

UNIVERZITA KARLOVA  
Přírodovědecká fakulta

---

Studijní program: Chemie



Petr Stávek

MODIFIKACE VNITŘNÍCH STĚN ELEKTROFORETICKÝCH  
KAPILÁR POMOCÍ Kladně nabitých kotev

Modifications of inner walls of electrophoretic capillaries using positively  
charged anchors

Bakalářská práce

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

Praha 2024

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem tuto 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.

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

V Praze dne 1. května 2024.

Petr Stávek

## Abstrakt

Elektroosmotický tok je důležitým faktorem v kapilární elektroforéze. Jeho modifikací lze ovlivnit rozlišení a dobu trvání separace. Jedním z možných způsobů modifikace elektroosmotického toku je dynamické pokrývání vnitřního povrchu kapiláry. Cílem práce bylo otestovat, zda je některý ze zkoumaných vzorků kladně nabitých kotev schopný poskytnout pokrytí vhodné pro použití v kapilární elektroforéze. Nejprve byly provedeny experimenty s neopentylovými kotvami PK 1291, PK 941, PK 1300 a PK 1294 pomocí čtyř různých metod pokrývání. Získaná pokrytí vykazovala schopnost potlačovat elektroosmotický tok. Jednotlivé kotvy se mezi sebou výrazně lišily ve stabilitě jednotlivých pokrytí. Nejlépe se z této skupiny osvědčila PK 941. Následně byla provedena měření i s cyklodextrinovou kotvou PK 1281. S touto kotvou bylo dosaženo nejzajímavějších výsledků. Bylo zjištěno, že v závislosti na použitém základním pufru a zvolené metodě tvorby pokrytí lze s touto kotvou dosáhnout otočení směru elektroosmotického toku, či jeho až téměř úplného potlačení.

**Klíčová slova:** kapilární elektroforéza, elektroosmotický tok, dynamické pokrývání kapilár, kladně nabitá kotvy.

## **Abstract**

Electroosmotic flow plays a crucial role in capillary electrophoresis, as it can impact both the resolution and duration of the separation process. Altering the electroosmotic flow can be achieved through dynamic coating of the inner capillary surface. The primary objective of this work was to investigate the potential of various positively charged anchors in providing a suitable dynamic coating for capillary electrophoresis. At first, experiments were carried out with neopentyl anchors PK 1291, PK 941, PK 1300 and PK 1294 using four different coating methods. Obtained coatings demonstrated the ability to suppress the electroosmotic flow, although the stability of the obtained coatings varied significantly among the individual anchors. PK 941 demonstrated the most promising results within this group. Subsequently, measurements were also performed using the cyclodextrin anchor PK 1281, which yielded the most favorable outcomes. It was observed that depending on the background electrolyte and the chosen coating method, this anchor could either reverse the direction of the electroosmotic flow or nearly completely eliminate it.

**Key words:** capillary electrophoresis, electroosmotic flow, dynamic capillary coating, positively charged anchors.

## **Poděkování**

Chtěl bych poděkovat svému školiteli doc. RNDr. Tomáši Křížkovi, Ph.D. za jeho vstřícnost, ochotu a cenné rady v průběhu zpracování celé této práce. Dále bych chtěl poděkovat Mgr. Alici Šimonové za pomoc při úvodním seznamování s používanou laboratorní technikou. Poděkování patří i doc. RNDr. Jindřichovi Jindřichovi CSc. z katedry organické chemie Přírodovědecké fakulty UK za poskytnutí vzorků kladně nabitých kotev. Na závěr bych chtěl poděkovat mé rodině a přátelům, kteří mě během celého studia neustále podporovali.

# Obsah

1	Cíl práce.....	9
2	Teoretická část .....	10
2.1	Historie kapilární elektroforézy .....	10
2.2	Instrumentace .....	10
2.3	Princip kapilární elektroforézy .....	11
2.3.1	Elektroforetická mobilita .....	11
2.3.2	Elektroosmotický tok .....	12
2.4	Příklady využití kapilární elektroforézy .....	15
2.5	Modifikace vnitřní stěny kapiláry .....	16
2.5.1	Ovlivňování elektroosmotického toku pomocí pokrytí kapilár .....	16
2.5.2	Dynamické pokrytí kapilár .....	16
2.5.3	Statické pokrytí kapiláry.....	17
2.6	Kladně nabitá kotvy .....	18
3	Experimentální část.....	20
3.1	Chemikálie .....	20
3.2	Instrumentace .....	20
3.3	Vzorky kotev .....	20
3.4	Dynamické pokrývání kapilár .....	21
3.5	Měření stability EOF v dynamicky pokrytých kapilárách .....	21
4	Výsledky a diskuse.....	23
4.1	Výběr nejvhodnějších materiálů pro tvorbu pokrytí kapilár .....	23
4.2	Kotva PK 1291 .....	23
4.2.1	Kotva PK 1291 v borátovém pufru .....	23
4.2.2	Kotva PK 1291 v HEPES .....	25
4.2.3	Kotva PK 1291 ve fosfátovém pufru .....	27
4.3	Kotva PK 941 .....	29

4.3.1	Kotva PK 941 v borátovém pufru .....	29
4.3.2	Kotva PK 941 v HEPES.....	31
4.3.3	Kotva PK 941 ve fosfátovém pufru .....	33
4.4	Kotva PK 1300 .....	35
4.4.1	Kotva PK 1300 v borátovém pufru.....	35
4.4.2	Kotva PK 1300 v HEPES .....	37
4.4.3	Kotva PK 1300 ve fosfátovém pufru.....	39
4.5	Kotva PK 1294 .....	41
4.5.1	Kotva PK 1294 v borátovém pufru.....	41
4.5.2	Kotva PK 1294 v HEPES .....	43
4.6	Kotva PK 1281 .....	45
4.6.1	Kotva PK 1281 v borátovém pufru.....	46
4.6.2	Kotva PK 1281 v HEPES .....	48
4.6.3	Kotva PK 1281 ve fosfátovém pufru.....	50
4.7	Srovnání výsledků .....	52
4.7.1	Srovnání použitých metod.....	52
4.7.2	Srovnání kotev .....	52
4.7.3	Srovnání pufrů.....	53
5	Závěr.....	55
	Literatura.....	56

## Seznam použitých zkratk a symbolů

CZE	kapilární zónová elektroforéza
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
GC	plynová chromatografie
EOF	elektroosmotický tok
MEKC	micelární elektrokinetická kapilární chromatografie
MEEKC	mikroemulzní elektrokinetická chromatografie
BGE	základní elektrolyt
CE	kapilární elektroforéza
CG	funkční skupina vhodná pro click reakce
NA	neopentylová kotva
CA	cyklodextrinová kotva
$\mu_e$	elektroforetická mobilita
$\mu_{EOF}$	mobilita elektroosmotického toku
$\xi$	zeta potenciál
RSD	relativní směrodatná odchylka



# 1 Cíl práce

Cílem této bakalářské práce je otestovat potenciální vhodnost pokrytí vnitřní stěny křemenné kapiláry v CZE. Testováno bude několik metod přípravy dynamického pokrytí z celkem pěti kladně nabitých kotev, přičemž čtyři z nich patří do skupiny kotev neopentylových a jedna do kotev cyklodextrinových. Stabilita jednotlivých pokrytí a jejich schopnost potlačovat elektroosmotický tok bude testována opakovaným měřením mobility elektroosmotického toku. Na základě získaných dat bude dále zkoumáno, zda neexistuje korelace mezi chováním trojice neopentylových kotev, jejichž chemické struktury se od sebe liší pouze v počtu navázaných kladně nabitých aminoskupin.

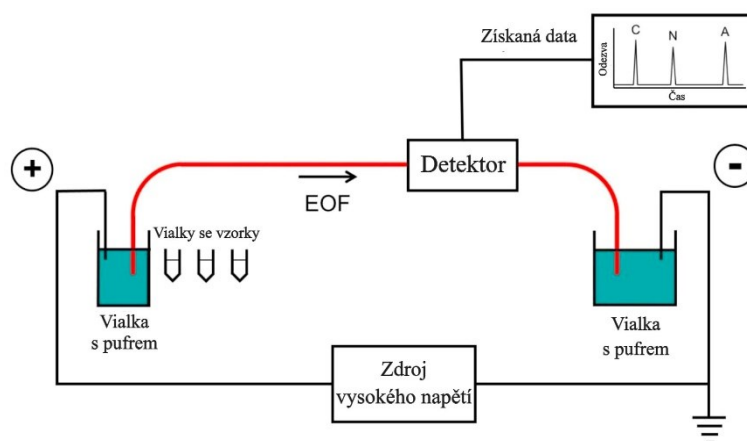
## 2 Teoretická část

### 2.1 Historie kapilární elektroforézy

Kapilární elektroforéza je analytická metoda založená na separaci nabitých částic v elektrickém poli na základě jejich rozdílných elektroforetických mobilit. První experimenty v oblasti elektroforetických měření se datují až ke konci 19. století. V roce 1937 *Arnes Tiselius* sestavil první elektroforetickou aparaturu a použil ji k separaci proteinů krevního séra [1]. V roce 1948 za svoji práci obdržel Nobelovu cenu. Na Tiselia navázal *Stella Hjertén*, který ke konci 60. let dvacátého století představil první model kapilární elektroforézy [2]. Větší pozornosti se této metodě ale dostalo až po roce 1981, kdy *J. W. Jorgenson* a *K. D. Lukacsová* publikovali výsledky svých měření za využití kapilár z křemenného skla [3]. V 90. letech dvacátého století začal vývoj kapilární elektroforézy na mikročipech. Jako první o této formě publikovali *Manz a kol.* [4]. Díky miniaturním rozměrům je tato forma výhodná zejména kvůli nízké spotřebě vzorku a potřebných reaktantů, vysoké přesnosti a době trvání separace v řádu desítek sekund.

### 2.2 Instrumentace

Základní instrumentace kapilární elektroforézy zahrnuje zdroj vysokého napětí, kapiláru, detektor a zařízení pro zpracování získaných dat. Obecné schéma zapojení shrnuje Obr 2.1.



Obr. 2.1 – Schématické zapojení kapilární elektroforézy. Převzato a upraveno z citace [5].

Zdroj vysokého napětí je připojen svými konci k elektrodám, které vytváří potřebné elektrické pole. Ionty následně putují kapilárou, ve které dochází k samotné separaci. Množství vzorku použité pro měření je malé, zpravidla menší než

2 % z celkového objemu použité kapiláry. Dávkování lze uskutečnit buď hydrostaticky (gravitace, tlak či vakuum) nebo elektromigračně. Kapilára je nejprve promyta roztokem pufru, následně je vialka s pufrem vyměněna za vialku se vzorkem a vzorek je nadávkován. Po nadávkování se aparatura vrátí do původního stavu. Ionty jsou následně unášeny kapilárou pomocí elektroosmotického toku a separovány na základě rozdílné elektroforetické mobility. Separované analyty jsou detekovány na konci kapiláry nebo v jeho blízkosti detektorem. Lze využít například UV/Vis absorpčních detektorů, fluorescenčních detektorů a hmotnostní spektrometrie [6].

## 2.3 Princip kapilární elektroforézy

Kapilární zónová elektroforéza (CZE) je jedna z nejjednodušších elektroforetických metod. Vyniká svojí rychlostí, přesností a selektivitou. V mnohém se podobá chromatografickým metodám HPLC a GC. Liší se však místem separace, kdy místo chromatografické kolony je použita kapilára. Instrumentace je jednodušší a levnější, není potřeba vysokotlakých čerpadel. Analyty samovolně putují kapilárou v přítomnosti elektrického pole díky jejich elektroforetické mobilitě a elektroosmotickému toku (EOF) [7].

CZE se používá na separaci nabitých částic, kationtů či aniontů. Pro separaci nenabitých analytů je tato metoda nevhodná. Zmíněnou problematikou se zabýval *Shigeru Terabe*, který za pomoci micelární elektrokinetické kapilární chromatografie (MEKC) byl schopen využít micely k efektivní separaci neutrálních analytů [8]. Další možností je využití mikroemulzní elektrokinetické chromatografie (MEEKC), kdy se pro separaci analytů využívají pufrované mikroemulze, jak publikoval *H. Watarai* [9].

### 2.3.1 Elektroforetická mobilita

Pohyb iontů v elektrickém poli je charakterizován jejich elektroforetickou mobilitou  $\mu_e$ . V případě, že elektrická síla, která urychluje částici v elektrickém poli, se vyrovná třecí síle prostředí, která pohyb částice brzdí, lze psát:

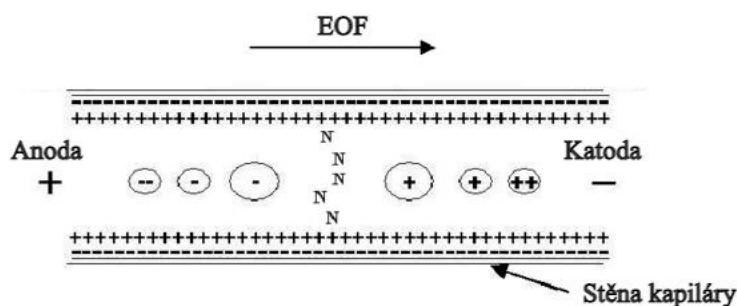
$$\mu_e = \frac{q}{6\pi\eta r_i} \quad (1)$$

Kde  $q$  je náboj,  $\eta$  dynamická viskozita a  $r_i$  hydratovaný poloměr iontu. Mezi ionty o stejném rozměru se bude k dané elektrodě nejrychleji pohybovat iont o nejvyšším náboji. V případě shody velikosti nábojů bude nejrychlejší pohyb u iontu o menším

hydratovaném poloměru. Celková mobilita daného iontu v kapiláře odpovídá součtu jeho elektroforetické mobility  $\mu_e$  a mobility elektroosmotického toku  $\mu_{EOF}$ :

$$\mu = \mu_e + \mu_{EOF} \quad (2)$$

Na tomto principu funguje vlastní separace analytů. Ionty jsou unášeny za pomoci EOF skrze kapiláru od anody ke katodě. Zároveň se pohybují směrem k elektrodě s opačným nábojem. Jelikož je však mobilita EOF zpravidla větší než elektroforetická mobilita jednotlivých iontů, jsou všechny analyty unášeny směrem ke katodě. Pohyb iontů v souhlasném směru s elektroosmotickým tokem se urychlí, zatímco pohyb iontů v opačném směru se zpomalí. V důsledku toho kationty dorazí k detektoru první, následované neutrálními molekulami a až poté anionty [10]. Výše popsáný princip separace shrnuje Obr. 2.2.



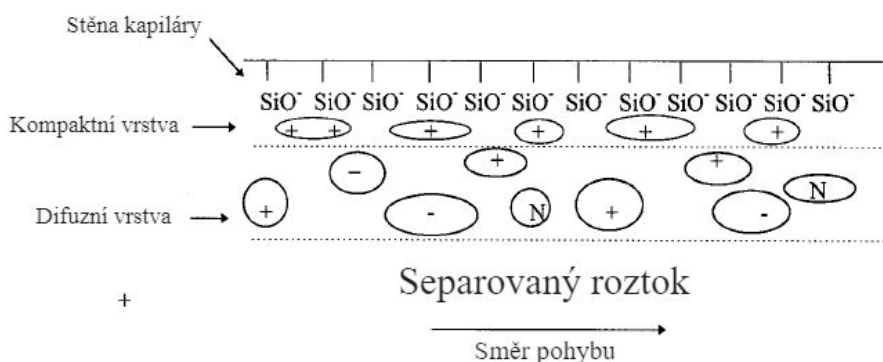
**Obr. 2.2.** – Znárodnění principu separace iontů v kapilární zónové elektroforéze. Převzato a upraveno z citace [11].

Další důležitý faktor ovlivňující separaci je teplota. Jak vyplývá z Rovnice 1, elektroforetická mobilita je závislá na viskozitě, která je funkcí teploty. Pro zlepšení opakovatelnosti měření je tedy třeba temperovat aparaturu na konstantní teplotu [12].

### 2.3.2 Elektroosmotický tok

Elektroosmotický tok (EOF) nebo také elektroosmóza je termín označující tok kapaliny v kontaktu s pevným povrchem za přítomnosti elektrického pole. V případě potřeby lze EOF omezit či úplně odstranit. Často je však jeho přítomnost žádoucí. Pokud je směr toku EOF stejný jako směr pohybu analytů, dochází k urychlení jejich pohybu a zkrácení doby separace. Pokud je směr toku opačný, dochází k zpomalení pohybu, ale zlepšení rozlišení [13].

Důležitým faktorem ovlivňujícím EOF je samotný materiál kapiláry. Nejčastější možnostmi jsou kapiláry z taveného křemene, lze ale použít například i polytetrafluorethylen, jak publikoval *Macka a kol.* [14]. Povrch křemenných kapilár je pokryt silanolovými skupinami  $-\text{SiOH}$ . V závislosti na pH dochází k disociaci a tvorbě záporně nabitých skupin  $-\text{SiO}^-$ . Stěna kapiláry tím získá záporný náboj a s kationty v roztoku vytváří elektrickou dvojvrstvu. Vrstva blíže ke stěně kapiláry je k ní pevně vázána elektrostatickými silami (kompaktní vrstva), interakce se vzdálenější vrstvou jsou slabší (difuzní vrstva). V přítomnosti elektrického pole jsou slabé interakce mezi difuzní vrstvou a stěnou kapiláry zpřetrhány a vrstva se spolu s ostatními kationty v roztoku začne pohybovat směrem ke katodě [10]. Schéma pro tento případ je znázorněno na Obr. 2.3.



**Obr. 2.3** – Schéma principu vzniku elektroosmotického toku v křemenné kapiláře. (N = neutrální analyt) Převzato a upraveno z citace [10].

EOF je ovlivněn řadou faktorů. Jedním z nich je zeta potenciál,  $\xi$ .

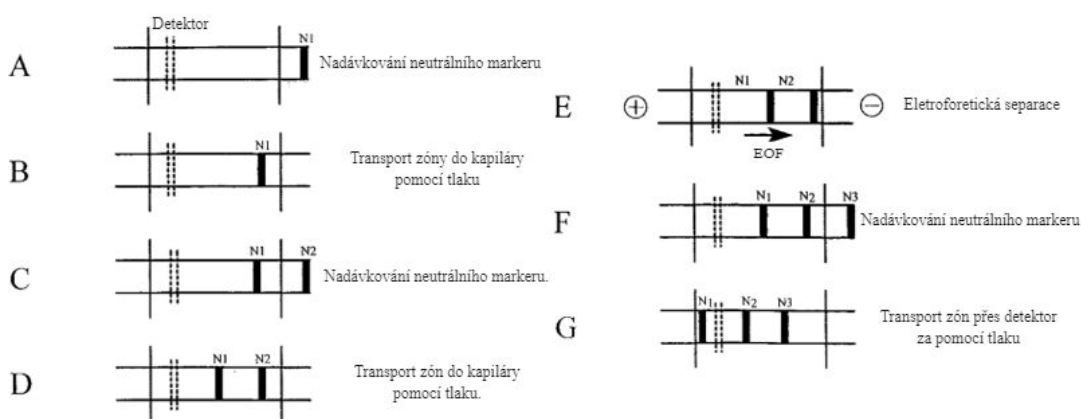
$$\mu_{EOF} = \frac{\xi \varepsilon}{4\pi\eta} \quad (3)$$

Kde  $\eta$  je viskozita,  $\mu_{EOF}$  mobilita elektroosmotického toku a  $\varepsilon$  je permitivita pufru. Rovnice 3 dokazuje, že EOF je ovlivňován  $\xi$  a je tedy ovlivňován stejnými faktory. Zeta potenciál závisí na složení povrchu kapiláry a iontové síle. Čím větší je iontová síla pufru, tím menší je tloušťka elektrické dvojvrstvy a tím menší je  $\xi$ . Větší koncentrace silanolových iontů na povrchu kapiláry vede ke zvýšení zeta potenciálu. Náboj stěny kapiláry závisí na pH prostředí, které ovlivňuje, jak velká část silanolových skupin je disociována. Se zvyšujícím se pH narůstá i EOF. Tato závislost platí do okamžiku, než

dojde k disociaci všech přítomných silanolových skupin (dosažení maximální rychlosti), dále se rychlost nezvyšuje [15].

Vliv na EOF mají i přídavky organických sloučenin do použitého pufru. Dochází tím ke změně viskozity, pH a iontové síly daného pufru, což způsobí změnu mobility elektroosmotického toku. Jak publikoval *Yang a kol.* [16] pro snížení EOF lze využít acetonitril, methanol, ethanol, propanol, či isopropanol.

