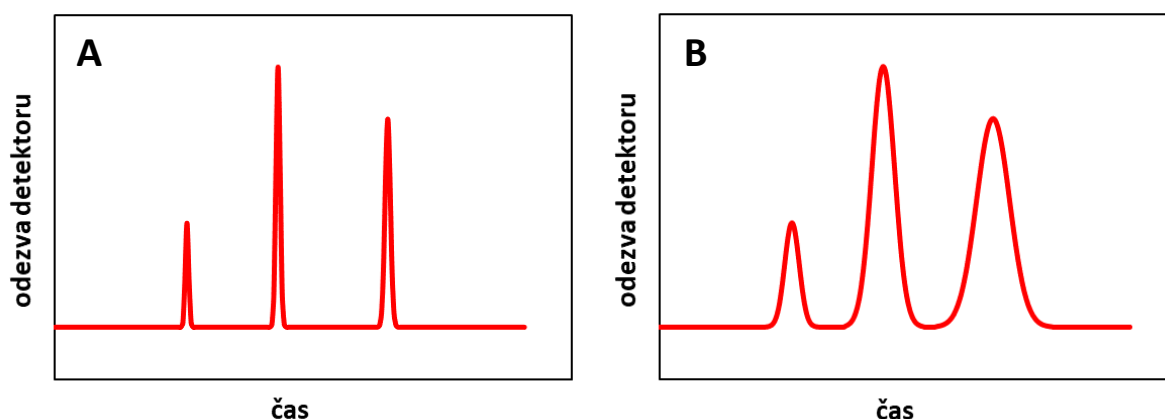


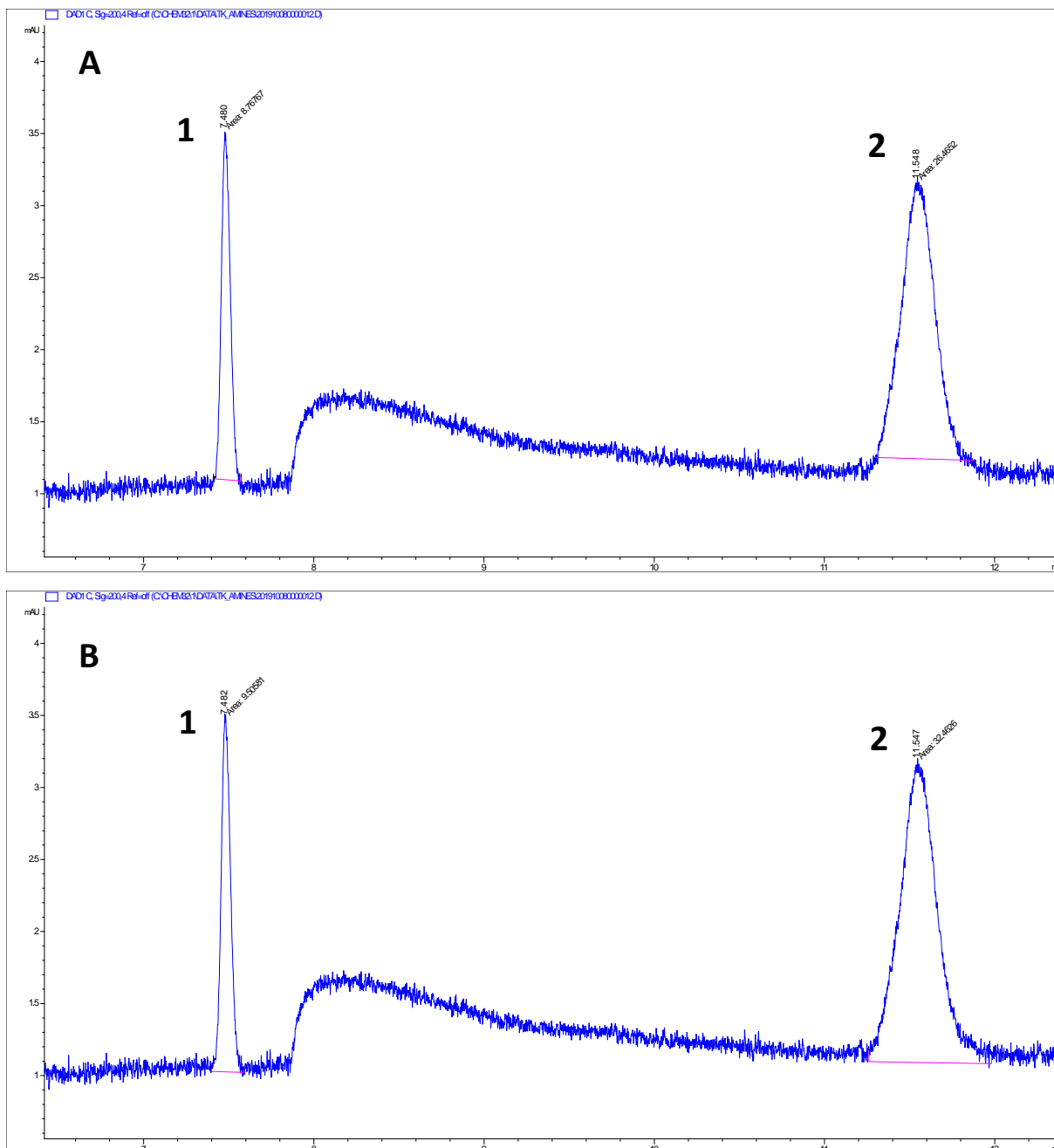
## Účinnost separace aneb proč někomu záleží na tvaru píků

V separačních metodách dáváme přednost píkům, které jsou úzké a vysoké. Nejde jen o nějakou estetickou záležitost, má to své praktické důvody. Mezi ty patří:

1. **Větší rozlišení** – úzké píky nemusejí být na časové ose tak daleko od sebe, aby byly zcela separovány. To je patrné z **Obr. 1**. Vrcholy píků na **Obr. 1A a 1B** jsou od sebe stejně vzdáleny (můžete si to přeměřit pravítkem 😊), díky tomu, že píky na **Obr. 1A** jsou výrazně užší, je mezi nimi prostor, do kterého by se vešlo ještě několik dalších píků. Na **Obr. 1B** jsou píky rovněž rozlišené na základní linii, ale prostoru mezi nimi zbývá jen málo. Účinnější separace na **Obr. 1A** nám dává více manévrovacího prostoru. Můžeme buď zkrátit kapiláru a tím i dobu trvání separace, nebo můžeme separovat ještě další analyty v prostoru mezi stávajícími píky.



