

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

**ELEKTROFORETICKÁ SEPARACE POLYHYDROXYSLOUČENIN  
VE FORMĚ KOMPLEXŮ S WOLFRAMANEM**

***RIGORÓZNÍ PRÁCE***

**HRADEC KRÁLOVÉ, 2006**

**LENKA KADEROVÁ**

Děkuji Doc. RNDr. Miroslavu Poláškov, CSc. a Mgr. Pavlovi Jáčovi za odborné vedení, ochotu a pomoc při vypracování rigorózní práce. Dále děkuji všem pracovníkům analytické chemie za cenné rady a účinnou spolupráci.

## **1. OBSAH**

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. OBSAH</b> .....  | <b>1</b>  |
| <b>2. ZKRATKY</b> .....  | <b>3</b>  |
| <b>3. ÚVOD</b> .....   | <b>5</b>  |
| <b>4. CÍL PRÁCE</b> .....  | <b>7</b>  |
| <b>5. TEORETICKÁ ČÁST</b> .....                                      | <b>9</b>  |
| <b>5.1 KAPILÁRNÍ ELEKTROSEPARAČNÍ METODY</b> .....                   | <b>10</b> |
| 5.1.1 Elektroforetická pohyblivost.....                              | 11        |
| 5.1.2 Iontová pohyblivost .....                                      | 11        |
| 5.1.3 Skutečná pohyblivost.....                                      | 11        |
| 5.1.4 Efektivní pohyblivost.....                                     | 12        |
| 5.1.5 Elektroosmotický tok (EOF).....                                | 12        |
| 5.1.6 Migrační čas.....  | 14        |
| 5.1.7 Ovlivňování elektroforetické pohyblivosti .....                | 14        |
| 5.1.7.1 Vliv pH pracovního elektrolytu .....                         | 15        |
| 5.1.7.2 Tvorba komplexů .....  | 15        |
| 5.1.7.3 Tvorba iontových asociátů.....                               | 15        |
| 5.1.7.4 Tvorba hostitelských komplexů.....                           | 15        |
| 5.1.7.5 Vliv nevodných rozpouštědel .....                            | 16        |
| 5.1.7.6 Vliv síťujícího prostředí.....                               | 16        |
| 5.1.7.7 Vliv ionogéních smáčedel.....                                | 16        |
| <b>5.2 KAPILÁRNÍ ZÓNOVÁ ELEKTROFORÉZA (CZE)</b> .....                | <b>17</b> |
| 5.2.1 Děje ovlivňující separaci .....                                | 17        |
| 5.2.1.1 Difúze.....  | 17        |
| 5.2.1.2 Jouleovo teplo .....   | 18        |
| 5.2.1.3 Elektromigrační disperze .....                               | 18        |
| 5.2.1.4 Sorpce .....   | 18        |
| 5.2.2 Instrumentální uspořádání.....                                 | 19        |
| 5.2.2.1 Separační kapilára.....                                      | 19        |
| 5.2.2.2 Zdroj vysokého napětí .....                                  | 19        |
| 5.2.2.3 Dávkování vzorku.....  | 20        |
| 5.2.2.4 Detekce .....  | 20        |
| 5.2.3 Aplikace kapilární elektroforézy .....                         | 21        |
| <b>5.3 FLAVONOIDY A FENOLICKÉ KYSELINY</b> .....                     | <b>23</b> |
| 5.3.1 Flavonoidy .....   | 23        |
| 5.3.2 Fenolické kyseliny .....                                       | 23        |
| 5.3.3 Sledované přírodní látky .....                                 | 24        |
| 5.3.3.1 Chemické struktury.....                                      | 24        |
| 5.3.3.2 Charakteristika jednotlivých látek <sup>33</sup> .....       | 25        |
| 5.3.4 Další metody analytického hodnocení polyhydroxysloučenin ..... | 26        |
| <b>5.4 KOMPLEXY ŠESTIMOCNÉHO WOLFRAMANU</b> .....                    | <b>28</b> |
| <b>6. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b> .....                                  | <b>31</b> |
| <b>6.1 CHEMIKÁLIE A ROZTOKY</b> .....                                | <b>32</b> |
| 6.1.1 Chemikálie .....   | 32        |
| 6.1.2 Roztoky .....  | 32        |
| 6.1.3 Příprava roztoků.....  | 33        |

|  |           |
|--|-----------|
| 6.1.3.1 Příprava roztoku elektrolytu .....   | 33        |
| 6.1.3.2 Příprava zásobních roztoků.....  | 33        |
| 6.1.3.3 Příprava standardního roztoku .....  | 33        |
| 6.1.3.4 Příprava kalibračních roztoků.....   | 33        |
| <b>6.2 PŘÍSTROJE .....</b>   | <b>34</b> |
| 6.2.1 Přístrojové vybavení .....   | 34        |
| 6.2.2 Kapilární elektroforetický systém PrinCE .....   | 34        |
| <b>6.3 PRACOVNÍ A VÝPOČETNÍ POSTUPY .....</b>  | <b>35</b> |
| 6.3.1 Pracovní postup.....   | 35        |
| 6.3.2 Vývoj a optimalizace metody .....  | 35        |
| 6.3.3 Měření kalibrační závislosti.....  | 36        |
| 6.3.4 Opakovatelnost metody .....  | 36        |
| 6.3.5 Rozlišení .....  | 37        |
| 6.3.6 Elektroforetická pohyblivost.....  | 37        |
| 6.3.7 Limit detekce (LOD) a limit stanovení (LOQ) <sup>32</sup> .....                                      | 38        |
| <b>7. VÝSLEDKY A DISKUSE .....</b>   | <b>39</b> |
| <b>7.1 VÝVOJ A OPTIMALIZACE METODY .....</b>   | <b>40</b> |
| 7.1.1 Volba optimální vlnové délky.....  | 40        |
| 7.1.2 Volba kapiláry vhodného průměru .....  | 41        |
| 7.1.3 Volba pracovního elektrolytu .....   | 41        |
| 7.1.4 Volba vhodné koncentrace HEPES .....   | 42        |
| 7.1.5 Volba vhodné koncentrace wolframanu sodného .....  | 43        |
| 7.1.6 Volba vhodného pH základního elektrolytu .....   | 45        |
| 7.1.7 Volba optimálního obsahu methanolu .....   | 46        |
| 7.1.8 Volba pracovního napětí .....  | 47        |
| 7.1.9 Volba doby nástřiku .....  | 48        |
| 7.1.10 Výsledky optimalizace.....  | 49        |
| 7.1.11 Elektroforeogramy .....   | 49        |
| 7.1.12 Rozlišení .....   | 51        |
| 7.1.13 Elektroforetická pohyblivost.....   | 51        |
| <b>7.2 KVANTITATIVNÍ ANALÝZA.....</b>  | <b>52</b> |
| 7.2.1 Kalibrační závislost.....  | 52        |
| 7.2.2 Limit detekce, limit stanovení .....   | 62        |
| 7.2.3 Opakovatelnost .....   | 62        |
| <b>7.3 SEPARACE MODELOVÉ SMĚSI V PŘÍTOMNOSTI DALŠÍCH<br/>FLAVONOIDŮ .....</b>                              | <b>63</b> |
| 7.3.1 Elektroforeogram směsi flavonoidů a hydroxyfenylkarboxylových kyselin.....                           | 63        |
| 7.3.2 Rozlišení .....  | 64        |
| <b>7.4 DISKUSE .....</b>   | <b>64</b> |
| 7.4.1 Porovnání použité metody s CZE využívající komplexaci analytů s B(III) a<br>komplexaci s Mo(VI)..... | 64        |
| 7.4.2 Porovnání CZE s HPLC.....  | 67        |
| <b>8. ZÁVĚR .....</b>  | <b>68</b> |
| <b>9. LITERATURA .....</b>   | <b>71</b> |

## **2. ZKRATKY**

|        |  |
|--------|--|
| ACES   | N-(2-acetamido)-2-aminoethansulfonová kyselina                         |
| BES    | N,N-bis[2-hydroxyethyl]-2-aminoethansulfonová kyselina                 |
| CTAB   | cetyltrimethylammoniumbromid   |
| CZE    | kapilární zónová elektroforéza   |
| DAD    | diode array detektor   |
| GC     | plynová chromatografie   |
| EDTA   | ethylendiaminotetraoctová kyselina                                     |
| EOF    | elektroosmotický tok   |
| HEPES  | 4-(2-hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonová kyselina                 |
| HEPPSO | 2-hydroxy-3-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl]propansulfonová kyselina |
| ITP    | izotachoforéza   |
| LOD    | limit detekce  |
| LOQ    | limit stanovení  |
| MECK   | micelární elektrokinetická chromatografie                              |
| MeOH   | methanol   |
| MES    | 2-morfolino-ethansulfonová kyselina                                    |
| MOPSO  | 3-(N-morfolino)-2-hydroxypropansulfonová kyselina                      |
| MS     | hmotnostní spektrometrie   |
| TRIS   | tris(hydroxymethyl)-aminomethan  |
| SDS    | sodium dodecyl sulfát  |

### **3. ÚVOD**



Kapilární elektroforéza je moderní separační metoda, která využívá rozdílné migrace látek iontového charakteru v elektrickém poli. Umožňuje separaci velkého množství rozmanitých sloučenin – anorganických iontů, organických molekul a bioorganických molekul za použití jednotného instrumentálního vybavení.

Velkou předností této metody je minimální spotřeba vzorku a pracovního elektrolytu, čímž se metoda stává šetrnější k životnímu prostředí, dále krátká doba analýzy, možnost on-line detekce a možnost automatizace.

Možnosti aplikace CZE jsou v současné době velmi rozsáhlé, vyznačuje se totiž vysokou separační účinností, reprodukovatelností na úrovni HPLC, ale při běžné UV detekci je přibližně o dva řády méně citlivá než HPLC.

## **4. CÍL PRÁCE**

Cílem rigorózní práce bylo vypracovat metodu kapilární zónové elektroforézy pro separaci a stanovení flavonoidů s využitím tvorby elektricky nabitých komplexů příslušných analytů s wolframanovým aniontem.

## **5. TEORETICKÁ ČÁST**

## 5.1 KAPILÁRNÍ ELEKTROSEPARAČNÍ METODY

Kapilární elektroforéza je elektromigrační dělicí metoda založená na rozdílné rychlosti putování jednotlivých složek analyzované směsi v elektrickém poli. Lze ji aplikovat na látky povahy elektrolytů tvořené nízkomolekulárními nebo vysokomolekulárními ionty a na systémy elektricky nabitých koloidních částic. Migračním prostředím je vodivý roztok elektrolytů. Hybnou silou, která uvádí částice do pohybu, je intenzita elektrického pole. Proti pohybu částic působí tření v kapalném prostředí podmíněné jeho viskozitou. Třecí síla při pohybu kulovité částice je přímo úměrná jejímu poloměru a viskozitě kapaliny (Stokesův zákon). Skutečná rychlost migrace je rozdílem těchto protichůdných vlivů. Pokud je u jednotlivých složek směsi rozdílná, dojde k jejich separaci.<sup>1,2</sup>

Separace probíhá v kapiláře, jejíž konce jsou ponořeny do nádobek s elektrolytem. K nim jsou připojeny elektrody vysokonapětového zdroje, které vytváří elektrické pole nutné pro separaci. Na distálním konci kapiláry je umístěn detektor, který snímá analytický signál. Tento signál je zapsán liniovým zapisovačem nebo dále zpracován počítačem.<sup>1</sup>

Rozlišujeme pět typů kapilárních elektromigračních metod :

- zónová elektroforéza
- micelární elektrokinetická chromatografie (MECK)
- izoelektrická fokusace
- kapilární elektrochromatografie (CEC)
- izotachoforéza (ITP)

Tyto metody mohou být provozovány i v makroměřítku, kapilární formát je zde jednotlívým prvkem kapilární elektroforézy. Separáční procesy jsou u jednotlivých typů odlišné: v zónové elektroforéze a izotachoforéze dochází k separaci na základě rozdílů efektivních pohyblivostí, v elektrokinetické micelární chromatografii na základě rozdílů rozdělovacích koeficientů mezi mobilní a pseudostacionární fází, v kapilární elektrochromatografii na základě rozdělování mezi mobilní a pevnou stacionární fází v náplňové kapiláře a v izoelektrické fokusaci na základě rozdílů v izoelektrických bodech.

### 5.1.1 Elektroforetická pohyblivost

Při elektroforéze dochází k pohybu elektricky nabitých částic v roztoku působením elektrického pole. Směr pohybu je dán znaménkem jejich náboje a orientací elektrického pole.<sup>1</sup> Rychlost pohybu částice v daném místě roztoku je přímo úměrná intenzitě elektrického pole  $E$  v tomto místě.<sup>3</sup>

$$\mathbf{v} = \mathbf{u} \cdot \mathbf{E}$$

$u$  - elektroforetická pohyblivost [ $\text{m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ]

$v$  - rychlost elektroforetického pohybu [ $\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ ]

$E$  - intenzita elektrického pole [ $\text{V} \cdot \text{m}^{-1}$ ]

Elektroforetická pohyblivost vyjadřuje rychlost pohybu částice nebo iontu v jednotkovém elektrickém poli, roste úměrně s nábojem, klesá s velikostí částice. Pohyblivostem bývá přisuzováno znaménko v souladu s nábojem příslušného iontu. Pro dvojici iont – prostředí je pohyblivost charakteristickou konstantou.<sup>1</sup>

### 5.1.2 Iontová pohyblivost

Iontová pohyblivost je znaménková veličina shodná s nábojem iontu, tedy kladná pro kationy a záporná pro aniony.<sup>1</sup>

Okolo každého iontu v roztoku vytvářejí ionty opačného znaménka tzv. iontovou atmosféru. Interakce mezi ionty ovlivňuje pohyblivost sledovaného iontu – s rostoucí koncentrací jeho pohyblivost klesá. Pokud extrapolujeme koncentrační závislost elektroforetické pohyblivosti na nulovou iontovou sílu, získáme pohyblivost iontovou  $u_0$ . S rostoucí teplotou se iontová pohyblivost zvyšuje (zvýšení teploty o 1 °C vede ke zvýšení pohyblivosti o 2%).<sup>1</sup>

### 5.1.3 Skutečná pohyblivost

Skutečná pohyblivost je pohyblivost v reálném prostředí při reálné teplotě. Je zpravidla nižší než  $u_0$  díky vzájemným interakcím iontů v konečně zředěných roztocích.<sup>2</sup>

#### 5.1.4 Efektivní pohyblivost

Látky povahy slabých kyselin a bází se v roztoku vyskytují ve dvou formách. Ve formě iontu s příslušnou elektroforetickou pohyblivostí a ve formě neutrální molekuly, která elektroforetickou pohyblivost nevykazuje. Obě formy jsou ve směsi zastoupeny v určitém poměru vyjádřeném např. disociačním stupněm. Při elektroforéze nemůže dojít k rozdělení rovnovážné směsi na nepohyblivé molekuly a pohyblivé ionty (ionizační rovnováha probíhá ve srovnání s elektromigrací nepoměrně rychleji). Směs putuje jednotnou rychlostí, která je úměrná disociačnímu stupni. Výsledná pohyblivost se nazývá efektivní pohyblivost  $\bar{u}$ , je dána vztahem :

$$\bar{u} = \sum u_i + x_i$$

$u_i$  - iontové pohyblivosti jednotlivých forem látky

$x_i$  - molární zlomky

Volbou pH lze upravit složení rovnovážné směsi a tím regulovat pohyblivost podle potřeby od nulové až po plnou iontovou. Je to účinný prostředek k dosažení optimálního dělení směsi kyselých a zásaditých látek.<sup>2</sup> Závislost elektroforetického chování jednosytných protolytů na aciditě prostředí popisuje vztah:<sup>1</sup>

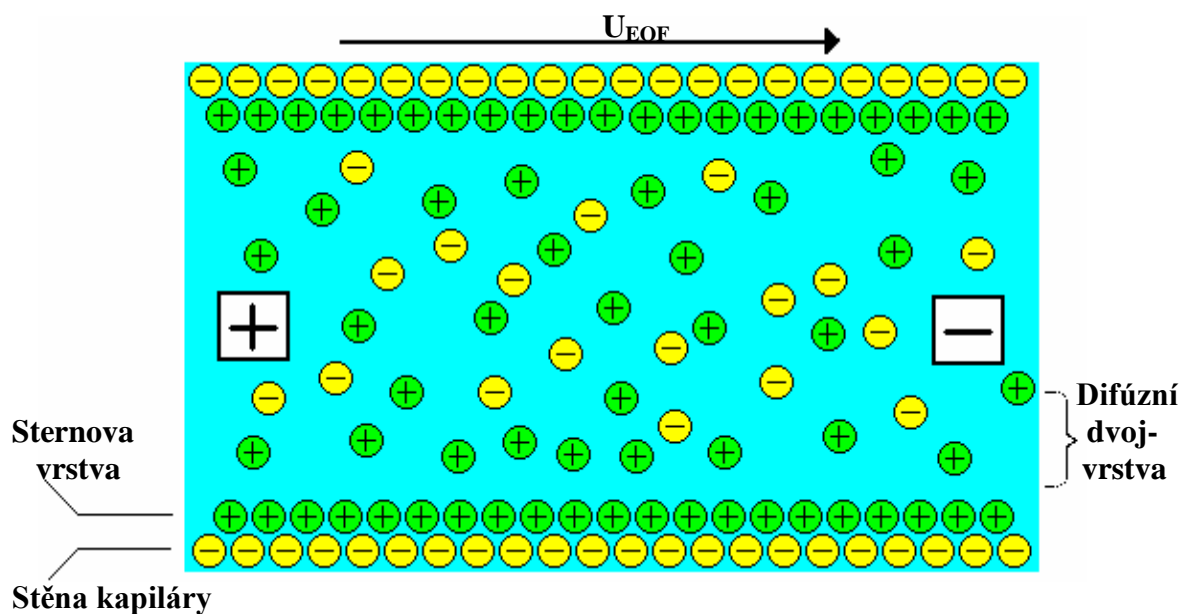
$$\bar{u} = \frac{u}{1 + 10^{pK - pH}}$$

Takto lze popsat i migrační chování komplexů. Pokud ustanovení rovnovážného stavu probíhá rychlostí srovnatelnou nebo nižší než je rychlost elektromigrace, je možné jednotlivé formy téže látky od sebe oddělit.<sup>1</sup>

#### 5.1.5 Elektroosmotický tok (EOF)

Elektroosmotický tok konstantním příspěvkem ovlivňuje pohyb částic.<sup>4</sup> Je způsoben přítomností nabitých silanolových skupin na vnitřním povrchu nepokryté křemenné kapiláry.<sup>1</sup> Negativní náboje těchto skupin přitahují kationty tlumivého roztoku a dochází ke vzniku elektrické dvojvrstvy přilehlé ke stěně kapiláry. Hydratované kationty migrují směrem ke katodě a strhávají s sebou roztok v kapiláře. Proudění kapaliny kapilárou tímto

jevem se nazývá elektroosmotický tok – EOF.



Obr. 1 Elektroosmotický tok

Velikost EOF je závislá na velikosti zeta potenciálu  $\zeta$  elektrické dvojvrstvy vytvořené na rozhraní proudící kapaliny a stěny kapiláry. Rychlost EOF je dána vztahem:<sup>3</sup>

$$v_{\text{EOF}} = \frac{\varepsilon \cdot \zeta \cdot E}{\eta}$$

$\varepsilon$  - permitivita roztoku

$\zeta$  - elektrokinetický potenciál

$E$  – intenzita elektrického pole

$\eta$  - viskozita roztoku

Zeta potenciál, a tedy i EOF, jsou závislé na pH. Při  $\text{pH} \approx 2$  je tok téměř nulový a se vzrůstem pH se zvyšuje (dochází k významnějšímu nahrazování  $\text{H}^+$  iontů na vnitřním povrchu kapiláry za ionty tlumivého roztoku). Elektroosmotický tok směřuje od anody ke katodě a již při neutrálním pH nabývá rychlosti, která převyšuje elektromigraci většiny aniontů, takže anionty putují paradoxně ke katodě. Výsledná rychlost pohybu aniontů a kationtů je dána vektorovým součtem jejich migrační rychlosti a rychlosti pohybu EOF. Neutrální částice tudíž migrují rychlostí odpovídající rychlosti EOF, anionty jsou v závislosti na velikosti náboje vymývány jako poslední. Kationty, které se pohybují ve směru EOF, jsou vymyty jako první.<sup>3</sup>



Z praktického hlediska je přítomnost EOF v některých případech výhodná, především při současné analýze kationtů a aniontů popř. i neutrálních částic.<sup>1</sup> Někdy je však nutné EOF eliminovat, proto se vnitřní povrch kapiláry opatřuje polymerním pokryvem, který blokuje volné silanové skupiny zodpovědné za EOF.