V případě potřeby lze upravit rychlost a směr EOF pomocí dynamického nebo statického pokrytí vnitřních stěn kapiláry kationogenními detergenty nebo polymery. Vlastnosti pokrytí lze pozorovat pomocí zkoumání časového vývoje EOF v sérii opakovaných měření za daných podmínek. Samotná měření lze provádět mnoha způsoby. Nejběžnějším je použití neutrálního markeru, který nevykazuje vlastní elektroforetickou mobilitu a z naměřeného migračního času lze následně stanovit hodnotu EOF. Jako vhodné markery mohou posloužit například thiomocovina [17], akrylamid a benzylalkohol [18], dimethylsulfoxid či aceton [19]. Z nepřímých metod stojí za zmínku váhové měření publikované *van de Goorem a kol.* [20] kdy je EOF vypočítán skrze vážení výtoku z kapiláry. Pokud je hodnota mobility EOF velmi nízká, lze použít nepřímou metodu využívající markerů, dle *Williamse a Vigha* [21]. Metoda se skládá z několika kroků, které jsou znázorněny na Obr. 2.4. Nejprve jsou nadávkovány dvě zóny markeru oddělené úsekem BGE. Následně je na kapiláru vloženo napětí, díky němuž se obě zóny rozpohybují rychlostí EOF. Poté je nadávkována třetí zóna markeru a všechny zóny jsou následně tlakem protlačeny přes detektor. EOF je určen z rozdílů v retenčních časech mezi jednotlivými píky.



**Obr. 2.4** – Nepřímá metoda stanovení rychlosti EOF dle Williamse a Vigha, převzato a upraveno z citace [21].

## 2.4 Příklady využití kapilární elektroforézy

Kapilární elektroforéza se těší velké oblibě zejména kvůli své jednoduchosti, rychlosti, efektivitě separace a nízké spotřebě vzorkového materiálu. Velké využití nachází hlavně v oblasti forenzních věd a klinické medicíny.

*Tagliario a kol.* [22] dokázali využít CZE pro identifikaci morfinu (hlavního metabolitu heroinu) a kokainu ze vzorků vlasů dlouhodobě závislých jedinců. Vlasy byly ponechány inkubovat přes noc v roztoku 0,25 M HCl za teploty 45 °C. Následující den byla provedena separace v křemenné kapiláře v 0,05 M borátovém pufru (pH 9,2) a vloženém napětí 15 kV. Detekce byla provedena UV detektorem při vlnových délkách 214 nm pro morfin a 238 nm pro kokain. Obě látky současně šlo detekovat za cenu horšího rozlišení při 200 nm. Metodou bylo možno stanovit až 0,15 ng/mg kokainu a morfinu z použitého vzorku vlasů o hmotnosti 100 mg. Obdobná měření byla provedena i s metodou MEKC. Tato metoda umožňuje separaci většího množství různých složek než CZE, avšak za cenu nižší citlivosti [23].

*Soliman a kol.* [24] separovali z moči sarkosin od jeho isomerů  $\alpha$ -alaninu a  $\beta$ -alaninu. Sarkosin by mohl sloužit jako jeden z možných markerů pro rakovinu prostaty. V tomto případě by mohla jeho včasná detekce napomoci potenciální léčbě. CE separace byla provedena v kapiláře pokryté polyethyleniminem s roztokem 0,2% kyseliny mravenčí v 50% methanolu. Vzorek moči byl před experimentem připraven extrakcí na pevnou fázi. Výsledné elektroferogramy vykazovaly velmi dobrou separaci sarkosinu od jeho izomerů.

Často zneužívané drogy metamfetamin a amfetamin detekovali v moči pomocí CE *Kuroda a kol.* [25]. Využita byla CZE a MEKC s UV detekcí a detekcí pomocí laserem indukované fluorescence. Měření vykazovala velmi vysokou citlivost. Pro metamfetamin za využití UV detekce pomocí CZE se limit detekce pohyboval mezi 48-72 fmol/nástřík, za využití MEKC 85-191 fmol/nástřík s časem separace okolo 15 minut. Při použití laserem indukované fluorescence byla citlivost ještě vyšší, zejména pro amfetamin, a to až tisíckrát. Avšak doba separace se prodloužila na přibližně 45 minut.

Kapilární elektroforéza byla využita i pro detekci nosičů kyslíku na bázi hemoglobinu (HBOCs), jak demonstrovali *Staub a kol.* [26] Tyto látky zlepšují roznášení kyslíku krevním řečištěm a dají se proto využít jako forma dopingů mezi vrcholovými

sportovci. Aby došlo k znatelnému zvýšení výkonnosti, musí se koncentrace hemoglobinových proteinů v krvi zvýšit o 5 %, což je u průměrného trénovaného člověka přibližně 8 g/l. Toto množství tedy odpovídá požadované citlivosti využitelné metody. Zmíněná metoda dosáhla limitu detekce 2 g/l. Separace byla provedena v křemenné kapiláře o efektivní délce 56 cm a průměru 75  $\mu\text{m}$  s UV/Vis detekcí při vlnové délce 415 nm. Jako BGE byl použit 75mM mravenčan sodný (pH 9,5). Jako vzorek pro separaci byl použit vzorek plasmy obohacený o Oxyglobin<sup>®</sup> naředěný vodou v poměru 2:1.

## **2.5 Modifikace vnitřní stěny kapiláry**

Vnitřní stěnu kapiláry použité ke kapilární elektroforéze lze modifikovat pokrytím různými druhy materiálů. K tomuto kroku se přistupuje zejména kvůli zamezení interakce analytů se stěnou kapiláry. Silanolové skupiny na povrchu křemenné kapiláry mohou přispět k adsorpci kladně nabitých analytů. Důsledkem tohoto jevu může vzniknout nežádoucí rozšíření zón analytů, snížení reprodukovatelnosti separace a v krajních případech až částečné či úplné zneprůchodnění kapiláry. Nejčastěji jsou takto ovlivněny bazické proteiny [27]. Modifikací vnitřních stěn kapiláry dochází i k ovlivňování elektroosmotického toku. Modifikace EOF má vliv na celkový čas separace a rozlišení získaných píků. Nejdůležitější faktory pokrývání jsou jeho homogenita a stálost. Jednotlivá pokrytí lze rozřadit do tří skupin – dynamické, statické a hybridní, v závislosti na přilnutí použitého materiálu ke stěně kapiláry [28].

### **2.5.1 Ovlivňování elektroosmotického toku pomocí pokrytí kapilár**

Elektroosmotický tok může být modifikován řadou způsobů. Menších změn lze dosáhnout úpravou iontové síly či viskozity základního elektrolytu. Znatelnější zásah způsobí změna pH základního elektrolytu, která může EOF velmi významně modifikovat či až úplně potlačit. Tato metoda ovšem často není vhodná vzhledem k potřebným podmínkám úspěšné separace. Určité analyty mohou vykazovat různé chování při odlišných hodnotách pH [29]. Nejčastěji se proto uchyluje k úpravě EOF pomocí pokrytí vnitřní stěny kapiláry. Vzniklá pokrytí musí být dostatečně stabilní, aby ustála beze změny měření za rozličných podmínek [30].

### **2.5.2 Dynamické pokrytí kapilár**

Dynamické pokrytí je založeno na sekundárních adsorpčních interakcích mezi použitou látkou a vnitřní stěnou kapiláry. Jeho výhody jsou cenová dostupnost



a jednoduchá a rychlá aplikace. Pokrytí se nanáší propláchnutím kapiláry roztokem požadované látky. V případě potřeby lze poměrně snadno odstranit promytím kapiláry roztokem NaOH či HCl. Nevýhodou dynamického pokrytí je jeho omezená životnost. Pro zabránění vymývání je třeba pokrytí pravidelně obnovovat buď přidáním malého množství použité látky do základního elektrolytu nebo pomocí pravidelného promývání kapiláry roztokem použité látky před započnutím nového měření [31].

Mezi nejpoužívanější materiály pro dynamické pokrytí se řadí polymery. V závislosti na jejich náboji lze pozorovat různé modifikace EOF. Záporně nabitě polymery jako dextran sulfát [32] EOF urychlují a zkracují dobu separace. Nenabitě polymery EOF potlačují, lze mezi ně zařadit například polyvinylalkohol [33], polyethylenoxid [34] nebo kopolymery akrylamidu [35]. Kladně nabitě polymery, například polyaminy [36], otáčí směr EOF, jsou proto vhodné zejména na separaci aniontů [28].

Další skupinou látek, vhodnou pro dynamické pokrytí, jsou kationogenní povrchově aktivní látky, například cetyltrimethylamonium bromid či tetradecyltrimethylamonium bromid [37]. Obrací směr EOF, využívají se na analýzu aniontů. Fungují na principu agregace, jsou proto silně závislé na koncentraci základního elektrolytu a případných organických příměsích [31].

### **2.5.3 Statické pokrytí kapiláry**

Permanентní pokrytí je založeno na kovalentních vazbách mezi vnitřní stěnou kapiláry a látkou použitou pro vytvoření pokrytí. Slouží k efektivní modifikaci EOF a zamezení adsorpci analytu na stěnu kapiláry. Hlavní výhodou je vysoká stabilita. Jeho životnost je v porovnání s dynamickým pokrytím výrazně vyšší a není třeba jej průběžně obnovovat. Nevýhodou je časově náročná příprava a snížená reprodukovatelnost. Tvorba permanentního pokrytí lze popsat třemi základními kroky – prvotní úpravou stěny kapiláry, silanizací a kovalentním navázáním požadovaného polymeru [28].

V prvním kroku dochází k očištění stěny kapiláry a aktivaci funkčních skupin potřebných v následujících reakcích. To je provedeno postupným promýváním pomocí roztoků NaOH a HCl. Pro zlepšení výsledků následné silanizace je vhodné odstranit vodu ze stěn kapiláry pomocí vysoušení [38]. V průběhu silanizace dochází k reakci silanolových skupin na povrchu kapiláry s funkční skupinou použitého monomeru.

V posledním kroku se navázané monomery přemění na radikály pomocí iniciátorů a vytvoří polymerní řetězec. Nejběžnější postup tvorby statického pokrytí publikoval *Hjertén* [39] za využití monomeru 3-(trimethoxysilyl)propyl methakrylátu.

Tvorba statického pokrytí z monomerních jednotek je náročný proces o mnoha krocích. Samotná polymerizace nemůže dosáhnout 100 % výtěžku, nezreagované monomery mohou tedy zůstat zachyceny uvnitř vzniklé polymerní vrstvy. Samotná polymerizace neprobíhá jen na povrchu kapiláry ale i v roztoku přítomném uvnitř kapiláry. Tyto jevy jsou příčinou nerovnoměrné tloušťky vzniklého pokrytí [28]. *Malik a kol.* [40] publikovali metodu, která obchází tento komplikovaný proces. Kapilára je na počátku naplněna roztokem, který obsahuje místo monomeru již požadovaný polymer, iniciátor a povrchové derivatizační činidlo. Vrstva polymeru je následně uchycena na povrchu kapiláry rychlým zvýšením teploty.

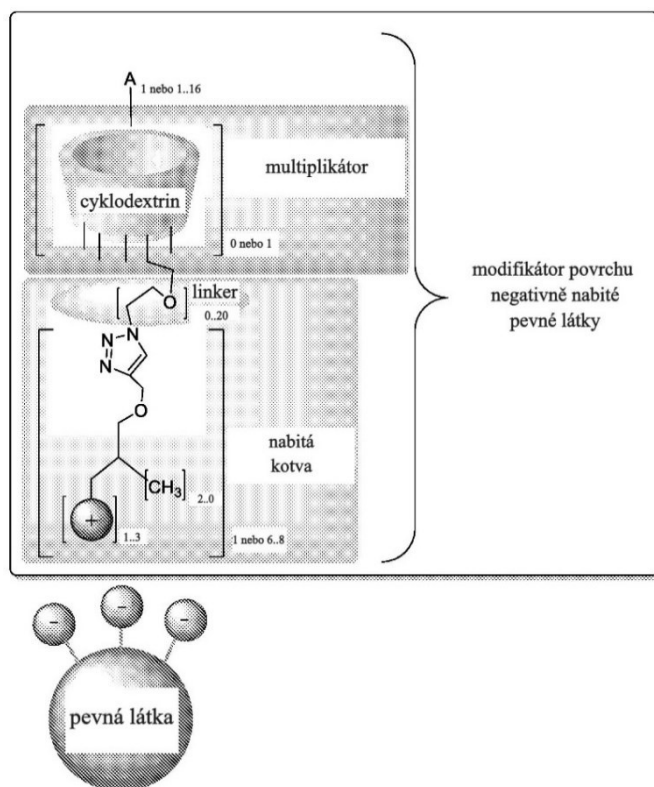
Využití silanizace pro navázání monomerních jednotek na stěnu kapiláry má i své nevýhody. Vzniklé vazby Si-O-Si nejsou stabilní za vysokých hodnot pH. *Cobb a kol.* [41] využili Grignardových činidel a nahradili tyto vazby za stabilnější Si-C vazby. Výsledné pokrytí mělo vysokou stabilitu v rozsahu pH 2,3–9,2 s vysokou mírou reprodukovatelnosti.

## 2.6 Kladně nabité kotvy

Kladně nabité kotvy jsou látky s jedním nebo více permanentními kladnými náboji. Tyto sloučeniny lze využít k navázání aktivní organické molekuly na negativně nabitě pevné látky. Princip navázání a syntéza samotných kotev byly patentovány *Kasalem a Jindřichem* [42]. Samotné navázání se skládá ze tří kroků. Nejdříve dojde k syntéze kotvy s 2-24 pozitivními náboji. Vzniklá kotva obsahuje funkční skupiny vhodné pro click reakce (CG), nejčastěji se využívá propargylová či allylová skupina. Následně se vhodná organická molekula naváže pomocí click reakce [43] kovalentní vazbou na připravenou kotvu. Takto vzniklý modifikátor se poté elektrostaticky naváže na pevný povrch. Samotná aplikace je poměrně jednoduchá, stačí vhodný povrch ponořit do roztoku modifikátoru. Další výhodou je velká síla vzniklých vazeb. K jejich narušení dochází pouze při proplachování 50% kyselinou mravenčí [42].

Kotvy lze rozdělit do dvou kategorií podle jejich obecné chemické struktury. Základem neopentylových kotev (NA) je neopentanová kostra, na kterou jsou navázány

1-3 funkční skupiny s kladným nábojem. Nejčastěji se používají aminové skupiny. Další součástí je skupina vhodná pro click reakce, sloužící k navázání požadované organické molekuly. Propargylová skupina se používá pro reakci se sloučeninami obsahujícími azidovou funkční skupinu. Allylová skupina je vhodná zejména pro navázání thiolů. Cyklodextrinové kotvy (CDA) obsahují cyklodextrin, který umožňuje současné navázání více neopentylových kotev (6-8). Díky většímu množství kladných nábojů (6-28) je výsledná vazba k negativně nabitému povrchu mnohem silnější. Nevýhodou je možná destabilizace molekuly z důvodu blízkosti kladných nábojů. Využívá se proto aniontů, například jodidů či chloridů, na jejich kompenzaci. Další výhodou cyklodextrinových kotev je možnost navázání více organických molekul díky přítomnosti až 16 CG [42]. Schéma obecné struktury výsledného modifikátorů je znázorněno na Obr. 2.5. Z praktických využití CDA stojí za zmínku chromatografické separace enantiomerů [44].



**Obr. 2.5** – Schéma chemické struktury modifikátoru použitého k navázání aktivních organických molekul (A) na negativně nabitou pevnou látku. Převzato a upraveno z citace [42].

Mezi vhodné negativně nabité pevné povrchy patří zejména materiály s  $-\text{SO}_3\text{H}$  skupinou (Nafion<sup>®</sup>, ionexy) a materiály s  $-\text{SiOH}$  skupinou (silikagel, zeolity či křemenné sklo). Lze využít i materiálů, které jsou samy o sobě nenabitě a negativní náboj získají až po úpravě, například sulfonací [42].

## 3 Experimentální část

### 3.1 Chemikálie

- Deionizovaná voda připravená systémem MiliQ (Millipore, USA)
- Dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát p.a. (Lach-Ner, Česká republika)
- Hydrogenfosforečnan sodný dodekahydrát p.a. (Lachema, Česká republika)
- Hydroxid sodný 1 mol/dm<sup>3</sup> (Agilent Technologies, Německo)
- Thiomočovina 99% (Sigma-Aldrich, USA)
- Tetraboritan sodný dekahydrát p.a. (Lachema, Česká republika)
- HEPES >99,5% (Carl Roth, Německo)

### 3.2 Instrumentace

- Analytické váhy Precisa 262 SMA-FR (Precisa, Švýcarsko)
- Automatické pipety (Socorex, Švýcarsko)
- Kapilární elektroforéza 1600 CE s DAD detektorem (Agilent Technologies, Německo)?
- Křemenná kapilára s vnější vrstvou polyimidu, vnitřní průměr 50 µm, délka 33 cm, efektivní délka 24,5 cm (Polymicro Technologies, USA)
- pH metr Jenway 3540 (Jenway, UK)
- Ultrazvuková lázeň Elmasonic S 15 (Elma, Německo)

### 3.3 Vzorky kotev

Kotvy byly poskytnuty doc. RNDr. Jindřichem Jindřichem, CSc. z katedry organické chemie Přírodovědecké fakulty UK. Pro experimenty bylo použito celkem 5 kotev – 4 NA a 1 CDA. Trojice kotev PK 1291, PK 941 a PK 1300 se lišila v počtu navázaných kladně nabitých aminoskupin. Při experimentech bylo kromě samotných vlastností pokrytí sledováno, zda rozdílný počet aminoskupin nějakým způsobem ovlivňuje výsledná pokrytí. Kotva PK 1294 měla na neopentanovou kostru navázána tři kladně nabitá pyridinová jádra. Kotva PK 1281 byla jediným zástupcem cyklodextrinových kotev. Podrobné chemické struktury všech zkoumaných látek jsou znázorněny v příslušných kapitolách níže u diskuse výsledků.

### 3.4 Dynamické pokrývání kapilár

Dynamické pokrývání kapilár bylo prováděno v křemenné kapiláře o vnitřním průměru 50  $\mu\text{m}$ , délce 33 cm a efektivní délce 24,5 cm. Byly použity vodné roztoky kotev o koncentraci 1 mg/ml. Na začátku každého dne měření byla kapilára nejprve propláchnuta roztokem NaOH o koncentraci 1 mol/dm<sup>3</sup> po dobu 10 minut a následně deionizovanou vodou po dobu 10 minut. Pro nanesení pokrytí byly využity čtyři způsoby, které jsou podrobněji popsány níže (Metoda I – Metoda IV). Po pokrytí kapiláry následovalo samotné měření mobility EOF v sekvenci opakovaných měření. Při změně pufru či použité kotvy byla kapilára vždy vyměněna za novou.

#### Metody pokrytí kapiláry

**Metoda I** – Jednorázové propláchnutí kapiláry roztokem kotvy po dobu 10 minut.

**Metoda II** – Propláchnutí kapiláry roztokem kotvy po dobu 1 minuty před každým měřením.

**Metoda III** – Jednorázové propláchnutí kapiláry roztokem kotvy po dobu 10 minut. Následně aplikace napětí 20 kV s oběma konci kapiláry ponořenými v roztoku kotvy po dobu 10 minut. Nakonec jednorázové propláchnutí kapiláry deionizovanou vodou po dobu 5 minut.

**Metoda IV** – Propláchnutí kapiláry roztokem kotvy po dobu jedné minuty, následně aplikace napětí 20 kV s oběma konci kapiláry ponořenými v roztoku kotvy po dobu 10 minut a propláchnutí deionizovanou vodou po dobu 1 minuty. Celý postup byl opakován před každým měřením.

### 3.5 Měření stability EOF v dynamicky pokrytých kapilárách

Jako BGE byly při provedených měřeních použity celkem tři pufrы – borátový pufr (10mM Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>, pH = 8,5) o koncentraci 10 mmol/l, fosfátový pufr o koncentraci 10 mmol/l (pH = 7,0) a 10 mM HEPES upravený přidavkem NaOH na pH = 7,0. Všechny tyto pufrы jsou běžně používány v CZE a byly vybrány kvůli jejich odlišným vlastnostem. Fosfátový pufr jako zástupce pufrů anorganických, HEPES jako zástupce organických pufrů z kategorie Goodových pufrů a borátový pufr jeho další zástupce anorganických pufrů vyznačující se schopností vytvářet větší aniontové klastry. Kapilára byla vybraným BGE promývána před každým měřením tlakem 95 kPa po dobu 150 vteřin

(Metoda I – III) nebo 120 vteřin (Metoda IV). Jako neutrální marker pro měření mobility EOF byla použita thiomočovina o koncentraci 0,1 mg/ml. Thiomočovina byla do kapiláry nadávkována hydrodynamickým tlakem 5 kPa po dobu 5 vteřin. Následně bylo na kapiláru vloženo stejnosměrné napětí 20 kV. Aparatura byla po celou dobu měření temperována na teplotu 25 °C. Maximální časový rozsah měření byl stanoven na 15 minut. Výsledné elektroferogramy byly zaznamenány při vlnové délce 200 nm a 254 nm. Tento postup byl aplikován při měření mobility EOF v pokryté i nepokryté kapiláře.