2. **Větší citlivost** – na **Obr. 2** vidíme dva píky. Z **Tab. 1** je patrné, že plocha píku 2 je zhruba trojnásobná oproti ploše píku 1. To znamená (pokud předpokládáme, že oba analyty vyvolávají zhruba stejně intenzivní odezvu detektoru), že analyt 2 je zhruba třikrát koncentrovanější než analyt 1. Díky svému tvaru je však pík 2 dokonce o něco nižší než pík 1 a má tedy horší odstup signálu od šumu. Tvar píku zde způsobuje, že měření látky 2 zhruba třikrát méně citlivé než měření látky 1.
3. **Přesnější vyhodnocení** – užší a vyšší píky umožňují rovněž přesnější vyhodnocení jejich plochy. U širšího píku je pozvolnější vzestup signálu na začátku a pozvolnější návrat signálu na základní linii na konci, takže je obtížnější přesně stanovit, kde pík začíná a kde končí. Navíc pokud není příliš velký odstup signálu od šumu, nemusí být vždy jasné, jak píky integrovat. Na **Obr. 2A a 2B** jsou ukázány dva extrémní přístupy k integraci, většinou se volí kompromis mezi nimi. Na **Obr. 2A** je základní linie vedena na horní hranici šumu a získané plochy píků jsou tak o něco menší. Na **Obr. 2B** je základní linie vedena na spodní hranici šumu a plochy píků jsou o něco větší. V **Tab. 1** je vidět, že v případě úzkého a vysokého píku 1 je relativní rozdíl ploch při těchto dvou způsobech integrace 8,0 %, zatímco v případě širšího píku 2 je to 20,4 %. Uvedené dva způsoby integrace jsou extrémní a ve skutečnosti bychom volili nějakou střední cestu, nicméně nám tento příklad hezky ilustruje rozdíl v přesnosti integrace způsobený tvarem píku.



**Obr. 2** Elektroferogramy ilustrující vliv tvaru píku na citlivost měření a přesnost integrace

**Tab. 1** Rozdíly způsobené různými přístupy k integraci píků na **Obr. 2**

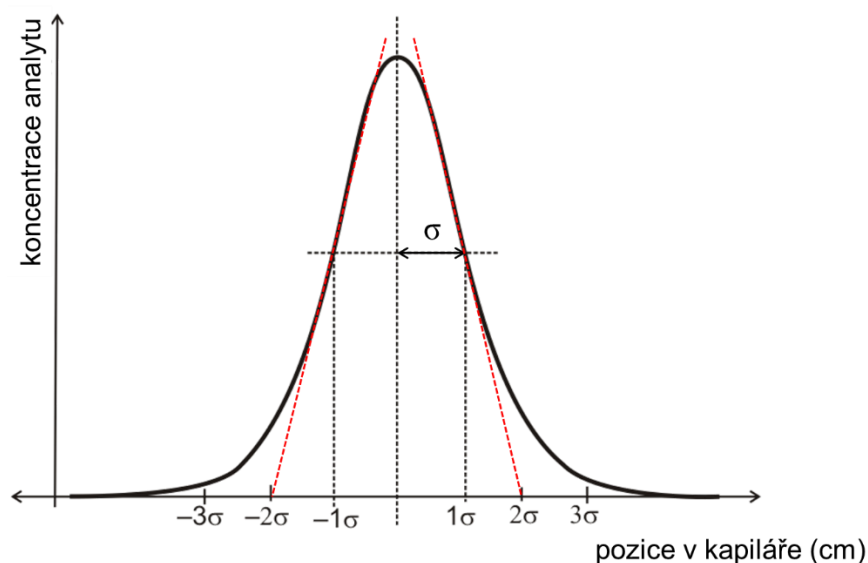
	Plocha Obr. A (mAU·s)	Plocha Obr. B (mAU·s)	Rozdíl (mAU·s)	Rel. rozdíl (%)
Pík 1	8,77	9,50	0,73	8,0
Pík 2	26,46	32,46	6,00	20,4

### Jak kvantifikovat tvar píku

Vyjádření, že lepší jsou píky úzké a vysoké než nízké a široké je poněkud vágní. Na základě tohoto kritéria můžeme nanejvýš vzájemně porovnat dva píky, které vidíme vedle sebe. V rámci odborné literatury je vždy vhodné mít pro daný jev nějaké kvantitativní měřítko, nějakou hodnotu, kterou můžeme objektivně porovnávat mezi různými měřeními. V případě účinnosti separace se uchýlil **model teoretických pater**, který byl převzat z rektifikačních kolon. V některých typech těchto destilačních zařízení se skutečně vyskytují patra, na kterých se vždy ustavuje rovnováha mezi kapalnou a plynnou fází. V separačních metodách k ničemu takovému nedochází, nicméně se ukázalo, že představa teoretických pater, na kterých se vždy ustavuje myšlená rovnováha jednoho separačního kroku, poskytuje vcelku dobré objektivní měřítko účinnosti separace a s ní souvisejícího tvaru píků.

### Jak se vůbec ty píky měří?

První problém je určení šířky píku. Jak je vidět na **Obr. 3**, naměřená křivka se velmi pomalu zvedá od základní linie a velmi pomalu se k ní na konci píku zase vrací. Je tedy prakticky nemožné přesně určit bod, kde se signál od základní linie začne odchylovat. Proto se šířka píku určuje jiným způsobem. Předpokládáme-li Gaussovský tvar píku, pak řeckým písmenem  $\sigma$  můžeme označit pološířku píku v inflexním bodě, jako je to naznačeno na **Obr. 3**. Šířka píku při základně se určuje tak, že se sestrojí tečny v inflexních bodech a tam, kde protnou vodorovnou osu, se odečte šířka píku (označeno červenými přerušovanými čarami). U Gaussovského píku je tato šířka při základně rovna  $4\sigma$ .



**Obr. 3** Elektroforetický pík Gaussovského tvaru a odečet jeho šířky při základně

### Čím víc pater, tím lépe

Účinnost separace při destilaci na rektifikační koloně je tím vyšší, čím více má kolona pater. Analogicky to platí pro teoretická patra v separačních metodách. Čím účinnější je separace, tím více má kapilára teoretických pater. **Počet teoretických pater  $N$**  je definován jako druhá mocnina podílu délky kolony od vstupního konce k detektoru  $l_D$  a pološířky píku v inflexním bodě  $\sigma$ :

$$N = \left(\frac{l_D}{\sigma}\right)^2 \quad (1)$$

Druhým parametrem, pomocí něhož se často vyjadřuje účinnost separace, je **výškový ekvivalent teoretického patra  $H$**  (někdy označovaný také HETP z anglického *height equivalent to the theoretical plate*).  $H$  představuje délku kapiláry, která odpovídá jednomu teoretickému patru. Jeho hodnotu získáme vydělením délky kapiláry k detektoru počtem teoretických pater:

$$H = \frac{l_D}{N} \quad (2)$$

Po dosazení  $N$  z rovn. 1 do rovn. 2 dostaneme:

$$H = l_D \left(\frac{\sigma}{l_D}\right)^2 = \frac{\sigma^2}{l_D} \quad (3)$$

Zatímco délka kapiláry k detektoru je známý parametr, se kterým není problém, s pološířkou píku v cm nebo mm je to složitější, protože naměřené elektroferogramy mají na vodorovné ose čas, nikoli vzdálenost v kapiláře. Proto se pro praktické účely hodnota  $N$  počítá nikoli z poměru délky kapiláry a šířky píku v cm, ale z poměru migračního času píku a pološířky píky v inflexním bodě v minutách, která se získá jako čtvrtina šířky píku při základně  $w$ . Pokud nad tím zauvažujete, zjistíte, že tento poměr musí být shodný. Vzorec pro praktický výpočet je:

$$N = \left(\frac{t_{\text{mig}}}{\sigma}\right)^2 = \left(\frac{t_{\text{mig}}}{\frac{w}{4}}\right)^2 = 16 \left(\frac{t_{\text{mig}}}{w}\right)^2 \quad (4)$$

