

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie

2006

**KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZA ANTHRACHINONOVÝCH
BARVIV, POUŽÍVANÝCH V UMĚLECKÝCH DÍLECH**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Prof. RNDr. Věra Pacáková, CSc.

Doc. RNDr. Zuzana Bosáková, CSc.

Vypracovala: Eva Svobodová

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně, pod vedením školitele Doc. RNDr. Zuzany Bosákové, CSc. (a školitele konsultanta Prof. RNDr. Věry Pacákové, CSc.), a že jsem všechny použité prameny řádně citovala.

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

V Praze dne...*26.4.2006*.....



.....
podpis

Na tomto místě bych chtěla poděkovat svým školitelkám Prof. RNDr. Věře Pacákové, CSc. a Doc. RNDr. Zuzaně Bosákové, CSc. za ochotu, cenné rady a odborné vedení. Děkuji také všem z katedry za vytvoření přátelského prostředí a pomoc. Rodičům a sourozencům děkuji za umožnění studia a psychickou i finanční podporu, bez níž by tato práce nikdy nevznikla.

Klíčová slova: CZE, MEKC

Předmětová hesla: optimalizace separace, mono-, di- a trihydroxyderiváty anthrachiononu, SDS, kvantifikace

OBSAH

1 ÚVOD	1
2 TEORETICKÁ ČÁST	3
2.1 ANALYZOVANÉ LÁTKY	3
2.1.1 <i>Monohydroxyderiváty anthrachinonu</i>	3
2.1.2 <i>Dihydroxyderiváty anthrachinonu</i>	4
2.1.3 <i>Trihydroxyderiváty anthrachinonu</i>	5
2.2 VLASTNOSTI LÁTEK.....	6
2.2.1 <i>Obecné vlastnosti analyzovaných látek</i>	6
2.2.2 <i>Rozpustnost látek</i> ¹³	7
2.2.3 <i>Spektrální vlastnosti analyzovaných látek</i> ^{2,9}	7
2.3 METODY POUŽÍVANÉ K ANALÝZE PŘÍRODNÍCH BARVIV	8
2.4 KAPILÁRNÍ ELEKTROMIGRAČNÍ METODY ^{2,29,30,31}	11
2.4.1 <i>Kapilární elektroforéza (CZE)</i>	12
2.4.2 <i>Micelární elektrokinetická kapilární chromatografie (MEKC)</i>	13
2.5 OPTIMALIZACE V CE.....	14
2.6 VYUŽITÍ METOD CE PRO STANOVENÍ HYDROXYDERIVÁTŮ ANTHRACHINONU	16
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	18
3.1 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE.....	18
3.2 POUŽITÉ PŘÍSTROJE	18
3.3 POSTUPY.....	20
3.3.1 <i>Promývání a vlastní měření</i>	20
3.3.2 <i>Příprava pufri</i>	20
3.3.3 <i>Příprava zásobních roztoků a jejich ředění</i>	20
4 VÝSLEDKY A DISKUSE	21
4.1 DETEKCE	21
4.1.1 <i>UV/VIS spektra</i>	21
4.2 OPTIMALIZACE SEPARAČNÍCH PODMÍNEK PRO CZE.....	24
4.2.1 <i>Volba pufri</i>	24
4.2.2 <i>Přídavek organického modifikátoru</i>	26
4.2.3 <i>Volba pH pufri</i>	29
4.2.4 <i>Identifikace ve směsi</i>	33
4.3 OPTIMALIZACE SEPARAČNÍCH PODMÍNEK PRO MEKC.....	35
4.3.1 <i>Detekce</i>	35
4.3.2 <i>Volba koncentrace micel</i>	35
4.3.3 <i>Identifikace ve směsi</i>	41
4.4 KVANTIFIKACE.....	42
5 ZÁVĚR	45
6 LITERATURA	47

SEZNAM ZKRATEK

K_a	disociační konstanta
T_t	teplota tání
T_v	teplota varu
λ	vlnová délka
λ_{\max}	vlnová délka odpovídající maximální absorbanci
ϵ_{\max}	molární absorpční koeficient při maximální absorbanci
Q_i	celkový náboj i-té látky
η	viskozita
r_i	poloměr i-té látky
v_{EOF}	rychlost elektroosmotického toku
ϵ_r	relativní permitivita
ζ	zeta-potenciál
E	intenzita elektrického pole
$\mu_{\text{ef},i}$	elektroforetická pohyblivost i-té látky
$\mu_{\text{eff}}^{\text{ps}}$	pseudoefektivní elektroforetická pohyblivost
$\mu_{\text{eff},i}$	efektivní elektroforetická pohyblivost i-té látky
μ_{eff}	elektroforetická pohyblivost zóny
μ_{A^-}	elektroforetická pohyblivost anionu
μ_i	pohyblivost i-té disociované formy
$t_{\text{mig},i}$	migrační čas i-té látky
t_{eof}	migrační čas elektroosmotického toku
L_D	délka kapiláry od vstupního konce k detektoru
L_C	celková délky kapiláry
U	napětí
c_0	celková koncentrace látky
c_i	koncentrace i-té disociované formy
w_{bi}	šířka píku při základně i-té látky
R	rozlišení
d_i či $i.d.$	vnitřní průměr
d_o	vnější průměr
A	absorbance

h	výška píku
S	plocha píku
k	směrnice přímky
q	úsek přímky
r^2	mocnina korelačního koeficientu
σ	průměrná výchylka šumu
LOD	mez detekce
LOQ	mez stanovitelnosti
UV/VIS	ultrafialová/viditelná oblast
IR	infračervená oblast
NMR- ¹³ C	jaderná magnetická rezonance ¹³ C
PC	papírová chromatografie
TLC	tenkovrstvá chromatografie
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
CE	kapilární elektroforéza (označení všech metod)
CZE	kapilární zónová elektroforéza
MEKC	micelární elektrokinetická kapilární chromatografie
CGE	kapilární gelová elektroforéza
CEC	elektrochromatografie v naplněných kapilárách
CIEF	kapilární izoelektrické fokusování
CITP	kapilární izotachoforéza
ESI-MS	hmotnostní spektrometrie s ionizací elektrosprejem
FAB-MS	hmotnostní spektrometrie s ionizací odstřelováním urychlenými atomy
1-HA	1-hydroxy-9,10-anthrachinon
2-HA	2-hydroxy-9,10-anthrachinon
1,2-DHA	1,2-dihydroxy-9,10-anthrachinon
1,4-DHA	1,4-dihydroxy-9,10-anthrachinon
1,5-DHA	1,5-dihydroxy-9,10-anthrachinon
1,8-DHA	1,8-dihydroxy-9,10-anthrachinon
1,2,4-THA	1,2,4-trihydroxy-9,10-anthrachinon
SDS	dodecylsírán sodný

1 ÚVOD

Deriváty antrachinonu jsou hlavní složkou přírodních barviv. Pro jejich barevnost a nerozpustnost ve vodě se využívají v uměleckých dílech, převážně textilu.

Jejich používání se datuje již od starověku, což potvrzuje řada archeologických nálezů. Tyto látky postupem času degradují a konzervování nebo obnova uměleckých děl si vyžaduje zásah restaurátora, pro nějž je důležité znát přesné složení použitých barev.

Přírodní anthrachinonová barviva jsou produkována jak živočichy, tak rostlinami, ze kterých se získávala. Extrakce z přírodních zdrojů se používala na různých kontinentech v určitých časových etapách, čehož může být využito k datování uměleckých děl. Podle klimatických podmínek, ve kterých se hmyz a rostliny vyskytují, obsahují rozmanité deriváty antrachinonů, které jsou pro ně typické. Toho se využívá při potvrzování pravosti a místa vzniku uměleckých děl.

