

Instrumentace aneb co máme za hračky

Jednou z velkých výhod elektroforézy jsou nízké nároky na instrumentaci. Potřebujeme:

- 1) zdroj vysokého napětí připojený na dvě elektrody, které jsou v kontaktu s roztokem základního elektrolytu
- 2) separační prostor (kapilára, vrstva gelu, čip)
- 3) zařízení pro dávkování vzorku
- 4) nějakou formu chlazení separačního prostředí (není nezbytné, ale velmi vhodné)
- 5) detektor, který poskytne odezvu při průchodu analytů

Vidíme, že ve srovnání s do jisté míry konkurenční vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC), jsou nároky celkem nízké. V HPLC je nutno pracovat za vysokých tlaků, což klade vysoké nároky na těsnost spojení, dále je nutno minimalizovat mrtvé objemy v rámci systému, nemluvě o tom, že separační prostor – chromatografická kolona – je řádově dražší než elektroforetická kapilára, gel nebo čip.

Náš kurz je zaměřen převážně na separace prováděné v kapiláře, takže s ní začneme. O elektromigračních separacích na čípech a v gelech bude stručně pojednáno v dalších lekcích. Je třeba poznamenat, že separace na gelech nejsou rozhodně zanedbatelné, hrají významnou roli v biochemii.

Zdroj vysokého napětí

V praktickém analytickém využití CE se samotným zdrojem vysokého napětí obvykle příliš nezabýváme. Používáme-li nějaký komerční přístroj, bývá zdroj jeho neoddělitelnou součástí. Zdroj napětí zpravidla umožňuje vložit mezi elektrody potenciálový rozdíl o velikosti do 30 kV. Vyšší napětí přístroje obvykle neumožňují, protože by mohlo docházet k výbojům mezi elektrodami. Když chceme vidět blesky, radši se podíváme za bouřky na nebe, nemusíme si kvůli tomu kupovat přístroj ☺.

Elektrody

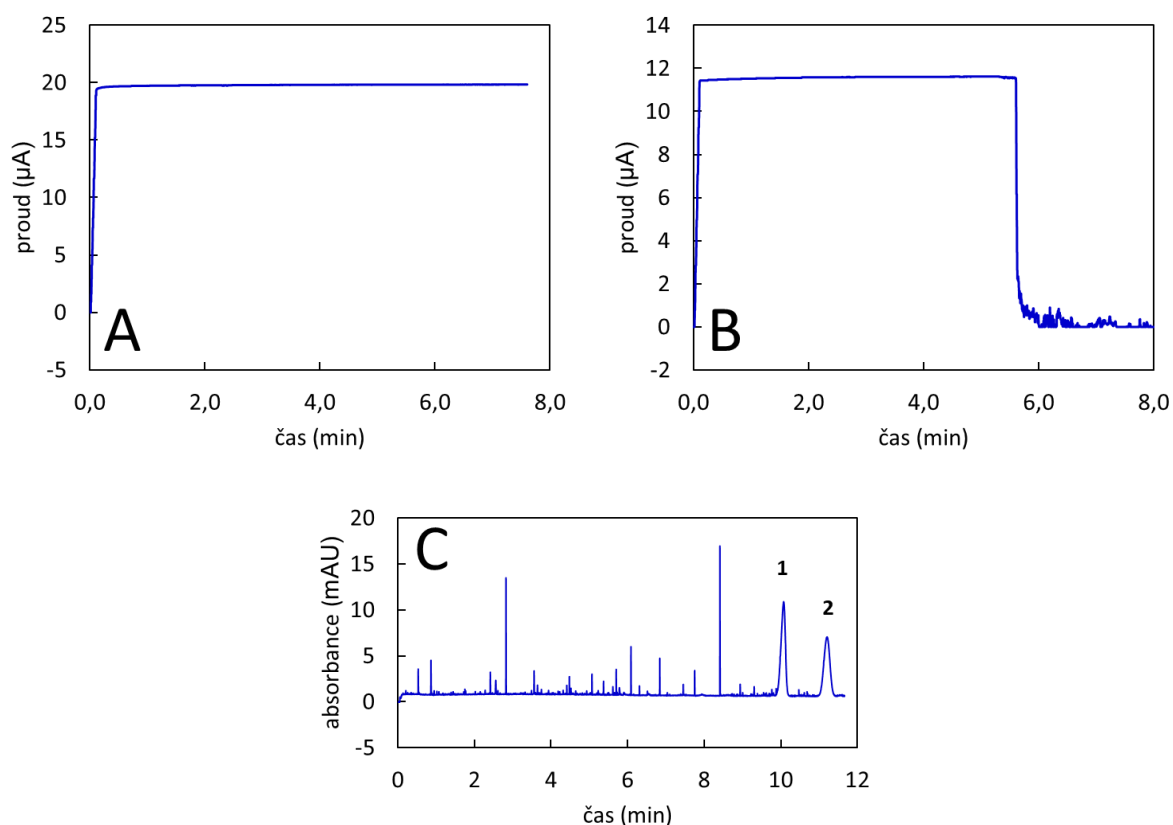
Co se týče elektrod, jsou z inertního kovu, buď z platiny nebo slitiny platiny a iridia, aby nedocházelo k jejich poškození, protože někdy se pracuje i v relativně silně kyselých nebo zásaditých roztocích. Navíc na elektrodách v průběhu měření probíhá elektrolyza, která umožňuje přechod elektrického náboje z elektrody do roztoku a obráceně. Elektrody z méně ušlechtilých materiálů by se tedy mohly rozpouštět nebo pokrývat vrstvou oxidu.

V komerčních přístrojích se vyskytují dvě varianty uspořádání. Buď je elektroda tvořena kovovým drátem, který je do nádoby s BGE umístěn vedle kapiláry, nebo tvoří trubičku, skrz níž do roztoku prochází kapilára. Obě varianty mají svoje výhody a nevýhody. Výhodou trubičkového uspořádání je větší robustnost (trubička má větší průměr a je pevnější než drát, takže se tak snadno neohne a nezlomí). Na druhé straně vzniká prostor mezi vnitřní stěnou trubičky a vnější stěnou kapiláry, ve kterém se může zadržovat malé množství roztoku. Může tak docházet ke vzájemné kontaminaci roztoků, do nichž se v průběhu měření kapilára s elektrodou postupně ponořují. V případě běžných

aplikací je tento problém naprosto zanedbatelný. Pokud se ale pracuje například s enzymy a jejich substráty, zařazuje se často mezi ponoření elektrody s kapilárou do roztoku enzymu a substrátu ještě její „opláchnutí“ ponořením do nádoby s vodou.

Proud jako indikátor problémů

Proud protékající kapilárou má hodnotu řádově jednotek až desítek μA . Během měření je vhodné zaznamenávat a průběžně sledovat hodnotu proudu a její časový průběh. Má-li proud stabilní hodnotu po celou dobu separace, jako je tomu na **Obr. 1A**, je to dobré znamení. Pokud proud kolísá, bývá to známkou nějakého problému.



Obr. 1 Časový průběh hodnoty proudu při elektroforetické separaci. A) Ideální stav, proud je stabilní. B) Pád hodnoty proudu k nule před šestou minutou značí problém a nepoužitelnost tohoto měření. C) Elektroferogram s dvěma analyty (označenými čísly 1 a 2) a nerealisticky úzkými píky (tzv. *spiky*) způsobenými vznikem mikrobublinek či jinými nežádoucími jevy.