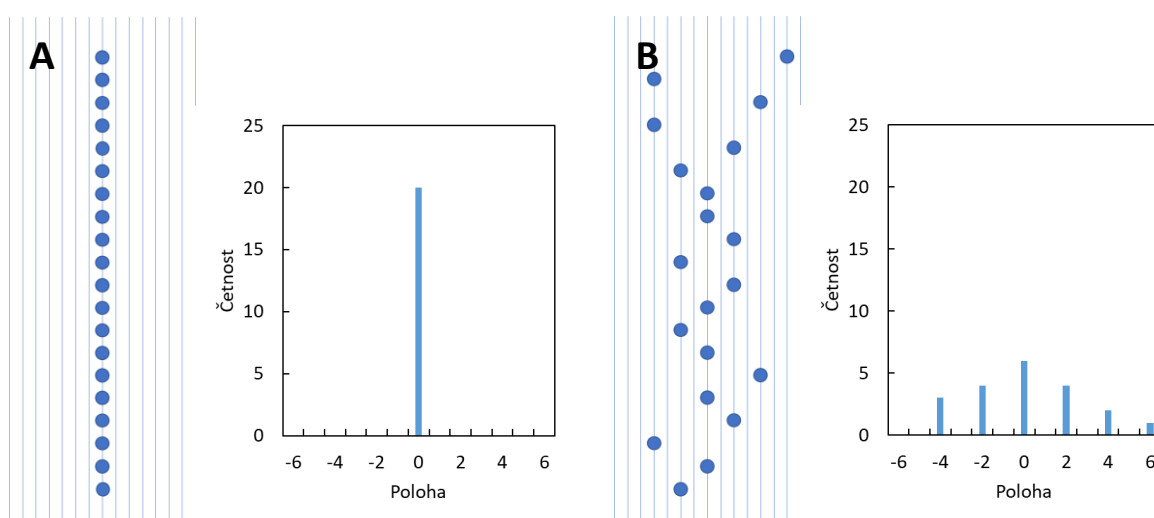
Jak jsme si vysvětlili, z několika důvodů preferujeme píky úzké a vysoké, a tedy separace s vysokou účinností. Proto pokud chceme v elektromigračních metodách dosahovat kvalitních výsledků, měli bychom již při plánování experimentů a vývoji metod dbát na dodržování jistých pravidel, kterými můžeme zamezit zbytečnému rozšiřování zón analytů v průběhu separace.

Pokud dodržíme podmínky, o kterých bude řeč později, k rozšiřování zón analytů během separace bude přispívat především podélná difúze molekul analytu v kapiláře. Difúze je zajímavý jev, udělejme proto malou odbočku a podívejme se na ni blíže.

### Exkurze do difúze aneb jak částice vědí, kam mají difundovat

Difúze probíhá spontánně díky náhodnému Brownovu pohybu částic. Molekuly analytu se z místa, kde je jejich koncentrace vyšší, postupně posouvají do míst, kde je jejich koncentrace nižší. Molekuly samozřejmě nevědí, ve kterém směru klesá koncentrace a kterým směrem se mají pohybovat. Zdrojem difúze je nahodilost Brownova pohybu. Tento mechanismus si můžeme ilustrovat na zjednodušeném příkladu, ve kterém budeme uvažovat pohyb částic pouze ve směru zprava doleva a obráceně. Situace na začátku a konci myšlenkového experimentu je naznačena na **Obr. 4**. Postupný vývoj rozložení částic ilustruje prezentace, která je přiložena k této lekci.

V tomto experimentu vezmeme dvacet částic, které jsou v pravolevém směru na stejné pozici. Budeme uvažovat, že se mohou pohybovat pouze doprava nebo doleva a jejich pohyb je náhodný, takže polovina částic, které se nacházejí na dané pozici, se v každém kroku pohne doprava a druhá polovina doleva. V prvním kroku se deset částic posune o jednu pozici doleva a druhých deset částic o jednu pozici doprava. Máme částice na dvou různých pozicích, na každé z nich jich je deset. Z deseti částic, které se v prvním kroku pohnuly doprava, se pět pohne znovu doprava a druhých pět doleva, zpátky na výchozí pozici. Totéž se stane s částicemi, které se v prvním kroku pohnuly doleva. Po druhém kroku máme uprostřed deset částic a po každé straně pět částic. Během dalších kroků se částice dostávají postupně do čím dál větší vzdálenosti od středu, zpětný náhodný pohyb ale zajišťuje, že ve středu jich je stále největší koncentrace, byť výrazně menší než na začátku. Navenek se tedy zdá, že se částice cíleně pohybují z místa o vysoké koncentraci (uprostřed), do míst o nízké koncentraci (na obou stranách). Ve skutečnosti je však tento pohyb poháněn pouze náhodným pohybem v obou směrech.



**Obr. 4** Rozložení částic (A) na začátku a (B) na konci myšlenkového experimentu ilustrujícího náhodnou povahu difúze, pro zjednodušení pouze v pravolevém směru a po krocích. Více viz prezentaci, která je součástí této lekce.

### Kdyby šlo jen o difúzi...

Vzhledem k tomu, že kapilára je velmi úzká a dlouhá, je proudění kapaliny v ní laminární a nedochází k turbulencím, které by přispívaly k rozšiřování zón analytů. Šířku zóny proto při dodržení podmínek, které budou zmíněny později, určuje především podélná difúze analytů v kapiláře. Z Fickových zákonů a povahy difúze vyplývá, že druhá mocnina pološířky píku v inflexním bodě ( $\sigma^2$ ) je úměrná difúznímu koeficientu analytu  $D$  a době trvání difúze  $t$ :

$$\sigma_{DIF}^2 = 2D \cdot t \quad (5)$$

Je tedy zřejmé, že čím déle difúze probíhá, tím širší bude výsledný pík. Čím vyšší má analyt difúzní koeficient, tím snáze difunduje, proto šířka píku roste i s hodnotou difúzního koeficientu.

V případě elektroforetického píku je doba trvání difúze (doba od začátku separace do okamžiku detekce píku) rovna migračnímu času analytu  $t_{\text{mig}}$ . Z předchozí lekce známe vztah mezi mobilitou a migračním časem:

$$\mu = \frac{l_D \cdot l_C}{U \cdot t_{\text{mig}}} \quad (6)$$

Vyjádřením migračního času z rovn. 6 a dosazením do rovn. 5 získáme:

$$\sigma_{\text{DIF}}^2 = 2D \frac{l_D \cdot l_C}{U \cdot \mu} = \frac{2D \cdot l_D}{E \cdot \mu} \quad (7)$$

Dosazením rovn. 7 do rovn. 1 dostaneme vztah:

$$N = \frac{\mu \cdot U \cdot l_D}{2D \cdot l_C} = \frac{\mu \cdot E \cdot l_D}{2D} \quad (8)$$

Z rovn. 8 je zřejmé, že počet teoretických pater, a tedy účinnost separace, roste s intenzitou elektrického pole. Vyšší intenzita pole znamená rychlejší migraci a tím pádem stráví analyt méně času v kapiláře. Díky tomu je méně času na difúzi. Podobně ionty s větší mobilitou budou migrovat rychleji a nebudou mít tolik času na difúzi. Z rovnice je také patrné, že velké analyty, jako je DNA nebo proteiny, které mají nízké difúzní koeficienty, budou vykazovat menší rozšiřování zón než ionty malé.