Využití anthrachinonových barviv není omezeno pouze na umělecká díla, ale uplatňují se například i v potravinářském průmyslu pro barvení potravin (karmínová kyselina), dále pak v lékařství (léčba rakoviny, úplavice, průjmu, hypertenze, poruch ledvin) a v zemědělství pro moření obilovin (mají repelentní účinky vůči ptákům).^{1,2, 26-28}

V současné době se využívají synteticky vyrobená anthrachinonová barviva, jejichž příprava je méně náročná a i cenově výhodnější.

Vzhledem k rozsáhlému využití derivátů antrachinonu je důležitý vývoj analytických metod k jejich identifikaci a stanovení. Hydroxyderiváty antrachinonu mají podobnou strukturu, a proto je nutno použít dostatečně účinné separační metody. Kvůli nízké koncentraci těchto derivátů je vyžadována vysoká citlivost metod, které by umožnily stanovení již velmi malých množství vzorku rychle a levně. Za tímto účelem již byla vyvinuta metody vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) pracující jak v normálním, tak v reverzním separačním uspořádání. Tato metoda je dostatečně účinná, vyžaduje však použití speciálně upravených, drahých kolon, které mají dostatečně účinně deaktivovaný silikagelový nosič, eliminující sekundární silanofilní

interakce analytu s nosičem. Zároveň je snížen obsah některých kovů v matrici pod 5 %, což zabraňuje tvorbě komplexů s analytem.

Kapilární elektroforéza poskytuje obecně oproti HPLC vyšší účinnost, větší rychlost analýzy, malou spotřebu vzorku i rozpouštědel, čímž je také šetrnější pro životní prostředí. Z tohoto důvodu je cílem této práce ověřit využití metody kapilární elektroforézy pro separaci a identifikaci, popřípadě kvantifikaci vybraných anthrachinonových derivátů.

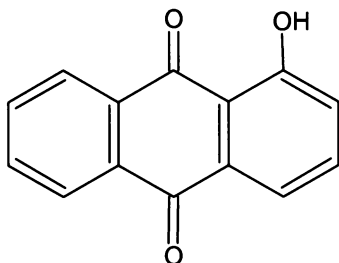
2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 ANALYZOVANÉ LÁTKY

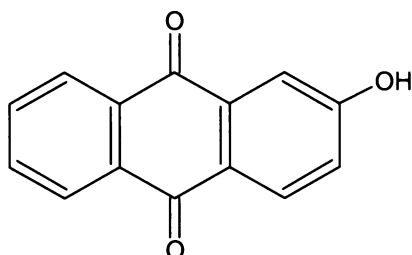
Všechny použité analyty jsou mono-, di- a trihydroxyderiváty anthrachinonu, které jsou složky přírodních barviv (žlutých, červených, fialových a hnědých odstínů) dříve získávaných z rostlin i živočichů. Pro barvení vláken se využívá jejich schopnosti tvořit nerozpustné komplexy s kovy, které se váží na vlákno ve formě oxidu.² V současné době jsou extrahovány z rostlin využívaných v čínské medicíně a studovány z hlediska jejich protinádorových a protimutagenních vlastností²⁴, tak i z hlediska studia intra- a intermolekulárních vodíkových vazeb^{6,7} souvisejících s jejich rozpustností. Lze je rozdělit jak podle přírodního zdroje výskytu jednotlivých derivátů, tak podle jejich strukturního uspořádání a počtu substituentů.

2.1.1 Monohydroxyderiváty anthrachinonu

1-hydroxy-9,10-anthrachinon



2-hydroxy-9,10-anthrachinon

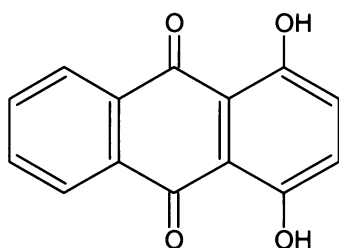


morinda officinalis

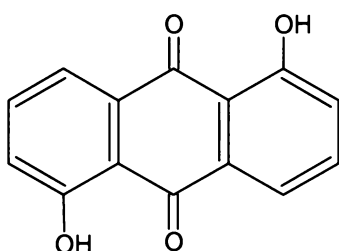
1-Hydroxy-9,10-anthrachinon se získává z kořenů rostliny *morinda officinalis*, která roste v tropickém pásu, převážně v Indii a Austrálii. Řadí se do rodu mořenovitých (*rubiceae*), které se již po tisíciletí používají k barvení vláken. 1-Hydroxy-9,10-anthrachinon je v současnosti využíván ke studiím vodíkových vazeb.^{6,7} 2-Hydroxy-9,10-anthrachinon se využívá jen jako barvivo.

2.1.2 Dihydroxyderiváty anthrachinonu

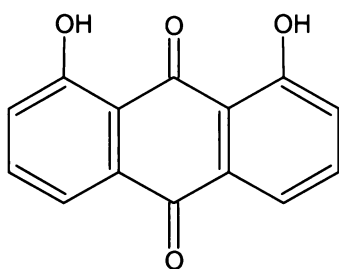
quinizarin = 1,4-dihydroxy-9,10-anthrachinon



anthrarufin = 1,5-dihydroxy-9,10-anthrachinon



danthron = 1,8-dihydroxy-9,10-anthrachinon

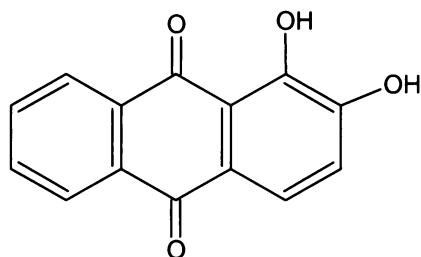


rubia cordifolia

Bylina *rubia cordifolia*, nazývaná též indická mořena, byla a je používána na Východě k barvení látek. *Rubia cordifolia* se také řadí do rodu *rubiceae*. Obsahuje 1,4-dihydroxy-9,10-anthrachinon, hnědofialový prášek, jehož roztok v acetonitrilu má

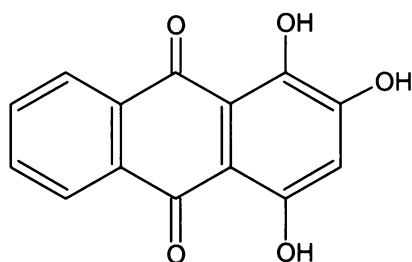
oranžovou barvu. Danthron a alizarin byly studovány jako inhibitory oxidace kyseliny linolové.¹²

alizarin = 1,2-dihydroxy-9,10-anthrachinon



2.1.3 Trihydroxyderiváty anthrachinonu

purpurin = 1,2,4-trihydroxy-9,10-anthrachinon



mořena barvířská
(*rubia tinctorum*)

Alizarin a purpurin jsou anthrachinonová barviva dříve získávaná z kořene mořeny barvířské (*rubia tinctorum*), patřící opět do rodu *rubiceae*. Roste v Jižní Americe a Evropě, používala se k barvení látek do druhé poloviny 19. století, kdy byl alizarin synteticky připraven.

