

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**  
**FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**  
**KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE**



**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

*VYUŽITÍ ELEKTROFORETICKÝCH METOD V ANALÝZE  
LÁTEK PŘÍRODNÍHO PŮVODU*

HRADEC KRÁLOVÉ 2007

JAN HONEGR

*Chtěl bych poděkovat Doc. RNDr. Marii Pospíšilové, CSc. za odborné vedení, trpělivost a cenné rady při vypracování diplomové práce. Dále děkuji Mgr. Jiřímu Šafrovi, Mgr. Pavlu Jáčovi a všem pracovníkům Katedry analytické chemie za ochotu a pomoc.*

# UTILISATION OF ELECTROMIGRATION METHODS IN ANALYSIS OF NATURALLY OCCURRING COMPOUNDS

Jan Honegr

## ABSTRACT

A transient isotachopheresis-capillary zone electrophoresis (tITP-CZE) method has been developed for pre-concentration and determination of nine analytes: caffeic, chlorogenic, o-coumaric, p-coumaric, ferulic and protocatechuic acid, and kaempferol, quercetin and rutin. The effects of several factors such as control of EOF, pH and concentration of the running buffer, addition of organic solvents and their concentrations, addition of cyclodextrins, the duration of injection and the  $\lambda$  max of UV detection were investigated to find the optimum conditions. Under these conditions, the analytes were separated within 15 min. Linearity was evaluated for concentration range 2.5-37.5 $\mu$ g/ml with  $R = 0.9924$ - $0.9983$ ; the detection limits (S/N 3:1) ranged from 203ng/ml to 5.556 $\mu$ g/ml. The relative standard deviations of the migration times (peak areas) were between 0.79 and 1.01% (1.34 and 2.13%).

# VYUŽITÍ ELEKTROMIGRAČNÍCH METOD V ANALÝZE LÁTEK PŘÍRODNÍHO PŮVODU

Jan Honegr

## ABSTRAKT

Pro analýzu devíti fenolických kyselin a flavonoidů (kyseliny ferulová protokatechová, kávová, o-kumarová, p-kumarová a chlorogenová a rutin, kvercetin a kaempferol) byla vyvinuta metoda přechodné isotachoforézy-zónové elektroforézy za účelem zvýšení citlivosti CZE. Byly sledovány vlivy různých faktorů na kvalitu separace, jako jsou vliv EOF, pH\*, koncentrace borátového pufru, přídavek organického rozpouštědla a jeho koncentrace, přídavek cyklodextrinů a jejich koncentrace, doba nástřiku, teplota a vlnová délka detekce. Za optimálních podmínek proběhla analýza v průběhu 15 minut. Byla ověřena lineární závislost v rozsahu koncentrací 2,5 μg/ml - 37,5 μg/ml a zjištěny detekční limity (S/N 3:1) v rozsahu 203 ng/ml až 554 ng/ml. RSD migračních časů, resp. ploch píků byly v rozsahu 0,79-1,01%, resp. 1,34-2,13%.

# 1. OBSAH

<b>1. OBSAH</b> .....	<b>5</b>
<b>2. ÚVOD</b> .....	<b>9</b>
<b>3. TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>11</b>
<b>3.1. Kapilární elektromigrační metody</b> .....	<b>12</b>
3.1.1. Isotachoforéza .....	13
3.1.2. Kapilární zónová elektroforéza .....	14
3.1.3. Jouleovo teplo .....	15
3.1.4. Difúze.....	15
3.1.5. Elektromigrační disperze .....	16
3.1.6. Adsorpce .....	16
<b>3.2. Základní elektroforetické charakteristiky</b> .....	<b>16</b>
3.2.1. Elektroforetická pohyblivost .....	16
3.2.2. Elektroosmotická pohyblivost.....	18
3.2.3. Celková pohyblivost .....	19
3.2.4. Migrační čas.....	20
<b>3.3. Možnosti ovlivnění separace</b> .....	<b>21</b>
3.3.1. Ovlivnění EOF .....	21
3.3.2. Tvorba komplexů .....	26
3.3.3. Tvorba iontových asociátů .....	26
3.3.4. Tvorba hostitelských komplexů .....	26
<b>3.4. Metody užívané k zakoncentrování vzorku</b> .....	<b>27</b>
3.4.1. Extrakce na pevnou fázi .....	27
3.4.2. Zametání – Sweeping .....	27
3.4.3. Polem zesílené zakoncentrování vzorku .....	28
3.4.4. Stacking z velkého objemu vzorku .....	28
3.4.5. Zakoncentrování zprostředkované pomocí pH.....	29
3.4.6. Isotachoforetické zakoncentrování.....	29
<b>3.5. Kombinace ITP–CZE</b> .....	<b>29</b>
3.5.1. Dvoukolonové spojení ITP–CZE (column–coupling).....	30
3.5.2. ITP-CZE v jednokolonovém uspořádání.....	31

<b>3.6. Analyzované látky .....</b>	<b>38</b>
3.6.1. Fenolické kyseliny .....	38
3.6.2. Flavonoidy .....	39
<b>4. CÍL PRÁCE.....</b>	<b>40</b>
<b>5. PRAKTICKÁ ČÁST .....</b>	<b>42</b>
<b>5.1. Chemikálie a roztoky.....</b>	<b>43</b>
5.1.1. Chemikálie .....	43
5.1.2. Roztoky .....	44
<b>5.2. Přístroje.....</b>	<b>44</b>
5.2.1. Kapilární elektroforetický systém PrinCE .....	45
<b>5.3. Pracovní a výpočetní postupy .....</b>	<b>45</b>
5.3.1. Pracovní postup.....	45
5.3.2. Vývoj a optimalizace metody.....	45
5.3.3. Detekční limit.....	46
5.3.4. Opakovatelnost metody.....	46
5.3.5. Rozlišení .....	46
<b>6. VÝSLEDKY A DISKUZE .....</b>	<b>47</b>
<b>6.1. Optimalizace separačních podmínek .....</b>	<b>48</b>
6.1.1. Volba podmínek pro CZE .....	48
6.1.2. Detekce .....	53
6.1.3. Optimalizace přechodné isotachofórézy (tITP-CZE).....	54
6.1.4. Optimální podmínky separace.....	55
6.1.5. Kalibrační závislost.....	56
6.1.6. Limity detekce a kvantifikace. ....	58
6.1.7. Opakovatelnost metody.....	58
6.1.8. Koncentrační faktor.....	59
6.1.9. Rozlišení .....	59

<b>7. ZÁVĚRY .....</b>	<b>61</b>
<b>8. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....</b>	<b>64</b>
<b>9. POUŽITÉ ZDROJE .....</b>	<b>66</b>



## **2. ÚVOD**

Kapilární zónová elektroforéza je progresivní analytická metoda, využívaná k analýze látek schopných nést elektrický náboj. Mezi její přednosti patří vysoká separační účinnost a široké spektrum použití: od separace biopolymerů a sekvenování DNA až po analýzu organických a anorganických iontů. Další předností je šetrnost k životnímu prostředí vzhledem k práci s velmi malými objemy organických rozpouštědel. Nedostatkem této metody je, že při běžné UV detekci je přibližně o dva řády méně citlivá než vysokoúčinná kapalinová chromatografie. Existuje ovšem několik postupů ke zvýšení detekčních limitů jak kapilární zónové elektroforézy samotné, tak zejména velmi výhodně v kombinaci s isotachoforézou.

### **3. TEORETICKÁ ČÁST**

K analýze složitých směsí látek využívá analytická chemie rozličné metody, jež jsou založeny na různých fyzikálně chemických základech. Jsou to zejména metody chromatografické a elektromigrační. Elektromigrační metody jsou založeny na rozdílné schopnosti analytů pohybovat se ve vhodném médiu, jímž je nejčastěji vodný pufr, pod vlivem elektrického pole[1].

Elektromigrační metody v kapilárním uspořádání (kapilární elektroforéza, CE) mají proti chromatografickým (zejména pak proti vysokoúčinné kapalinové chromatografii, HPLC) některé významné výhody. Mezi nejvýznačnější lze zařadit např. velmi nízkou spotřebu vzorků a organických rozpouštědel a zejména mnohem vyšší separační účinnost.

Hlavní nevýhody jsou, že separované látky by měly být schopné nést elektrický náboj a výrazně nižší detekční limity [2] (LOD) oproti HPLC při využití nejběžnějšího způsobu detekce - měření UV absorbance. Dle Lambert - Beerova zákona:

$$A = \varepsilon \cdot l \cdot c$$

**Rovnice 1**

je totiž absorbance  $A$  závislá na molárním absorpčním koeficientu  $\varepsilon$ , na délce optické dráhy  $l$  a na koncentraci látky  $c$ . Poslední dvě uvedené hodnoty jsou při CE velmi nízké. To je způsobeno jednak malými dávkovacími objemy, a z toho vyplývajícími nízkými koncentracemi vzorků, a úzkým průsvitem kapiláry. Z tohoto důvodu bylo vyvinuto množství technik umožňujících zakoncentrování vzorku [3]. V této práci se budu zabývat zejména přechodnou isotachoforézou (tITP) v kapilární zónové elektroforéze (CZE) která umožňuje eliminovat oba dva tyto nejvýznamnější nedostatky.

### **3.1. Kapilární elektromigrační metody**

Při využití těchto metod probíhá separace v kapiláře, jejíž oba konce jsou ponořeny do nádobek s elektrolytem. Do nich jsou vloženy rovněž elektrody vysokonapěťového zdroje, jenž vytváří elektrické pole, které je hybnou silou separace.

Rozlišujeme následující varianty kapilární elektroforézy:

- isotachoforéza (ITP)
- kapilární zónové elektroforéza (CZE)
- kapilární gelová elektroforéza (CGE)
- micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC)
- kapilární elektrochromatografie (CEC)

- kapilární isoelektrická fokusace (IEF)

Separační procesy se u jednotlivých variant značně liší. Zatímco např. v zónové elektroforéze a isotachoforéze dochází k dělení látek na základě rozdílné elektroforetické pohyblivosti, v elektrochromatografii dochází k separaci na základě rozdílů rozdělovacích koeficientů mezi stacionární a mobilní fázi a isoelektrická fokusace využívá k dělení látek rozdíl v jejich isoelektrických bodech [4].

### 3.1.1. Isotachoforéza

Isotachoforéza je separační technika, která na rozdíl od zónové elektroforézy pracuje v prostředí s diskontinuálním elektrolytovým systémem. V isotachoforéze vytváří jednotlivé složky vzorku v kapiláře přesně definované zóny, jež migrují kapilárou stejnou rychlostí za sebou v pořadí jejich mobilit[5]. Tyto zóny jsou velmi přesně ohraničeny, přičemž mají společné rozhraní. Zóny vzorku jsou sevřeny vedoucím elektrolytem (leading electrolyte - LE) a koncovým elektrolytem (terminating electrolyte - TE).

Vedoucí elektrolyt obsahuje vedoucí iont (tzv. koiont) a protiion. Vedoucí iont musí mít vyšší rychlost než všechny ostatní analyzované složky vzorku. Koncový elektrolyt pak obsahuje tzv. koncový iont, který musí mít efektivní pohyblivost menší, než kterákoli ze sledovaných složek vzorku[6].

Jednotlivé zóny putují kapilárou stejnou rychlostí, která je konstantní, za podmínky že k separaci použijeme konstantního proudu. Tím pádem vzrůstá od vedoucího ke koncovému iontu intenzita elektrického pole. S tím souvisí tzv. samozaostřující efekt. Když se iont s nižší elektroforetickou pohyblivostí dostane do zóny pohyblivějšího iontu, klesne jeho elektroforetická rychlost v důsledku nižší intenzity elektrického pole v této zóně a vrátí se zpět do své zóny Rovnice 3. Naopak, pokud se iont s vyšší pohyblivostí opozdí, je v zóně pomalejšího iontu urychlen a vrátí se zpět do své zóny. Tím je docíleno, že rozhraní zůstávají ostrá a nerozmyývají se.

Rozdílná velikost intenzity elektrického pole se také projevuje na koncentračních poměrech v jednotlivých zónách. Všemi zónami protéká konstantní proud. Podle Ohmova zákona:

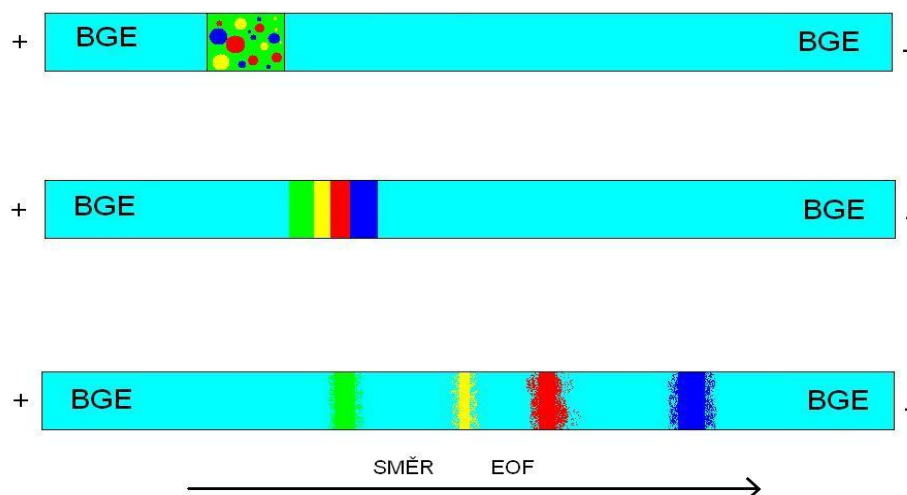
$$I = konst. = \frac{E}{R}$$

**Rovnice 2**

musí v zónách vzrůstat odpor přímo úměrně narůstajícímu spádu napětí. Aby tato podmínka mohla být splněna, upravují se v zónách samovolně koncentrace tak, aby odpovídaly Kohlrauschově regulační funkci. Podle ní je součet podílu koncentrací a pohyblivostí v ustáleném stavu ve všech zónách konstantní. Každá zóna upravuje svou koncentraci stejným mechanismem na koncentraci zóny předchozí. Koncentrace je v každé zóně konstantní a není závislá na nadávkovaném množství.[3, 4].

### **3.1.2. Kapilární zónová elektroforéza**

Kapilární zónová elektroforéza je nejjednodušší formou kapilární elektroforézy. Pro CZE je typické použití jediného pracovního elektrolytu (BGE, background). V celé kapiláře je tedy konstantní elektrické pole. Vzorek se dávkuje jako roztok, do určitého místa migračního prostoru, ve formě úzké zóny. Po nadávkování vzorku do kapiláry se oba její konce ponoří do nádobek s elektrolytem, ke kterým se připojí stejnosměrné vysoké napětí. Za normálních podmínek se konec kapiláry obsahující nadávkovaný vzorek připojuje k anodě a konec s detektorem ke katodě. Analyty se pohybují ke katodě různými rychlostmi, které jsou závislé na jejich elektroforetické pohyblivosti a pohyblivosti elektroosmotického toku. Zároveň se kationty oddělují od aniontů a vzniká tak řada prostorově odlišených zón jednotlivých složek původní směsi. Tyto zóny si však bohužel nezachovávají původní šířku a ostré rozhraní. Vlivem difúze se časem rozšiřují a jejich okraje ztrácejí na ostrosti. Tím se koncentrace v zónách snižuje a stává se nerovnoměrnou. Jakmile dojde k rozdělení na jednotlivé zóny, může dojít k analytickému vyhodnocení pomocí detekčního zařízení. Látky migrují kapilárou dále, až všechny projdou určitým místem, kde je detekční cela. Záznam analýzy, jenž se nazývá elektroforeogram, reprezentuje závislost odezvy určitého detektoru na čase. Průběh separace popisuje Obr. 1



**Obr. 1; Průběh separace při CZE**

V kapiláře se při elektromigraci uplatňují ještě další jevy, které ovlivňují průběh separace. Tyto jevy mohou působit velmi negativně a tak jsou individuální zóny promíchávány a rozmývány.[1,4].

### 3.1.3. Jouleovo teplo

Průchod elektrického proudu kapilárou způsobuje zahřívání jejího obsahu. Tento ohřev je limitujícím faktorem pro používání vysokých elektrických napětí při snaze o zrychlení analýzy. Jouleovým ohřevem se zvyšuje střední teplota zón, což má za následek jak ovlivnění mobility migrujících analytů, tak může dojít k destrukci termolabilních látek, případně k vypařování organické části tlumivého roztoku, což vede k přerušení analýzy. Další problémy plynou z toho, že teplo vzniká v celém průmětu kapiláry, ale odváděno je pouze na okrajích, kde se elektrolyt stýká se stěnami kapiláry. Tím je dáno, že vnitřní část sloupce elektrolytu v kapiláře má vyšší teplotu než jeho okrajové části. Přítomnost teplotních gradientů má za následek nehomogenitu mobility, hustoty, pH atd. Vzhledem k teplotní závislosti mobilit je vliv ohřevu na rozmývání zřejmý.