### 5.1.6 Migrační čas

Elektroforetická pohyblivost je veličina, kterou nelze zjistit přímo experimentálně. Lze ji vypočítat z migračního času  $t_m$ , tj. času, který je nutný pro migraci látky z místa nástřiku do detekční cely. Pokud dochází k hydrodynamickému toku (např. důsledkem elektroosmózy), je nutno znát i migrační čas nenabitých částic  $t_o$ . Elektroforetická pohyblivost se vypočte ze vztahu:<sup>1</sup>

$$u = \frac{l_t \cdot l_s}{U} \cdot \left( \frac{1}{t_m} - \frac{1}{t_o} \right)$$

$l_t$  – celková délka kapiláry [m]

$l_s$  – efektivní délka kapiláry (vzdálenost od nástřiku po detektor) [m]

$U$  – pracovní napětí [V]

$t_m$  – migrační čas látky [s]

$t_o$  – migrační čas nenabitých částic [s]

### 5.1.7 Ovlivňování elektroforetické pohyblivosti

Při analýze směsi látek je potřeba maximalizovat rozdíly v migračních časech všech nebo alespoň hlavních komponentů vzorku. Jedna z cest, jak toho dosáhnout, je použití delší separační kapiláry. Nevýhodou však je podstatné prodloužení doby analýzy. Proto se k tomuto kroku přistupuje až po vyčerpání dalších možností. Snahou je najít takové podmínky, aby rozdíly elektroforetických pohyblivostí mezi sousedními zónami byly co největší. Toho lze dosáhnout změnou pH pracovního elektrolytu, přidavkem vhodného komplexujícího činidla, látek vytvářejících hostitelské komplexy, detergentů, přidavkem nevodného rozpouštědla nebo použitím gelu.<sup>1</sup>

### **5.1.7.1 Vliv pH pracovního elektrolytu**

Změna pH pracovního elektrolytu je nejjednodušším krokem vedoucím ke změně elektroforetické pohyblivosti látek povahy slabých kyselin a bází. Se změnou pH dochází ke změně ionizace a tím ke změně efektivní pohyblivosti látky. Při hledání optimálního pH pro separaci určitých látek je potřeba vycházet ze závislosti elektromigračních pohyblivostí těchto látek na pH pracovního elektrolytu. Vhodná hodnota pH je taková, při které je rozdíl pohyblivostí největší.<sup>1</sup>

### **5.1.7.2 Tvorba komplexů**

U analyzovaných látek, které mohou vytvářet komplexy, může dojít vhodným přídavkem iontu 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 centrálního iontu a druhu ligandu, což vede k vysoce selektivní analýze.<sup>3</sup> Takto lze využít tvorby komplexů při analýze kovů, kde se hledá vhodný ligand a jeho koncentrace na dosažení úplné separace. Analogicky se hledá vhodný kovový iont pro separaci ligandů.

### **5.1.7.3 Tvorba iontových asociátů**

Tvorba iontových asociátů se využívá ke snížení rychlosti migrace analytů.<sup>3</sup> Ionty s vyšším nábojem vytváří díky silným coulombickým interakcím iontové asociáty s ionty opačného znaménka. Čím vyšší je náboj interagujících iontů, tím výraznější je redukce mobility. Nejčastěji jsou používány kyseliny a baze o vyšším náboji (např. kyselina citrónová, kyselina fytová, spermin).<sup>1</sup>

### **5.1.7.4 Tvorba hostitelských komplexů**

Jedná se o separace 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 skupiny, čímž vznikají různě pevné hostitelské komplexy. Vzhledem k tomu, že hydroxylové skupiny na povrchu jsou chirální, vytváří cyklodextriny s chirálními separandy komplexy lišící se stabilitou, což umožňuje jejich

separaci.<sup>1</sup>

Jako chirální selektory se mohou používat také cyklické polyethery, polysacharidy a bílkoviny.<sup>6</sup>

#### ***5.1.7.5 Vliv nevodných rozpouštědel***

Přídavkem nevodného rozpouštědla k pracovnímu elektrolytu dochází ke změně solvatace separovaných iontů a ke změně viskozity elektrolytu. Tím dochází k ovlivnění iontové pohyblivosti, což může přispět k účinné separaci. Nejčastěji se využívá methanol, ethanol, propanol, aceton, acetonitril a dimetylsulfoxid.<sup>1</sup>

Přídavek organických modifikátorů do tlumivého roztoku obecně způsobuje snížení elektroosmotického toku.<sup>6</sup>

#### ***5.1.7.6 Vliv síťujícího prostředí***

Použití síťujícího prostředí je vhodné pro separaci polymerů s odlišnou molekulovou hmotností. Síťujícím prostředím s největší tradicí je polyakrylamidový gel. Menší molekuly procházejí gelem snáze, větší molekuly jsou při migraci síťujícím prostředím více zpomalovány. Dnes jsou gelové kapiláry nahrazeny roztoky lineárních polymerů. Nejčastěji používanými lineárními polymery jsou deriváty celulózy, polyvinylalkohol, polyetylglykol, dextran a další.<sup>1</sup>

#### ***5.1.7.7 Vliv ionogenních smáčedel***

Přídavek ionogenních smáčedel k pracovnímu elektrolytu je další možností, jak ovlivnit pohyblivost jednotlivých složek vzorku. Využití nachází např. SDS při elektroforéze bílkovin. Po překročení kritické micelární koncentrace začnou ze smáčedel vznikat micely. Tento jev je podstatou micelární elektrokinetické chromatografie.<sup>1</sup> Používají se anionaktivní, kationaktivní nebo neutrální surfaktanty (SDS, TWEEN), které způsobují modifikaci elektroosmotického toku, solubilizaci hydrofobních analytů.

## 5.2 KAPILÁRNÍ ZÓNOVÁ ELEKTROFORÉZA (CZE)

Migračním prostředím je při CZE jediný pracovní elektrolyt, který zaujímá celý migrační prostor. Jeho složení je všude stejné, v důsledku toho je v celé kapiláře konstantní elektrické pole.

Vzorek se nanáší ve formě roztoku najednou do určitého místa migračního prostoru jako úzká zóna. Jednotlivé složky směsi putují rozdílnými rychlostmi, úměrnými jejich pohyblivostem.

$$\mathbf{v}_i = \mathbf{u}_i \cdot \mathbf{E}$$

Jakmile je směs takto rozdělena na zóny jednotlivých látek, může dojít k analytickému vyhodnocení pomocí detekčního zařízení. Látky (již separované) migrují kapilárou dále, až všechny postupně projdou určitým místem, kde je detekční cela. Záznam analýzy, elektroforeogram, reprezentuje závislost odezvy (určitého signálu) detektoru na čase.

Při elektromigraci se v kapiláře uplatňují ještě další jevy, které ovlivňují průběh separace, a mohou působit velmi negativně, jednotlivé zóny mohou být rozmývány a promíchávány.<sup>5</sup>

### 5.2.1 Děje ovlivňující separaci

#### 5.2.1.1 Difúze

Vlivem difúze dochází k rozmývání elektroforetických zón, u kterých se nezachovává původní šířka a ostré ohraničení. Účinnost elektroforetické separace je dána součtem dosažených teoretických pater  $N$  :

$$N = \frac{\mathbf{u} \cdot U}{2 \cdot D}$$

$u$  – elektroforetická pohyblivost

$U$  – napětí

$D$  – difúzní koeficient

Vzhledem k přímé úměře mezi pohyblivostí a difúzním koeficientem bude menší disperze (a větší počet teoretických pater) u větších molekul s malým difúzním koeficientem.<sup>1</sup>

### **5.2.1.2 Jouleovo teplo**

Průchod elektrického proudu pracovním elektrolytem způsobuje tvorbu Jouleova tepla.<sup>1</sup> Zvýšení teploty vede ke zvýšení pohyblivosti iontů a je dosaženo kratších migračních časů. Množství tepla vznikající v kapiláře je přímo úměrné vodivosti elektrolytu  $K$ , vloženému napětí  $U$  a nepřímo úměrné délce kapiláry  $L$ .

Při chlazení dochází ke vzniku teplotního gradientu uvnitř kapiláry, což má negativní dopad na kvalitu separace. Ionty pohybující se v ose kapiláry, kde teplota dosahuje vyšších hodnot, se pohybují nejrychleji, zatímco na okraji naopak nejpomaleji. Tento jev zaznamenává detektor jako rozšíření zóny.<sup>1</sup>

### **5.2.1.3 Elektromigrační disperze**

Rozdíl v pohyblivostech mezi analytem a iontem pracovního elektrolytu se projevuje asymetrií elektroforetického píku. Pokud má analyt větší pohyblivost, je v jeho zóně nižší intenzita elektrického pole. Jestliže ionty na jeho čelním rozhraní opouští difúzní zónu, dostávají se do prostředí o vyšší intenzitě elektrického pole, dochází k jejich urychlení a čelní rozhraní je plošší než bylo při vlivu prosté difúze. Naopak na zadním rozhraní se ionty opouštějící zónu dostávají do prostředí o vyšší intenzitě elektrického pole, jejich migrační rychlost se zvýší a jsou vráceny zpět. Dochází k zaostřování zadního rozhraní zóny. Analogicky se tvoří asymetrická zóna při migraci analytu o menší pohyblivosti než má iont pracovního elektrolytu (čelní rozhraní je ostré a zadní je difúzní). Zóna iontu, který má stejnou pohyblivost jako iont základního elektrolytu, nebude elektromigrační disperzí ovlivněna. Čím je rozdíl v pohyblivostech mezi analytem a iontem pracovního elektrolytu větší, tím je zóna více deformovaná.<sup>1</sup>

### **5.2.1.4 Sorpce**

Negativní vliv na kvalitu separace má i interakce iontů se stěnou kapiláry. Pokud jsou tyto interakce dostatečně silné, může dojít k úplné sorpci analytu na stěnu kapiláry. Tento jev se může projevit i absencí píku v elektroforeogramu, v lepším případě asymetrií a chvostováním píku.<sup>1</sup>

## 5.2.2 Instrumentální uspořádání

Zařízení pro kapilární zónovou elektroforézu je velmi jednoduché, obsahuje separační kapiláru, zdroj napětí, dávkovač vzorku, detektor a zařízení pro záznam analytického signálu<sup>1</sup> (obr. 2).

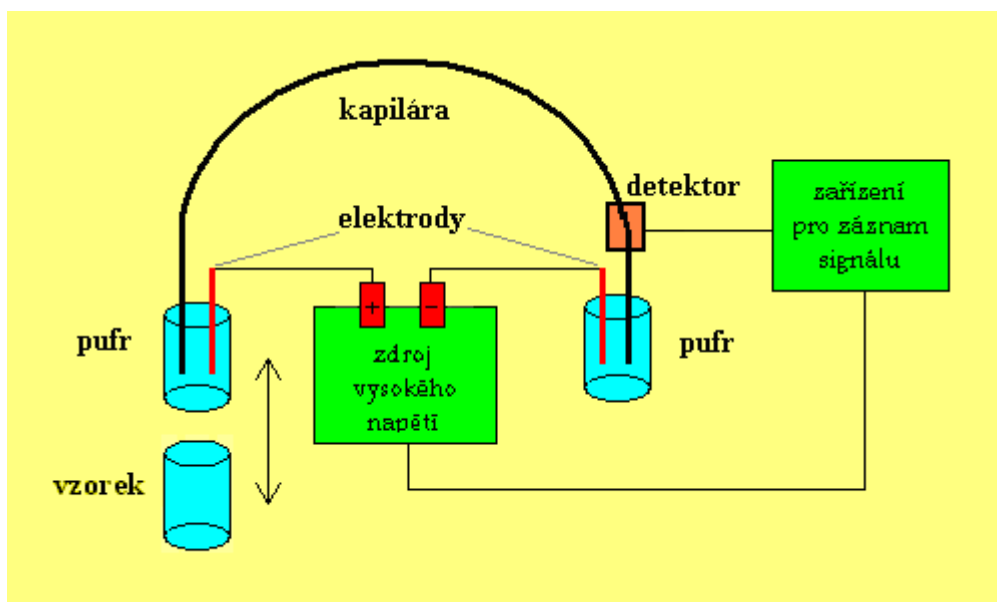
### 5.2.2.1 Separační kapilára

V kapilární elektroforéze se nejčastěji používají křemenné kapiláry, které jsou z důvodu lepší mechanické pevnosti pokryty vrstvou polyimidu. Výjimečně se využívají teflonové nebo skleněné. Vnitřní průměr kapiláry je obvykle v rozmezí 25 – 100  $\mu\text{m}$ . Délka kapiláry dosahuje 20 – 100 cm.<sup>2</sup>

V místě detekce má opticky průhledné okénko. Rozměr kapiláry ovlivňuje čas analýzy, účinnost separace a kapacitu.<sup>6</sup> Během elektroforetického děje jsou oba konce kapiláry ponořeny v elektrodových nádobkách naplněných pracovním elektrolytem.<sup>1</sup>

### 5.2.2.2 Zdroj vysokého napětí

K elektrodovým nádobkám jsou připojeny elektrody vysokonapěťového zdroje s rozsahem 0 – 30 kV. Vyšší vložené napětí, které by teoreticky mělo vést ke zkrácení doby analýzy, nemá již praktický význam, neboť dochází k ionizaci vzduchu a vzniku elektrického výboje v okolí elektrod.<sup>1</sup>



Obr. 2 Schéma instrumentálního uspořádání pro kapilární elektroforézu

### 5.2.2.3 *Dávkování vzorku*

Dávkování vzorku do kapiláry má vliv na kvantitativní výsledky měření. Obecně lze rozlišit dva způsoby dávkování: hydrodynamické a elektromigrační .

Hydrodynamické dávkování spočívá ve vtlačování úzkého sloupce kapalného vzorku do kapiláry vlivem tlakových rozdílů podél kapiláry. Tento způsob dávkování je založen na aplikaci určitého objemu vzorku, tudíž efektivita dávkování je stejná pro kationty, anionty a neutrální částice. Využívá se různých mechanismů – *head space* dávkování pomocí tlaku, použití *vakua* – aplikací podtlaku na opačný konec kapiláry, samospádové dávkování využívající tzv. *sifonového efektu* – nádobka se vzorkem se zvedne na určitou dobu do určité výšky nad nádobku s pracovním elektrolytem a vzorek se aplikuje do kapiláry konstantním tokem.

Elektromigrační dávkování spočívá v tom, že anodický konec kapiláry se přesune z nádoby s pracovním elektrolytem do nádoby se vzorkem, přičemž dávkovací napětí je nižší než je pracovní a čas aplikace je krátký (5 – 60 s). Tento způsob je založen na elektroforetické pohyblivosti jednotlivých částic vzorku. Je to jediný možný způsob dávkování vzorku v kapilární gelové elektroforéze.<sup>1</sup>

Vzhledem k faktu, že elektroforetická pohyblivost je dána velikostí částic a jejich nábojem, bude zastoupení kationů, anionů a neutrálních částic v nadávkovaném vzorku nerovnoměrné,<sup>3</sup> do kapiláry budou přednostně vstupovat mobilnější částice.

### 5.2.2.4 *Detekce*

Vhodný detektor je volen s ohledem na jeho citlivost, selektivitu, linearitu záznamu a hladinu šumu. Vhodně zvolený detektor přispívá ke správné identifikaci, neboť získaný signál je závislý na charakteru analytu.<sup>5</sup> U kapilární elektroforézy je nejčastější způsob detekce v on-line uspořádání, kdy je analytický signál získáván přímo na kapiláře.<sup>1</sup>

#### UV absorpce

UV detekce patří mezi nejrozšířenější metody detekce v kapilární elektroforéze. Většina analytů obsahuje chromofory, které umožňují absorpci v UV oblasti bez předchozí derivatizace. Vzhledem k velkému počtu sloučenin absorbujících v UV oblasti dochází k častým interferencím, což vede k překrývání píků analyzovaných složek.<sup>3</sup>

Pro identifikaci píků je výhodné použít diode – array detektoru, který využívá polychromatického paprsku. Výsledkem je trojrozměrný elektroforeogram, kde je pro

každý pík zachyceno celé spektrum, což přispívá k přesnější identifikaci.<sup>1</sup>

Lze použít i *nepřímou UV detekci*. Pokud stanovovaná látka v UV oblasti neabsorbuje, je možné využít přítomnost absorbujícího spoluiontu jako hlavní součásti pracovního elektrolytu. Při průchodu zóny analytu detektorem se na zapisovači objeví negativní pík.

### Fluorescence

Fluorescence poskytuje velmi vysokou selektivitu a citlivost detekce. Selektivita vyplývá z faktu, že je jen málo sloučenin, které samovolně fluoreskují, obzvláště ve viditelné oblasti. To vedlo k přípravě fluorescenčních činidel, kterými jsou tyto látky převáděny na fluoreskující sloučeniny.<sup>3</sup> Mezi tato činidla patří např. ftalaldehyd, dansylchlorid, fluoreskamin a další.

### Hmotnostní spektrometrie

Kombinace CZE a MS je metoda využívající migrace iontů v roztoku a ve vakuu. Pro každou látku lze získat hmotové spektrum, což umožňuje snadnou identifikaci píků.<sup>1</sup>

### Amperometrie

Amperometricky lze snadno detekovat oxidovatelné ionty. Citlivost detekce není závislá na průměru kapiláry.<sup>1</sup>

### Konduktometrie

Jedná se o univerzální způsob detekce využívající rozdílné vodivosti zón analytu a pracovního elektrolytu.<sup>1</sup>

## **5.2.3 Aplikace kapilární elektroforézy**

Metody kapilární elektroforézy mají obecně v praxi velmi široké využití, lze je aplikovat na separaci velkého množství rozmanitých chemických sloučenin – anorganických iontů, organických molekul a bioorganických makromolekul.

- Analýza *aminokyselin, peptidů, proteinů* (určení aminokyselinového složení hydrolyzátu neznámých proteinů, stanovení sekvence aminokyselin v bílkovinách, peptidové mapy apod.)
- Analýza *nukleotidů, nukleových kyselin* (určování sekvencí bází v molekule DNA)



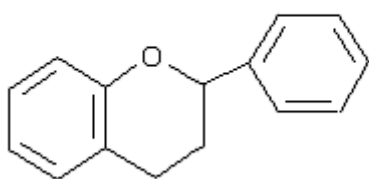
- *Analýza tělních tekutin* (separace sérových bílkovin, monitorování lékových hladin, stanovení toxických agens)
- *Ostatní analýzy* (analýzy léčiv, potravin, průmyslových a zemědělských vzorků)<sup>1</sup>

## 5.3 FLAVONOIDY A FENOLICKÉ KYSELINY

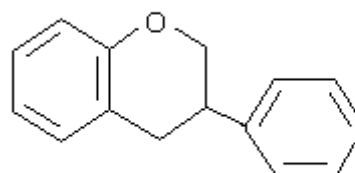
### 5.3.1 Flavonoidy

Flavonoidy jsou netoxické, farmaceuticky významné přírodní látky vyskytující se v rostlinných materiálech. Pro všestranné působení na lidský organismus se často nazývají **bioflavonoidy**. Vyskytují se většinou glykosidycky vázané, rozpuštěné v buněčné šťávě vakuoly, lipofilní methoxylované deriváty se nalézají v silicích.

Flavonoidy jsou deriváty 2-fenylchromanu, deriváty 3-fenylchromanu se nazývají isoflavonoidy.<sup>8</sup>



Obr. 3 Flavonoidy



Obr. 4 Isoflavonoidy

Flavonoidy snižují patologicky zvýšenou permeabilitu a lomivost kapilár (P-vitamínový účinek), působí antihemoragicky a antiedematózně, potencují účinek vitamínu C. Mají hypotenzivní účinek a pozitivně ovlivňují srdeční činnost. Flavonoidy se rovněž vyznačují diuretickým, choleretickým, cholagogním a spasmolytickým účinkem. Jejich antitrombotická aktivita souvisí s tvorbou komplexů s vápenatými ionty, brání tak srážení krve a zadržují vápník v těle. Významné je jejich antioxidační působení, potlačují tvorbu volných radikálů kyslíku a tím chrání organismus před mnoha civilizačními chorobami.

Neméně důležitou vlastností flavonoidů je jejich schopnost inhibovat enzymy: hyaluronidázu, lipooxygenázu a cyklooxygenázu.

Ze všech výše zmíněných biologických účinků je terapeuticky nejvíce využívaná schopnost ovlivňovat činnost srdce, schopnost působit angioprotektivně, antihemoragicky, protizánětlivě a diureticky.<sup>8</sup>

### 5.3.2 Fenolické kyseliny

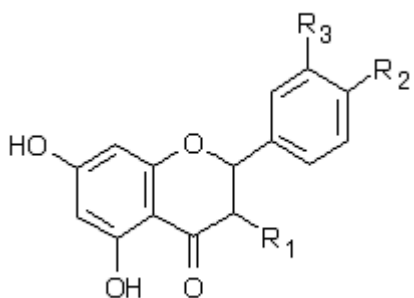
Aromatické rostlinné kyseliny jsou rozšířené sekundární metabolity rostlin a mají mnohé fyziologické vlastnosti. Kromě rozmanitých funkcí v rostlinné říši, mají některé kyseliny jak chemotaxonomický význam tak farmakologické vlastnosti. Většina aromatických kyselin existuje jako deriváty benzoové nebo skořicové kyseliny.<sup>10</sup> Jsou to

produkty rostlinných pletiv, které přispívají ke vzniku polymerních struktur taninu a ligninu. Přestože je dobře doložen škodlivý vliv na dostupnost živin, jeví i známky protitumorové a antivirové aktivity.<sup>9</sup>

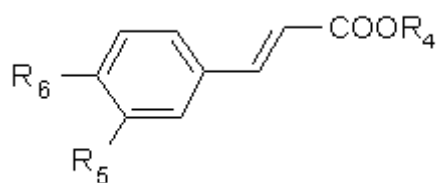
### 5.3.3 Sledované přírodní látky

Předmětem zájmu rigorózní práce jsou flavonoidy (apigenin, hyperosid, kvercetin, luteolin a rutin) a deriváty kyseliny skořicové (chlorogenová kyselina a p-kumarová kyselina). Při optimalizaci elektroforetické metody obsahovala modelová směs analytů pouze rutin, kvercetin, chlorogenovou a p-kumarovou kyselinu.