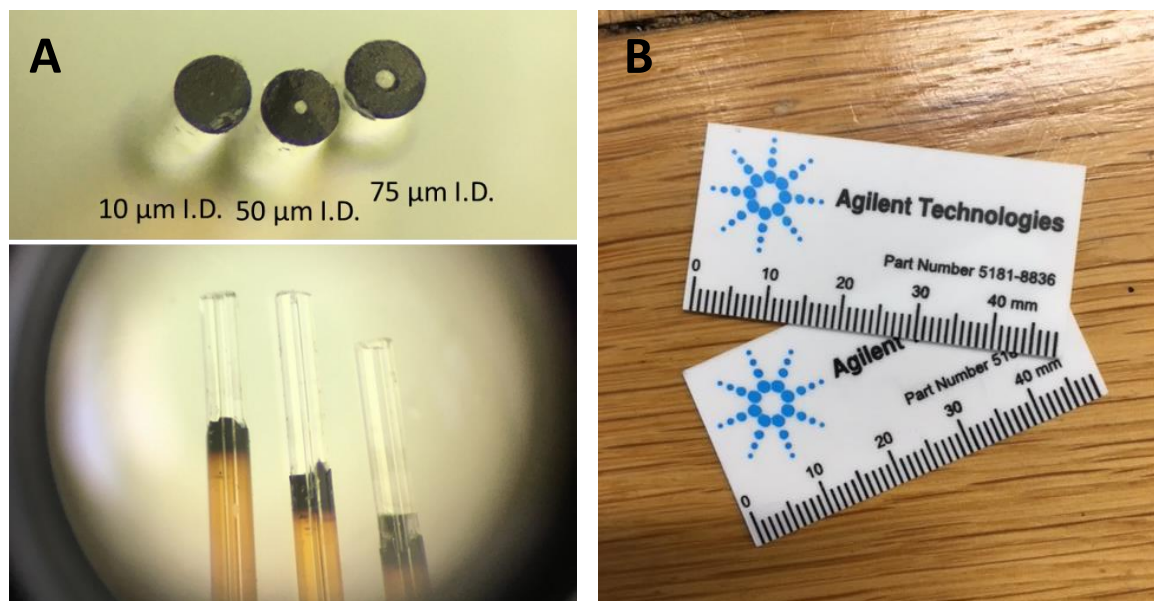
Obvykle se snažíme pracovat za takových podmínek, aby velikost proudu byla spíše v jednotkách či nižších desítkách μA . Pokud nemáme na výběr a musíme pracovat v podmínkách, kdy se proud blíží k hodnotě 100 μA , měli bychom být obezřetní, protože je zde velmi reálné riziko přehřívání roztoku v kapiláře, které může působit zhoršení účinnosti separace, nestabilitu elektrického proudu nebo snížení reprodukovatelnosti měření. Zahřívá-li se roztok v kapiláře na opravdu vysoké teploty, může dojít k tvorbě mikrobublinek, které se na signálu UV detektoru projevují jako ostré, nerealisticky úzké píky. Ty se často označují anglickým výrazem *spike*. V češtině se jim pak většinou nehezky nečesky říká

„spajky“. Můžeme je vidět na **Obr. 1C**. V extrémním případě může dojít i k vytvoření tak velké bubliny, že zabere celý průřez kapiláry, čímž přeruší elektrický obvod, dojde k poklesu proudu k nule (**Obr. 1B**) a v měření nemá smysl dále pokračovat. Kapiláru je nutno promýt a začít další měření, ideálně s podmínkami, za kterých poteče menší proud.

Na **Obr. 1** si můžete také povšimnout, že proud na začátku měření postupně nabíhá na stabilní hodnotu od nuly. Obvykle se totiž doporučuje nevložit v jednom okamžiku celých 30 kV, ale použít tzv. **potenciálovou rampu**, kdy se hodnota napětí lineárně zvyšuje z 0 na 30 kV (nebo jinou zvolenou hodnotu) během několika prvních sekund (např. během 0,1 min = 6 s). Udává se, že potenciálová rampa pomáhá zmírnit některé nežádoucí přechodové jevy tím, že si systém na vysoké napětí „postupně zvykne“ a neutrpí takový šok.

Kapilára

V CE se separace obvykle provádějí v kapilárách z taveného křemene, které mají vnitřní průměr 50 nebo 75 μm . Větší vnitřní průměry se prakticky nepoužívají, protože, jak jsme viděli v minulé lekci, prochází jimi větší proudy a hůře se z nich odvádí teplo. Menší vnitřní průměry se v některých případech používají (5, 10 či 20 μm), především tam, kde se pracuje s vysoce vodivými BGE. Křemenná kapilára je potažena vrstvou polyimidu, která jí propůjčuje pružnost, protože samotný tavený křemen je velmi křehký a stočit takovou kapiláru bez vrstvy polyimidu do přístroje je prakticky nemožné.



Obr. 3 A) Elektroforetické kapiláry o různých průměrech s odstraněnou vrstvou polyimidu na konci. B) Keramické destičky používané k řezání kapilár.

V komerčních přístrojích bývá délka kapiláry volitelná s tím, že nejmenší délka, kterou lze do přístroje namontovat je zhruba 30 cm. Horní hranice neexistuje, ale použití kapilár delších než 100 cm je nepraktické a vyskytuje se výjimečně. Kapiláry je možno koupit již nařezané na danou délku. Častá a výrazně levnější varianta je nakoupit delší kus kapiláry vcelku (desítky metrů) a pak si kapiláru uříznout na vzdálenost, která nám vyhovuje. Na řezání kapiláry existují různé řezačky, nejjednodušší a oblíbenou

variantou je ale prostá keramická destička, jejíž hranou se kapilára z jedné strany nařízne a pak se kapilára ohnutím zlomí. Některé studie ukázaly, že účinnějších separací se dosahuje, pokud je konec kapiláry rovný, není roztřepený nebo sešikmený. Nepravidelný tvar konce kapiláry způsobuje nehomogenitu elektrického pole na vstupu do kapiláry a tím deformaci elektroforetických zón. Uříznutou kapiláru je proto vhodné zkontrolovat lupou, případně mikroskopem. Na koncích kapiláry se doporučuje odstranit polyimid, který může v některých roztocích botnat, zvětšovat svůj objem a překrývat vstup do kapiláry. Na **Obr. 3A** jsou vidět kapiláry tří různých vnitřních průměrů. Je zde také vidět, že na konci je odstraněna vrstva polyimidu (v tomto případě opálením zapalovačem a otřením buničinou namočenou do lihu). Na **Obr. 3B** jsou pro ilustraci dvě keramické destičky, které se používají k řezání kapilár.

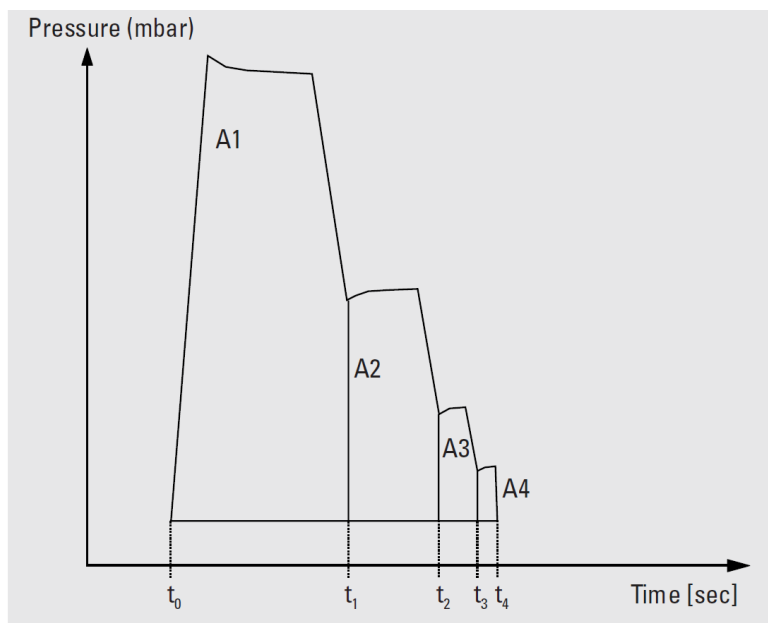
Dávkování vzorku

V komerčních přístrojích se vzorek do kapiláry vpravuje v zásadě dvěma způsoby, hydrodynamicky nebo elektrokineticky.

Hydrodynamické dávkování

Tento způsob dávkování je založen na vytvoření tlakového rozdílu mezi vstupním a výstupním koncem kapiláry. V počátcích CE byl tento rozdíl realizován **vyzdvihnutím vstupní nádoby** tak, aby hladina roztoku BGE v ní byla o několik centimetrů výš než hladina ve výstupní nádobce. Protože se jedná o spojené nádoby, vede takové vyzdvihnutí k toku kapaliny směrem ze vstupní do výstupní nádoby. Tento způsob se v moderních přístrojích nepoužívá proto, že z praktických důvodů je možné vytvořit maximální rozdíl hladin zhruba 20 cm, takže rozdíl tlaků není příliš vysoký a dávkování musí probíhat relativně dlouho. Druhým problémem je horší reprodukovatelnost tohoto dávkování.

