je používán při výrobě elektrod, baterií, tranzistorů nebo počítačových čipů. Jedna z oblastí výzkumu je zaměřena na studium skladování energie a grafen je zde používán při výrobě superkondenzátorů. [6,25,28] Díky svým optickým (schopen propustit až 97% světla) a elektrickým vlastnostem je využíván jako materiál pro solární články, dotykové obrazovky nebo displeje z tekutých krystalů (LCD). [28] Pro své mechanické vlastnosti (pevnost, pružnost a současně nízkou hmotnost) nachází využití jako kompozitní materiál ve stavebnictví, dopravě či leteckém průmyslu. [26,28] V současné době se grafen studuje pro využití ve filtračních systémech, neboť je téměř nepropustný pro kapaliny a plyny. [29] Další uplatnění nachází v biomedicině a medicíně např. pro cílené podávání léčiv (jako nosiče léčiv do cílových tkání), v biosenzorech nebo pro vývoj inovativních zdravotnických prostředků. [25,28]

Grafen i GO nacházejí své uplatnění i v analytických aplikacích. V tomto případě se využívá vlastností jako je velký specifický povrch (teoretická plocha $2630 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$) a π -delokalizovaný elektronový systém. Tento π -elektronový systém hraje významnou roli při kontaktu s jinými molekulami a předpokládá se, že díky němu může docházet ke vzniku π - π interakcí se sloučeninami obsahujícími aromatický kruh. [4,25,27] Grafen i GO jsou považovány za vysoce účinné adsorbenty pro svůj povrch a afinitu k aromatickým sloučeninám, a proto se

využívají jako stacionární fáze pro OT-CEC. [25] Využití nachází např. jako sorbent při adsorpci organických sloučenin, kovových iontů (zejména těžkých kovů) nebo extrakci na pevné fázi. [24,27] Adsorpce kovových iontů probíhá v případě GO pomocí volného elektronového páru na kyslíku. Na tento elektronový pár se mohou vázat ionty kovů za vzniku kovového komplexu. [4,27]

Grafen lze připravit pomocí jednoduché chemické reakce z grafitu (Obrázek 10). [29] V prvním kroku musí dojít k přípravě GO. Neznámější metodou pro přípravu GO je tzv. Hummersova metoda. [4,27] Nejdříve probíhá oxidace grafitu pomocí oxidačních činidel např. H_2SO_4 , KMnO_4 , NaNO_3 . [6,26,27] Poté dochází k exfoliaci (odlupování) na jednotlivé listy GO pomocí ultrazvuku. [29] V dalším kroku nastává redukce GO na redukovaný GO a dále na grafen. Využívají se k tomu redukční činidla (např. hydrazin, fenyhydrazin, hydroxylamin) případně UV záření nebo mikrovlny. [4,26,27]



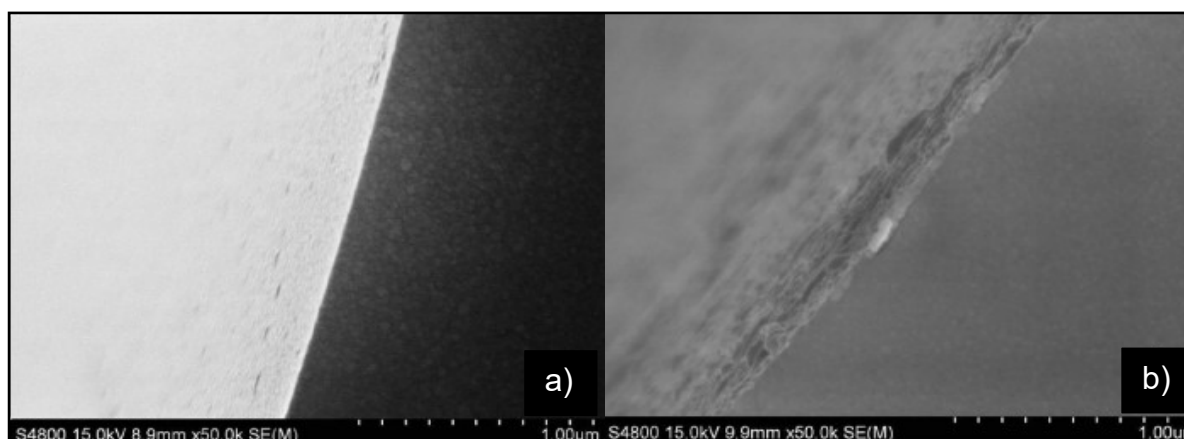
Obrázek 10 Příprava grafenu z grafitu. V prvním kroku dochází k oxidaci grafitu na grafit oxid a následně k exfoliaci pomocí ultrazvuku za vzniku GO. Po redukci GO vzniká grafen. (převzato z [29])

1.5 Modifikace kapilární stěny

Nízký fázový poměr u CEC a OT-CEC brání jejich širokému využití pro separační aplikace. [6,25] Kvůli tomu dochází ke zhoršenému rozlišení, ztrátě vzorku a špatné opakovatelnosti. [30] V poslední době se vyvíjejí metody pro zvětšení povrchu kapiláry, čímž by se zlepšila separační účinnost. [6,25] Jedním z přístupů je modifikace kapilární stěny. Kapilární stěna musí být po úspěšné modifikaci stabilní, musí vykazovat dostatečnou separační účinnost při daných podmínkách a umožňovat dobrou opakovatelnost. [5,6,25]

Vhodnými materiály pro modifikaci kapilární stěny jsou látky typu polymeru, nanočástic atd. [5] Při jejich použití může dojít ke zvětšení povrchu kapiláry, možnosti nových interakcí nebo efektivnímu dělení analytů mezi stacionární a mobilní fázi. [5,6]

Úspěšnost modifikace je hodnocena na základě charakterizace povrchu. Nejčastěji používané metody charakterizace povrchu jsou např. mikroskopie atomárních sil (atomic force microscopy, AFM) nebo skenovací elektronová mikroskopie (scanning electron microscopic, SEM). [24,26] Jednou z možností, jak modifikovat povrch kapiláry, je zobrazen na *Obrázku 11*. V tomto případě došlo k potažení kapiláry chemickou cestou za použití aminopropylsilanu 3-aminopropyl-diethoxymethylsilanu (3-AMDS), na který se poté navázal GO. U nemodifikované kapiláry je viditelný hladký povrch, který se po modifikaci (navázání GO na povrch kapiláry) zdrsnil. [6,31]



Obrázek 11 Snímek pomocí SEM nemodifikované a modifikované kapilární stěny. V tomto obrázku je a) zobrazen snímek nemodifikované kapilární stěny kondicionované 1M NaOH po dobu 3 hod., b) zobrazen snímek modifikované kapilární stěny chemickou cestou za využití aminopropylsilanu s navázaným GO na povrchu kapiláry. (převzato a upraveno z [6])

Kapilární stěna může být modifikována kovalentní a nekovalentní vazbou nebo elektrostatickou interakcí. [32]

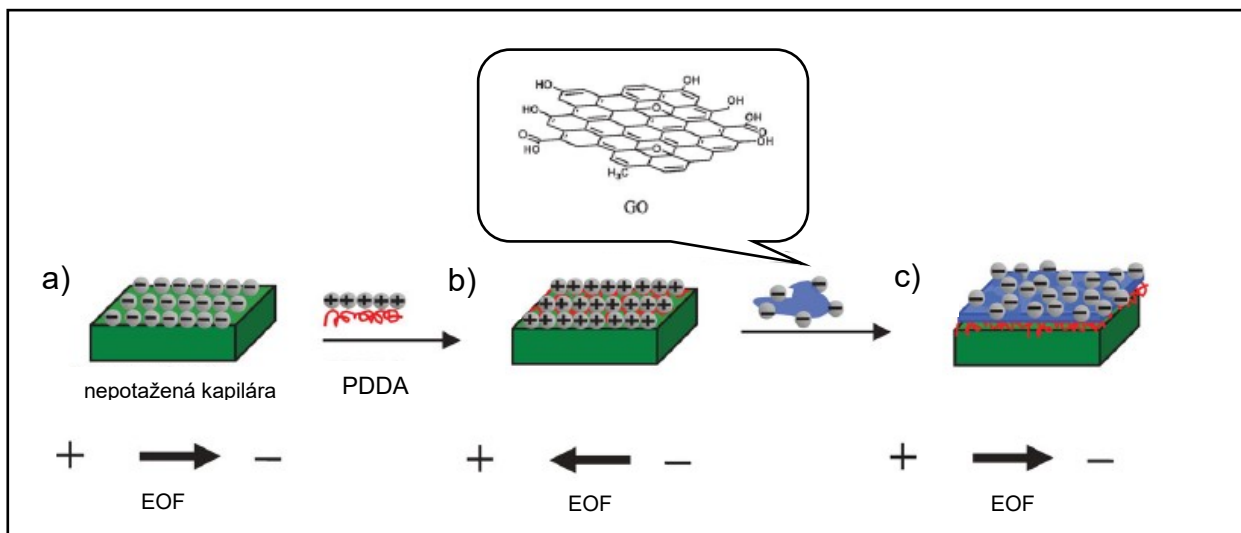
1.5.1 Nekovalentní modifikace

Při této modifikaci dochází k úpravě vnitřní stěny kapiláry pomocí fyzikální adsorpce. [29] Jedná se o adsorpci prostřednictvím nekovalentních interakcí, jako jsou například van der Waalsovy síly či elektrostatické interakce. [27] Mezi tento typ modifikace se řadí i metoda LbL.