Ravn. 8 umožňuje výpočet teoretického maxima účinnosti separace pro daný analyt v kapiláře dané délky a v elektrickém poli dané intenzity. Reálná účinnost je vždy nižší, protože k rozmytí zón přispívají i další procesy a jevy.

### Další přispěvatelé

K celkové disperzi píku, kterou můžeme označit  $\sigma_{\text{TOT}}^2$  může přispívat řada různých jevů. Každému z těchto jevů můžeme přisoudit určitý příspěvek, a tyto příspěvky se společně sčítají.

$$\sigma_{\text{TOT}}^2 = \sigma_{\text{DIF}}^2 + \sigma_{\text{INJ}}^2 + \sigma_{\text{Joule}}^2 + \sigma_{\text{ADS}}^2 + \sigma_{\text{DET}}^2 + \sigma_{\text{EMD}}^2 + \dots \quad (9)$$

Jednotlivé členy v rovn. 8 představují příspěvky:  $\sigma_{\text{DIF}}^2$  – difúze,  $\sigma_{\text{INJ}}^2$  – délky zóny nadávkovaného vzorku,  $\sigma_{\text{TEMP}}^2$  – Jouleova tepla a zahřívání roztoku v kapiláře,  $\sigma_{\text{ADS}}^2$  – adsorpce analytu na stěnu kapiláry,  $\sigma_{\text{DET}}^2$  – velikosti detekční cely,  $\sigma_{\text{EMD}}^2$  – elektromigrační disperze. Do rovnice mohou v závislosti na podmínkách konkrétní separace přibýt i další členy.

### Délka dávkované zóny vzorku

Při dávkování vlastně „zasouváme“ zónu vzorku na začátek kapiláry. Čím více vzorku nadávkujeme, tím větší získáme plochu píku, avšak nesmíme přitom zapomenout, že se tím zároveň prodlouží počáteční zóny všech analytů a jejich rozšiřování difúzí začíná na větší počáteční hodnotě. Je tedy třeba snažit se o to, aby délka dávkované zóny nebyla výrazně větší než disperze způsobená difúzí během separace.

Konkrétní velikost příspěvku dávkování k šířce zóny je vyjádřena vztahem:

$$\sigma_{\text{INJ}}^2 = \frac{l_{\text{INJ}}^2}{12} \quad (10)$$

Hodnota  $l_{\text{INJ}}$  odpovídá délce nadávkované zóny bezprostředně po dávkování. V ideálním případě by příspěvek délky zóny vzorku měl být menší než příspěvek difúze. Z *rovn. 5* vidíme, že

$$l_{\text{INJ}} < \sqrt{2D \cdot t_{\text{mig}}} \quad (11)$$

Požadovaná délka dávkované zóny tedy závisí i na hodnotě difúzního koeficientu analytu. Velké molekuly s malým difúzním koeficientem vyžadují kratší zóny vzorku.

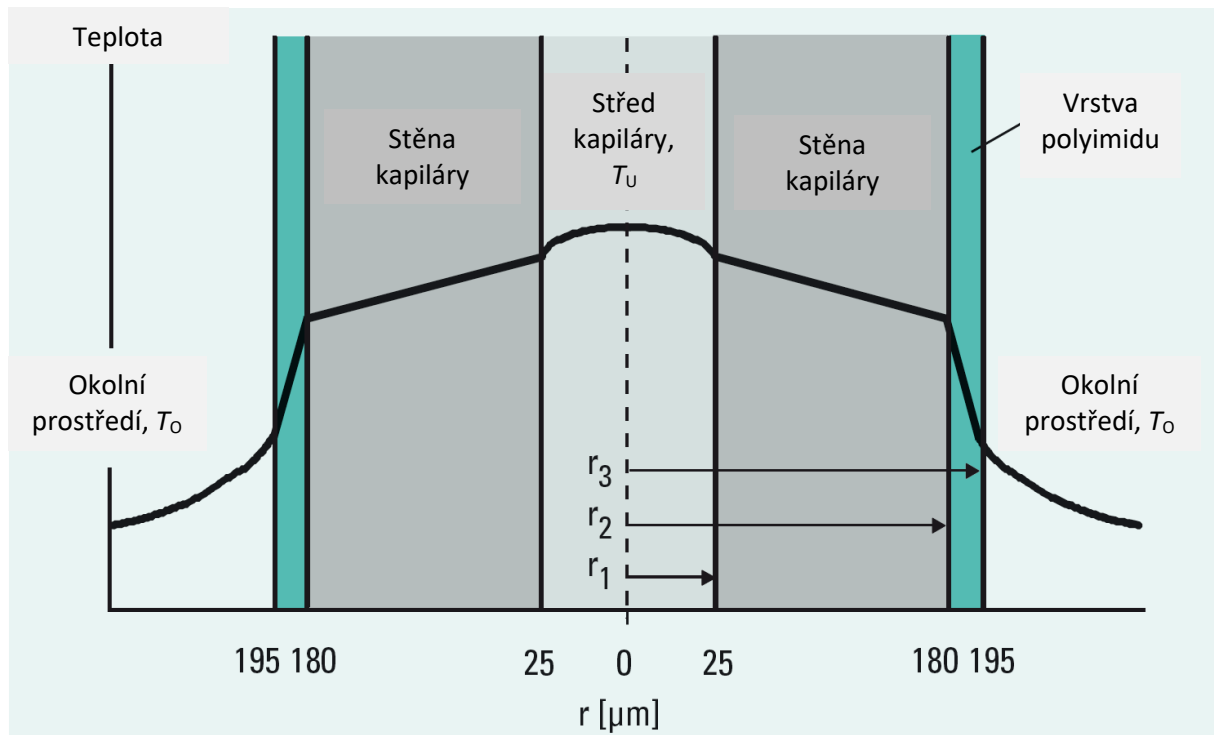
V praxi se pro délku dávkované zóny používá zjednodušené pravidlo, že by neměla být větší než 1-2 % celkové délky kapiláry. Pro kapiláru o délce 50 cm to je 5-10 mm.

### Jouleovo teplo

Problémem, který s sebou automaticky přináší použití separačního systému s procházejícím elektrickým proudem, je vznik tzv. **Jouleova tepla**. Výhodou použití kapilár o velmi malém vnitřním průměru je to, že mají díky malému průřezu velký elektrický odpor a tím pádem je minimalizován procházející proud. Navíc je u nich velký poměr plochy vnitřní stěny a vnitřního objemu, který umožňuje lepší odvod vzniklého tepla a účinnější chlazení.