Rozdíl tlaku se dnes proto dosahuje zpravidla **natlakováním vstupní nádoby** se vzorkem vzduchem nebo inertním plynem (analogickou možností je vytvoření podtlaku v nádobce výstupní). Natlakování vzduchu je zajištěno vzduchovým čerpadlem zabudovaným v přístroji. K tlakování inertním plynem, nejčastěji dusíkem, se používá externí tlaková lahev. Dávkovací tlaky v komerčních přístrojích mohou být 5 až 10 kPa a dávkování tak může probíhat po dobu několika málo sekund. Pro zlepšení reprodukovatelnosti neaplikuje přístroj jednoduše tlak 5 kPa na dobu 5 s (je třeba si uvědomit, že i natlakování nádoby několik okamžiků trvá), ale využívá sofistikovaný tlakový program. Na **Obr. 4** je ukázka takového dávkovacího programu. Tento program je součástí software a uživatel jej nijak neupravuje, pouze nastaví hodnotu tlaku a délku dávkování.



Obr. 4 Příklad tlakového programu používaného komerčním přístrojem pro dávkování vzorků tlakem.

Elektrokinetické dávkování

Druhou hojně rozšířenou možností je dávkování vzorku tím, že se mezi konce kapiláry vloží na krátkou dobu napětí, zatímco je vstupní konec kapiláry ponořen do vzorku a výstupní konec do roztoku BGE. Nevýhoda tohoto způsobu dávkování spočívá v tom, že k pohybu analytů do kapiláry dochází kombinací EOF (je-li přítomen) a vlastní migrace analytů. Analyty, které mají větší mobilitu se tak nadávkují ve větším množství než analyty, které migrují pomaleji nebo dokonce v opačném směru. Elektrokinetické dávkování však s sebou nese ještě další prvek, který může být jak výhodou, tak nevýhodou. Jedná se o jev, který lze použít k zakoncentrování analytů ze vzorku.

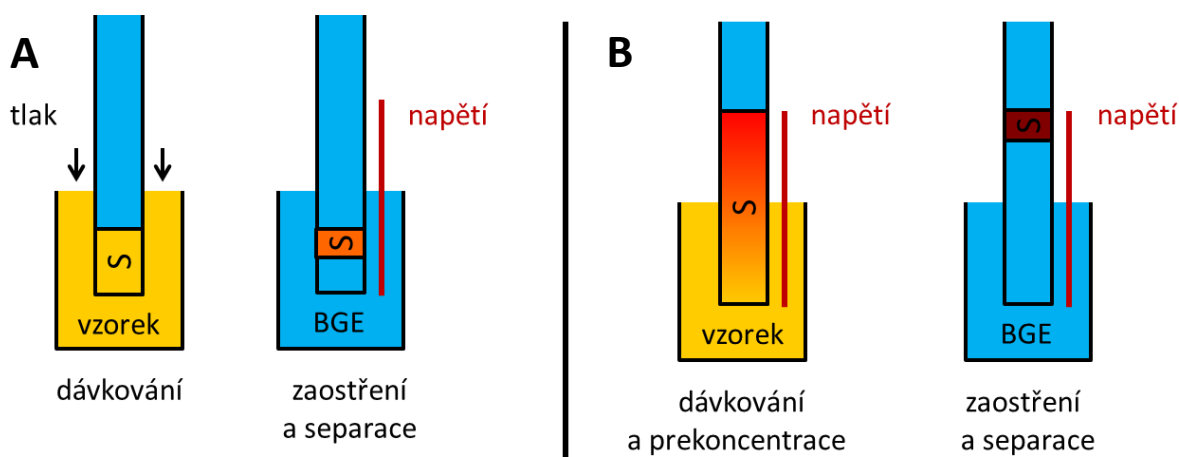
Zakoncentrování vzorku zesílením pole

Tento jev se v angličtině nazývá *field-amplified sample stacking* (FASS). Variantou pak je *field-amplified sample injection* (FASI). Využívá se při něm jevů spojených s podmínkou zachování elektroneutality a kontinuity, které vedou k elektromigrační disperzi. Tyto jevy byly popsány v předešlé lekci, takže si je v případě potřeby můžete oživit. Základem je to, že pokud je zóna vzorku výrazně méně vodivá než zóna základního elektrolytu, vynutí si v ní podmínka elektroneutality a kontinuity lokální zvýšení intenzity elektrického pole. Díky tomu se v zóně vzorku analyty pohybují rychleji. Když dospějí na rozhraní zóny vzorku a základního elektrolytu, dostávají se do oblasti s méně intenzivním polem, což vede ke zpomalení jejich pohybu. V důsledku toho je další ionty analytu „dohánějí“ a analyt se tak na tomto rozhraní zakoncentrovává. Ilustraci tohoto procesu s využitím analogie s říčním proudem z minulé lekce **2 – Účinnost separace** nabízí prezentace **Zakoncentrování vzorku zesílením pole (FASS)**, která je součástí této lekce v Moodle.

Popsaného principu lze využít v zásadě dvojím způsobem. Jednou z možností je technika *field-amplified sample stacking* (FASS), při které se vzorek do kapiláry dávkuje hydrodynamicky a následné zakoncentrování probíhá s oběma konci kapiláry ponořenými do roztoku BGE. Nadávkované množství

analytů je tedy stejné jako při hydrodynamickém dávkování, ale zaostří se do užší zóny, což vede ke vzniku užších a vyšších píků, tedy ke zvýšení účinnosti separace.

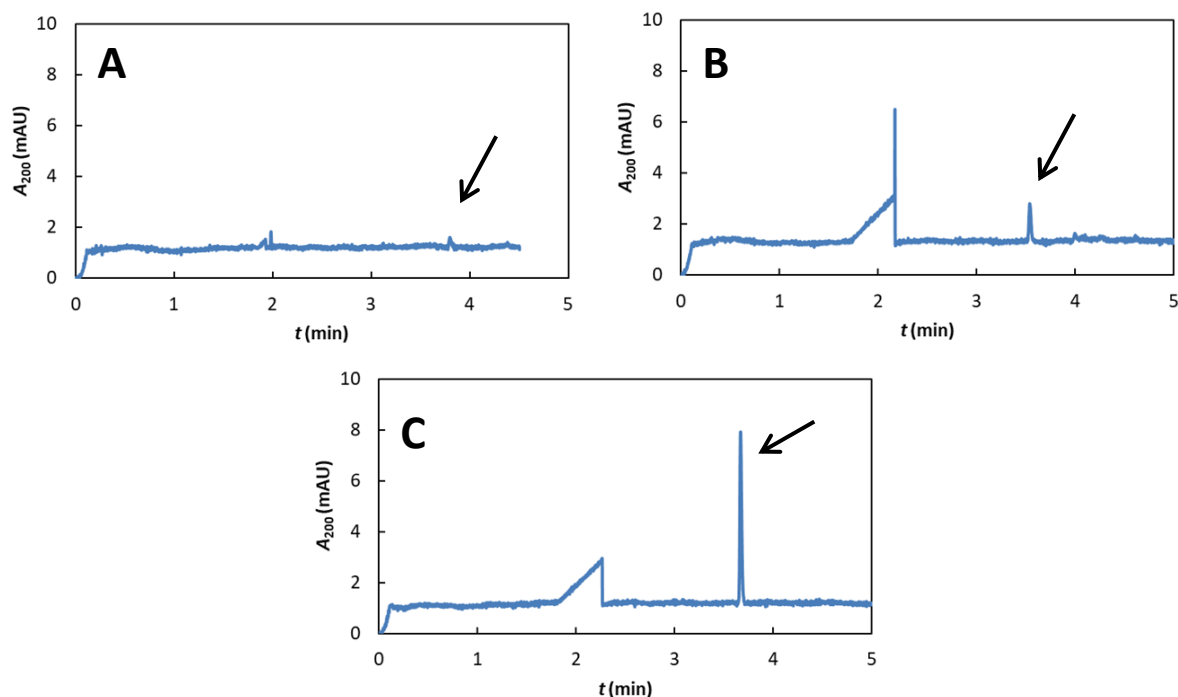
Druhou variantou, kterou je možné výrazně i o několik řádů zvýšit citlivost měření, je *field-amplified sample injection* (FASI). Při této technice je vzorek dávkován elektrokineticky a napětí je tedy vkládáno v okamžiku, kdy je vstupní konec kapiláry ponořen do roztoku vzorku a výstupní konec do roztoku BGE. Díky tomuto uspořádání migrují ze vzorku další a další analyty k rozhraní s BGE a zde se hromadí. Při použití delší doby dávkování je možné zvýšit tímto způsobem koncentraci analytu na rozhraní vzorku a BGE ve srovnání s koncentrací v původním vzorku o několik řádů. Rozdíl mezi FASS a FASI ilustruje Obr. 5.