2.2 VLASTNOSTI LÁTEK

2.2.1 Obecné vlastnosti analyzovaných látek

látka	triviální název	CAS	molekulový vzorec	barva krystalů
1-hydroxyanthrachinon	-	129-43-1	C ₁₄ H ₈ O ₃	žlutá
2-hydroxyanthrachinon	-	605-32-3	C ₁₄ H ₈ O ₃	žlutooranžová
1,2-dihydroxyanthrachinon	alizarin	72-48-0	C ₁₄ H ₈ O ₄	červená
1,4-dihydroxyanthrachinon	quinizarin	81-64-1	C ₁₄ H ₈ O ₄	hnědofialová
1,5-dihydroxyanthrachinon	anthrarufin	117-12-4	C ₁₄ H ₈ O ₄	zelenohnědá
1,8-dihydroxyanthrachinon	danthron	117-10-2	C ₁₄ H ₈ O ₄	žlutohnědá
1,2,4-trihydroxyanthrachinon	purpurin	81-54-9	C ₁₄ H ₈ O ₅	fialověčervená

CAS = registrační číslo Chemical Abstracts

Fyzikální vlastnosti analyzovaných látek a teploty tání jejich derivátů
využívaných k identifikaci analyzovaných látek¹³

látka	T _t °C	T _t derivátů °C	T _v * °C	disociační konstanta* pK _a
1-HA	200	acetát 176-179; methylether 170, (oxim) 198; fenylether 145, (oxim) 175; 1-naftylether 275-276; 2-naftylether 180	414,8 ± 14,0	7,15 ± 0,20
2-HA	305	acetát 159-160; benzoát 202-204; methylether 195-196; ethylether 135; fenylether 153	409,7 ± 14,0	7,40 ± 0,20
alizarin	289-290	acetát (di) 184; benzoát (di) 187; methylether (di) 215; ethylether (di) 162	430,0 ± 40,0	6,77 ± 0,20
quinizarin	201-202	acetát (di) 207-208; methylether (di) 143; ethylether (di) 176-177; fenylether (di) 165	465,3 ± 40,0	7,54 ± 0,20
anthrarufin	280	acetát (di) 244-245; methylether (di) 236; ethylether (mono) 163-164, (di) 178; fenylether (di) 215	452,7 ± 35,0	6,42 ± 0,20
danthron	193	acetát (di) 231-232; methylether (mono) 197-198, (di) 219; fenylether (di) 190	452,7 ± 35,0	6,26 ± 0,20
purpurin	259	acetát (tri) 193	488,0 ± 40,0	7,05 ± 0,20

* Hodnoty uvedené v Chemical Abstracts vypočtené softwarem Advanced Chemistry Development (ACD/Labs) Software V8.14 for Solaris (© 1994-2006 ACD/Labs).

2.2.2 Rozpustnost látek¹³

látka	rozpustnost v prostředí				
	voda	alkohol	ether	benzen	ostatní
1-HA	nerozpustný	rozpustný	velmi rozpustný	rozpustný	-
2-HA	nerozpustný	rozpustný	rozpustný	-	-
alizarin	málo rozpustný	velmi rozpustný	rozpustný	rozpustný	rozpustný v CS ₂
quinizarin	rozpustný za horka	rozpustný	rozpustný	rozpustný	-
anthrarufin	nerozpustný	málo rozpustný	rozpustný	rozpustný	rozpustný v CS ₂ a acetonu
danthron	nerozpustný	rozpustný	rozpustný	-	rozpustný v chloroformu
purpurin	málo rozpustný za horka	-	rozpustný	rozpustný	velmi rozpustný v acetonu za horka

2.2.3 Spektrální vlastnosti analyzovaných látek^{2,9}

látka	rozpouštědlo	λ_{\max} (nm) ($\log \epsilon_{\max}$)				
1-HA	methanol	402	-	-	-	-
2-HA	methanol	368	-	-	-	-
alizarin	ethanol	251 (4,5)	280 (4,3)	331 (3,55)	435 (3,79)	-
	1% NaOH	229 (4,25)	273,5 (4,52)	564 (4,22)	607,5 (4,15)	-
quinizarin	ethanol	225 (4,34)	249 (4,49)	279 (4,01)	325 (3,39)	450 (3,93)
	methanol	490	-	-	-	-
anthrarufin	ethanol	225 (4,64)	253 (4,31)	286 (4,02)	430 (4,04)	-
danthron	methanol	428	-	-	-	-
purpurin	methanol	255	290	485	518	-

Uváděné hodnoty vlnové délky byly experimentálně zjištěny pomocí molekulové absorpční spektrometrie v UV a některé deriváty ve VIS oblasti.

2.3 METODY POUŽÍVANÉ K ANALÝZE PŘÍRODNÍCH BARVIV

K identifikaci a stanovení přírodních barviv se využívají metody, jež je možno rozdělit do několika podskupin:

1. mikrochemické důkazy
2. elektrochemické metody
3. spektrální metody
4. chromatografické metody
5. elektromigrační metody

Mikrochemické důkazy²

Představují je selektivní reakce barviv s činidly. Byly využívány dříve k předběžnému rozlišení přírodních a syntetických barviv, či k identifikace konkrétních přírodních barviv. V současnosti jsou využívány k orientačním důkazům přírodních barviv.

Elektrochemické metody

K analýze některých přírodních anthrachinonových barviv bylo využito elektrochemických metod. K identifikaci alizarinu a purpurinu (červených barviv) a jejich příměsí v anorganické matrici byla využita voltametrie.³ Voltametriky byly stanoveny 1- a 2-hydroxy-9,10-anthrachinon i 1,4- a 1,8-dihydroxy-9,10-anthrachinon. Cyklickou voltametrií byla studována interakce mezi 1,4-dihydroxy-9,10-anthrachinonem a centrálním kovem v komplexech, které hydroxyderiváty anthrachinonu ochotně tvoří.⁴

Spektrální metody

Přírodní barviva jsou nejčastěji detekována pomocí některých spektrálních metod, jež využívají absorpce či emise kvant energie molekulami analyzovaných látek. Mezi tyto metody patří infračervená spektrometrie (dnes výhradně s Fourierovou transformací), Ramanova spektrometrie, rentgenová fluorescenční spektrometrie, absorpční fluorescenční spektrometrie a převážně molekulová absorpční spektrometrie v UV/VIS oblasti. Infračervená spektrometrie se využívá k analýzám povrchových vrstev uměleckých děl jak v transmisním, tak i v reflexním módu. Nevýhodou je

složitější úprava vzorku a nutnost použití hygroskopických bromidových květ.⁵ Infračervená a fluorescenční spektrometrie byly využity ke studii intramolekulárních a intermolekulárních vodíkových interakcí 1-hydroxy-9,10-anthrachinonu a jeho hydrátů.⁶ Intramolekulární vodíková vazba v molekule 1-hydroxy-9,10-anthrachinonu byla studována i Ramanovou spektrometrií pro vysvětlení přenosu protonu v závislosti na použitém rozpouštědle.⁷ Rentgenová fluorescenční spektrometrie se využívá obdobně jako infračervená spektrometrie, tedy při povrchové i hloubkové analýze povrchů uměleckých děl. V práci⁸ byla využita k identifikaci přírodních barviv a pigmentů obsažených ve freskách.

Nejpoužívanější metodou je pro svou vysokou citlivost, jednoduché uspořádání a především nízkou cenu molekulová absorpční spektrometrie v oblasti UV/VIS. Využívá se rozdílných absorpčních spekter jednotlivých hydroxyderivátů, které jsou způsobeny pozicí substituentů na vnějších kruzích anthrachinonu. Ze struktury přírodních barviv lze tedy odhadnout vlnové délky odpovídající maximální absorpci. Vzhled UV/VIS spekter ovlivňují i solvatační efekty, kterými jsou modifikace základní geometrie karbonylového barviva a tím i změna jeho excitace.⁹ Molekulové absorpční spektrometrie UV/VIS se využívá i k určení disociačních konstant. V práci¹⁰ je studována závislost disociační konstanty některých derivátů anthrachinonu na jejich struktuře ve směsi methanol – voda.

V současné době jsou IR, UV/VIS i NMR-¹³C spektra většiny hydroxyderivátů anthrachinonů v daných rozpouštědlech dostupná v knihovnách spekter.¹¹

Chromatografické metody

K identifikaci derivátů anthrachinonu je nejčastěji využívána rozdělovací chromatografie, která je založena na rozdělení analyzované látky mezi stacionární a mobilní fázi podle jejich polarit. Polární analyty se budou nejlépe rozpouštět v polárním rozpouštědle a naopak nepolární v nepolárním rozpouštědle. Volbou polarit stacionární a mobilní fáze ovlivníme pohyb analyzované látky v separačním prostoru, a tím i její eluční čas, který je pro danou látku při daných podmínkách specifický.