Pokud je generováno více tepla, než kolik se stihne odvádět, začne se roztok v kapiláře přehřívat. Zahřívání roztoku v celém objemu uvnitř kapiláry by nebylo tak velkým problémem, ve skutečnosti však zahřívání není rovnoměrné. U stěn dochází k účinnějšímu odvodu tepla, takže teplota u stěny narůstá pomaleji než uprostřed kapiláry. Teplotní gradient na průřezu kapilárou (viz **Obr. 5**) způsobuje uvnitř kapiláry rozdíly ve viskozitě roztoku. Tam, kde je vyšší teplota, se snižuje viskozita. Jak víme z předchozí lekce, s viskozitou souvisí i elektroforetická mobilita analytů. Ionty analytů uprostřed kapiláry pak migrují rychleji než ty u stěny, tím jim „utíkají“ a dochází k deformaci zóny, která získává parabolický profil. O tom jsme si minule řekli, že způsobuje snížení účinnosti separace.

Z *rovn. 8* vyplývá, že vyšší účinnosti separace je dosahováno při vyšší intenzitě elektrického pole. Vyšší intenzita pole také vede k rychlejší migraci a kratší době analýzy. Na druhé straně s rostoucí intenzitou pole (a s ní rostoucím proudem) roste i množství generovaného Jouleova tepla, takže při optimalizaci metody musíme volit kompromis.



**Obr. 5** Teplotní profil na průřezu kapilárou způsobený vznikem Jouleova tepla a jeho nedostatečným odvodem.

#### Jak moc se to vlastně zahřeje?

Rozdíl v teplotě uprostřed kapiláry  $T_u$  a teplotě okolního prostředí  $T_o$ , označený jako  $\Delta T$ , je možné vypočítat pomocí poměrně složitějšího vztahu (který si nemusíte pamatovat ☺). Jednotlivé členy v hranaté závorce odpovídají odporu proti prostupu tepla (zleva doprava): v roztoku uvnitř kapiláry, v křemenné stěně kapiláry, v polyamidové vrstvě a v okolním prostředí:

$$\Delta T = \frac{Q \cdot r_1^2}{2} \left[ \frac{1}{2\lambda_1} + \frac{1}{\lambda_2} \ln\left(\frac{r_2}{r_1}\right) + \frac{1}{\lambda_3} \ln\left(\frac{r_3}{r_2}\right) + \frac{1}{r_3} \left(\frac{1}{h}\right) \right] \quad (12)$$

$Q$  je výkonová hustota,  $\lambda_1$  je tepelná vodivost roztoku v kapiláře,  $\lambda_2$  je tepelná vodivost křemene,  $\lambda_3$  je tepelná vodivost polyimidu,  $h$  je koeficient přestupu tepla z kapiláry do okolního prostředí,  $r_1$  je vnitřní poloměr kapiláry,  $r_2$  je vnější poloměr křemenného těla kapiláry a  $r_3$  je vnější poloměr kapiláry včetně polyimidové vrstvy.

Ve většině praktických případů klade největší odpor přestupu tepla rozhraní mezi vnější stěnou kapiláry a okolním prostředím. V celkovém teplotním rozdílu je proto dominantní poslední člen v rovn. 12. Se zanedbáním ostatních členů můžeme rovn. 12. zjednodušit na:

$$\Delta T \cong \frac{Q \cdot r_1^2}{2r_3 \cdot h} = \Delta T_{S-0} \quad (13)$$

V této rovnici je  $\Delta T_{S-0}$  rozdíl teplot mezi vnější stěnou kapiláry a okolím. Vidíme, že rozdíl teplot roste se čtvercem vnitřního poloměru kapiláry  $r_1^2$  a klesá s jejím vnějším poloměrem  $r_3$ . Pro lepší odvod tepla je tedy výhodnější, když má kapilára větší vnější poloměr. Zásadní roli však hraje vnitřní poloměr, který se v rovnici vyskytuje v druhé mocnině. Kapiláry s menším vnitřním poloměrem

poskytují proto daleko lepší odvod tepla. Odvod tepla z vnější stěny kapiláry do okolního prostředí usnadňuje aktivní chlazení kapiláry, ať už termostatovaným vzduchem nebo kapalinou. Jelikož právě tento člen je v celé rovnici nejdůležitější, je chlazení kapiláry zásadní pro účinné a reprodukovatelné separace.

První člen *rovn. 12* popisuje teplotní rozdíl mezi středem kapiláry a její vnitřní stěnou  $\Delta T_{\text{kap}}$  a jeho velikost nám říká, jak velký rozdíl je v teplotě roztoku uprostřed a u stěny kapiláry – jak velký negativní vliv na účinnost Jouleovo teplo bude mít.

$$\Delta T_{\text{kap}} = \frac{Q \cdot r_1^2}{4\lambda_1} = \frac{E \cdot i \cdot d^2}{16\lambda_1} \quad (14)$$

Symbol  $i$  zde značí proudovou hustotu,  $d$  vnitřní průměr kapiláry. I zde, uvnitř kapiláry, roste teplotní rozdíl s druhou mocninou vnitřního poloměru. Tento člen *rovn. 12* proto také poukazuje na výhodnost kapilár menšího vnitřního poloměru. **Tab. 1** tyto zákonitosti ilustruje přehledem vypočtených rozdílů v teplotě pro kapiláry různého vnitřního průměru.

**Tab. 1** Teplotní rozdíly vypočítané pro  $E = 300 \text{ V cm}^{-1}$ ,  $i = 0,6 \text{ A cm}^{-1}$ ,  $T_0 = 25 \text{ °C}$ ,  $h = 50$  – nehybný vzduch v okolí kapiláry,  $h = 250$  – proudící vzduch ( $2 \text{ m s}^{-1}$ ),  $h = 550$  – rychle proudící vzduch ( $10 \text{ m s}^{-1}$ ). Jednotlivé teplotní rozdíly:  $\Delta T_{\text{kap}}$  – mezi středem kapiláry a vnitřní stěnou,  $\Delta T_{\text{křemen}}$  – mezi vnitřní a vnější stěnou křemenné kapiláry,  $\Delta T_{\text{PI}}$  – mezi vnitřní a vnější stranou polyamidové vrstvy,  $\Delta T_{\text{S-O}}$  – mezi vnější stěnou kapiláry a okolním prostředím,  $\Delta T$  – mezi středem kapiláry a vnějším prostředím.  $T_U$  – teplota ve středu kapiláry.