### 3.1.4. Difúze

Vlivem difúze dochází k rozmývání elektroforetických zón, u kterých se nezachovává původní šířka a ostré rozhraní. Difúze rozšiřuje zónu symetricky a výsledný koncentrační profil má tvar Gaussovy křivky.

### **3.1.5. Elektromigrační disperze**

Rozdíl v pohyblivosti analytu a iontu pracovního elektrolytu způsobuje asymetrii elektroforetického píku. Má-li analyt větší pohyblivost, je v jeho zóně nižší intenzita elektrického pole. Pokud ionty na čelním rozhraní opouštějí difúzní zónu, dochází k jejich urychlení a čelní rozhraní je plošší, než by odpovídalo prostému vlivu elektromigrační disperze (tzv. fronting). Pokud ionty ze zadního rozhraní opustí zónu, jsou urychleny a vráceny zpět.

Podobným mechanismem vzniká asymetrie (tzv. chvostování, tailing) při migraci analytu pomalejšího než co-ion pracovního elektrolytu. Zónu analytu o stejné elektroforetické pohyblivosti jako ion BGE není elektromigrační disperzí ovlivněna.

### **3.1.6. Adsorpce**

Vzhledem k tomu, že na upravených stěnách křemenných kapilár, ale i teflonových a obzvláště pak skleněných, jsou vždy po naplnění elektrolytem přítomny ionizované skupiny, dochází k hromadění opačně nabitých analytů v blízkosti stěn separační kapiláry. Stěny se pak vůči separovaným iontům chovají jako ionex, což vede ke zvýšené sorpci, obzvláště u makromolekul s malými difúzními koeficienty. Tato sorpce vede obvykle k rozmývání separovaných zón, což se projeví silným chvostováním píků. Sorbované látky mohou změnit rozložení náboje podél stěn separační kapiláry a tím lokálně ovlivnit elektroosmotický tok. To vede k rozmývání zón separovaných látek a případně až k zne-možnění analýzy. Tyto jevy lze ovlivnit změnou pH pracovního elektrolytu a nebo lépe deaktivací stěn kapiláry.

## **3.2. Základní elektroforetické charakteristiky**

### **3.2.1. Elektroforetická pohyblivost**

Elektroforéza je pohyb nabitých částic v roztoku vlivem elektrického pole. Rychlost, jakou se částice pohybuje, je přímo úměrná intenzitě elektrického pole a platí:



$$v_{ef} = \mu_{ef} \cdot E$$

**Rovnice 3**

kde  $v_{ef}$  je elektroforetická rychlost a  $E$  je intenzita elektrického pole.

Konstanta úměrnosti  $\mu_{ef}$  se nazývá elektroforetická pohyblivost a platí pro ni:

$$\mu_{ef} = \frac{q}{6\pi \cdot \eta \cdot r}$$

**Rovnice 4**

Kde  $q$  je náboj částice,  $\eta$  viskozita kapaliny a  $r$  je poloměr částice. Čili elektroforetická pohyblivost je přímo úměrná náboji částice a nepřímo úměrná poloměru částice a viskozitě prostředí[1].

### **3.2.1.1. Iontová pohyblivost**

V okolí každého iontu v roztoku vytváří ionty opačného náboje tzv. iontovou atmosféru. Interakce mezi ionty ovlivňuje pohyblivost sledovaného iontu - s rostoucí koncentrací pohyblivost iontu klesá. Extrapolací koncentrační závislosti elektroforetické pohyblivosti na nulovou iontovou sílu získáme iontovou pohyblivost  $\mu_0$ . S rostoucí teplotou se iontová pohyblivost zvyšuje (zvýšení teploty o 1 K vede ke zvýšení pohyblivosti o 2%)[7]

### **3.2.1.2. Skutečná pohyblivost**

Skutečná pohyblivost je konstantou, která charakterizuje pohyblivost iontu při reálných podmínkách, tedy při určité teplotě v určitém prostředí a při určité iontové síle. Obvykle bývá nižší než  $\mu_0$ , což je zapříčiněno vzájemnými interakcemi iontů.[4,7]

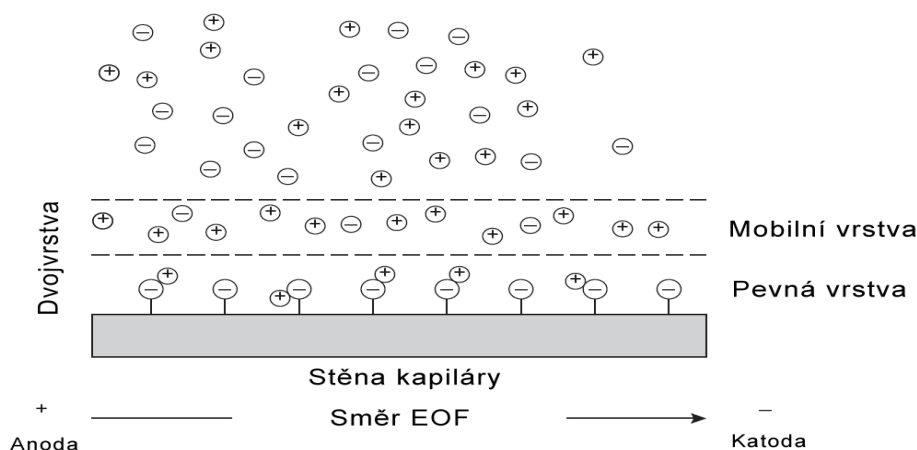
### **3.2.1.3. Efektivní pohyblivost**

Slabé kyseliny, baze a zwitteriony se v roztoku vyskytují ve dvou formách (jako ionty a neionizované molekuly). Neionizované formy mají nulovou pohyblivost. Protože ionizační rovnováha probíhá rychleji než elektromigrace, putují všechny formy látky jednou výslednou rychlostí. Výsledná pohyblivost je nazývá efektivní pohyblivost.

Efektivní pohyblivost látky lze ovlivnit změnou pH roztoku. Jde o způsob dělení směsi kyselých či bazických látek[4].

### 3.2.2. Elektroosmotická pohyblivost

Elektroosmóza je jev, který působením elektrického pole způsobuje pohyb elektrolytu v kapiláře směrem ke katodě. Vyskytuje v důsledku skutečnosti, že vnitřní povrch kapiláry je za běžných podmínek elektricky nabitý. Povrch křemenné kapiláry obsahuje velké množství silanolových skupin (Si-OH). Při pH přibližně okolo 2 až 3 se tyto skupiny ionizují na záporně nabitě ionty Si-O<sup>-</sup>.



Obr. 2; Vznik elektroosmotického toku; převzato z Harvey[1]

Jak je patrné z Obr. 2, kationty z roztoku pufru jsou přitahovány k těmto iontům. Některé jsou přitahovány velmi pevně a vytvoří tak vnitřní, tzv. pevnou vrstvu. Další jsou rovněž přitahovány, ale ne již tak silně a tyto vytvoří druhou, vnější tzv. mobilní, vrstvu. Tyto dvě vrstvy jsou obecně nazývány dvojvrstva. Kationty z vnější mobilní vrstvy jsou taženy směrem ke katodě a protože jsou solvatovány, strhávají s sebou i molekuly rozpouštědla a tím způsobují elektroosmotický tok (EOF)[1].

#### 3.2.2.1. Elektroosmotický tok

Rychlost elektroosmotického toku  $v_{eof}$ , je závislá na elektroosmotické pohyblivosti  $\mu_{eof}$  tlumivého roztoku a intenzitě elektrického pole  $E$

$$v_{eof} = \mu_{eof} \cdot E$$

Rovnice 5

Elektroosmotická pohyblivost je definována:

$$\mu_{eof} = \frac{\varepsilon \cdot \zeta}{4\pi \cdot \eta}$$

**Rovnice 6**

Kde  $\varepsilon$  je dielektrická konstanta roztoku pufru,  $\zeta$  je zéta potenciál a  $\eta$  je viskozita roztoku pufru. Z uvedených rovnic vyplývá že  $\zeta$  potenciál hraje důležitou roli při určení rychlosti EOF. Dva faktory ovlivňují  $\zeta$  potenciál a s ním i velikost EOF.

Zéta potenciál je přímo úměrný náboji, jenž nese kapilární stěna, tedy se zvyšující se hustotou silanolových skupin na stěně kapiláry roste i  $\zeta$  potenciál. Při velmi nízkém pH (menším než 2) je vnitřní povrch kapiláry nenabitý, což vede k tomu, že  $\zeta$  potenciál a tedy i rychlost EOF se limitně blíží nule. Jak pH postupně vzrůstá, zároveň roste i  $\zeta$  potenciál a s ním i rychlost EOF.

Dále je  $\zeta$  potenciál přímo úměrný šířce dvojvrstvy. Zvýšení iontové síly roztoku pufru přináší větší koncentraci kationtů v roztoku a tím dojde k zúžení dvojvrstvy. Následkem toho je snížení EOF.[1]

Profil elektroosmotického toku je oproti hydrodynamickému téměř plochý, což přispívá k menšímu rozmývání zón a tím k lepší separační účinnosti elektroforézy.

Ovlivnění elektroosmotického toku je jedna ze základních možností jak ovlivnit separaci[8].

### 3.2.3. Celková pohyblivost

Celková rychlost  $v_{tot}$  pohybu látky je výslednicí její elektroforetické rychlosti a rychlosti elektroosmotického toku.

$$v_{tot} = v_{ef} + v_{eof}$$

**Rovnice 7**

a zároveň:

$$\mu_{tot} = \mu_{ef} + \mu_{eof}$$

**Rovnice 8**

Za normálních podmínek a při klasickém uspořádání kapilární elektroforézy nejrychleji migrují kationy, protože k jejich mobilitě se přičítá mobilita EOF. Přitom malé, vysoce nabitě kationty migrují před většími, méně nabitými kationty. Neutrální látky migrují jako

jediná zóna, přičemž jejich rychlost a mobilita je rovna rychlosti a mobilitě EOF. Nejpomaleji migrují kapilárou anionty, neboť vektor jejich rychlosti je opačný proti vektoru EOF, tedy vlastně migrují proti toku. Zdánlivě nejpomalejší tedy budou malé vysoce nabitě anionty. V případě že  $\mu_0$  (aniontu) je větší než  $\mu_{eof}$ , anionty vymigrují z kapiláry a nedojdou vůbec k detektoru[1].

### 3.2.4. Migrační čas

Elektroforetickou pohyblivost ani elektroosmotickou pohyblivost nemůžeme měřit přímo experimentálně. Musíme je zjistit z migračního času  $t_m$ .

$$t_m = \frac{l}{v_{tot}}$$

**Rovnice 9**

kde  $l$  je efektivní délka kapiláry a pokud platí

$$v_{tot} = \mu_{tot} \cdot E = (\mu_{ef} + \mu_{eof}) \cdot E$$

**Rovnice 10**

dosazením do rovnice získáme

$$t_m = \frac{l}{(\mu_{ef} + \mu_{eof}) \cdot E}$$

**Rovnice 11**

přičemž pro velikost elektrického pole platí

$$E = \frac{V}{L}$$

**Rovnice 12**

Kde  $V$  je aplikovaný potenciál a  $L$  celková délka kapiláry.

$$t_m = \frac{l \cdot L}{(\mu_{ef} + \mu_{eof}) \cdot V}$$

**Rovnice 13**

dosazením do Rovnice 11 a Rovnice 8 získáme:

$$t_m = \frac{l \cdot L}{\mu_{tot} \cdot V}$$

**Rovnice 14**

Dosazením do předchozích rovnic můžeme vypočítat jak elektroosmotickou pohyblivost (dosazením migračního času elektroneutrální látky), tak elektroforetickou pohyblivost analytu. Jak je patrné z Rovnice 14, můžeme zkrátit migrační čas a tím celou dobu analýzy například zvýšením napětí nebo zkrácením kapiláry nebo ovlivněním EOF[1,8].

### **3.3. Možnosti ovlivnění separace**

Při analýze směsi látek je potřeba maximalizovat rozdíly v migračních časech alespoň hlavních komponent vzorku. Toho lze dosáhnout ovlivněním EOF, změnou pH pracovního elektrolytu, přidavkem vhodného komplexujícího činidla nebo látek vytvářející hostitelské komplexy, přidavkem tenzidů, přidavkem nevodného rozpouštědla nebo prodloužením kapiláry. Prodloužení kapiláry je vždy až poslední krok, neboť se vždy prodlouží čas analýzy.

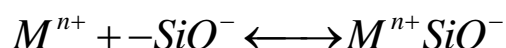
#### **3.3.1. Ovlivnění EOF**

Ovlivněním rychlosti elektroosmózy můžeme dosáhnout vysokého rozlišení nebo vysoké rychlosti analýzy. Normální elektroosmotický tok může být zpomalen přidavkem aditiv, jako např. organickými rozpouštědly, nebo ionty  $Mg^{2+}$  nebo hexamethonia, jejichž ionty se vážou s ionty silanolových skupin a tím dochází ke snížení efektivního náboje vnitřního povrchu kapiláry.

Další možností je použití kationických polyelektrolytů, kationických surfaktantů, nebo směsi kationických a anionických surfaktantů, jež nám vytvoří pokrytí vnitřního povrchu kapiláry a tím vedou ke změně směru EOF[8,9].

##### **3.3.1.1. Dynamická iontová výměna na kapilární stěně.**

Jak je patrné z Obr. 2, je ve vnější oblasti difúzní dvojvrstvy na kapilární stěně nadbytek kationtů, jejichž pohybem vzniká EOF. Navíc jsou zde ještě kationty, jež jsou v těsném kontaktu se silanolovými skupinami a které se vyskytují v pevné vrstvě. Mezi těmito kationty a kationty pufru se ustavuje iontovýměnná rovnováha, jež se dá popsat takto:



Rovnice 15

Přítomnost těchto kationtů v pevné vrstvě mobilní dvojvrstvy snižuje efektivní náboj kapilární stěny a tím i EOF. Schopnost redukce EOF se snižuje v řadě:  $Ca^{2+} > Ba^{2+} > Mg^{2+} > Sr^{2+} > Cs^{+} \approx Rb^{+} > K^{+} > NH_4^{+} > Bu_4N^{+} > TrisH^{+} > Na^{+} > Li^{+}$ . K ovlivnění elektroosmózy se více než jednomocné kationty alkalických kovů hodí dvojmocné kationty kovů alkalických zemin. Z nich je nejpoužívanější  $Mg^{2+}$  pro jeho vysokou rozpustnost v tlumivých roztocích.

Jak je patrné z uvedené řady, monovalentní aminy ovlivňují EOF se stejným účinkem jako kationty jednomocných kovů. Proto není překvapující, že diaminy potlačují EOF stejně účinně jako kationty kovů alkalických zemin. Nejpoužívanějším z nich je hexamethonium - 1,6-bis(trimethylamonium)hexan ve formě bromidu. Těžištěm jeho využití je analýza malých organických a anorganických aniontů[8].

### 3.3.1.2. Pokrývání stěny kapiláry pomocí kationických polymerů

Logickým vyústěním používání diaminů bylo zavedení polykationických polymerů. Tyto polyelektrolyty se v důsledku velmi silné vzájemné elektrostatické přitažlivosti mezi polymerem a silanolovými skupinami adsorbují na kapilární stěnu. To přináší obrácení směru EOF (elektroosmóza postupuje směrem ke katodě). Pro otočení EOF stačí již velmi nízké koncentrace polyelektrolytu, v rozsahu od 0,001–0,4%. v tomto rozsahu je velikost EOF nezávislá na koncentraci použité látky, závisí pouze na typu kationtu. Přičemž pravděpodobně souvisí s hustotou náboje na polymeru. Vedoucími látkami této skupiny jsou diethylaminoethyl-dextran (DEAED) a hexadimetřin bromid (HDB, Polybren).

Tyto modifikátory EOF bývají většinou součástí roztoku BGE. Což ovšem může mít za následek interakce s některými složkami vzorku. Tyto interakce nám někdy mohou pomoci zvýšit selektivitu analýzy, ale na druhou stranu mohou nepříznivě ovlivnit analýzu (rozmýváním píků a prodloužením migračních časů)

Proto byly vyvinuty postupy jak snížit tyto interakce. Postup spočívá v promytí kapiláry roztokem kationického polymeru před analýzou. Polymer se tedy může naadsorbovat na povrch kapiláry aniž by musel být přímo přítomen v roztoku BGE. Jsou popsány práce kde

podobné pokrytí vede k dlouhodobému přetrvání (25 analýz) efektu otočení toku jen s 9% změnou  $\mu_{eof}$ .

V praxi se ukazuje, že využití kationických polymerů pro analýzu aniontů nemůže být zcela rutinní záležitostí a to ze dvou hlavních důvodů. Pro ustálení podmínek mezi kationtem a kapilárou, které je zcela nezbytné pro dobrou reprodukovatelnost výsledků, může být potřeba dosti dlouhého času, což činí vývoj nové metody obtížným. A dále chování elektrolytu je závislé na molekulové hmotnosti, která ovšem v některých studiích nebývá udávána, což představuje problém pro přenesení metody z jedné laboratoře do druhé[8].