#### 5.3.3.1 Chemické struktury



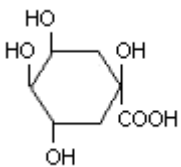
Obr. 5 Chemická struktura flavonoidů



Obr. 6 Chemická struktura derivátů kyseliny skořicové

Tab. 1: Studované látky (struktury viz Obr. 5 a Obr. 6)

| Flavonoidy | R <sub>1</sub>  | R <sub>2</sub> | R <sub>3</sub> | pKa <sub>1</sub>   |
|------------|-----------------|----------------|----------------|--------------------|
| Apigenin   | H               | H              | OH             | 8,54 <sup>36</sup> |
| Rutin      | O-rhamnoglukosa | OH             | OH             | 7,12 <sup>23</sup> |
| Hyperosid  | O-galaktosa     | OH             | OH             |                    |
| Kvercetin  | OH              | OH             | OH             | 6,74 <sup>23</sup> |
| Luteolin   | H               | OH             | OH             | 7,52 <sup>23</sup> |

| Der. skořicové kyseliny | R <sub>4</sub>  | R <sub>5</sub> | R <sub>6</sub> | pKa                |
|-------------------------|---|----------------|----------------|--------------------|
| P-kumarová kyselina     | H   | H              | OH             | 6,64 <sup>37</sup> |
| Chlorogenová kyselina   | <br>chinová kyselina | OH             | OH             | 3,59 <sup>37</sup> |

### 5.3.3.2 Charakteristika jednotlivých látek<sup>33</sup>

#### **APIGENIN**

Chemický název: 5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxyfenyl)-chromen-4-on

Sumární vzorec: C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub>

Biologická aktivita: spasmolytické účinky

#### **RUTIN (VITAMÍN P)**

Chemický název: 2-(3,4-dihydroxyfenyl)-5,7-dihydroxy-3-[3,4,5-trihydroxy-6-(3,4,5-trihydroxy-6-methyltetrahydropyran-2-yloxy)]-chromen-4-on

Sumární vzorec: C<sub>27</sub>H<sub>30</sub>O<sub>16</sub>

Biologická aktivita: zvyšuje pevnost žilní stěny

snižuje permeabilitu stěny kapilár

potlačuje fragilitu kapilár

#### **HYPEROSID**

Chemický název: 2-(3,4-dihydroxyfenyl)-5,7-dihydroxy-3-(3,4,5-trihydroxy-6-hydroxymethyltetrahydropyran-2-yloxy)-chromen-4-on

Sumární vzorec: C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>12</sub>

Biologická aktivita: antihemoragický účinek

adstringenční účinek

#### **KVERCETIN (MELETIN)**

Chemický název: 2-(3,4-dihydroxyfenyl)-3,5,7-trihydroxychromen-4-on

Sumární vzorec: C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>7</sub>

Biologická aktivita: napomáhá potlačení fragility kapilár

## LUTEOLIN

Chemický název: 2-(3,4-dihydroxyfenyl)-5,7-dihydroxy-4H-1-benzopyran-4-on

Sumární vzorec: C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>6</sub>

Biologická aktivita: protizánětlivý účinek  
antispasmogenní účinek

## P-KUMAROVÁ KYSELINA

Chemický název: 3-(4-hydroxyfenyl)-2-propenová kyselina

Sumární vzorec: C<sub>9</sub>H<sub>8</sub>O<sub>3</sub>

Biologická aktivita: schopnost inaktivovat toxiny a omezovat zánětlivou reakci  
potopudný účinek

## CHLOROGENOVÁ KYSELINA

Chemický název: 3-[(3,4-dihydroxycinnamoyl)-1,4,5-trihydroxycyclohexan-karboxylová kyselina

Sumární vzorec: C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>O<sub>9</sub>

Biologická aktivita: mírný spasmolytický účinek  
tlumivý účinek na CNS  
kladné působení na cévy  
protirakovinový efekt

### 5.3.4 Další metody analytického hodnocení polyhydroxysloučenin

***Příklady vědeckých prací zabývajících se analýzou polyhydroxyfenolických sloučenin:***

Elektroforetické metody:

- CZE, pracovní elektrolyt: 20 mM tetraborát, 20 mM SDS, 15 mM β-cyklodextrin, pH 10, detekce DAD při 337 nm<sup>25</sup>
- CZE, pracovní elektrolyt: 25 mM HEPPSO, 2 mM molybdenan sodný, 25 % (v/v) methanolu, pH 7,4; UV detekce při 263 nm<sup>7</sup>
- on-line propojení ITP a CZE, ITP - vedoucí elektrolyt: 10 mM HCl + TRIS, pH 7,2; koncový elektrolyt: 50 mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, pH 8,2; CZE – základní elektrolyt: 25 mM TAPS a 55 mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, , pH 8,75; 20% methanol, spektrofotometrická detekce při 254 nm<sup>26</sup>

- CE, 100 mM borátový pufr, pH 9,0, elektrochemická detekce<sup>31</sup>
- MECK, pracovní elektrolyt: 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 15 mM Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>, 30 mM SDS, pH 8,73; UV detekce při 350 nebo 275 nm<sup>30</sup>

### Chromatografické metody

#### Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC)

- HPLC s využitím coulometrického detektoru, gradientová eluce mobilní fází: octan amonný a acetonitril, kolona Zorbax SB C18, CoulArray detektor<sup>27</sup>
- Off-line spojení ITP a HPLC, ITP: vedoucí elektrolyt: 10mM HCl, koncový elektrolyt: 50 mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, ITP elektrolyty obsahovaly 20 % (v/v) methanolu; HPLC: gradientová eluce mobilní fází: methanol, acetonitril a orthofosforečná kyselina, kolona - Discovery C18 a Discovery RP Amid C16<sup>28</sup>

#### Plynová chromatografie (GS)

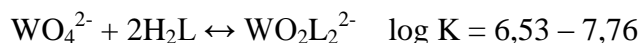
- GS, detekce hmotnostním spektrometrem<sup>29</sup>

## 5.4 KOMPLEXY ŠESTIMOCNÉHO WOLFRAMANU

Roztoky polyfenolů v alkalickém prostředí snadno podléhají oxidaci rozpuštěným vzdušným kyslíkem. Riziko spontánní oxidace můžeme snížit tím, že pro elektroforetickou separaci použijeme vhodný pracovní elektrolyt s  $\text{pH} \approx 7$  s obsahem komplexotvorného činidla, jehož přítomností můžeme převést dané analyty na aniontové komplexy různé stability.

Schopnost W (VI) utvářet aniontové komplexy s hydroxysloučeninami byla prokázána již před mnoha lety. V roce 1959 J. Halmekoski dokázal metodou spektrofotometrie, že  $\text{WO}_4^{2-}$  reaguje s 1,2 –difenoly v neutrálních vodných roztocích za tvorby následujících komplexů<sup>11</sup> ( $\log K$  je rovnovážná konstanta):

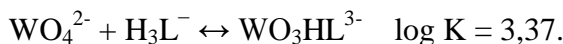
- *pyrokatechol, 3,4-dihydroxybenzaldehyd  $\text{H}_2\text{L}$ :*



- *pyrogallol, 3,4 dihydroxybenzoová kyselina  $\text{H}_3\text{L}$ :*

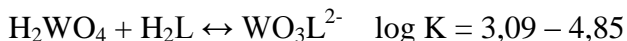


- *gallová kyselina  $\text{H}_4\text{L}$ :*



V roce 1962 K. B. Yatsimirskii dokázal metodou polarografie tvorbu komplexů mezi vícesytnými karboxylovými kyselinami a  $\text{H}_2\text{WO}_4$ :<sup>12</sup>

- *šťavelová kyselina, malonová kyselina a vinná kyselina  $\text{H}_2\text{L}$ :*



Dosud byl wolfram v souvislosti s CZE použit v několika studiích, avšak za zcela jiným účelem nežli v této práci.

- *W(VI) jako komplexotvorné činidlo*

Pro paralelní stanovení Sb (III) a Bi (III) metodou kapilární elektroforézy byl využit W (VI) spolu s P (V) jako komplexotvorné činidlo, které poskytovalo se zmíněnými ionty komplexy  $[\text{P}(\text{Sb}^{\text{III}}\text{W}_{11})\text{O}_{40}]^{6-}$ ,  $[\text{P}(\text{Bi}^{\text{III}}\text{W}_{11})\text{O}_{40}]^{6-}$  s odlišnou migrační rychlostí.<sup>13</sup>

- *W(VI) jako detekovaný anion*

Metodou kapilární elektroforézy bylo detekováno v průběhu 6 minut 19 různých anorganických a organických aniontů a kationtů, jedním z nich byl také  $\text{WO}_4^{2-}$ , pracovní elektrolyt obsahoval 5 mM  $\text{K}_2\text{CrO}_4$ , 3 mM  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 35  $\mu\text{M}$  CTAB a 12  $\mu\text{M}$  EDTA jako činidlo tvořící komplexy s kationty kovů ( $\text{pH} 8$ ).<sup>14</sup>

$\text{WO}_4^{2-}$  byl také jedním z 13 anorganických aniontů, které byly detekovány metodou CZE za použití křemenné kapiláry potažené polyethylenglykolem (DB-WAX) za účelem potlačení EOF. Jako pracovní elektrolyt byl použit 20 mM fosfátový pufr o pH 8,8.<sup>15</sup>

18 různých aniontů včetně  $\text{WO}_4^{2-}$  bylo separováno pomocí CZE v systému, který obsahoval 10 mM  $\text{Na}_2\text{CrO}_4$  a 2,3 mM CTAB o pH 11,5.<sup>16</sup>

➤  *$\text{WO}_4^{2-}$  jako vnitřní standard*

Při detekci dusitanu a dusičnanu v potravinách metodou CZE byl původně použit wolframan jako vnitřní standard, ale vzhledem k nestálé ploše a nesouměrnosti píku wolframanu byl při vývoji metody nahrazen thiokyanatanem, který byl pro danou studii jako vnitřní standard přijatelnější.<sup>17</sup>

➤ *wolframan komplexně vázaný jako součást proteinů, enzymů*

Wolframan byl pozorován jako součást proteinů u bakterie *Acidithiobacillus ferrooxidans* AP 19-3. Protein vázající wolframan byl získán z plasmatické membrány zmíněné železooxidující bakterie, skládá se ze dvou podjednotek a na 1 mg plasmatické membrány je vázáno 1,7 mg wolframanu. Wolframan vázající protein byl po dobu 1 hod. inkubován s 10 mM  $\text{Na}_2\text{WO}_4$  a 10 mM některé z následujících sloučenin:  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$ ,  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{NiSO}_4$ ,  $\text{MnSO}_4$ ,  $\text{CoSO}_4$ , nebo  $\text{CdCl}_2$ , žádná z těchto látek neměla znatelný vliv na množství wolframanu vázaného na bílkovinu, jedná se tudíž o protein specificky vázající wolframan.<sup>18</sup>

Wolframan byl také prokázán jako součást enzymů: aldehyd-ferredoxin oxidoreduktasy z *Thermococca* strain ES-1<sup>19</sup>, reduktasy karboxylové kyseliny z *Clostridiaformicoaceticum*<sup>20</sup>, acetylhydratasy z *Pelobactera-acetylenicus*<sup>21</sup>, dehydrogenasy ( $\text{CO}_2$ -reduktasy) z bakterie *Syntrophobacter fumaroxidans*<sup>22</sup>.

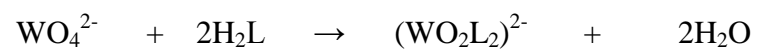
Možnost použití W(VI) jako selektoru v kapilární elektroforetické separaci polyhydroxysloučenin nebylo dosud předmětem vědeckých studií.

Vzhledem k výše uvedeným poznatkům o tvorbě aniontových komplexů hydroxysloučenin s wolframanem by měl přídavek wolframanu k pracovnímu elektrolytu ovlivňovat elektroforetickou migraci sloučenin s o-dihydroxy skupinami, zatímco pohyblivost monohydroxysloučenin by neměla být prakticky ovlivněna.

Z látek studovaných v této práci mají strukturní předpoklady pro tvorbu relativně stabilních aniontových komplexů s wolframanem hyperosid, luteolin, kvercetin, rutin a chlorogenová kyselina.



Obecně lze tvorbu komplexu 1,2-difenolického ligandu  $H_2L$  s wolframanem popsat rovnicí:



## **6. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST**

## 6.1 CHEMIKÁLIE A ROZTOKY

### 6.1.1 Chemikálie

- luteolin p.a. Aldrich Chemie, USA,  $M_r = 286,24$
- apigenin p.a. Aldrich Chemie, USA,  $M_r = 270,24$
- hyperosid p.a. Aldrich Chemie, USA,  $M_r = 464,39$
- rutin p.a. Aldrich Chemie, USA,  $M_r = 664,57$
- kvercetin p.a. Aldrich Chemie, USA,  $M_r = 338,26$
- p-kumarová kyselina p.a. Aldrich Chemie, USA,  $M_r = 164,16$
- chlorogenová kyselina p.a. Aldrich Chemie, USA,  $M_r = 354,31$
- dihydrát wolframanu sodného p.a. Riedel-de Haën, Německo,  $M_r = 329,86$
- 1 – nitroso – 2 – naftol p.a. Lachema, Brno, Česká republika,  $M_r = 173,17$
- ACES - N-(2-acetamido)-2-aminoethansulfonová kyselina p.a. Aldrich Chemie, USA,  $M_r = 182,20$
- BES - N,N-bis[2-hydroxyethyl]-2-aminoethansulfonová kyselina, Sigma-Aldrich Chemie, Německo,  $M_r = 213,20$
- HEPES – 4-(2-hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonová kyselina p.a. Fluka, Švýcarsko,  $M_r = 238,31$
- HEPPSO – 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazin-1-(2-hydroxypropansulfonová kyselina) p.a. Fluka, Švýcarsko,  $M_r = 286,35$
- MOPSO - 3-(N-morfolino)-2-hydroxypropansulfonová kyselina p. a. Aldrich Chemie, USA,  $M_r = 225,27$
- TRIS – tris(hydroxymethyl)-aminomethan p.a. Lachema, Brno, Česká republika,  $M_r = 121,14$
- methanol p.a. Lachema, Brno, Česká Republika,  $M_r = 32,04$
- hydroxid sodný p.a. Merk, Německo,  $M_r = 40,00$
- ultračistá voda připravena pomocí Milli Q systému p.a. Millipore, Bedford, MA, USA

### 6.1.2 Roztoky

- hydroxid sodný 0,1 mol/l
- wolframan sodný 0,01 mol/l
- TRIS 0,2 mol/l

### **6.1.3 Příprava roztoků**

#### **6.1.3.1 Příprava roztoku elektrolytu**

Do kádinky jsem odvážila vypočítané množství HEPES (0,59661 g), odpipetovala požadované množství 10 mM roztoku wolframnanu sodného (10 ml) a optimální množství methanolu (12,5 ml). Upravila jsem pH pomocí 200 mM TRIS na hodnotu 7,4. Obsah kádinky jsem kvantitativně převedla demineralizovanou vodou do 50 ml odměrné baňky a doplnila ji vodou po rysku. Baňku jsem umístila na 10 minut do ultrazvukové lázně.

#### **6.1.3.2 Příprava zásobních roztoků**

Do 10 ml odměrných baněk jsem na mikrováhách odvážila přibližně 25,0 mg každé z polyhydroxysloučenin: luteolinu, apigeninu, hyperosidu, rutinu, kvercetin a kyseliny p-kumarové a chlorogenové a vnitřního standardu 1- nitroso-2-naftolu. Odměrné baňky jsem doplnila po rysku methanolem a získala jsem tak zásobní roztoky o koncentraci 2500 µg/ml.

#### **6.1.3.3 Příprava standardního roztoku**

Do odměrné baňky o objemu 10 ml jsem převedla automatickou pipetou 0,20 ml každého ze zásobních roztoků a doplnila po rysku 25% (v/v) methanolem, získala jsem tak standardní roztok o koncentraci 50 µg/ml každého analytu a 50 µg/ml vnitřního standardu.

#### **6.1.3.4 Příprava kalibračních roztoků**

Připravila jsem si sadu kalibračních roztoků do odměrných baněk o objemu 10 ml, které obsahovaly 0,10 - 0,20 - 0,30 - 0,40 - 0,50 ml zásobního roztoku analytu, vždy 0,20 ml zásobního roztoku vnitřního standardu a 25 % (v/v) methanolu. Výsledné koncentrace analytů v kalibračních roztocích byly 25; 50; 75; 100; 125 µg/ml a koncentrace vnitřního standardu byla 50 µg/ml.

Všechny zásobní, kalibrační a elektrolytové roztoky byly po dobu 15 minut odplyněny na ultrazvukové lázni a filtrovány skrz membránový filtr Millipore Millex<sup>®</sup> - LCR (velikost póru 0,45 µm).

## 6.2 PŘÍSTROJE

### 6.2.1 Přístrojové vybavení

- Kapilární elektroforetický systém PrinCE 650, Prince Technologies B.V., Nizozemí
- Osobní počítač Electra, ABM s operačním systémem Microsoft Windows 98
- Laboratorní digitální pH – metr PHM 220, Radiometer Copenhagen, Francie se skleněnou elektrodou PHC 2401-8, Radiometer Analytical, Francie, která byla kalibrována na standardní pufrů Radiometer
- Ultrazvuková lázeň Sonorex RK 31, Bandelin electronic, Německo
- Automatické analytické váhy Sartorius A200S, Göttingen, Německo
- Analytické mikrováhy Sartorius 4503 MICRO GMBH, Göttingen, Německo
- UV/VIS spektrofotometr Hewlett-Packard 8453

### 6.2.2 Kapilární elektroforetický systém PrinCE

Přístroj byl vybaven UV –VIS HPLC spektrofotometrickým detektorem LAMBDA 1010 (Leonberg, Německo). Separace probíhala v křemenné nepotažené kapiláře o průměru 75  $\mu\text{m}$ , celkové délce 75 cm a efektivní délce 42 cm.

Komunikaci s počítačem a časové a proudové programování analýzy zajišťoval program WinPrinCE, který je integrální součástí DAX 6.1, programu pro sběr, zpracování a vyhodnocování dat.

## 6.3 PRACOVNÍ A VÝPOČETNÍ POSTUPY

### 6.3.1 Pracovní postup

Před zahájením analýzy jsem uvedla do chodu kapilární elektroforetický systém, detektor a počítač s programem pro přístrojové ovládání a nastavila jsem parametry pro měření. Před začátkem měření jsem kapiláru promývala 0,1 M NaOH po dobu 15 minut a demineralizovanou vodou též 15 minut. Za účelem dosažení lepší separační účinnosti a reprodukovatelnosti migračních časů jsem kapiláru před každou analýzou proplachovala 2 minuty 0,1 M NaOH, 2 minuty demineralizovanou vodou a 4 minuty pracovním elektrolytem. Po skončení všech analýz jsem kapiláru opět promývala 15 minut 0,1 M NaOH a 15 minut demineralizovanou vodou.

V programu jsem nastavila parametry pro měření. Vzorek byl dávkován hydrodynamicky tlakem 50 mbar po dobu 6 s. Elektroforetická separace probíhala při vloženém napětí 30 kV a při teplotě 25 °C. Detekce byla prováděna v UV oblasti při 275 nm.

Vialky jsem plnila pomocí injekční stříkačky a membránového filtru Millex<sup>®</sup> - LCR 0,45 µm. Po naplnění jsem jejich obsah odplynula v ultrazvukové lázni.

### 6.3.2 Vývoj a optimalizace metody

Pro optimalizaci elektroforetických podmínek byly provedeny následující úkony a byly vyzkoušeny uvedené systémy, chemické sloučeniny a změny pracovního prostředí:

- optimalizace vlnové délky pomocí UV/VIS spekter
- kapilára: Ø 50 µm, 75 µm, 100 µm
- elektrolyty na bázi substituovaných derivátů sulfonových kyselin: ACES (pK<sub>a</sub> = 6,84), BES (pK<sub>a</sub> = 7,10), HEPES (pK<sub>a</sub> = 7,51), HEPPSO (pK<sub>a</sub> = 7,80), MOPSO (pK<sub>a</sub> = 6,79)
- koncentrace HEPES: 10 – 100 mM (10, 25, 50, 75, 100 mM)
- přídavek wolframanu: 0 – 3 mM (0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0 mM)
- rozmezí pH: 6,8 – 7,8 (6,8; 7,0; 7,2; 7,4; 7,6; 7,8); upraveno pomocí TRIS
- přídavek methanolu: 0 – 30 % (0; 5; 10; 15; 20; 25; 30 %)
- velikost pracovního napětí: 20 – 30 kV (20; 25; 30 kV)
- doba nástřiku vzorku: 3 – 24 sec. (3; 6; 12; 24 sec.)

### 6.3.3 Měření kalibrační závislosti

Kalibrační křivky jsem měřila s pěti kalibračními roztoky obsahujícími 25 – 125 µg/ml analytu, 50 µg/ml 1-nitroso-2-naftolu jako vnitřního standardu a 25% (v/v) methanolu. Kalibrační křivky jsem proměřovala za optimalizovaných elektroforetických podmínek: pracovní elektrolyt 50 mM HEPES/TRIS pH\* 7,4 obsahující 2 mM wolframianu sodného ve vodném 25% (v/v) methanolu (30 kV, křemenná kapilára o průměru 75 µm, celková délka 75 cm, efektivní délka 42 cm, UV detekce při 275 nm, hydrodynamické dávkování tlakem 50 mbar po dobu 6 s).

U každé koncentrace jsem provedla tři měření a získané výsledky zprůměrovala. Kalibrační závislost jsem vyhodnotila na PC pomocí programu lineární regrese jako závislost korigované plochy píku na koncentraci stanovované látky a jako závislost poměru korigovaných ploch analytu a vnitřního standardu na koncentraci stanovované látky.

Korigovaná plocha se rovná podílu plochy píku analytu (mV.min) a migračního času analytu (min).

### 6.3.4 Opakovatelnost metody

Pro zjištění míry shody mezi jednotlivými výsledky metody jsem provedla pět paralelních měření pro roztok o koncentraci analytu 50 µg/ml.