Hodnota mobility EOF byla vypočtena z naměřených migračních časů thiomočoviny podle Rovnice 4.

$$\mu_{EOF} = \frac{l_c \cdot l_e}{U \cdot t_{thio}} \quad (4)$$

Kde  $\mu_{EOF}$  je hodnota mobility EOF [ $\text{m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ],  $l_c$  je celková délka kapiláry [m],  $l_e$  je efektivní délka kapiláry [m],  $U$  je vložené napětí [V], a  $t_{thio}$  migrační čas thiomočoviny [s].

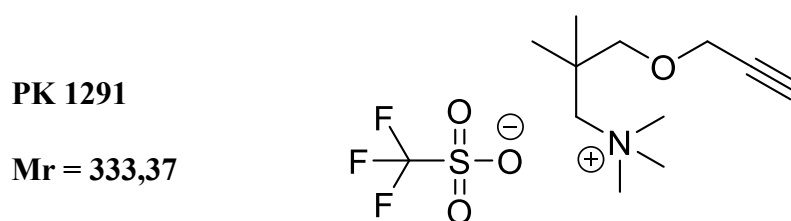
## 4 Výsledky a diskuse

### 4.1 Výběr nejvhodnějších materiálů pro tvorbu pokrytí kapilár

Všechna testovaná pokrytí byla připravena pomocí jedné z metod popsanych výše v kapitole 2.4. Byla sledována efektivita potlačení EOF u jednotlivých pokrytí a také jejich stabilita. Hodnota mobility EOF byla získána z migračních časů thiomocoviny. Jednotlivé experimenty byly prováděny v sérii s 20 nebo 40 opakováními, aby bylo možné sledovat chování vzniklých pokrytí i v delším časovém rozsahu. Získaná data byla rozdělena do tří až šesti úseků v závislosti na počtu opakování, a to konkrétně měření 1 až 5, 8 až 12, 16 až 20, 22 až 26, 28 až 32 a 36 až 40. Pro každý úsek byl následně vypočítán medián, směrodatná a relativní směrodatná odchylka. Výsledné hodnoty byly graficky zpracovány jako procentuální rozdíl oproti mediánu mobility EOF pro daný pufr v nepokryté kapiláře. Tyto výchozí hodnoty byly stanoveny na  $6,95 \cdot 10^{-8} \pm 0,05 \cdot 10^{-8} \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  (RSD = 0,66, n = 5) pro borátový pufr,  $3,96 \cdot 10^{-8} \pm 0,01 \cdot 10^{-8} \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  (RSD = 0,17, n = 5) pro fosfátový pufr a  $5,74 \cdot 10^{-8} \pm 0,01 \cdot 10^{-8} \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  (RSD = 0,13, n = 5) pro HEPES.

### 4.2 Kotva PK 1291

Kotva PK 1291 se řadí do skupiny neopentylových kotev. Její chemická struktura je znázorněna na Obr. 4.1. Experimenty byly provedeny ve všech výše zmíněných pufrech.



Obr. 4.1 – Znázornění chemické struktury kotvy PK 1291.

#### 4.2.1 Kotva PK 1291 v borátovém pufru

Porovnání hodnot změny EOF při použití jednotlivých metod oproti nepokryté kapiláře je znázorněno na Obr. 4.2.

Pokrytí získané jednorázovým promytím roztokem kotvy (Metoda I) nevykazovalo žádné potlačení elektroosmotického toku. Při prvním měření bylo

dosaženo 142 % původní hodnoty EOF. V průběhu celé sekvence nebyly zaznamenány výrazné výkyvy získaných hodnot. Při dvacátém měření dosáhl EOF 146 % původní hodnoty. Pozorované chování lze vysvětlit tím, že pokrytí vzniklé touto metodou je poměrně stabilní, avšak EOF urychluje, nikoliv potlačuje. Nelze však s jistotou říct, že se kotva vůbec adsorbuje na stěnu kapiláry. Další možné vysvětlení tedy je, že kotva kapiláru nepokrývá, ale více aktivuje její povrch, což vede k urychlení EOF.

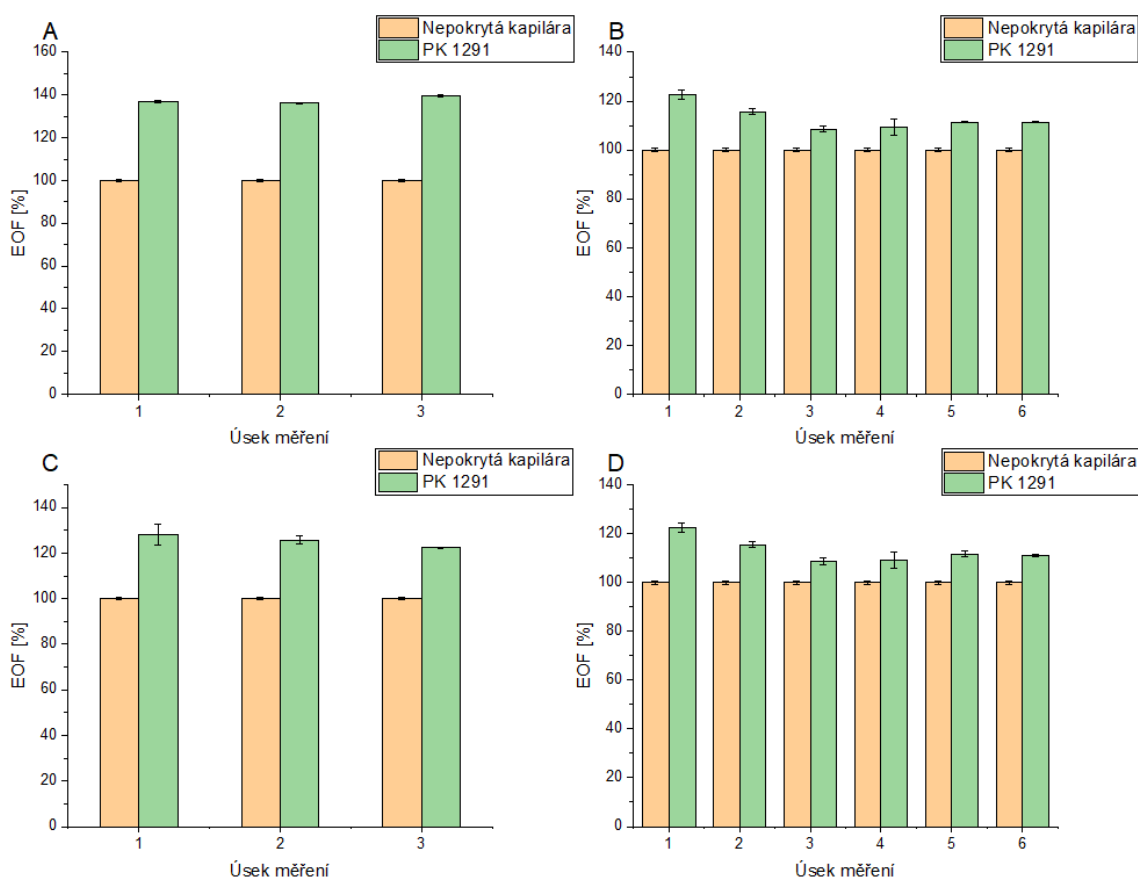
Při opakovaném proplachování kapiláry roztokem PK 1291 (Metoda II) bylo dosaženo podobných výsledků, jako u Metody I. Získané pokrytí opět urychlilo EOF, tentokrát na 133 % původní hodnoty při prvním měření. V průběhu sekvence však docházelo k postupnému snižování hodnoty EOF až na výsledných 117 %. Stabilita výsledného pokrytí je nižší a dochází k poklesu směrem k původní hodnotě. V porovnání s výsledky získanými při měření s Metodou I může být celková nižší hodnota EOF a její postupný pokles způsoben zkrácením času promývání kapiláry roztokem kotvy. I když bylo promývání u Metody II opakované před každým měřením, jeho krátký jednominutový interval pravděpodobně nestačil k dostatečnému navázání kotvy a postupně docházelo k jejímu vymývání.

Použitím Metody III bylo také dosaženo zvýšení hodnoty EOF, a to na 137 % původní hodnoty. Výsledné pokrytí bylo poměrně stabilní, avšak stejně jako u Metody II docházelo k postupnému snižování až na výsledných 130 % při posledním dvacátém měření.

I Metoda IV poskytla zvýšení naměřené hodnoty EOF oproti nepokryté kapiláře. Z počátečních 136 % původní hodnoty EOF došlo k poklesu až na konečných 117 % při čtyřicátém měření. Průběh změny mobility EOF byl velmi podobný s Metodou II, jak lze pozorovat na Obr. 4.2b a Obr. 4.2d. Avšak tato sekvence byla provázena větším množstvím drobných výkyvů, zejména v oblasti mezi dvacátým a třicátým měřením. Opakovanou aplikací napětí pravděpodobně docházelo k narušování pokrytí a snížení stability.

Z provedených experimentů lze dojít k závěru, že PK 1291 v prostředí borátového pufru není vhodná pro potlačování EOF v kapilární elektroforéze. Metody I a III sice vykazují poměrně vysokou stabilitu, avšak všechny metody zvyšují mobilitu EOF v řádu desítek procent oproti nepokryté kapiláře.





**Obr. 4.2** - Grafické znázornění procentuální změny EOF při pokrytí kapiláry PK 1291 v prostředí borátového pufru oproti nepokryté kapiláře. Hodnoty jsou uvedeny ve formě mediánu pro daný úsek měření. Graf A – Jednorázové pokrytí PK 1291 (Metoda I), Graf B – Pokrytí PK 1291 před začátkem každého měření (Metoda II), Graf C – Jednorázové pokrytí PK 1291 s následnou aplikací napětí 20 kV (Metoda III), Graf D – Pokrytí PK 1291 s následnou aplikací napětí 20 kV před začátkem každého měření (Metoda IV). Úsek 1 odpovídá měření 1-5, úsek 2 měření 8-12, úsek 3 měření 16-20, úsek 4 měření 22-26, úsek 5 měření 28-32 a úsek 6 měření 36-40.

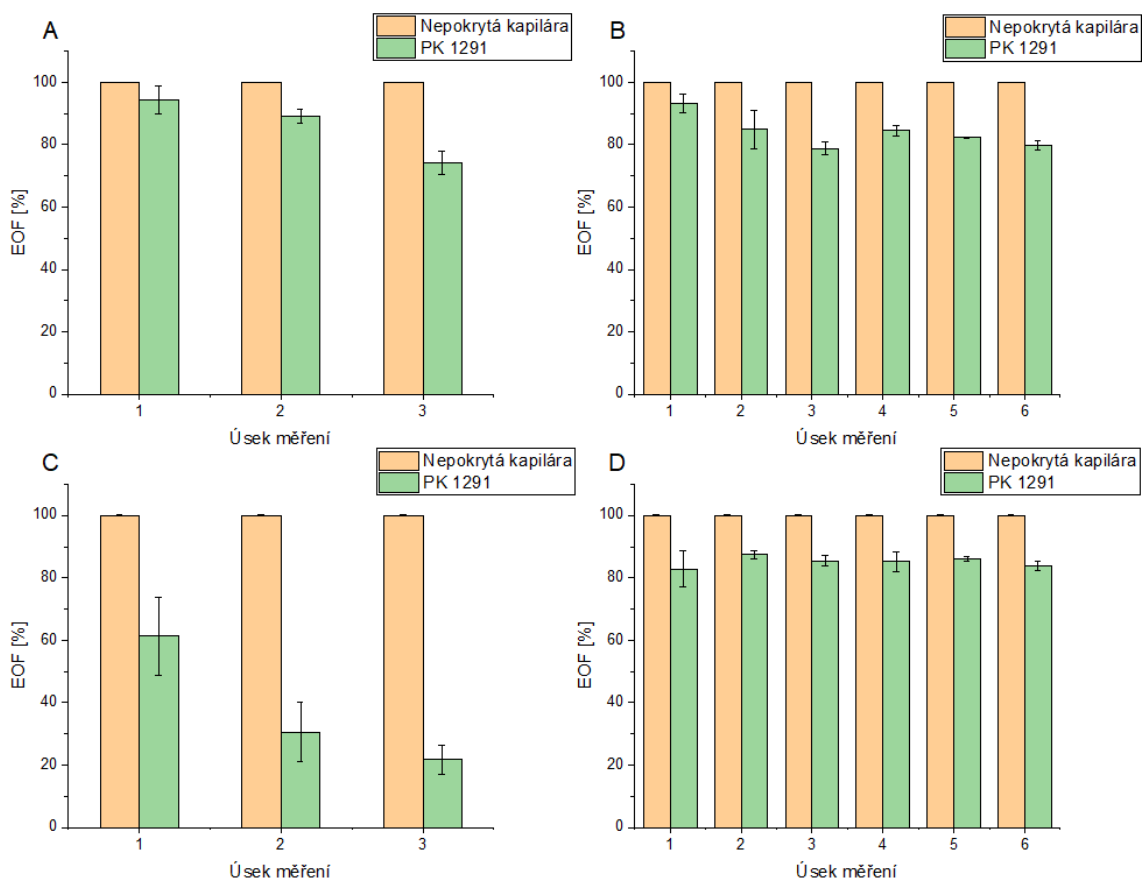
#### 4.2.2 Kotva PK 1291 v HEPES

Porovnání hodnot změny EOF při použití jednotlivých metod oproti nepokryté kapiláře je znázorněno na Obr. 4.3.

Při použití Metody I docházelo k postupnému potlačování EOF. První měření dosáhlo 85,3 % původní hodnoty, během sekvence dvaceti měření došlo k poklesu až na 70,8 %. Efektivita kotvy se zvyšuje s opakováním měření, jak je vidět na Obr. 4.3a. U prvních třech měření byl pozorován krátkodobý nárůst hodnoty EOF z 85,3 % na 92,7 %, po kterém následoval plynulý lineární pokles až na výslednou hodnotu po

dvacátém měření. Výsledné pokrytí není příliš vhodné, poněvadž i když se v delším časovém úseku efektivněji potlačuje EOF, není příliš stabilní.

Opakované promývání kapiláry roztokem kotvy (Metoda II) také poskytlo pokrytí potlačující EOF. V průběhu sekvence čtyřiceti měření došlo k poklesu z 89 % na 80,1% původní hodnoty. Sekvence však byla doprovázena řadou výkyvů na obě strany, jak lze pozorovat na Obr. 4.3b. Stabilita pokrytí je nižší i v porovnání s Metodou I a není zlepšena ani opakovaným promýváním roztokem použité kotvy.



**Obr. 4.3** - Grafické znázornění procentuální změny EOF při pokrytí kapiláry PK 1291 v prostředí HEPES oproti nepokryté kapiláře. Hodnoty jsou uvedeny ve formě mediánu pro daný úsek měření. Graf A – Jednorázové pokrytí PK 1291 (Metoda I), Graf B – Pokrytí PK 1291 před začátkem každého měření (Metoda II), Graf C – Jednorázové pokrytí PK 1291 s následnou aplikací napětí 20 kV (Metoda III), Graf D – Pokrytí PK 1291 s následnou aplikací napětí 20 kV před začátkem každého měření (Metoda IV). Úsek 1 odpovídá měření 1-5, úsek 2 měření 8-12, úsek 3 měření 16-20, úsek 4 měření 22-26, úsek 5 měření 28-32 a úsek 6 měření 36-40.

Pokrytí vytvořené Metodou III dosáhlo poměrně vysoké efektivity. Z počáteční hodnoty 66,9 % následoval rychlý pokles na konečných 21,1 % v průběhu dvaceti měření. Už při desátém opakování došlo k snížení EOF na 29,2 % původní hodnoty. Při jednorázové aplikaci napětí tedy dochází k dobré adsorpci PK 1291 na stěnu kapiláry. V průběhu delší sekvence měření se zlepšuje i stabilita vzniklého pokrytí.

Opakované promývání roztokem kotvy a aplikace napětí (Metoda IV) poskytla stabilní pokrytí potlačující EOF, jak lze pozorovat na Obr. 4.3d. První dvě měření v sérii byla sice vychýlena až k 75,5 % původní hodnoty, avšak od třetího měření až do konce sekvence čtyřiceti opakování byla naměřená hodnota EOF konstantně na úrovni  $82 \pm 1\%$  z hodnoty EOF před pokrytím. Získané pokrytí je tedy vysoce stabilní i v dlouhé sekvenci opakovaných měření. Nevýhodou takto vytvořeného pokrytí je však jeho nízká schopnost potlačovat EOF.

Z provedených experimentů lze konstatovat, že PK 1291 v prostředí HEPES je schopna vytvořit pokrytí potlačující EOF v kapilární elektroforéze. Nejvhodnější pokrytí o vysoké stabilitě poskytla Metoda IV. Metodou III bylo získáno pokrytí o vysoké efektivitě, které však není příliš stabilní, zejména v sekvencích s malým množstvím opakování.

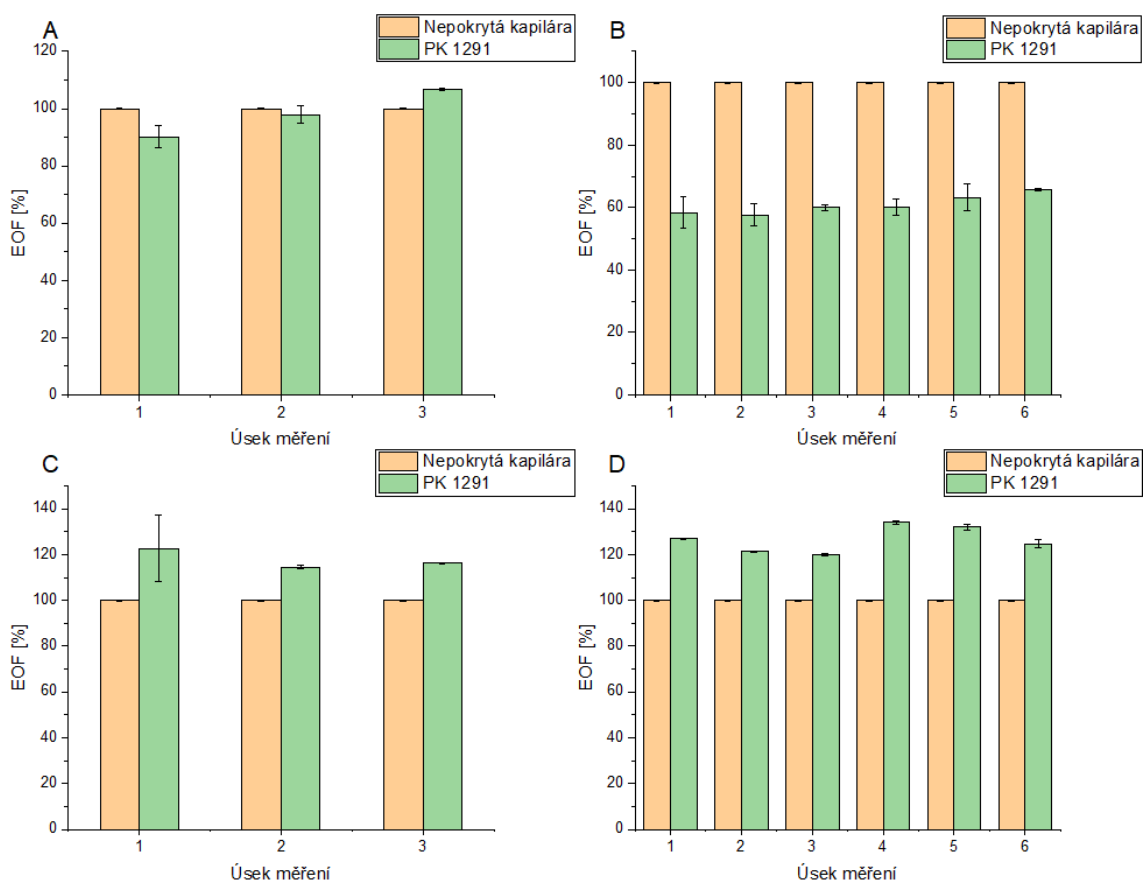
#### **4.2.3 Kotva PK 1291 ve fosfátovém pufru**

Porovnání hodnot změny EOF při použití jednotlivých metod oproti nepokryté kapiláře je znázorněno na Obr. 4.4.