### 3.3.1.3. Dynamické pokrytí kationickými surfaktanty

Kationické surfaktanty jako cetyltrimethylamonium bromid (CTAB), tetradecyltrimethylamonium bromid (TTAB) a didodecylmethylamonium bromid (DDAB) se ukázaly jako velmi vhodné látky pro změnu směru EOF. Metoda patentovaná firmou Waters, založená na použití 0,5mM TTAB v roztoku 5mM chromátu, umožnila dokonalou separaci 30 aniontů v průběhu 89 sekund. Tento obrovský pokrok měl za následek prudký rozvoj používání kationických surfaktantů k analýze aniontů. I přes své široké rozšíření, není zcela přesně znám mechanismus, jakým dochází k ovlivnění EOF. Otočení EOF je zřejmě následkem agregačních pochodů mezi molekulami surfaktantu, jak je znázorněno na Obr. 3 [8]

#### *Tvorba micel*

Když je surfaktant přítomen v roztoku v koncentraci větší, než je jeho kritická micelární koncentrace (KMK), začnou jednotlivé volné molekuly postupně tvořit micely. Hnací silou tohoto pochodu jsou nepříznivé interakce mezi uhlovodíkovým řetězcem a vodou.

Hydrofobní části molekul smáčedla tvoří jádro micely ve snaze minimalizovat kontakt s vodou. Prodloužení délky řetězce zvýší tendenci k hydrofobnímu spojování a tím sníží i KMK. Prodloužení postranního řetězce však nevykazuje žádný vliv na změnu  $\mu_{eof}$ .

Dalším faktorem ovlivňujícím tvorbu micel je elektrostatická repulze mezi hydrofilními hlavičkami.[8] Zatímco hydrofobní interakce mezi postranními řetězci napomáhají tvorbě micel, repulze mezi hlavičkovými doménami inhibují jejich tvorbu. Často se přehlíží skutečnost, že elektrolyt, ve kterém je surfaktant rozpuštěn, také velmi výrazně ovlivňuje KMK. Roztok BGE ovlivňuje KMK dvěma způsoby. Odstíněním elektrostatické

repulze mezi hlavičkovými doménami molekul smáčedla v micelách a nebo iontovou interakcí mezi hlavičkou smáčedla a koiontu BGE.

### ***Tvar micel***

Tvar micely závisí na poměru  $P$ , pro který platí:

$$P = \frac{V}{a_0 \cdot l_f}$$

**Rovnice 16**

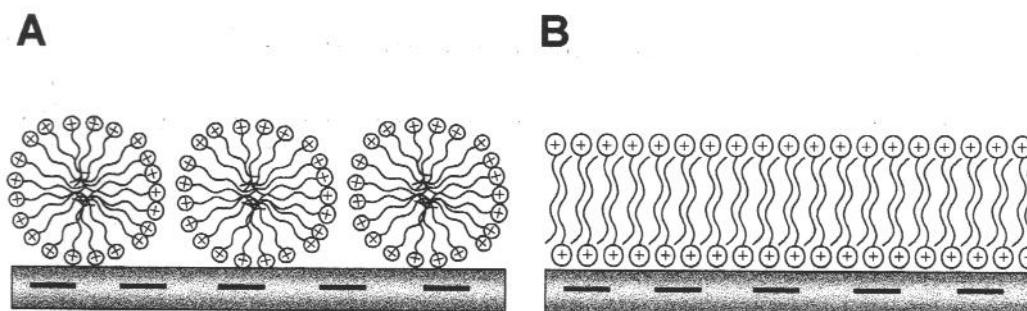
$V$  a  $l_f$  jsou délka a objem hydrofobní části molekuly a  $a_0$  je průřez hlavičkové domény, určený elektrorepulzními silami mezi sousedními doménami v micelle. Většina tenzidů s jedním postraním řetězcem (včetně CTAB a TTAB) mají „balící“ poměr  $P$  menší než  $\frac{1}{3}$ , což vede pouze k tvorbě sférických micel. U surfaktantů s dvěma postranními řetězci, jako jsou DDAB a DLPC (1,2-dilauroylfosfatidylcholin), se zvětšuje objem hydrofobní oblasti  $V$ , což vede k zvětšení  $P$  na hodnotu 0,5-1. Při těchto hodnotách už dochází k tvorbě dvojvrstvy na povrchu kapiláry[9]. Veličinu  $P$  a tím i tvar micely rovněž ovlivňují protiion surfaktantu, pH a teplota.

### ***Ovlivnění EOF***

Schopnost otáčet elektroosmotický tok je pozorována i při přítomnosti surfaktantu pod jeho KMK. Tento jev je vysvětlován tím, že kladně nabitě molekuly smáčedla jsou koncentrovány v blízkosti vnitřního povrchu kapilární stěny, kam je přitahuje jeho náboj. Zakoncentrováním u kapilární stěny tedy může dojít k vytvoření micel (v případě DDAB dvojvrstvy) na jejím povrchu, i přesto že hodnota KMK v celém objemu roztoku ještě dosažena není.

Pro křemenné kapiláry je hodnota tzv. „KMK kapilární stěny“ přibližně  $\frac{1}{3}$ – $\frac{1}{2}$  hodnoty KMK v roztoku pufru. Pod touto koncentrací se v roztoku vyskytují pouze samostatné molekuly surfaktantu. Při koncentraci  $\frac{1}{3}$ – $\frac{1}{2}$  KMK začíná agregace na vnitřním povrchu kapiláry. Nad touto prahovou úrovní koncentrace můžeme pozorovat rapidní přechod od kladných hodnot  $\mu_{eof}$  k záporným a s tím i změnu směru EOF. Ve chvíli kdy je již micelární vrstva zcela vytvořena, už další zvyšování koncentrace smáčedla nevede k urychlení otočeného EOF.[8]





Obr. 3; Agregační struktury - micelární: CTAB nebo TTAB (A) a dvojvrstvá: DDAB (B) na kapilární stěně. Koncentrace tenzidů jsou nad „KMK kapilární stěny“, převzato z [8]

### 3.3.1.4. Semipermanentní pokrytí kapilární stěny kationickými surfaktanty nebo směsí kationických a anionických surfaktantů

Přítomnost surfaktantů v roztoku BGE se ukázala jako limitující faktor pro využití detekce pomocí ESI–MS, kde smáčedla potlačovala ionizaci jednotlivých molekul vzorku. Proto bylo vyvinuto několik technik, které umožňují využít schopnosti surfaktantů otočit EOF bez nutnosti jejich přítomnosti v roztoku BGE.

Starší postup spočívá v promytí kapiláry roztokem kationického surfaktantu, např. DDAB nebo DLPC, před samotným prováděním analýzy. Stabilita tohoto pokrytí bývá připisována tomu, že právě tyto surfaktanty mají dva postranní řetězce, a proto vytvoří na povrchu kapiláry dvojvrstvu.

Novější způsob spočívá v promytí kapiláry směsí kationického (CTAB) a anionického tenzidu (SDS, dodecylsírán sodný). Dodecyl síran se k CTAB chová jako protiion a velice výrazně omezuje elektrostatickou repulzi mezi hlavičkami. To následně vede k tvorbě asociací dvojvrstvy nebo asociátu válcovitého či vezikulárního tvaru. O výsledném tvaru rozhodují vzájemné poměry mezi SDS a CTAB a složení BGE[9].

### 3.3.1.5. Přídavek organického rozpouštědla

Organická rozpouštědla mají velký vliv na ovlivnění elektroosmotického toku. Již velmi malá koncentrace organického rozpouštědla přidaného do prostředí s micelárním systémem, může snížením KMK změnit ochotu surfaktantu se spojovat do micel a změnit i jejich tvar. Organické modifikátory mohou rovněž změnit velikost micel a ovlivňovat EOF. Přidáním organického rozpouštědla do roztoku BGE, totiž dojde ke změně smáčivosti kapilární stěny. Tím se změní ionizace stěny, což dále vede ke změněnému  $\zeta$  poten-

ciálu a následně i ke změnám v EOF. Organická rozpouštědla způsobují změny EOF také změnou viskozity BGE. V praxi většinou dochází přidavkem organického rozpouštědla k zvýšení KMK[9,10,11].

### **3.3.2.Tvorba komplexů**

U analyzovaných látek, které mohou vytvářet komplexy, může dojít vhodným přidavkem kovu nebo ligandu k tlumivému roztoku ke zlepšení jejich separace. Elektroforetická pohyblivost vzniklých komplexů se podstatně odlišuje od pohyblivosti samotného analytu. Konstanta stability komplexu závisí na druhu kovu a druhu ligandu, což vede k vysoce selektivním analýzám. Takto lze využít tvorbu komplexů při analýze kovů, kde se hledá vhodný ligand a jeho koncentrace k dosažení úplné separace. Analogicky se hledá vhodný kov pro separaci ligandů[7].

### **3.3.3.Tvorba iontových asociátů**

Tvorba iontových asociátů se využívá ke snížení rychlosti migrace analytů. Ionty s vyšším nábojem vytváří díky silným coulombickým interakcím iontové asociáty s ionty opačného náboje. Čím vyšší je náboj interagujících iontů, tím větší je snížení pohyblivosti. Nejčastěji jsou používány kyseliny a baze o vyšším náboji (např. kyselina citrónová, kyselina fytoová, spermin)[7].

### **3.3.4.Tvorba hostitelských komplexů**

Jedná se o separaci v přítomnosti cyklodextrinů ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) Cyklodextriny jsou neionogenní oligosacharidy tvořené 6–8 molekulami glukózy, které vytvářejí dutý válec, na jehož obvodu jsou hydroxylové skupiny a vnitřní jádro zůstává hydrofobní. Do tohoto jádra mohou vstupovat hydrofobní molekuly a vznikají tak různě pevné hostitelské komplexy. Vzhledem k tomu že jsou hydroxyly na povrchu chirální, vytváří cyklodextriny s chirálními separandy komplexy lišící se stabilitou, což umožňuje jejich separaci.

Jako chirální selektory se mohou používat také cyklické polyethery, polysacharidy a bílkoviny[7].

## **3.4. Metody užívané k zakoncentrování vzorku**

Jedním ze způsobů jak snížit vysoký limit detekce v CZE je zvýšit koncentraci analytu v prostoru detekce. K tomuto účelu bylo vytvořeno velké množství technik, založených na dvou hlavních principech.

**První skupina** technik k tomuto účelu využívá rozdělování mezi mobilní a (pseudo)stacionární fázi. Zahrnuje zejména extrakci na pevnou fázi a sweeping[2]:

### **3.4.1. Extrakce na pevnou fázi**

Extrakce na pevnou fázi je běžně užívanou off-line metodou separace. Je to užitečná technika, která umožňuje, aby analyt byl zakoncentrován v kolonce a poté byl malým množstvím rozpouštědla vyeluován a pohodlně stanoven. Protože je tato úprava vzorku dosti časově náročná, bylo vyvinuto pár technik které umožňují zahrnout SPE on-line do procesu CZE.

Jedna z nich spočívá v naplnění krátkého (2mm) úseku kapiláry pevnou LC fází. Vzorek je hydrodynamicky nadávkován a poté vyeluován druhým rozpouštědlem. Těžiště této metody leží zejména v analýze léčiv z moči[2].

### **3.4.2. Zametání – Sweeping**

Tato on-line metoda slouží k zakoncentrování analytu v jeho zóně během elektromi-gračního procesu přímo v kapiláře („on-line sample stacking“). Sweeping se využívá u MEKC. Na základě chromatografického procesu dochází k akumulaci analytu do micelární fáze. Umožňuje zvýšení citlivosti 80–5000× a závisí na afinitě látky k pseudostacionární fázi.

Vzorek je rozpuštěn a nadávkován do kolony v pufru, který má stejnou vodivost jako BGE, ovšem nesmí obsahovat přísadu tvořící micely. Inlet kapiláry je ponořen do nádobky s pufrem obsahující BGE s anionickou povrchově aktivní látkou s překročenou kritickou micelární koncentrací. Analýza je prováděna při negativní polaritě. pH roztoku BGE musí být velmi nízké, aby mohl být potlačen EOF a tím bylo micelám umožněno pohybovat se kapilárou směrem k detektoru. Ve chvíli, kdy micely procházejí zónou neutrálního analytu,

vstupují molekuly analytu do micel a jsou tak ze své zóny „vymetány“ a v micelách unášeny k detekčnímu oknu[2].

**Druhá skupina** metod využívá ke stacking efektu elektroforetickou pohyblivost analytu, resp. pouze elektromigrační efekty a zahrnuje:

intrinsic („vnitřní“) stacking (analyty přítomny v matrici - voda, zř. BGE, - jejichž konduktivita je podstatně nižší než konduktivita BGE)

ITP stacking v CZE (analyty přítomny v matrici, jejíž konduktivita je mnohonásobně vyšší než konduktivita BGE: t-ITP v CZE (v jedné koloně) a ITP-CZE - on-line spojení dvou kolon

Některé techniky jsou vysvětleny níže: FASS - Field-amplified sample stacking (využití nestejně intenzity elektrického pole), LVSS - Large volume sample stacking (zakoncentrování vzorku z velkého objemu), zakoncentrování prostřednictvím pH a isotachforetický stacking [2]

### **3.4.3. Polem zesílené zakoncentrování vzorku**

Nejjednodušší technikou k zakoncentrování vzorku je FASS. Tato metoda je založena na faktu, že ionty, jež elektroforeticky migrují z prostředí roztoku s nízkou vodivostí do prostředí roztoku s vysokou vodivostí se velmi zpomalí při přechodu rozhraní těchto dvou roztoků. Jako příklad lze uvést vzorek rozpuštěný ve vodě, čili roztok s nízkou vodivostí. Intenzita elektrického pole bude v zóně analytu větší než v zóně BGE. Proto rychlost vzorku bude vysoká, dokud se bude pohybovat ve své zóně. Jakmile překročí rozhraní BGE, dostane se do zóny s vysokou koncentrací BGE a tím vysokou konduktivitou a nízkou intenzitou elektrického pole. Tím pádem se vzorek zpomalí a koncentruje v úzké zóně na rozhraní mezi zónami BGE a analytu.

### **3.4.4. Stacking z velkého objemu vzorku**

LVSS je technikou, při které je vodný roztok vzorku hydrodynamicky dávkován do  $\frac{1}{3}$  -  $\frac{1}{2}$  objemu kapiláry. Poté je zavedeno napětí s obrácenou polaritou. Tímto způsobem je pomocí EOF odstraňována matrice vzorku ven z kapiláry, zatímco anionty analytu migrují

směrem k detekčnímu oknu a jsou stackovány na rozhraní s BGE. Stack analytů se pohybuje s EOT ke katodě. Po celou dobu je monitorován elektrický proud a ve chvíli, kdy dosáhne 95 až 99% původní hodnoty (úzká zóna analytů dosahuje začátku kapiláry), je polarita změněna a separace dále probíhá klasicky s pozitivní polaritou [2].

### **3.4.5. Zakoncentrování zprostředkované pomocí pH**

FASS a LVSS jsou techniky, které využívají rozpuštění vzorku ve vodě nebo málo vodivém pufru. Ne vždy je možné tento způsob využít, např. při analýze vzorku o nízké koncentraci, např. dialyzátu. Proto byla vyvinuta technika stackování pomocí pH. Tato metoda využívá spuštění FASS pomocí úpravy injikované zóny analytu na neutrální pH, čímž vznikne zóna o nízké vodivosti. Nejdříve je elektrokineticky injikována zóna biologického materiálu o vysoké iontové síle. Tím, jak je vzorek elektrokineticky injikován, jsou anionty silných kyselin, např. chloridy, nahrazeny anionty slabých kyselin z BGE např. acetátovými. Dále je elektrokineticky nadávkována HCl. Protony kyseliny rychle migrují zónou vzorku a titrují acetátové ionty, čímž se vytváří elektroneutrální oblast s vysokou hodnotou elektrického odporu. Tím je kationtům umožněno vymigrovat z ztitrované zóny a stackovat se na rozhraní s BGE [2].

### **3.4.6. Isotachoforetické zakoncentrování**

Z principu isotachofórey plyne, že minoritní složky vzorku mohou být isotachoforeticky zakoncentrovány až o několik řádů. Právě z tohoto důvodu se využívá spojení isotachofórey s kapilární tónovou elektroforézou.