Obr. 5 Porovnání průběhu dávkovacích technik A) *field-amplified sample stacking* (FASS) a B) *field-amplified sample injection* (FASI).

Techniku FASI je možné přímo použít, pokud pracujeme se vzorky, které mají samy o sobě velmi nízkou vodivost. Pokud mají vodivost vyšší, je možno je naředit vodou a poté dávkovat. V ideálním případě výrazné zvýšení citlivosti přebije naředění vzorku před dávkováním. Další možností, jak snížit vodivost vzorku, je jeho naředění vhodným organickým rozpouštědlem, například acetonitrilem. Ukázka praktického využití této techniky je na Obr. 6. Můžeme zde vidět elektroferogramy stanovení denatoniového kationtu (denatonium benzoát = bitrex – jedna z nejhořčejších látek na světě, povinně se přidává do chladicích kapalin, čisticích prostředků apod., aby se předešlo jejich náhodnému požití). Na Obr. 6A je měření vzorku chladicí kapaliny naředěného vodou 1:9 po hydrodynamickém dávkování tlakem. Na Obr. 6B je vidět, že při použití elektrokinetického dávkování a techniky FASI dojde ke zvětšení píku analytu. Na Obr. 6C je dobře patrné, jak snížení vodivosti vzorku naředěním acetonitrilem místo vody ještě výrazně zvýší odezvu analytu.

Variantou FASI je technika zvaná *large-volume sample stacking*. Zde je zakoncentrování založeno na stejném principu jako u FASI. Dávkování však probíhá velmi dlouhou dobu, takže se až $\frac{3}{4}$ délky kapiláry naplní vzorkem, přičemž analyty jsou zakoncentrovány na rozhraní vzorku a BGE. Protisměrným tlakem se zóna zakoncentrovaných analytů následně posune zpět na začátek kapiláry. Při tom se odstraní matrice vzorku z kapiláry. Následně se vloží separační napětí a dojde k separaci.



Obr. 6 Stanovení denatoniového kationtu (označen šipkou) v chladicí kapalině. A) Vzorek naředěn vodou 1:9, dávkování 5 kPa × 5 s, B) vzorek naředěn vodou 1:9, dávkování 5 kV × 30 s, C) vzorek naředěn acetonitrilem 1:9, dávkování 5 kV × 30 s.

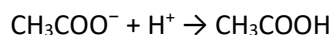
I v případech, kdy má vzorek vyšší vodivost, lze provádět jeho zakoncentrování zesílením pole. Takovou možnost nabízí ***pH-mediated sample stacking***. Technika je založena na snížení vodivosti zóny vzorku potlačením disociace slabé kyseliny nebo slabé zásady. Pro případ, kdy je analytem kation je tato technika ilustrována na **Obr. 7**. Máme vysoce vodivý vzorek, který obsahuje kationtový analyt A^+ a jako protiion vysoce pohyblivé chloridy, které mají vysokou iontovou vodivost. BGE obsahuje sodné kationty a anionty slabé kyseliny – octanové anionty.

V prvním kroku (**Obr. 7A**) je vzorek umístěn na vstupní konec kapiláry.

V druhém kroku (**Obr. 7B**) je vloženo elektrické pole, v němž chloridové anionty ze vzorku migrují doleva – ven z kapiláry, zatímco kationty analytu migrují doprava do kapiláry, kde získají jako protiionty octanové ionty ze základního elektrolytu.

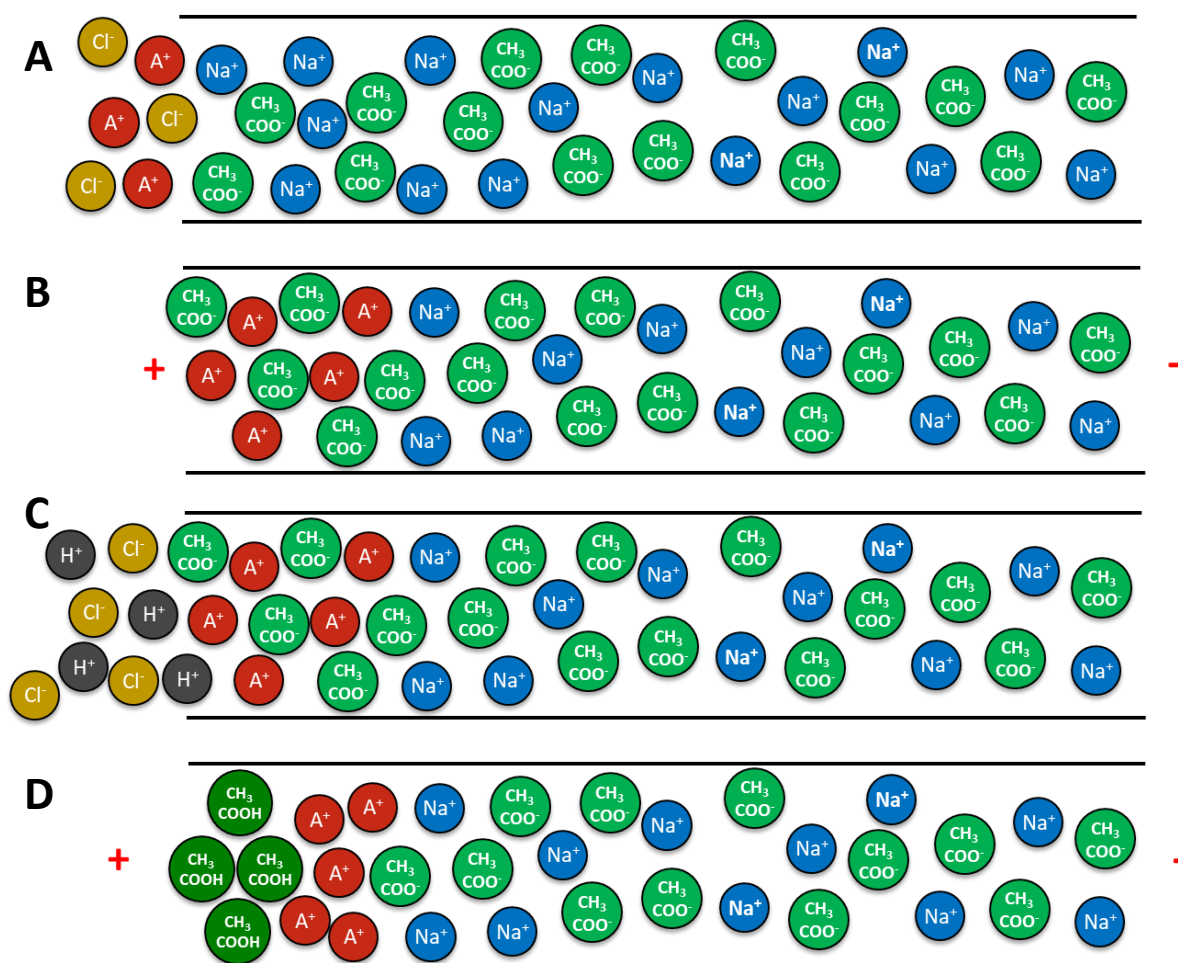
Ve třetím kroku (**Obr. 7C**) je na vstupní konec kapiláry umístěna nádobka se silnou kyselinou HCl.