1.5.2 Vrstvení, LbL

Jedna z možností modifikace vnitřního povrchu kapiláry je metoda LbL. Tato metoda využívá elektrostatických interakcí. [24,32,33] Výhoda této modifikace spočívá v jednoduchém způsobu přípravy a dobré opakovatelnosti. [5,24,31] Pro své fyzikálně-chemické vlastnosti zde našel uplatnění i GO, respektive redukovaný GO. GO obsahuje na svém povrchu hydrofilní funkční skupiny (hydroxylové, karboxylové, epoxidové), a proto je tento povrch ve vodném prostředí negativně nabitý. [33]

Schéma modifikace metodou LbL je zobrazena na *Obrázku 12*. Nepotažená kapilára nese na své vnitřní stěně negativní náboj. Na tento povrch se váže molekula s pozitivním nábojem např. polyelektrolyt (PDDA). PDDA je kladně nabitý, a proto se váže na negativně nabitou kapilární stěnu. Tím vzniká na stěně kapiláry pozitivní náboj. [5,31,33] Následně dochází k navázání negativně nabitého GO na vrstvu PDDA s kladným nábojem pomocí elektrostatických interakcí. [27,31]



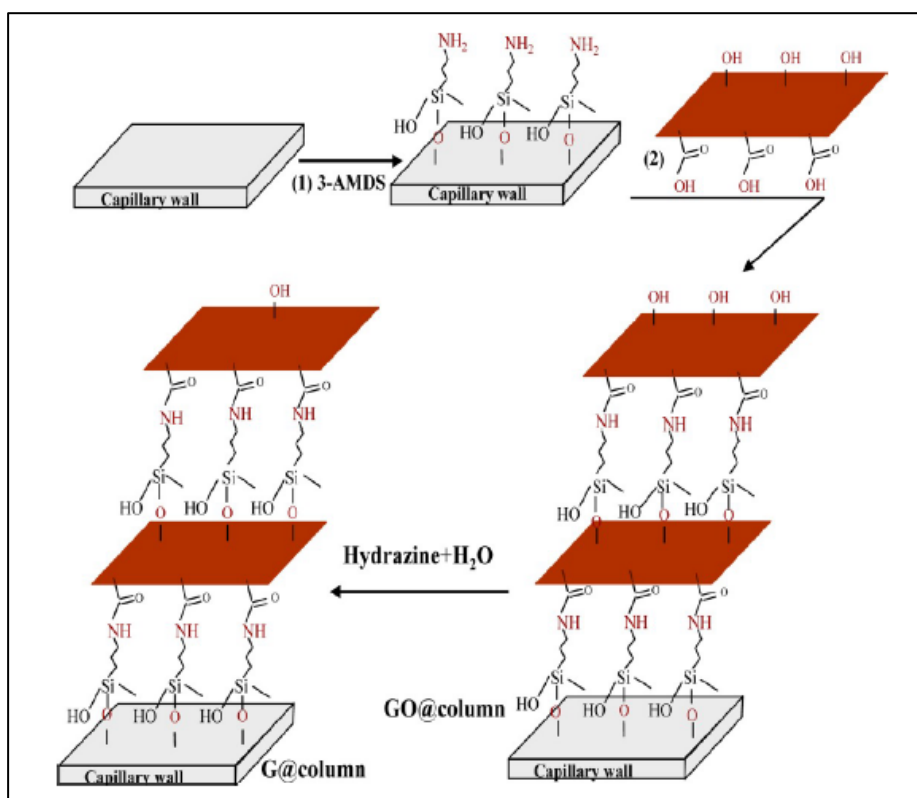
Obrázek 12 Potažení kapiláry GO pomocí PDDA. Na tomto obrázku je a) zobrazená nepotažená kapilára, kde EOF směřuje od anody ke katodě, b) zobrazená kapilára s kladně nabitou vrstvou PDDA, kde EOF směřuje od katody k anodě, c) zobrazená kapilára s kladně nabitou vrstvou PDDA a potažená záporně nabitým GO, kde EOF směřuje od anody ke katodě. (převzato z [31])

Směr EOF se mění dle modifikace povrchu a je znázorněn na *Obrázku 12*. Nepotažená kapilára má na stěně záporně nabitě silanolové skupiny a směr EOF směřuje od anody ke katodě. [5,31,34] Po potažení stěny kladně nabitou vrstvou PDDA dojde k obrácení směru EOF a ten směřuje naopak od katody k anodě. Po navázání záporně nabitého GO na kladně nabitou vrstvu PDDA dochází opět k otočení směru EOF od anody ke katodě. [5,31]

1.5.3 Modifikace chemickou cestou

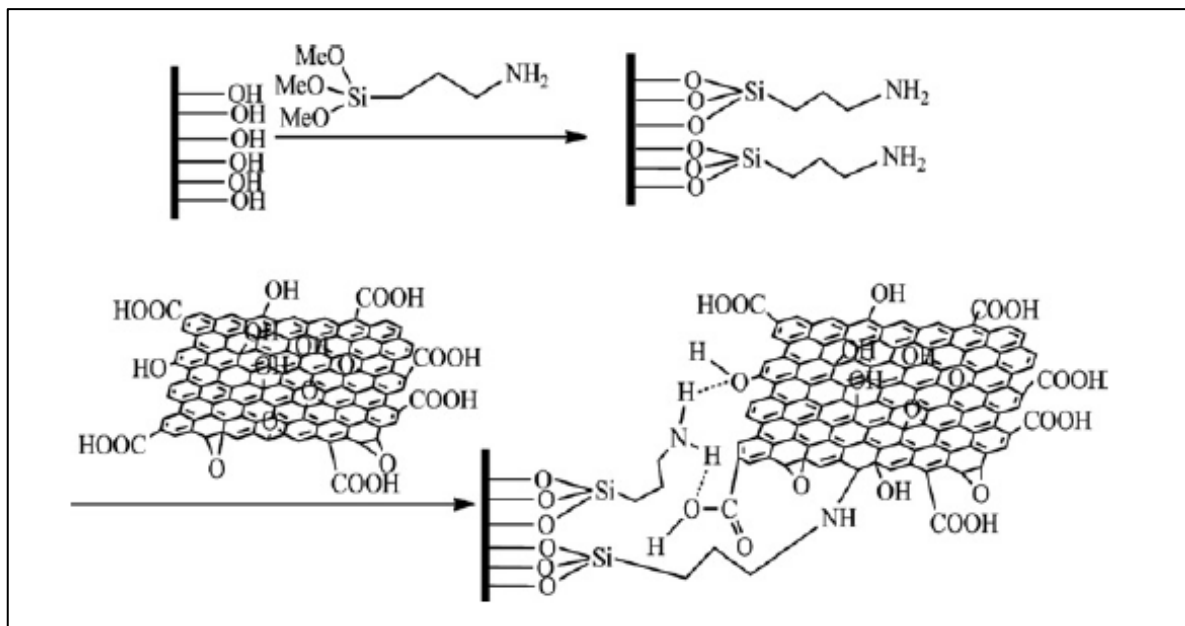
Při modifikaci chemickou cestou se GO váže na kapilární stěnu pomocí kovalentní vazby. [6,27] Výhodou této modifikace je vznik pevnější vazby než u metody LbL. U modifikace chemickou cestou by nemělo docházet k vymývání vrstev, jako se tomu v některých případech stává u metody LbL. Mezi další výhody patří např. dobrá stabilita povrchu. [4,33]

Kapilára se na začátku upravuje za účelem aktivování silanolových skupin na vnitřním povrchu kapiláry a také pro vytvoření bezvodého prostředí pro navázání aminopropylsilanu. [23] Nejdříve dojde k reakci silanolových skupin s 3-AMDS, čímž dojde k zavedení aminoskupiny na povrch kapiláry. [4,6,29] Dále se kapilára potahuje GO, který se váže pomocí kovalentní vazby na 3-AMDS. Tímto způsobem se připraví 1 vrstva GO (Obrázek 13). [6]



Obrázek 13 Potažení kapiláry vrstvou GO pomocí 3-AMDS. V prvním kroku dochází k navázání 3-AMDS na kapilární stěnu. V dalším kroku dojde k navázání GO na 3-AMDS. Poté může nastat redukce na modifikovaném povrchu z GO na grafen. (převzato z [6])

Další kovalentní modifikací je vazba s APTES. Postup modifikace kapilární stěny je naprosto totožný. K zavedení aminoskupiny na povrch kapiláry se v tomto případě používá APTES. Chemickou reakcí karboxylové skupiny z GO a aminoskupiny z APTES dojde k uchycení GO na stěnu kapiláry. [4,6,27] Mezi další podobné modifikace patří například modifikace 3-aminopropyltrimethoxysilanem (APTMS) zachycená na Obrázku 14. [23]



Obrázek 14 Potažení kapiláry GO pomocí APTMS. V prvním kroku dochází k navázání APTMS na kapilární stěnu. V dalším kroku dojde k navázání GO na APTMS pomocí kovalentní vazby. (převzato z [23])

2 CÍLE PRÁCE

Cílem diplomové práce bylo studium separačních vlastností kapilár s modifikovaným povrchem grafenem v CE. Povrch kapilár bylo nejprve nutné modifikovat metodou LbL nebo chemickou cestou. Konkrétní cíle jsou shrnuty v následujících bodech:

- Příprava stabilní disperze GO (DGO)
- Modifikace kapilární stěny pomocí polymerů, aminopropylsilanu a grafenu metodou LbL nebo chemickou cestou
- Optimalizace metody přípravy modifikovaných kapilár
- Studium modifikovaných kapilár z hlediska separačních vlastností na sériích modelových analytů
- Srovnání separačních vlastností kapilár s modifikovaným povrchem s komerční nemodifikovanou kapilárou

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Přístrojové vybavení

CE Agilent 7100 s UV-DAD detekcí a softwarem OpenLab CDS ChemStation (Agilent, USA)

Analytické váhy (Sartorius, CPA225D-OCE, Německo)

Ultrazvuková lázeň (Kraintek s.r.o., K-10, Slovenská republika)

Sonikátor (Qsonica – Q500, ultrasonic processor, USA)

Sušárna (Mettler – UN55, Německo)

Centrifuga (Thermo electron corporation – IEC CL31R Multispeed, USA)

pH metr – pH 8 + DHS (XS instrument, XS Standard T-BNC DHS, Itálie)

Vortex (Velp scientifica, Itálie)

Window maker (MicroSolv, USA)

Zdroj dusíku (Nitrogen Generator, Německo)

Další pomůcky:

Injekční stříkačky (1 ml, Medilab, Česká republika)

Filtry (0,45 µm, Labstore 13 mm, Česká republika)

Vialky Headspace šroubovací (10 ml, Thermo Fisher Scientific, USA)

Mikrozkumavky Eppendorf Safe-Lock Tubes (1,5 ml, Německo)

Vialky Snap Ring/Crimp (1 ml, snap polypropylene, Agilent, USA)

Centrifugační zkumavky s víčkem (50 ml, Roth, Německo)

Mikropipety (Eppendorf Research plus, 1000 µl, 100 µl, 20 µl, 10 µl, Německo)

Kapiláry, Bare Fused Silica, Untreated, 50 µm ID by 25 m (Simplus Capillaries, MicroSolv, USA)

3.2 Použité chemikálie

Rozpouštědla:

Acetonitril (HyPerSolv CHROMANORM, VWR)

Aqua purificata (Merck–Millipore)

Hydrogenfosforečnan sodný dodecahydrát (ČL 2005, Dr. Kulich Pharma, s.r.o.)

Hydroxid sodný (p.a., Penta)

Chlorid sodný (p.a., Lach-ner)

Kyselina octová (35%. p.a., Penta)

Kyselina fosforečná (85%, čistá, Penta)

Methanol (for HPLC, gradient grade, Sigma-Aldrich)

DGO, aminopropylsilan a polymery:

DGO ve vodě (4 mg/mL, Graphenea)

APTES (99%, Sigma-Aldrich)

PAH (Av. Mw = 65 000, 10 wt. % in H₂O, Sigma-Aldrich)

PDDA (Av. Mw = 200 000 – 350 000, Sigma-Aldrich)

PEI (branched, Av. Mw = 25 000, Sigma-Aldrich)

Modelové analyty:

Benzen (CHEMAPOL)

Ethylbenzen (čistý, standard for GC, Fluka)

Ethylester kyseliny 4-hydroxybenzoové = ethylparaben (Sigma-Aldrich)

Kofein (čistý, Penta)

Methylester kyseliny 4-hydroxybenzoové = methylparaben (Sigma-Aldrich)

Naftalen (p.a., Penta)

2-nitroanilin (LACHEMA)

3-nitroanilin (LACHEMA)

4-nitroanilin (LACHEMA)

2-nitrofenol (Merc)

3-nitrofenol (p.a., Fluka)

4-nitrofenol (čistý, CHEMAPOL)

Propylester kyseliny 4-hydroxybenzoové (Fagron)

Theobromin (Ph. Eur. 7.0, Dr. Kulich Pharma, s.r.o.)