## **3.5. *Kombinace ITP–CZE***

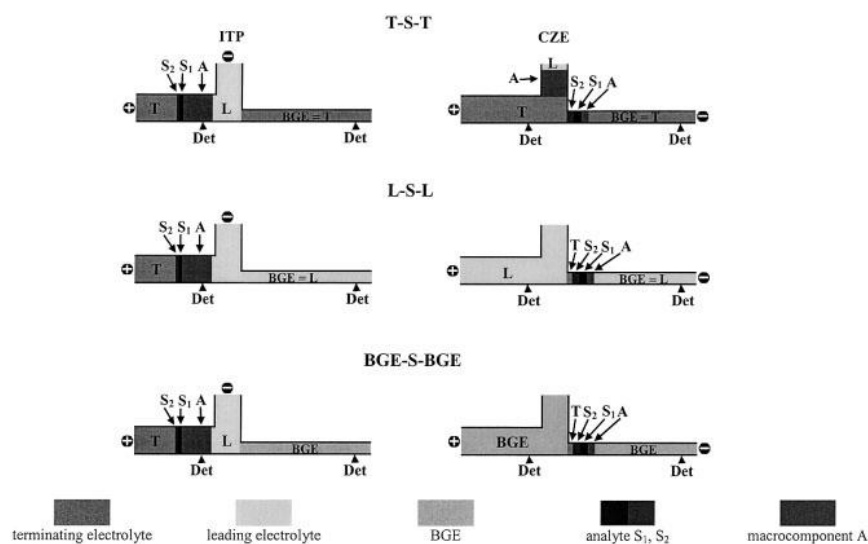
Kombinace zónové elektroforézy s isotachoforézou se jeví velmi výhodná, v isotachoforetickém kroku je vzorek zakoncentrován a rozseparován do bloku na sebe navazujících zón, které potom separujeme v kroku zónové elektroforézy. Existují dva hlavní způsoby instrumentace: dvoukolonové a jednokolonové uspořádání.

### 3.5.1. Dvukolonové spojení ITP–CZE (column–coupling)

On-line kombinace kapilární isotachoforézy a zónové elektroforézy ve dvou kapilárách umožňuje zlepšit separační účinnost a snížit LOD až o tři řády. Tato technika je zejména vhodná pro stanovení stopového množství analytu ve vzorku biologického původu nebo vzorků vztahujících se k životnímu prostředí, kde přítomnost makrokomponent by neumožňovala CZE separaci..

Výhoda techniky spočívá v možnosti nadávkování velkého množství málo koncentrovaného vzorku (10-100 $\mu$ l). Aby tohoto bylo možné dosáhnout, mívá kapilára pro ITP obvykle velký vnitřní průměr (200-300 $\mu$ m). Interferující a nestanovované součásti vzorku mohou být odstraněny na konci kapiláry, nebo je jím zabráněno ve vstupu do CZE vyplavením předseparační kapiláry základním CZE elektrolytem. Zde hraje klíčovou roli výběr vhodného elektrolytového systému a nalezení optimálního času přepnutí proudu z předseparační do separační kapiláry.

V zásadě jsou tři způsoby, jak provést ITP–CZE spojení. Ten nejjednodušší využívá TE z ITP fáze jako pracovní elektrolyt pro CZE (T–S–T). Druhá varianta je analogicky založena na užití LE jako BGE (L–S–L). Třetí a nejkomplicovanější způsob má zcela odlišný BGE od LE a TE (BGE–S–BGE)[7, 12].



Obr. 4; Schéma ITP- CZE ve dvou kapilárách. A: analyty S<sub>1</sub> a S<sub>2</sub> jsou zakonzentrovány a přechází s malým množstvím makrokomponenty A do analytické kapiláry.

### 3.5.2. ITP-CZE v jednokolonovém uspořádání

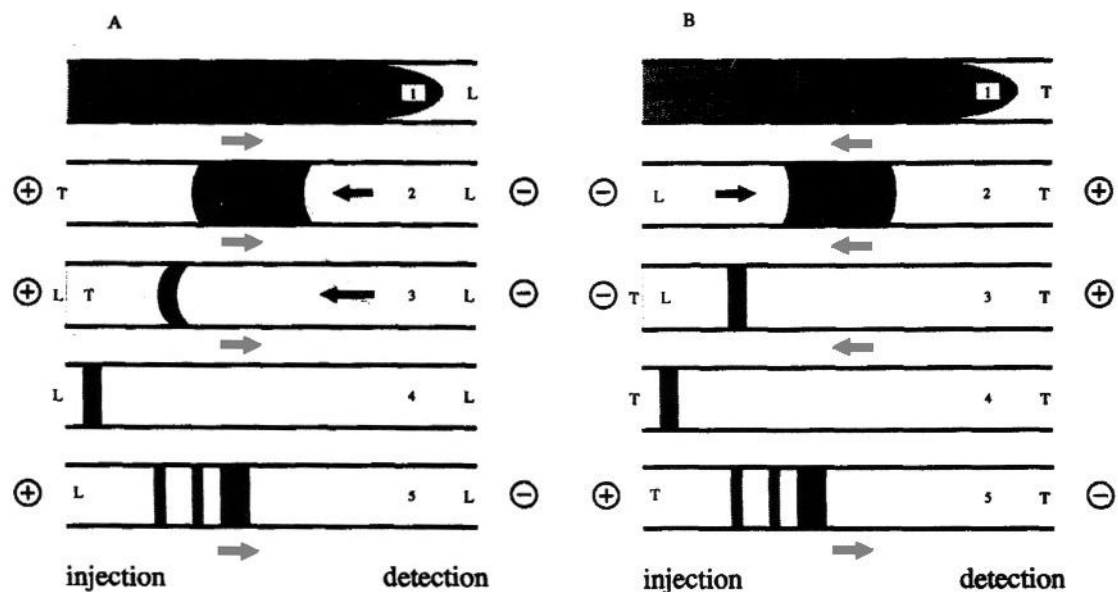
Realizace spojení isotachoforézy s zónovou elektroforézou může být prováděna v jedné kapiláře dvěma způsoby: s využitím hydrodynamického protitlaku nebo jako indukovaná isotachoforéza v průběhu zónové elektroforézy.

#### 3.5.2.1. ITP–CZE využitím hydrodynamického (proti)tlaku

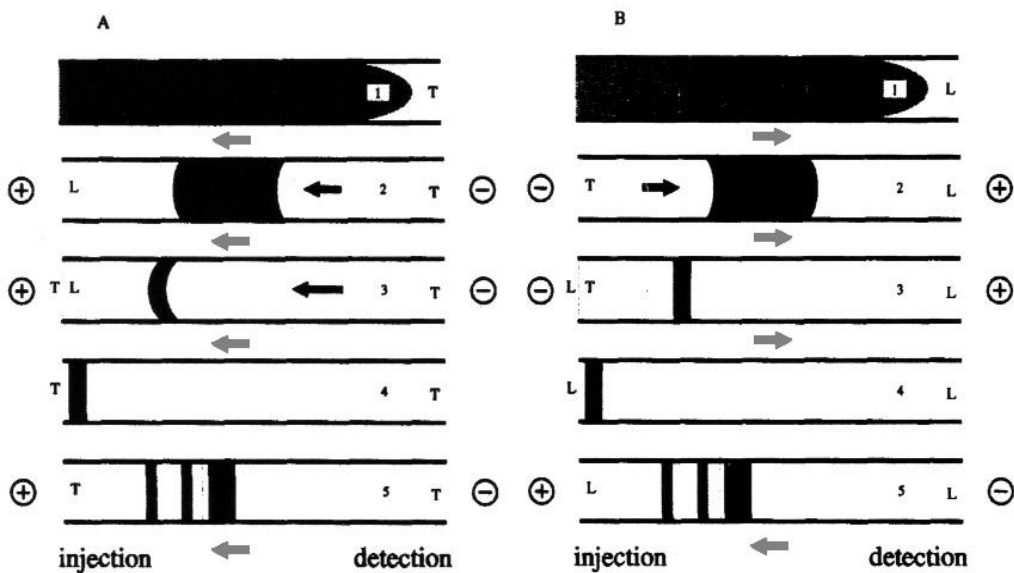
Tato technika umožňuje využít výhod on–line kombinace ITP–CZE i v případě, že nemáme dostupnou instrumentaci pro dvoukolonové uspořádání. V závislosti na typu analyzovaných látek existují čtyři možnosti provedení, dvě pro anionty a dvě pro kationty, které se od sebe mírně liší.

Vždy se jedná o možnost použití buď LE, nebo TE jako BGE pro krok zónové elektroforézy. Analýza probíhá v pěti krocích. Na tomto místě je popsáno schéma používané pro analýzu kationtů s LE jako pufr pro CZE. Na schématech – Obr. 5 a 6 - jsou vysvětleny rozdíly pro ostatní možnosti uspořádání[13].

1. Nejprve naplníme kapiláru roztokem LE a poté vzorkem. Můžeme plnit i do 60-90%.
2. Vialku vzorku nahradíme vialkou obsahující TE. Připojíme ji k katodě. Na detekčním konci kapiláry připojíme vialku s LE a připojíme ji ke anodě a zapneme proud a protitlak na outletu. Zatímco probíhá zakoncentrování, analyty jsou drženy protitlakem na místě.
3. Když je fokusace dokončena, vypneme napětí a vialka s TE je nahrazena vialkou s LE (čili nyní BGE). Hydrodynamický protitlak zachováme a připojíme nižší napětí než bylo použito v kroku 2. Vysoce koncentrovaná oblast analytů je posunována k inletu, přičemž nedochází k rozmývání zón, protože ITP podmínky jsou stále zachovány. Pro zjištění přesného okamžiku, kdy je třeba vypnout protitlak, sledujeme protékající proud. S klesajícím podílem složky s nízkou vodivostí (TE) stoupá hodnota proudu.
4. Ve chvíli, kdy proud dosáhne 92–99% (závisí na poměru vodivosti LE a TE) hodnoty, jakou má proud protékající kapilárou naplněnou pouze roztokem LE, vypínáme hydrodynamický protitlak.
5. Začíná CZE krok[14,15].



troforézu je TE. Jsou zde tyto rozdíly oproti A: v kroku 1 naplníme kapiláru roztokem T. V kroku 2 připojujeme obrácené napětí a protitlak na inletu. V kroku 3 vypínáme protitlak a analyty isotachoforeticky migrují směrem k inletu, monitorujeme pokles proudu. V kroku 5 přepólujeme napětí na normální a dále probíhá CZE. Černé šipky znázorňují směr hydrodynamického tlaku, šedivé šipky směr migrace analytů. Převzato a doplněno z Reinhold et al.[14]



Obr. 6; Schéma analýzy aniontů. A: jako BGE pro CZE byl zvolen roztok TE. Rozdíl proti situaci popsané výše je pouze v tom, že na začátku je do kapiláry nadávkován roztok TE a analyty jsou k detektoru nesený EOF. B: za pracovní roztok CZE byl zvolen LE. V podstatě identická situace jako



na Obr. 5, pouze nyní byl do kapiláry nadávkován jako první roztok LE. Převzato a doplněno z Reinhoud et al.[14]

Rovnice potřebné pro výpočet isotachoretické rychlosti a tomu odpovídající velikosti protitlaku lze nalézt v Reinhoud et al.[15] V praxi se lépe osvědčily systémy založené na LE jako pracovním elektrolytu pro CZE. Při sledování proudu je totiž jeho hodnota v řádu  $\mu\text{A}$ , v případě TE jde o  $\text{nA}$ [14]. Toto uspořádání umožňuje stonásobné zvýšení citlivosti analýzy[13].

### 3.5.2.2. Přechodná isotachoforéza (tITP) v CZE

Nutným předpokladem pro existenci přechodné isotachoforézy v zónové elektroforéze je, aby byla v systému přítomna alespoň jedna komponenta, která by mohla hrát buď roli vedoucího, nebo koncového elektrolytu, pro ostatní složky systému, složeného ze vzorku a BGE.

Aby komponenta mohla hrát roli LE nebo TE, musí být v systému zastoupena v nadkritickém množství, které umožní, aby tato její role byla efektivní. Ať už makrokomponenta bude hrát roli LE nebo TE, bude koiont BGE hrát roli opačnou. Tedy v případě, že makrokomponenta bude hrát roli vedoucího iontu bude koiont BGE terminátorem a opačně [5].

Jsou celkem tři možnosti, jak tohoto dosáhnout a tím pádem můžeme rozlišit tři podtypy přechodné isotachoforézy.

#### *Přechodná isotachoforéza indukovaná složením vzorku*

Při tomto uspořádání je makrokomponenta přítomna ve vzorku a po určitou dobu bude hrát roli buď terminátoru nebo leadingu pro ostatní složky vzorku, jejichž mobility se budou vyskytovat v isotachoretické okně, tvořeném komponentou a koiontem BGE[5,16].

Pro stacker, který bude terminátorem musí platit

$$\bar{\mu}_{B,B} \frac{\bar{\mu}_{A,V}}{\bar{\mu}_{B,V}} < \bar{\mu}_{X,B} < \bar{\mu}_{B,B}$$

**Rovnice 17**

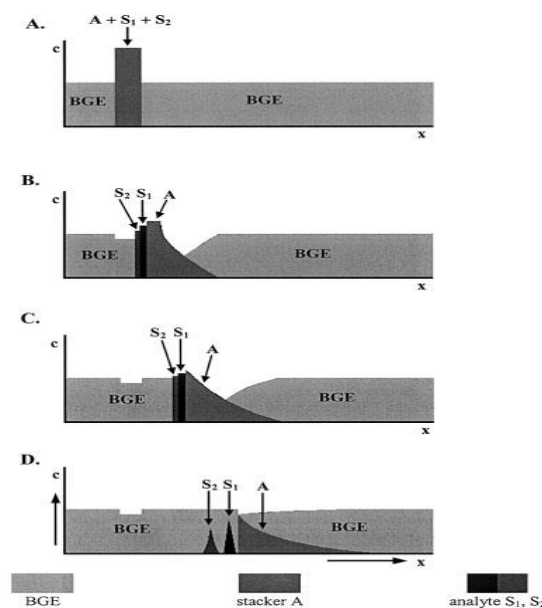
pro přechodný leading

$$\bar{\mu}_{B,B} < \bar{\mu}_{X,B} < \bar{\mu}_{B,B} \frac{\bar{\mu}_{A,V}}{\bar{\mu}_{B,V}}$$

Rovnice 18

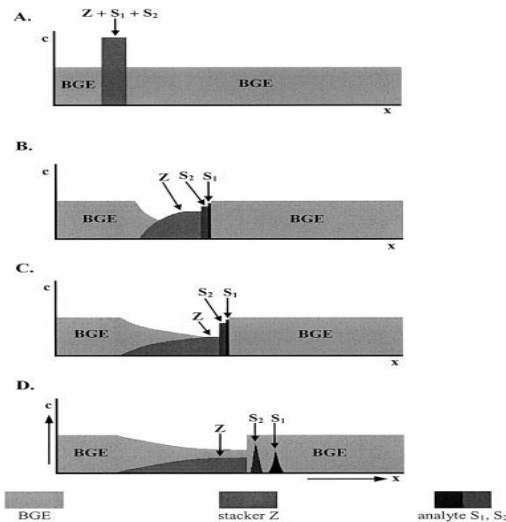
kde  $\mu_{B,B}$  je mobilita koiontu v zóně BGE,  $\mu_{A,V}$  je mobilita stackeru v zóně vzorku,  $\mu_{B,V}$  je mobilita koiontu v zóně vzorku a  $\mu_{X,B}$  je mobilita mikrokomponenty vzorku v zóně BGE.[16]

Stacker může být buď přirozenou součástí vzorku (např.  $\text{Cl}^-$  nebo  $\text{Na}^+$  v moči) nebo může být do vzorku uměle přidán. Výsledkem indukované isotachofórey je, že mikrokomponenty vzorku se stackují za přechodným leadingem, nebo před přechodným terminátorem. Situaci, kdy makrokomponenta je přechodným leadingem ilustruje Obr. 7.



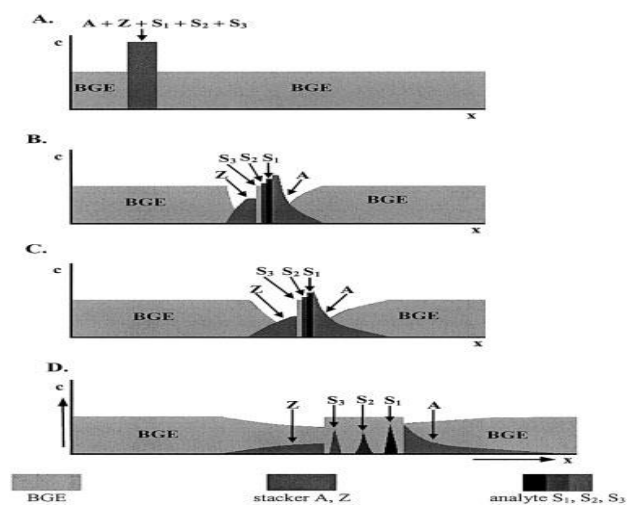
Obr. 7; Schéma tITP; makrokomponenta A je přechodným leadingem, BGE terminátorem;(A): V zóně vzorku se nacházejí tři individua. Makrokomponenta A bude v následujících krocích hrát roli přechodného leadingu pro látky  $S_1$  a  $S_2$ ,  $\mu_A > \mu_{S1} > \mu_{S2}$  (B): průběh vlastní přechodné isotachofórey po zapojení separačního napětí. Látka A funguje jako vedoucí elektrolyt, látky  $S_1$  a  $S_2$  upravují svoji koncentraci, v souladu s Kohlrauschovou regulační funkcí, vzhledem ke koncentraci látky A v její zóně. C: migrační rychlost A je v zóně BGE silně zvýšena, rozhraní mezi A a BGE je silně frontující a po čase se vytvoří směsná zóna BGE a A. A už nadále nemůže být leadingem D zobrazuje situaci, kdy došlo k rozmytí zóny leadingu a rozpadu isotachoforetických podmínek a látky nyní migrují v módu zónové elektroforézy. Pík látky  $S_2$  je více rozšířen neboť látka opustila dříve ITP podmínky. Převzato z Urbánek et al[12].