Ve čtvrtém kroku (**Obr. 7D**) je opět vloženo elektrické pole, ve kterém chloridy z HCl migrují ven z kapiláry, zatímco ionty H^+ migrují dovnitř do kapiláry, kde protonují octanové ionty (silná kyselina HCl potlačí disociaci slabé kyseliny CH_3COOH). Reakcí dle rovnice:



dojde k zániku dvou nabitých částic (včetně vysoce vodivého H^+) a vzniku neutrální molekuly. Díky tomu se výrazně zmenší vodivost zóny na vstupním konci kapiláry a může se zde uplatnit zakoncentrování analytů na rozhraní s roztokem BGE podle principu FASS.

Stejným způsobem ovšem s použitím obrácené polarizace napětí, soli slabé zás. místo soli slabé kys. a silné zás. místo silné kys., je možné realizovat tuto techniku i v případě, že analyty jsou anionty.



Obr. 7 Zakoncentrování analytu prostřednictvím změny pH (*pH-mediated sample stacking*).

Zakoncentrování může probíhat i na principu přechodné izotachofórey, anglicky **transient isotachophoresis**, kdy je vzorek dávkován mezi vedoucí a koncový elektrolyt. Princip izotachofórey jako samostatného separačního módu bude vysvětlen v následujících lekcích.

Existují i další možnosti a varianty zakoncentrování vzorků, jejich podrobný výčet však není předmětem této přednášky.

Speciální dávkovače

Komerční přístroje zpravidla umožňují obě výše popsané metody dávkování, hydrodynamické zprostředkované natlakováním nádoby se vzorkem i elektrokinetické prostřednictvím vložení elektrického pole. V současnosti umožňuje použití tlakových programů, jako je ten na **Obr. 4**, dostatečně přesné a reprodukovatelné dávkování, nicméně v průběhu vývoje instrumentace tomu vždy tak nebylo a byly navrženy, zkonstruovány a využívány i různé další speciální dávkovače založené například na různých typech dávkovacích ventilů. Dnes se používají v některých starších nebo po domácku vyrobených přístrojích. Mohou být využity i pro speciální aplikace, kterým standardní způsob dávkování z nějakého důvodu nevyhovuje.

Chlazení

Chlazení kapiláry se zajišťuje buď rychle proudícím termostatovaným vzduchem nebo termostatovanou chladicí kapalinou. Chlazení vzduchem je přirozeně méně účinné než chlazení kapalinou. Na druhé straně nutnost použití speciálních chladicích kapalin instrumentaci komplikuje a přináší s sebou i riziko úniku kapaliny vlivem netěsností. Takový únik pak může znehodnotit výsledky měření. Různí výrobci volí jednu nebo druhou variantu. V současnosti jsou na trhu jak přístroje, které mají dostatečně efektivní chlazení vzduchem, tak přístroje, v nichž se kapilára chladí kapalinou, a které mají vyřešenou těsnost chladicího okruhu.

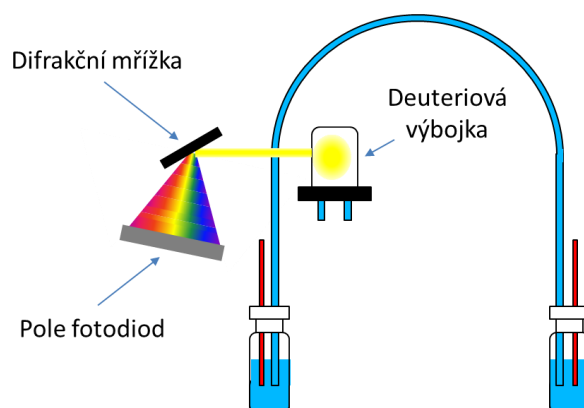
Detektory

Zóny, které procházejí kapilárou, zpravidla nemůžeme sledovat pouhým okem. Jednak většina analytů není barevná, jednak je kapilára pokryta vrstvou polyimidu, která není transparentní. Navíc detekce pouhým okem by nebyla použitelná pro spolehlivou kvantifikaci analytů.

Pro kapilární elektroforézu byla, podobně jako pro ostatní separační metody, vyvinuta celá řada různých detektorů. Jelikož se jedná o detekci analytů v proudící kapalině, část detektorů je shodná nebo velmi podobná detektorům pro kapalinovou chromatografii. V rámci této přednášky se nebudeme věnovat všem detektorům, o kterých lze najít zmínky v literatuře, ale zaměříme se na ty, které se v praxi nejčastěji používají. Jsou to detektory UV/VIS absorpční, fluorescenční a bezkontaktní vodivostní. Významnou roli zastává použití hmotnostního spektrometru. Této technice jsou však věnovány samostatné kurzy, takže zde ji rozebírat nebudeme.

UV/VIS absorpční detektor

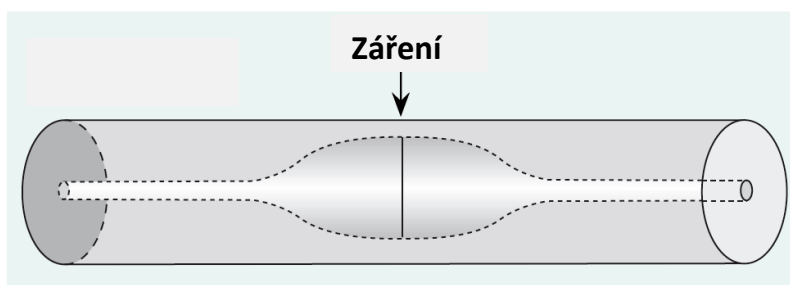
Komerční přístroje jsou standardně vybaveny tímto typem detektoru s diodovým polem. Uspořádání je vidět na **Obr. 8**. Poblíž výstupního konce kapiláry je umístěn zdroj záření (obvykle deuteriová výbojka), která vysílá záření přes kapiláru. Roztok procházející detekčním okénkem na kapiláře absorbuje část záření ze zdroje. Prošlé záření je následně rozloženo na difrakční mřížce a dopadá na pole fotodiod, které zaznamenávají intenzitu záření jednotlivých vlnových délek. Výhodou tohoto uspořádání je, že je možné měřit celé spektrum v každém okamžiku analýzy a získáváme tak v podstatě 3D data. Na jedné ose je migrační čas, na druhé ose je absorbance a na třetí ose je vlnová délka detekce. UV spektra je pak možné použít k identifikaci analytů.



Obr. 8 Uspořádání přístroje pro CE s UV/VIS detektorem s diodovým polem.

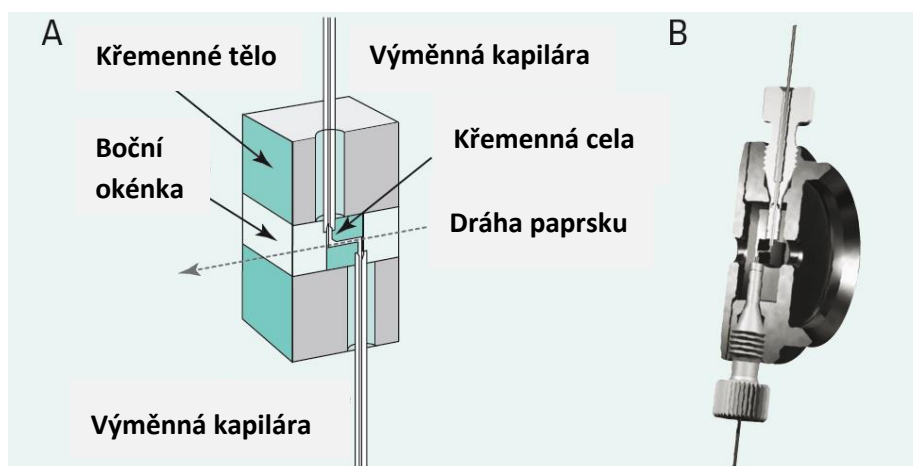
V místě, kudy prochází záření z detektoru, musí být z povrchu kapiláry odstraněn polyimid, který záření nepropouští. Toto tzv. detekční okénko se může vytvořit několika způsoby: (i) tepelně - opálením vrstvy polyimidu plamenem nebo žhaveným drátem, (ii) mechanicky - odstraněním polyimidu žiletkou, (iii) chemicky - kapkou koncentrované kyseliny sírové, která se nažhaví pájkou. Rovněž je možné koupit již nařezané kapiláry s připravenými detekčními okénky, ty jsou však nepoměrně dražší.