Theofylin (ČL 97, Dr. Kulich Pharma, s.r.o.)

Thiomočovina ($\geq 99,0\%$, Sigma-Aldrich)

Toluen (p.a., Penta)

Toluen bezvodý ($\geq 99,8\%$, Sigma-Aldrich)

3.3 Příprava disperze grafenu, roztoků polymerů a aminopropylsilanu

DGO

6,25 ml komerční DGO o koncentraci 4 mg/ml bylo odebráno do 50ml odměrné baňky a naředěno na koncentraci 0,5 mg/ml čištěnou vodou doplněním po rysku. Poté bylo provedeno rozpouštění pomocí kontaktního ultrazvuku 3× po dobu 10 min (30% amplituda, OFF a ON cykly 5 s). Rozpouštění ultrazvukem se provádělo za stálého chlazení vzorku v ledové lázni. Následně byla provedena centrifugace při 10 000 rpm po dobu 10 min. Výsledná DGO byla dekantována a pro další práci byl použit získaný supernatant. Pomocí 0,5M hydroxidu sodného bylo upraveno pH disperze na hodnotu pH 8,00.

Příprava PDDA 2% vodný roztok s obsahem 0,1M NaCl

K 100 µl 20% roztoku PDDA bylo přidáno 900 µl čištěné vody obsahující NaCl o koncentraci 0,1M.

Příprava PAH 2% vodný roztok s obsahem 0,1M NaCl

K 200 µl 10% roztoku PAH bylo přidáno 800 µl čištěné vody obsahující NaCl o koncentraci 0,1M.

Příprava PEI 2% vodný roztok

200 mg PEI bylo naváženo do 10ml odměrné baňky a rozpuštěno v čištěné vodě. Roztok byl vložen do ultrazvukové lázně po dobu 10 min.

Příprava APTES 5% roztok v toluenu

0,5 ml APTES bylo odebráno za použití ochranné argonové atmosféry do 10ml odměrné baňky a naředěno bezvodým toluenem po rysku.

3.4 Příprava pufrů

20mM fosfátový pufr, pH 7,00

358 mg hydrogenfosforečnanu sodného dodekahydrátu bylo naváženo do 50ml odměrné baňky a rozpuštěno v čištěné vodě. Pro dokonalé rozpuštění byla použita ultrazvuková lázeň. Odměrná baňka byla poté doplněna čištěnou vodou po rysku. Pomocí 5% kyseliny fosforečné bylo upraveno pH na hodnotu pH 7,00. Pufr byl zfiltrován pomocí filtru o porozitě 0,45 μm .

20mM fosfátový pufr, pH 7,00 + 20 % methanolu (MeOH)

2 ml MeOH byly odebrány do 10ml odměrné baňky a naředěny 20mM fosfátovým pufrům, pH 7,00 (viz příprava výše) po rysku. Pufr byl zfiltrován pomocí filtru o porozitě 0,45 μm .

3.5 Příprava vzorků pro měření

Marker EOF – thiomocovina

Zásobní roztok byl připraven o koncentraci 1 mg/ml rozpuštěním thiomocoviny v MeOH. Pro měření byl zásobní roztok naředěn na koncentraci 0,1 mg/ml příslušným puftrem. Připravený vzorek byl zfiltrován pomocí filtru o porozitě 0,45 μm .

Příprava modelových analytů – parabeny

- methylparaben
- ethylparaben
- propylparaben
- směs methylparaben + ethylparaben + propylparaben

Zásobní roztoky byly připraveny o koncentraci 1 mg/ml rozpuštěním v MeOH. Pro měření byly zásobní roztoky naředěny na koncentraci 0,1 mg/ml příslušným puftrem. Vzorky byly zfiltrovány pomocí filtru o porozitě 0,45 μm .

Příprava modelových analytů – nitrofenoly

- 2-nitrofenol
- 3-nitrofenol
- 4-nitrofenol
- směs 2-nitrofenol + 3-nitrofenol + 4-nitrofenol

Zásobní roztoky byly připraveny o koncentraci 1 mg/ml rozpuštěním v MeOH. Zásobní roztok 2-nitrofenolu byl naředěn z důvodu nižší rozpustnosti na koncentraci 0,5 mg/ml. Pro měření byly zásobní roztoky naředěny na koncentraci 0,2 mg/ml příslušným puftrem. Vzorky byly zfiltrovány pomocí filtru o porozitě 0,45 μm .

Příprava modelových analytů – nitroaniliny

- 2-nitroanilin
- 3-nitroanilin
- 4-nitroanilin
- směs 2-nitroanilin + 3-nitroanilin + 4-nitroanilin

Zásobní roztoky byly připraveny o koncentraci 1 mg/ml rozpuštěním v MeOH. Zásobní roztok 4-nitroanilinu byl naředěn z důvodu nižší rozpustnosti na koncentraci 0,5 mg/ml. Pro měření byly zásobní roztoky naředěny na koncentraci 0,1 mg/ml příslušným pufrům. Vzorky byly zfiltrány pomocí filtru o porozitě 0,45 µm.

Příprava modelových analytů – látky s aromatickým kruhem

- benzen
- toluen
- ethylbenzen
- naftalen
- směs benzen + toluen + ethylbenzen
- směs benzen + naftalen

Zásobní roztoky byly připraveny o koncentraci 5 mg/ml rozpuštěním v MeOH. Pro měření byly zásobní roztoky naředěny na koncentraci 0,5 mg/ml příslušným pufrům. Pro směs látek s aromatickým kruhem byl používán 20mM fosfátový pufr, pH 7,00 s přidavkem 20 % MeOH. Tento typ vzorků bylo nutné připravovat v čase potřeby. Vzorky byly zfiltrány pomocí filtru o porozitě 0,45 µm.

Příprava modelových analytů – puriny

- kofein
- theofylin
- theobromin
- směs kofein + theofylin + theobromin

Zásobní roztoky byly připraveny o koncentraci 1 mg/ml rozpuštěním v MeOH. V případě theobrominu byl k zásobnímu roztoku 1 mg/ml pro lepší rozpuštění látky přidán 1M NaOH, který tvořil 3 % celkového objemu vzorku. Zásobní roztoky byly zředěny na koncentraci 0,3 mg/ml rozpuštěním příslušného množství zásobního roztoku v MeOH. Výsledný vzorek pro měření byl připraven ze 166,7 µl vzorku (0,3 mg/ml), ke kterému bylo přidáno 333,3 µl MeOH a 500 µl příslušného pufru. Vzorky byly zfiltrány pomocí filtru o porozitě 0,45 µm.

3.6 Příprava kapilár s modifikovaným povrchem

V diplomové práci byly používány kapiláry o celkové délce 50 cm s vnitřním průměrem 50 μm . Každá kapilára byla upravena před umístěním do cartridge pro CE na požadovanou délku a po provedení modifikace povrchu bylo vypáleno detekční okénko. Vzdálenost od středu detekčního okénka ke katodovému konci kapiláry byla 8,4 cm. Délka detekčního okénka byla 5 mm. Oba konce kapiláry byly zbaveny vrstvy polyimidového pláště opálením.

Modifikace stěny kapilár proběhla dvěma způsoby – metodou LbL a chemickou cestou. V obou případech došlo nejdříve k navázání polymeru (respektive aminopropylsilanu APTES) na stěnu kapiláry, na který se poté navázal GO. V následujících tabulkách (*Tabulka 1–4*) jsou zobrazeny jednotlivé kroky při modifikaci daných kapilár.

Příprava DGO proběhla ve všech případech stejně (viz kapitola 3.3). Polymery pro potahování kapilár byly naředěny a použity jako 2% vodné roztoky, aminopropylsilan jako 5% roztok v toluenu (viz kapitola 3.3).

3.6.1 Modifikace kapilární stěny metodou LbL

U modifikace metodou LbL došlo k navázání GO na polymer pomocí elektrostatických interakcí.

Kapilára modifikována PDDA/GO (upraveno dle [31])

Tabulka 1 znázorňuje přípravu kapiláry potažené vrstvou PDDA a GO. Prvním krokem bylo promývání kapiláry hydroxidem sodným. Pro odstranění zbylého hydroxidu sodného byla kapilára promyta vodou. V dalším kroku došlo k promývání kapiláry roztokem polymeru, po kterém proběhlo opět promývání vodou. Na závěr byla kapilára promyta DGO a vodou. Promývání a potahování kapiláry probíhalo tlakem 930 mBar.

Tabulka 1 Příprava kapiláry PDDA/GO

	Chemikálie používané k potahování	Čas potahování (promývání)
1.	0,1M NaOH	1 hod
2.	voda	5 min
3.	PDDA	1 hod
4.	voda	10 min
5.	DGO 0,5 mg/ml, pH 8,00	30 min
6.	voda	10 min

Kapilára modifikována PAH/GO (upraveno dle [31,33])

Tabulka 2 popisuje postup přípravy kapiláry potažené vrstvou PAH a GO. Došlo k promývání kapiláry hydroxidem sodným a vodou. V dalším kroku byla kapilára vyjmuta z CE cartridge a zbývající kroky proběhly mimo přístroj CE. Dále byla kapilára promyta roztokem polymeru a poté vodou. Na závěr byla kapilára promyta DGO, vodou a vyfoukána vzduchem do sucha. Promývání a potahování kapiláry probíhalo tlakem 930 mBar.

Tabulka 2 Příprava kapiláry PAH/GO

	Chemikálie používané k potahování	Čas potahování (promývání)
1.	0,1M NaOH	1 hod
2.	voda	15 min
3.	PAH	1 hod
4.	voda	10 min
5.	DGO 0,5 mg/ml, pH 8,00	30 min
6.	voda	30 min
7.	vzduch	20 min

Kapilára modifikována PEI/GO (upraveno dle [24,31])

Příprava kapiláry polymerem PEI a GO proběhla dle *Tabulky 3*. Kapilára byla promyta hydroxidem sodným a vodou. Dále byla kapilára vyjmuta z CE

cartridge a zbývající kroky proběhly mimo přístroj CE. Poté byla kapilára promyta roztokem polymeru a vodou. V dalším kroku byla kapilára promyta DGO a ponechána v sušárně při 70 °C po dobu 2 hod. Poté byla kapilára vyjmuta ze sušárny a promyta vodou. Promývání a potahování kapiláry probíhalo tlakem 930 mBar.