Používanými metodami separace a identifikace hydroxyderivátů anthrachinonu jsou papírová chromatografie (PC), tenkovrstvá chromatografie (TLC) a v současnosti nejčastěji používaná vysokoúčinná kapalinovou chromatografie (HPLC).

K analýze 1,4-dihydroxy-9,10-anthrachinonu byla využita papírová chromatografie (PC) s mobilní fází tvořenou 10% roztokem 1-bromnaftalenu v chloroformu + ledovou kyselinou octovou, dále 10% roztokem 1-bromnaftalenu + roztokem 50/50 (v/v) pyridin / voda.¹³ Modernější obdobou papírové chromatografie je tenkovrstvá chromatografie, která využívá stacionární fázi nanesenou na vhodné desce. V práci³ byla pro separaci 1,2-dihydroxy-9,10-anthrachinonu a 1,2,4-trihydroxy-9,10-anthrachinonu tenkovrstvou chromatografií po extrakci a hydrolyze z kořenů mořeny využita polyamidová deska K541V (Eastman) a roztok 90/10 (v/v) toluen / octová kyselina s UV detekcí či detekcí parami amoniaku. Papírová chromatografie i tenkovrstvá chromatografie je výhodná pro svou jednoduchost, nenáročnost, rychlost a pro nízké náklady.

Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC) je účinná metoda pro separaci hydroxyderivátů anthrachinonu jak v normálním, tak i v reverzním separačním uspořádání. Nevýhodou využití HPLC pro separaci anthrachinonových derivátů bývá značné rozmytí a nesymetrie píků, což je způsobeno tvorbou komplexů s již stopovým množstvím kovů obsažených ve stacionární fázi. Anthrachinonová a naftochinonová barviva používaná v historických textiliích byla identifikována a kvantifikována pomocí HPLC s reverzní fází na koloně RP-C_{18e} s diode-array detekcí při 270 nm. Alizarin a purpurin¹⁴ byly separovány izokratickou elucí s mobilní fází 75/25 (v/v) methanol / 0,2 mol · dm⁻³ roztok octanového pufru (pH 4,3) s dobrým rozlišením ($R = 1,5$) do 10 min.

V práci¹⁵ byla vyvinuta metoda pro separaci mutagenního lucidinu od ostatních anthrachinonových derivátů obsažených v mořeně barvířské (2-hydroxy-9,10-anthrachinon, alizarin, purpurin, xanthopurpurin a další) izokratickou elucí na koloně Purospher RP-C_{18e} s mobilní fází tvořenou směsí 45/55 (v/v) acetonitril / 0,2 mol · dm⁻³ octanového pufru (pH 4,2) a UV detekcí při 254 nm. Všechny deriváty eluovaly do 32 min, byly separovány až na základní linii vyjma koeluce 2-hydroxy-9,10-anthrachinonu a 1,2-dihydroxy-9,10-anthrachinonu. Použitím stacionární fáze Purospher RP-C_{18e}, která se vyznačuje deaktivovaným povrchem silikagelového nosiče spolu se sníženým obsahem kovů (zejména Fe, Al pod 5 %) vedlo k potlačení sekundárních interakcí analytu, obzvláště purpurinu, se stacionární fází.

2.4 KAPILÁRNÍ ELEKTROMIGRAČNÍ METODY^{2,29,30,31}

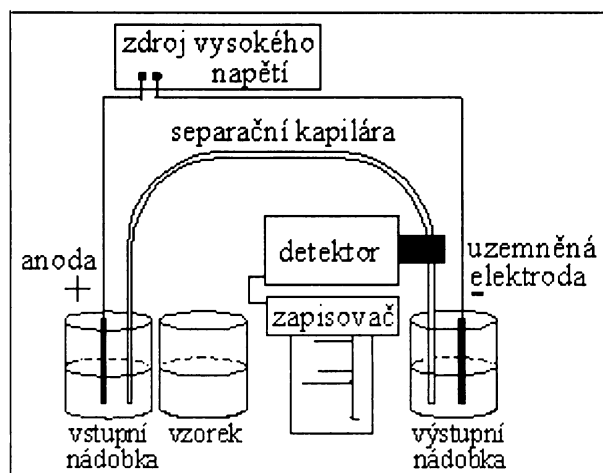
Kapilární elektromigrační metody se používají pro velmi dobrou účinnost separace, velkou rychlost analýzy a malou spotřebu vzorku a činidel. Nevýhodou těchto technik je menší reprodukovatelnost a nižší citlivost metody.

Elektromigrační metody jsou založeny na pohybu nabitých molekul v elektrickém poli. Pohyb molekul je závislý na velikosti náboje a na velikosti molekuly. Pro analýzy anthrachinonových barviv se využívají kapilární zónová elektroforéza (CZE) a micelární kapilární elektroforéza (MEKC).

Do kapilárních elektromigračních separačních metod řadíme:

- 1) Kapilární zónová elektroforéza (CZE)
- 2) Kapilární gelová elektroforéza (CGE)
- 3) Micelární elektrokinetická kapilární chromatografie (MEKC)
- 4) Elektrochromatografie v naplněných kapilárách (CEC)
- 5) Kapilární izoelektrické fokusování (CIEF)
- 6) Kapilární izotachoforéza (CITP)

Pro všechny elektromigrační metody je společné přístrojové uspořádání uvedené na obrázku 1.



Obr. 1 Schéma přístroje pro kapilární elektroforézu.³⁰

V této práci byly k separaci analyzovaných látek použity techniky kapilární zónové elektroforézy a kapilární micelární elektroforézy, o nichž bude dále pojednáno.

2.4.1 Kapilární elektroforéza (CZE)

Kapilární elektroforéza je vhodná pro separaci a stanovení kladně i záporně nabitých molekul v homogenním elektrickém poli současně během jednoho experimentu. Dělení nabitých látek je založeno na rozdílných elektroforetických pohyblivostech (mobilitách), které jsou závislé na molekulové hmotnosti, tvaru molekuly a jejím náboji podle vztahu:

$$\mu_{ef,i} = \frac{Q_i}{6\pi \cdot \eta \cdot r_i}, \quad (1)$$

kde $\mu_{ef,i}$ je elektroforetická pohyblivost (rozměr $\text{m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$), Q_i je celkový náboj iontu (rozměr C), η je dynamická viskozita okolního prostředí (rozměr $\text{kg} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) a r_i je poloměr iontu (rozměr m).

Analyzované látky se pohybují v elektrolytu nejen vlastní pohyblivostí, ale jsou unášeny směrem k detektoru elektroosmotickým tokem. Jeho velikost je dána vlastnostmi nosného elektrolytu a použité kapiláry. Nejčastěji používaná křemenná kapilára je na vnitřním povrchu tvořena siloxanovými (Si-O-Si) a silanolovými (Si-OH) skupinami. Silanolové skupiny disociují v závislosti na pH nosného elektrolytu. Povrch kapiláry je pak tvořen negativními nabitými ionty, které společně s protony, uvolněnými do nosného elektrolytu, vytváří u vnitřní stěny kapiláry elektrickou dvojvrstvu. Po vložení vysokého napětí mezi elektrody na koncích kapiláry dochází k pohybu solvatovaných kationtů nosného elektrolytu směrem ke katodě, čímž vzniká elektroosmotický tok, jehož rychlost udává vztah:

$$v_{EOF} = -\frac{\epsilon_r \cdot \zeta}{\eta} \cdot E, \quad (2)$$

kde v_{EOF} je rychlost elektroosmotického toku (rozměr $\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$), ε_r je relativní permitivita roztoku, ζ je zeta-potenciál (rozměr V), η viskozita roztoku (rozměr $\text{kg} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) a E intenzita elektrického pole (rozměr $\text{V} \cdot \text{m}^{-1}$).

Celková rychlost zóny je vektorový součet rychlosti elektroosmotického toku a elektroforetické rychlosti analyzované látky. Je-li rychlost elektroosmotického toku vyšší než elektroforetické rychlosti analytů, lze pak všechny analyty detekovat v pořadí kladně nabitě látky, směs neutrálních látek a záporně nabitě látky.