Průměrné hodnoty, směrodatné odchylky a relativní směrodatné odchylky ploch píků a migračních časů jsem vypočítala na PC pomocí programu Microsoft Excel 2000.

- Směrodatná odchylka podle vztahu:

$$s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \cdot \sum (x_i - \bar{x})^2}$$

s - směrodatná odchylka

n - počet měření

$\bar{x}$  - průměr hodnot výsledků měření

$x_i$  - jednotlivý výsledek měření

- Relativní směrodatná odchylka (v %) podle vztahu:

$$s_r = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100$$

$s_r$  - relativní směrodatná odchylka

$s$  - směrodatná odchylka

$\bar{x}$  - průměr naměřených hodnot

### 6.3.5 Rozlišení

Rozlišení  $R_s$  je jeden z kvantitativních parametrů separační účinnosti. Rozlišení dvou sousedních píků lze vypočítat podle vzorce: <sup>1</sup>

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

$t_1, t_2$  – migrační čas [s]

$w_1, w_2$  – šířka píku při základní linii [s]

Jestliže je hodnota  $R_s$  rovna nebo vyšší než 1,5, je separace dvou látek úplná a píky jsou rozlišeny na základní linii.

### 6.3.6 Elektroforetická pohyblivost

Elektroforetickou pohyblivost  $u$  lze vypočítat podle vztahu: <sup>1</sup>

$$u = \frac{l_t \cdot l_s}{U} \cdot \left( \frac{1}{t_m} - \frac{1}{t_0} \right) [\text{m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}]$$

$l_t$  - celková délka kapiláry [m]

$l_s$  – efektivní délka kapiláry (vzdálenost od nástřiku po detektor) [m]

$U$  – pracovní napětí [V]

$t_m$  – migrační čas látky [s]

$t_0$  – migrační čas nenabitých částic [s]



Jako migrační čas nenabitých částic je udáván čas migrace MeOH (5,45 min.). Připravila jsem si roztok MeOH ve vodě v poměru 1 : 5 a proměřila za optimálních elektroforetických podmínek při vlnové délce 210 nm.

### 6.3.7 Limit detekce (LOD) a limit stanovení (LOQ)<sup>32</sup>

Z elektroforeogramu placebo (25 % (v/v) MeOH) jsem odečetla největší kladnou ( $r^+$ ) a zápornou ( $r^-$ ) amplitudu šumu v těsné blízkosti migračních časů separovaných látek. Z tohoto rozpětí šumu jsem vypočítala směrodatnou odchylku dle vzorce:

$$s_n = \frac{r^+ - r^-}{5}$$

Dále jsem změřila vzorek o koncentraci 25  $\mu\text{g/ml}$  a ze záznamu jsem odečetla velikost plochy a výšku píků separovaných látek, tyto hodnoty jsem využila k výpočtu LOD a LOQ.

Limit detekce byl vypočten podle vzorce:

$$LOD = 3 \cdot s_n \cdot \frac{K}{b_i}$$

Limit stanovení byl vypočten podle vzorce:

$$LOQ = 10 \cdot s_n \cdot \frac{K}{b_i}$$

K - plocha píku/výška píku

$b_i$  - plocha píku/koncentrace analytu (25  $\mu\text{g/ml}$ )

$s_n$  - rozpětí šumu

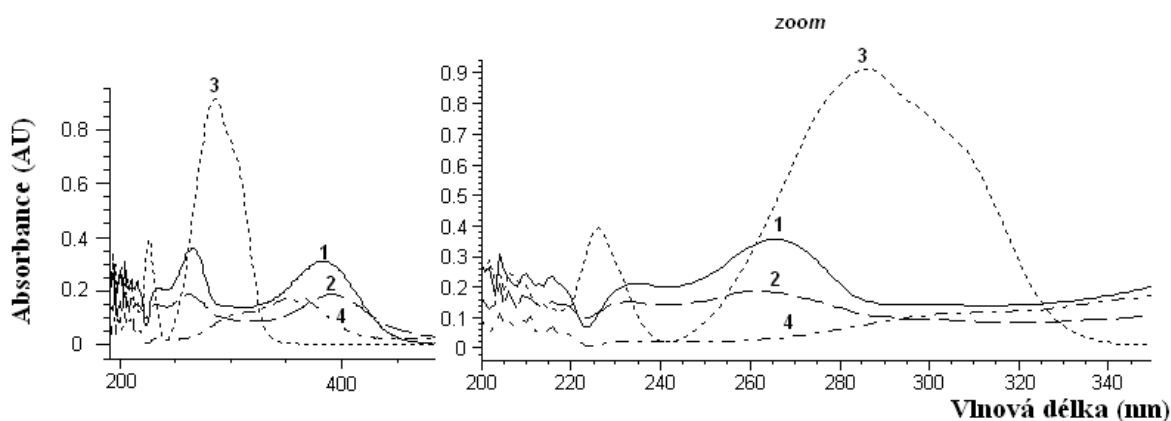
## **7. VÝSLEDKY A DISKUSE**

## 7.1 VÝVOJ A OPTIMALIZACE METODY

Předmětem práce bylo nalézt vhodný elektrolytový systém pro analýzu polyhydroxysloučenin: rutinu, kvercetinu, p- kumarové kyseliny a chlorogenové kyseliny, kde by došlo k jejich úplné separaci se symetrickými píky a co největší plochou. Jako vnitřní standard byl použit 1-nitroso-2-naftol. Při hodnocení elektroforeogramů byla zvažována rovněž separační účinnost za přítomnosti dalších tří flavonoidů: apigeninu, hyperosidu a luteolinu, které již byly za podobných podmínek separovány a hodnoceny v diplomové práci s využitím molybdenanu jako komplexotvorného selektoru.<sup>7</sup> Předpokládala jsem stejné pořadí migrace jednotlivých látek jako v předešlé práci, což se v závěru potvrdilo.

### 7.1.1 Volba optimální vlnové délky

Pomocí UV/VIS spektrofotometru jsem proměřila UV spektra jednotlivých látek. Hledala jsem vlnovou délku, při které byla absorbance wolframanových komplexů studovaných analytů (flavonoidů) v použitém BGE nejvyšší. Flavonoidy absorbovaly nejvíce v rozmezí vlnových délek 265-275 nm a 370-380 nm. Při výběru optimální vlnové délky jsem brala v potaz i absorbanci studovaných fenolických kyselin. Při vlnové délce 370-380 nm byla absorbance chlorogenové kyseliny přijatelná, ale p-kumarová kyselina absorbovala minimálně, o jeden řád méně než chlorogenová kyselina při vlnové délce 265-275 nm. P-kumarová kyselina je navíc pro tuto práci zajímavá tím, že nemá o-dihydroxy skupiny a tudíž netvoří komplexy s wolframanem a její migrace není ovlivněna. Ze záznamu (obr. 7) jsem jako optimální vlnovou délku zvolila 275 nm, při které byla absorbance kvercetinu a rutinu nejvyšší a absorbance p-kumarové kyseliny dostatečná, čímž jsem dosáhla zvýšení citlivosti detekce jednotlivých látek s výjimkou chlorogenové kyseliny.



Obr. 7 UV spektra rutinu (1), kvercetinu (2), p-kumarové kyseliny (3) a chlorogenové kyseliny (4) v BGE: 24,5 mM HEPES, 1,9 mM Na<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>, 24,5 % (v/v) MeOH, pH 7,4, koncentrace analytů 50 µg/ml, jako slepý roztok byl použit roztok BGE.

### 7.1.2 Volba kapiláry vhodného průměru

Pro optimalizaci citlivosti a pro zvýšení separační účinnosti byly vyzkoušeny kapiláry o průměru 50 µm, 75 µm a 100 µm.

Zhodnocení jednotlivých záznamů:

50 µm: nízká citlivost, kvercetin téměř nedekovatelný, dobrá separační účinnost

75 µm: dobrá citlivost a separační účinnost

100 µm: vyšší citlivost, neúplné oddělení píků rutinu a kvercetinu, rozmytí zadního rozhraní píku chlorogenové kyseliny, nejkratší čas analýzy

Po analýze jednotlivých záznamů jsem zvolila kapiláru o průměru 75 µm, která se jevila optimální z hlediska separační účinnosti, citlivosti a symetrie píků.

### 7.1.3 Volba pracovního elektrolytu

Flavonoidy jsou slabší kyseliny, pK<sub>a</sub> hodnota fenolické skupiny nejjednoduššího 7-hydroxyflavonu je 7,39.<sup>35</sup> S ohledem na tento fakt byly zkoušeny následující deriváty sulfonových kyselin jako součásti pracovního elektrolytu:

- ACES (pK<sub>a</sub> = 6,84)
- BES (pK<sub>a</sub> = 7,10)
- HEPES (pK<sub>a</sub> = 7,51)
- HEPPSO (pK<sub>a</sub> = 7,80)

- MOPSO ( $pK_a = 6,79$ )

Kvůli omezené rozpustnosti ve vodě pracovní elektrolyt a všechna činidla obsahovala 25 % (v/v) methanolu. Proto kyselost takového elektrolytu byla měřena jako zdánlivá (pseudo) hodnota  $pH^*$ .

Zhodnocení testování jednotlivých elektrolytických systémů:

- ACES: nestabilní základní linie, výrazné rozmytí čelního rozhraní píku kvercetinu, delší čas analýzy
- BES: nestabilní základní linie, rozšíření píků při základní linii
- HEPES: nejlepší symetrie píků, nejvyšší rozlišení píků všech analytů, přijatelná délka analýzy, dostatečná citlivost
- HEPPSO: nedostatečné rozlišení sousedních píků kvercetinu a p - kumarové kyseliny, rozmytí zadního rozhraní píku kvercetinu
- MOPSO: nízká citlivost, delší čas analýzy, symetričtější pík p – kumarové kyseliny

Po porovnání všech záznamů jsem zvolila pro zkoumání účinku W(VI) na migraci polyhydroxysloučenin jako nejvhodnější součást pracovního elektrolytu HEPES o  $pK_a$  7,51.

#### 7.1.4 Volba vhodné koncentrace HEPES

Koncentrace pracovního elektrolytu má vliv na efektivní pohyblivost a tudíž i na separaci analyzovaných složek. Testovala jsem pufrы obsahující 10, 25, 50, 75 a 100 mM HEPES, ostatní složky BGE a parametry měření byly konstantní: 2 mM  $Na_2WO_4$ , pH 7,4, 25 % (v/v) MeOH, 25 kV, doba nástřiku 6 sekund.

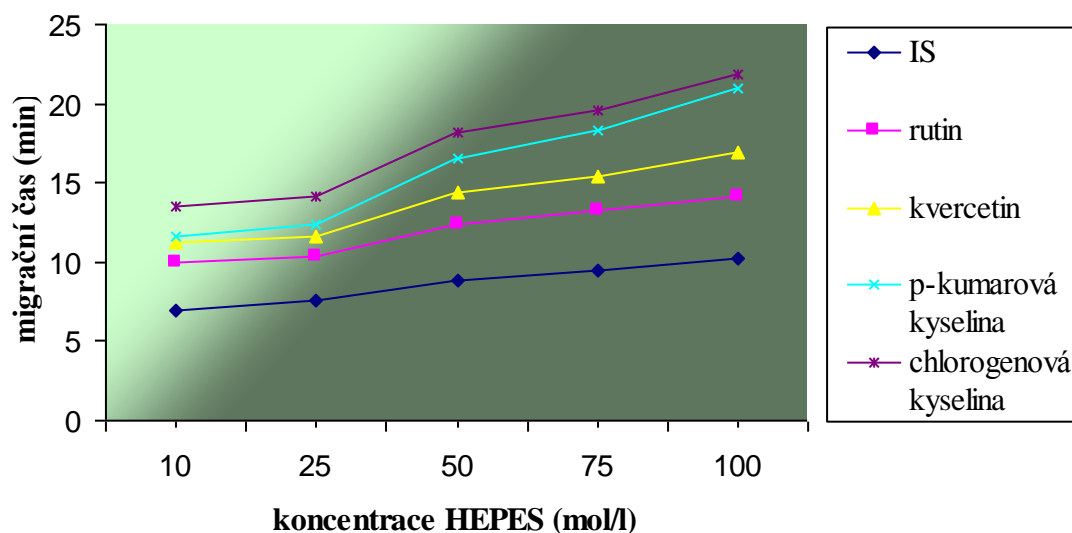
Pro 10 mM HEPES v základním elektrolytu byly časy migrace analytů kratší, ale efektivita separace nebyla dostatečná, kvercetin a p – kumarová kyselina tvořily dokonce jednu zónu a pík chlorogenové kyseliny jevil značné rozmytí zadní zóny. Záznam s koncentrací 75 mM HEPES měl viditelně nestabilní základní linii a asymetrický pík chlorogenové kyseliny stejně jako při koncentraci 100 mM HEPES, kde asymetrii jevil i pík p- kumarové kyseliny a kde migrační časy analytů byly zřetelně delší.

Při rozhodování mezi koncentrací 25 mM a 50 mM bylo bráno v úvahu několik faktorů: stabilnější základní linie a lepší symetrie píků analyzovaných látek při použití 50 mM HEPES, avšak delší čas analýzy, ale i vyšší hodnoty rozlišení mezi jednotlivými píky.

V závěru jsem zvolila 50 mM HEPES pro efektivnější separaci v případě předpokládané separace dalších výše zmíněných flavonoidů (obr. 8).

Tab. 2: Hodnoty migračních časů analytů v závislosti na koncentraci HEPES

|                    |                       | koncentrace HEPES (mol/l) |      |      |      |      |
|--------------------|-----------------------|---------------------------|------|------|------|------|
|                    |                       | 10                        | 25   | 50   | 75   | 100  |
| migrační čas (min) | IS                    | 6,9                       | 7,6  | 8,9  | 9,5  | 10,2 |
|                    | rutin                 | 10                        | 10,3 | 12,4 | 13,2 | 14,2 |
|                    | kvercetin             | 11,3                      | 11,6 | 14,4 | 15,4 | 16,9 |
|                    | p-kumarová kyselina   | 11,6                      | 12,4 | 16,5 | 18,3 | 21   |
|                    | chlorogenová kyselina | 13,5                      | 14,1 | 18,2 | 19,6 | 21,9 |



Obr. 8 Vliv koncentrace HEPES na separaci analyzovaných látek, BGE: 2 mM Na<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>, pH 7,4 (upraveno pomocí TRIS), 25 % (v/v) MeOH, 25 kV, 25 °C, dávkování hydrodynamickým tlakem 50 mbar po dobu 6 sekund, UV detekce při 275 nm.

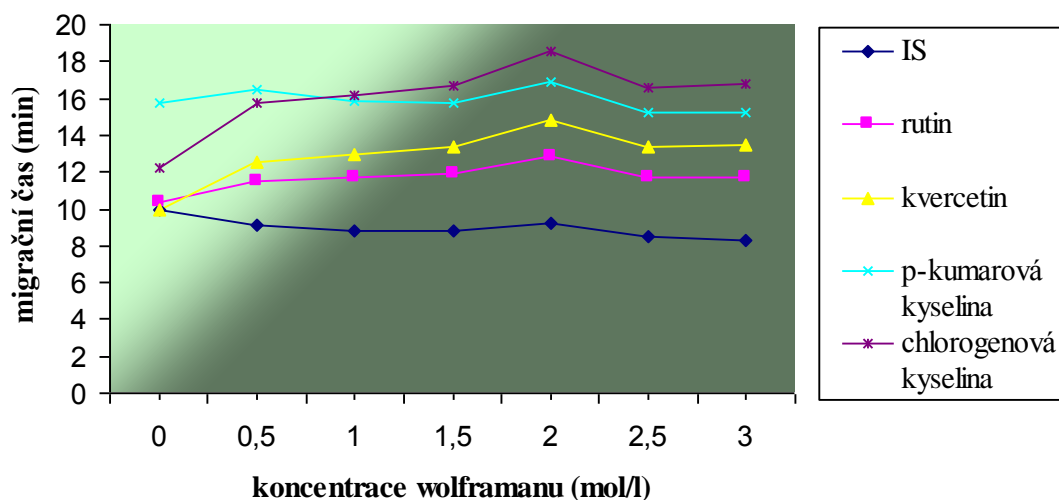
### 7.1.5 Volba vhodné koncentrace wolframanu sodného

Rutin, kvercetin a chlorogenová kyselina mají strukturální předpoklady pro tvorbu komplexů s wolframem. Jeho množství má tudíž vliv na separaci jednotlivých složek, pro zkoumání tohoto vlivu byl použit wolframan v koncentračním rozmezí 0,5 mM – 3,0 mM. Ostatní složky BGE a parametry měření byly konstantní: 50 mM HEPES, pH 7,4, 25 % (v/v) MeOH, 25 kV, doba nástřiku 6 sekund.

Za nepřítomnosti wolframanu prakticky nedošlo k oddělení píků rutinu, kvercetinů a vnitřního standardu 1-nitroso-2-naftolu. Po přidavku 0,5 mM wolframanu do základního elektrolytu migrovala chlorogenová kyselina před p-kumarovou kyselinou a hodnota rozlišení píků těchto dvou látek byla nižší, píky byly značně nesymetrické, zatímco flavonoidy a vnitřní standard se navzájem oddělily. Zvýšení koncentrace W(VI) na 1 mM mělo za následek neúplné oddělení p-kumarové kyseliny od chlorogenové kyseliny a vedlo k asymetrii píku vnitřního standardu, stejně jako u koncentrace 1,5 mM. Optimální koncentrace potřebná pro separaci všech analytů od základní linie je 2 mM. Při této koncentraci centrálního iontu měly píky lepší symetrii a rovněž vyšší hodnotu rozlišení než při použití 2,5 mM wolframanu. Přídavek 3 mM wolframanu způsobil asymetrii píku vnitřního standardu.

Tab. 3: Hodnoty migračních časů analytů v závislosti na koncentraci wolframanu

|                    |                       | koncentrace wolframanu (mol/l) |      |      |      |      |      |      |
|--------------------|-----------------------|--------------------------------|------|------|------|------|------|------|
|                    |                       | 0                              | 0,5  | 1    | 1,5  | 2    | 2,5  | 3    |
| migrační čas (min) | IS                    | 9,9                            | 9,1  | 8,8  | 8,8  | 9,2  | 8,5  | 8,3  |
|                    | rutin                 | 10,4                           | 11,5 | 11,7 | 11,9 | 12,8 | 11,7 | 11,7 |
|                    | kvercetin             | 9,9                            | 12,5 | 13   | 13,4 | 14,8 | 13,4 | 13,5 |
|                    | p-kumarová kyselina   | 15,8                           | 16,5 | 15,9 | 15,8 | 16,9 | 15,2 | 15,2 |
|                    | chlorogenová kyselina | 12,2                           | 15,7 | 16,2 | 16,7 | 18,6 | 16,6 | 16,8 |



Obr. 9 Vliv koncentrace wolframanu na separaci analyzovaných látek, BGE: 50 mM HEPES, pH 7,4 (upraveno pomocí TRIS), 25 % (v/v) MeOH, 25 kV, 25 °C, dávkování hydrodynamickým tlakem 50 mbar po dobu 6 sekund, UV detekce při 275 nm.

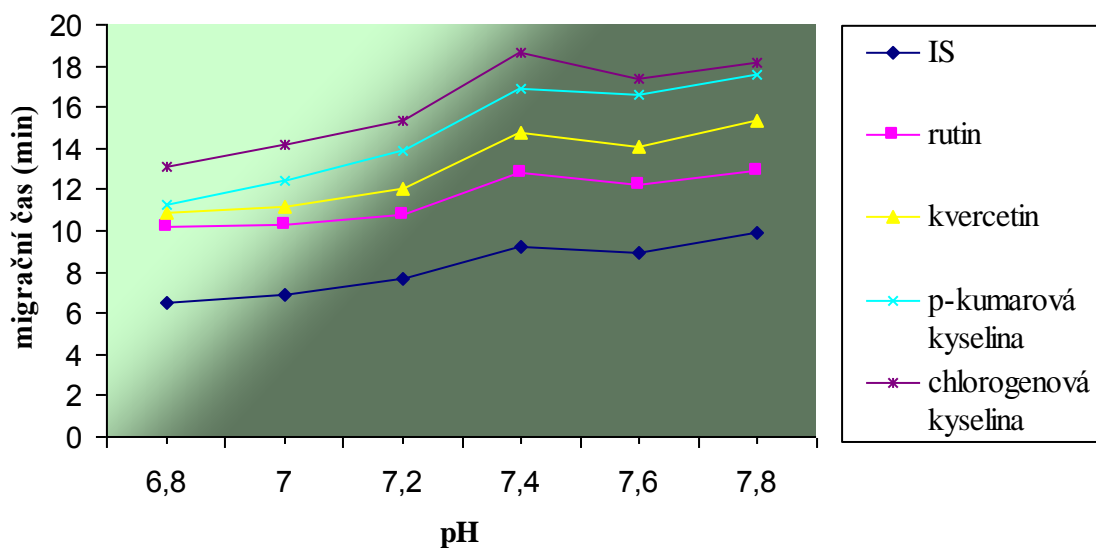
### 7.1.6 Volba vhodného pH základního elektrolytu

pH základního elektrolytu je velmi důležitým parametrem ovlivnění elektroosmotického toku a stupně ionizace každého analytu. Pro zhodnocení efektu pH na separaci analytů byl testován zvolený elektrolytický systém s hodnotami pH mezi 6,8 – 7,8, ostatní složky BGE a parametry měření byly konstantní: 50 mM HEPES, 2 mM Na<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>, 25 % (v/v) MeOH, 25 kV, doba nástřiku 6 sekund.