Situaci, kdy makrokomponenta je přechodným terminátorem popisuje Obr. 8.



Obr. 8; schéma tITP; makrokomponenta A je přechodným terminátorem, BGE leadingem. (A): zóna vzorku obsahuje makrokomponentu Z a dvě komponenty  $S_1$  a  $S_2$ .  $\mu_{S1} > \mu_{S2} > \mu_Z$ . BGE funguje jako vedoucí elektrolyt, látky  $S_1$  a  $S_2$  upravují svoji koncentraci, v souladu s Kohlrauschovou regulační funkcí. (C): migrační rychlost BGE v zóně Z je zvýšena, vstupuje do zóny Z a rozhraní mezi BGE a Z je silně chvostující. Ve chvíli, kdy vznikne směšná zóna BGE a Z jsou přerušeny ITP podmínky. (D): látky migrují v CZE módu. Pík látky  $S_1$  je rozšířen neboť tato látka má vysokou mobilitu a opustila ITP podmínky dříve. Převzato z Urbánek et al[12].

Poslední možností je varianta přítomnosti dvou makrokomponent A a B ve vzorku. Přičemž A slouží jako přechodný leading, za kterým se stackují analyty, které mají nižší mobilitu než A a vyšší mobilitu než koiont BGE, jenž iontu A plní funkci terminátoru. Ion B naopak funguje jako přechodný terminátor pro ionty, jejichž mobilita je větší než mobilita iontu B, ale menší než mobilita koiontu BGE, který zde funguje jako leading[5, 12, 16, 17]viz Obr. 9.

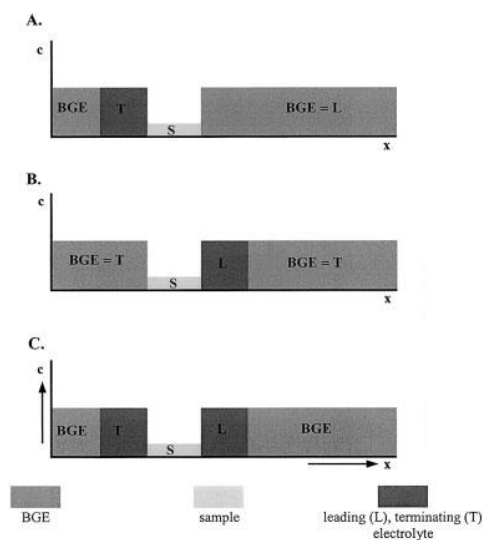


Obr. 9; Schéma tITP indukovaná složením vzorku s dvěma stackery. (A): zóna vzorku obsahuje 2 makrokomponenty A a Z a 3 mikrokomponenty  $S_1, S_2, S_3$ .  $\mu_A > \mu_{S1} > \mu_B = \mu_{S2} > \mu_{S3} > \mu_Z$ . (B): Po zapnutí

proudu se systém rozdělí na dva ITP systémy. A je leader pro  $S_1$  a Z je terminátor pro  $S_3$ . (C): postupně dochází k přerušování ITP podmínek. (D): všechny komponenty putují v CZE módu. Zóna analytu  $S_2$ , jehož mobilita je blízká mobilitě BGE, je nejvíce rozmyta, protože u ní neproběhl stacking. Převzato z Urbánek et al[12].

### *Přechodná isotachofórze indukovaná složením separačního média.*

Zde je isotachofórze vyvolána tak, že kapilára je postupně naplněna BGE, poté zónou přechodného vedoucího elektrolytu, zónou vzorku, zónou přechodného terminátoru a opět BGE. Nebo je možné do kapiláry naplněné BGE nadávkovat zónu přechodného leadingu a vzorku, přičemž koiont BGE hraje roli terminátoru. A nebo do kapiláry naplněné BGE nadávkovat zónu vzorku a přechodného terminátoru a koiontu BGE tak přidělit roli leadingu[5, 12] viz Obr. 10.



Obr. 10; Schéma tITP indukované složením média; převzato z Urbánek et al.[12]

### *Přechodná isotachofórze přetrvávající z on-line ITP–CZE techniky*

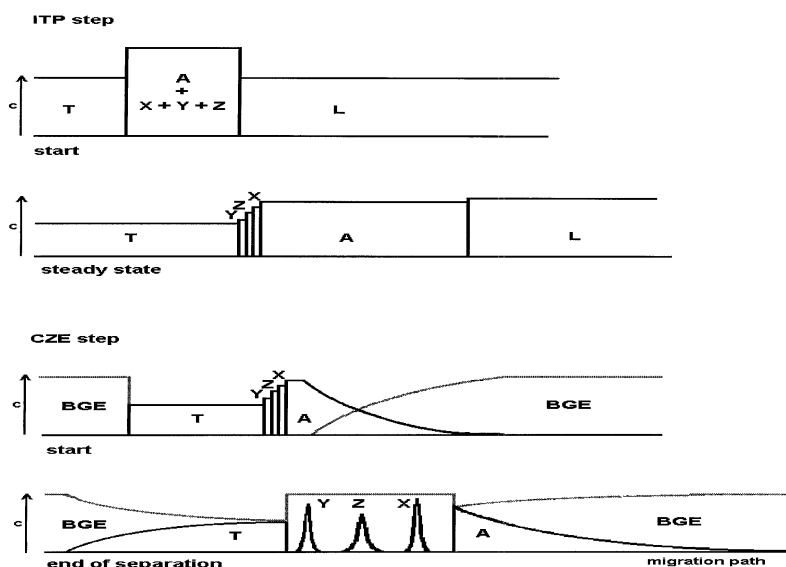
Tato přechodná isotachofórze je v podstatě již jen rušivým jevem, který někdy může doprovázet krok CZE při technikách on–line kombinace ITP–CZE. Ve chvíli, kdy proběhl již ITP krok, je další prodlužování isotachoforetického migrování nevýhodné, protože brání destackingu a vzájemnému rozseparování jednotlivých složek. K tomuto jevu dochází z důvodu, že do separační kapiláry se vždy dostane (nebo v ní zůstane) i část terminátoru (případně leadingu) neboť nechceme přijít o část již separovaného a zakoncentrovaného vzorku.

V případě, že je přítomna komponenta , která by mohla hrát roli vedoucího iontu (jímž může být jak makrokomponenta vzorku tak i samotný koiont BGE), může dojít k vytvoření podmínek pro přechodnou isotachoforézu.

Situace se podobá buď tITP indukované složením pracovního média ( $\mu_B > \mu_A > \mu_X > \mu_T$ ; koiont je leadingem a makrokomponenta T [což je zbytek terminátoru po předchozí isotachoforéze] je přechodným terminátorem).

Nebo se může podobat tITP indukované složením vzorku ( $\mu_A > \mu_X > \mu_T > \mu_B$ ; přičemž ve vzorku musí být přítomná složka A, která bude přechodným leadingem. A zároveň koncentrace A musí být vyšší, než je kritická koncentrace pro vyvolání přechodné isotachoforézy).

Ve chvíli kdy dojde k poklesu koncentrace v zóně leadingu nebo terminátoru, dojde k přerušení isotachoforetických podmínek a látky nadále migrují už pouze v módu zónové elektroforézy. viz Obr. 11.



**Obr. 11; Přechodná elektroforéza přetrvávající z on-line ITP-CZE; (A) popisuje situaci při isotachoforetickém kroku. Dochází k úpravě koncentrací a analyty se dělí do zón v pořadí jejich mobilit. (B): V CZE kroku dochází nejdříve k přechodné ITP, kde makrokomponenta A hraje roli přechodného leadingu a BGE terminátoru. A posléze dochází k rozpadu isotachoforetických podmínek a migraci v klasické CZE. převzato z Křivánková [5]**

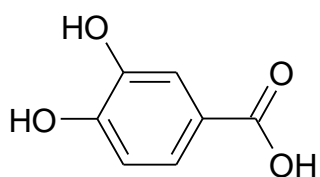
Ve všech výše uvedených případech přechodná isotachoforéza významně ovlivňuje analytické parametry CZE, zejména pak: detekční čas, rozmytí zón, separační účinnost a citlivost analýzy. Klíčovým problémem celého postupu je nalezení takových podmínek pro přechodnou isotachoforézu, které i při nástřiku velkého množství vzorku umožní jeho vý-

razné zakoncentrování při zachování vysoké separační účinnosti a při co nejmenší disperzi výsledných zón. To následně vede ke zvýšení limitu detekce, což je požadovaný výsledek.

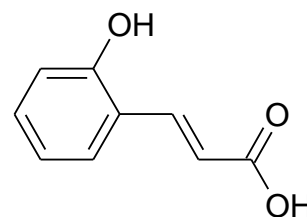
### 3.6. Analyzované látky

Analyzované látky můžeme rozdělit do dvou skupin podle jejich chemické struktury. Jsou to fenolické kyseliny: deriváty kyseliny benzoové a skořicové a flavonoidy.

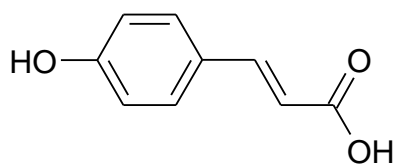
#### 3.6.1. Fenolické kyseliny



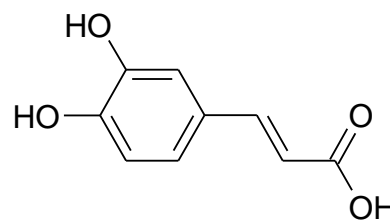
Kyselina protokatechová (pKa=4,45)



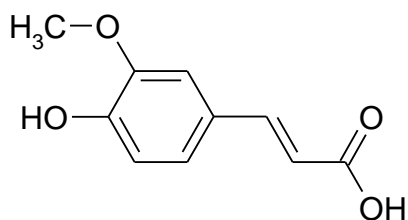
Kyselina o-kumarová (pKa=3,96)



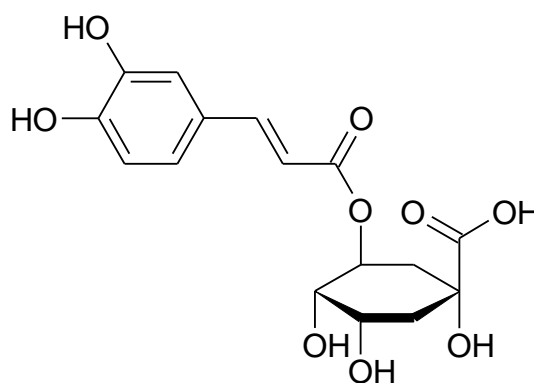
Kyselina p-kumarová (pKa=4,10)



Kyselina kávová (pKa=4,04)

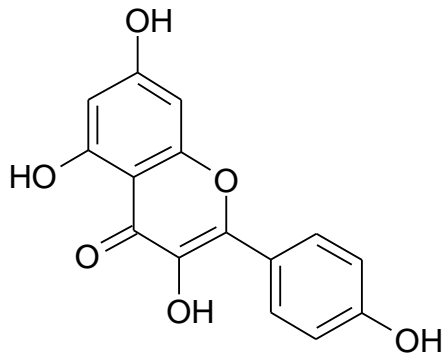


Kyselina ferulová (pKa=4,04)

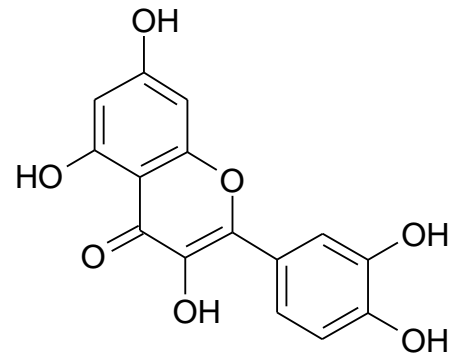


Kyselina chlorogenová (pKa=3,96)

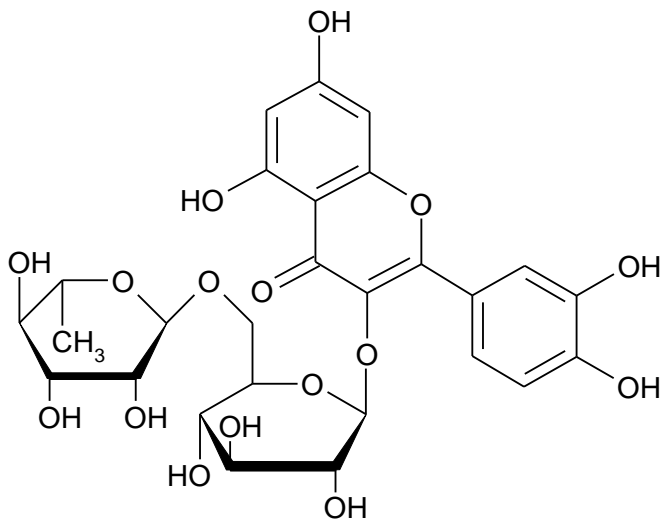
### 3.6.2.Flavonoidy



Kaempferol (pKa=6,93)



Kvercetin (pKa=6,89)



Rutin ((pKa=6,83)

## **4. CÍL PRÁCE**



Cílem mojí práce bylo nalezení vhodného elektrolytového systému a optimalizace podmínek pro separaci a stanovení derivátů kyseliny skořicové a benzoové a vybraných flavonoidů pomocí přechodné isotachoforézy - kapilární zónové elektroforézy (tITP-CZE)

## **5. PRAKTICKÁ ČÁST**

## 5.1. Chemikálie a roztoky

### 5.1.1. Chemikálie

Název látky	Mr	Výrobce	čistota
2,6-di-O-methyl- $\beta$ -cyklodextrin	1331,39	Fluka	>> 97%
2-Hydroxypropyl- $\alpha$ -cyklodextrin	1180	Fluka	p.a.
2-Hydroxypropyl- $\beta$ -cyklodextrin	1380	Fluka	p.a.
Dimethylsulfoxid	78,13	Aldrich	99,90%
Hexadecyltrimethylamonium bromid	364,36	Sigma	99%
Hexadimethrin bromid		Sigma	94%
Chlorid sodný	58,44	Penta	p.a.
Isopropylalkohol	60,1	Penta	p.a.
Kaempferol	286,24	Fluka	>>96%
Kvercetin	302,24	Lachema Brno	p.a.
Kyselina boritá	61,83	Sigma	pro elektroforézu
Kyselina chlorogenová	354,31	Aldrich	p.a.
Kyselina kávová	180,16	Aldrich	97%
Kyselina o-kumarová	164,16	Aldrich	97%
Kyselina p-kumarová	164,16	Aldrich	98%
Kyselina prokatechová	154,12	Aldrich	97%
Kyselina trans-ferulová	194,19	Aldrich	99%
Methanol pro HPLC	32,94	Sigma-Aldrich	99,90%
Rutin hydrát	610,52	Sigma	min 95%
$\alpha$ -Cyklodextrin hydrát	1137,01	Sigma	p.a.
$\gamma$ -Cyklodextrin	1297,1	Sigma	p.a.

## **5.1.2. Roztoky**

### **5.1.2.1. Příprava standardních a pracovních roztoků analytů**

Na analytických vahách jsem postupně navážil přibližně 0,2 mg kyseliny protocatechové, o–kumarové, p–kumarové, kávové, ferulové a chlorogenové, kvercetinu, rutinu a kaempferolu. Ty jsem poté převedl do odměrné baňky na 10ml pomocí methanolu a doplnil methanolem po rysku. Koncentrace analytů v tomto roztoku byla přibližně 200 $\mu$ g/ml. Poté jsem roztok odplynil po dobu 10 minut v ultrazvukové lázni. Tento zásobní roztok jsem uchovával v lednici. V čas potřeby jsem z něj methanolem naředit pracovní roztoky o požadované koncentraci .

### **5.1.2.2. Příprava zásobních roztoků.**

Vypočtené množství kyseliny borité (6,1743g) jsem navážil přibližně přesně a rozpustil v 100 ml vody. Kvantitativně jsem převedl do odměrné baňky na 200ml a doplnil jsem po rysku vodou. Tím jsem získal zásobní roztok kyseliny borité o koncentraci 0,5 mol/l. Vypočtené množství CTAB (0,19045g) jsem přibližně přesně navážil a kvantitativně převedl do odměrné baňky na 50 ml. Vypočtené množství HDB (0,1g) jsem navážil přibližně přesně a kvantitativně převedl vodou do odměrné baňky na 100ml a doplnil vodou po rysku. Tyto zásobní roztoky jsem uchovával v lednici a v čas potřeby jsem z nich ředil pracovní roztoky.