Elektroforetická pohyblivost je však závislá na experimentálních podmínkách (teplota, viskozita, iontová síla, pH separačního pufru), a proto bývá v praxi měřena tzv. efektivní elektroforetická pohyblivost μ_{eff} :

$$\mu_{\text{eff},i} = \left(\frac{1}{t_{\text{mig},i}} - \frac{1}{t_{\text{eof}}} \right) \cdot \frac{L_D \cdot L_C}{U}, \quad (3)$$

kde μ_{eff} je efektivní elektroforetická pohyblivost (rozměr $\text{m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$), t_{eof} a $t_{\text{mig},i}$ jsou migrační časy neutrálního značkovače elektroosmotického toku a i -té nabitě látky (rozměr min), L_D je délka kapiláry od vstupního konce k detektoru (rozměr m), L_C je celková délka kapiláry a U je vložené napětí mezi elektrody (rozměr V).

2.4.2 Micelární elektrokinetická kapilární chromatografie (MEKC)

Tato technika slouží především k separaci neutrálních (hydrofobních) molekul na základě jejich rozdílných rozdělovacích koeficientů mezi vodnou a pseudo-stacionární fází, která je tvořena micelami. Micely vytvářejí povrchově aktivní látky (kationogenní, anionogenní, neionogenní tenzidy, deriváty cholových kyselin apod.) ve vyšší koncentraci než je kritická micelární koncentrace. Nenabitě micely jsou unášeny elektroosmotickým tokem k detektoru.

Příkladem kationogenního tenzidu je hexadecyltrimethylamoniumbromid (CTAB), neionogenním polyoxyethylen-23-laurylether (Brij 35) a nejpoužívanějším anionogenním tenzidem je dodecylsírán sodný (SDS), který tvoří záporně nabitě micely a má tudíž vlastní elektroforetickou pohyblivost. Záporně nabitě micely migrují jako poslední. Separované látky se rozdělují mezi micely a nosný elektrolyt podle své

polarity. Analyt, který je úplně rozpustný v micelách vytváří horní mez elučního okna, naopak dolní mez je určena neinteragujícími látkami, které migrují s elektroosmotickým tokem.

Pohyb analyzovaných látek je popsán pseudoefektivní pohyblivostí, která se vypočte podle vztahu (3).

2.5 OPTIMALIZACE V CE

Pro určení vhodných podmínek separace analytů v CE mohou být optimalizovány následující parametry: typ a koncentrace nosného elektrolytu, pH nosného elektrolytu, druh a koncentrace organického modifikátoru a velikost napětí. Separaci lze dále modifikovat přidavkem různých druhů tenzidů či iontů kovů vhodných pro tvorbu chelátů.

Vliv koncentrace nosného elektrolytu

Složení a koncentrace nosného elektrolytu určuje vodivost, iontovou sílu i procházející proud kapilárou. Elektrický výkon se mění v Jouleovo teplo, jež je odváděno stěnou kapiláry. Tím se kapilára ohřívá, tvoří se teplotní gradient a mění se rychlostní profil, což je nežádoucí. Pro analýzy by měl být použit pufr s co nejnižší koncentrací a minimální molární vodivostí.

Vliv pH nosného elektrolytu

Velikost elektroosmotického toku i elektroforetická pohyblivost analytů, zvláště slabých kyselin a bází, je ovlivněna kyselostí či bazicitou nosného elektrolytu. V tlumivých roztocích jsou zastoupeny obě formy (konjugovaný anion i kation). Závislost efektivní elektroforetické pohyblivosti analytu na pH nosného elektrolytu (4) popisuje sigmoidní křivka s inflexním bodem v $\text{pH} = \text{p}K_a$, kde K_a je disociační konstanta jednosytné slabé kyseliny a μ_{A^-} je iontová pohyblivost příslušného anionu disociovaného analytu.

$$\mu_{eff,i} = \mu_{A^-} \cdot \frac{1}{1 + 10^{(\text{p}K_a - \text{pH})}} \quad (4)$$

Během analýzy dochází k ustavení rychlých acidobazických rovnováh mezi jednotlivými formami látky a látka pak migruje v podobě jedné zóny a není tak možné jednotlivé formy látky rozdělit. Efektivní pohyblivost μ_{eff} zóny analytu je dána vztahem:

$$\mu_{eff} = \frac{1}{c_o} \cdot \sum_{i=1}^n c_i \cdot \mu_i, \quad (5)$$

kde c_o je celková koncentrace analyzované látky, c_i jsou koncentrace jednotlivých disociovaných forem analyzované látky a μ_i jsou jejich pohyblivosti.

Vliv koncentrace organického modifikátoru

Pro lepší rozpustnost hydrofobnějších nabitých látek během separaci se přidává do nosného elektrolytu organický modifikátor, většinou methanol nebo ethanol. S rostoucím přídavkem modifikátoru (asi do 40 %) do nosného elektrolytu klesá rychlost elektro-osmotického toku, a tím se prodlužuje doba analýzy. Proto jsou používány přídavky organických modifikátorů do 20 %.

Vliv vkládaného napětí

S rostoucím napětím se zkracuje doba analýzy díky změně pohyblivostí, ale také se zvyšuje procházející proud a množství uvolněného Jouleova tepla.

Separace analyzovaných látek se udává hodnotou rozlišení R dvou píků, které je dáno vztahem:

$$R = \frac{2 \cdot (t_{mig,2} - t_{mig,1})}{w_{b2} - w_{b1}}, \quad (6)$$

kde $t_{mig,1}$ a $t_{mig,2}$ jsou migrační časy sousedících píků (rozměr min), w_{b1} a w_{b2} jsou šířky píků při základně (rozměr min).

2.6 VYUŽITÍ METOD CE PRO STANOVENÍ HYDROXYDERIVÁTŮ ANTHRACHINONU

Pro identifikaci anthrachinonových barviv (alizarin a purpurin) z evropského typu mořeny barvířské byla použita kapilární zónová elektroforéza spojená s diode-array detekcí v UV/VIS oblasti (260 a 270 nm) na nepokryté křemenné kapiláře (Agilent Technologies, Německo) s elektrolytem $5 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ vodným roztokem fosforečnanu sodného (pH 8,5). Jako detekční cela umístěná „on-line“ v kapiláře byla použita tzv. „bubble“ cela, prodlužující optickou dráhu paprsku, což zvyšuje citlivost detekce. Kromě diode-array detekce byla pro detekci použita i hmotnostní spektrometrie s ionizací elektrosprejem (ESI-MS), jako elektrolyt byl použit $0,02 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ vodný roztok uhličitanu amonného (pH 9,0). Lepší separace alizarinu a purpurinu bylo dosaženo při UV detekci.¹⁶ Alizarin a purpurin byly separovány kapilární zónovou elektroforézou i v elektrolytu 10/90 (v/v) acetonitril / $0,03 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ vodný roztok tetraboritanu sodného (pH 10,56) v nepokryté křemenné kapiláře (75 μm i.d.) (Polymicro Technologies, USA) s UV detekcí při 260 nm. Autoři studovali vliv koncentrace borátového pufru na migrační časy anthrachinonů v rozsahu 0,01 - 0,05 $\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a vliv pH elektrolytu na separaci anthrachinonů v rozsahu pH 9,23 - 12,05. Zjištěné výsledky autoři srovnali s metodou HPLC s revezní fází, která poskytovala lepší separaci jednotlivých derivátů anthrachinonu, ale při dvojnásobné době analýzy.¹⁷