Vnitřní průměr ( $\mu\text{m}$ )	Proud ( $\mu\text{A}$ )	$\Delta T_{\text{kap}}$ ( $^{\circ}\text{C}$ )	$\Delta T_{\text{křemen}}$ ( $^{\circ}\text{C}$ )	$\Delta T_{\text{PI}}$ ( $^{\circ}\text{C}$ )	$\Delta T_{\text{S-O}}$ ( $^{\circ}\text{C}$ )	$\Delta T$ ( $^{\circ}\text{C}$ )	$T_U$ ( $^{\circ}\text{C}$ )
25	11,8	0,05	0,08	0,04	6,0 ( $h = 50$ )	6,2	31,2
					1,2 ( $h = 250$ )	1,4	26,4
					0,6 ( $h = 550$ )	0,8	25,8
50	47,1	0,19	0,19	0,16	24,0 ( $h = 50$ )	24,5	49,5
					4,8 ( $h = 250$ )	5,3	30,3
					2,2 ( $h = 550$ )	2,7	27,7
75	106,0	0,42	0,29	0,37	54,1 ( $h = 50$ )	55,2	80,2
					10,8 ( $h = 250$ )	11,9	36,9
					4,9 ( $h = 550$ )	6,0	31,0

Z **Tab. 1** je dobře patrné, že k celkovému rozdílu mezi středem kapiláry a okolním prostředím  $\Delta T$  přispívá daleko nejvíce člen  $\Delta T_{\text{S-O}}$ , tedy rozdíl mezi vnější stěnou kapiláry a okolním prostředím, jak již bylo zmíněno výše. Tento rozdíl je řádově vyšší než ostatní příspěvky a bez proudění vzduchu může u 75 $\mu\text{m}$  kapiláry dosáhnout hodnoty 55  $^{\circ}\text{C}$ , přičemž roztok uvnitř kapiláry je zahřátý na 80  $^{\circ}\text{C}$ .

Z hodnot je dále patrná výhodnost kapilár malého vnitřního průměru, protože snížením vnitřního průměru ze 75  $\mu\text{m}$  na 25  $\mu\text{m}$  se sníží teplota uvnitř kapiláry z 80  $^{\circ}\text{C}$  na 31  $^{\circ}\text{C}$ . Na 75 $\mu\text{m}$  kapiláře je dobře ilustrován zásadní vliv aktivního chlazení. Zatímco ve stojatém vzduchu se roztok v kapiláře zahřeje na 80  $^{\circ}\text{C}$ , při proudění vzduchu o rychlosti 10  $\text{m s}^{-1}$  se zahřeje pouze na 31  $^{\circ}\text{C}$ , tedy o 6  $^{\circ}\text{C}$  nad teplotu okolního prostředí.

### Do kapiláry ale teploměr nenacpete

Výpočet teploty uvnitř kapiláry je často prakticky nemožný, protože neznáme všechny proměnné. Měření teploty uvnitř kapiláry je technicky velmi náročné. To, zda se roztok v kapiláře významně zahřívá, je ale možné celkem snadno ověřit změřením proudu procházejícího kapilárou při různých hodnotách napětí. Pokud je teplota uvnitř kapiláry konstantní, je konstantní i elektrický odpor roztoku a podle Ohmova zákona ( $I = U/R$ ) je závislost proudu na napětí lineární. V momentě, kdy se začne křivka závislosti proudu na napětí odchylovat od lineárního průběhu, znamená to, že se teplota roztoku v kapiláře zvyšuje, což vede ke snížení viskozity a zvýšení procházejícího proudu nad očekávanou hodnotu.

### Jak to zchladit

V případě, že v našem systému dochází k nežádoucímu přehřívání kapiláry, můžeme podniknout několik kroků ke snížení množství generovaného tepla či zlepšení jeho odvodu. Jak už to tak bývá, všechny tyto kroky mají své stinné stránky.

- Jednou možností je snížení výkonové hustoty  $Q$  v rovn. 11. Toho lze dosáhnout snížením napětí. Tím se ale prodlužuje trvání separace a také disperze zón podélnou difúzí.
- Výkonovou hustotu je možné snížit také snížením koncentrace základního elektrolytu, čímž se sníží koncentrace nosičů náboje v roztoku a tím také proud. Snížení koncentrace však snižuje pufrační kapacitu elektrolytu, a navíc může vést k intenzivnějším interakcím analytů se stěnou kapiláry.
- Dále je možno použít v základním elektrolytu ionty, které mají menší mobilitu, se kterou souvisí menší vodivost a tím i menší proud. Zde však můžeme narazit na problém s elektromigrační disperzí, který bude vysvětlen dále.
- Použití kapiláry menšího vnitřního průměru vede ke snížení proudu a tím potlačení zahřívání, jak je vidět z **Tab. 1**. Zde však opět musíme dělat kompromis, protože se zmenšujícím se průměrem kapiláry se snižuje citlivost nejčastěji používaných způsobů detekce. Kapiláry malých průměrů se také snáze ucpávají nečistotami a kladou velký hydrodynamický odpor, takže je nutné používat vyšší tlaky při jejich promývání.
- Jak je opět patrné z **Tab. 1**, odvod tepla od vnější stěny kapiláry lze zefektivnit použitím aktivního chlazení kapalinou nebo rychlým proudem vzduchu.

### Adsorpce analytů na stěnu kapiláry

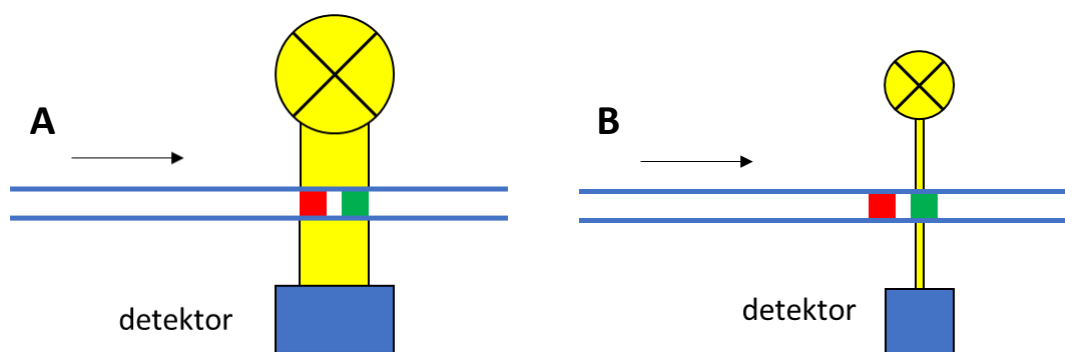
Interakce analytů se stěnou kapiláry mají v CE výrazný negativní vliv na účinnost separace. Analyty, které se na krátkou dobu „přilepí“ na stěnu kapiláry, zaostávají za zónou analytu a po svém uvolnění se pohybují na chvostu píku. Proto v takovém případě píky chvostují. Pokud je interakce extrémně silná, může dokonce dojít k tomu, že se analyty zcela naadsorbují na stěnu a vůbec neprojdou

detektorem. Adsorpci obvykle zprostředkovávají iontové interakce mezi kladně nabitými analyty a záporně nabitou stěnou kapiláry, případně hydrofilní nebo hydrofobní interakce. Vysoký poměr vnitřního povrchu kapiláry k objemu, který usnadňuje odvod tepla, zvyšuje riziko adsorpce. Adsorpce je často velmi výrazná u velkých peptidů a proteinů, protože obsahují mnoho nabitých i hydrofobních funkčních skupin.

Mezi metody, kterými je možné potlačit adsorpci analytů, patří použití základního elektrolytu s nízkým pH, které potlačuje disociaci silanolových skupin na stěně kapiláry a tím snižuje její tendenci adsorbovat kladně nabitě analyty. Další možností je dynamické nebo permanentní pokrytí vnitřní stěny kapiláry vhodným polymerem, případně zvýšení iontové síly roztoku, které vede k tomu, že více koncentrované ionty základního elektrolytu intenzivněji soutěží s analyty o místa k adsorpci na stěně kapiláry.