Pokrytí získané jednorázovým promytím kapiláry roztokem kotvy (Metoda I) nevykazovalo vysokou stabilitu. Při prvním měření dosáhl EOF sice 83,3 % původní hodnoty, avšak v průběhu sekvence dvaceti opakování došlo k nárůstu až na 106,6 %. Kotva se po jednorázové aplikaci pravděpodobně špatně adsorbovala a postupně docházelo k jejímu vymývání.

Opakované promývání kapiláry roztokem kotvy (Metoda II) poskytlo v porovnání s Metodou I mnohem stabilnější pokrytí, které bylo schopno potlačovat EOF v celém rozsahu sekvence o čtyřiceti opakování. První hodnota EOF činila 64,1 % a čtyřicátá 64,9 % původní hodnoty. Měření bylo doprovázeno drobnými nárůsty EOF při výměnách BGE po každém desátém měření, jak lze pozorovat na Obr. 4.4b. Tyto výchyly se však

pohybovaly v řádu jednotek procent, výsledné pokrytí lze tedy prohlásit za poměrně stabilní.



**Obr. 4.4** - Grafické znázornění procentuální změny EOF při pokrytí kapiláry PK 1291 v prostředí fosfátového pufru oproti nepokryté kapiláře. Hodnoty jsou uvedeny ve formě mediánu pro daný úsek měření. Graf A – Jednorázové pokrytí PK 1291 (Metoda I), Graf B – Pokrytí PK 1291 před začátkem každého měření (Metoda II), Graf C – Jednorázové pokrytí PK 1291 s následnou aplikací napětí 20 kV (Metoda III), Graf D – Pokrytí PK 1291 s následnou aplikací napětí 20 kV před začátkem každého měření (Metoda IV). Úsek 1 odpovídá měření 1-5, úsek 2 měření 8-12, úsek 3 měření 16-20, úsek 4 měření 22-26, úsek 5 měření 28-32 a úsek 6 měření 36-40.

Pokrytí získané Metodou III nevykazovalo schopnost potlačit EOF. První naměřená hodnota činila 158,6 % a v průběhu sekvence došlo k poklesu na 115,5 % původní hodnoty. Pokles naměřených hodnot byl skokový, kdy po prvních třech měřeních klesla hodnota EOF na 116,7 % původní hodnoty a od tohoto okamžiku nedocházelo k velkým změnám až do konce měření. Z důvodu neschopnosti potlačení EOF však tato metoda nebyla vyhodnocena jako vhodná pro tvorbu potenciálních pokrytí. Kotva se

nedokázala na kapiláru po jednorázové aplikaci napětí dostatečně adsorbovat a v průběhu sekvence docházelo k návratu EOF na původní hodnotu.

Metoda IV obdobně jako Metoda III neposkytla žádané výsledky. Kotva se i přes opakované promývání kapiláry jejím roztokem nebyla schopna dostatečně adsorbovat a opakovaně vkládané napětí způsobovalo vysokou nestabilitu výsledného pokrytí, jak lze pozorovat na Obr. 4.4d. Nedošlo k velké změně mezi prvním (126,7 %) a čtyřicátým měřením (120,1 %) v sekvenci vzhledem k původní hodnotě EOF, avšak celý experiment byl doprovázen četnými výchyly v naměřených hodnotách. U některých píků docházelo k drobným deformacím, a to zejména mezi 24-33 měření v sekvenci, kdy byly pozorovány i největší výchyly u naměřených hodnot EOF. Metoda byla proto vyhodnocena jako nevhodná.

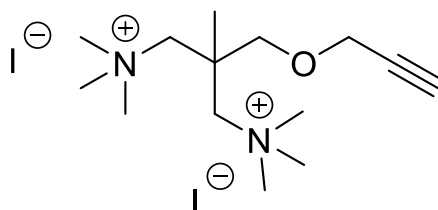
Z provedených experimentů lze konstatovat, že jediná použitelná metoda pro vytvoření pokrytí z kotvy PK 1291 v prostředí fosfátového pufru je Metoda II, která vykazovala poměrně dobrou stabilitu výsledného pokrytí a potlačení EOF o přibližně 35 %.

### 4.3 Kotva PK 941

Kotva PK 941 se řadí do skupiny neopentylových kotev. Její chemická struktura je znázorněna na Obr. 4.5. Experimenty byly provedeny ve všech výše zmíněných pufrch.

**PK 941**

**Mr = 496,22**



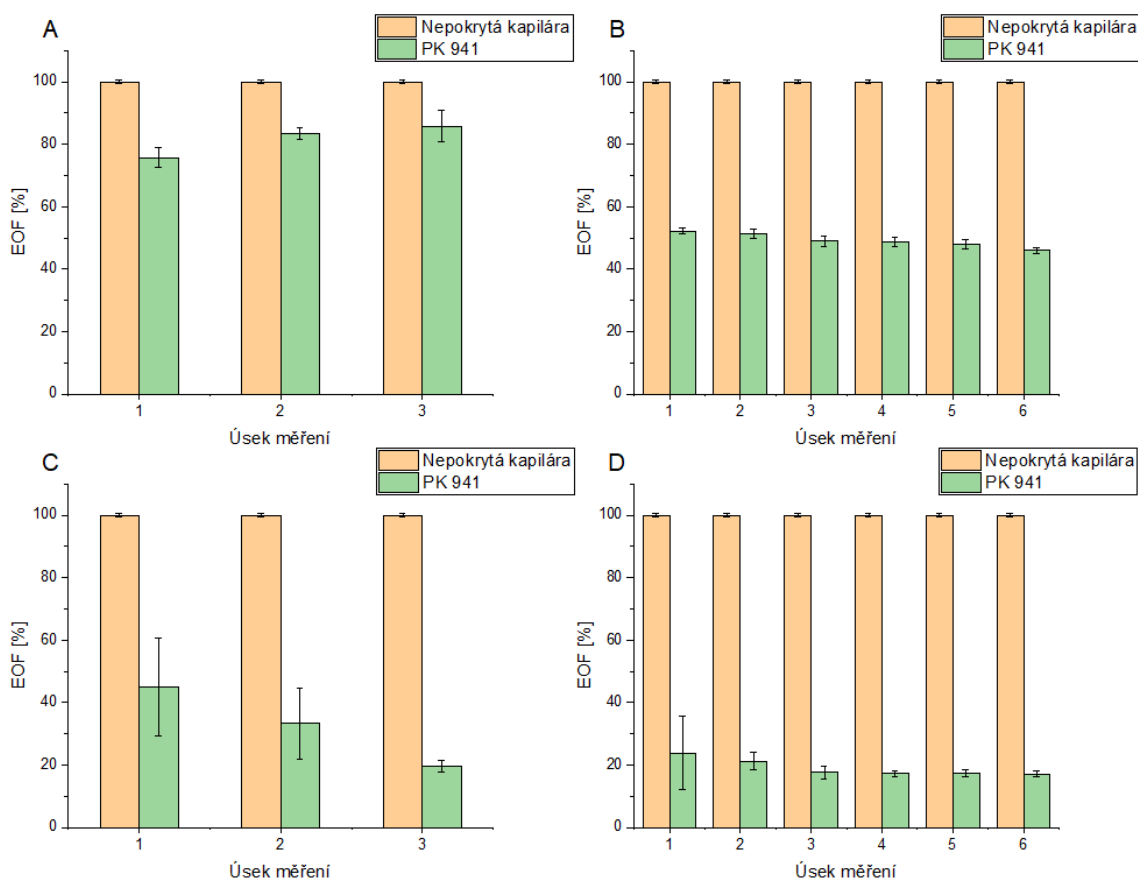
**Obr. 4.5** – znázornění chemické struktury kotvy PK 941.

#### 4.3.1 Kotva PK 941 v borátovém pufru

Porovnání hodnot změny EOF při použití jednotlivých metod oproti nepokryté kapiláře je znázorněno na Obr. 4.6.

Pokrytí vytvořené pomocí Metody I vykazovalo schopnost potlačovat EOF. V průběhu sekvence dvaceti měření však docházelo k postupnému vymývání a nárůstu mobility EOF z 72,8 % původní hodnoty při prvním měření na 86,2 % u poslední

naměřené hodnoty. Kotva se při jednorázovém promytí nedokázala dobře adsorbovat na stěnu kapiláry a výsledné pokrytí proto není příliš stabilní.



**Obr. 4.6** - Grafické znázornění procentuální změny EOF při pokrytí kapiláry PK 941 v prostředí borátového pufru oproti nepokryté kapiláře. Hodnoty jsou uvedeny ve formě mediánu pro daný úsek měření. Graf A – Jednorázové pokrytí PK 941 (Metoda I), Graf B – Pokrytí PK 941 před začátkem každého měření (Metoda II), Graf C – Jednorázové pokrytí PK 941 s následnou aplikací napětí 20 kV (Metoda III), Graf D – Pokrytí PK 941 s následnou aplikací napětí 20 kV před začátkem každého měření (Metoda IV). Úsek 1 odpovídá měření 1-5, úsek 2 měření 8-12, úsek 3 měření 16-20, úsek 4 měření 22-26, úsek 5 měření 28-32 a úsek 6 měření 36-40.

Metoda II přinesla v porovnání s předchozím experimentem výrazné zlepšení stability. EOF byl nejprve potlačen na 51,6 % své původní hodnoty. Poslední zaznamenaná hodnota činila 45,6 % původní hodnoty. V celé sekvenci čtyřiceti měření nedocházelo k žádným výkyvům, a to ani po výměně BGE. Opakované promývání kapiláry roztokem kotvy zabránilo vymývání, které bylo pozorovatelné u Metody I a tím došlo k výraznému zlepšení stability získaného pokrytí. Takto získané pokrytí bylo

vyhodnoceno jako jedno z nejlepších napříč všemi provedenými experimenty popsány v této práci.

Při jednorázovém pokrytí roztokem kotvy a následné aplikaci napětí 20 kV (Metoda III) došlo ke snížení EOF na 53,8 % původní hodnoty. Obdobně jako u Metody I nebylo získané pokrytí příliš stabilní. V průběhu celé sekvence dvaceti měření docházelo k poklesu mobility EOF až na výsledných 19,8 % původní hodnoty, jak lze pozorovat na Obr. 4.6c. Efektivita pokrytí se s časem zvyšovala. Samotná změna nebyla lineární, ale proložená řadou skokových poklesů.

Opakovaným promýváním kapiláry roztokem kotvy a následnou aplikací napětí 20 kV (Metoda IV) došlo při prvním měření ke snížení EOF na 28,6 % původní hodnoty. Jak lze pozorovat na Obr. 4.6d, první úsek měření je doprovázen větší odchylkou způsobenou rychlejším poklesem EOF mezi prvním až čtvrtým měřením a to z již zmíněných 28,6 % na 21,6 %. Ve zbytku sekvence o celkovém počtu čtyřiceti měření však už nebyly zaznamenány výraznější výkyvy. Experiment byl ukončen na 17,2 % původní hodnoty EOF u posledního měření. V porovnání s Metodou III bylo dosaženo výrazně vyšší stability výsledného pokrytí. Díky opakované aplikaci napětí před každým měřením došlo i k většímu zpomalení EOF, než tomu bylo pouze u opakovaného promývání roztokem kotvy u Metody II.

Na základě provedených experimentů lze konstatovat, že pro tvorbu pokrytí z kotvy PK 941 v borátovém pufru jsou nejvhodnější Metoda II a Metoda IV. obě možnosti poskytly pokrytí o vysoké stabilitě a dobré schopnosti modifikovat EOF. Vyšší efektivitu vykazovala Metoda IV, kdy bylo opakovanou aplikací napětí 20 kV dosaženo potlačení EOF až na 17,2 % původní hodnoty. Jednorázové pokrývání Metodou I a Metodou III není vhodné kvůli nízké stabilitě výsledných pokrytí.

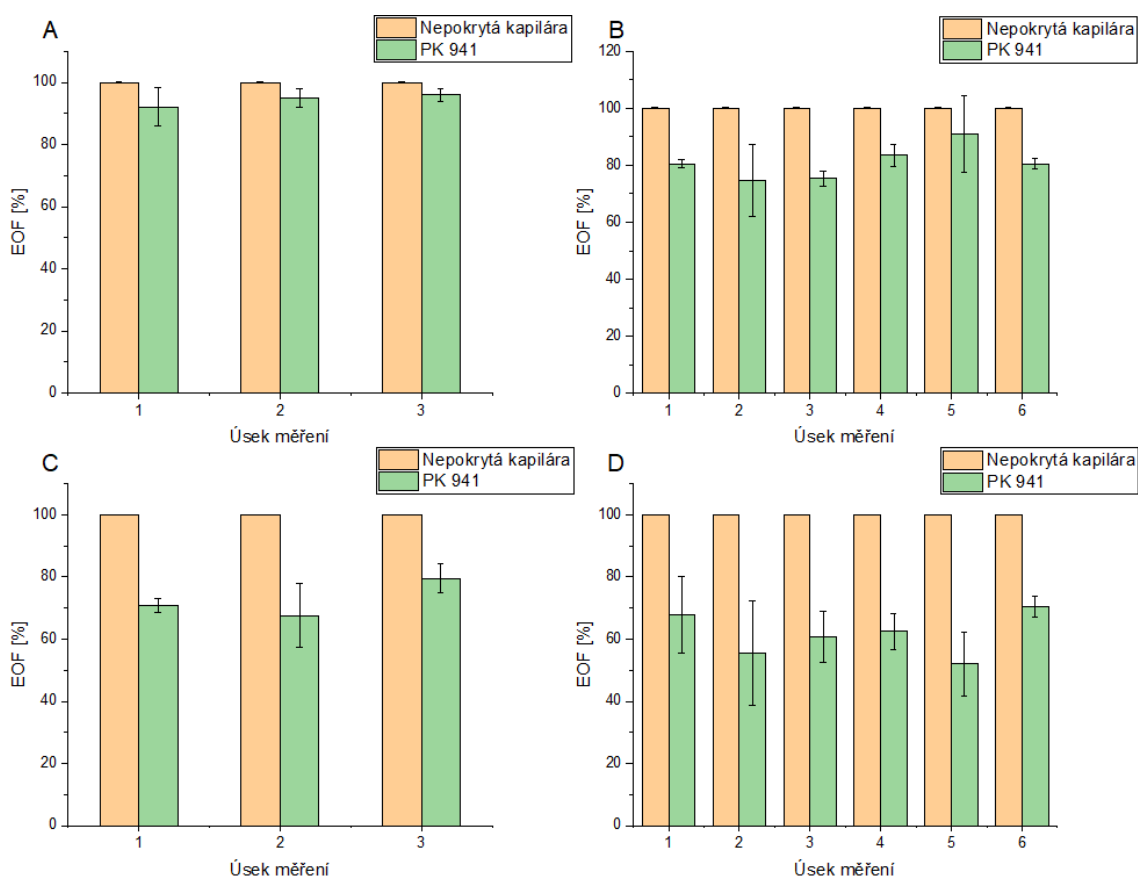
#### **4.3.2 Kotva PK 941 v HEPES**

Porovnání hodnot změny EOF při použití jednotlivých metod oproti nepokryté kapiláře je znázorněno na Obr. 3.7.

Pokrytí vytvořené pomocí Metody I vykazovalo schopnost potlačovat EOF. V průběhu sekvence dvaceti měření však docházelo k postupnému vymývání a nárůstu mobility EOF z prvotních 81,2 % původní hodnoty na 93,2 % u posledního měření. Kotva

se při jednorázovém promytí nedokázala dobře adsorbovat na stěnu kapiláry a postupně docházelo k návratu EOF na původní hodnotu.

Opakované promývání kapiláry roztokem kotvy (Metoda II) nepřineslo zlepšení ve stabilitě vzniklého pokrytí. Opět bylo pozorováno potlačení mobility EOF a to na 80,7 % původní hodnoty při prvním měření a 79,5 % při čtyřicátém měření. Jak však vyplývá z Obr. 4.7b, celá sekvence byla doprovázena výkyvy. Konkrétně byl pozorován trend skokového zrychlení EOF při každé výměně BGE následovaný postupným poklesem.



**Obr. 4.7** - Grafické znázornění procentuální změny EOF při pokrytí kapiláry PK 941 v prostředí HEPES oproti nepokryté kapiláře. Hodnoty jsou uvedeny ve formě mediánu pro daný úsek měření. Graf A – Jednorázové pokrytí PK 941 (Metoda I), Graf B – Pokrytí PK 941 před začátkem každého měření (Metoda II), Graf C – Jednorázové pokrytí PK 941 s následnou aplikací napětí 20 kV (Metoda III), Graf D – Pokrytí PK 941 s následnou aplikací napětí 20 kV před začátkem každého měření (Metoda IV). Úsek 1 odpovídá měření 1-5, úsek 2 měření 8-12, úsek 3 měření 16-20, úsek 4 měření 22-26, úsek 5 měření 28-32 a úsek 6 měření 36-40.



Jednorázová aplikace napětí 20 kV (Metoda III) nepřinesla výraznou změnu ve stabilitě vzniklého pokrytí v porovnání s Metodou I. Prvotní potlačení EOF bylo výraznější a to na 72 % původní hodnoty. V průběhu sekvence dvaceti měření došlo k nárůstu EOF na 79,5 % původní hodnoty. Stejně jako u Metody II bylo pozorováno skokové urychlení EOF a následný pokles po výměně BGE.

Metoda IV se osvědčila nejméně ze všech použitých metod v této sadě experimentů. Při prvním měření došlo k poklesu EOF na 81,1 % původní hodnoty. U čtyřicátého měření byla zaznamenána modifikace EOF až na 67,6 % původní hodnoty. Celá sekvence byla provázena velkým množstvím výkyvů. Byl opět pozorován trend skokového urychlení EOF při každé výměně BGE a následný pokles. Zmíněný pokles však nebyl plynulý jako u Metod II a III, ale doprovázený výkyvy na obě strany. Opakovaná aplikace napětí pravděpodobně narušovala vytvořené pokrytí a tím ještě více snižovala jeho stabilitu.

Na základě provedených experimentů lze konstatovat, že PK 941 není v prostředí HEPES vhodná pro tvorbu pokrytí v kapilární elektroforéze z důvodu nízké stability výsledných pokrytí. Skoková urychlení EOF po výměně BGE lze vysvětlit tím, že z kapiláry je vymýváno do vialky s BGE malé množství kotvy a jejího protiiontu, čímž dochází k ovlivnění vlastností BGE a následně i EOF.

### **4.3.3 Kotva PK 941 ve fosfátovém pufu**

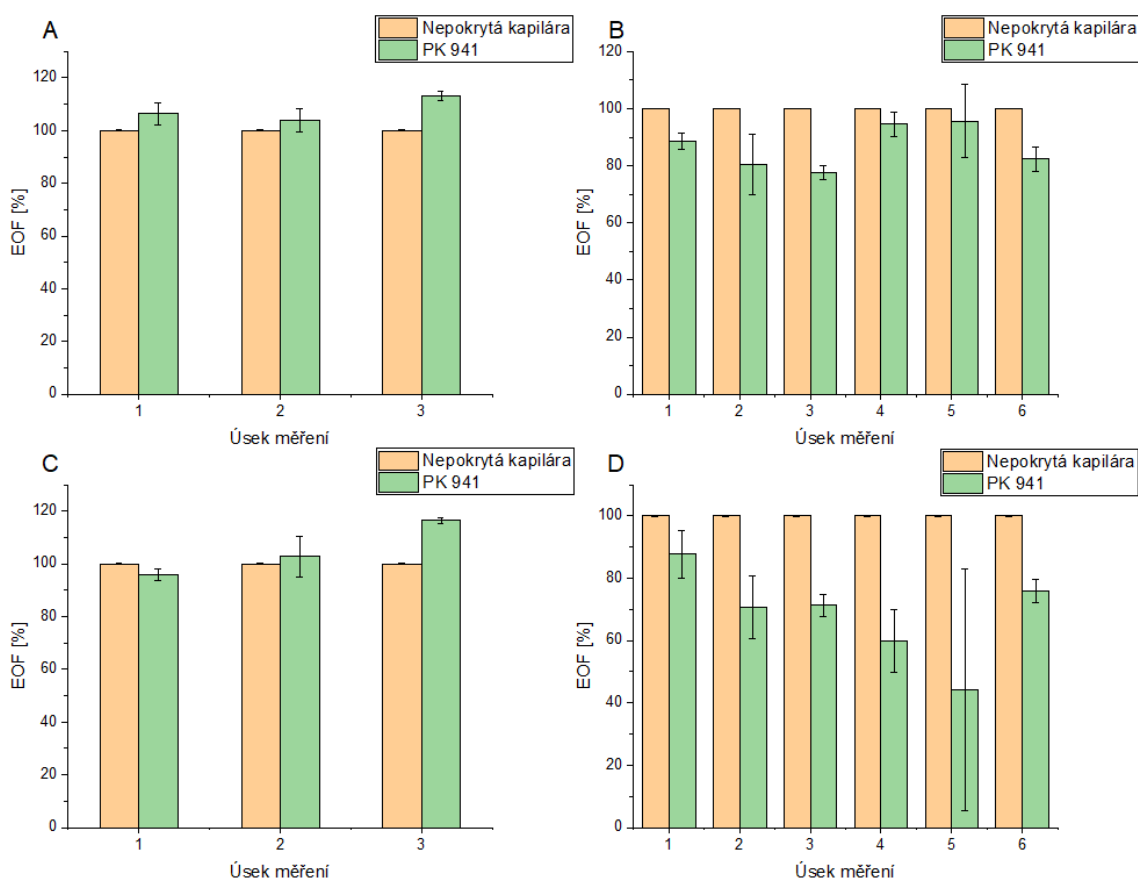
Porovnání hodnot změny EOF při použití jednotlivých metod oproti nepokryté kapiláře je znázorněno na Obr. 4.8.