Tabulka 3 Příprava kapiláry PEI/GO

	Chemikálie používané k potahování	Čas potahování (promývání)
1.	0,1M NaOH	1 hod
2.	voda	10 min
3.	PEI	1 hod
4.	voda	10 min
5.	DGO 0,5 mg/ml, pH 8,00	30 min
6.	sušárna 70 °C	2 hod
7.	voda	10 min

3.6.2 Modifikace kapilární stěny chemickou cestou

V tomto případě došlo k navázání GO na aminopropylsilan APTES pomocí kovalentní vazby.

Kapilára modifikovaná APTES/GO (upraveno dle [6,23])

Tato kapilára byla připravena dle *Tabulky 4*. Nejdříve byla promyta hydroxidem sodným. Dále byla kapilára vložena do sušárny a ponechána zde při 100 °C po dobu 1 hod. Poté byla kapilára zchlazena a promyta vodou. V dalším kroku byla kapilára promyta kyselinou chlorovodíkovou, vodou a acetonem. Poté byla vysušena proudem dusíku. Následně byla kapilára promyta roztokem aminopropylsilanu, vložena do sušárny a ponechána zde při 100 °C po dobu 3 hod. Kapilára byla zchlazena a promyta toluenem a acetonem. Poté byla vysušena proudem dusíku. Dále byla kapilára promyta DGO a ponechána v sušárně při 70 °C po dobu 2 hod. Poté byla kapilára vyjmuta ze sušárny a promyta vodou. Promývání a potahování kapiláry probíhalo tlakem 930 mBar.

Tabulka 4 Příprava kapiláry APTES/GO

	Chemikálie používané k potahování	Čas potahování (promývání)
1.	1M NaOH	15 min
2.	sušárna 100 °C	1 hod
3.	voda	10 min
4.	0,5M HCl	15 min
5.	voda	10 min
6.	aceton	10 min
7.	dusík	1 hod
8.	APTES	15 min
9.	sušárna 100 °C	3 hod
10.	toluen	5 min
11.	aceton	10 min
12.	dusík	15 min
13.	DGO 0,5 mg/ml, pH 8,00	15 min
14.	sušárna 70 °C	2 hod
15.	voda	15 min

3.7 Ověřovací experiment – příprava

Příprava roztoků

Pro ověřovací experiment byly připraveny roztoky o koncentraci 0,1 mg/ml naředěním zásobních roztoků o koncentraci 0,2 mg/ml čišťenou vodou.

DGO 0,2 mg/ml

DGO 0,2 mg/ml byla připravena naředěním DGO 0,5 mg/ml (příprava viz kapitola 3.3) v čišťené vodě.

Voda s obsahem 0,1M NaCl

219 mg 0,1M chloridu sodného bylo naváženo do 25ml odměrné baňky a rozpuštěno v čišťené vodě. Odměrná baňka byla doplněna čišťenou vodou po rysku.

PDDA 0,2 mg/ml

PDDA 0,2 mg/ml byl připraven použitím PDDA 2% vodného roztoku (příprava viz kapitola 3.3) a jeho naředěním vodou s obsahem 0,1M NaCl na požadovanou koncentraci.

PAH 0,2 mg/ml

PAH 0,2 mg/ml byl připraven použitím PAH 2% vodného roztoku (příprava viz kapitola 3.3) a jeho naředěním vodou s obsahem 0,1M NaCl na požadovanou koncentraci.

PEI 0,2 mg/ml

PEI 0,2 mg/ml byl připraven naředěním PEI 2% vodného roztoku (příprava viz kapitola 3.3) v čišťené vodě na požadovanou koncentraci.

Provedení ověřovacího experimentu

Ve vialkách byly smíchány připravené roztoky polymerů s DGO. První vialka obsahovala pouze GO (0,1 mg/ml) a připravila se smíchání 500 μ l DGO (0,2 mg/ml) a 500 μ l čištěné vody. V dalších vialkách došlo ke smíchání 500 μ l DGO (0,2 mg/ml) s 500 μ l polymeru PDDA, PAH, PEI (0,2 mg/ml).

Roztoky byly sledovány za laboratorní teploty a po zahřívání v sušárně. První série byla podrobena kontrolní reakci při laboratorní teplotě 25 °C. U druhé série došlo k ponechání roztoků v sušárně při 70 °C po dobu 1 hodiny. Roztoky byly porovnávány z hlediska vzniku agregátů daných kompatibilitou DGO a roztoku polymeru a změn v roztoku vzniklých vystavením zvýšené teplotě.

3.8 Metoda měření na kapilární elektroforéze

Tabulka 5 zobrazuje podmínky měření, kondicionaci a promývání kapiláry před a po analýze. Pro aktivaci silanolových skupin na vnitřním povrchu kapiláry byla nová nemodifikovaná kapilára promývána 0,1M hydroxidem sodným. U modifikovaných kapilár se 0,1M hydroxid sodný pro promývání nepoužíval a kapiláry byly promývány pouze čištěnou vodou a pufrům.

Kondicionace nové kapiláry probíhala pomocí příslušného pufru. Nejdříve se začalo aplikovat nízké napětí a následně došlo k jeho postupnému navyšování až do hodnoty 25 kV. Kondicionace byla prováděna do ustálení odezvy detektoru a udržení konstantního napětí a proudu.

Tabulka 5 Podmínky měření a promývání kapiláry

Podmínky měření	
napětí	5kV, 10kV, 15kV, 25kV
velikost nástřiku	35–50 mBar po dobu 3–5 s
vlnové délky DAD	205–350 nm
teplota	25 °C
Kondicionace	
promývání pufrům	10 min
napětí	5kV, 10kV, 15kV, 25kV
Promývání kapiláry před začátkem nové analýzy	
voda	5 min
pufr	10 min
Promývání kapiláry po analýze	
pufr	5 min
voda	10 min

4 VÝSLEDKY A DISKUSE

4.1 Modifikované kapiláry pro kapilární elektroforézu

Kapiláry pro CE byly připraveny modifikací povrchu stěny vrstvou polymeru nebo aminopropylsilanu, na kterou byl navázán grafen. Modifikace byly založeny na principu LbL nebo na vzniku kovalentních vazeb. Pro přípravu kapilár bylo nejprve nutné připravit DGO a příslušné roztoky polymerů a aminopropylsilanu.

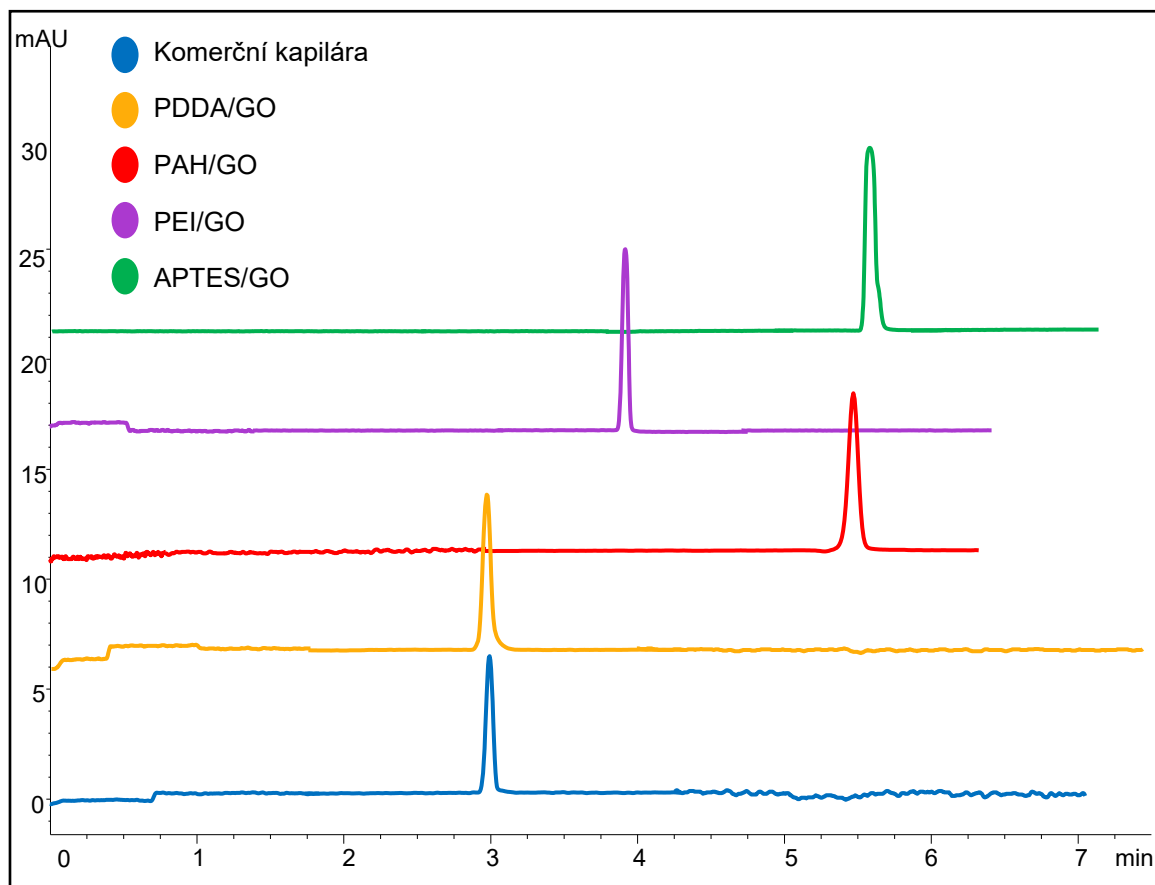
K úpravě pH DGO na hodnotu 8,00 bylo přistoupeno z důvodu zajištění stability disperze. V disperzi tímto dochází k tvorbě negativních nábojů na listech GO, které se navzájem odpuzují, a tím je zabráněno nežádoucímu vzniku agregátů GO.

Do roztoků polymerů PAH a PDDA určených pro přípravu kapilár PAH/GO a PDDA/GO byl přidán NaCl z důvodu vytvoření rozvolněnější struktury polymerů umožňující snadněji navázat na svůj povrch listy GO. V případě modifikací povrchu kapilár polymery PAH a PEI byla modifikace stěny provedena mimo CE tak, aby bylo zabráněno kontaktu DGO s roztokem polymeru, a tím se zabránilo vzniku agregátů GO a následnému ucpání kapiláry. Hypotéza týkající se srážení GO z DGO v případě expozice roztoku polymeru byla potvrzena v experimentu uvedeném níže (viz kapitola 4.2).

Po přípravě modifikovaných kapilár (viz kapitola 3.6) bylo přikročeno ke studiu separačních vlastností v CE. V těchto experimentech byl zvolen jako BGE 20mM fosfátový pufr, pH 7,00. Pro srovnání separačních vlastností byly nejprve získány výsledky měření na komerční nemodifikované kapiláře. Následně byla studována separační schopnost kapilár a migrační časy modelových analytů (směs parabenů, nitrofenolů, nitroanilinů, purinů a látek obsahujících aromatický kruh) u kapilár s modifikovaným povrchem. Výsledky byly poté srovnány z hlediska separačních vlastností, délky migračních časů a tvaru píků analytů s nemodifikovanou komerční kapilárou.