Zřejmou nevýhodou UV/VIS absorpční detekce v CE je velmi krátká optická dráha paprsku v absorbujícím prostředí. Zatímco v molekulové absorpční spektrometrii obvykle používáme kyvety o délce optické dráhy 1 cm, v CE probíhá absorpce pouze napříč kapilárou, tedy na dráze dlouhé 50 μm , což je 200× kratší úsek. Tuto nevýhodu někdy výrobci řeší použitím kapiláry s „bublinkovou celou“ anglicky *bubble cell*, která je znázorněna na **Obr. 9**. Optická dráha v rozšířené části cely je třikrát delší, tím pádem je třikrát vyšší i citlivost detekce. Tento typ kapiláry je samozřejmě výrazně dražší než klasická kapilára a je velmi citlivý na správné umístění „bubliny“ do detektoru.



Obr. 9 Bublinková cela (*bubble cell*) která trojnásobně prodlužuje optickou dráhu detekce.

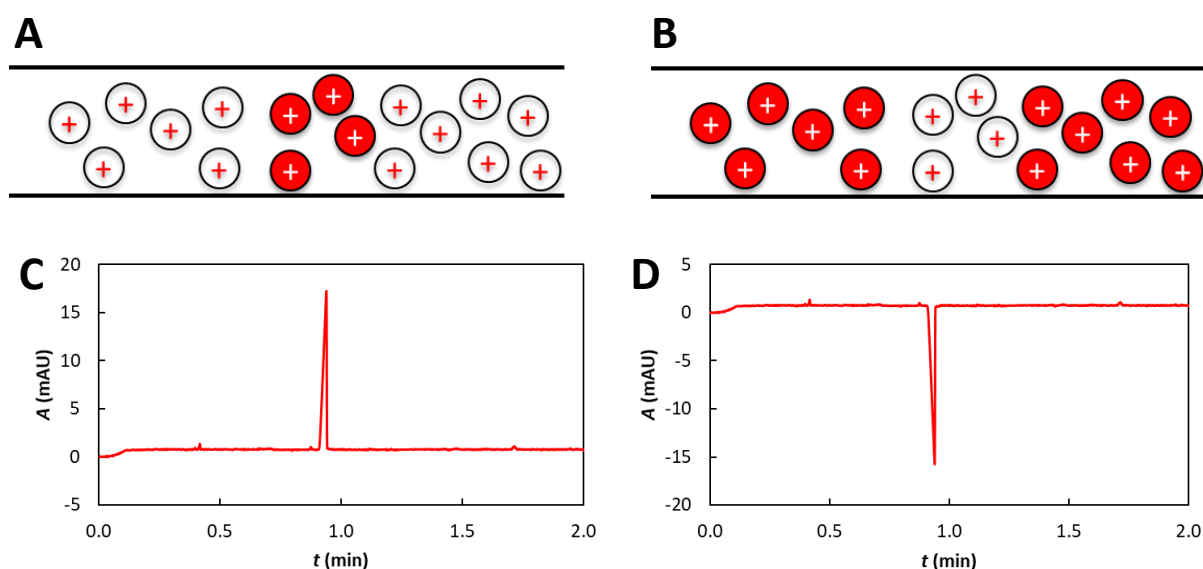
Druhou možností je použití Z-cely (**Obr. 10**). Upořádání tohoto zařízení je podobné tomu, co se používá pro UV/VIS detekci v kapalinové chromatografii. Zde je prodloužení optické dráhy ještě výrazně větší. Nevýhodou je komplikovaná montáž kapilár do cely a také nutnost velmi rovného řezu konců kapiláry, které se do cely zasouvají. Nerovnosti na řezu by způsobily vznik netěsností nebo mrtvých objemů a s ním spojené snížení účinnosti separace.



Obr. 10 Z-cela pro vysokou citlivost UV/VIS detekce. (A) Schématické znázornění, (B) řez reálným provedením detekční cely.

Nepřímá UV detekce

CE nám na rozdíl od HPLC nabízí jednu zajímavou možnost, a tou je nepřímá UV detekce. V roztoku uvnitř kapiláry musí být zachována elektroneutralita. Pokud budou naším analytem kationty, pak jejich kladný náboj musí být v roztoku kompenzován nějakými anionty. Stejně tak anionty přítomné v BGE kompenzují náboj kationtů BGE. Po zahájení separace kationty analytů své původní anionty ztratí, protože migrují opačným směrem. Přimigrují k nim však anionty z BGE, které pak kompenzují jejich kladný náboj. Pokud jsou v nějaké zóně přítomny kationty analytů, vytěsní z této zóny část kationtů základního elektrolytu, aby byla zachována elektroneutralita. Pokud náš analyt neabsorbuje UV/VIS záření a kation základního elektrolytu záření absorbuje, dojde k tomu, že v zóně analytu poklesne absorbance. To se na elektroferogramu projeví jako negativní pík. Dosažení nepřímé UV detekce je tedy velmi prosté. Stačí pouze v BGE použít ion, který absorbuje UV nebo viditelné záření. V případě, že jsou analyty kationty, použijeme absorbující kation, v případě, že jsou analyty anionty, použijeme absorbující anion. Rozdíl mezi přímou a nepřímou detekcí ilustruje **Obr. 11**.

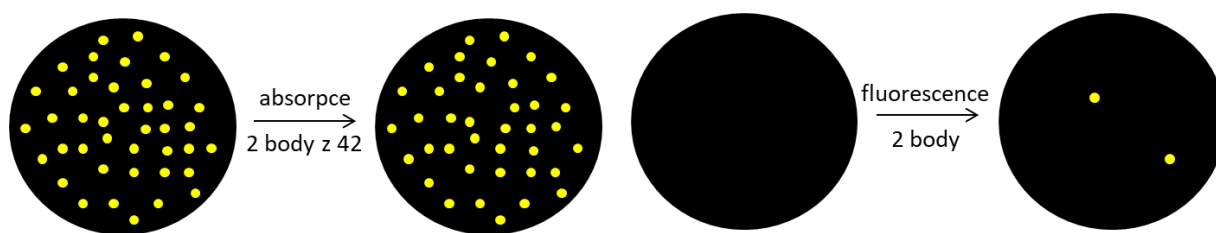


Obr. 11 Schématické znázornění rozdílů mezi přímou (A) a nepřímou (B) UV/VIS detekcí. Ukázka elektroferogramu získaného při přímé (C) a nepřímé (D) detekci.

Fluorescenční detekce

V případě, že máme analyty, které vykazují fluorescenci, nebo jsme schopni je derivatizovat tak, aby produkty derivatizace vykazovaly fluorescenci, můžeme použít velmi citlivý a selektivní fluorescenční detektor.

Důvod, proč je fluorescenční detektor v principu výrazně citlivější než absorpční, spočívá v tom, že při fluorescenci máme na začátku bez přítomnosti analytu prakticky nulový signál a měříme malé množství záření, které vzniká fluorescencí malého množství přítomného analytu. Pro dokreslení situace si můžeme představit, že v noci na stadionu sedí lidé potmě a dva z nich rozsvítí baterky. Ačkoli tam může být celkem několik tisíc lidí, jsme mezi nimi schopni velmi dobře najít dva, kteří rozsvítili. Absorbance odpovídá situaci, kdy na stadionu sedí několik tisíc lidí s rozsvícenými baterkami a dva z nich svou baterku zhasnou. Rozdíl bude daleko hůře patrný. To ilustruje také **Obr. 12**.



Obr. 12 Vyšší citlivost fluorescenční detekce ve srovnání s absorpční detekcí.