V práci¹⁸ byla sledována biodegradace sulfonovaných anthrachinonů (znečišťujících vodní toky) rostlinami a vliv vnitřního průměru kapiláry (75 a 100 μm i.d.) na separaci těchto derivátů anthrachinonu v nepokryté křemenné kapiláře (Beckman, USA). Výborné separaci analytů bylo dosaženo v kapiláře o vnitřním průměru 75 μm a v $0,02 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ vodném roztoku tetraboritanu sodného (přirozené pH~9,3). Ze závislosti elektroforetické mobility derivátů anthrachinonu na pH pufru (dvou parametrické nelineární regrese pro physcion, chrysophanol, aleo-emodin; čtyř parametrické nelineární regrese pro rhein, emodin) a na koncentraci organického modifikátoru – acetonitrilu, byla sledována změna disociačních konstant těchto derivátů metodou kapilární zónové elektroforézy s křemennou nepokrytou kapilárou (75 μm i.d.), $24 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ fosfátovým pufrům o různém pH (iontová síla od 0,03 do $0,11 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) a s UV detekcí při 254 nm.¹⁹

Methoxyderiváty anthrachinonu a glukosidy některých hydroxy- a methoxyderivátů anthrachinonu byly separovány využitím CZE s α - či β -cyklodextriny ($0,005 - 4 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) v $0,03 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ borátovém pufru (pH = 10,0 a 10,5) a v $0,06 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ 1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborátovém pufru (pH 10,0) s UV detekcí.^{20,21,22} Využitím micelární kapilární elektroforézy k separaci derivátů anthrachinonu z rostlin *Cassia siamea* a *Rhubarb* v prostředí dodecylsírany sodného a sodné soli kyseliny cholové v přítomnosti β - a γ -cyklodextrinu se zabývají práce.^{23,24,25}

Anthrachinonové složky čínských rostlin *Rhubarb* a *Rhei Rhizoma* byly stanoveny micelární kapilární elektroforézou v elektrolytu sestávajícího se z 25/75 (v/v) acetonitril/($0,01 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ SDS; $12,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ fosfátový a $15 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ borátový pufr) o pH 9,34 na křemenné nepokryté kapiláře ($75 \mu\text{m}$ i.d.) a UV detekcí (254 nm).²⁶ Hydrofobní vlastnosti těchto složek byly studovány jak kapilární zónovou elektroforézou, tak i micelární kapilární elektroforézou s SDS a směsí fosfátového a borátového pufru s acetonitrem a ethanolem.²⁷ Přírodní pigmenty používané pro potravinářské barvení byly stanoveny kombinacemi metod: HPLC s FAB-MS (ionizace odstřelováním rychlými atomy), CZE s použitím $0,3 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ roztoku borátového pufru (pH 8,0 a 9,0), MEKC s $0,02$ a $0,03 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ SDS ve směsi 20/80 (v/v) acetonitril / $0,05 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ fosfátový pufr (pH 7,0), dále pak MEKC ve spojení s ESI-MS (ionizace elektrosprejem).²⁸

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE

acetonitril R CHROMASOLV[®] pro kapalinovou chromatografii (Sigma-Aldrich, Německo)

thiomočovina (p.a., Lachema, ČR)

sudan III (~90%, Sigma-Aldrich, Německo)

dodecyl síran sodný SDS pro kapilární elektroforézu ($\geq 98.5\%$ (GC), Sigma-Aldrich, Německo)

tetraboritan disodný (dekahydrát, p.a., Lachema, ČR)

hydroxid sodný (p.a., Lach-Ner, ČR)

1-hydroxy-9,10-anthrachinon

2-hydroxy-9,10-anthrachinon

1,2-dihydroxy-9,10-anthrachinon, alizarin

1,4-dihydroxy-9,10-anthrachinon, chinizarin ($\geq 95,0\%$ (HPLC), Fluka, Německo)

1,5-dihydroxy-9,10-anthrachinon, anthrarufin (technický, $\geq 85\%$ (HPLC), Fluka, Německo)

1,8-dihydroxy-9,10-anthrachinon, danthron (technický, $\geq 95,0\%$ (HPLC), Fluka, Německo)

1,2,4-trihydroxy-9,10-anthrachinon, purpurin (standard, Fluka, Německo)

1-, 2- a 1,2- (di)hydroxyderiváty anthrachinonu byly izolovány v Mikrobiologickém ústavu AV ČR s čistotou vyšší než 98 %.

K přípravě všech vodných roztoků a k promývání byla použita destilovaná voda.

3.2 POUŽITÉ PŘÍSTROJE

Složky základního elektrolytu byly váženy na předvážkách TUNING-FORK VIBRATION GC-600C (SHINKO, Japonsko) a analyty pro přípravu zásobních roztoků byly odvažovány na analytických vahách Precisa 262 SMA-FR (Precisa Instrument AG – Dietikon, Švýcarsko).

K měření pH pufru byl použit konduktometr/pH metr JENWAY 4330 Conductivity & pH Meter (JENWAY Ltd., Velká Británie) s elektrodou JENWAY (skleněná).

Připravené pufrы byly přečištěny filtrací přes nylonové filtry NYLON MEMBRANE FILTERS (o průměru 47 mm) s velikostí pórů 0,45 μm (Whatman International Ltd., Velká Británie).

Měřené roztoky analytů byly před analýzou sonifikovány po dobu 8 min na ultrazvukové lázni ULTRASONIC LC 30 H (Elma[®], Německo).

Pro přípravu směsí analytů byla použita injekční stříkačka Microliter[™] Syringes HAMILTON 702NR (Hamilton Bonaduz AG, Švýcarsko) o objemu 25 μl .

UV spektra jednotlivých roztoků analytů byla měřena na UV/VIS spektrofotometru PYE UNICAM PU 8800 UV/VIS spectrophotometer (PHILIPS, Velká Británie) s 1 mm křemennými kyvetami a na spektrofotometru HP 8453 (HEWLETT PACKARD, USA) s 5 mm křemennými kyvetami.

Pro analýzy byla využita kapilární elektroforéza PrinCE 250 autosampler (PrinCE Technologies B.V., Nizozemsko) a pro detekci byl použit UV/VIS spektrofotometrický detektor Spectra 100 (Therma Separation Products, USA). Ke sběru a vyhodnocení dat byly využity programy 4880 Chromatography Data Handling System (ATI Unicam, Velká Británie), CSW32 v.1.4.11.66 Chromatography Station for Windows (DataApex Ltd., ČR) a Origin[®] 6.1 v6.1052 (B232) (OriginLab Corporation, USA).

Měření byla prováděna na nemodifikované křemenné kapiláře firmy CACO s.r.o. (Slovensko) o parametrech: vnitřní průměr $d_i = 75 \mu\text{m}$, vnější průměr $d_o = 380 \mu\text{m}$, délka kapiláry k detekčnímu okénku $L_D = 55,8 \text{ cm}$ a celková délka kapiláry $L_C = 69,8 \text{ cm}$. Dále byla vyzkoušena nemodifikovaná křemenná kapilára firmy Composite Metal Services Ltd. (Velká Británie) o parametrech $d_i = 75 \mu\text{m}$, $d_o = 375 \mu\text{m}$, $L_D = 55,8 \text{ cm}$ a $L_C = 69,8 \text{ cm}$.

3.3 POSTUPY

3.3.1 Promývání a vlastní měření

Kapilára byla každý den před prvním měřením promývána destilovanou vodou po dobu 5 min, dále 10 min $1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ NaOH, opět 5 min destilovanou vodou a nakonec použitým základním elektrolytem po dobu 10 min. Poté následovalo vlastní měření, sestávající se z promývání základním elektrolytem při tlaku $5 \cdot 10^4$ Pa po dobu 3 min, dále z dávkování vzorku při tlacích $(5 - 30) \cdot 10^2$ Pa po dobu 5 – 30 s a pak následovala samotná analýza při vloženém napětí 20 či 30 kV.

Mezi jednotlivými měřeními byla kapilára opět promývána v následujícím pořadí: 10 min $1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ NaOH, 2 min destilovanou vodou a na závěr 8 min základním elektrolytem. Použitý tlak ve všech promývacích krocích byl 10^5 Pa.