Pokrytí vytvořené jednorázovým promytím kapiláry roztokem kotvy (Metoda I) vykazovalo velmi slabou schopnost potlačovat EOF. Při prvním měření došlo k potlačení EOF na 98,4 % původní hodnoty. V průběhu sekvence dvaceti měření došlo k nárůstu až na 110 % původní hodnoty u posledního měření. Jednorázové propláchnutí pravděpodobně nestačilo na dostatečnou adsorpci kotvy na stěnu kapiláry.

Metoda II poskytla oproti Metodě I pokrytí s lepší schopností potlačovat EOF. Nejprve došlo k potlačení mobility EOF na 90,3 % původní hodnoty. V průběhu sekvence o čtyřiceti opakováních došlo k poklesu až na 81,8 % původní hodnoty. Byl pozorován trend skokových zrychlení EOF na téměř původní hodnotu při výměně BGE a následný

pozvolný pokles. Lze konstatovat, že kotva se adsorbuje na stěnu kapiláry lépe díky opakovanému promývání jejím roztokem před začátkem každého měření.

Jednorázové promytí kapiláry roztokem kotvy s následnou aplikací napětí 20 kV (Metoda III) přineslo obdobné výsledky jako Metoda I. Kotva se špatně adsorbovala na povrch kapiláry a nebyla schopna efektivně potlačit EOF, jak lze pozorovat na Obr. 4.8c. Při prvním měření došlo k poklesu na 94,1 % původní hodnoty. V průběhu dvaceti měření rychlost EOF vystoupala až na 115,5 % původní hodnoty.



**Obr. 4.8** - Grafické znázornění procentuální změny EOF při pokrytí kapiláry PK 941 v prostředí fosfátového pufru oproti nepokryté kapiláře. Hodnoty jsou uvedeny ve formě mediánu pro daný úsek měření. Graf A – Jednorázové pokrytí PK 941 (Metoda I), Graf B – Pokrytí PK 941 před začátkem každého měření (Metoda II), Graf C – Jednorázové pokrytí PK 941 s následnou aplikací napětí 20 kV (Metoda III), Graf D – Pokrytí PK 941 s následnou aplikací napětí 20 kV před začátkem každého měření (Metoda IV). Úsek 1 odpovídá měření 1-5, úsek 2 měření 8-12, úsek 3 měření 16-20, úsek 4 měření 22-26, úsek 5 měření 28-32 a úsek 6 měření 36-40.

Opakované promývání kapiláry roztokem kotvy s následnou aplikací napětí 20 kV (Metoda IV) zvýšilo oproti Metodě III schopnost vytvořeného pokrytí potlačovat EOF. Při prvním měření došlo ke snížení mobility EOF na 95,5 % původní hodnoty a během sekvence čtyřiceti měření docházelo k dalšímu zpomalování až na 81,2 % u posledního měření. Jak lze pozorovat na Obr. 4.8d, výsledné pokrytí bylo vysoce nestabilní a celý experiment byl doprovázen nepravidelnými výkyvy, zejména v posledních deseti měřeních. Obdobně jako u Metody II bylo opakovaným promýváním kapiláry roztokem kotvy dosaženo lepší schopnosti potlačit EOF. Výsledné pokrytí bylo pravděpodobně narušováno opakovanou aplikací napětí, což vedlo ke snížení stability.

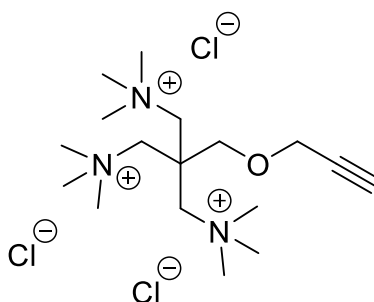
Na základě provedených experimentů lze konstatovat, že PK 941 není v prostředí fosfátového pufru vhodná pro tvorbu pokrytí v kapilární elektroforéze z důvodu nízké stability výsledných pokrytí. Skoková urychlení EOF po výměně BGE lze vysvětlit tím, že z kapiláry je vymýváno do vialky s BGE malé množství kotvy a jejího protiiontu, čímž dochází k ovlivnění vlastností BGE a následně i EOF.

#### 4.4 Kotva PK 1300

Kotva PK 1300 se řadí do skupiny neopentylových kotev. Její chemická struktura je znázorněna na Obr. 4.9. Experimenty byly provedeny ve všech výše zmíněných pufrech.

**PK 1300**

**Mr = 406,86**



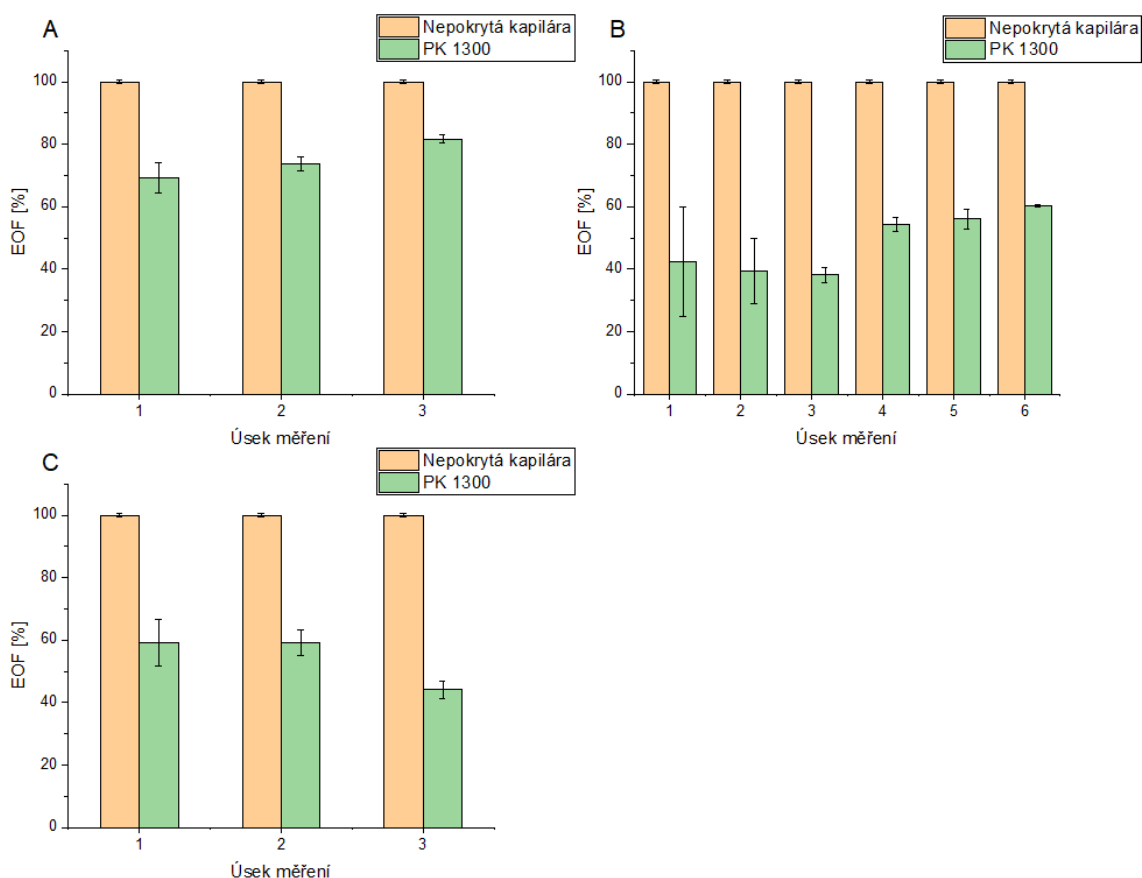
**Obr. 4.9** – znázornění chemické struktury kotvy PK 941.

##### 4.4.1 Kotva PK 1300 v borátovém pufru

Porovnání hodnot změny EOF při použití jednotlivých metod oproti nepokryté kapiláře je znázorněno na Obr. 4.10.

Pokrytí vytvořené Metodou I nevykazovalo vysokou stabilitu. Mobilita EOF klesla při prvním měření na 62,1 % své původní hodnoty. V průběhu sekvence dvaceti

měření docházelo k postupnému zrychlování až na 83,3 % původní hodnoty. Kotva se pravděpodobně špatně adsorbovala na stěnu kapiláry a postupně docházelo k jejímu vymývání.



**Obr. 4.10** - Grafické znázornění procentuální změny EOF při pokrytí kapiláry PK 1300 v prostředí borátového pufru oproti nepokryté kapiláře. Hodnoty jsou uvedeny ve formě mediánu pro daný úsek měření. Graf A – Jednorázové pokrytí PK 1300 (Metoda I), Graf B – Pokrytí PK 1300 před začátkem každého měření (Metoda II), Graf C – Jednorázové pokrytí 1300 s následnou aplikací napětí 20 kV (Metoda III), Úsek 1 odpovídá měření 1-5, úsek 2 měření 8-12, úsek 3 měření 16-20, úsek 4 měření 22-26, úsek 5 měření 28-32 a úsek 6 měření 36-40.

Opakované promývání kapiláry roztokem kotvy (Metoda II) nepřineslo zlepšení ve stabilitě výsledného pokrytí, jak lze pozorovat na Obr. 4.10b. Při prvním měření poklesl EOF na 57,1 % své původní hodnoty. Zpomalování pokračovalo až do dvacátého měření a to na 37,7 % původní hodnoty. Tento pokles byl proložen krátkodobým nárůstem při výměně BGE po desátém měření. Po dvacátém měření následovalo skokové urychlení EOF a postupný nárůst až na 59,6 % původní hodnoty při čtyřicátém měření. Ani opakované promývání kapiláry roztokem kotvy nestačilo k její dostatečné adsorpci

a obdobně jako u Metody I docházelo po delším časovém úseku k jejímu postupnému vymývání.

Při prvním měření Metodou III došlo k potlačení EOF na 50,3 % původní hodnoty. Do šestého měření byl pozorován krátkodobý nárůst rychlosti na 63,7 %, následovaný opětovným poklesem EOF až na konečných 43,4 % původní hodnoty. Jednorázová aplikace napětí výrazně nezlepšila schopnost kotvy adsorbovat se na stěnu křemenné kapiláry.

Experiment s pomocí Metody IV nebyl proveden. Důvodem byla vysoká nestabilita pokrytí vytvořených pomocí všech předchozích metod a absence jakýchkoliv náznaků trendů v jejich chování.

Na základě provedených experimentů lze konstatovat, že PK 1300 není v prostředí borátového pufru vhodná pro tvorbu pokrytí v kapilární elektroforéze z důvodu nízké stability výsledných pokrytí.

#### **4.4.2 Kotva PK 1300 v HEPES**

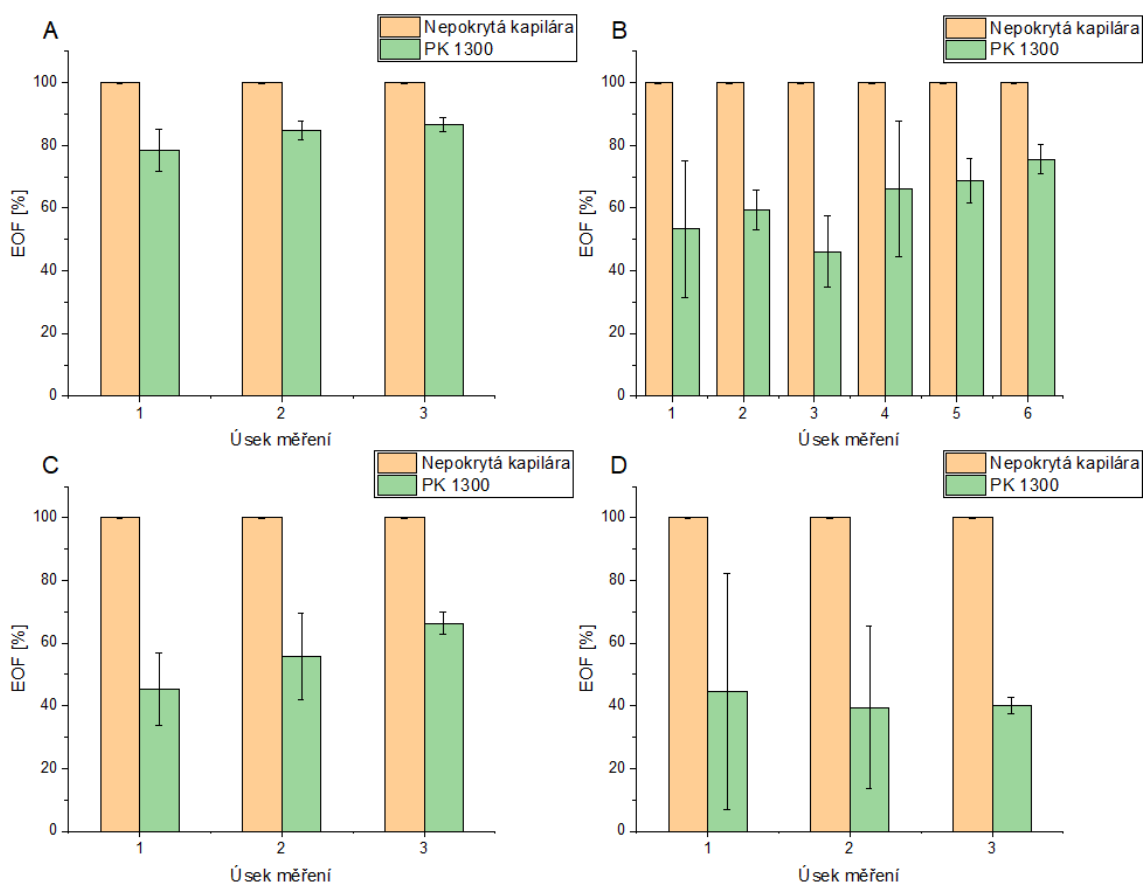
Porovnání hodnot změny EOF při použití jednotlivých metod oproti nepokryté kapiláře je znázorněno na Obr. 4.11.

Při jednorázovém promytí kapiláry roztokem kotvy (Metoda I) nedošlo k výraznému potlačení EOF. První naměřený údaj činil 68,1 % původní hodnoty. V průběhu sekvence dvaceti měření byl pozorován postupný nárůst až na 90,4 % původní hodnoty. Kotva se pravděpodobně špatně adsorbovala na stěnu kapiláry a postupně docházelo k jejímu vymývání.

Opakované promývání kapiláry roztokem kotvy (Metoda II) nepřineslo žádné zlepšení stability pokrytí v porovnání s Metodou I. Celá sekvence byla doprovázena náhodnými skokovými nárůsty a poklesy ve všech úsecích měření, jak lze pozorovat na Obr. 4.11b. Jedním z možných důvodů tohoto chování je částečné zneprůchodnění kapiláry vlivem opakovaného promývání roztokem kotvy. Metoda II byla v tomto případě vyhodnocena jako nepoužitelná.

Pokrytí vytvořené Metodou III vykazovalo velmi podobné chování v porovnání s Metodou I. Jednorázová aplikace napětí zlepšila prvotní schopnost potlačit EOF, a to na 37 % původní hodnoty. V průběhu sekvence dvaceti měření docházelo ke zrychlování

EOF až na 65,7 % původní hodnoty při dvacátém měření. Samotná změna nebyla lineární, po výměně BGE byl pozorován skokový nárůst EOF. Kotva se ani v tomto případě nedokázala dostatečně adsorbovat a byla postupně vymývána z kapiláry.



**Obr. 4.11** - Grafické znázornění procentuální změny EOF při pokrytí kapiláry PK 1300 v prostředí HEPES oproti nepokryté kapiláře. Hodnoty jsou uvedeny ve formě mediánu pro daný úsek měření. Graf A – Jednorázové pokrytí PK 1300 (Metoda I), Graf B – Pokrytí PK 1300 před začátkem každého měření (Metoda II), Graf C – Jednorázové pokrytí PK 1300 s následnou aplikací napětí 20 kV (Metoda III), Graf D – Pokrytí PK 1300 s následnou aplikací napětí 20 kV před začátkem každého měření (Metoda IV). Úsek 1 odpovídá měření 1-5, úsek 2 měření 8-12, úsek 3 měření 16-20, úsek 4 měření 22-26, úsek 5 měření 28-32 a úsek 6 měření 36-40.

Opakované promývání kapiláry roztokem kotvy a následná aplikace napětí 20 kV (Metoda IV) zabránilo postupnému vymývání kotvy z kapiláry. EOF byl při prvním měření potlačen na 72,6 % původní hodnoty. V průběhu celé sekvence docházelo k dalšímu zpomalování až na konečných 39 % z původní hodnoty. Byl pozorován trend

skokového zrychlení EOF po výměně BGE. Vzniklé pokrytí poměrně dobře potlačuje EOF, nelze jej však vyhodnotit jako vhodné, z důvodu snížené stability.

Na základě provedených experimentů lze konstatovat, že PK 1300 není v prostředí HEPES vhodná pro tvorbu pokrytí v kapilární elektroforéze z důvodu nízké stability výsledných pokrytí. Skoková urychlení EOF po výměně BGE lze vysvětlit tím, že z kapiláry je vymýváno do vialky s BGE malé množství kotvy a jejího protiiontu, čímž dochází k ovlivnění vlastností BGE a následně i EOF.

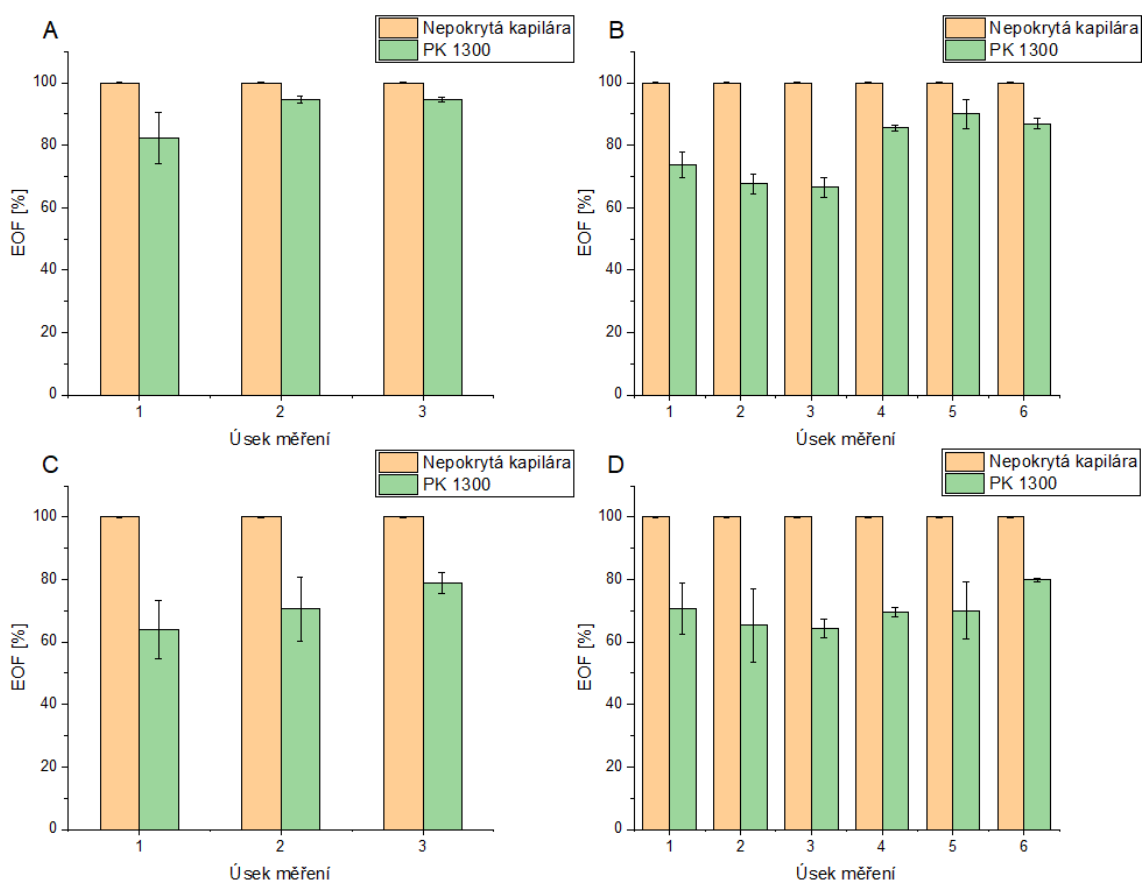
#### **4.4.3 Kotva PK 1300 ve fosfátovém pufru**

Porovnání hodnot změny EOF při použití jednotlivých metod oproti nepokryté kapiláře je znázorněno na Obr. 4.12.