Jako marker EOF byla zvolena thiomocovina. Migrační časy markeru EOF se měnily v závislosti na typu modifikace kapiláry a jsou zobrazeny na *Obrázku 15*. Pro komerční kapiláru a kapiláru potaženou PDDA/GO byl zaznamenán čas 3 minuty. Naproti tomu u kapilár modifikovaných PAH/GO (5,5 min), PEI/GO (4 min) a APTES/GO (5,6 min) byly migrační časy

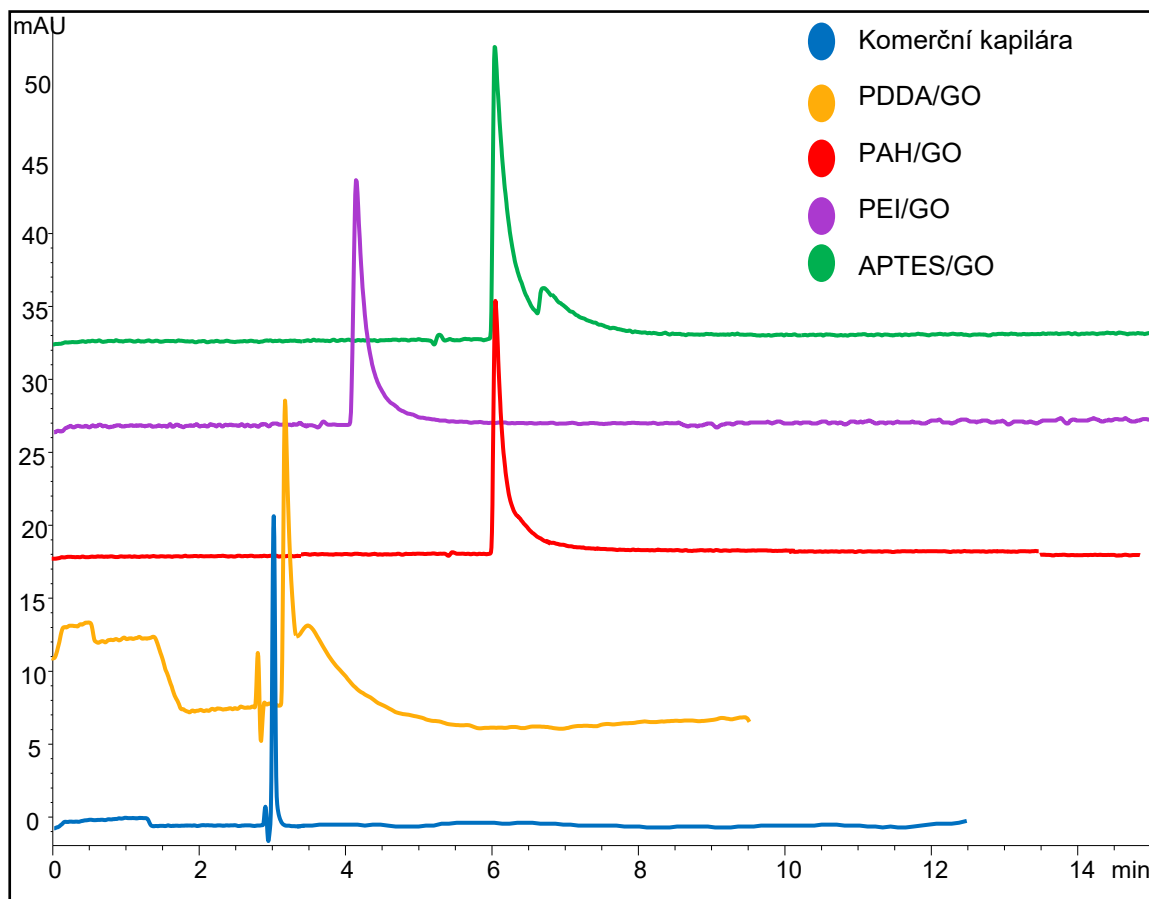
značně prodlouženy a tyto kapiláry bylo třeba před prvním měřením kondicionovat po delší dobu.



Obrázek 15 Porovnání migračních časů thiomocoviny (0,1 mg/ml rozpuštěno ve 20mM fosfátovém pufru, pH 7,00) jako markeru EOF u kapilár s modifikovaným povrchem a komerční kapiláry. Napětí 25 kV, nástřik 50 mBar/5s, 20mM fosfátový pufr, pH 7,00, UV detekce 240 nm.

4.1.1 Modelová směs analytů – parabeny

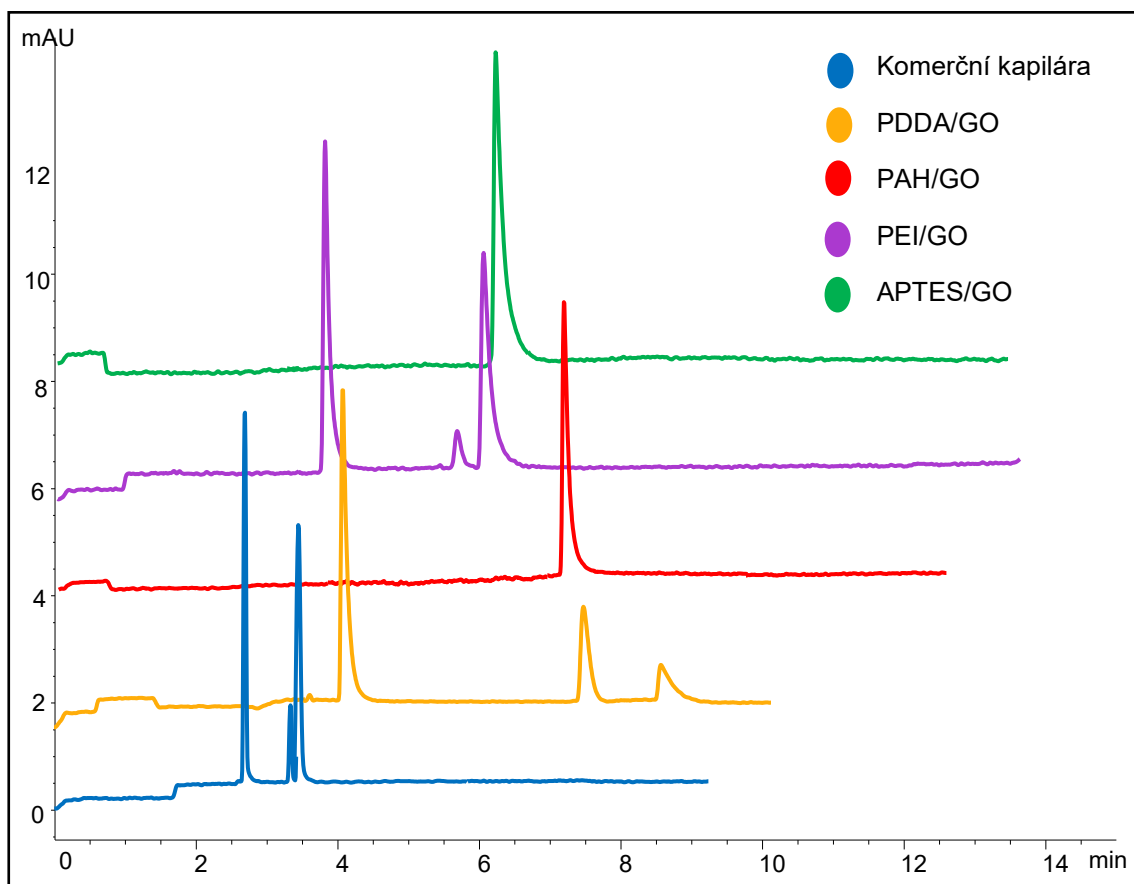
Na *Obrázku 16* byla sledována separační schopnost kapilár na směsi modelových analytů (methylparaben, ethylparaben a propylparaben).



Obrázek 16 Porovnání separačních vlastností kapilár s modifikovaným povrchem na směsi modelových analytů methylparaben, ethylparaben, propylparaben (0,1 mg/ml rozpuštěno ve 20mM fosfátovém pufru, pH 7,00). Napětí 25 kV, nástřik 50 mBar/5s, 20mM fosfátový pufr, pH 7,00, UV detekce 254 nm.

Při porovnání vlastností modifikovaných kapilár s komerční kapilárou došlo ve všech případech k prodloužení migračního času analytů. Za prodloužení migračního času je zodpovědný GO navázaný na vnitřní povrch kapiláry. U modifikovaných kapilár nebylo pozorováno zlepšení separačních vlastností (PAH/GO a PEI/GO) nebo bylo pozorováno jen částečné zlepšení separace (PDDA/GO a APTES/GO). Z výše uvedených výsledků vyplývá, že modifikací povrchu kapiláry nebylo docíleno methylenové selektivity. K rozdělení analytů nedošlo ani při nižším napětí (10kV) u žádné z jmenovaných modifikací kapilár.

4.1.2 Modelová směs analytů – nitrofenoly

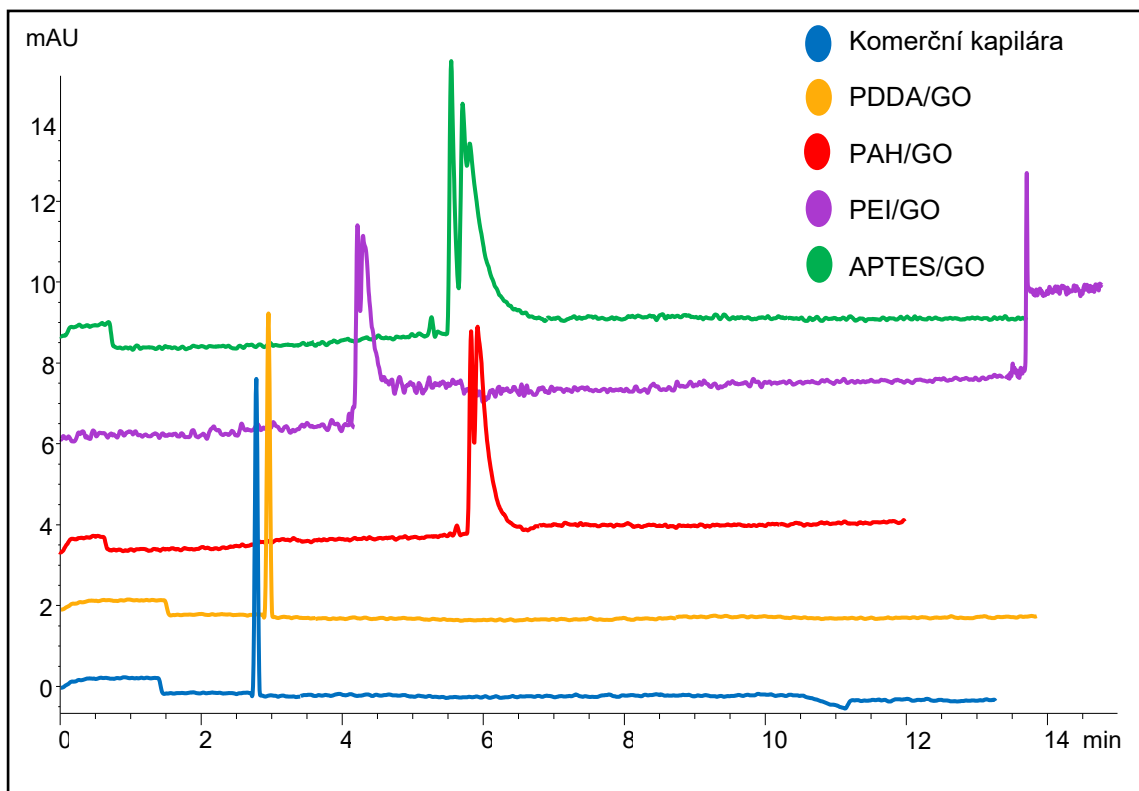


Obrázek 17 Porovnání separačních vlastností kapilár s modifikovaným povrchem na směsi modelových analytů 2-nitrofenol, 3-nitrofenol, 4-nitrofenol (0,2 mg/ml rozpuštěno ve 20mM fosfátovém pufru, pH 7,00). Napětí 25 kV, nástřik 35 mBar/5s, 20mM fosfátový pufr, pH 7,00, UV detekce 214 nm.