Na **Obr. 12** je dobře vidět, že zatímco rozsvícení dvou bodů z nuly je naprosto zřetelné. Zhasnutí dvou bodů ze 42 je velmi těžko viditelné, jak se sami přesvědčíte v domácím úkolu ☺. Obecně řečeno je vždy snazší sledovat malý přírůstek něčeho tam, kde na počátku nic není, než sledovat malý úbytek z relativně velkého počátečního množství.

Fluorescenční detektor bývá často konstruován tak, že emitované záření je měřeno ve směru kolmém k excitačnímu záření. Excitační záření prošlé vzorkem tak neinterferuje se zářením vzniklým fluorescencí. Není to ovšem pravidlem. Existují komerční přístroje, ve kterých se emitované záření měří ve stejném směru. Excitační záření je pak odfiltrováno vhodným filtrem, což je možné, protože emitované záření má vždy o něco vyšší vlnovou délku než záření excitační.

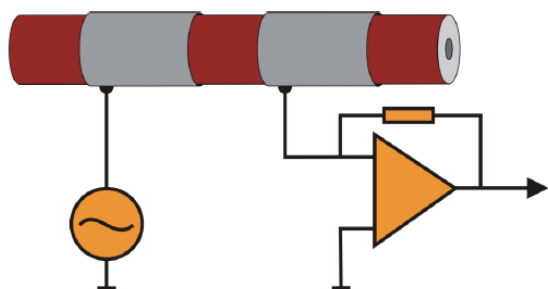
Pro CE a především pro elektroforézu na čípech je důležitou variantou **detektor s laserem indukovanou fluorescencí (LIF)**, který poskytuje citlivost dosahující až k možnostem hmotnostní spektrometrie. Stejně jako v případě absorpční detekce je možné využít i **nepřímou fluorescenční detekci**, pokud do BGE přidáme ko-ion, který má stejné znaménko náboje jako analyt a vykazuje fluorescenci.

Vodivostní detekce

Vzhledem k tomu, že BGE jsou vodivé a analyty jsou obvykle rovněž nabitě látky, je možné k detekci v CE využít rozdílů v elektrické vodivosti BGE a zón analytů. Existují detektory konstruované tak, že elektrody měřící vodivost jsou přímo v kontaktu s BGE a analyty. Zřejmou nevýhodou takového uspořádání je právě ten přímý kontakt. Reakcemi se složkami BGE nebo samotnými analyty se elektrody mohou různě pasivovat a reprodukovatelnost měření může být problematická.

Bezkontaktní vodivostní detekce (CCD)

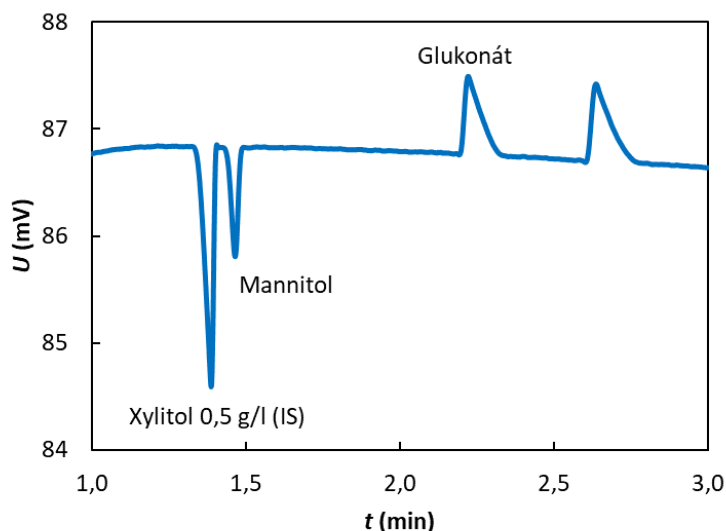
Někdy je také označována jako **C⁴D** z anglického **capacitively coupled contactless conductivity detection**. Konstrukce takového detektoru je na **Obr. 13**. Kapilára je provléknuta dvěma elektrodami, které mají tvar krátkých trubiček. Na první z nich je vkládáno vysokofrekvenční střídavé napětí. Tato elektroda slouží jako vysílač. Na druhé elektrodě, která slouží jako přijímač, je napětí snímáno. Snímaný signál se od vysílaného liší. Odlišnost obou signálů je mimo jiné ovlivněna vodivostí roztoku uvnitř kapiláry v prostoru mezi oběma elektrodami. Tento prostor tvoří „detekční celu“. Výhodou je, že obě elektrody mohou být umístěny blízko sebe, prostor mezi nimi může být velmi malý a detekční cela tím pádem může mít nepatrný objem a nepřispívat k rozmývání píků. Velkou výhodou je to, že elektrody nejsou v přímém kontaktu s roztokem, takže detektor je robustní a stabilní. Výměna kapiláry je také velmi snadná.



Obr. 13 Bezkontaktní vodivostní detektor.

Vodivostní detekce je téměř univerzální. Není nutné, aby analyty vykazovaly nějakou zvláštní vlastnost, jako například absorpci UV záření nebo fluorescenci. Je pouze nutné, aby se vodivost zóny analytu lišila od vodivosti BGE. Podle toho, zda je zóna analytu vodivá méně nebo více než BGE, je pík pozitivní nebo negativní. Na **Obr. 14** je vidět ukázka reálného záznamu elektroforetické separace s CCD. Jedná se o separaci sacharidových složek infuzního roztoku v borátovém BGE. (*Borát se pro separace sacharidů někdy používá, protože s nimi vytváří záporně nabitě estery, které lze separovat v CE. Jinak je pro disociaci hydroxylových skupin neutrálních sacharidů nutné použití roztoků o velmi vysokém pH a tedy i velmi vysoké vodivosti.*) Xylitol a mannitol vykazují menší vodivost než BGE, takže jejich píky jsou negativní. Glukonát, který má disociovanou karboxylovou skupinu, a tedy větší náboj naproti tomu vykazuje vyšší vodivost a pozitivní pík.

Další výhodou vodivostní detekce je to, že ji lze bez problémů používat i s kapilárami malého vnitřního průměru, aniž bychom výrazně ztráceli citlivost měření. Separace na **Obr. 14** byla prováděna v kapiláře o vnitřním průměru 20 μm .



Obr. 14 Separace sacharidových složek infuzního roztoku v borátovém BGE s použitím CCD.

Systémové píky

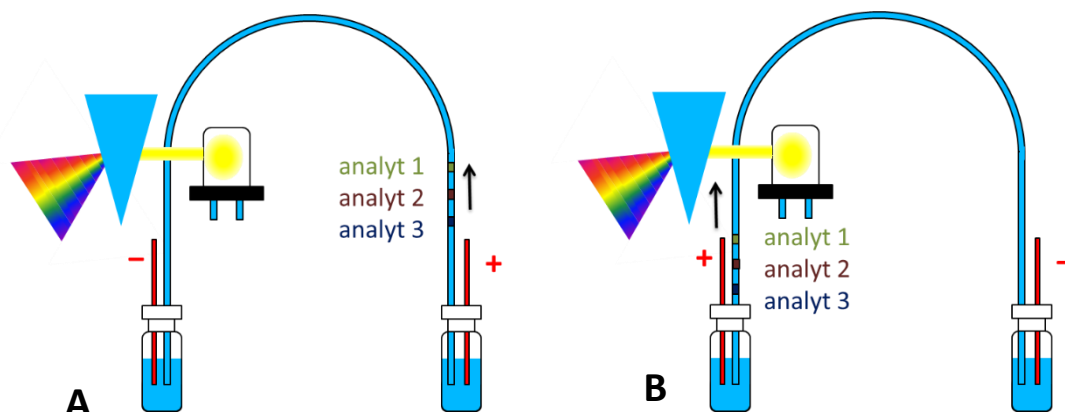
Univerzálnost vodivostní detekce přináší i jednu nevýhodu. V CE se objevují tzv. **systémové píky**. Ty jsou způsobeny poruchami ve složení základního elektrolytu, které v průběhu separace migrují kapilárou. Jejich původ souvisí s tím, že nadávkováním vzorku vložíme do kapiláry roztok jiného složení, než má základní elektrolyt. Tím přerušíme kontinuitu složení roztoku v kapiláře. Systém se pak chová tak, aby zachoval kontinuitu proudu a neutralitu roztoku, což vede ke vzniku různých lokálních odchylek v koncentracích jednotlivých složek BGE. Tyto koncentrační poruchy a odchylky pak mohou migrovat kapilárou s určitou elektroforetickou mobilitou, kterou lze předvídat například pomocí programu Peakmaster. Čím více složek vzorek obsahuje, tím více systémových zón kapilárou putuje a tím více systémových píků se v elektroferogramu může objevit. Jelikož jsou systémové píky často způsobeny lokálními výchyly koncentrace iontů základního elektrolytu, a ty obvykle neabsorbují UV/VIS záření, nejsou tak často viditelné v elektroferogramech získaných s použitím UV/VIS detekce. Při měření s vodivostní detekcí je jejich výskyt výrazně častější. Pokud systémové píky nezasahují do píků analytů, jejich přítomnost není na závadu. Poslední (neoznačený) pík na **Obr. 14** je právě systémový pík, který nijak neohrožuje analýzu, protože je separován od píků všech analytů.