Jednorázové promytí kapiláry roztokem kotvy (Metoda I) nevedlo k výraznému potlačení EOF. Po prvním měření došlo k poklesu na 75,3 % původní hodnoty. Následoval postupný nárůst až na 93,3 % původní hodnoty po dvaceti měřeních. Kotva se jednorázovým promytím kapiláry pravděpodobně nedokázala dostatečně adsorbovat a docházelo k jejímu vymývání, jak lze pozorovat na Obr. 4.12a.

Opakované promývání kapiláry roztokem kotvy (Metoda II) nepřineslo výrazné zlepšení ani ve schopnosti potlačit EOF, ani ve stabilitě. Mobilita EOF po prvním měření činila 66,9 % původní hodnoty. Během sekvence čtyřiceti měření postupně vystoupala na 85 % původní hodnoty. Byl pozorován trend skokových nárůstů EOF po výměně BGE. Je dobré podotknout, že i když docházelo k vymývání kotvy z kapiláry, stejně jako v případě Metody I, opakované promývání u Metody II dokázalo tento proces výrazně zpomalit.

Experiment s Metodou III měl velmi podobný průběh v porovnání s Metodou I. Jednorázová aplikace napětí před samotnou sekvencí však zlepšila schopnost potlačit EOF, a to konkrétně na 51,9 % původní hodnoty po prvním měření. V průběhu sekvence dvaceti měření docházelo opět k vymývání kotvy z kapiláry a urychlování EOF až na 81,9 % původní hodnoty po posledním měření. Byl pozorován skokový nárůst EOF po výměně BGE obdobně jako u Metody II.



**Obr. 4.12** - Grafické znázornění procentuální změny EOF při pokrytí kapiláry PK 1300 v prostředí fosfátového pufru oproti nepokryté kapiláře. Hodnoty jsou uvedeny ve formě mediánu pro daný úsek měření. Graf A – Jednorázové pokrytí PK 1300 (Metoda I), Graf B – Pokrytí PK 1300 před začátkem každého měření (Metoda II), Graf C – Jednorázové pokrytí PK 1300 s následnou aplikací napětí 20 kV (Metoda III), Graf D – Pokrytí PK 1300 s následnou aplikací napětí 20 kV před začátkem každého měření (Metoda IV). Úsek 1 odpovídá měření 1-5, úsek 2 měření 8-12, úsek 3 měření 16-20, úsek 4 měření 22-26, úsek 5 měření 28-32 a úsek 6 měření 36-40.

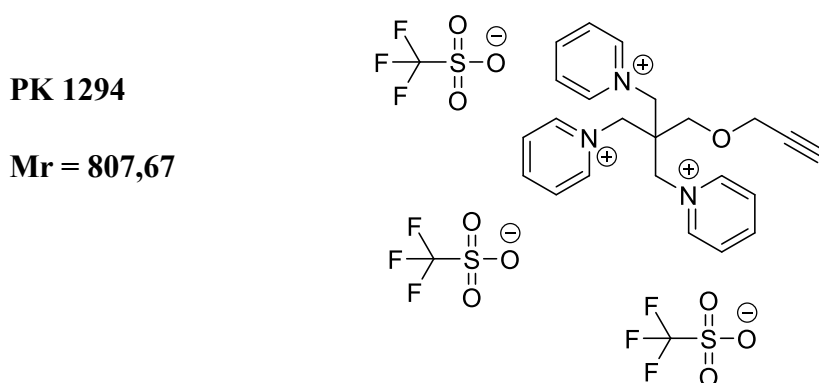
Opakované promývání kapiláry roztokem kotvy a následná aplikace napětí 20 kV (Metoda IV) také dokázalo potlačit EOF, a to na 80,6 % původní hodnoty po prvním měření. Jak lze pozorovat na Obr. 4.12d, první polovina sekvence byla doprovázena výkyvy způsobenými skokovým urychlováním EOF po výměně BGE. Po dvacátém měření však začalo docházet ke stabilizování vytvořeného pokrytí. Posledních přibližně dvanáct měření se naměřená hodnota EOF držela téměř na konstantní hodnotě, která činila 78,8 % po čtyřicátém měření. Adsorpce kotvy na stěnu kapiláry probíhala postupně a po delším časovém úseku se výrazně zvýšila stabilita vzniklého pokrytí.



Na základě provedených experimentů lze konstatovat, že PK 1300 v prostředí fosfátového pufru není příliš vhodná pro tvorbu pokrytí v kapilární elektroforéze z důvodu nízké stability výsledných pokrytí. Jedinou výjimkou je Metoda IV, pomocí níž bylo získáno pokrytí, s dobrou stabilitou. Nevýhodou této metody je nutnost delšího časového úseku pro dostatečnou adsorpci kotvy na stěnu kapiláry. Skoková urychlení EOF po výměně BGE lze vysvětlit tím, že z kapiláry je vymýváno do vialky s BGE malé množství kotvy a jejího protiiontu, čímž dochází k ovlivnění vlastností BGE a následně i EOF.

#### 4.5 Kotva PK 1294

Kotva PK 1294 se řadí do skupiny neopentylových kotev. Její chemická struktura je znázorněna na Obr. 4.13. Experimenty byly provedeny v prostředí borátového pufru a HEPES.



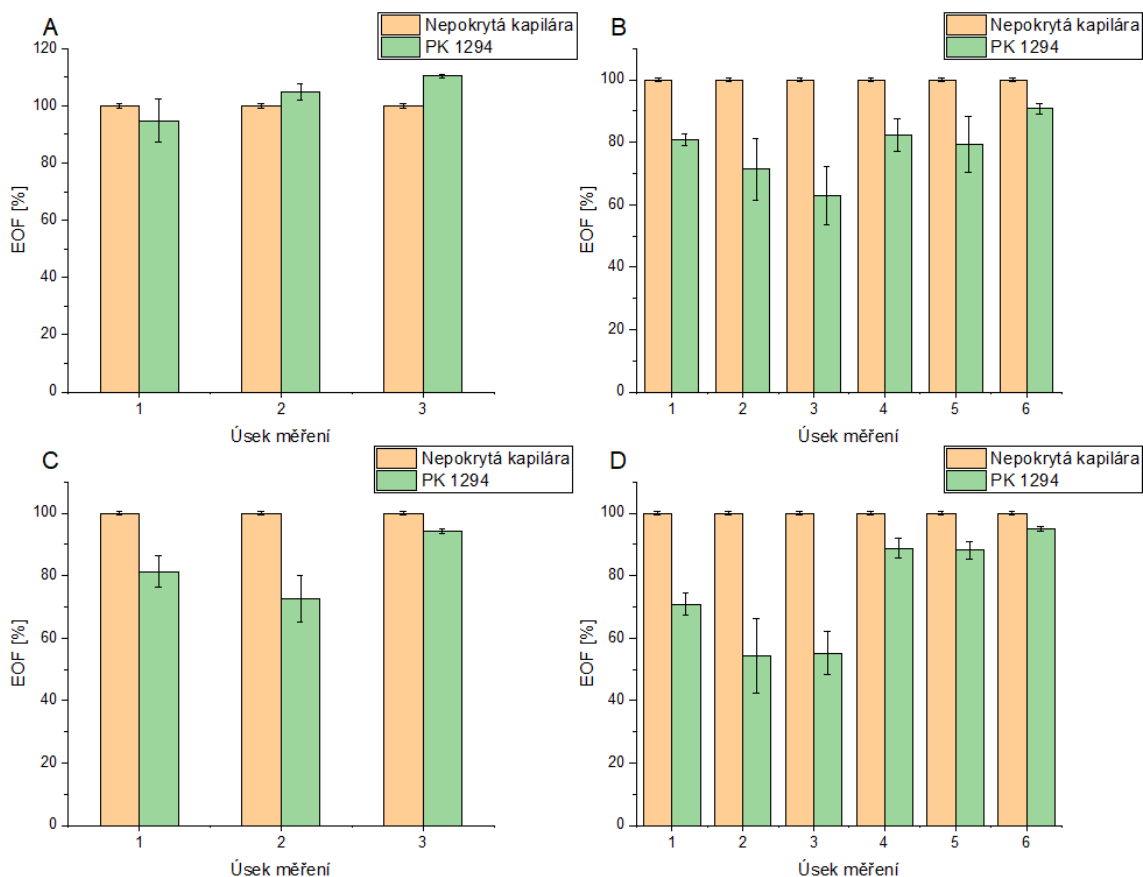
Obr. 4.13 – znázornění chemické struktury kotvy PK 1294

##### 4.5.1 Kotva PK 1294 v borátovém pufru

Porovnání hodnot změny EOF při použití jednotlivých metod oproti nepokryté kapiláře je znázorněno na Obr. 4.14.

Pokrytí vytvořené Metodou I vykazovalo slabou schopnost potlačovat EOF, jak lze pozorovat na Obr. 4.14a. Po prvním měření došlo k poklesu na 82,3 % původní hodnoty. V průběhu sekvence dvaceti měření bylo pozorováno postupné zrychlování až na konečných 114,3 % původní hodnoty. Jednorázové promytí kapiláry roztokem kotvy nebylo dostatečné pro její adsorpci a postupně docházelo k jejímu vymývání.

Opakovaným promýváním kapiláry roztokem kotvy (Metoda II) nedošlo k výraznému zlepšení vlastností výsledného pokrytí. EOF byl po prvním měření potlačen na 86,5 % své původní hodnoty. V průběhu sekvence čtyřiceti měření byl pozorován trend skokových nárůstů hodnot EOF po výměně BGE. Po posledním měření byl zaznamenán EOF na 91,7 % své původní hodnoty. Vzhledem k výkyvům v průběhu měření, které snižovaly stabilitu výsledného pokrytí, tuto metodu nelze vyhodnotit jako vhodnou.



**Obr. 4.14** - Grafické znázornění procentuální změny EOF při pokrytí kapiláry PK 1294 v prostředí borátového pufru oproti nepokryté kapiláře. Hodnoty jsou uvedeny ve formě mediánu pro daný úsek měření. Graf A – Jednorázové pokrytí PK 1294 (Metoda I), Graf B – Pokrytí PK 1294 před začátkem každého měření (Metoda II), Graf C – Jednorázové pokrytí PK 1294 s následnou aplikací napětí 20 kV (Metoda III), Graf D – Pokrytí PK 1294 s následnou aplikací napětí 20 kV před začátkem každého měření (Metoda IV). Úsek 1 odpovídá měření 1-5, úsek 2 měření 8-12, úsek 3 měření 16-20, úsek 4 měření 22-26, úsek 5 měření 28-32 a úsek 6 měření 36-40.

V porovnání s Metodou I nedokázala jednorázová aplikace napětí 20 kV (Metoda III) výrazně zlepšit vlastnosti výsledného pokrytí. Při prvním měření byl EOF

potlačen na 86,7 % původní hodnoty. Následoval krátký pokles na 75,2 %, jak lze pozorovat na Obr. 4.14c. Po výměně BGE se EOF začal skokově zrychlovat až na konečných 96,2 % původní hodnoty. Kotva se pravděpodobně nedokázala dostatečně adsorbovat na stěnu kapiláry a byla postupně vymývána.

Opakované promývání kapiláry roztokem kotvy a následná aplikace napětí 20 kV (Metoda IV) poskytlo velmi podobné výsledky v porovnání s Metodou II. Prvotní potlačení EOF činilo 73,3 % původní hodnoty. V průběhu sekvence čtyřiceti měření byl pozorován trend skokových nárůstů hodnot EOF po výměně BGE. Po posledním měření byl zaznamenán EOF na 97 % své původní hodnoty. Je dobré podotknout, že i když trendy pozorované v průběhu měření pomocí Metody II a IV byly podobné, naměřené hodnoty u Metody IV podléhaly většímu množství nepravidelných výchylek a skokových změn. Z toho lze usoudit, že opakovaná aplikace napětí mohla narušovat strukturu vzniklého pokrytí a tím ještě více snižovat jeho stabilitu.

Na základě provedených experimentů lze konstatovat, že PK 1294 není v prostředí borátového pufru vhodná pro tvorbu pokrytí v kapilární elektroforéze. Důvody jsou nízká stabilita a postupné vymývání kotvy v každé z provedených sekvencí. Skoková urychlení EOF po výměně BGE lze vysvětlit tím, že z kapiláry je vymýváno do vialky s BGE malé množství kotvy a jejího protiiontu, čímž dochází k ovlivnění vlastností BGE a následně i EOF.

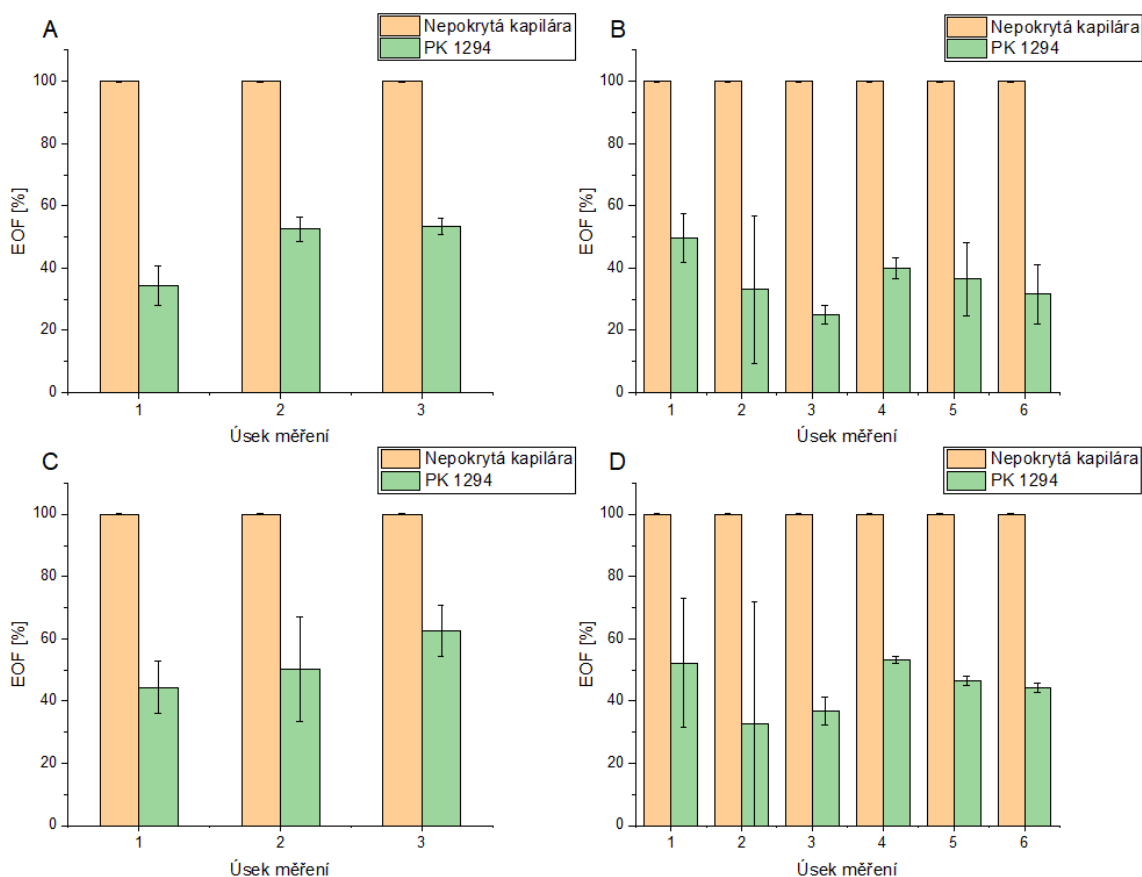
#### **4.5.2 Kotva PK 1294 v HEPES**

Porovnání hodnot změny EOF při použití jednotlivých metod oproti nepokryté kapiláře je znázorněno na Obr. 4.15.

Jednorázovým promytím kapiláry roztokem kotvy (Metoda I) bylo dosaženo potlačení mobility EOF, a to na 30,3 % původní hodnoty. Následná měření vykazovala poměrně dobrou stabilitu, která byla však narušena skokovým nárůstem EOF na 53,7 % původní hodnoty po výměně BGE. Toto zrychlení bylo opět následováno úsekem deseti měření o vysoké stabilitě, až na koncových 52,1 % po dvacátém měření v sekvenci.

Při opakovaném promývání kapiláry roztokem kotvy (Metoda II) byl pozorován trend střídání prudkých nárůstů a poklesů mobility EOF po výměně BGE, jak lze pozorovat na Obr. 4.15b. Po prvním měření došlo k potlačení EOF na 52,5 % původní

hodnoty. Následoval prudký pokles na 24,6 % během deseti měření a skokový nárůst na 38,7 % po výměně BGE. Obdobné chování doprovázelo zbytek měření až do konce sekvence. Při čtyřicátém měření, byl zaznamenán EOF na 27,5 % původní hodnoty. Opakovaná aplikace kotvy sice poskytla vyšší efektivitu potlačení EOF, avšak výrazně snížila stabilitu výsledného pokrytí.



**Obr. 4.15** - Grafické znázornění procentuální změny EOF při pokrytí kapiláry PK 1294 v prostředí HEPES oproti nepokryté kapiláře. Hodnoty jsou uvedeny ve formě mediánu pro daný úsek měření. Graf A – Jednorázové pokrytí PK 1294 (Metoda I), Graf B – Pokrytí PK 1294 před začátkem každého měření (Metoda II), Graf C – Jednorázové pokrytí PK 1294 s následnou aplikací napětí 20 kV (Metoda III), Graf D – Pokrytí PK 1294 s následnou aplikací napětí 20 kV před začátkem každého měření (Metoda IV). Úsek 1 odpovídá měření 1-5, úsek 2 měření 8-12, úsek 3 měření 16-20, úsek 4 měření 22-26, úsek 5 měření 28-32 a úsek 6 měření 36-40.

Jednorázová aplikace napětí 20 kV (Metoda III) zhoršila stabilitu výsledného pokrytí. Obdobně jako u Metody I byl pozorován skokový nárůst po výměně BGE. Avšak v případě Metody III byla i zbylá měření v sekvenci doprovázena pozvolným

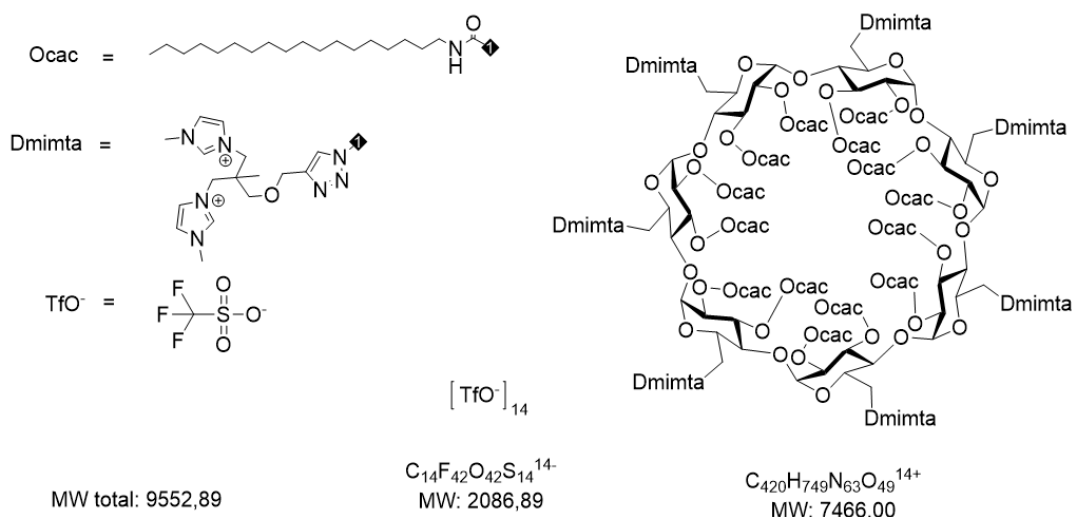
urychlováním EOF, jak lze pozorovat na Obr. 4.15c. Prvotní potlačení činilo 37,7 % původní hodnoty. Po dvaceti měřeních byl zaznamenán EOF na 55,9 % původní hodnoty.