Při studiu směsi analytů (2-nitrofenol, 3-nitrofenol a 4-nitrofenol) byla sledována selektivita kapiláry související s rozlišením polohy nitro skupiny (*ortho*, *meta*, *para*) na aromatickém kruhu (Obrázek 17). I v tomto případě došlo u modifikovaných kapilár k prodloužení migračních časů ve srovnání s komerční kapilárou. Zlepšená účinnost separace byla pozorována v případě komerční kapiláry, avšak s nízkým rozlišením. Na kapilárách modifikovaných PDDA/GO a PEI/GO došlo k úplnému rozdělení analytů v pořadí 3-nitrofenol (PDDA/GO 4,1 min; PEI/GO 4 min), 2-nitrofenol (PDDA/GO 7,5 min; PEI/GO 5,7 min) a 4-nitrofenol (PDDA/GO 8,8 min; PEI/GO 6,3 min). U kapilár modifikovaných PAH/GO a APTES/GO nebyla zaznamenána zlepšená

separace. V tomto případě k rozdělení směsi nedošlo, a to ani v případě volby nižšího napětí (10 kV).

4.1.3 Modelová směs analytů – nitroaniliny

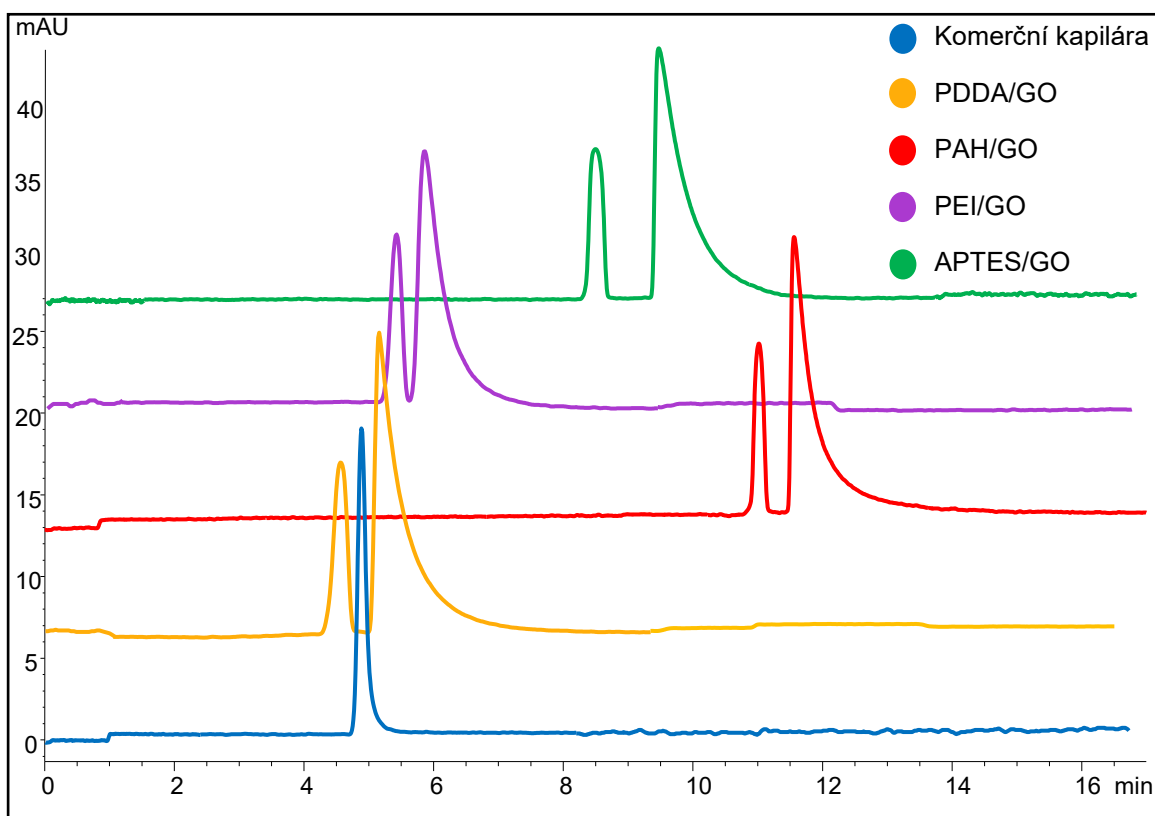


Obrázek 18 Porovnání separačních vlastností kapilár s modifikovaným povrchem na směsi modelových analytů 2-nitroanilin, 3-nitroanilin, 4-nitroanilin (0,1 mg/ml rozpuštěno ve 20mM fosfátovém pufru, pH 7,00). Napětí 25 kV, nástřík 35 mBar/5s, 20mM fosfátový pufr, pH 7,00, UV detekce 192 nm.

Na této modelové směsi analytů (2-nitroanilin, 3-nitroanilin a 4-nitroanilin) byla sledována selektivita modifikovaných kapilár týkající se polohy substituce nitro skupiny (*ortho*, *meta*, *para*) na aromatickém kruhu (Obrázek 18). Opět došlo k prodloužení migračního času analytů v případě modifikovaných kapilár oproti nemodifikované komerční kapiláře. Na kapilárách modifikovaných (PAH/GO, PEI/GO, APTES/GO) byla pozorována neúplná separace analytů. U komerční kapiláry a kapiláry PDDA/GO k separaci analytů nedošlo a směs byla zaznamenána jako jeden pík v čase 3 min. Ke zlepšení separace nedošlo ani při aplikaci nižšího napětí (10 kV).

4.1.4 Modelová směs analytů – látky s aromatickým kruhem

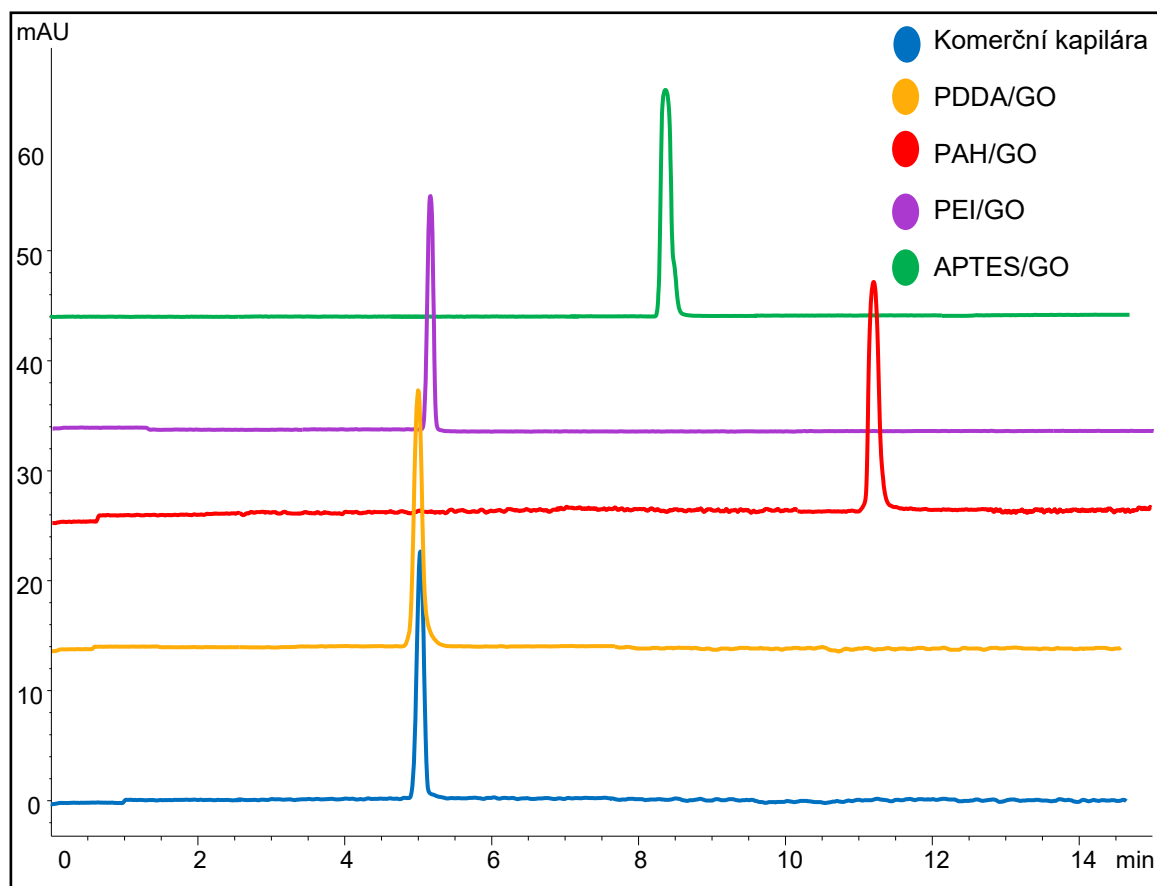
Pro tyto analýzy byl zvolen 20mM fosfátový pufr, pH 7,00 s 20 % přídavkem organického rozpouštědla MeOH z důvodu nepolárního charakteru analytů. V této kapitole byla použita směs benzenu a naftalenu pro studium selektivity k počtu aromatických kruhů (Obrázek 19). V druhé části byla studována směs analytů benzen, toluen, ethylbenzen z hlediska selektivity k postupnému prodlužování alkylového řetězce na aromatickém kruhu (Obrázek 20).



Obrázek 19 Porovnání separačních vlastností kapilár s modifikovaným povrchem na směsi modelových analytů benzen, naftalen (0,5 mg/ml rozpuštěno ve 20mM fosfátovém pufru, pH 7,00 + 20 % MeOH). Napětí 25 kV, nástřik 35 mBar/5s, 20mM fosfátový pufr, pH 7,00 + 20% MeOH, UV detekce 205 nm.