Systémové píky se relativně často objevují i při použití nepřímé UV/VIS detekce, a to kvůli univerzálnější povaze této detekční techniky.

Separace na krátkém konci

V některých případech se může stát, že je rozlišení analytů zbytečně velké a separace trvá výrazně déle, než je nezbytné. Jednou možností, jak zkrátit analýzu, je zkrácení délky kapiláry. U komerčních přístrojů je však tato možnost limitována nejkratší možnou délkou kapiláry, kterou lze do přístroje umístit. Jak bylo uvedeno, bývá to zhruba 30 cm. Dráha, po které pak analyty migrují k detektoru se tím zkrátí na nějakých zhruba 20 cm, tedy na polovinu až třetinu běžné vzdálenosti. Nevýhodou takového zkracování celkové délky kapiláry je to, že se při zachování separačního napětí zvyšuje intenzita elektrického pole a tím i protékající proud. To zvyšuje riziko přehřívání roztoku v kapiláře.

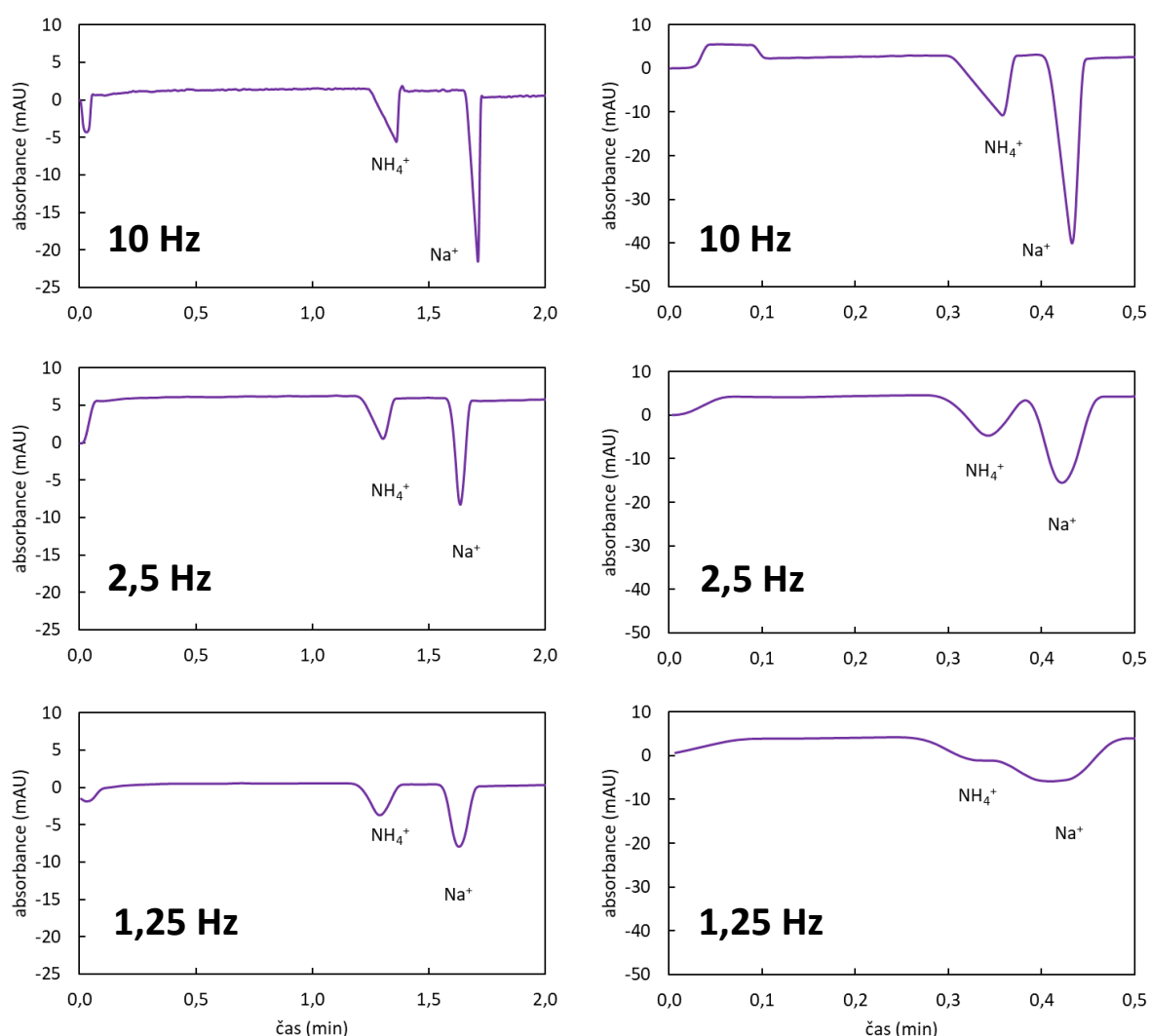
Elegantním řešením může být tzv. **separace na krátkém konci kapiláry**, anglicky *short-end separation*. V tomto případě se analyty dávkují na konci kapiláry, který je blíže detektoru a použije se obrácená polarita napětí. Při klasické délce kapiláry 50,0/41,5 cm se pak separace odehrává na pouhých 8,5 cm. Dráha migrace k detektoru se tak zkrátí na pětinu. Zároveň se nemění celková délka kapiláry a tím ani protékající proud. Srovnání separace na dlouhém a krátkém konci je na **Obr. 15**.



Obr. 15 Schéma uspořádání při klasické separaci kationtů na dlouhém konci (A) a rychlé separaci kationtů na krátkém konci kapiláry (B).

Frekvence sběru dat

V případě velmi rychlých separací, zvláště těch na krátkém konci kapiláry, je nutné věnovat pozornost i experimentálnímu parametru, na který se dnes často zapomíná. Je jím frekvence sběru dat. Počítač totiž nezaznamenává měřený signál detektoru kontinuálně, ale ukládá diskrétní hodnoty signálu v určitých časových rozestupech. Při velmi rychlé separaci může být počet datových bodů zaznamenaných při průchodu píku detektorem tak malý, že nevykreslí věrně tvar píku a dochází k jeho deformaci. Menší frekvence sběru dat celkově vyhlazuje signál a potlačuje šum základní linie. V dřívějších dobách byla také celkem silným argumentem pro menší frekvenci sběru dat velikost vznikajícího datového souboru. V dnešní době již toto omezení při použití běžných způsobů detekce není rozhodující. Lze proto doporučit volit frekvenci sběru dat spíše vysokou. Konečně i vyhlazení šumu je možné provést dodatečně čistě matematickým zpracováním naměřených dat. Vyhlazená data naměřená při nízké frekvenci však zpět do vysoké frekvence dopočítat nelze. **Obr. 16** ukazuje vliv frekvence sběru dat na získaný elektroferogram při relativně krátké separaci na dlouhém konci a velmi krátké separaci na krátkém konci kapiláry.



Obr. 16 Separace amonných a sodných iontů na dlouhém konci kapiláry (levý sloupec) a na krátkém konci kapiláry (pravý sloupec). Elektroferogramy, které jsou v sloupci pod sebou znázorňují totožnou separaci, pouze zaznamenanou s různou frekvencí sběru dat uvedenou v Herzích.