### Příspěvek detektoru

Detektor, který nám v podstatě umožňuje „vidět píky“ nikdy neposkytuje signál z nekonečně krátkého úseku kapiláry. Například u UV absorpčního detektoru je reálně měřeným signálem celková absorbance po celé šířce paprsku, který používáme k měření, jak je vidět na **Obr. 6**. Na **Obr. 6A** je znázorněn detektor se širokým paprskem. Objem roztoku, ve kterém probíhá detekce, „detekční cela“, je pak relativně velký a máme-li dvě krátké zóny analytů (červená a zelená), které jsou sice separovány, ale jsou velmi blízko u sebe, ocitnou se v detektoru současně a budou detegovány jako jedna zóna. Pokud použijeme užší detekční paprsek, zmenšíme tím objem detekční cely a zaznameneáme zelenou a červenou zónu odděleně. Z toho je patrné, že nevhodná konstrukce detektoru může znehodnotit pečlivě optimalizovanou separaci v kapiláře a byť jsou oba analyty zcela odděleny, mohou být nakonec detegovány jako jeden pík.



**Obr. 6** Vliv velikosti detekční cely.

Pro příspěvek objemu detekční cely k celkové disperzi platí podobný vztah jako pro příspěvek délky dávkované zóny vzorku:

$$\sigma_{\text{DET}}^2 = \frac{l_{\text{DET}}^2}{12} \quad (15)$$

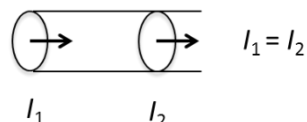
Vzhledem k tomu, že v CE probíhá detekce často přímo v kapiláře, bývá tento příspěvek k disperzi zanedbatelný, je však třeba jej mít na paměti při konstrukci nových detektorů apod.

## Elektromigrační disperze

Posledním jevem, který může zhoršovat účinnost separace a kterému se budeme věnovat, je elektromigrační disperze, která se projevuje velmi typicky tím, že deformuje píky do tvaru trojúhelníku. Jejím vysvětlení bude trochu obsírné, začneme u podmínky kontinuity proudu.

### Kontinuita elektrického proudu

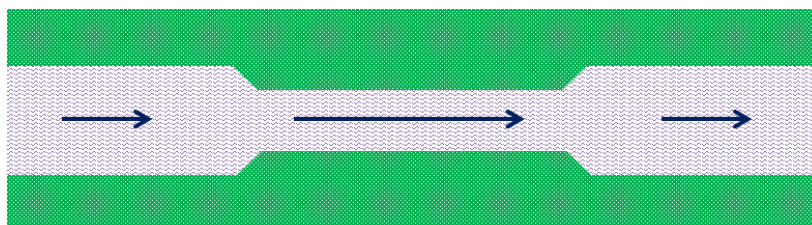
Ve všech místech po délce kapiláry musí téct stejně velký elektrický proud, protože nosiče náboje, které proud zprostředkovávají – kationty a anionty, se nemohou jen tak objevit a zase zmizet, ale musí plynule proudit kapilárou. To je naznačeno na **Obr. 7**.



**Obr. 7** Kontinuita elektrického proudu v kapiláře.

### Analogie s říčním proudem

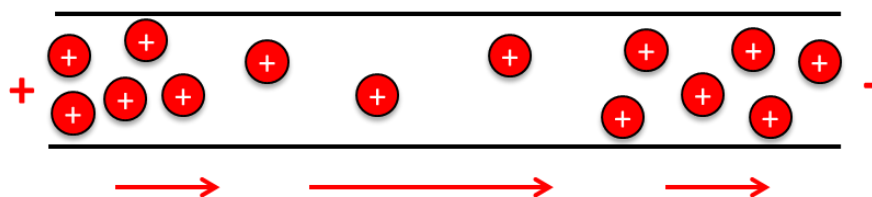
Když si představíme řeku, která se v jednom místě zužuje, můžeme lépe vidět důsledky podmínky kontinuity. Předpokládejme, že voda na **Obr. 8** by proudila stejnou rychlostí ve všech částech řeky. V takovém případě by za minutu proteklo užší částí řeky méně  $\text{m}^3$  vody než jejími širšími částmi. V důsledku toho by se voda zdržovala v levé širší části řeky a chyběla by v pravé širší části řeky, protože (stejně jako ionty v kapiláře) voda nemůže na jednom místě zmizet a na jiném se zase objevit. Z těchto důvodů je v užším místě řeky větší lineární rychlost toku, aby tento tok přenesl za minutu stejný objem vody jako pomalejší tok v širší části.



**Obr. 8** Analogie s říčním proudem.

### A jak to funguje v kapiláře?

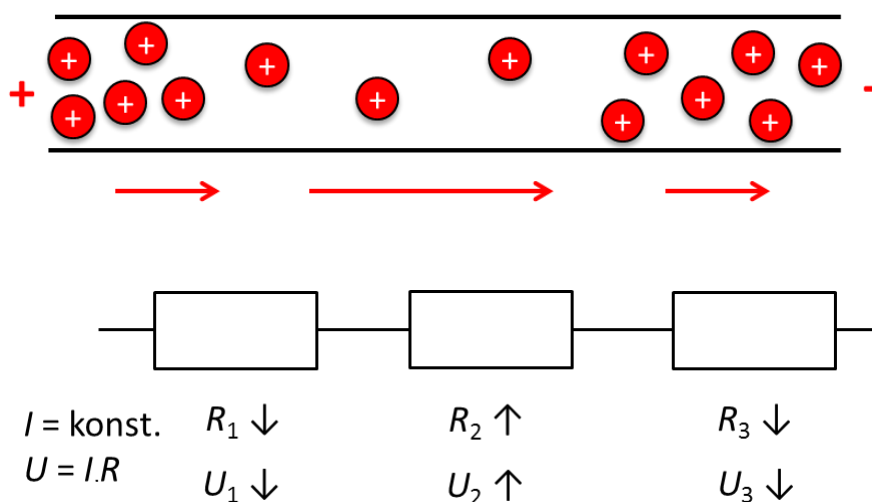
Uvnitř elektroforetické kapiláry je elektrický proud přenášen ionty. Podobně jako je tomu u proudu vody v řece, elektrický proud (náboj přenesený za čas) musí být konstantní ve všech částech podél kapiláry, protože ionty jako nosiče náboje nemohou mizet a zase se objevovat. Nachází-li se v kapiláře zóna, v níž je nižší koncentrace iontů (prostřední část kapiláry na **Obr. 9**), tato zóna bude mít nižší schopnost přenášet elektrický náboj (neboli vést elektrický proud), tzn. že tato zóna bude mít nižší elektrickou vodivost. Podobně jako v příkladu s řekou musí ionty v této části migrovat rychleji, aby přenesly stejné množství náboje za čas jako ionty v částech, kde je vodivost větší.