Z Obrázku 19 vyplývají následující závěry. Modifikace kapilární stěny vede k zisku selektivity týkající se rozlišení počtu aromatických kruhů. U všech modifikovaných kapilár bylo zaznamenáno úplné rozdělení směsi analytů v pořadí benzen, naftalen. Získaný výsledek byl doložen srovnáním s komerční

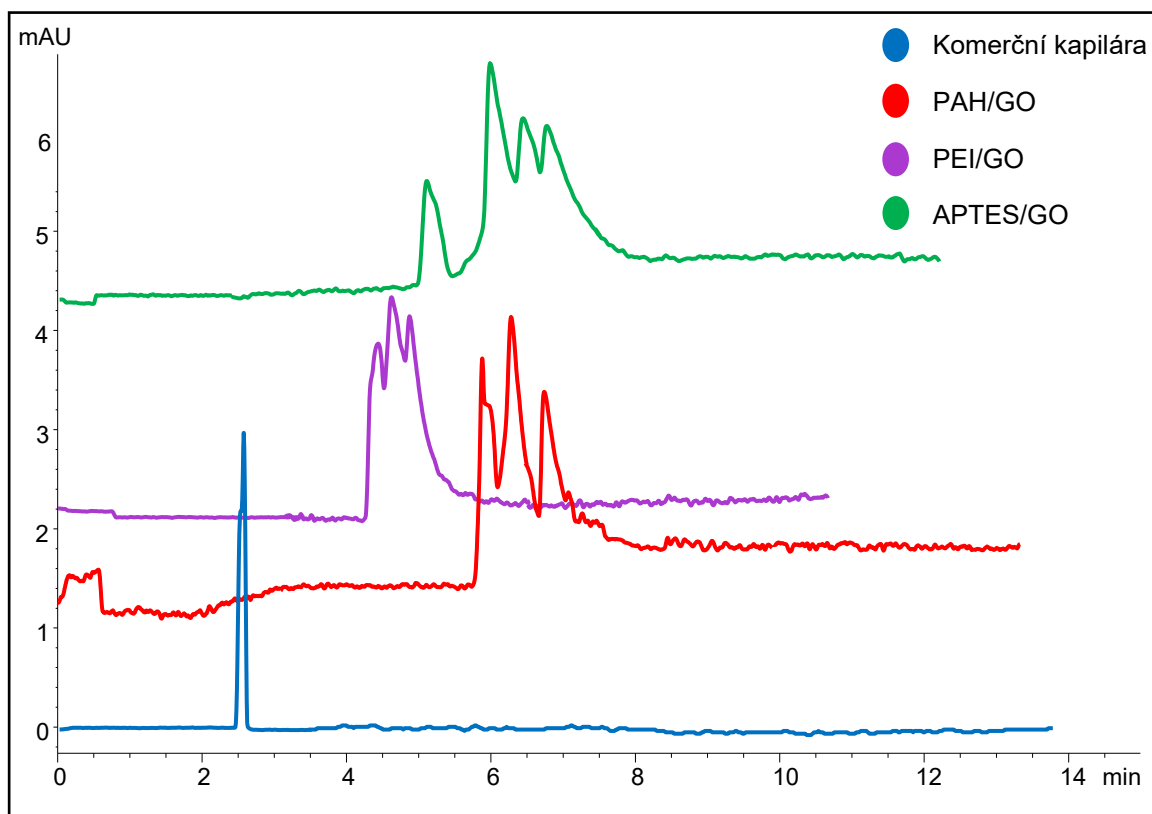
nemodifikovanou kapilárou, kde směs nebyla rozdělena, a to ani při aplikaci nižšího napětí (10 kV).



Obrázek 20 Porovnání separačních vlastností kapilár s modifikovaným povrchem na směsi modelových analytů benzen, toluen, ethylbenzen (0,5 mg/ml rozpuštěno ve 20mM fosfátovém pufru, pH 7,00 + 20 % MeOH). Napětí 25 kV, nástřik 35 mBar/5s, 20mM fosfátový pufr, pH 7,00 + 20 % MeOH, UV detekce 205 nm.

V případě této směsi modelových analytů je viditelné, že modifikace kapilární stěny nepřispěla ke zlepšení separace. Směs analytů nebyla rozdělena ani při sníženém napětí 10 kV. U kapilár PAH/GO a APTES/GO byl prodloužen migrační čas způsobený nejspíše déle trvajícím interakcí analytů s modifikovaným povrchem kapiláry. Ze získaných výsledků vyplývá, že modifikací povrchu stěny kapiláry nebylo dosaženo selektivity k aromatickému kruhu, který obsahuje prodlužující se alkylový řetězec.

4.1.5 Modelová směs analytů – puriny



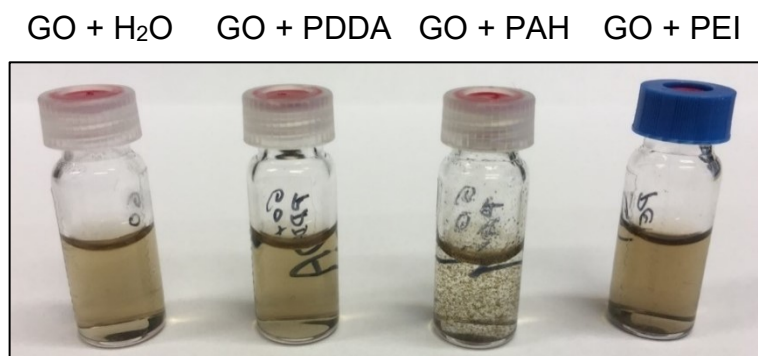
Obrázek 21 Porovnání separačních vlastností kapilár s modifikovaným povrchem na směsi modelových analytů kofein, theobromin, theofylin (166,7 μ l vzorku o koncentraci 0,3 mg/ml + 333,3 μ l MeOH + 500 μ l 20mM fosfátového pufru, pH 7,00). Napětí 25 kV, nástřik 50 mBar/5s, 20mM fosfátový pufr pH 7,00, UV detekce 205 nm.

Modifikace povrchu stěny kapiláry u směsi analytů kofein, theobromin, theofylin (Obrázek 21) vedla k prodloužení migračních časů společně se zlepšenou separací. Modelové analyty byly však jen částečně rozdělány, nejlepšího výsledku bylo dosaženo u kapiláry PAH/GO. Naproti tomu u komerční kapiláry nedošlo k separaci této směsi analytů. Zlepšení separačních vlastností nebylo dosaženo ani při volbě nižšího napětí 10 kV. Měření této modelové směsi neproběhlo v rámci diplomové práce na kapiláře PDDA/GO.

4.2 Ověřovací experiment – výsledky

Tento experiment byl proveden, abychom objasnili příčiny ucpávání kapiláry během modifikace kapilární stěny. V rámci experimentu bylo pracováno s hypotézou, zda nedochází ke srážení roztoku polymeru a DGO a dále byl studován vliv zvýšené teploty (70 °C) na tento roztok.

1. Kontrolní experiment při laboratorní teplotě 25 °C (Obrázek 22)

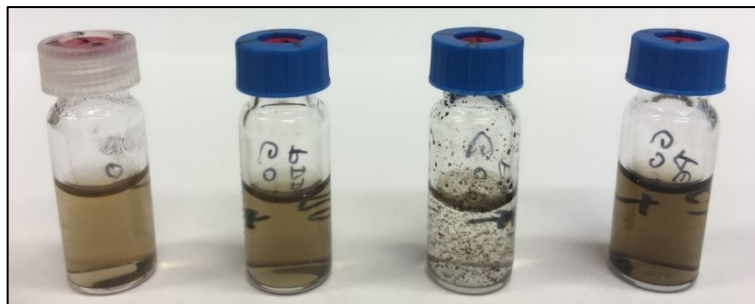


Obrázek 22 Roztok vody s GO (0,1 mg/ml), roztoky polymerů smíchané s DGO (0,1 mg/ml) při laboratorní teplotě 25 °C

Roztoky GO + PDDA a GO + PEI po smíchání nevykazovaly agregaci a byly totožné s kontrolním roztokem obsahujícím DGO ve vodě. Hnědé zabarvení roztoků odpovídá barvě oxidované formy GO. V případě GO + PAH došlo k agregaci GO. Vznik agregace GO potvrzuje naši hypotézu o ucpávání kapiláry. Při styku roztoku polymeru s DGO vznikají agregáty, které mohou ucpávat kapiláru během modifikace povrchu stěny.

2. Experiment vystavení roztoků polymerů a DGO 70 °C po dobu 1 hodiny (Obrázek 23)

GO + H₂O GO + PDDA GO + PAH GO + PEI



Obrázek 23 Roztok vody s GO (0,1 mg/ml), roztoky polymerů smíchané s DGO (0,1 mg/ml) po vystavení 70 °C po dobu 1 hodiny

Po vystavení roztoků polymerů a DGO teplotě 70 °C (1 hod) došlo k částečné redukci GO, což je doloženo ztmavnutím hnědé barvy roztoků polymerů a DGO. Agregace GO byla opět zaznamenána pouze v případě roztoku GO + PAH. U roztoku PEI/GO nedošlo k agregaci. Tento výsledek je důležitý, protože kapilára PEI/GO je při přípravě vystavena teplotě 70 °C a tímto byla ověřena kompatibilita roztoku polymeru PEI a DGO.

5 ZÁVĚR

V diplomové práci byly sledovány separační vlastnosti na kapilární stěně modifikované grafenem. Byla připravena stabilní DGO důležitá pro potahování vnitřní stěny kapiláry. Úspěšně byly připraveny modifikované kapiláry dvěma způsoby a provedena optimalizace metody. Kapilára modifikována metodou LbL pomocí elektrostatických interakcí byla potažena polymery PDDA, PAH, PEI s GO na povrchu. Příprava kapiláry chemickou cestou pomocí kovalentních vazeb byla potažena aminopropylsilanem APTES a GO. Modifikované kapiláry byly studovány z hlediska separačních vlastností na sériích modelových analytů. Výsledky separace byly porovnány s výsledky měření na komerční nemodifikované kapiláře.

Modifikací kapilárního povrchu nebylo dosaženo methylenové selektivity v případě směsi parabenů. U modelové směsi nitrofenolů, kde se sledovala selektivita související s polohou nitro skupiny na aromatickém kruhu, došlo k úplnému rozdělení analytů na kapilárách PDDA/GO a PEI/GO v pořadí 3-nitrofenol, 2-nitrofenol a 4-nitrofenol. Dále byla sledována selektivita modifikovaných kapilár týkající se polohy nitro skupiny na aromatickém kruhu u modelové směsi nitroanilinů, kde byla zaznamenána neúplná separace na kapilárách PAH/GO, PEI/GO, APTES/GO. Výborných separačních vlastností bylo dosaženo na všech modifikovaných kapilárách u modelové směsi látek obsahující aromatický kruh, kde byla pozorována selektivita z hlediska rozlišení počtu aromatických kruhů v pořadí benzen, naftalen. Oproti tomu u druhé modelové směsi látek obsahující aromatický kruh modifikace kapilární stěny nepřispěla k získání methylenové selektivity. U modelové směsi purinů došlo pouze k částečnému zlepšení separace na modifikovaných kapilárách. Ve většině případů na modifikovaných kapilárách bylo zaznamenáno zlepšení separačních vlastností a prodloužení migračních časů, které bylo způsobené interakcí mezi modelovými analyty a GO navázaným na povrchu kapiláry.