3.3.2 Příprava pufru

Jako základní elektrolyt byly připraveny $0,01 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a $0,02 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ roztoky dekahydrátu tetraboritanu disodného (borátový pufr) rozpuštěním 0,19 g či 0,38 g pevného dekahydrátu tetraboritanu disodného v destilované vodě do objemu 100 ml. pH takto připraveného roztoku bylo upraveno přidávkem $1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ roztoku hydroxidu sodného na hodnotu 9,0 – 11,0. V případě micelární elektroforézy byla v připraveném roztoku borátového pufru o daném pH rozpuštěna navážka SDS (0,28 g, 0,43 g a 0,57 g) v objemu 100 ml do výsledných koncentrací (1,0; 1,5 a 2,0) $\cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$.

3.3.3 Příprava zásobních roztoků a jejich ředění

Zásobní roztoky analytů byly připraveny rozpuštěním 0,24 mg pevného vzorku 1-hydroxy-anthrachinonu, 0,09 mg 2-hydroxyanthrachinonu, 0,45 mg 1,2-dihydroxy-anthrachinonu, 0,27 mg 1,4-dihydroxyanthrachinonu, 0,20 mg 1,5-dihydroxy-anthrachinonu, 0,18 mg 1,8-dihydroxyanthrachinonu a 0,13 mg 1,2,4-trihydroxy-anthrachinonu v 1,5 ml acetonitrilu. Pro vlastní měření byly zásobní roztoky ředěny

základním elektrolytem v poměru 33/67 (v/v) zásobní roztok analytu / základní elektrolyt.

K určení elektroosmotického toku byl použit $6 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ vodný roztok thiomčoviny, která je neutrální, a proto migruje s elektroosmotickým tokem.

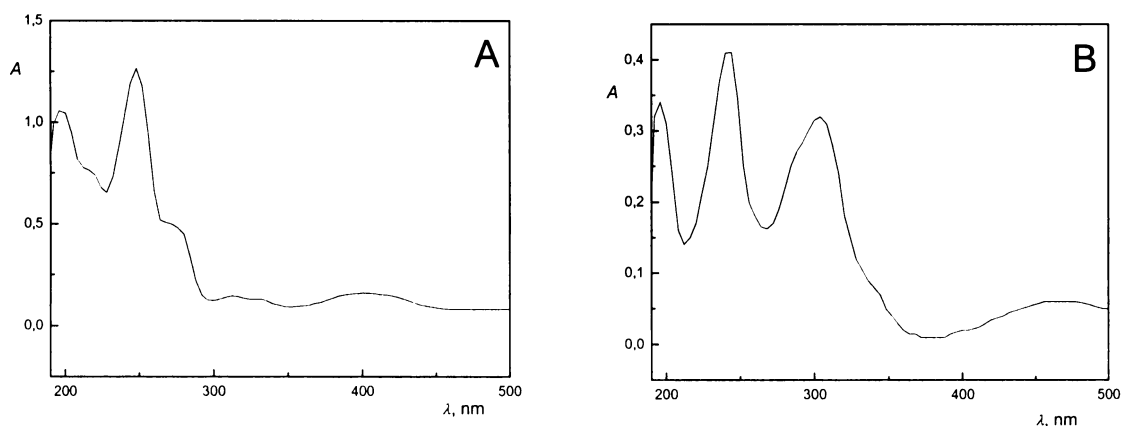
Pro určení elučního okna v micelární kapilární elektroforéze byl použit $10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ zásobní roztok sudanu III v acetonitrilu.

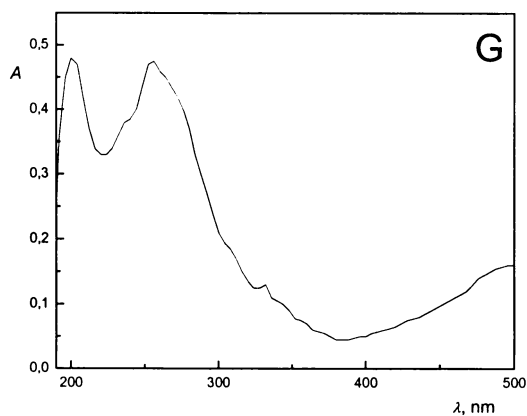
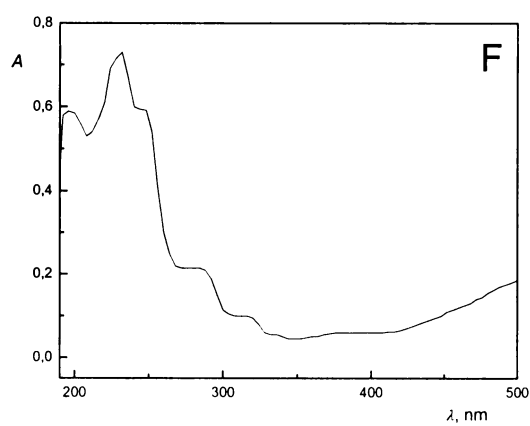
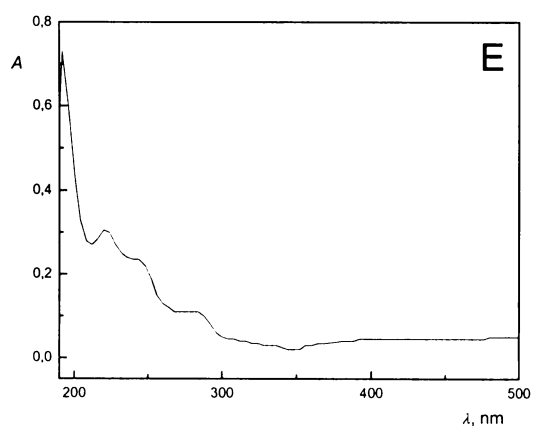
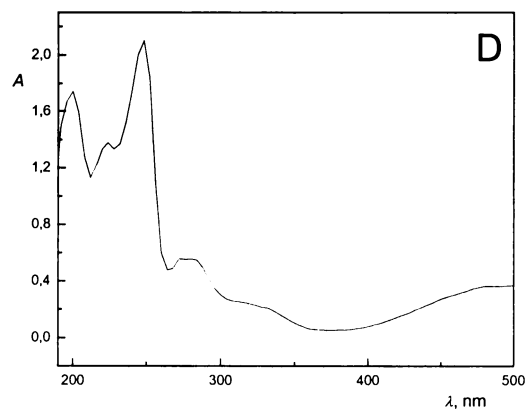
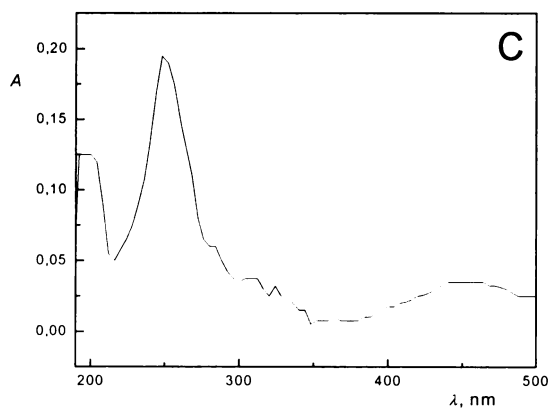
4 VÝSLEDKY A DISKUSE

4.1 DETEKCE

4.1.1 UV/VIS spektra

Pro výběr optimální vlnové délky k dosažení nejvyšší citlivosti detekce analytů byla proměřena UV/VIS spektra jednotlivých derivátů anthrachinonu. Pro měření absorpčních spekter byly zásobní roztoky analytů ředěny směsí tvořenou 33/67 (v/v) acetonitril/ $0,02 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ vodný roztok borátového pufru (pH 9,5) na koncentrace řádově $10^{-5} - 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Ředící roztok byl použit jako slepý vzorek pro určení absorpčního pozadí. Absorpční spektra jednotlivých analytů byla proměřena v rozsahu vlnových délek 190 - 500 nm v milimetrových křemenných kyvetách. Záznamy měření jsou uvedeny na obrázku 2.