**Obr. 9** Kontinuita elektrického proudu uvnitř kapiláry.

### Ale jak to udělají? Elektroforetická mobilita přece nezávisí na vodivosti roztoku...

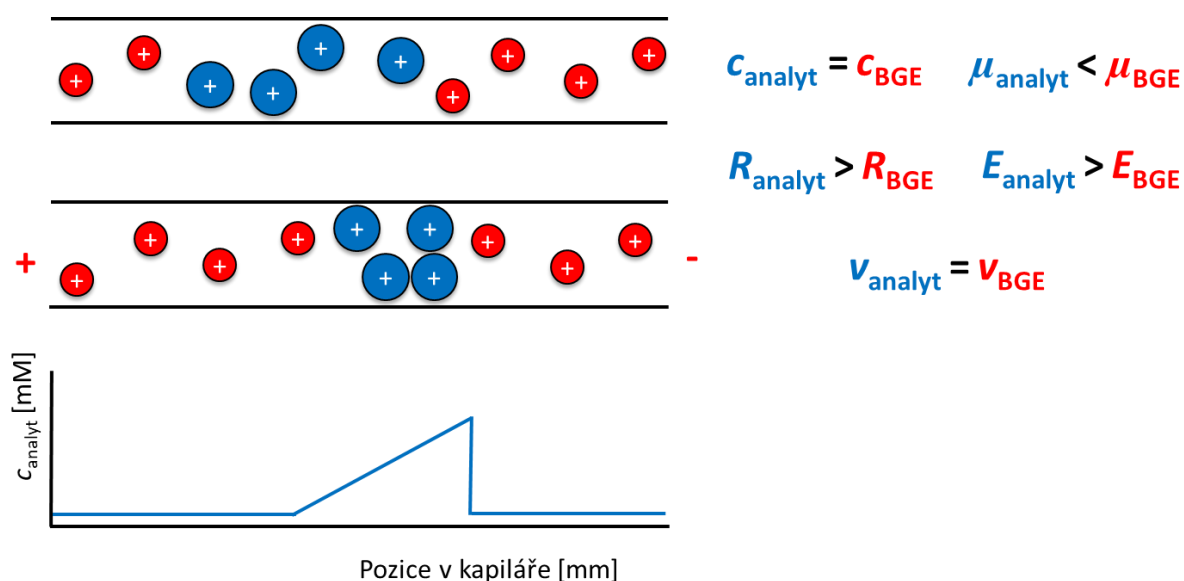
Rychlost migrace je dána součinem mobility a intenzity elektrického pole. Jelikož mobilita se s vodivostí roztoku nemění, musí se pro zrychlení migrace lokálně změnit intenzita elektrického pole. Situaci v kapiláře si můžeme představit jako tři rezistory zapojené v sérii (**Obr. 10**). Hodnota elektrického proudu musí být na všech třech rezistorech stejná. Celkový rozdíl elektrického potenciálu, který je na rezistory vložen, je mezi rezistory rozdělen nerovnoměrně. Na rezistoru s vyšším odporem (a nižší vodivostí) bude větší rozdíl potenciálu („spotřebuje se zde větší část celkového napětí“). Toto větší napětí umožní, aby rezistorem tekla stejný elektrický proud, jako rezistory s menším odporem, na kterých bude menší napětí, což je v souladu s Ohmovým zákonem.



**Obr. 10** Vyjádření kontinuity proudu uvnitř kapiláry pomocí rezistorů zapojených do série

### A teď ta disperze

Jedním z projevů výše uvedeného principu je **elektromigrační disperze**. Představme si kapiláru (**Obr. 11**) a zabývejme se pouze kationty. Pochopitelně jsou v kapiláře přítomné i anionty, které kompenzují náboj kationtů, ale pro jednoduchost je nyní budeme ignorovat.



**Obr. 11** Elektromigrační disperze

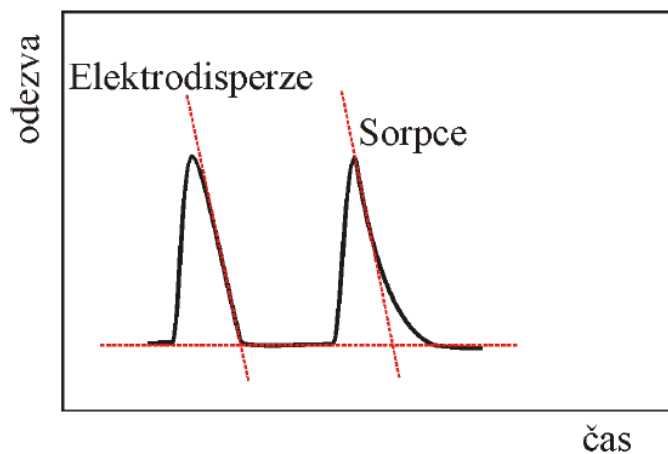
Kapilára je naplněná základním elektrolytem, jehož kationty jsou na **Obr. 11** vybarveny červeně. Ve střední části kapiláry je zóna, která obsahuje modře vybarvené kationty analytů v podobné koncentraci, ale s větším hydrodynamickým poloměrem a tedy nižší mobilitou:  $\mu_{\text{analyt}} < \mu_{\text{BGE}}$

Díky tomu bude odpor modré zóny analytu větší, než odpor základního elektrolytu  $R_{\text{analyt}} > R_{\text{BGE}}$ . Kdyby byl rozdíl potenciálu rozložen rovnoměrně po délce kapiláry, z Ohmova zákona by vyplývalo, že zónou analytu by protékal menší elektrický proud. Jak bylo vysvětleno výše, k takové situaci nemůže dojít, protože musí být zachována kontinuita proudu. Rozdíl potenciálu bude proto podél kapiláry rozložen tak, že v zóně analytu bude lokálně vyšší intenzita elektrického pole  $E_{\text{analyt}} > E_{\text{BGE}}$ . Vyšší intenzita nutí modré kationty analytu migrovat rychleji. Když ale domigrují do základního elektrolytu, který je před nimi, vstoupí do pole o nižší intenzitě a jejich pohyb se zpomalí. Zde je potom dohánějí další kationty, které migrují za nimi. Kationty analytu se tímto způsobem hromadí na rozhraní zóny analytu a základního elektrolytu.

Na opačném konci zóny analytu se odehrává opačný proces. Výsledkem je typický trojúhelníkový tvar píků ovlivněných elektromigrační disperzí. V tomto případě píky chvostují.

Samozřejmě, pokud budou mít kationty analytů vyšší mobilitu než kationty základního elektrolytu, elektromigrační disperze se bude odehrávat opačně a trojúhelníkové píky nebudou chvostovat, ale tzv. frontovat (budou rozmyté vpředu).

**Obr. 13** Ilustruje rozdíl mezi tvarem píku rozmytého elektromigrační disperzí a adsorpcí analytu na stěnu kapiláry.



**Obr. 13** Srovnání deformace píků způsobené elektromigrační disperzí a adsorpcí analytu na stěnu kapiláry

Elektromigrační disperzi je možné potlačit dvěma způsoby:

- a) Volbou jiného iontu v základním elektrolytu, který bude mít podobnou mobilitu jako analyty.
- b) Naředěním vzorku nebo zvýšením koncentrace základního elektrolytu. Efekt elektromigrační disperze je větší, když jsou koncentrace iontů analytů a základního elektrolytu srovnatelné. Pokud je koncentrace analytů výrazně nižší, disperze je do jisté míry potlačena.