Při pH 6,8 a 7,0 je zřejmá nižší separační účinnost, neúplné oddělení analytů (při pH 6,8 kvercetin a p-kumarové kyseliny, při pH 7,0 rutin a kvercetin) a menší souměrnost píků. Se vzrůstajícím pH se prodlužoval čas analýzy a při pH 7,6 a 7,8 se stal pík 1-nitroso-2-naftolu extrémně asymetrickým a při pH 7,8 se snížila hodnota rozlišení mezi p-kumarovou kyselinou a chlorogenovou kyselinou. Při pH 7,2 jsem pozorovala výraznější rozmytí předního rozhraní píku kvercetin, a proto byl zvolen systém o pH 7,4, ve kterém měly navíc píky analytů nejlepší souměrnost, dále optimální separační účinnost a přijatelnou dobu analýzy (obr.10).

Tab. 4: Hodnoty migračních časů analytů v závislosti na pH základního elektrolytu

|                    |                       | pH pufru |      |      |      |      |      |
|--------------------|-----------------------|----------|------|------|------|------|------|
|                    |                       | 6,8      | 7    | 7,2  | 7,4  | 7,6  | 7,8  |
| migrační čas (min) | IS                    | 6,5      | 6,9  | 7,7  | 9,2  | 8,9  | 9,9  |
|                    | rutin                 | 10,2     | 10,3 | 10,8 | 12,8 | 12,2 | 12,9 |
|                    | kvercetin             | 10,9     | 11,2 | 12   | 14,8 | 14,1 | 15,3 |
|                    | p-kumarová kyselina   | 11,3     | 12,4 | 13,9 | 16,9 | 16,6 | 17,6 |
|                    | chlorogenová kyselina | 13,1     | 14,2 | 15,3 | 18,6 | 17,4 | 18,2 |





Obr. 10 Vliv pH na separaci analyzovaných látek, BGE: 50 mM HEPES, 2 mM Na<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>, 25 % (v/v) MeOH, 25 kV, 25 °C, dávkování hydrodynamickým tlakem 50 mbar po dobu 6 sekund, UV detekce při 275 nm.

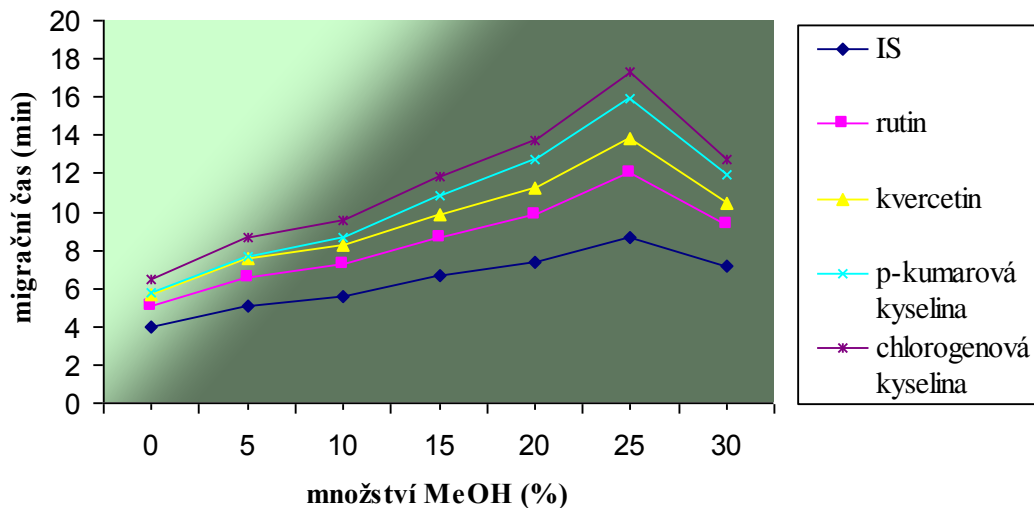
### 7.1.7 Volba optimálního obsahu methanolu

Přídavkem vhodného množství organického rozpouštědla lze ovlivnit selektivitu separace, testovala jsem vliv přídavku methanolu k pracovnímu elektrolytu v rozmezí koncentrací 0 – 30 % (v/v), ostatní složky BGE a parametry měření byly konstantní: 50 mM HEPES, 2 mM Na<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>, pH 7,4, 25 kV, doba nástřiku 6 sekund.

V pracovním elektrolytu bez přídavku methanolu vystupovala p-kumarová kyselina a kvercetin jako jediný pík a pík vnitřního standardu byl asymetrický, stejně jako s 5 % MeOH. Asymetrie píku vnitřního standardu byly zaznamenána i u koncentrace 10 % MeOH. Se zvyšující se koncentrací MeOH docházelo k prodlužování analýzy, ale i ke zlepšování symetrie píků. Jako optimální koncentrace MeOH byla zvolena koncentrace 25 % MeOH, při které byla pozorována optimální separace analytů a vyšší stabilita základní linie. U koncentrace 30 % MeOH došlo opět ke snížení separační účinnosti (obr. 11).

Tab. 5: Hodnoty migračních časů analytů v závislosti množství MeOH

|                    |                       | množství MeOH (%) |     |     |      |      |      |      |
|--------------------|-----------------------|-------------------|-----|-----|------|------|------|------|
|                    |                       | 0                 | 5   | 10  | 15   | 20   | 25   | 30   |
| migrační čas (min) | IS                    | 4                 | 5,1 | 5,6 | 6,7  | 7,4  | 8,7  | 7,2  |
|                    | rutin                 | 5,1               | 6,6 | 7,3 | 8,7  | 9,9  | 12   | 9,4  |
|                    | kvercetin             | 5,7               | 7,6 | 8,3 | 9,9  | 11,2 | 13,8 | 10,4 |
|                    | p-kumarová kyselina   | 5,8               | 7,7 | 8,7 | 10,8 | 12,7 | 15,9 | 11,9 |
|                    | chlorogenová kyselina | 6,5               | 8,7 | 9,6 | 11,8 | 13,7 | 17,3 | 12,7 |



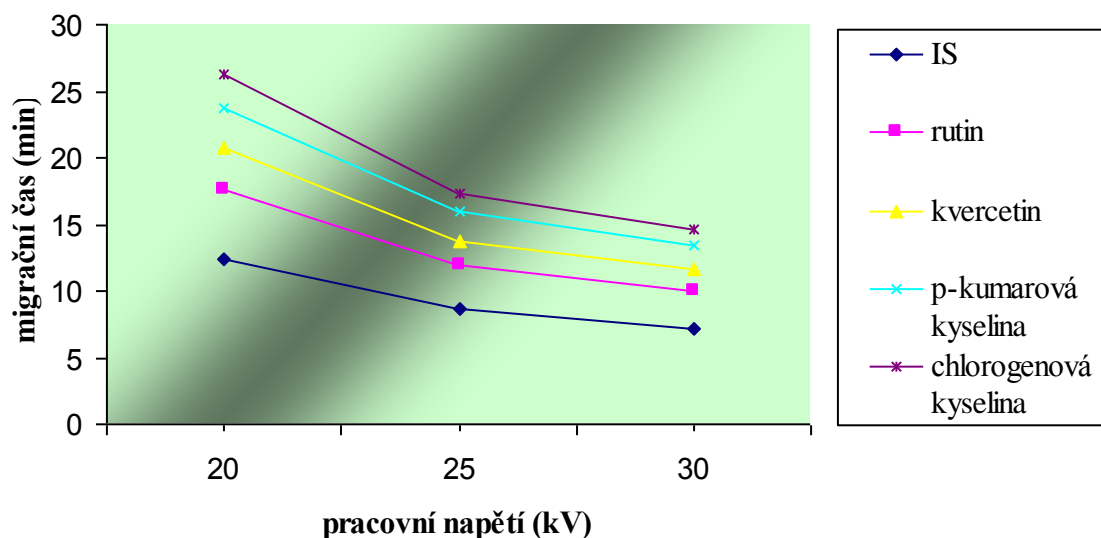
Obr. 11 Vliv obsahu MeOH na separaci analyzovaných látek, BGE: 50 mM HEPES, 2 mM Na<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>, pH 7,4 (upraveno pomocí TRIS), 25 kV, 25 °C, dávkování hydrodynamickým tlakem 50 mbar po dobu 6 sekund, UV detekce při 275 nm.

### 7.1.8 Volba pracovního napětí

Separaci analyzovaných látek jsem sledovala při vloženém napětí 20, 25 a 30 kV, ostatní složky BGE a parametry měření byly konstantní: 50 mM HEPES, 2 mM Na<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>, pH 7,4, 25 % (v/v) MeOH, doba nástřiku 6 sekund. Hodnotila jsem délku analýzy, kvalitu záznamu, rozlišení a symetrii píků. Hlavní předností použití pracovního napětí 30 kV byl podstatně kratší čas analýzy a stabilita základní linie, proto bylo toto napětí zvoleno jako optimální (obr. 12).

Tab. 6: Hodnoty migračních časů analytů v závislosti na velikosti vloženého napětí

|                    |                       | napětí (kV) |      |      |
|--------------------|-----------------------|-------------|------|------|
|                    |                       | 20          | 25   | 30   |
| migrační čas (min) | IS                    | 12,4        | 8,7  | 7,2  |
|                    | rutin                 | 17,6        | 12   | 10   |
|                    | kvercetin             | 20,8        | 13,8 | 11,6 |
|                    | p-kumarová kyselina   | 23,7        | 15,9 | 13,5 |
|                    | chlorogenová kyselina | 26,2        | 17,3 | 14,7 |



Obr. 12 Vliv velikosti pracovního napětí na délku analýzy, BGE: 50 mM HEPES, 2 mM Na<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>, pH 7,4 (upraveno pomocí TRIS), 25 % (v/v) MeOH, 25 °C, dávkování hydrodynamickým tlakem 50 mbar po dobu 6 sekund, UV detekce při 275 nm.

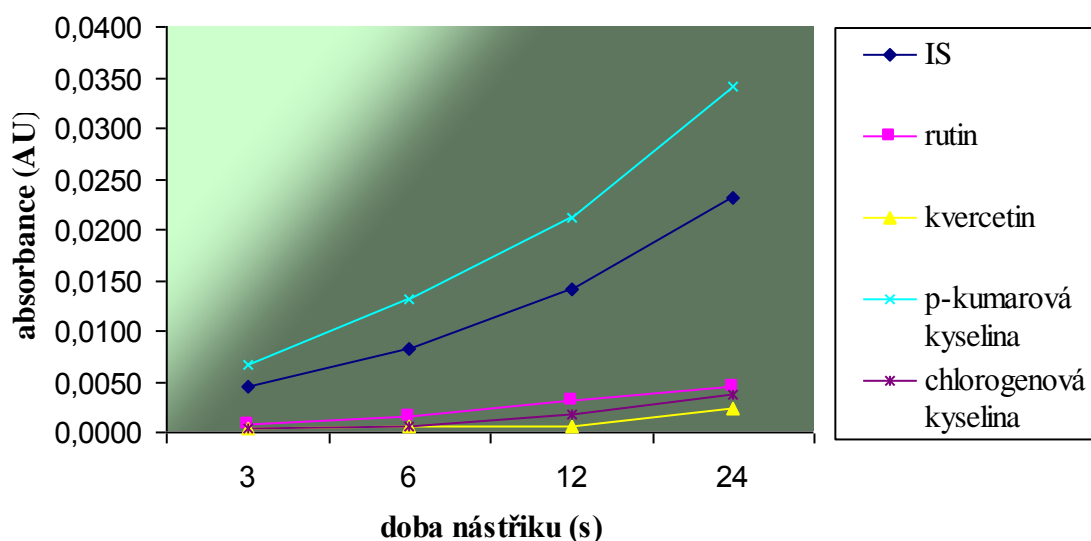
### 7.1.9 Volba doby nástřiku

S prodlužující se dobou nástřiku se zvyšuje citlivost detekce, výška píků se zvyšuje, ale zároveň dochází k rozšiřování píků při základní linii. Vzorek byl dávkován po dobu 3, 6, 12 a 24 sekund a byla sledována velikost plochy a výška píků a jejich opakovatelnost, souměrnost píků a délka analýzy, která se ale výrazně neměnila. Ostatní složky BGE a parametry měření byly konstantní: 50 mM HEPES, 2 mM Na<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>, pH 7,4, 25 % (v/v) MeOH, 30 kV.

Nástřik po dobu 3 sekund byl vyloučen z důvodu nízké citlivosti detekce. Při nástřiku po dobu 12 sekund byly píky méně souměrné a po dobu 24 sekund již došlo k výraznějšímu rozšíření píků při základní linii. Proto jsem zvolila 6sekundový nástřik, při kterém měly píky navíc nejlepší symetrii a lepší opakovatelnost migračních časů.

Tab. 7: Absorbance analytů v závislosti na době nástřiku

|                 |                       | doba nástřiku (s) |         |         |         |
|-----------------|-----------------------|-------------------|---------|---------|---------|
|                 |                       | 3                 | 6       | 12      | 24      |
| absorbance (AU) | IS                    | 0,00461           | 0,00832 | 0,01406 | 0,02309 |
|                 | rutin                 | 0,00078           | 0,00153 | 0,00311 | 0,00451 |
|                 | kvercetin             | 0,00032           | 0,00055 | 0,00068 | 0,00234 |
|                 | p-kumarová kyselina   | 0,00671           | 0,01313 | 0,02123 | 0,03402 |
|                 | chlorogenová kyselina | 0,00042           | 0,00057 | 0,00184 | 0,00375 |



Obr. 13 Vliv doby nástřiku na absorbanci analyzovaných látek, BGE: 50 mM HEPES, 2 mM Na<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>, pH 7,4 (upraveno pomocí TRIS), 25 % (v/v) MeOH, 30 kV, 25 °C, dávkování hydrodynamickým tlakem 50 mbar, UV detekce při 275 nm.

### 7.1.10 Výsledky optimalizace

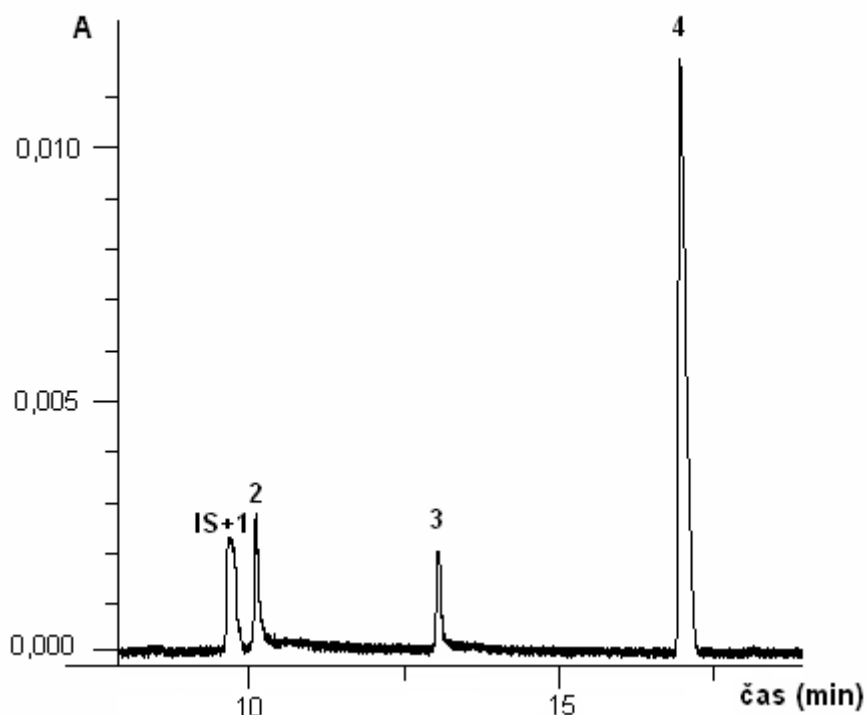
Tab. 8: Optimální složení pracovního elektrolytu

|                     |  |
|---------------------|--|
| <b>BGE</b>          | 50 mM HEPES + 2 mM Na <sub>2</sub> WO <sub>4</sub>               |
| <b>pH</b>           | 7,4 (upraveno pomocí TRIS)                                       |
| <b>Rozpouštědlo</b> | 25 % MeOH  |
| <b>Napětí</b>       | 30 kV  |
| <b>Teplota</b>      | 25°C   |
| <b>Dávkování</b>    | hydrodynamický tlak 50 mBar, 6 sekund                            |
| <b>Kapilára</b>     | celková délka 75 cm, efektivní délka 42 cm, vnitřní průměr 75 μm |
| <b>Detekce</b>      | 275 nm   |

### 7.1.11 Elektroforeogramy

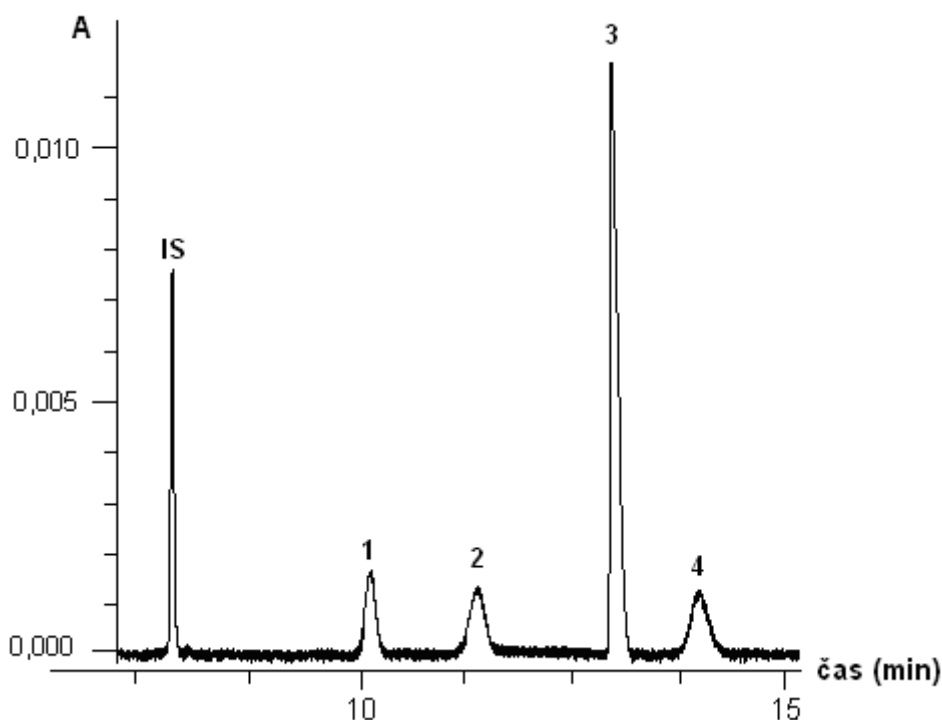
Elektroforeogramy ukazující separaci modelové směsi flavonoidů, chlorogenové a p-kumarové kyseliny v nepřítomnosti a v přítomnosti wolframanu v pracovním elektrolytu jsou na obr. 14 a obr. 15. K úplnému rozdělení modelové směsi čtyř analytů je potřeba < 15 minut (obr. 15). V elektrolytickém systému bez wolframanu vystupoval kvercetin a 1-nitroso-2-naftol jako jediný pík, chlorogenová kyselina migrovala před p-kumarovou kyselinou a píky byly asymetrické. Píky kyseliny p-kumarové a chlorogenové byly detekovány za nejpomalejším flavonoidem, což je způsobeno přítomností ionizované karboxylové skupiny ve struktuře těchto dvou modelových sloučenin.

Obr. 14



Obr. 14 Elektroforeogram roztoku standardu o koncentraci 50  $\mu\text{g/ml}$ , BGE: 50 mM HEPES, 0 mM  $\text{Na}_2\text{WO}_4$ , pH 7,4 (upraveno pomocí TRIS), 25 % (v/v) MeOH, 25 kV, 25  $^\circ\text{C}$ , dávkování hydrodynamickým tlakem 50 mbar po dobu 6 s, UV detekce při 275 nm, 1-nitroso-2-naftol (IS), kvercetin (1), rutin (2), chlorogenová kyselina (3), p-kumarová kyselina (4).

Obr. 15



Obr. 15 Elektroforeogram roztoku standardů o koncentraci 50  $\mu\text{g/ml}$ , BGE: 50 mM HEPES, 2 mM  $\text{Na}_2\text{WO}_4$ , pH 7,4 (upraveno pomocí TRIS), 25 % (v/v) MeOH, 30 kV, 25  $^\circ\text{C}$ , dávkování hydrodynamickým tlakem 50 mbar po dobu 6 s, UV detekce při 275 nm, 1-nitroso-2-naftol jako vnitřní standard (IS), rutin (1), kvercetin (2), p-kumarová kyselina (3), chlorogenová kyselina (4).

### 7.1.12 Rozlišení

Podle příslušného vztahu uvedeného v části 6.3.5 na straně 37 jsem vypočítala rozlišení  $R_s$  dvou sousedních píků při optimálním složení pracovního elektrolytu (tab. 8). Výsledky jsou uvedeny v tab.9.

Tab. 9: Rozlišení pro dvojice analytů

| Analyt                         | $R_s$ |
|--------------------------------|-------|
| IS - rutin                     | 10,3  |
| Rutin - kvercetin              | 3,8   |
| Kvercetin – p-kumarová kys.    | 6,6   |
| P-kumarová – chlorogenová kys. | 3,2   |

U všech dvojic analyzovaných látek je hodnota  $R_s$  vyšší než 1,5 a v daném systému došlo k úplnému rozlišení.

### 7.1.13 Elektroforetická pohyblivost

Vypočítala jsem elektroforetické pohyblivosti jednotlivých analytů při optimálním složení pracovního elektrolytu (tab. 8) z migračních časů látek podle vzorce na str. 37. Výsledky jsou uvedeny v tab. 10.