### **5.1.2.3. Příprava pracovních elektrolytů**

Do kádinky na 100 ml jsem odpipetoval vypočtené množství zásobního roztoku kyseliny borité. Přidal jsem vypočtené množství činidla pro otočení EOF (CTAB nebo HDB) a organického rozpouštědla. Případně jsem přidal vypočtené množství cyklodextrinu a doplnil objem vodou na 45 ml. Dále jsem upravil pH na hodnotu 9,3 pomocí roztoku amoniaku. Poté jsem převedl kvantitativně do odměrné baňky na 50ml a doplnil po rysku vodou. Roztok jsem odplynil na ultrazvukové lázni po dobu 5-ti minut.

## **5.2. Přístroje**

- Kapilární elektroforetický systém PrinCE 750, Holandsko

- Laboratorní digitální pH metr PNM 220, Radiometr Kopenhagen, Dánsko, přístroj byl kalibrován za použití standardních pufrů (pH 7,000 a 10,012)
- Ultrazvuková lázeň Badelin Sonorex RK 31, Německo
- Analytické váhy Sartorius, Německo
- Elektromagnetická míchačka MM 2A, Laboratorní přístroje Praha, ČR

### **5.2.1. Kapilární elektroforetický systém PrinCE**

Přístroj byl vybaven DAD detektorem (diode array detektorem). Separace probíhala v křemenné potažené kapiláře o vnitřním průměru 50 $\mu$ m a o efektivní délce 60cm a celkové délce 67,2cm. Komunikaci s počítačem a řízení analýzy zajišťoval program DAX 3D verze 7.3 od firmy Van Mierlo Software Consultancy, pracující pod operačním systémem Microsoft Windows 98.

## **5.3. Pracovní a výpočetní postupy**

### **5.3.1. Pracovní postup**

Před začátkem analýzy jsem uvedl do chodu počítač a elektroforetický systém.

V programu jsem nastavil parametry pro měření a vyhodnocování. Na začátku a na konci dne jsem kapiláru proplachoval 1 M roztokem NaOH, 10 minut 0,1 M roztokem NaOH a 10 minut ultračistou vodou tlakem 2000mbar po dobu 10 minut. Před vlastním měřením jsem pro dosažení lepší reprodukovatelnosti kapiláru proplachoval tlakem 2000mbar po dobu 5 minut roztokem 0,1 M NaOH, 5 minut ultračistou vodou a 5 minut roztokem BGE. Dávkování vzorku probíhalo hydrodynamicky tlakem 50 mbar. po dobu 6 sekund.

Detekce probíhala v UV oblasti při vlnových délkách 200, 214, 228, 280, 352 a 400 nm.

### **5.3.2. Vývoj a optimalizace metody**

Sledoval jsem tyto vlivy:

- vliv činidla otáčejícího EOF
- koncentrace borátového pufru v rozmezí 50–200 mM

- oblast pH v rozmezí 8,8–9,2
- přidavek organických rozpouštědel a jejich koncentrace
- přidavek cyklodextrinů a vliv jejich koncentrace
- testování délky nástřiku vzorku

### 5.3.3. Detekční limit

Detekční limit vyjadřuje citlivost metody. Je to nejnižší detekovatelná koncentrace látky, nestanovovaná kvantitativně. U instrumentálních metod se může určit jako koncentrace analyzované látky odpovídající poměru signálu k šumu s hodnotou 3.

### 5.3.4. Opakovatelnost metody

Směrodatnou odchylku  $s$  jsem vypočítal pomocí funkce SMODCH v programu Microsoft Excel. Pro výpočet relativní odchylky (%) jsem použil vzorec:

$$RSD = \frac{s}{x} \cdot 100$$

Rovnice 19

### 5.3.5. Rozlišení

Rozlišení je jeden z kvantitativních parametrů separační účinnosti. Rozlišení dvou sousedních píků lze vypočítat podle vzorce:

$$R_s = \frac{2 \cdot (t_2 - t_1)}{w_1 + w_2}$$

Rovnice 20

Kde  $t_1$  a  $t_2$  jsou migrační časy látek a  $w_1$  a  $w_2$  jsou šířky píku při základní linii.

## **6. VÝSLEDKY A DISKUZE**

## **6.1. Optimalizace separačních podmínek**

Cílem této práce bylo nalézt optimální separační systém pro CZE analýzu směsi fenolických kyselin a flavonoidů, ve kterém by látky byly úplně separovány a poskytovaly symetrické píky s co největší plochou. Dále bylo nutné optimalizovat proces zakoncentrování velmi zředěných roztoků modelové směsi v jedné kapiláře za použití přechodné isotachoforézy s cílem zvýšit citlivost CE analýzy (tITP-CZE). Z hlediska zamýšlené koncentrační techniky tITP je z teoretického hlediska nutné pracovat v systému s redukováným EOF, což předpokládá buď kovalentní nebo dynamické pokrytí kapiláry nebo pracovat s vyšším obsahem organické složky pufru apod., tj. realizovat zásahy, které vedou k potlačení EOF.

### **6.1.1. Volba podmínek pro CZE**

#### **6.1.1.1. Volba elektrolytového systému**

Pro separaci jsem zvolil s přihlédnutím k literatuře[18] a charakteru studovaných látek (= potenciálních aniontů) jako základ elektrolytu systém borátový s koncentracemi 50 mM, 75 mM, 100 mM, 125 mM, 150 mM a 200 mM. Jako protiion byl vybrán amonný iont. Tento výběr byl učiněn na základě práce Křivánková et al.[19], aby nedocházelo k nekontrolované migraci  $\text{OH}^-$  zónami analytů a tím rušení přechodného isotachoforetického kroku.

#### **6.1.1.2. Volba činidla pro otočení EOF**

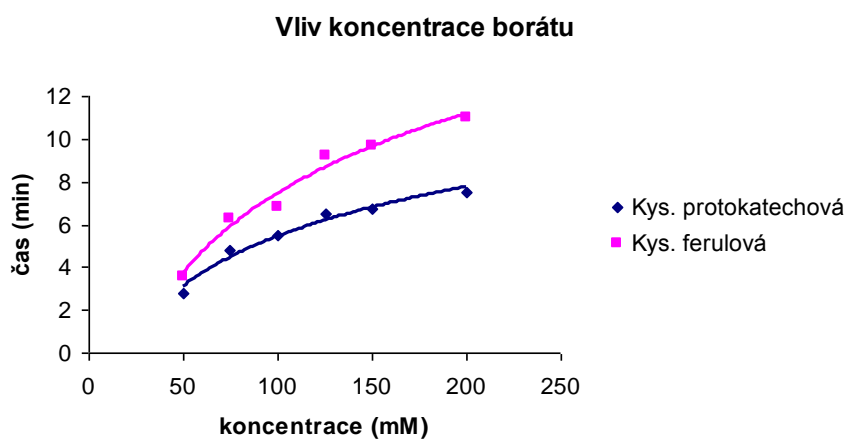
Při úvodních experimentech jsem zjistil, že při normální polaritě dojde k migraci stackeru z kapiláry ještě dříve, než stačí proběhnout zakoncentrování, a proto bylo nutné provádět analýzu při otočeném EOF a s reverzní polaritou. EOF a aniontové analyty jsou detekovány u pozitivního konce kapiláry, přičemž inlet je negativní. Původně byl pro otočení elektroosmotického toku zvolen přídavek kationického tenzidu CTAB a systém se jevil jako selektivní pouze pro fenolické kyseliny, protože flavonoidy migrovaly v čase EOF neboť byly interakcemi s CTAB jako neutrální speciés výrazně zpomaleny. Systém obsahoval 50 mM borátu, 0,5 mM CTAB a 30 % methanolu s úpravou  $\text{pH}^*$  9 pomocí amoniaku. Bohužel z neobjasněných příčin docházelo při opakovaných experimentech k sorpcím nejenom flavonoidů, ale i fenolických kyselin, což se projevovalo minimální



výškou píku a obrovským chvostováním. Dále jsem testoval vliv neutrálního polymeru hydroxyethylcelulózy v koncentraci 0,1%, při jejím použití docházelo k ucpávání kapiláry. Proto jsem dále pokračoval v práci s přidavkem polykationického polymeru HDB. Jako vhodná koncentrace byla vzhledem k literatuře zvolena koncentrace 0,001%

### 6.1.1.3. Vliv koncentrace borátového pufru

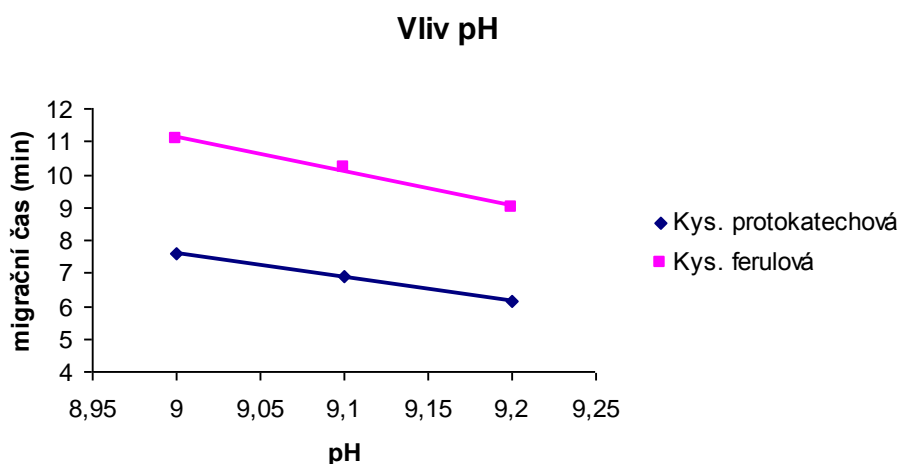
Selektivní komplexace mezi borátovým iontem a některými analyty, obsahujícími o-dihydroxylové skupiny, dá vzniknout negativně nabitým komplexům a usnadňuje tak jejich separaci při relativně nižším pH. Zjišťoval jsem vliv koncentrace elektrolytu při  $\text{pH}^* = 9$  na separaci z hlediska rozlišení píků a délky analýzy. Pro zajištění rozpustnosti flavonoidů jsem zvolil obsah methanolu 30% v pracovním médiu. Proměřil jsem koncentraci 50–200 mM. Vliv koncentrace borátu na analýzu shrnuje Obr. 12 Vysoká koncentrace borátu se ukázala jako nejlepší, neboť docházelo k prodlužování analýzy a tím i k zlepšení rozlišení mezi jednotlivými analyty. Vyšší hodnoty koncentrace borátu nebyly zkoušeny, protože vysoký protékající proud by v systému způsoboval vysokou produkci Jouleova tepla i vysokou disperzi (kapilára je chlazena pouze „větráčkem“). Dost vysoký obsah methanolu v pufru také skýtal nebezpečí jeho odpařování při vyšší teplotě a přerušování analýz. V tomto kroku ještě nemohly být identifikovány všechny analyty, neboť rozlišení nebylo u všech dostatečné. Pro měření EOF byl používán přídavek dimethylsulfoxidu (DMSO), jehož koncentrace ve vzorku byla 2,5% (V/V). Měření probíhala současně při vlnových délkách 200, 214, 280 a 352 nm.



**Obr. 12;** Vliv koncentrace borátu na migrační čas kyseliny protokatechové a ferulové. Migrační časy ostatních analytů byly mezi těmito dvěma hodnotami.

#### 6.1.1.4. Vliv pH\*

Pro ovlivnění EOF a stupně ionizace každého analytu je pH pracovního elektrolytu velmi důležitým parametrem. Vzhledem k tomu, že separace při  $\text{pH}^* = 9$  nebyla ani zdaleka dokonalá, zkoušel jsem vliv  $\text{pH}^*$  od 9 do 9,2. Vyšších hodnot  $\text{pH}^*$  nelze dosáhnout, protože činidlem k úpravě pH byl amoniak. Z Obr. 13 je patrné, že docházelo ke zkracování migračních časů, ale zároveň byl dobře patrný vliv vzrůstajícího  $\text{pH}^*$  na tvar a rozdělení píků. Jako optimální  $\text{pH}^*$  byla vybrána hodnota 9,2. Bohužel ani po tomto kroku nebyly na elektroforeogramu patrné všechny analyty.



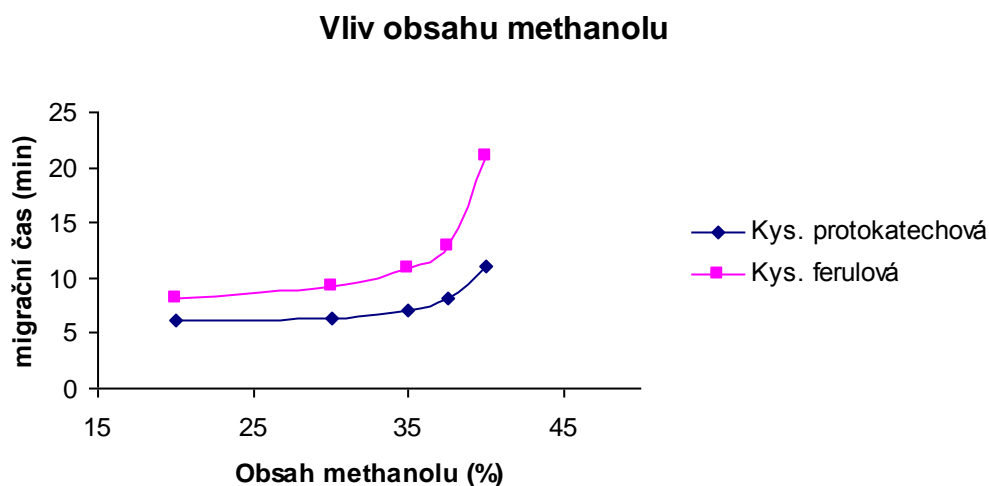
Obr. 13; Vliv  $\text{pH}^*$  na migrační čas kyseliny protokatechové a ferulové. Migrační časy ostatních analytů byly mezi těmito dvěma hodnotami.

#### 6.1.1.5. Výběr organického rozpouštědla

Sledoval jsem vliv přídavku organického činidla na průběh analýzy. Podle literatury [18] jsem zkoušel přídavek 2-propanolu, acetonitrilu, směsi 2-propanolu a methanolu a methanolu. Ukázalo se, že vzhledem k tomu, že byl vzorek rozpuštěný v methanolu, je nejlepšího rozlišení dosahováno přídavkem methanolu. Vlivem přídavku 2-propanolu v koncentraci 20% nebyly na záznamu patrné žádné píky kromě velice silně zašuměné základní linie. Směs 2-propanolu a methanolu v poměru 1:2 měla rovněž velice silný šum základní linie. Přídavek 15% acetonitrilu sice prodloužil analýzu a baseline nebyla příliš zašuměná, ale velice zhoršil rozlišení. Proto jsem se rozhodl pokračovat v analýzách s přídavkem methanolu v BGE.

### ***Vliv koncentrace methanolu***

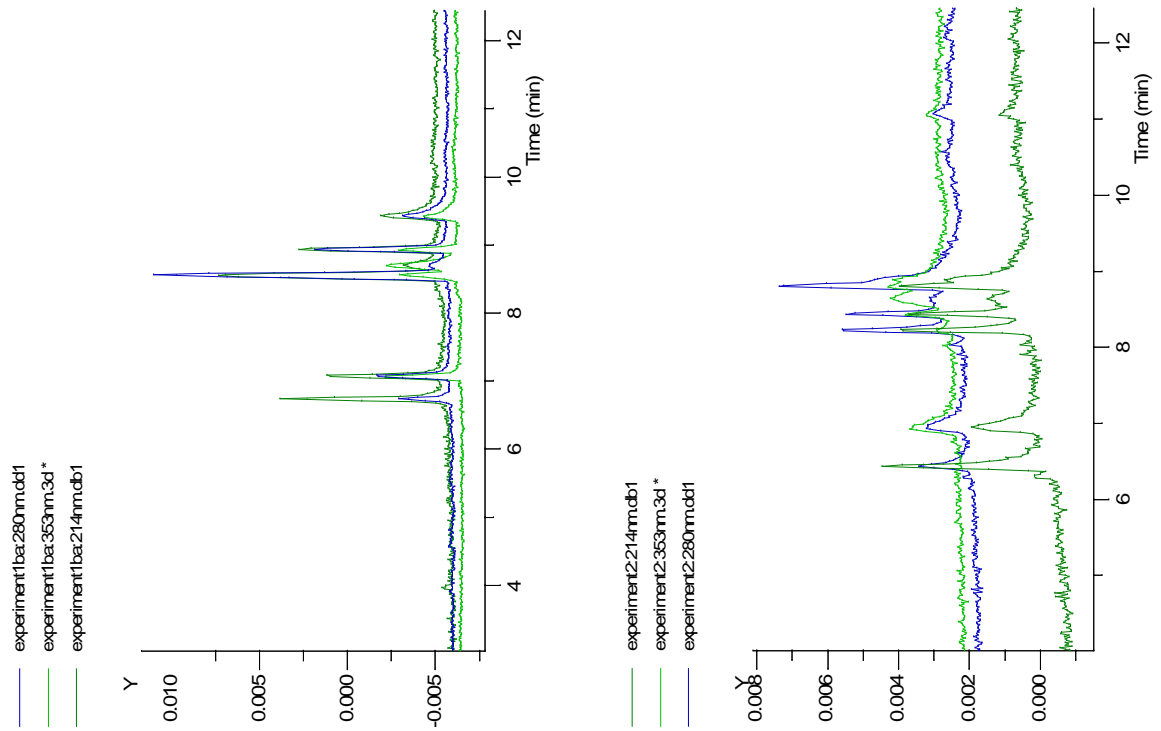
Proměřoval jsem závislost obsahu methanolu v BGE v koncentracích od 20% až po 40% viz Obr. 14. Vliv stoupající koncentrace methanolu měl prodloužením analýzy příznivý vliv na rozlišení. Při 40% methanolu v roztoku BGE už byla velmi silně zašuměná základní linie a dosti se prodloužil čas analýzy a proto jsem se rozhodl dále pokračovat s 37,5% přídavkem methanolu, kdy základní linie byla relativně stabilní. Ani po zpomalení EOF pomocí methanolu nedošlo k úplné separaci, a proto jsem dále testoval vliv cyklo-dextrinů na kvalitu separace.