I při použití Metody IV byly pozorovány skokové nárůsty EOF po výměně BGE. Na rozdíl od Metody II však k tomuto trendu docházelo pouze u prvních dvaceti měření v sekvenci, jak lze pozorovat na Obr. 4.15d. Prvotní potlačení EOF činilo 61,2 % původní hodnoty. Po dvaceti měřeních došlo ke stabilizaci pokrytí a hodnota EOF odpovídala 50,2 % původní hodnoty. Po zbytek experimentu nebyly pozorovány výraznější výkyvy a sekvence byla zakončena na 43,6 % z původní hodnoty EOF. Lze předpokládat, že kotva se na kapiláru adsorbovala postupně a opakovaná aplikace napětí pomohla zlepšit stabilitu výsledného pokrytí oproti Metodě II.

Na základě provedených experimentů lze konstatovat, že PK 1294 není v prostředí HEPES vhodná pro tvorbu pokrytí v kapilární elektroforéze. Důvodem je nekonzistentní stabilita všech vytvořených pokrytí. Skoková urychlení EOF po výměně BGE lze vysvětlit tím, že z kapiláry je vymýváno do vialky s BGE malé množství kotvy a jejího protiiontu, čímž dochází k ovlivnění vlastností BGE a následně i EOF.

#### 4.6 Kotva PK 1281

Kotva PK 1281 se řadí do skupiny cyklodextrinových kotev. Její chemická struktura je znázorněna na Obr. 4.16. Experimenty byly provedeny ve všech výše zmíněných pufrch.



Obr. 4.16 – znázornění chemické struktury kotvy PK 1281

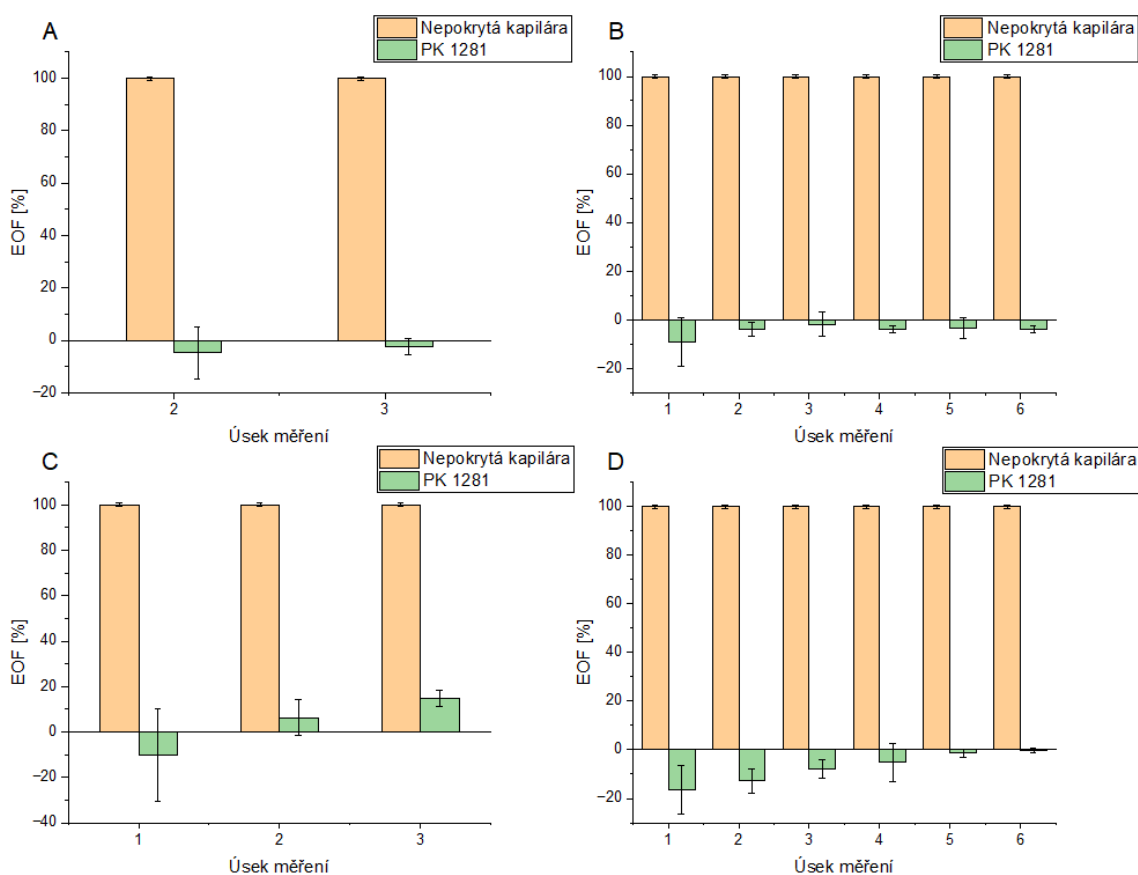
Po aplikaci postupu popsaného v kapitole 2 nebyly na výsledných elektroferogramech pozorovány žádné píky. Problém nebyl vyřešen ani prodloužením časového rozsahu jednotlivých měření z 15 na 30 minut. Proto byl zmíněný postup pro experimenty s PK 1281 upraven. Po nadávkování vzorku byl kromě aplikovaného napětí 20 kV přidán i tlak 50 mbar na vstupním konci kapiláry. Díky aplikaci tlaku projde neutrální marker detektorem i v případě nulového EOF. Zbytek postupu zůstal nezměněn. Aby nedošlo k znehodnocení získaných výsledků, přítomnost tlaku byla zohledněna přepočtem. Od rychlosti EOF byla odečtena rychlost tlakem poháněného toku v kapiláře s daným BGE bez aplikace napětí 20 kV. Z důvodu absence elektrického pole nelze v tomto případě pro výpočet použít mobilitu. Rychlost tlakem poháněného toku činila  $2,03 \cdot 10^{-8} \pm 0,01 \cdot 10^{-8} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$  (RSD = 0,45, n = 5) pro borátový pufr,  $1,99 \cdot 10^{-8} \pm 0,01 \cdot 10^{-8} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$  (RSD = 0,45, n = 5) pro fosfátový pufr a  $2,00 \cdot 10^{-8} \pm 0,03 \cdot 10^{-8} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$  (RSD = 1,50, n = 5) pro HEPES.

#### 4.6.1 Kotva PK 1281 v borátovém pufru

Porovnání hodnot změny EOF při použití jednotlivých metod oproti nepokryté kapiláře je znázorněno na Obr. 4.17.

Kotva byla díky svému kladnému náboji schopna otáčet směr EOF. Tato vlastnost se projevovala u všech použitých metod měření. Při jednorázovém promytí kapiláry roztokem kotvy (Metoda I) nebyly zprvu zaznamenány při prvních pěti měřeních žádné píky. Z tohoto důvodu chybí v Obr. 4.17a úsek 1. Při šestém měření byl zaznamenán EOF na -1,65 % původní hodnoty. Byl pozorován trend skokového urychlení a následného zpomalení anodického EOF po výměně BGE. Po dvaceti měřeních byla zaznamenána konečná hodnota EOF 0,04 %. Výsledné pokrytí dokázalo potlačit EOF nejlépe ze všech testovaných možností a zároveň vykazovalo poměrně dobrou stabilitu.

Opakované promývání kapiláry roztokem kotvy (Metoda II) přineslo oproti Metodě I zvýšení účinnosti obrácení EOF. Po prvním měření došlo ke změně EOF na -11 % původní hodnoty. Během dalších dvou měření došlo k zpomalení anodického EOF na -5,6 %. Po zbytek sekvence čtyřiceti měření nebyly zaznamenány výraznější výkyvy. Po posledním měření byl EOF na -4,1 % původní hodnoty. Vzhledem k dobré stabilitě vzniklého pokrytí byla Metoda II vyhodnocena jako jeden z nejvhodnějších postupů zkoumaných v této práci.



**Obr. 4.17** - Grafické znázornění procentuální změny EOF při pokrytí kapiláry PK 1281 v borátovém pufru oproti nepokryté kapiláře. Hodnoty jsou uvedeny ve formě mediánu pro daný úsek měření. Graf A – Jednorázové pokrytí PK 1281 (Metoda I), Graf B – Pokrytí PK 1281 před začátkem každého měření (Metoda II), Graf C – Jednorázové pokrytí PK 1281 s následnou aplikací napětí 20 kV (Metoda III), Graf D – Pokrytí PK 1281 s následnou aplikací napětí 20 kV před začátkem každého měření (Metoda IV). Úsek 1 odpovídá měření 1-5, úsek 2 měření 8-12, úsek 3 měření 16-20, úsek 4 měření 22-26, úsek 5 měření 28-32 a úsek 6 měření 36-40.

Jednorázová aplikace napětí 20 kV (Metoda III) výrazně zhoršila stabilitu výsledného pokrytí. EOF byl po prvním měření modifikován na  $-16,1\%$  původní hodnoty. V průběhu sekvence dvaceti měření bylo pozorováno obrácení EOF do původního směru a jeho mobilita skončila na  $16,7\%$ . Původní hodnoty Kotva se nedokázala dostatečně adsorbovat na stěnu kapiláry a postupně docházelo k jejímu vymývání.

Opakované promývání kapiláry roztokem kotvy a následná aplikace napětí 20 kV (Metoda IV) vykazovalo velmi podobné chování jako Metoda III. EOF byl nejprve

modifikován na  $-18,7\%$  původní hodnoty. V průběhu sekvence čtyřiceti měření došlo postupně až k téměř úplnému potlačení EOF. Po posledním měření odpovídala jeho hodnota  $0,01\%$ . Kotva se obdobně jako u Metody III pravděpodobně nedokázala dostatečně adsorbovat na stěnu kapiláry. EOF však díky opakovanému promývání roztokem kotvy nepodléhal tak rychlým změnám, jako v případě Metody III.

Na základě provedených experimentů lze konstatovat, že v prostředí borátového pufru je pro tvorbu pokrytí pomocí PK 1281 vhodná pouze Metoda II, která poskytuje stabilní pokrytí schopné otáčet směr EOF.

#### **4.6.2 Kotva PK 1281 v HEPES**

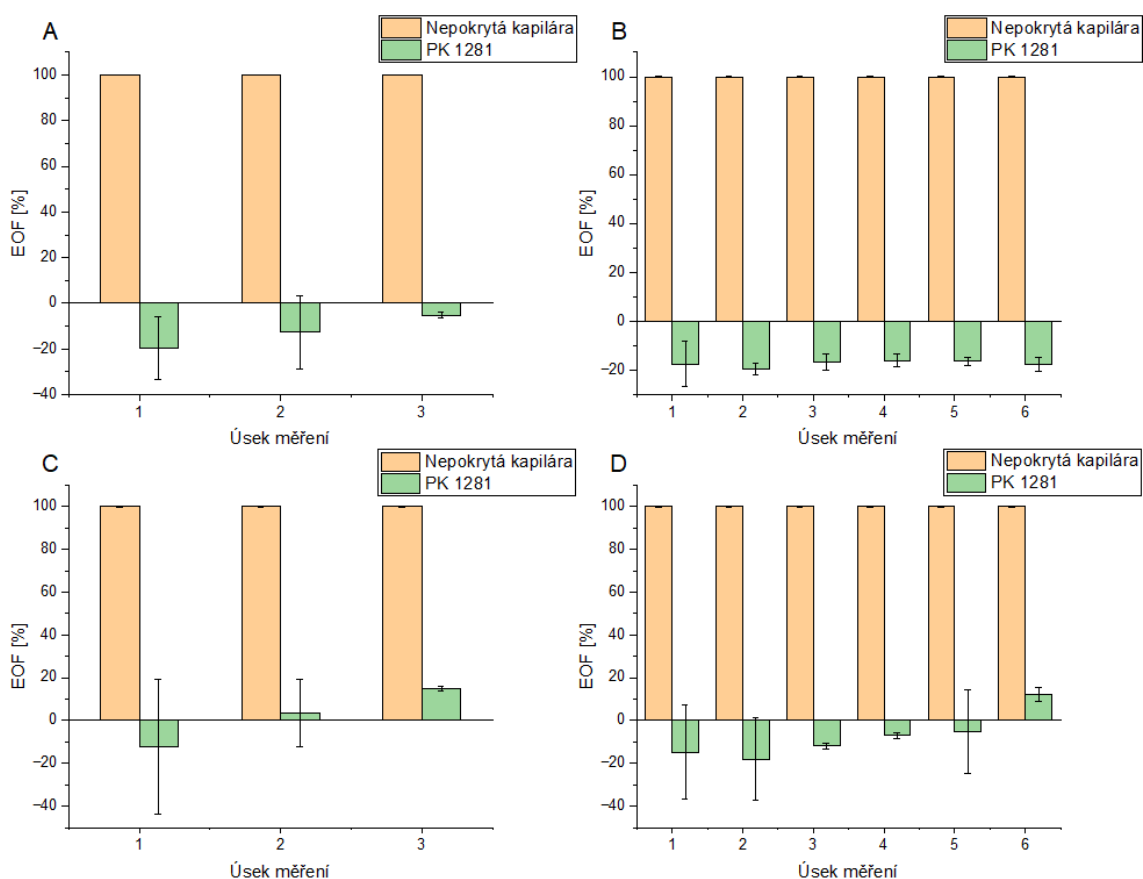
Porovnání hodnot změny EOF při použití jednotlivých metod oproti nepokryté kapiláře je znázorněno na Obr. 4.18.

Při jednorázovém promytí kapiláry roztokem kotvy (Metoda I) bylo získáno nepřilíš stabilní pokrytí se schopností otáčet směr EOF. Po prvním měření došlo k modifikaci EOF na  $-22,8\%$  původní hodnoty. V průběhu sekvence dvaceti měření byla pozorována postupná změna až na konečných  $-5,4\%$ . Jednorázové promytí pravděpodobně nestačilo na dostatečnou adsorpci kotvy na stěnu kapiláry a postupně docházelo k jejímu vymývání.

Opakované promývání kapiláry roztokem kotvy (Metoda II) dokázalo v porovnání s Metodou I výrazně zlepšit stabilitu výsledného pokrytí. Nedochozelo k vymývání kotvy z kapiláry a nebyly zaznamenány výraznější výkyvy v průběhu celé sekvence čtyřiceti měření, jak lze pozorovat na Obr. 4.18b. Prvotní modifikace EOF činila  $-15,3\%$  původní hodnoty. Koncová hodnota byla stanovena na  $-18,5\%$ . Metoda II byla vyhodnocena jako jedna z nejlepších metod tvorby pokrytí testovaných v této práci. Důvodem je vysoká stabilita vytvořeného pokrytí a jeho schopnost otáčet směr EOF.

Jednorázová aplikace napětí 20 kV (Metoda III) měla negativní důsledky na stabilitu výsledného pokrytí. Po prvním měření byla, obdobně jako u Metody I, zaznamenána modifikace EOF na  $-21,7\%$  původní hodnoty. Stabilita pokrytí byla však výrazně horší a po dvaceti měřeních se mobilita EOF změnila až na  $15,8\%$  původní hodnoty. Kotva se díky aplikovanému napětí adsorbovala ještě hůře než v případě Metody I a opět docházelo k postupnému vymývání z kapiláry.





**Obr. 4.18** - Grafické znázornění procentuální změny EOF při pokrytí kapiláry PK 1281 v prostředí HEPES oproti nepokryté kapiláře. Hodnoty jsou uvedeny ve formě mediánu pro daný úsek měření. Graf A – Jednorázové pokrytí PK 1281 (Metoda I), Graf B – Pokrytí PK 1281 před začátkem každého měření (Metoda II), Graf C – Jednorázové pokrytí PK 1281 s následnou aplikací napětí 20 kV (Metoda III), Graf D – Pokrytí PK 1281 s následnou aplikací napětí 20 kV před začátkem každého měření (Metoda IV). Úsek 1 odpovídá měření 1-5, úsek 2 měření 8-12, úsek 3 měření 16-20, úsek 4 měření 22-26, úsek 5 měření 28-32 a úsek 6 měření 36-40.

Kombinace opakovaného promývání kapiláry roztokem kotvy a aplikace napětí 20 kV (Metoda IV) také zhoršila stabilitu výsledného pokrytí. Po prvotní modifikaci EOF na  $-6,1$  % původní hodnoty byla celá sekvence doprovázena nepravidelnými výkyvy na obě strany, jak lze pozorovat na Obr. 4.18d. Při posledních šesti měřeních se EOF obrátil do původního směru a jeho mobilita skončila po čtyřiceti měřeních na 12,4 %. Metody III a IV demonstrovaly, že aplikace napětí je pro tvorbu pokrytí pomocí PK 1281 v HEPES

nevhodná. V případě Metody IV pravděpodobně docházelo opakovanou aplikací k narušování struktury výsledného pokrytí a výraznému snížení stability.

Na základě provedených experimentů lze konstatovat, že pro tvorbu pokrytí v HEPES pomocí kotvy PK 1281 je vhodná pouze Metoda II, která poskytuje vysoce stabilní pokrytí schopné otáčet směr EOF

#### **4.6.3 Kotva PK 1281 ve fosfátovém pufru**

Porovnání hodnot změny EOF při použití jednotlivých metod oproti nepokryté kapiláře je znázorněno na Obr. 4.19.

Jednorázové promytí kapiláry roztokem kotvy (Metoda I) vykazovalo dobrou schopnost potlačit EOF. Po prvním měření došlo k jeho poklesu na 2,5 % původní hodnoty. V průběhu sekvence dvaceti měření docházelo k urychlování až na konečných 28,8 %. Byl pozorován skokový nárůst EOF po výměně BGE. Metoda I není vhodná pro tvorbu pokrytí v kapilární elektroforéze z důvodu snížené stability výsledného pokrytí.

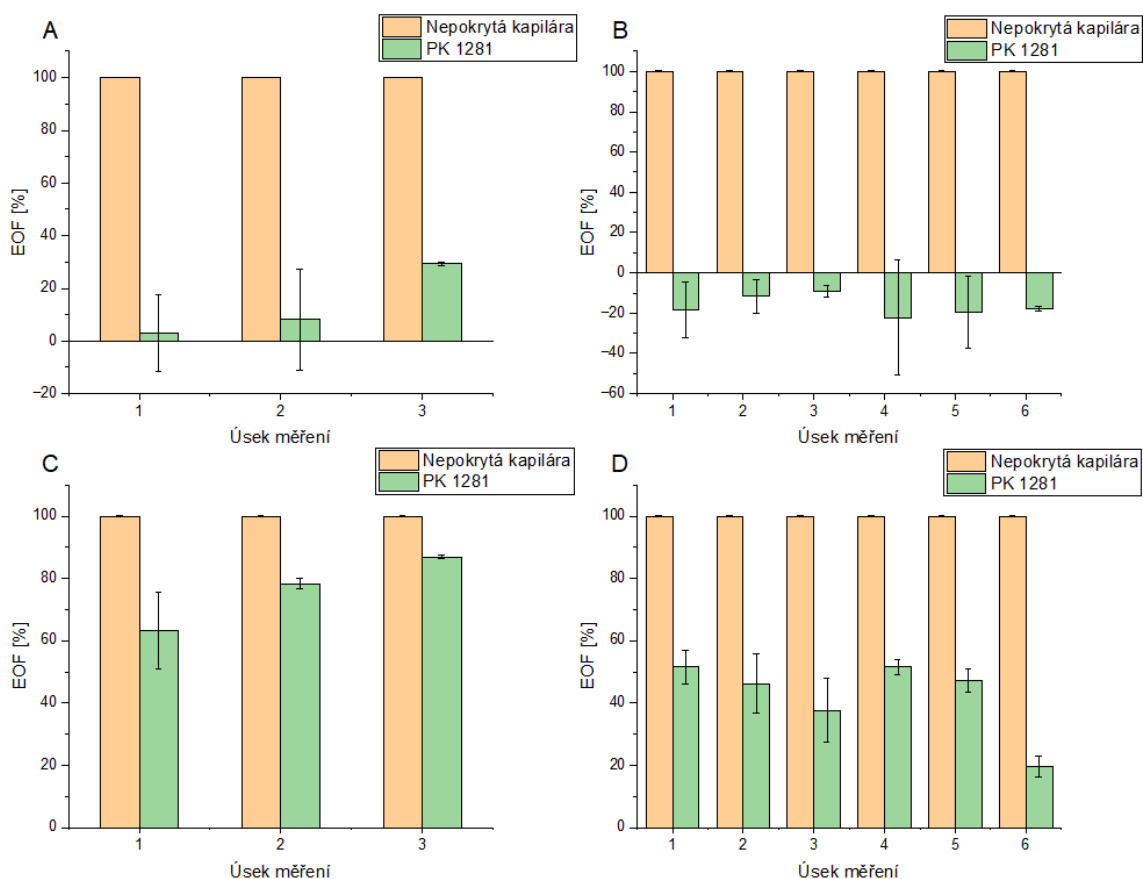
Opakované promývání kapiláry roztokem kotvy (Metoda II) dokázalo otočit směr EOF. Po prvním měření došlo k jeho modifikaci na -25,8 % původní hodnoty. V průběhu sekvence čtyřiceti měření byla zaznamenána řada skokových výkyvů bez náznaku jakéhokoliv trendu. Konečná hodnota EOF činila -17,4 %. Kotva se pravděpodobně nebyla schopna dostatečně adsorbovat na stěnu kapiláry. Metoda II je z tohoto důvodu nevhodná pro tvorbu pokrytí.