Tab. 10: Hodnoty elektroforetických pohyblivostí analyzovaných látek

| Analyt                       | Elektroforetická pohyblivost [ $10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ] |
|------------------------------|--|
| <b>Rutin</b>                 | -11,67   |
| <b>Kvercetin</b>             | -14,05   |
| <b>P-kumarová kyselina</b>   | -16,85   |
| <b>Chlorogenová kyselina</b> | -17,77   |

## 7.2 KVANTITATIVNÍ ANALÝZA

### 7.2.1 Kalibrační závislost

Kalibrační závislosti jsem proměřila za optimálních elektroforetických podmínek (tab. 8). Záznamy jsem získala pro následující koncentrace jednotlivých standardních látek 25, 50, 75, 100 a 125  $\mu\text{g/ml}$ , vždy s přidavkem 50  $\mu\text{g/ml}$  vnitřního standardu a 25 % (v/v) methanolu.

Studovala jsem rozdíl mezi parametry lineární regrese zpracované bez vnitřního standardu a s vnitřním standardem.

Jako kvantitativní parametr pro kalibrační závislost jsem odečítala plochy píků záznamu UV detektoru automaticky vyhodnocené počítačovým programem. Pro každou koncentraci jsem provedla tři měření a vypočítala průměr. Hodnoty pro sestavení kalibračních závislostí jsou uvedeny v tab. 11 – 14. Kalibrační přímky jednotlivých složek standardního roztoku jsou znázorněny na obr. 16 - 23. Parametry regresní přímky bez vnitřního standardu a s vnitřním standardem shrnuje tab. 15 a 16.

Tab. 11: Hodnoty pro kalibrační závislost rutinu (R)

| číslo měření   | 1.                         | 2.       | 3.       | 1.                     | 2.       | 3.       | $c_{Rnav.}$ ( $\mu\text{g/ml}$ ) | $\emptyset A_K R$ | $\emptyset A_K IS$ | $\emptyset A_K R / \emptyset A_K IS$ |
|----------------|----------------------------|----------|----------|------------------------|----------|----------|----------------------------------|-------------------|--------------------|--------------------------------------|
| $c_R / c_{IS}$ | rutin 25 $\mu\text{g/ml}$  |          |          | IS 50 $\mu\text{g/ml}$ |          |          |                                  |                   |                    |                                      |
| $t_m$ (min)    | 9,277                      | 9,137    | 9,045    | 6,86                   | 6,767    | 6,708    |                                  |                   |                    |                                      |
| A (mV.min)     | 0,00018                    | 0,00018  | 0,00019  | 0,00047                | 0,00046  | 0,00045  |                                  |                   |                    |                                      |
| $A_K$ (mV)     | 1,95E-05                   | 1,96E-05 | 2,07E-05 | 6,81E-05               | 6,77E-05 | 6,70E-05 | 25,008                           | 2,00E-02          | 6,76E-05           | 0,295                                |
| $c_R / c_{IS}$ | rutin 50 $\mu\text{g/ml}$  |          |          | IS 50 $\mu\text{g/ml}$ |          |          |                                  |                   |                    |                                      |
| $t_m$ (min)    | 8,887                      | 8,85     | 8,943    | 6,62                   | 6,597    | 6,673    |                                  |                   |                    |                                      |
| A (mV.min)     | 0,00032                    | 0,00037  | 0,00036  | 0,00044                | 0,00046  | 0,00042  |                                  |                   |                    |                                      |
| $A_K$ (mV)     | 3,66E-05                   | 4,23E-05 | 4,08E-05 | 6,38E-05               | 6,94E-05 | 6,25E-05 | 50,016                           | 3,99E-02          | 6,52E-05           | 0,612                                |
| $c_R / c_{IS}$ | rutin 75 $\mu\text{g/ml}$  |          |          | IS 50 $\mu\text{g/ml}$ |          |          |                                  |                   |                    |                                      |
| $t_m$ (min)    | 8,997                      | 8,977    | 8,992    | 6,695                  | 6,677    | 6,853    |                                  |                   |                    |                                      |
| A (mV.min)     | 0,00051                    | 0,00049  | 0,00052  | 0,00043                | 0,00046  | 0,00045  |                                  |                   |                    |                                      |
| $A_K$ (mV)     | 5,64E-05                   | 5,48E-05 | 5,82E-05 | 6,40E-05               | 6,85E-05 | 6,62E-05 | 75,024                           | 5,65E-02          | 6,62E-05           | 0,853                                |
| $c_R / c_{IS}$ | rutin 100 $\mu\text{g/ml}$ |          |          | IS 50 $\mu\text{g/ml}$ |          |          |                                  |                   |                    |                                      |
| $t_m$ (min)    | 8,917                      | 8,892    | 8,867    | 6,647                  | 6,63     | 6,628    |                                  |                   |                    |                                      |
| A (mV.min)     | 0,00069                    | 0,00069  | 0,00068  | 0,00045                | 0,00046  | 0,00045  |                                  |                   |                    |                                      |
| $A_K$ (mV)     | 7,68E-05                   | 7,78E-05 | 7,71E-05 | 6,83E-05               | 6,89E-05 | 6,77E-05 | 100,032                          | 7,72E-02          | 6,83E-05           | 1,131                                |
| $c_R / c_{IS}$ | rutin 125 $\mu\text{g/ml}$ |          |          | IS 50 $\mu\text{g/ml}$ |          |          |                                  |                   |                    |                                      |
| $t_m$ (min)    | 9,782                      | 9,645    | 9,543    | 7,142                  | 7,042    | 6,987    |                                  |                   |                    |                                      |
| A (mV.min)     | 0,00094                    | 0,00089  | 0,00091  | 0,00044                | 0,00047  | 0,00042  |                                  |                   |                    |                                      |
| $A_K$ (mV)     | 9,58E-05                   | 9,24E-05 | 9,57E-05 | 6,13E-05               | 6,61E-05 | 6,02E-05 | 125,04                           | 9,46E-02          | 6,25E-05           | 1,514                                |

$t_m$  – migrační čas R, A – plocha R,  $A_K$  - korig. plocha R,  $c_R / c_{IS}$  - koncentrace R/vnitřního standardu,  $c_{Rnav.}$  - navážka R



Tab. 12: Hodnoty pro kalibrační závislost kvercetinu (KV)

| číslo měření                        | 1.   | 2.       | 3.       | 1.                                       | 2.       | 3.       | $c_{KVnav.}$<br>( $\mu\text{g/ml}$ ) | $\emptyset A_K$ KV | $\emptyset A_K$ IS | $\emptyset A_K$ KV / $\emptyset A_K$ IS |
|-------------------------------------|--|----------|----------|--|----------|----------|--------------------------------------|--------------------|--------------------|---|
| <b><math>c_{KV} / c_{IS}</math></b> | <b>kvercetin 25 <math>\mu\text{g/ml}</math></b>  |          |          | <b>IS 50 <math>\mu\text{g/ml}</math></b> |          |          |                                      |                    |                    |   |
| <b><math>t_m</math> (min)</b>       | 10,57  | 10,402   | 10,268   | 6,86                                     | 6,767    | 6,708    |                                      |                    |                    |   |
| <b>A (mV.min)</b>                   | 0,00022  | 0,00024  | 0,00022  | 0,00047                                  | 0,00046  | 0,00045  |                                      |                    |                    |   |
| <b><math>A_K</math> (mV)</b>        | 2,12E-05   | 2,26E-05 | 2,14E-05 | 6,81E-05                                 | 6,77E-05 | 6,70E-05 | 25,000                               | 2,17E-02           | 6,76E-05           | 0,321                                   |
| <b><math>c_{KV} / c_{IS}</math></b> | <b>kvercetin 50 <math>\mu\text{g/ml}</math></b>  |          |          | <b>IS 50 <math>\mu\text{g/ml}</math></b> |          |          |                                      |                    |                    |   |
| <b><math>t_m</math> (min)</b>       | 10,032   | 10,037   | 10,153   | 6,62                                     | 6,597    | 6,673    |                                      |                    |                    |   |
| <b>A (mV.min)</b>                   | 0,00043  | 0,00047  | 0,00043  | 0,00044                                  | 0,00046  | 0,00042  |                                      |                    |                    |   |
| <b><math>A_K</math> (mV)</b>        | 4,26E-05   | 4,65E-05 | 4,23E-05 | 6,38E-05                                 | 6,94E-05 | 6,25E-05 | 50,000                               | 4,37E-02           | 6,52E-05           | 0,670                                   |
| <b><math>c_{KV} / c_{IS}</math></b> | <b>kvercetin 75 <math>\mu\text{g/ml}</math></b>  |          |          | <b>IS 50 <math>\mu\text{g/ml}</math></b> |          |          |                                      |                    |                    |   |
| <b><math>t_m</math> (min)</b>       | 10,18  | 10,183   | 10,205   | 6,695                                    | 6,677    | 6,853    |                                      |                    |                    |   |
| <b>A (mV.min)</b>                   | 0,00065  | 0,00066  | 0,00064  | 0,00043                                  | 0,00046  | 0,00045  |                                      |                    |                    |   |
| <b><math>A_K</math> (mV)</b>        | 6,42E-05   | 6,49E-05 | 6,32E-05 | 6,40E-05                                 | 6,85E-05 | 6,62E-05 | 75,000                               | 6,42E-02           | 6,62E-05           | 0,970                                   |
| <b><math>c_{KV} / c_{IS}</math></b> | <b>kvercetin 100 <math>\mu\text{g/ml}</math></b> |          |          | <b>IS 50 <math>\mu\text{g/ml}</math></b> |          |          |                                      |                    |                    |   |
| <b><math>t_m</math> (min)</b>       | 10,163   | 10,103   | 10,017   | 6,647                                    | 6,63     | 6,628    |                                      |                    |                    |   |
| <b>A (mV.min)</b>                   | 0,00090  | 0,00090  | 0,00088  | 0,00045                                  | 0,00046  | 0,00045  |                                      |                    |                    |   |
| <b><math>A_K</math> (mV)</b>        | 8,82E-05   | 8,95E-05 | 8,75E-05 | 6,83E-05                                 | 6,89E-05 | 6,77E-05 | 100,000                              | 8,84E-02           | 6,83E-05           | 1,295                                   |
| <b><math>c_{KV} / c_{IS}</math></b> | <b>kvercetin 125 <math>\mu\text{g/ml}</math></b> |          |          | <b>IS 50 <math>\mu\text{g/ml}</math></b> |          |          |                                      |                    |                    |   |
| <b><math>t_m</math> (min)</b>       | 11,268   | 11,082   | 10,913   | 7,142                                    | 7,042    | 6,987    |                                      |                    |                    |   |
| <b>A (mV.min)</b>                   | 0,00137  | 0,00120  | 0,00112  | 0,00044                                  | 0,00047  | 0,00042  |                                      |                    |                    |   |
| <b><math>A_K</math> (mV)</b>        | 1,21E-04   | 1,08E-04 | 1,03E-05 | 6,13E-05                                 | 6,61E-05 | 6,02E-05 | 125,000                              | 1,11E-01           | 6,25E-05           | 1,771                                   |

$t_m$  – migrační čas KV, A – plocha KV,  $A_K$  - korig. plocha KV,  $c_{KV} / c_{IS}$  - koncentrace KV/vnitřního standardu,  $c_{KVnav.}$  - navážka KV

Tab. 13: Hodnoty pro kalibrační závislost p-kumarové kyseliny (KK)

| číslo měření      | 1.   | 2.       | 3.       | 1.                                       | 2.       | 3.       | $c_{KKnav.}$<br>( $\mu\text{g/ml}$ ) | $\emptyset A_K$ KK | $\emptyset A_K$ IS | $\emptyset A_K$ KK / $\emptyset A_K$ IS |
|-------------------|--|----------|----------|--|----------|----------|--------------------------------------|--------------------|--------------------|---|
| $c_{KK} / c_{IS}$ | <b>p-kumarová kys. 25 <math>\mu\text{g/ml}</math></b>  |          |          | <b>IS 50 <math>\mu\text{g/ml}</math></b> |          |          |                                      |                    |                    |   |
| $t_m$ (min)       | 12,73  | 12,498   | 12,33    | 6,86                                     | 6,767    | 6,708    |                                      |                    |                    |   |
| A (mV.min)        | 0,00079  | 0,00077  | 0,00078  | 0,00047                                  | 0,00046  | 0,00045  |                                      |                    |                    |   |
| $A_K$ (mV)        | 6,19E-05   | 6,13E-05 | 6,35E-05 | 6,81E-05                                 | 6,77E-05 | 6,70E-05 | 25,004                               | 6,22E-02           | 6,76E-05           | 0,921                                   |
| $c_{KK} / c_{IS}$ | <b>p-kumarová kys. 50 <math>\mu\text{g/ml}</math></b>  |          |          | <b>IS 50 <math>\mu\text{g/ml}</math></b> |          |          |                                      |                    |                    |   |
| $t_m$ (min)       | 12,072   | 11,953   | 12,098   | 6,62                                     | 6,597    | 6,673    |                                      |                    |                    |   |
| A (mV.min)        | 0,00163  | 0,00172  | 0,00151  | 0,00044                                  | 0,00046  | 0,00042  |                                      |                    |                    |   |
| $A_K$ (mV)        | 0,000135   | 0,000144 | 0,000125 | 6,38E-05                                 | 6,94E-05 | 6,25E-05 | 50,008                               | 1,35E-01           | 6,52E-05           | 2,063                                   |
| $c_{KK} / c_{IS}$ | <b>p-kumarová kys. 75 <math>\mu\text{g/ml}</math></b>  |          |          | <b>IS 50 <math>\mu\text{g/ml}</math></b> |          |          |                                      |                    |                    |   |
| $t_m$ (min)       | 12,037   | 12,002   | 12,025   | 6,695                                    | 6,677    | 6,853    |                                      |                    |                    |   |
| A (mV.min)        | 0,00251  | 0,00255  | 0,00226  | 0,00043                                  | 0,00046  | 0,00045  |                                      |                    |                    |   |
| $A_K$ (mV)        | 0,000209   | 0,000212 | 0,000188 | 6,40E-05                                 | 6,85E-05 | 6,62E-05 | 75,012                               | 2,03E-01           | 6,62E-05           | 3,065                                   |
| $c_{KK} / c_{IS}$ | <b>p-kumarová kys. 100 <math>\mu\text{g/ml}</math></b> |          |          | <b>IS 50 <math>\mu\text{g/ml}</math></b> |          |          |                                      |                    |                    |   |
| $t_m$ (min)       | 11,793   | 11,737   | 11,707   | 6,647                                    | 6,63     | 6,628    |                                      |                    |                    |   |
| A (mV.min)        | 0,00333  | 0,00324  | 0,00306  | 0,00045                                  | 0,00046  | 0,00045  |                                      |                    |                    |   |
| $A_K$ (mV)        | 0,000282   | 0,000276 | 0,000261 | 6,83E-05                                 | 6,89E-05 | 6,77E-05 | 100,016                              | 2,73E-01           | 6,83E-05           | 4,001                                   |
| $c_{KK} / c_{IS}$ | <b>p-kumarová kys. 125 <math>\mu\text{g/ml}</math></b> |          |          | <b>IS 50 <math>\mu\text{g/ml}</math></b> |          |          |                                      |                    |                    |   |
| $t_m$ (min)       | 13,308   | 13,175   | 13,005   | 7,142                                    | 7,042    | 6,987    |                                      |                    |                    |   |
| A (mV.min)        | 0,00452  | 0,00455  | 0,00423  | 0,00044                                  | 0,00047  | 0,00042  |                                      |                    |                    |   |
| $A_K$ (mV)        | 0,00034  | 0,000345 | 0,000325 | 6,13E-05                                 | 6,61E-05 | 6,02E-05 | 125,020                              | 3,37E-01           | 6,25E-05           | 5,388                                   |

$t_m$  – migrační čas KK, A – plocha KK,  $A_K$  - korig. plocha KK,  $c_{KK} / c_{IS}$  - koncentrace KK/vnitřn. standardu,  $c_{KKnav.}$  - navážka KK

Tab. 14: Hodnoty pro kalibrační závislost chlorogenové kyseliny (CHK)

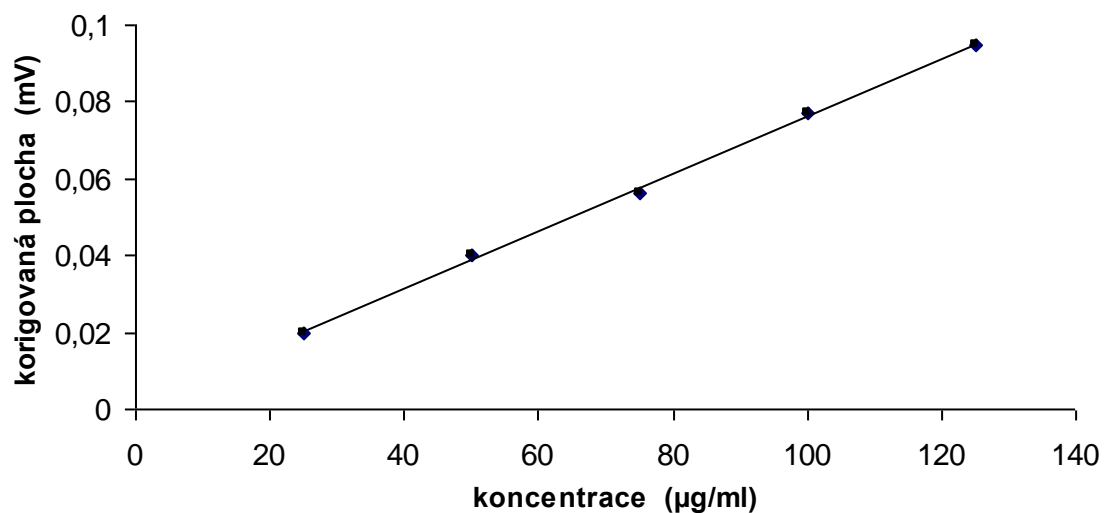
| číslo měření       | 1.                                     | 2.       | 3.       | 1.                     | 2.       | 3.       | $c_{CHKnav.}$<br>( $\mu\text{g/ml}$ ) | $\emptyset A_K$<br>CHK | $\emptyset A_K$ IS | $\emptyset A_K$ CHK / $\emptyset A_K$<br>IS |
|--------------------|--|----------|----------|------------------------|----------|----------|---------------------------------------|------------------------|--------------------|---|
| $c_{CHK} / c_{IS}$ | chlorogenová kys. 25 $\mu\text{g/ml}$  |          |          | IS 50 $\mu\text{g/ml}$ |          |          |                                       |                        |                    |   |
| $t_m$ (min)        | 13,497                                 | 13,202   | 13,062   | 6,86                   | 6,767    | 6,708    |                                       |                        |                    |   |
| A (mV.min)         | 0,00013                                | 0,00013  | 0,00013  | 0,00047                | 0,00046  | 0,00045  |                                       |                        |                    |   |
| $A_K$ (mV)         | 9,59E-06                               | 9,58E-06 | 9,70E-06 | 6,81E-05               | 6,77E-05 | 6,70E-05 | 25,000                                | 9,63E-03               | 6,76E-05           | 0,142                                       |
| $c_{CHK} / c_{IS}$ | chlorogenová kys. 50 $\mu\text{g/ml}$  |          |          | IS 50 $\mu\text{g/ml}$ |          |          |                                       |                        |                    |   |
| $t_m$ (min)        | 12,79                                  | 12,705   | 12,098   | 6,62                   | 6,597    | 6,673    |                                       |                        |                    |   |
| A (mV.min)         | 0,00025                                | 0,00023  | 0,00024  | 0,00044                | 0,00046  | 0,00042  |                                       |                        |                    |   |
| $A_K$ (mV)         | 1,92E-05                               | 1,85E-05 | 2,02E-05 | 6,38E-05               | 6,94E-05 | 6,25E-05 | 50,000                                | 1,93E-02               | 6,52E-05           | 0,296                                       |
| $c_{CHK} / c_{IS}$ | chlorogenová kys. 75 $\mu\text{g/ml}$  |          |          | IS 50 $\mu\text{g/ml}$ |          |          |                                       |                        |                    |   |
| $t_m$ (min)        | 12,837                                 | 12,825   | 12,856   | 6,695                  | 6,677    | 6,853    |                                       |                        |                    |   |
| A (mV.min)         | 0,00040                                | 0,00039  | 0,00037  | 0,00043                | 0,00046  | 0,00045  |                                       |                        |                    |   |
| $A_K$ (mV)         | 3,13E-05                               | 3,06E-05 | 2,85E-05 | 6,40E-05               | 6,85E-05 | 6,62E-05 | 75,000                                | 3,01E-02               | 6,62E-05           | 0,455                                       |
| $c_{CHK} / c_{IS}$ | chlorogenová kys. 100 $\mu\text{g/ml}$ |          |          | IS 50 $\mu\text{g/ml}$ |          |          |                                       |                        |                    |   |
| $t_m$ (min)        | 12,628                                 | 12,603   | 12,505   | 6,647                  | 6,63     | 6,628    |                                       |                        |                    |   |
| A (mV.min)         | 0,00051                                | 0,00052  | 0,00050  | 0,00045                | 0,00046  | 0,00045  |                                       |                        |                    |   |
| $A_K$ (mV)         | 4,04E-05                               | 4,11E-05 | 3,97E-05 | 6,83E-05               | 6,89E-05 | 6,77E-05 | 100,000                               | 2,73E-01               | 6,83E-05           | 0,592                                       |
| $c_{CHK} / c_{IS}$ | chlorogenová kys. 125 $\mu\text{g/ml}$ |          |          | IS 50 $\mu\text{g/ml}$ |          |          |                                       |                        |                    |   |
| $t_m$ (min)        | 14,275                                 | 14,182   | 13,977   | 7,142                  | 7,042    | 6,987    |                                       |                        |                    |   |
| A (mV.min)         | 0,00069                                | 0,00010  | 0,00069  | 0,00044                | 0,00047  | 0,00042  |                                       |                        |                    |   |
| $A_K$ (mV)         | 4,82E-05                               | 4,94E-05 | 4,96E-05 | 6,13E-05               | 6,61E-05 | 6,02E-05 | 125,000                               | 4,91E-02               | 6,25E-05           | 0,790                                       |