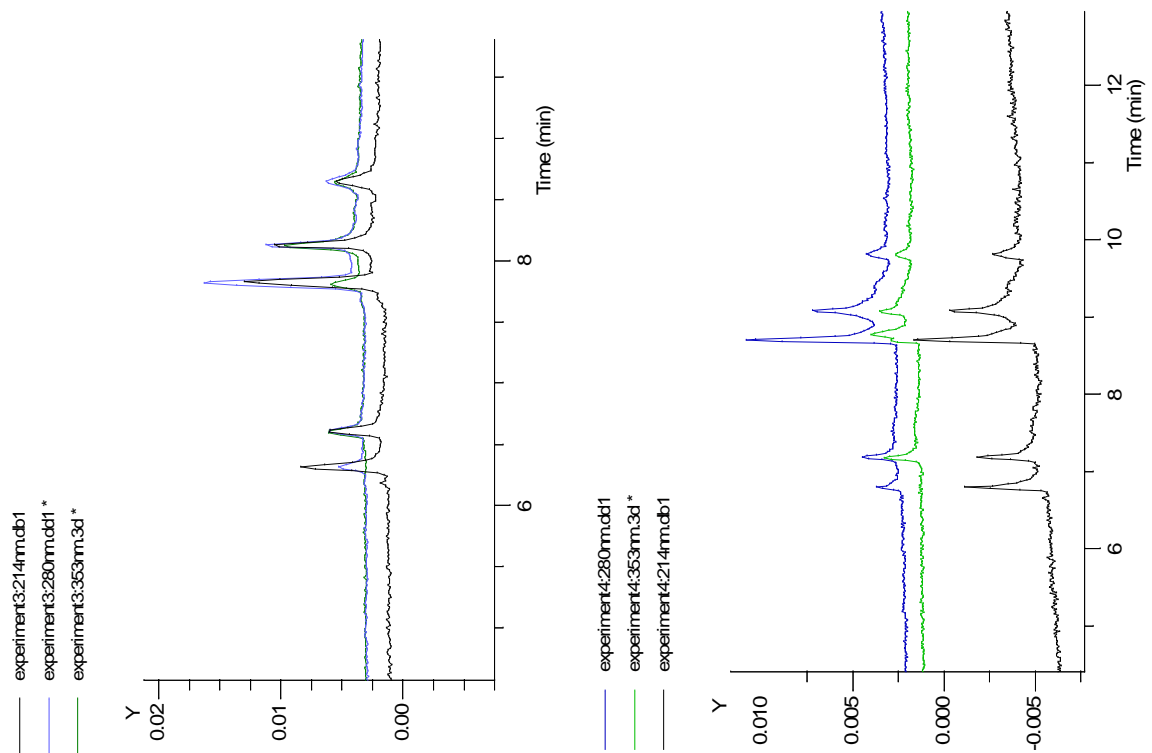
**Obr. 14; Vliv obsahu methanolu na migrační čas kyseliny protokatechové a ferulové. Migrační časy ostatních analytů byly mezi těmito dvěma hodnotami.**

### **6.1.1.6. Vliv přídavku cyklodextrinů**

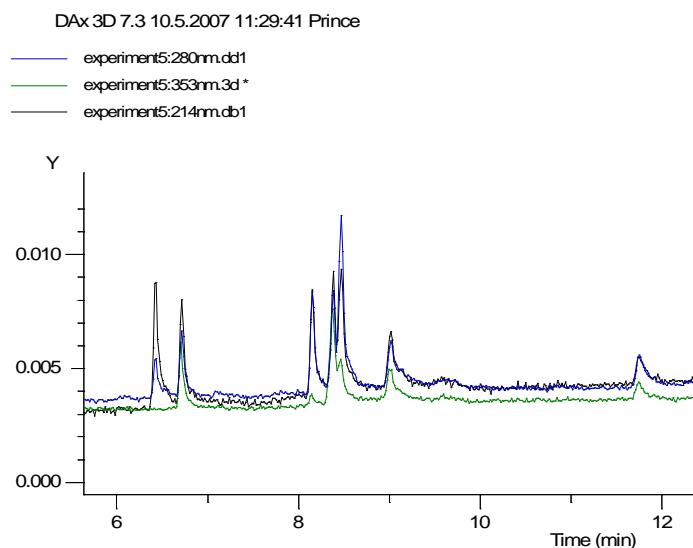
Zkoušel jsem postupně přídavek 10 mM těchto cyklodextrinů: 2,6-di-O-Methyl- $\beta$ -cyklodextrin, (2-hydroxypropyl)- $\alpha$ -cyklodextrin, (2-hydroxypropyl)- $\beta$ -cyklodextrin,  $\alpha$ -cyklodextrin a  $\gamma$ -cyklodextrin. Jako jednoznačně nejlepší se ukázal (2-hydroxypropyl)- $\beta$ -cyklodextrin, pomocí něhož bylo na elektroforeogramu patrné 8 píků (směs obsahovala devět látek) viz Obr. 15-Obr. 17.



Obr. 15; Vliv přidavku 10 mM (2-hydroxypropyl)- $\alpha$ -cyklodextrinu (vlevo) a 10 mM (2-hydroxypropyl)- $\beta$ -cyklodextrinu (vpravo).



Obr. 16; Vliv přidavku  $\alpha$ -cyklodextrinu (vlevo) a  $\gamma$ -cyklodextrinu (vpravo)



Obr. 17; Vliv přidavku 10 mM  $\gamma$ -cyklodextrinu

### ***Vliv koncentrace cyklodextrinu***

Vyzkoušel jsem vliv koncentrací (2-hydroxypropyl)- $\beta$ -cyklodextrinu 5 mM, 10 mM a 15 mM a nejlepší rozlišení poskytovala koncentrace 15 mM.

### **6.1.1.7. Vliv teploty**

Přestože je kapilární systém vybaven termostatem, docházelo v průběhu analýz často k jejich přerušování. Vysledoval jsem, že příčina je v nedostatečném termostatování prostoru kapiláry. Vzhledem k vysokým teplotám v laboratoři nebyl systém schopen udržet teplotu na požadované hodnotě tj. 25°C a při přestoupení teploty přes 25°C v prostoru kapiláry docházelo pravděpodobně k lokálnímu přehřívání až odpařování methanolu ze směsi a vzniku bublin, které následně přerušily tok elektrického proudu. Z tohoto důvodu bylo nutné v laboratoři permanentně používat klimatizaci.

### **6.1.2. Detekce**

Pro detekci jsem využíval DAD detektor. Maxima absorpce pro detekci kyselin byla při 214 a 280 nm. Pro detekci flavonoidů byla nejlepší vlnová délka 214 nebo 280 nm, kromě rutinu, který měl při těchto vlnových délkách odezvu velmi malou. Proto bylo pro vyhodnocení rutinu použito jeho maximum v 352 nm. Kyselinu chlorogenovou se nepoda-

řilo na elektroforeogramu identifikovat, ani metodou standardního přídavku ani porovná-  
ním spekter. Pravděpodobně tedy docházelo k jejímu vychytání na stěně kapiláry .

Důležitou podmínkou pro optimální CZE separaci fenolických kyselin v nalezeném  
optimálním BGE je dobrá opakovatelnost otočeného a redukováného EOF. Proto byla mo-  
bilita EOF neustále sledována a měření prováděna s EOF markrem ve vzorku a v případě  
potřeby optimalizována promývací metoda mezi analýzami (stejně hladiny elektrolytu ve  
vialkách, tři vialky s BGE-in, out, promývací, systematická výměna BGE ve vialkách po 5  
měřeních).

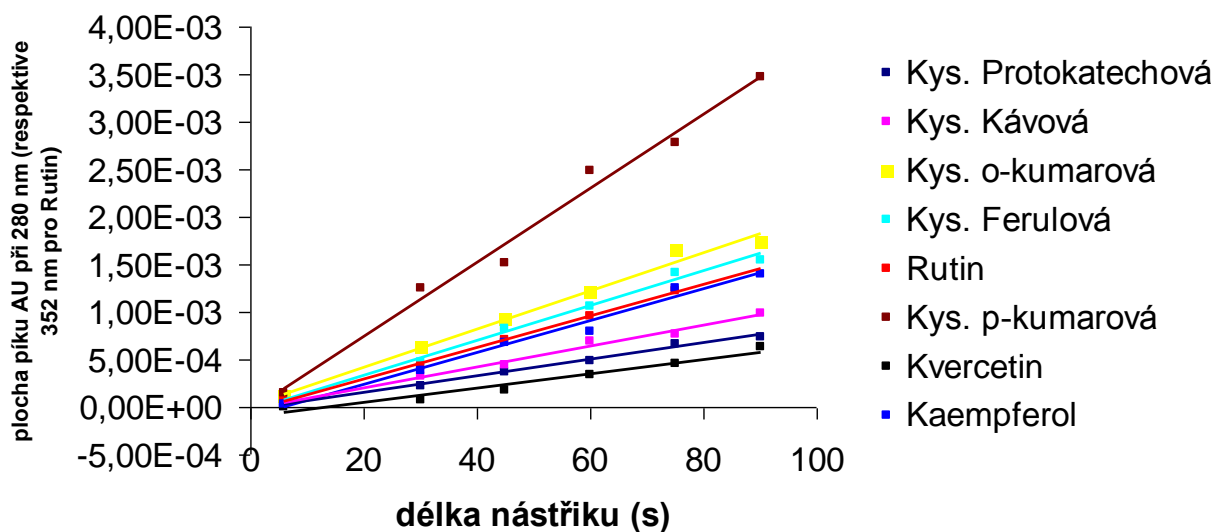
### **6.1.3. Optimalizace přechodné isotachoforézy (tITP-CZE)**

Přechodná isotachoforéza byla indukována složením vzorku, tak jak je popsáno v pod-  
kapitole Přechodná isotachoforéza indukovaná složením vzorku na str.33 a na Obr. 7. Da-  
nou koncepcí v kombinaci se složením elektrolytů v separační kapiláře lze realizovat  
tandemové on-line spojení dvou principiálně odlišných elektromigračních metod v jedné  
kapiláře bez upravování komerční instrumentace. Tímto způsobem lze dosáhnout zakon-  
centrování analytů až o několik řádů, resp. jsou vytvořeny předpoklady pro vypracování  
selektivní .elektroforetické metody s integrovanou on-line úpravou vzorku . Cenné je, že  
uvedené hyphenační techniky jsou použitelné pro přímé analýzy účinných látek  
v biologickém materiálu, resp. rostlinné matrici bez náročných off-line dělicích a čistících  
postupů.

V této práci bylo ke vzorku přidáno 100mM NaCl a byla sledována závislost odezvy  
detektoru na délce nástřiku v rozsahu 6–90 s. viz Obr. 18

Prodlužující se délka nástřiku při standardní CZE vede překročením separační kapaci-  
ty kapiláry k rozšiřování a vyšší disperzi zón, naopak prodloužení délky nástřiku při využi-  
tí tITP umožňuje získávat úzké vysoké píky. Závislost plochy píku na délce nástřiku byla  
lineární v celém rozsahu testovaných dob. Pro další práci byla zvolena doba nástřiku 80s.

## Závislost odezvy detektoru na délce nástřiku



Obr. 18; Závislost odezvy detektoru na délce nástřiku

### 6.1.4. Optimální podmínky separace

Optimální podmínky separace shrnuje Tabulka 1

<b>Koncentrace borátu</b>	200 mM
<b>pH*</b>	9,2
<b>Činidlo otáčející EOF</b>	0,001% HDB
<b>Rozpouštědlo</b>	37,5% Methanolu
<b>Cyklodextrin</b>	15 mM 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyklodextrin
<b>Teplota</b>	25°C
<b>Napětí</b>	-30kV
<b>Koncentrace NaCl pro tITP</b>	100mM
<b>Dávkování</b>	80 s, 50 mbar
<b>Detekce</b>	UV při 214 nebo 280 a 352 nm
<b>Kapilára</b>	Křemenná kapilára 50 $\mu$ m, efektivní délka 60cm, celková délka 67,2 cm

Tabulka 1; Optimalizované podmínky měření.

### 6.1.5. Kalibrační závislost

Kalibrační závislost byla měřena za podmínek shrnutých v Tabulka 1 pro koncentrace 2,5 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 25 µg/ml a 37,5 µg/ml. Kalibrační závislost nebyla změřena pro kyselinu chlorogenovou a pro kvercetin. Pro kyselinu chlorogenovou nebyla získána žádná data z důvodů popsaných výše. Pro kvercetin nebylo možné kalibraci provést v tomto rozsahu, neboť jeho limit kvantifikace byl příliš vysoký (18,5µg). To je pravděpodobně způsobeno částečnou sorpcí, která se projevuje i výrazným chvostováním píku kvercetinu. Jako kvantitativní parametr jsem použil plochu píku elektroforeogramu získaného pomocí UV detektoru. Pro každou koncentraci jsem provedl tři měření a spočítal aritmetický průměr. Kalibrační závislost jsem zpracoval pomocí programu Microsoft Excel pomocí lineární regrese. Obecný tvar kalibrační křivky:

$$y = k \cdot x + q$$

**Rovnice 21**

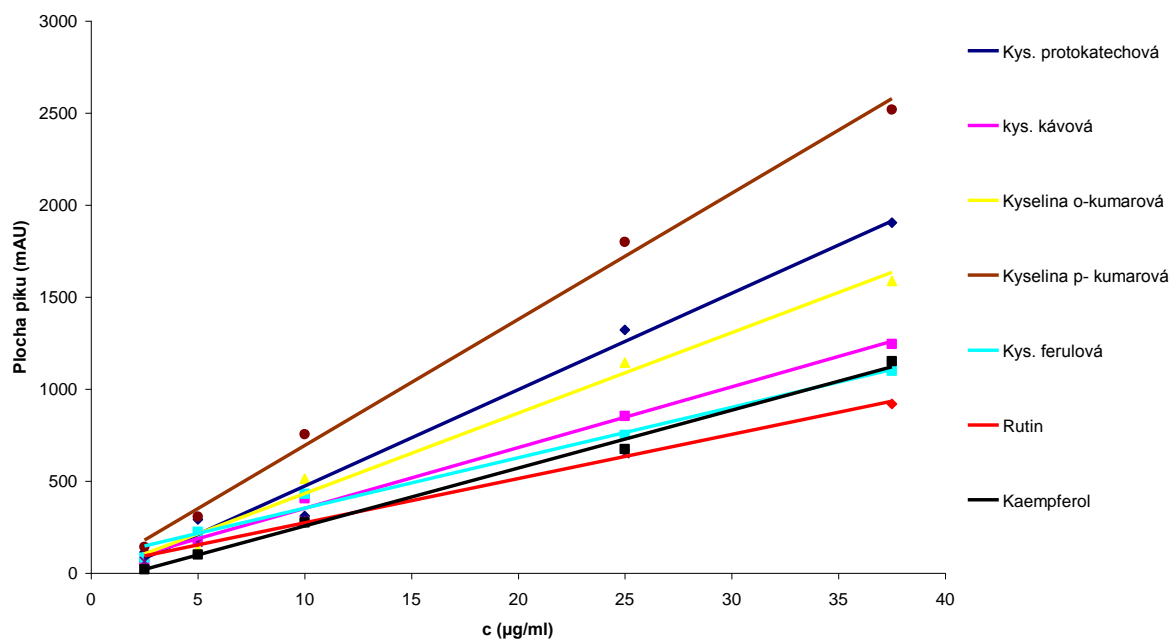
kde  $y$  je plocha píku analytu v mAU,  $x$  je koncentrace analytu v µg/ml,  $k$  směrnice přímky a  $q$  absolutní člen. Parametry kalibračních přímek včetně koeficientu korelace  $R$  shrnuje Tabulka 2 a Obr. 19. Na Obr. 20 je znázorněn typický záznam analýzy. Závislost ploch píků na koncentraci je v uvedeném rozmezí lineární, o čemž svědčí i korelační koeficienty v rozmezí 0,9922–0,9983.