Při experimentech se objevily problémy spojené s nestabilitou povrchu kapilár, ucpáváním kapilár a v některých případech byla zaznamenána nízká opakovatelnost měření. Ucpávání kapiláry bylo objasněno u kapiláry PAH/GO provedeným experimentem (agregace GO v roztoku polymeru PAH). Abychom předešli styku roztoku polymeru PAH s GO, potahování bylo prováděno mimo

přístroj CE. Získané výsledky z této práce poslouží jako základ pro následující experimenty, kdy bude pozornost věnována přípravě modifikovaných povrchů kapilár novými polymery a GO s očekávaným zlepšením separačních vlastností, případně použití nových modelových analytů.

6 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] *Kapilární elektroforéza* [on-line], [cit. 2020-11-07]. Dostupné z: <http://www.amedis.cz/laboratorni-technika/kapilarni-elektroforeza/>
- [2] GAŠ, B. Kapilární elektroforéza. *Vesmír*, **2001**, 80, 370–373.
- [3] PAZOUREK, J. *Moderní elektroforetické analytické metody* (přednášky pro magisterské studium), Brno 2003.
- [4] SITKO, R.; ZAWISZA, B.; MALICKA, E. Graphene as a new sorbent in analytical chemistry. *Trends Anal. Chem.*, **2013**, 51, 33–43.
- [5] LIU, X. et al. Application of graphene as the stationary phase for open-tubular capillary electrochromatography. *J. Chromatogr. A*, **2013**, 1277, 93–97.
- [6] QU, Q.; GU, C.; HU, X. Capillary coated with graphene and graphene oxide sheets as stationary phase for capillary electrochromatography and capillary liquid chromatography. *Anal. Chem.*, **2012**, 84, 8880–8890.
- [7] KLOUDA, P. *Moderní analytické metody*. 3. vyd., Pavko, Ostrava 2016. ISBN 978-80-86369-22-8
- [8] LAUER, H. H.; ROZING, G. P. *High Performance Capillary Electrophoresis. A Primer*, 2. vyd., Agilent Technologies, Německo 2018.
- [9] Prince Technologies [on-line], [cit. 2021-04-29]. Dostupné z: <https://www.princetechnologies.com/products/ce-systems/ce-technologies/ce-introduction/>
- [10] Capillary Electrophoresis [on-line], [cit. 2021-04-29]. Dostupné z: https://www.whitman.edu/chemistry/edusolns_software/GC_LC_CE_MS_2017/CH%204%202017.pdf
- [11] MINISTERSTVO ZDRAVOTNICTVÍ ČESKÉ REPUBLIKY. *Český lékopis 2017*. 1. vyd., Grada Publishing, a.s., Praha 2017. ISBN 978-80-271-0500-7
- [12] *Capillary Electrophoresis* [on-line], [cit. 2020-12-14]. Dostupné z: [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Supplemental_Modules_\(Analytical_Chemistry\)/Instrumental_Analysis/Capillary_Electrophoresis](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Supplemental_Modules_(Analytical_Chemistry)/Instrumental_Analysis/Capillary_Electrophoresis)
- [13] HEIGER, D. N. *High Performance Capillary Electrophoresis – An Introduction*. 3. vyd., Hewlett Packard Company, Francie 1992,1997.

- [14] ALTRIA, K. D. *Capillary Electrophoresis Guidebook: Principles, Operation, and Applications*. 1. vyd., Humana Press, Totowa 1996. ISBN 978-0-89603-315-3
- [15] MUIJSELAAR, P. *Chromedia* [on-line], [cit. 2020-12-14]. Dostupné z: <https://www.chromedia.org/chromedia?waxtrapp=jzosgDsHiemBpdmBIIecCW&subNav=iafynDsHiemBpdmBIIecCWzC>
- [16] KVASNIČKOVÁ, L.; GLATZ, Z.; KAHLE, V. Kapilární elektrochromatografie. *Chem. Listy*, **2003**, *97*, 86–92.
- [17] KAZAKEVICH, Y.; LOBRUTTO, R. *HPLC for pharmaceutical scientists*. 1. vyd., John Wiley & Sons, Hoboken 2007. ISBN 978-0-471-68162-5
- [18] HANSEN, S. H.; PEDERSEN-BJERGAARD, S.; RASMUSSEN, K. E. *Introduction to pharmaceutical chemical analysis*. 1. vyd., John Wiley & Sons, Chichester 2012. ISBN 978-0-470-66122-2
- [19] *CE kapiláry* [on-line], [cit. 2021-07-30]. Dostupné z: <https://www.labicom.cz/produkty/spotrebni-material/elektroforeza-prislusenstvi/ce-kapilary-pokrytenepokryte>
- [20] *UV/VIS HPLC detektory* [on-line], [cit. 2021-08-05]. Dostupné z: http://www.hplc.cz/Teorie/UV_VIS_detector.html
- [21] SNYDER, R. L.; KIRKLAND, J. J.; DOLAN, W. J. *Introduction to modern liquid chromatography*. 3. vyd., John Wiley & Sons, Hoboken 2010. ISBN 978-0-470-16754-0
- [22] DONG, M. W. *Modern HPLC for Practicing Scientists*. 1. vyd., John Wiley & Sons, Hoboken 2006. ISBN 978-0-471-72789-7
- [23] XU, Y. et al. Preparation and characterization of open-tubular capillary column modified with graphene oxide nanosheets for the separation of small organic molecules. *J. Chromatogr. A*, **2013**, *1284*, 180–187.
- [24] ZHANG, J. et al. Enhancement of capillary electrochromatographic separation performance by conductive polymer in a layer-by-layer fabricated graphene stationary phase. *J. Chromatogr. A*, **2014**, *1339*, 192–199.
- [25] GAO, X.; MO, R.; JI, Y. Preparation and characterization of tentacle-type polymer stationary phase modified with graphene oxide for open-tubular capillary electrochromatography. *J. Chromatogr. A*, **2015**, *1400*, 19–26.

- [26] RAO, C. N. R.; SOOD, A. K. *Graphene: Synthesis, Properties, and Phenomena*. 1. vyd., Wiley-VCH, Weinheim 2013. ISBN 978-3-527-33258-8
- [27] WANG, X.; LIU, B.; LU, Q.; QU, Q. Graphene – based materials: Fabrication and application for adsorption in analytical chemistry. *J. Chromatogr. A*, **2014**, *1362*, 1–15.
- [28] DE LA FUENTE, J. *Properties of Graphene* [on-line], [cit. 2021-08-21]. Dostupné z: <https://www.graphenea.com/pages/graphene-properties#.YSIR2bAzblU>
- [29] LIU, Q; SHI, J.; JIANG, G. Application of graphene in analytical sample preparation. *Trends Anal. Chem.*, **2012**, *37*, 1–11.
- [30] PEI, L.; LUCY, C. A. Insight into the stability of pol(diallyldimethylammoniumchloride) and polybrene poly cationic coatings in capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A*, **2014**, *1365*, 226-233.
- [31] LIU, X. et al. Graphene oxide and reduced graphene oxide as novel stationary phases via electrostatic assembly for open-tubular capillary electrochromatography. *Electrophoresis*, **2013**, *34*, 1869–1876.
- [32] LIU, Q. et al. Layer-by-Layer assembly of polyelectrolyte and nanoparticles, monitored by capillary electrophoresis. *Chem. – Eur. J.*, **2009**, *15*, 12828–12836.
- [33] QU, Q. et al. Layer-by-layer assembly of polyelectrolyte and graphene oxide for open-tubular capillary electrochromatography. *J. Chromatogr. A*, **2013**, *1282*, 95–101.
- [34] ZHANG, Y. et al. Separation of monoclonal antibody charge state variants by open tubular capillary electrochromatography with immobilised protein as stationary phase. *J. Chromatogr. A*, **2016**, *1466*, 180–188.

7 SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Dělení iontů dle působení elektrické a třecí síly	12
Obrázek 2 Disociace silanolových skupin.....	13
Obrázek 3 Vznik EOF v základním uspořádání (pozitivní mód).....	14
Obrázek 4 Rozdílná separace látek vlivem působení EOF uvnitř kapiláry	15
Obrázek 5 Plochý rychlostní profil (CE) a profil parabolický (HPLC)	16
Obrázek 6 Schématický nákres efektivní a celkové délky kapiláry	18
Obrázek 7 Schématický nákres CE	22
Obrázek 8 Princip MEKC.....	28
Obrázek 9 Schéma principu CEC	29
Obrázek 10 Příprava grafenu z grafitu.....	31
Obrázek 11 Snímek pomocí SEM nemodifikované a modifikované kapilární stěny	32
Obrázek 12 Potažení kapiláry GO pomocí PDDA	34
Obrázek 13 Potažení kapiláry vrstvou GO pomocí 3-AMDS	35
Obrázek 14 Potažení kapiláry GO pomocí APTMS	36
Obrázek 15 Porovnání migračních časů thiomčoviny jako markeru EOF u kapilár s modifikovaným povrchem a komerční kapiláry	53
Obrázek 16 Porovnání separačních vlastností kapilár s modifikovaným povrchem na směsi modelových analytů methylparaben, ethylparaben, propylparaben.....	54
Obrázek 17 Porovnání separačních vlastností kapilár s modifikovaným povrchem na směsi modelových analytů 2-nitrofenol, 3-nitrofenol, 4-nitrofenol.	55
Obrázek 18 Porovnání separačních vlastností kapilár s modifikovaným povrchem na směsi modelových analytů 2-nitroanilin, 3-nitroanilin, 4-nitroanilin.	56
Obrázek 19 Porovnání separačních vlastností kapilár s modifikovaným povrchem na směsi modelových analytů benzen, naftalen	57
Obrázek 20 Porovnání separačních vlastností kapilár s modifikovaným povrchem na směsi modelových analytů benzen, toluen, ethylbenzen.....	58
Obrázek 21 Porovnání separačních vlastností kapilár s modifikovaným povrchem na směsi modelových analytů kofein, theobromin, theofylin.....	59

Obrázek 22 Roztok vody s GO (0,1 mg/ml), roztoky polymerů smíchané s DGO (0,1 mg/ml) při laboratorní teplotě 25 °C	60
Obrázek 23 Roztok vody s GO (0,1 mg/ml), roztoky polymerů smíchané s DGO (0,1 mg/ml) po vystavení 70 °C po dobu 1 hodiny.....	61

8 SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Příprava kapiláry PDDA/GO	46
Tabulka 2 Příprava kapiláry PAH/GO	46
Tabulka 3 Příprava kapiláry PEI/GO	47
Tabulka 4 Příprava kapiláry APTES/GO	48
Tabulka 5 Podmínky měření a promývání kapiláry.....	51