$t_m$  – migrační čas CHK, A – plocha CHK,  $A_K$  - korig. plocha CHK,  $c_{CHK} / c_{IS}$  - koncentrace CHK/vnitřní standardu,  $c_{CHKnav.}$  - navážka CHK

## KALIBRAČNÍ ZÁVISLOSTI

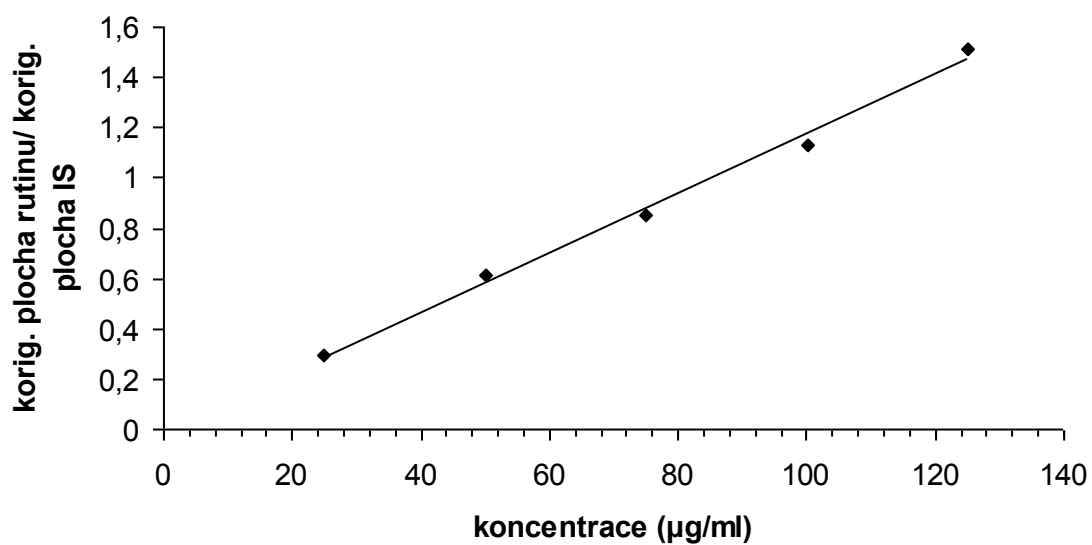
### 1. Kalibrační závislost rutinu

- bez vnitřního standardu



Obr. 16 Kalibrační závislost rutinu bez vnitřního standardu

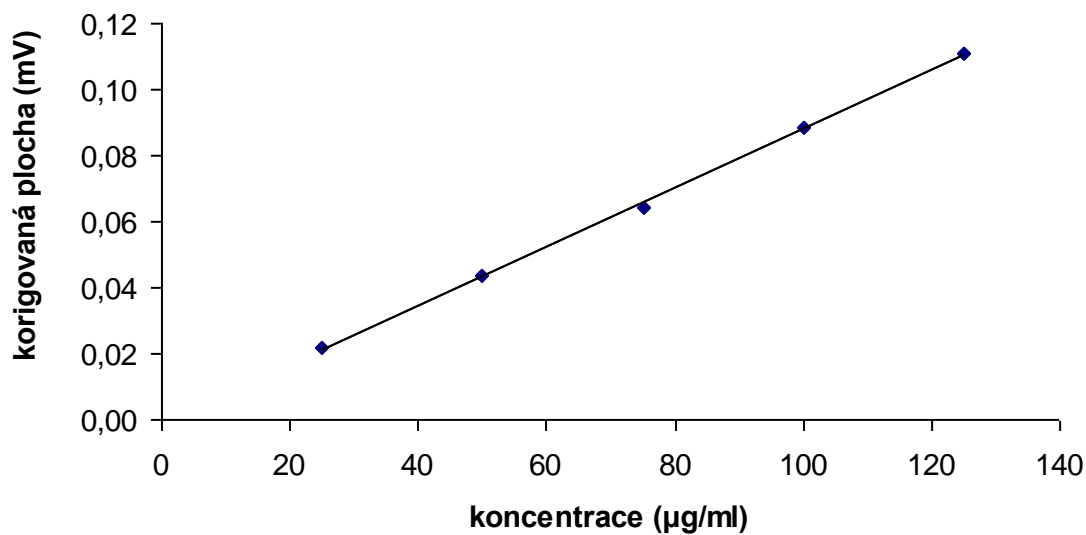
- s vnitřním standardem



Obr. 17 Kalibrační závislost rutinu s vnitřním standardem

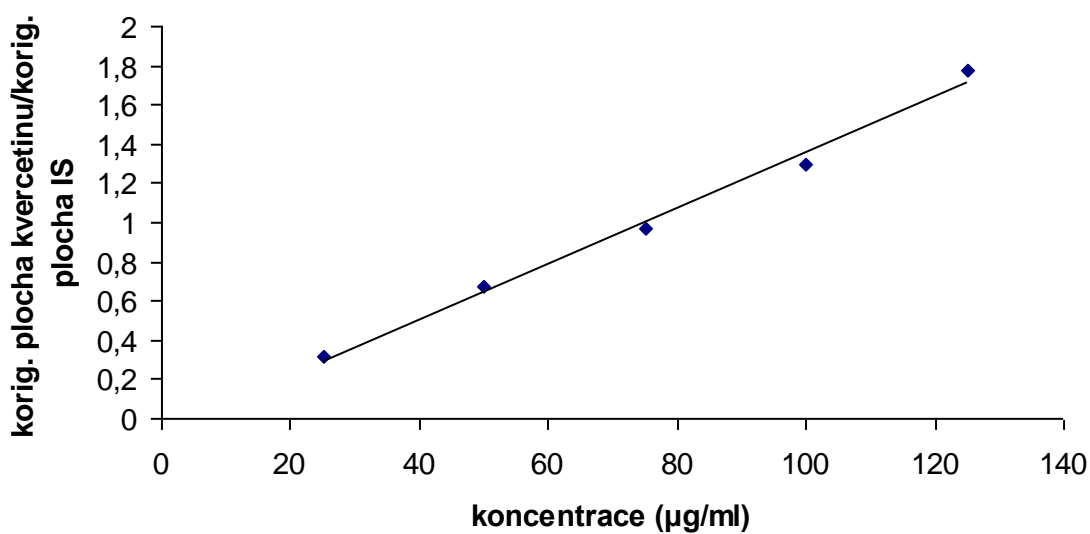
## 2. Kalibrační závislost kvercetinu

- bez vnitřního standardu



Obr. 18 Kalibrační závislost kvercetinu bez vnitřního standardu

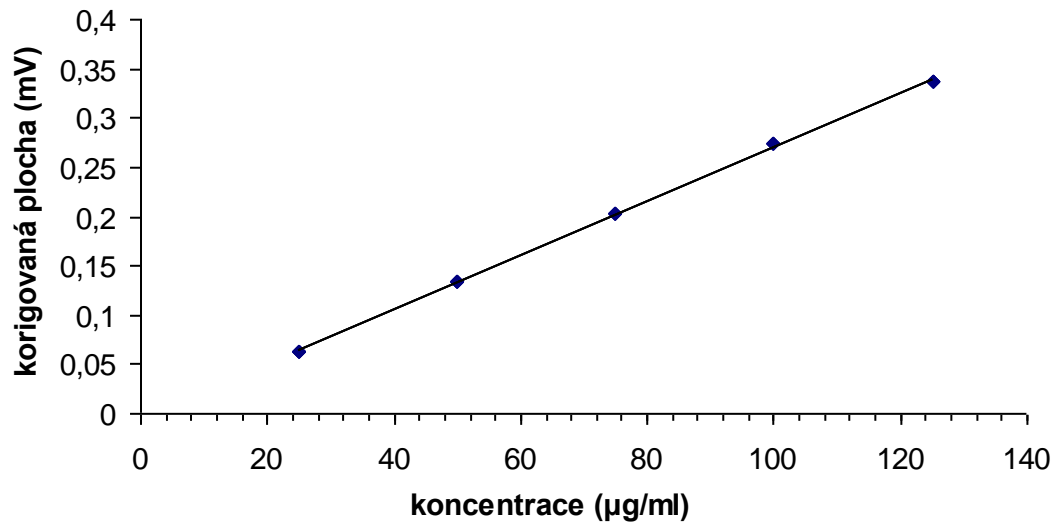
- s vnitřním standardem



Obr. 19 Kalibrační závislost kvercetinu s vnitřním standardem

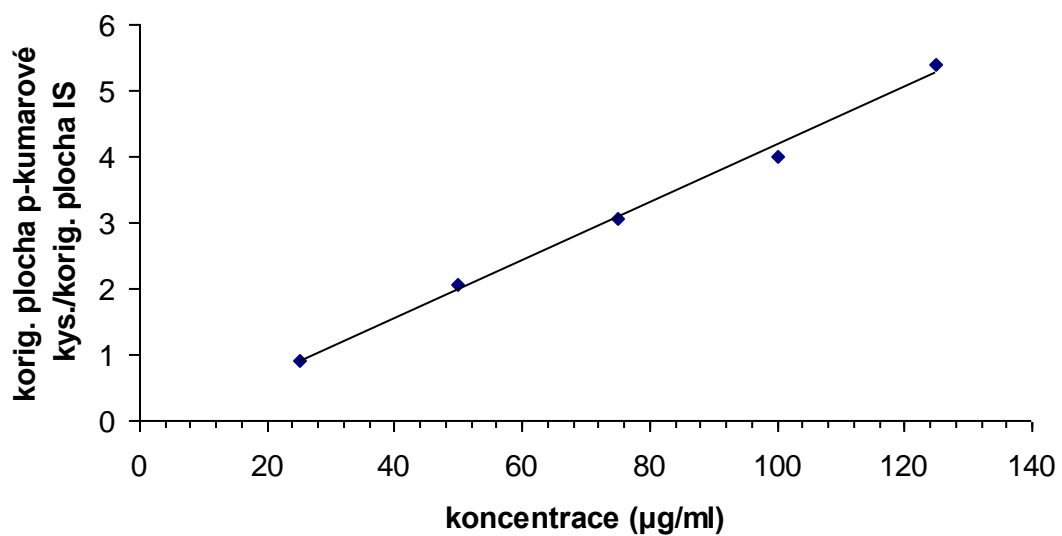
### 3. Kalibrační závislost p-kumarové kyseliny

- bez vnitřního standardu



Obr. 20 Kalibrační závislost p-kumarové kyseliny bez vnitřního standardu

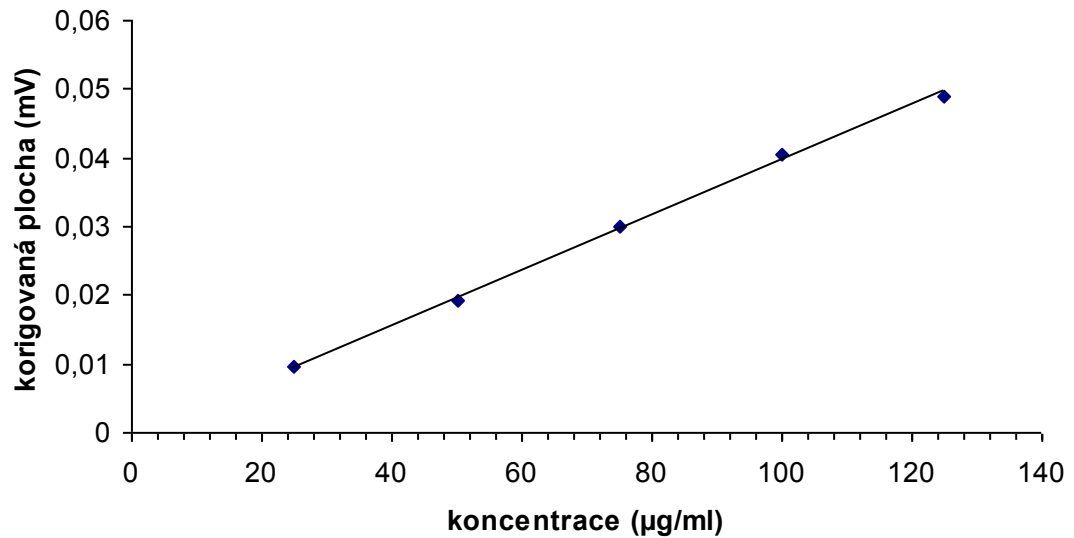
- s vnitřním standardem



Obr. 21 Kalibrační závislost p-kumarové kyseliny s vnitřním standardem

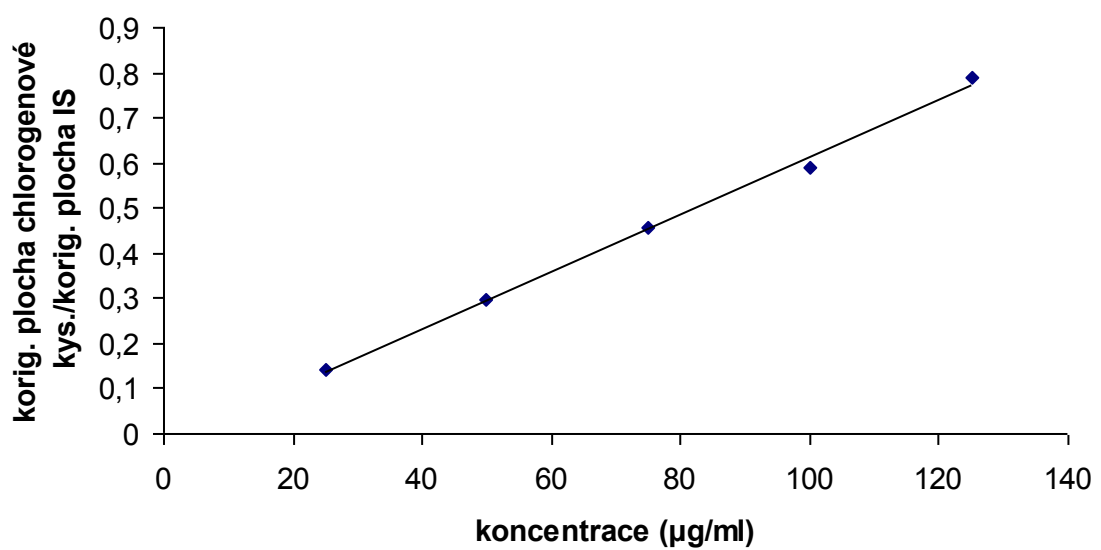
#### 4. Kalibrační závislost chlorogenové kyseliny

- bez vnitřního standardu



Obr. 22 Kalibrační závislost chlorogenové kyseliny bez vnitřního standardu

- s vnitřním standardem



Obr. 23 Kalibrační závislost chlorogenové kyseliny s vnitřním standardem

Obecný tvar regresní rovnice (směrnice tvar přímky):

$$y = kx + q$$

x - koncentrace látky ( $\mu\text{g/ml}$ )

y - plocha píku

k - směrnice přímky

q - absolutní člen

Tab.15: Regresní parametry kalibračních křivek bez vnitřního standardu

| Analyt                   | Směrnice přímky<br>$k+s$ | Absolutní člen<br>$q+s$ | Korelační koeficient<br>$r$ |
|--------------------------|--------------------------|-------------------------|-----------------------------|
| <b>Rutin</b>             | 0,0007 $\pm$ 1,33E-05    | 0,0016 $\pm$ 0,0011     | 0,9991                      |
| <b>Kvercetin</b>         | 0,0009 $\pm$ 1,27E-05    | - 0,0010 $\pm$ 0,0011   | 0,9994                      |
| <b>P-kumarová kys.</b>   | 0,0028 $\pm$ 3,39E-05    | - 0,0044 $\pm$ 0,0028   | 0,9995                      |
| <b>Chlorogenová kys.</b> | 0,0004 $\pm$ 8,06E-06    | - 0,0003 $\pm$ 0,0007   | 0,9988                      |

s – směrodatná odchylka

Tab.16: Regresní parametry kalibračních křivek s vnitřním standardem

| Analyt                   | Směrnice přímky<br>$k+s$ | Absolutní člen<br>$q+s$ | Korelační koeficient<br>$r$ |
|--------------------------|--------------------------|-------------------------|-----------------------------|
| <b>Rutin</b>             | 0,0118 $\pm$ 0,0005      | - 0,0063 $\pm$ 0,0443   | 0,9939                      |
| <b>Kvercetin</b>         | 0,0141 $\pm$ 0,0007      | - 0,0519 $\pm$ 0,0596   | 0,9923                      |
| <b>P-kumarová kys.</b>   | 0,0435 $\pm$ 0,0016      | - 0,1743 $\pm$ 0,1358   | 0,9958                      |
| <b>Chlorogenová kys.</b> | 0,0064 $\pm$ 0,0002      | - 0,0225 $\pm$ 0,0175   | 0,9967                      |

s – směrodatná odchylka

Sledovaná závislost korigované plochy píku analytu na koncentraci, resp.závislost poměru korigované plochy píku analytu a korigované plochy píku vnitřního standardu na koncentraci je v koncentračním rozmezí 25 - 125  $\mu\text{g/ml}$  lineární.

Z porovnání hodnot korelačních koeficientů ( $r_{\text{bez IS}}$ : 0,9988 - 0,9995,  $r_{\text{s IS}}$ : 0,9923 - 0,9967) vyplývá, že bez použití vnitřního standardu získáme přesnější a správnější výsledky než metodou s vnitřním standardem.



### 7.2.2 Limit detekce, limit stanovení

Detekční limity a kvantitativní limity byly určeny analýzou látek o koncentraci 25 µg/ml a vypočteny dle vztahů na str. 38. Výsledky jsou uvedeny v tab. 17.

Tab. 17: Hodnoty limitu detekce (LOD) a limitu stanovení (LOQ) pro jednotlivé látky

| Analyt            | LOD (µg/ml) | LOQ (µg/ml) |
|-------------------|-------------|-------------|
| Rutin             | 2,6         | 8,5         |
| Kvercetin         | 1,8         | 5,8         |
| P-kumarová kys.   | 0,8         | 2,8         |
| Chlorogenová kys. | 1,6         | 5,3         |

Detekční limity se pohybují v rozmezí 0,8 µg/ml (p-kumarová kyselina) – 2,6 µg/ml (rutin) a kvantitativní limity v rozmezí 2,8 µg/ml (p-kumarová kyselina) – 8,5 µg/ml (rutin).

### 7.2.3 Opakovatelnost

Pro ověření opakovatelnosti ploch píků a migračních časů jsem provedla pět měření pro koncentraci analytů 50 µg/ml. Směrodatnou odchylku a relativní směrodatnou odchylku jsem vypočítala podle vztahů na str. 36, 37. Výsledky jsou zaznamenány v tab.18.

Tab. 18: Opakovatelnost ploch píků a migračních časů

| Analyt            | Migrační čas $t_m$ (min) |           | Plocha píku A (mV.min)  |           |
|-------------------|--------------------------|-----------|-------------------------|-----------|
|                   | $\bar{\sigma}$ (min)     | $s_r$ (%) | $\bar{\sigma}$ (mV.min) | $s_r$ (%) |
| Rutin             | 8,56                     | 0,6       | 0,251696                | 1,6       |
| Kvercetin         | 9,69                     | 0,7       | 0,252208                | 2,9       |
| P-kumarová kys.   | 11,47                    | 0,4       | 1,442143                | 2,3       |
| Chlorogenová kys. | 12,2                     | 0,5       | 0,303054                | 3,0       |

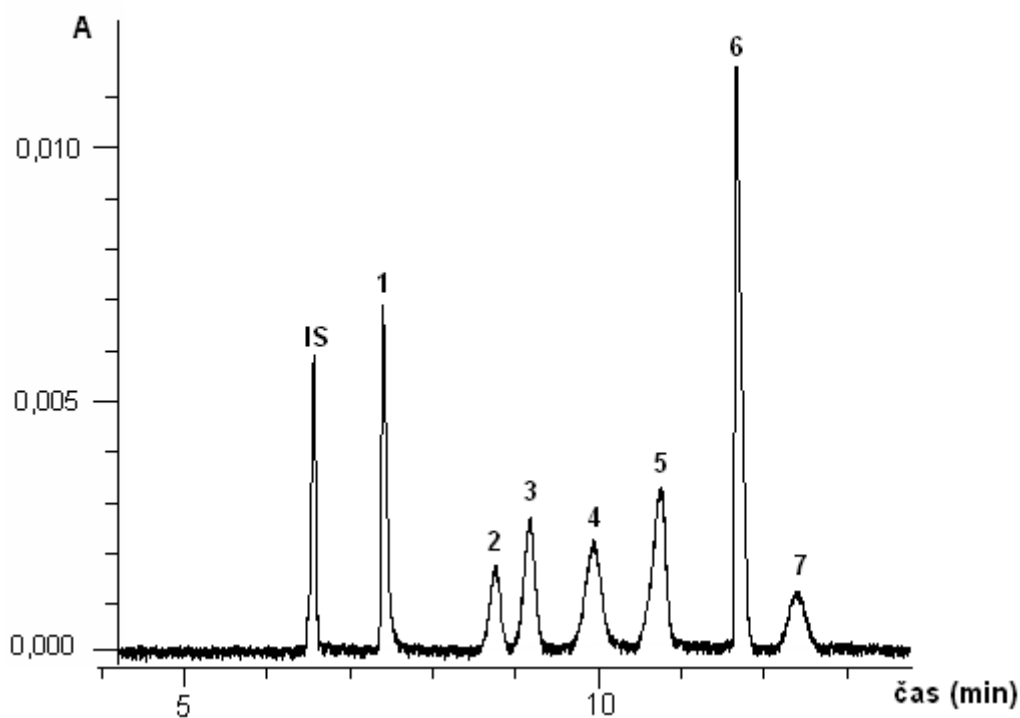
Opakovatelnost je velmi dobrá, relativní směrodatná odchylka pro migrační časy se pohybuje v rozmezí 0,4 – 0,7 %, pro plochy píků v rozmezí 1,6 – 3,0 %.