Analyt	Rovnice regresní přímky $y=kx+q$	R
Kyselina protokatechová	52,36x -49,464	0,9922
Kyselina kávová	33,051x +21,503	0,9974
Kyselina o-kumarová	43,738x -4,850	0,9946
Kyselina ferulová	27,019x +79,279	0,9924
Rutin	24,019x +33,590	0,9983
Kyselina p-kumarová	68,567x +7,760	0,9980
Kaempferol	31,482x - 58,501	0,9983

**Tabulka 2; Kalibrační závislost**

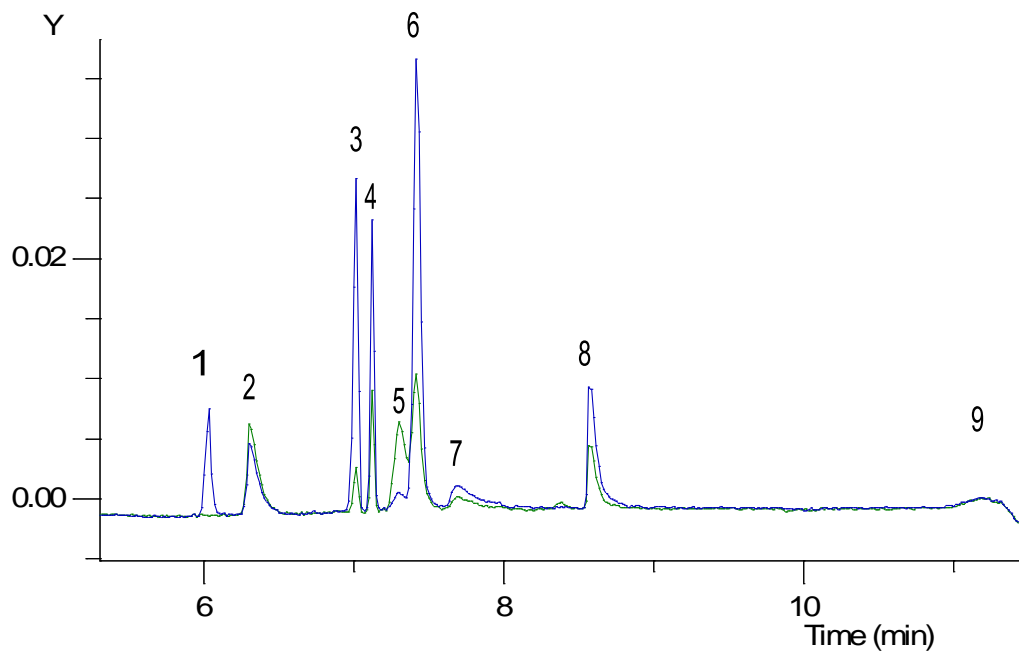


## Kalibrační závislost



Obr. 19; Kalibrační závislost

— 25µg:280nm:dd1  
 — 25µg:352nm:de1



Obr. 20; Typický elektroforeogram. 1-kys protokatechová, 2-kys. kávová, 3-kys. o-kumarová, 4-kys. ferulová, 5-rutin, 6-kys. p-kumarová, 7-kvercetin, 8-kaempferol, 9-markr EOF (DMSO)

### 6.1.6. Limity detekce a kvantifikace.

Detekční limit byl určen pro každý analyt jako koncentrace, při které byl poměr signálu k šumu roven nejméně hodnotě 3. Limit kvantifikace pak má poměr 10:1. Výsledky shrnuje Tabulka 3

Analyt	LOD ( $\mu\text{g/ml}$ )	LOQ ( $\mu\text{g/ml}$ )
Kyselina protokatechová	0,277	1,062
Kyselina kávová	0,414	1,585
Kyselina o-kumarová	0,321	1,232
Kyselina ferulová	0,461	1,768
Rutin	0,554	2,124
Kyselina p-kumarová	0,203	0,779
Kvercetin	5,556	18,543
Kaempferol	0,477	1,830

Tabulka 3; Limity detekce a kvantifikace

### 6.1.7. Opakovatelnost metody

Pro ověření opakovatelnosti migračních časů a ploch píků jsem provedl šest měření při koncentraci 25  $\mu\text{g/ml}$ . Výpočet relativní odchylky proběhl podle Rovnice 19. Výsledky jsou uvedeny v

Tabulka 4. Reprodukovatelnost časů i ploch píků je velmi dobrá. Relativní směrodatná odchylka pro migrační časy leží v rozmezí 0,79–1,01%, pro plochy píků v rozmezí od 1,34–2,13%.

Identifikace analytů byla provedena metodou přídavku standardů k modelové směsi a s využitím DAD detektoru. Spektra jednotlivých analytů byla zaznamenána a uložena do knihovny a použita pro sledování změn selektivity během optimalizace a perspektivně pro identifikaci studovaných kyselin v reálných vzorcích.

Analyt	RSD	RSD
	(%) čas	(%) plocha
Kyselina protokatechová	0,93	1,92
Kyselina kávová	0,87	1,45
Kyselina o-kumarová	0,79	1,34
Kyselina ferulová	0,84	1,87
Rutin	0,91	1,75
Kyselina p-kumarová	0,96	1,90
Kvercetin	1,01	2,13
Kaempferol	0,90	2,01

Tabulka 4; Opakovatelnost elektroforetických parametrů

### 6.1.8. Koncentrační faktor

Porovnal jsem plochy píků při standardní CZE a při použití optimálních podmínek tITP–CZE podle vztahu:

$$F = \frac{AUC_{tITP}}{AUC_{CZE}} \cdot \frac{c_{CZE}}{c_{tITP}}$$

Rovnice 22

V průměru bylo dosaženo 25násobné zakoncentrování..Další zvýšení citlivosti by bylo možné pravděpodobně dosáhnout další optimalizací objemu nástřiku, tj. optimalizací nástřikového času v kombinaci s tlakem.

### 6.1.9. Rozlišení

Podle Rovnice 20 jsem vypočítal rozlišení  $R_s$  dvou sousedních píků při optimálním složení pracovního elektrolytu a optimální délce nástřiku. Výsledky jsou uvedeny v Tabulka 5. Systém není zcela optimální pro rozlišení kyseliny protokatechové a kávové, kyseliny o-kumarové a ferulové a rutinu a kyseliny p-kumarové, jejichž hodnoty rozlišení jsou nižší než 1,5.

<b>Analyty</b>	<b>Rozlišení</b>
K. protokatechová - K. kávová	1,1
K. kávová - K. o-kumarová	4
K. o-kumarová - K. ferulová	0,8
K. ferulová - Rutin	1,6
Rutin - K. p-kumarová	0,67
K. p-kumarová - Kvercetin	2
Kvercetin - Kaempferol	4,17

**Tabulka 5; Rozlišení analytů**

## **7. ZÁVĚRY**

Z výsledků mé práce vyplývají tyto závěry:

### ***CZE v klasickém provedení- konvenční nástřik vzorku.***

1. Pomocí kapilární zónové elektroforézy byla analyzována směs šesti fenolických kyselin:(kyselina protokatechová, kávová, o-kumarová, ferulová, p-kumarová a chlorogenová) a tří flavonoidů (rutin, kvercetin a kaempferol).
2. Analýzy probíhaly v prostředí s obráceným EOF, aby bylo možno aplikovat metodu tITP-CZE. Jako činidlo otáčející EOF byl vybrán HDB v koncentraci 0,001%
3. Sledoval jsem vliv koncentrace borátového pufru na kvalitu separace v intervalu 50-200 mM. Pro další měření byla zvolena koncentrace 200 mM.
4. Studoval jsem vliv pH\* pracovního elektrolytu na kvalitu analýzy v rozmezí pH\* 9,0-9,2. Nejlepší výsledky byly poskytovány v prostředí o pH\* 9,2.
5. Vyhodnocoval jsem vliv přídavku organického rozpouštědla na účinnost separace. Pro další měření jsem vybral systém s obsahem 37,5% methanolu.
6. Sledoval jsem vliv přídavku cyklodextrinů na kvalitu separace. Nejlepší rozlišení 8 látek poskytoval přídavek 15 mM 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyklodextrin.
7. Při analýzách vyplynula nutnost v teplejších dnech klimatizovat prostor v laboratoři pro nedostatečnou interního účinnost temperování elektroforetického systému PrinCE.
8. Elektroforetická separace probíhala v kapiláře s efektivní délkou 60cm a vnitřním průměru 50 $\mu$ m. Při průměru kapiláry 75  $\mu$ m docházelo k přerušování analýz v důsledku generování vyšší hodnoty proudu. Bylo používáno hydrodynamické dávkování tlakem 50mbar po dobu 6s. Při separaci bylo vkládáno napětí -30kV s gradientem 6 kV za sekundu. Detekce probíhala při 214, 280 a 352 nm.

### ***Kapilární elektroforéza s přechodnou isotachoforézou indukovanou složením vzorku.***

1. Pro ITP zakoncentrování byl zvolen přídavek chloridů o koncentraci 100 mM.
2. Byl sledován vliv délky nástřiku na plochu píku v rozsahu 6-90s V celém tomto rozsahu byl patrný lineární nárůst plochy píku. Jako optimální doba nástřiku byla zvolena doba 80s.

3. Byla změřena kalibrační závislosti pro analyzované látky v rozmezí 2,5 µg/ml –37,5 µg/ml. Korelační koeficienty byly v rozmezí 0,9924-0,9983
4. Byly zjištěny detekční limity osmi analytů v rozmezí od 203ng/ml do 7,555 µg. Nejnížší LOD má kyselina p-kumarová a nejvyšší kvercetin.
5. Rozlišení analytů v tomto systému bylo u tří analytů nižší než 1,5. Pro větší rozlišení je potřebné prodloužit dobu nutnou pro destacking po přechodné isotachofórze. Jako nejjednodušší řešení navrhuji prodloužení efektivní délky kapiláry.
6. S využitím tITP-CZE bylo dosaženo v průměru 25 násobné zakoncentrování analytů. Vyššího zakoncentrování by mohlo být dosaženo další optimalizací nastříknutého objemu, tj. prodloužením doby nástřiku v kombinaci s optimalizací tlaku nástřiku.

## **8. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK**



BGE	Základní elektrolyt CZE (background)
CE	Kapilární elektroforéza
CEC	Kapilární elektrochromatografie
CGE	Kapilární gelová elektroforéza
CTAB	Cetyltrimethylamonium bromid
CZE	Kapilární zónová elektroforéza
DDAB	Didodecyldimethylamonium bromid
DEAED	Diethylaminoethyl-dextran
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
DPLC	Dilauroylfosfatidylcholin
EOF	Elektroosmotický tok
ESI	Ionizace elektrosprayem
FASS	Polem zesílené zakoncentrování vzorku
HDB	Hexadimethrin bromid
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IEF	Isoelektrická fokusace
ITP	Isotachoforéza
KMK	Kritická micelární koncentrace
LC	Kapalinová chromatografie
LE	Vedoucí elektrolyt ITP
LOD	Limit detekce
LOQ	Limit kvantifikace
LVSS	Zakoncentrování vzorku z velkého objemu
MEKC	Micelární elektrokinetická chromatografie
MS	Hmotnostní spektroskopie
SPE	Extrakce na pevnou fázi
TE	Koncový elektrolyt ITP
tITP	Přechodná isotachoforéza
TTAB	Tetradecyltrimethylamonium bromid

## **9. POUŽITÉ ZDROJE**

- 
- 1 HARVEY, D. *Modern analytical chemistry*. Boston. 1. mezinár. vyd. 2000. ISBN 0-07-116953-9.
  - 2 OSBOURN, D. – WEISS, D. – LUNTE, C. On-line preconcentration methods for capillary electrophoresis *Electrophoresis*. 2000. vol. 21. s. 2768-2779. ISSN 1522-2683.
  - 3 BECKERS, J. L. – BOČEK, P. Sample stacking in capillary zone electrophoresis: Principles, advantages and limitations. *Electrophoresis*. 2000. vol. 21. s. 2747-2767. ISSN: 1522-2683.
  - 4 ŠAFRA, J. Využití *on-line kombinace kapilární izotachoforézy a kapilární elektroforézy v analýze rostlinného materiálu*. 66 s. Hradec Králové. 2004. Diplomová práce na Farmaceutické fakultě Univerzity Karlovy na Katedře analytické chemie. Vedoucí diplomové práce: doc. Marie Pospíšilová, CSc.
  - 5 KŘIVÁNKOVÁ, L. – PANTŮČKOVÁ, P. – BOČEK, P. Isotachophoresis in zone electrophoresis. *Journal of Chromatography A*. 1999. vol 838. s. 55-70. ISSN: 0021-9673.
  - 6 BECKERS, J. L. Window optimization in isotachophoresis superimposed on capillary zone electrophoresis. *Electrophoresis*. 2000. vol. 21. s. 2788-2796. ISSN: 1522-2683.
  - 7 HAŠEK, J. *Využití elektroforetických metod v analýze látek přírodního původu*. 68 s. Hradec Králové. 2005. Diplomová práce na Farmaceutické fakultě Univerzity Karlovy na Katedře analytické chemie. Vedoucí diplomové práce: doc. Marie Pospíšilová, CSc.
  - 8 MELANSON, J. E. – BARYLA, N. E. – LUCY, C. A. Dynamic capillary coatings for electroosmotic flow control in capillary electrophoresis. *Trends in analytical chemistry*. 2001. vol. 20. s. 365-374. ISSN: 0165-9936.
  - 9 WANG, CH. – LUCY, C. A. Mixed cationic/anionic surfactants for semipermanent wall coatings in capillary electrophoresis. *Electrophoresis*. 2004. vol. 25. s. 825-832. ISSN: 1522-2683.
  - 10 DIRESS, A. G. – LUCY, CH. A. Electroosmotic flow reversal for the determination of inorganic anions by capillary electrophoresis with methanol-water buffers. *Journal of Chromatography A*. 2004. vol. 1027. s. 185-191. ISSN: 0021-9673.
  - 11 LUKKARI, P. – VUORELA, H. – RIEKKOLA, M. L. Effects of organic mobile phase modifiers on elution and separation of  $\beta$ -blockers in micellar electrokinetic capillary chromatography. *Journal of chromatography A*. 1993. vol. 655. s. 317-324. ISSN: 0021-9673.
  - 12 URBÁNEK, M. – KŘIVÁNKOVÁ, L. – BOČEK, P. Stacking phenomena in electromigration: From basic principles to practical procedures. *Electrophoresis*. 2003. vol. 24. s. 466-485. ISSN: 1522-2683
  - 13 REINHOUD, N. J. – TJADEN, U. R. – VAN DER GREEF, J. Automated isotachophoretic analyte focusing for capillary zone electrophoresis in a single capillary using hydrodynamic backpressure programming. *Journal of chromatography*. 1993. vol 641. s. 155-162. ISSN: 0021-9673.
  - 14 REINHOUD, N. J. – TJADEN, U. R. – VAN DER GREEF, J. Strategy for setting up single-capillary isotachophoresis-zone electrophoresis. *Journal of chromatography A*. 1993. vol 653. s. 303-312. ISSN: 0021-9673.
  - 15 REINHOUD, N. J. – TJADEN, U. R. – VAN DER GREEF, J. Correlation between zone velocity and current in automated single-capillary isotachophoresis-zone electrophoresis. *Journal of chromatography A*. 1994. vol. 673. s. 239-253. ISSN: 0021-9673.

- 
- 16 KŘIVÁNKOVÁ, L. – BOČEK, P. Synergism of capillary isotachopheresis and zone electrophoresis. *Journal of Chromatography B*. 1997. 689. 13-34. ISSN: 1570–0232.
- 17 BECKERS, J. L. Isotachopheresis superimposed on capillary zone electrophoresis. *Journal of chromatography*. 1993. vol 641. s. 363-373. ISSN: 0021–9673.
- 18 PANCORBO, A. C. – CARRETERO, A. S – GUTIÉRREZ, A. F. Co-electroosmotic capillary electrophoresis determination of phenolic acids in commercial olive oil. *Journal of Separation Sciences*. 2005. vol. 28. s. 925–934. ISSN: 1615–9314.
- 19 KŘIVÁNKOVÁ, L. et al. Importance of the counterion in optimization of borate electrolyte system for analyses of anions in samples with complex matrices performed by capillary zone electrophoresis. *Electrophoresis*. 2004. vol. 25. s. 3406–3415. ISSN: 1522–2683.
- 20 BOLDIŠ, P. *Bibliografické citace dokumentu podle ČSN ISO 690 a ČSN ISO 690-2: Část 1 – Citace: metodika a obecná pravidla*. Verze 3.3. © 1999–2004, poslední aktualizace 11. 11. 2004. URL: <<http://www.boldis.cz/citace/citace1.pdf>>.
- 21 BOLDIŠ, Petr. *Bibliografické citace dokumentu podle ČSN ISO 690 a ČSN ISO 690-2: Část 2 – Modely a příklady citací u jednotlivých typů dokumentu*. Verze 3.0 (2004). © 1999–2004, poslední aktualizace 11. 11. 2004. URL: <<http://www.boldis.cz/citace/citace2.pdf>>.