Jednorázová aplikace napětí (Metoda III) výrazně snížila schopnost pokrytí potlačovat EOF, a to na 36,6 % původní hodnoty po prvním měření. Následovalo postupné zrychlování EOF až na 87,6 % po dvacátém měření. Kotva se nedokázala dostatečně adsorbovat na stěnu kapiláry a docházelo k jejímu vymývání.

Opakované promývání kapiláry roztokem kotvy a aplikace napětí 20 kV (Metoda IV) dokázalo potlačit vymývání kotvy z kapiláry za cenu drastického snížení stability výsledného pokrytí, jak lze pozorovat na Obr. 4.19d. Mobilita EOF se z prvotních 51,8 % během sekvence čtyřiceti měření propadla až na 19,7 % původní hodnoty. Během celé sekvence byly pozorovány skokové změny v hodnotách EOF bez náznaku jakéhokoliv trendu. Opakovaná aplikace napětí pravděpodobně narušila

strukturu výsledného pokrytí a výrazně snížila jeho stabilitu. Metoda IV je z tohoto důvodu naprosto nevhodná pro tvorbu pokrytí v kapilární elektroforéze.

Na základě provedených experimentů lze konstatovat, že kotva PK 1281 není v prostředí fosfátového pufru vhodná pro tvorbu pokrytí v kapilární elektroforéze. Všechny použité metody poskytly pokrytí, která sice dokázala potlačit EOF, avšak vykazovala vysokou míru nestability.



**Obr. 4.19** - Grafické znázornění procentuální změny EOF při pokrytí kapiláry PK 1281 ve fosfátovém pufru oproti nepokryté kapiláře. Hodnoty jsou uvedeny ve formě mediánu pro daný úsek měření. Graf A – Jednorázové pokrytí PK 1281 (Metoda I), Graf B – Pokrytí PK 1281 před začátkem každého měření (Metoda II), Graf C – Jednorázové pokrytí PK 1281 s následnou aplikací napětí 20 kV (Metoda III), Graf D – Pokrytí PK 1281 s následnou aplikací napětí 20 kV před začátkem každého měření (Metoda IV). Úsek 1 odpovídá měření 1-5, úsek 2 měření 8-12, úsek 3 měření 16-20, úsek 4 měření 22-26, úsek 5 měření 28-32 a úsek 6 měření 36-40.

## 4.7 Srovnání výsledků

### 4.7.1 Srovnání použitých metod

Na základě provedených měření lze konstatovat, že žádná z kotev nevykazovala extrémně silnou adsorpci na stěnu kapiláry. Metoda jednorázového pokrývání byla proto shledána jako nevhodná, protože při jejím použití obvykle docházelo k postupnému vymývání pokrytí z kapiláry. Opakované promývání kapiláry roztokem kotvy poskytlo nejvíce pozitivních výsledků ze všech použitých metod, díky vysoké stabilitě výsledných pokrytí a dobré modifikaci EOF. Nejlepších výsledků bylo touto metodou dosaženo u kotev PK 941 v borátovém pufru, PK 1291 ve fosfátovém pufru a PK 1281 v prostředí HEPES. První dvě zmiňované kotvy poskytly pokrytí o solidní stabilitě s dobrou schopností modifikovat EOF. PK 1281 navíc obracela směr EOF. Jednorázová aplikace napětí ve většině případů zlepšila schopnost výsledných pokrytí potlačovat EOF za cenu snížené stability. Kombinace opakovaného promývání kapiláry roztokem kotvy a následné aplikace napětí měla ve většině případů za následek destabilizaci výsledných pokrytí. Jediné dvě výjimky tvořily kotvy PK 941 a PK 1281 v borátovém pufru. U první jmenované bylo pozorováno vysoce stabilní pokrytí s ještě lepší schopností potlačit EOF než v případě výše zmíněného opakovaného promývání bez aplikace napětí. Pokrytí tvořené PK 1281 vykazovalo dobrou stabilitu, otáčelo směr EOF a přiblížilo se až k úplnému potlačení EOF.

### 4.7.2 Srovnání kotev

Kotva PK 1291, jejíž chemická struktura sestává z jedné kladně nabitě aminoskupiny navázané na neopentanovou kostru, obecně neposkytovala pokrytí schopná účinně potlačit EOF. Zejména v borátovém pufru bylo naopak pozorováno zvýšení EOF oproti původní hodnotě až o desítky procent. Jedinou výjimkou bylo opakované promývání kapiláry roztokem kotvy ve fosfátovém pufru, kdy bylo získáno poměrně stabilní pokrytí schopné potlačit EOF na přibližně 64 % původní hodnoty.

Kotva PK 941, jejíž chemická struktura sestává ze dvou kladně nabitých aminoskupin navázaných na neopentanovou kostru, se osvědčila jako nejlepší zástupce ze všech testovaných kotev neopentylového typu. Nejlepších výsledků bylo dosaženo v borátovém pufru pomocí Metody II a IV. V obou případech bylo získáno velmi stabilní pokrytí s dobrou schopností potlačovat EOF. V prostředí fosfátového pufru a HEPES bylo

sice dosaženo účinnějšího potlačení EOF oproti PK 1291, z důvodu snížené stability však tato pokrytí nelze vyhodnotit jako vhodná.

Kotva PK 1300, jejíž chemická struktura sestává ze tří kladně nabitých aminoskupin navázaných na neopentanovou kostru, byla vyhodnocena jako nevhodná pro tvorbu pokrytí v kapilární elektroforéze. Jednotlivá pokrytí sice dokázala poměrně účinně potlačovat EOF, avšak žádná z nich nevykazovala velkou míru stability. Ve většině případů bylo pozorováno postupné vymývání kotvy z kapiláry.

Kotva PK 1294, jejíž chemická struktura sestává ze tří kladně nabitých pyridinových jader navázaných na neopentanovou kostru, byla vyhodnocena jako nevhodná pro tvorbu pokrytí v kapilární elektroforéze. Získaná pokrytí byla schopna potlačovat EOF, avšak v porovnání s ostatními kotvami vykazovala nejhorší stabilitu. Příčinou pozorovaného chování by mohly být sterické důvody. Pyridinová jádra jsou méně flexibilní a objemnější než aminoskupiny.

Kotva PK 1281 se řadí do kategorie cyklodextrinových kotev. Měření s touto kotvou poskytla daleko lepší výsledky než v případě kotev neopentylových. Pokrytí vytvořená především v borátovém pufru a prostředí HEPES vykazovala schopnost otáčet směr EOF. Zejména opakované promývání kapiláry roztokem kotvy poskytlo v těchto pufrách velmi stabilní a účinná pokrytí. Pozorované chování lze odůvodnit velkým množstvím kladných nábojů přítomných v chemické struktuře použité kotvy. Zároveň jsou na cyklodextrinové jádro navázány hydrofobní uhlíkaté řetězce. Kotva se tedy chová jako kationogenní detergent. Látky tohoto druhu se často využívají v kapilární elektroforéze pro jejich dobrou schopnost otáčet směr EOF. Obecně platí, že čím delší je uhlíkatý řetězec daného detergentu, tím účinněji obrací EOF, protože delší řetězce stabilizují pokrytí vzájemnými hydrofobními interakcemi [45].

### **4.7.3 Srovnání pufrů**

Na základě provedených experimentů lze konstatovat, že obecně nejlepších výsledků bylo dosaženo při použití borátového pufru, a to jak z hlediska účinnosti potlačení EOF, tak z hlediska stability. Pokrytí vytvořená v prostředí HEPES také poměrně dobře potlačovala EOF. V porovnání s borátovým pufrům však byl u většiny kotev zaznamenán pokles stability výsledného pokrytí. Fosfátový pufr se neosvědčil téměř v žádném ze

zkoumaných případů. Získaná data naznačují, že fosfátový pufr působí nejagresivněji na pokrytí a jeho použití v kombinaci se zkoumanými kotvami tedy není vhodné.

## 5 Závěr

V této práci bylo testováno, zda je některý z pěti vybraných vzorků kotev vhodný pro tvorbu pokrytí v kapilární elektroforéze. Zkoumána byla stabilita jednotlivých pokrytí a jejich schopnost modifikovat či potlačit EOF. Jako BGE byly použity borátový pufr, fosfátový pufr a HEPES. Na základě provedených měření lze konstatovat, že žádná z kotev nevykazovala extrémně silnou adsorpci na stěnu kapiláry. Z tohoto důvodu se nejlépe osvědčila tvorba pokrytí pomocí opakovaného promývání kapiláry vodným roztokem dané kotvy před každým měřením. Z testovaných kotev poskytla nejlepší výsledky cyklodextrinová kotva PK 1281. Pokrytí vytvořená její opakovanou aplikací v prostředí borátového pufru a HEPES vykazovala velmi dobrou stabilitu a schopnost otáčet směr EOF. Z tohoto důvodu by mohla najít potenciální využití při separaci aniontů. Pozorované chování bylo pravděpodobně zapříčiněno přítomností velkého množství kladných nábojů v molekule a hydrofobních uhlíkatých řetězců navázaných na cyklodextrinové jádro. Zbylé kotvy patřící do skupiny neopentylových kotev se pro tvorbu pokrytí příliš neosvědčily. Nejlepší výsledky poskytla PK 941 obsahující dvě kladně nabitě aminoskupiny navázané na neopentanovou kostru. V prostředí borátového pufru byla její opakovanou aplikací získána pokrytí o dobré stabilitě, a to jak bez aplikace napětí 20 kV, tak i s jeho opakovanou aplikací před každým měřením. Výsledná pokrytí vykazovala schopnost účinně potlačit EOF.

V průběhu testování bylo dále zkoumáno, zda neexistuje korelace mezi chováním trojice kotev PK 1291, PK 941 a PK 1300, jejichž chemické struktury se od sebe lišily pouze v počtu navázaných aminoskupin. Na základě získaných výsledků lze prohlásit, že nebyly pozorovány žádné společné trendy chování.

## Literatura

- [1] Tiselius, A. A new apparatus for electrophoretic analysis of colloidal mixtures. *Trans. Faraday Soc.* **33**, 524–531 (1937).
- [2] Hjertén, S. Free zone electrophoresis. *Chromatogr Rev* **9**, 122–219 (1967).
- [3] Jorgenson, J. W. & Lukacs, K. D. Free-zone electrophoresis in glass capillaries. *Clin Chem* **27**, 1551–1553 (1981).
- [4] Manz, A. *et al.* Planar chips technology for miniaturization and integration of separation techniques into monitoring systems: Capillary electrophoresis on a chip. *J Chromatogr A* **593**, 253–258 (1992).
- [5] Thormann, W. Chapter 2 - Theoretical Principles of Capillary Electromigration Methods. in *Capillary Electromigration Separation Methods* (ed. Poole, C. F.) 21–44 (Elsevier, 2018).
- [6] Shihabi, Z. K. Chapter 3 - Capillary electrophoresis for the determination of drugs in biological fluids. in *Drug Monitoring and Clinical Chemistry* (ed. Hempel, G.) vol. 5 77–94 (Elsevier Science B.V., 2004).
- [7] Tagliaro, F., Manetto, G., Crivellente, F. & Smith, F. P. A brief introduction to capillary electrophoresis. *Forensic Sci Int* **92**, 75–88 (1998).
- [8] Terabe, S. Twenty-five years of micellar electrokinetic chromatography. *Procedia Chem* **2**, 2–8 (2010).
- [9] Watarai, H. Microemulsion Capillary Electrophoresis. *Chem Lett* **20**, 391–394 (1991).
- [10] Weston, Andrea. & Brown, P. R. *High Performance Liquid Chromatography & Capillary Electrophoresis Principles and Practices*. (Elsevier Science, Burlington, 1997).
- [11] Locatelli, M. Advanced Capillary Electrophoresis Techniques in the Analytical Quantification of Drugs, Metabolites and Biomarkers in Biological Samples. *Global Journal of Analytical Chemistry* **1**, 244–261 (2010).
- [12] Rathore, A. S. Joule heating and determination of temperature in capillary electrophoresis and capillary electrochromatography columns. *J Chromatogr A* **1037**, 431–443 (2004).
- [13] Pretorius, V., Hopkins, B. J. & Schieke, J. D. Electro-osmosis: A new concept for high-speed liquid chromatography. *J Chromatogr A* **99**, 23–30 (1974).
- [14] Macka, M. *et al.* Poly(tetrafluoroethylene) separation capillaries for capillary electrophoresis: Properties and applications. *J Chromatogr A* **1039**, 193–199 (2004).
- [15] HUNTER, R. J. Chapter 3 - The Calculation of Zeta Potential. in *Zeta Potential in Colloid Science* (ed. HUNTER, R. J.) 59–124 (Academic Press, 1981).
- [16] Yang, Y., Boysen, R. I. & Hearn, M. T. W. Impact of organic solvents on the resolution of synthetic peptides by capillary electrophoresis. *J Chromatogr A* **1043**, 81–89 (2004).



- [17] Dearie, H. S. *et al.* Characterisation of electroosmotic flow in capillary electrochromatography columns. *J Chromatogr A* **929**, 123–131 (2001).
- [18] Hellqvist, A., Hedeland, Y. & Pettersson, C. Evaluation of electroosmotic markers in aqueous and nonaqueous capillary electrophoresis. *Electrophoresis* **34**, 3252–3259 (2013).
- [19] Martínková, E., Křížek, T., Kubíčková, A. & Coufal, P. Mobilization of electroosmotic flow markers in capillary zone electrophoresis. *Electrophoresis* **42**, 932–938 (2021).
- [20] van de Goor, A. A. M., Wanders, B. J. & Everaerts, F. M. Modified methods for off- and on-line determination of electroosmosis in capillary electrophoretic separations. *J Chromatogr A* **470**, 95–104 (1989).
- [21] Williams, B. A. & Vigh, G. Fast, Accurate Mobility Determination Method for Capillary Electrophoresis. *Anal Chem* **68**, 1174–1180 (1996).
- [22] Tagliaro, F. *et al.* Capillary electrophoresis for the investigation of illicit drugs in hair: determination of cocaine and morphine. *J Chromatogr A* **638**, 303–309 (1993).
- [23] Tagliaro, F., Smyth, W. F., Turrina, S., Deyl, Z. & Marigo, M. Capillary electrophoresis: a new tool in forensic toxicology. Applications and prospects in hair analysis for illicit drugs. *Forensic Sci Int* **70**, 93–104 (1995).
- [24] Soliman, L. C., Hui, Y., Hewavitharana, A. K. & Chen, D. D. Y. Monitoring potential prostate cancer biomarkers in urine by capillary electrophoresis–tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* **1267**, 162–169 (2012).
- [25] Kuroda, N., Nomura, R., Al-Dirbashi, O., Akiyama, S. & Nakashima, K. Determination of methamphetamine and related compounds by capillary electrophoresis with UV and laser-induced fluorescence detection. *J Chromatogr A* **798**, 325–334 (1998).
- [26] Staub, A., Rudaz, S., Saugy, M., Veuthey, J.-L. & Schappler, J. Analysis of hemoglobin-based oxygen carriers by CE-UV/Vis and CE-ESI-TOF/MS. *Electrophoresis* **31**, 1241–1247 (2010).
- [27] Hajba, L. & Guttman, A. Recent advances in column coatings for capillary electrophoresis of proteins. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **90**, 38–44 (2017).
- [28] Horvath, J. & Dolník, V. Polymer wall coatings for capillary electrophoresis. *Electrophoresis* **22**, 644–655 (2001).
- [29] Hayes, M. A., Kheterpal, Indu. & Ewing, A. G. Effects of buffer pH on electroosmotic flow control by an applied radial voltage for capillary zone electrophoresis. *Anal Chem* **65**, 27–31 (1993).
- [30] Sola, L. & Chiari, M. Modulation of electroosmotic flow in capillary electrophoresis using functional polymer coatings. *J Chromatogr A* **1270**, 324–329 (2012).
- [31] Melanson, J. E., Baryla, N. E. & Lucy, C. A. Dynamic capillary coatings for electroosmotic flow control in capillary electrophoresis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **20**, 365–374 (2001).

- [32] Katayama, H., Ishihama, Y. & Asakawa, N. Stable Capillary Coating with Successive Multiple Ionic Polymer Layers. *Anal Chem* **70**, 2254–2260 (1998).
- [33] Kleemiß, M. H., Gilges, M. & Schomburg, G. Capillary electrophoresis of DNA restriction fragments with solutions of entangled polymers. *Electrophoresis* **14**, 515–522 (1993).
- [34] Iki, N. & Yeung, E. S. Non-bonded poly(ethylene oxide) polymer-coated column for protein separation by capillary electrophoresis. *J Chromatogr A* **731**, 273–282 (1996).
- [35] Mandabhusi, R. S. Separation of 4-color DNA sequencing extension products in noncovalently coated capillaries using low viscosity polymer solutions. *Electrophoresis* **19**, 224–230 (1998).
- [36] Assi, K. A., Altria, K. D. & Clark, B. J. Rapid resolution of drugs and related substances with an eCAPTM polyamine coated capillary. *J Pharm Biomed Anal* **15**, 1041–1049 (1997).
- [37] Tsuda, T. Modification of electroosmotic flow with cetyltrimethylammonium bromide in capillary zone electrophoresis. *Journal of High Resolution Chromatography* **10**, 622–624 (1987).
- [38] Gómez, J. E. & Sandoval, J. E. The effect of conditioning of fused-silica capillaries on their electrophoretic performance. *Electrophoresis* **29**, 381–392 (2008).
- [39] Hjertén, S. High-performance electrophoresis: Elimination of electroendosmosis and solute adsorption. *J Chromatogr A* **347**, 191–198 (1985).
- [40] Malik, A., Zhao, Z. & Lee, M. L. Simple method for the preparation of highly efficient polymer-coated capillary electrophoresis columns. *Journal of Microcolumn Separations* **5**, 119–125 (1993).
- [41] Cobb, K. A., Dolnik, Vladislav. & Novotny, Milos. Electrophoretic separations of proteins in capillaries with hydrolytically-stable surface structures. *Anal Chem* **62**, 2478–2483 (1990).
- [42] Kasal, P.; Jindřich, J. Compounds for Modification of Negatively Charged Carrier Surface, Method of Their Preparation and Use Thereof. PCT/CZ2020/050088, November 29, 2019.
- [43] Kolb, H. C., Finn, M. G. & Sharpless, K. B. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angewandte Chemie International Edition* **40**, 2004–2021 (2001).
- [44] Kasal, P. *et al.* Chiral Nafion membranes prepared by strong electrostatic binding of multiply positively charged  $\beta$ -cyclodextrin derivatives for tryptophan racemic mixtures' separation. *Mater Today Commun* **27**, 102234 (2021).
- [45] Lucy, C. A. & Underhill, R. S. Characterization of the Cationic Surfactant Induced Reversal of Electroosmotic Flow in Capillary Electrophoresis. *Anal Chem* **68**, 300–305 (1996).