## 7.3 SEPARACE MODELOVÉ SMĚSI V PŘÍTOMNOSTI DALŠÍCH FLAVONOIDŮ

Připravila jsem si standardní roztok, který obsahoval 50 µg/ml každého z flavonoidů: apigenin, hyperosid, luteolin, kvercetin a rutin, rovněž 50 µg/ml p-kumarové kyseliny a chlorogenové kyseliny a 50 µg/ml vnitřního standardu. Elektroforetická separace proběhla za optimálních podmínek a při optimálním složení pracovního elektrolytu (tab. 8).

### 7.3.1 Elektroforeogram směsi flavonoidů a hydroxyfenylkarboxylových kyselin

Obr. 24



Obr. 24 Elektroforeogram roztoku standardů o koncentraci 50 µg/ml, BGE: 50 mM HEPES, 2 mM Na<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>, pH 7,4 (upraveno pomocí TRIS), 25 % (v/v) MeOH, 30 kV, 25 °C, dávkování hydrodynamickým tlakem 50 mbar po dobu 6 s, UV detekce při 275 nm, 1-nitroso-2-naftol jako vnitřní standard (IS), apigenin (1), rutin (2), hyperosid (3), kvercetin (4), luteolin (5), p-kumarová kyselina (6), chlorogenová kyselina (7).

### 7.3.2 Rozlišení

Podle vztahu na straně 37 jsem vypočítala rozlišení  $R_s$  vždy dvou sousedních píků při optimálním složení pracovního elektrolytu (tab. 8). Migrační časy analytů jsou zaznamenány v tab. 19. Hodnoty rozlišení jsou uvedeny v tab. 20.

Tab. 19: Migrační časy analytů

| Analyt                | $t_m$ (min) |
|-----------------------|-------------|
| IS                    | 6,57        |
| Apigenin              | 7,40        |
| Rutin                 | 8,74        |
| Hyperosid             | 9,27        |
| Kvercetin             | 9,95        |
| Luteolin              | 10,75       |
| P-kumarová kyselina   | 11,71       |
| Chlorogenová kyselina | 12,42       |

Tab. 20: Rozlišení pro dvojice analytů

| Analyt                         | $R_s$ |
|--------------------------------|-------|
| IS - apigenin                  | 4,2   |
| Apigenin - rutin               | 4,8   |
| Rutin - hyperosid              | 1,4   |
| Hyperosid - kvercetin          | 2,0   |
| Kvercetin - luteolin           | 1,8   |
| Luteolin - p-kumarová kys.     | 3,0   |
| P-kumarová – chlorogenová kys. | 1,9   |

Kromě dvojice rutin – hyperosid ( $R_s = 1,4$ ) je u všech ostatních dvojic analyzovaných látek hodnota  $R_s$  vyšší než 1,5 a v daném systému došlo k úplnému rozlišení. Všechny sledované látky jsou rozděleny na základní linii, separační účinnost je dostatečná pro oddělení všech složek modelové směsi flavonoidů včetně apigeninu, hyperosidu a luteolinu.

## 7.4 DISKUSE

Kapilární elektroforéza je pro analýzu polyhydroxyfenolických sloučenin velmi vhodná (zejm. pro vysokou separační efektivitu a krátký čas analýzy). V předešlých pracích bylo pro separaci a stanovení studovaných látky využito tvorby anionických komplexů s borátem<sup>25,26,31</sup> či molybdenem<sup>7</sup>, ale komplexace daných analytů s wolframem nebyla dosud zkoumána.

### 7.4.1 Porovnání použité metody s CZE využívající komplexaci analytů s B(III) a komplexaci s Mo(VI)

Výhody použití šestimocného wolframanu(VI) jako komplexotvorného činidla oproti tetraborátu B(III):

- možnost použití nižšího pH (7,4) a tím snížení rizika oxidace analytů atmosferickým kyslíkem, (borát: pH 9 –11)
- možnost použití nižší koncentrace wolframanu (0,5 –2 mM), (borát: koncentrace 10 – 50 mM)
- tvorba stabilnějších komplexů W(VI) s aromatickými polyhydroxysloučeninami

Porovnání metody využívající šestimocný wolframan(VI) a metody využívající šestimocný molybdenan Mo(VI) jako komplexotvorné činidlo:

Tab. 21: Porovnání elektroforetických podmínek obou metod

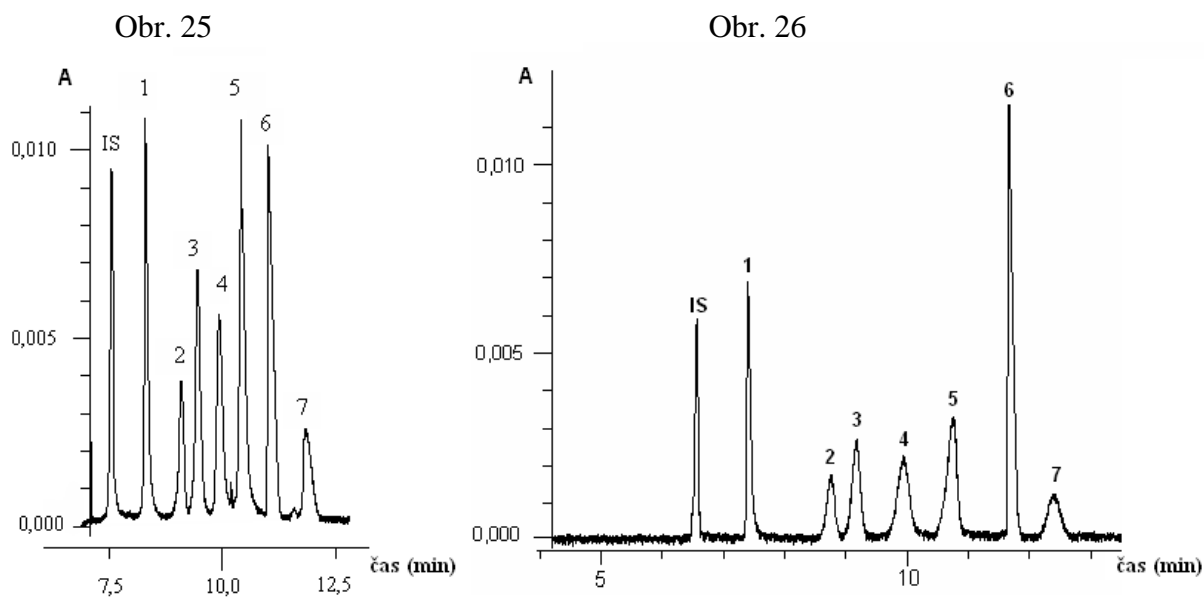
|                     | Mo(VI)  | W(VI)  |
|---------------------|---|--|
| <b>BGE</b>          | 25 mM HEPPSO + 2 mM Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>              | 50 mM HEPES + 2 mM Na <sub>2</sub> WO <sub>4</sub>               |
| <b>pH</b>           | 7,4   | 7,4  |
| <b>Rozpouštědlo</b> | 25 % MeOH   | 25 % MeOH  |
| <b>Napětí</b>       | 25 kV   | 30 kV  |
| <b>Teplota</b>      | 25°C  | 25°C   |
| <b>Dávkování</b>    | hydrodynamický tlak 50 mBar, 6 s.                                 | hydrodynamický tlak 50 mBar, 6 s.                                |
| <b>Kapilára</b>     | celková délka 70 cm, efektivní délka 45 cm, vnitřní průměr 100 μm | celková délka 75 cm, efektivní délka 42 cm, vnitřní průměr 75 μm |
| <b>Detekce</b>      | 263 nm  | 275 nm   |

Tab. 22: Porovnání časů analýzy a parametrů kalibrace

|   | Mo(VI)        | W(VI)          |
|---|---------------|----------------|
| <b>Čas analýzy t<sub>m</sub>(min.)</b>    | 13,1          | 14,7           |
| <b>Rozmezí linearit kalibrační křivky</b> | 10 - 40 μg/ml | 25 - 125 μg/ml |
| <b>Korelační koeficient r<sup>2</sup></b> | > 0,9986      | > 0,9988       |

Tab. 23: Porovnání LOD, LOQ, s<sub>r</sub> migračních časů a ploch píků

| LÁTKA                        | LOD /LOQ (μg/ml) |           | s <sub>r</sub> migračních časů/ s <sub>r</sub> ploch píků (%) |           |
|------------------------------|------------------|-----------|---|-----------|
|                              | Mo (VI)          | W(VI)     | Mo (VI)   | W(VI)     |
| <b>Rutin</b>                 | 0,4 / 1,2        | 2,6 / 8,8 | 1,5 / 1,6   | 0,6 / 1,6 |
| <b>Kvercetin</b>             | 0,9 / 2,8        | 1,8 / 5,8 | 0,9 / 0,4   | 0,7 / 2,9 |
| <b>P-kumarová kyselina</b>   | 0,4 / 1,1        | 0,8 / 2,8 | 1,8 / 1,6   | 0,4 / 2,3 |
| <b>Chlorogenová kyselina</b> | 1,6 / 4,7        | 1,6 / 5,3 | 0,7 / 1,8   | 0,5 / 3,0 |



Obr. 25, 26 Porovnání elektroforeogramů separace zvolených analytů ve formě komplexů s molybdenanem (obr. 25) a wolframanem (obr. 26). Pořadí výstupu látek je u obou záznamů stejné: 1-nitroso-2-naftol jako vnitřní standard (IS), apigenin (1), rutin (2), hyperosid (3), kvercetin (4), luteolin (5), p-kumarová kyselina (6), chlorogenová kyselina (7).

Použitím kapiláry o menším průměru (75  $\mu\text{m}$  vs. 100  $\mu\text{m}$ ) jsem dosáhla lepší separační účinnosti. Vloženým napětím 30 kV došlo k podstatnému zkrácení doby analýzy, avšak v porovnání s metodou využívající Mo(VI) je čas analýzy nepatrně delší. V této práci jsem vypracovala kalibrační závislost pro širší koncentrační rozmezí.

Při separaci s Mo(VI) byly zaznamenány nižší detekční a kvantitativní limity látek než s W(VI), hodnoty charakterizující opakovatelnost metod jsou v obou případech přijatelné.

Z elektroforeogramů separace analytů (selektory Mo(VI) vs. W(VI)) je zřejmé, že v této práci bylo dosaženo lepší separační účinnosti a většího rozlišení mezi píky jednotlivých látek, avšak při separaci s Mo(VI) byly píky analytů štíhlejší a pozorujeme také vyšší citlivost detekce (což je dáno především větším vnitřním průměrem použité separační kapiláry).

#### **7.4.2 Porovnání CZE s HPLC**

K analýze polyhydroxysloučenin se používají velmi často chromatografické metody. V porovnání s HPLC se použitá metoda vyznačuje vyšší separační účinností a menší produkcí odpadu (spotřebovaného BGE), čímž se metoda CZE stává ekonomicky přijatelnější a enviromentálně šetrnější.

Na druhé straně vykazuje CZE ve srovnání s HPLC nižší citlivost a nižší reprodukovatelnost kvantitativních dat.

## **8. ZÁVĚR**

Z výsledků rigorózní práce vyplývají následující závěry:

Byla poprvé prokázána možnost využití wolframanu jako komplexotvorného selektoru při elektroforetické analýze vybraných flavonoidů a hydroxyfenylkarboxylových kyselin při prakticky neutrálním pH základního elektrolytu.

Za optimálních podmínek:

- HEPES ..... 50 mM
- wolframan sodný ..... 2 mM
- pH\* ..... 7,4 (TRIS)
- MeOH ..... 25 % (v/v)
- pracovní napětí ..... 30 kV
- hydrodynamické dávkování vzorku tlakem 50 mbar po dobu 6 sekund
- křemenná kapilára: průměr 75  $\mu\text{m}$ , celková délka 75 cm, efektivní délka 42 cm
- teplota 25 °C
- detekce při 275 nm

bylo dokonale separováno pět flavonoidů: apigenin, hyperosid, luteolin, kvercetin a rutin, dvě fenolické kyseliny (chlorogenová a p-kumarová) a vnitřní standard 1-nitroso-2-naftol.

Kalibrační závislosti analytů (závislost korigované plochy píku na koncentraci, závislost poměru korigované plochy píku analytu a korigované plochy píku vnitřního standardu na koncentraci) byly v rozmezí 25 – 125  $\mu\text{g/ml}$  lineární. Hodnoty korelačních koeficientů (0,9988 - 0,9995) byly vyšší při metodě bez vnitřního standardu než s vnitřním standardem (0,9923 -0,9967).

Limity detekce (LOD) se pohybovaly v rozmezí 0,8  $\mu\text{g/ml}$  (p-kumarová kyselina) až 2,6  $\mu\text{g/ml}$  (rutin) a limity kvantifikace (LOQ) mezi 2,8  $\mu\text{g/ml}$  (p-kumarová kyselina) až 8,5  $\mu\text{g/ml}$  (rutin).

Byla ověřena opakovatelnost migračních časů a ploch piků opakovaným dávkováním standardního roztoku o koncentraci analytů 50  $\mu\text{g/ml}$ . Relativní směrodatné odchylky migračních časů, resp. ploch piků se pohybovaly v rozmezí hodnot 0,4% (p-



kumarová kyselina) až 0,7% (kvercetin) resp. 1,6% (rutin) až 3,0% (chlorogenová kyselina).

## **9. LITERATURA**

1. Dolník, V., Úvod do kapilární elektroforézy, Ústav analytické chemie Akademie věd ČR v Brně a spol. Chromspec s. r. o., Brno, 1994
2. Majer, J. a kol., Analytická chémia, Osveta, Martin, 1989
3. Lunte, S. M., Radzik, D. M., Pharmaceutical and Biomedical applications of capillary electroforesis, Pergamon, Elsevier Science Ltd, Oxford, UK, 1996
4. Drbal, K., Křížek, M., Analytická chemie, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, 1989
5. Churáček J., Nové trendy v teorii a instrumentaci vybraných analytických metod, Academia, Praha, 1993
6. Český lékopis 2002, 1. díl, Grada Publishing a. s., Praha, 2002, s. 146 – 154, 191-200
7. Kaderová, L., Diplomová práce, Elektroforetické stanovení flavonoidů ve formě komplexů s molybdenanem, Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta, Hradec Králové 2005
8. Hubík J. a kol., Obecná farmakognosie II, Sekundární látky, Státní pedagogické nakladatelství, Praha, 1989
9. Jen-Fon Jen, Yean-Hwa Hsu, Maw-rong Lee, Separation of plant phenolic compounds by capillary zone electrophoresis, J. Chromatogr. A, 734, 1996, s. 375 – 380
10. Hiermann, A., Radl, B., Analysis of aromatic plant acids by capillary zone electrophoresis, J. Chromatogr. A, 803, 1998, s. 311 – 314
11. Sillen, G. L., Martell, A. E., Stability Constants of Metal – Ion Complexes, Special publication No. 17, The Chem. Soc., London, 1964
12. Sillen, G. L., Martell, A. E., Högfeltdt, E., Smith, R. M., Stability Constants of Metal – Ion Complexes, Supplement No. 1, Special publication 25, The Chem. Soc., London, 1970
13. Himeno, S., Kitazumi, I., Takamoto, M., Nakashima, Y., Simultaneous capillary electrophoretic determination of Sb(III) and Bi(III) based on the complex-formation with a W(VI)-P(V) reagent, Talanta, 61, 2003, s. 591-596
14. Kubáň, P., Kubáň, P., Kubáň, V., Simultaneous capillary electrophoretic separation of small anions and cations after complexation with ethylenediaminetetraacetic acid, J. Chromatogr. A, 836, 1999, s. 75-80
15. Soga, T., Inoue, Y., Ross, G. A., Analysis of halides, oxyhalides and metal oxoacids by capillary electrophoresis with suppressed electroosmotic flow, J. Chromatogr. A, 718, 1995, s. 421-428

16. Jimidar, M., Hartmann, C., Cousement, N., Massart, D. L., Determination of nitrate and nitrite in vegetables by capillary electrophoresis with indirect detection, *J. Chromatogr. A*, 706, 1995, 479-492
17. Marshall, P. A., Trenerry, V. C., The determination of nitrite and nitrate in food by capillary ion electrophoresis, *Food Chem.*, 57, 1996, s. 339-345
18. Sugio, T., Kuwano, H., Hamago, Y., Negishi, A., Maeda, T., Takeuchi, F., Kamimura, K., Existence of a tungsten-binding protein in *Acidithiobacillus ferrooxidans* AP19-3, *J. Biosci. Bioeng.*, 97, 2004, in *Anal. Abstr.*, AN: 5805D00019
19. Heider, J., MA, K., ADAMS, M.W.W., Purification, characterization, and metabolic function of tungsten-containing aldehyde ferredoxin oxidoreductase from the hyperthermophilic and proteolytic archaeon *Thermococcus* strain ES-1, *J. Bacteriol.*, 177, 1995, s. 4757-4764
20. White, H., Feicht, R., Huber, C., Lottspeich, F., Simon, H., Purification and some properties of the tungsten-containing carboxylic-acid reductase from *Clostridium-formoaceticum*, *Biol. Chem.*, 372, 1991, 999-1005
21. Rosner, B. M., Schink, B., Purification and characterization of acetylene hydratase of *Pelobacter-acetylenicus*, a tungsten iron-sulfur protein, *J. Bacteriol.*, 177, 1995, 5767-5772
22. de Bok, F. A. M., Hagedoorn, P. L., Silva, P. J., Hagen, W. R., Two W-containing formate dehydrogenases (CO<sub>2</sub>-reductases) involved in syntrophic propionate oxidation by *Syntrophobacter fumaroxidans*, *Eur. J. Biochem.*, 270, 2003, 2476-2485
23. Slobodan Jovanovic, V., Steenken, S., Tocis, M., Marjanovic, B., Flavonoids as antioxidants, *J. Am. Chem. Soc.*, 116, 1994, s. 4848
24. Altria, K. D., Frake, P., Gill, I., Hadget, T., Kelly, M. A., Rudd, D. R., Validated capillary electroforesis method of a range of basic drug, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 13, 1995, s. 951-957
25. Fonseca, F. N., Kato, M. J., Oliveira, L., Neto, N. P., Tavares, M. F. M., Critical assessment of electrolyte systems for the capillary electrophoresis analysis of phenolic compounds in herbal extract, *J. Microcolumn. Sep.*, 13, 2001, s. 227 –235
26. Urbánek, M., Blechtová, L., Pospíšilová, M., Polášek, M., On-line coupling of capillary isotachophoresis and capillary zone electrophoresis for the determination of flavonoids in methanolic extracts of *Hypericum perforatum* leaves or flowers, *J. Chromatogr. A*, 958, 2002, s. 261-271

27. Škeříková, V., Grynová, L., Jandera, P., Využití coulometrického detektoru pro analýzu přírodních antioxidantů, *Chem. Listy*, 98, 2004, s. 343 –348
28. Sladkovský, R., Urbánek, M., Solich, P., Off-line coupling of isotachophoresis and high performance liquid chromatography for determination of flavonoids in plant extract, *Chromatographia*, 58, 2003, s. 187 – 192
29. Deng, F.X., Zito, S.W., Development and validation of a gas chromatographic-mass spectrometric method for simultaneous identification and quantification of marker compounds including bilobalide, ginkgolides and flavonoids in *Ginkgo biloba* L. extract and pharmaceutical preparations, *J. chromatogr. A*, 986, 2003, s. 121-127
30. Xie, L.H., Wang, X., Basnet, P., Matsunaga, N., Evaluation of variation of acteoside and three major flavonoids in wild and cultivated *Scutellaria baicalensis* roots by micellar electrokinetic chromatography, *Chem. Pharm. Bull.*, 50, 2002, 896-899, in *Anal. Abstr.*, AN: 6512G10247
31. Chen, G., Zhang, H.W., Ye, J. N., Determination of rutin and quercetin in plants by capillary electrophoresis with electrochemical detection, *Anal. Chim.-Acta*, 432, 2000, s. 69-76
32. Holík, M., Validace analytických metod, Příručka, Katedra teoretické a fyzikální chemie, Přírodovědecká fakulta Masarykovy University, Brno, 2000
33. internetový zdroj: [faf.vfu.cz/html/txts/flavonoids.html](http://faf.vfu.cz/html/txts/flavonoids.html)
34. Grossman, P. D., Colburn, J. C., *Capillary electrophoresis*, Academic Press, Inc., London, 1992
35. Mcghe, T. K., Markham, K. R., Separation of flavonols by capillary electrophoresis, *Phytochem. Anal.* 5, 1994, s.121
36. Lemanska, K., Szymusiak, H., Tyrakowska, B., Zielinski, R., A. E. M. F. Soffers and I. M. C. M. Rietjens, The influence of pH on antioxidant properties and the mechanism of antioxidant action of hydroxyflavones, *Free Radical Biol. Med.*, 31, 2001. s. 869
37. Serjeant, E. P., Dempsey, B., *Ionisation Constants of Organic Acids in Aqueous Solution*, IUPAC Chemical Data Series No. 23, Pergamon Press, Oxford, 1979, s. 459