Obr. 2 Absorpční spektrum analytů: **A** $1,1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ 1-hydroxyanthrachinon, **B** $2,7 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ 2-hydroxyanthrachinon, **C** $1,3 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ 1,2-dihydroxyanthrachinon, **D** $2,4 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ 1,4-dihydroxyanthrachinon, **E** $5,6 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ 1,5-dihydroxyanthrachinon, **F** $5,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ 1,8-dihydroxyanthrachinon, **G** $3,4 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ 1,2,4-trihydroxyanthrachinon.

Většina spekter anthrachinonových derivátů, kromě 1,5- a 1,8-dihydroxyanthrachinonu, vykazují lokální absorpční maximum v okolí 250 nm. Bohužel jediné absorpční maximum 1,5-dihydroxyanthrachinonu při 190 nm je z praktického hlediska špatně využitelné vzhledem k tomu, že při těchto vlnových délkách absorbují i ostatní složky základního elektrolytu. To je příčinou nižší citlivost detekce 1,5-dihydroxyanthrachinonu.

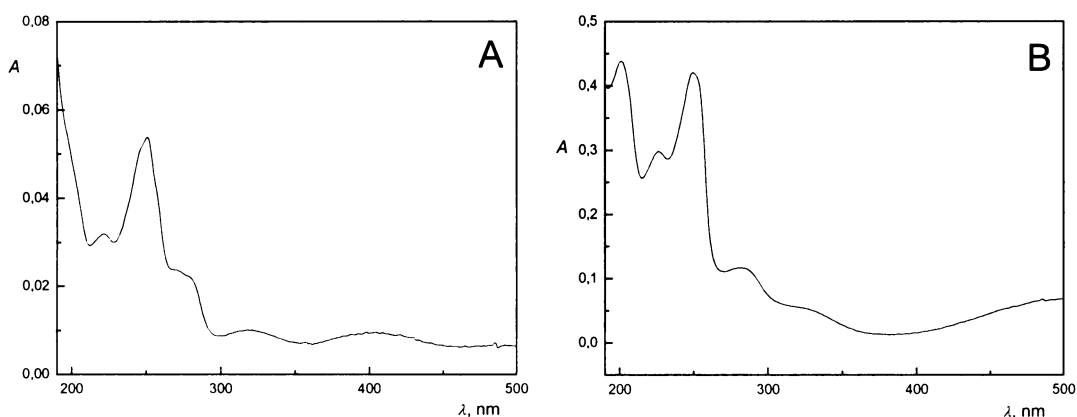
Jednotlivé analyty byly detekovány při vlnových délkách odpovídající lokálnímu maximu, která jsou v tabulce 1 vyznačena tučným písmem.

Směsné vzorky byly měřeny při $\lambda = 250$ nm.

Tab. 1 Vlnové délky lokálních absorpčních maxim jednotlivých analytů; tučně jsou vyznačeny použité vlnové délky pro vlastní měření.

analyt	λ (nm)		
1-hydroxyanthrachinon	400	248	198
2-hydroxyanthrachinon	304	242	196
1,2-dihydroxyanthrachinon	250	–	–
1,4-dihydroxyanthrachinon	280	248	224
1,5-dihydroxyanthrachinon	222	192	–
1,8-dihydroxyanthrachinon	224	194	–
1,2,4-trihydroxyanthrachinon	254	200	–

U zásobních roztoků byla ověřována jejich stálost po 30-ti dnech opětovným měřením jejich absorpčních UV/VIS spekter za stejných podmínek. Zjišťovalo se tak, zda zásobní roztoky analytů stáním degradují. Lokální absorpční maxima jednotlivých analytů se shodují s naměřenými spektry, tedy k degradaci zásobních roztoků nedochází. Pro ilustraci jsou na obrázku 3 uvedena UV/VIS spektra 1-hydroxyanthrachinonu (A) a 1,4-dihydroxyanthrachinonu (B) měřená po šesti měsících, která jsou ve srovnání se spektry měřenými na počátku (Obr.2A, D) shodná .



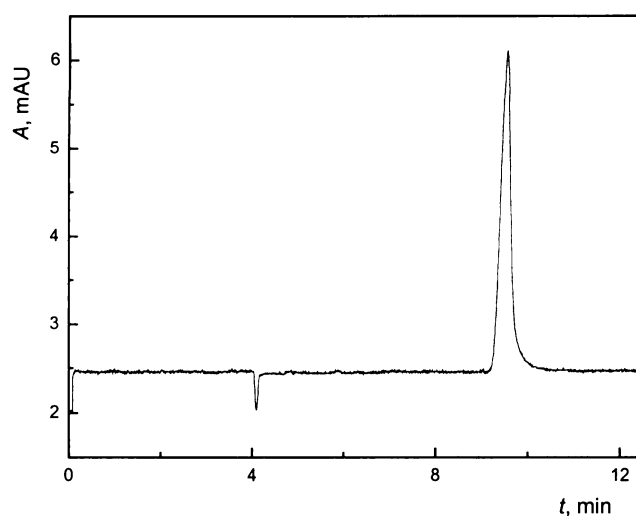
Obr. 3 Absorpční spektrum analytů po šesti měsících: **A** $1,1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ 1-hydroxyanthrachinon, **B** $2,4 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ 1,4-dihydroxyanthrachinon.

4.2 OPTIMALIZACE SEPARAČNÍCH PODMÍNEK PRO CZE

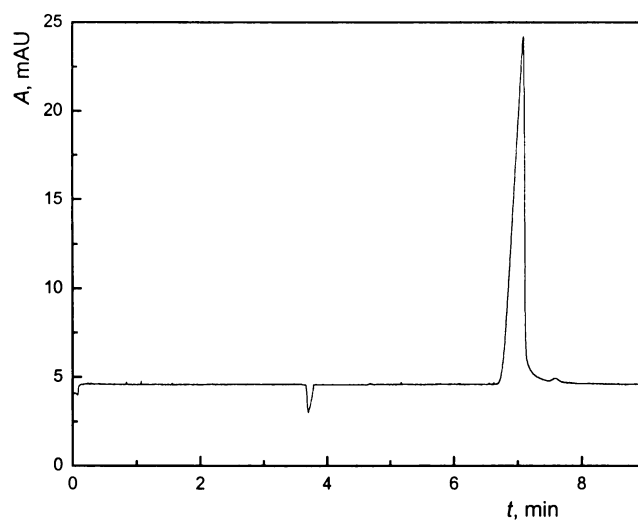
4.2.1 Volba pufru

Vzhledem k chemické struktuře analytů byl pro jejich elektroforetické měření zvolen borátový pufr o pH 9,5. Při tomto alkalickém pH by měly mít separované látky anionogenní povahu, tedy měly by migrovat až za značkovačem elektroosmotického toku. Koncentrace borátového pufru byla volena tak, aby migrační čas elektroosmotického toku byl co nejkratší, ale také aby kapilárou procházel nižší stabilní proud. Při vyšších proudech procházejících kapilárou roste Jouleovo teplo, tím se kapilára zahřívá a v důsledku toho se mění viskozita roztoku.

V roztoku $0,02 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ borátového pufru o pH 9,5 vykazují anionogenní charakter pouze 2-hydroxyanthrachinon a 1,2-dihydroxyanthrachinon, což se projevuje pozdějšími migračními časy, než je migrace elektroosmotického toku. Elektroferogramy těchto dvou látek jsou uvedeny na obrázcích 4 a 5. V elektroferogramech záporný pík představuje elektroosmotický tok a kladný pík odezvu proměřovaného analytu. Díky vysoké odezvě obou analytů i tvaru píku bylo sníženo dávkování analytu tlakem z $3 \cdot 10^3 \text{ Pa}$ po dobu 30 s na tlak $2 \cdot 10^3 \text{ Pa}$ po dobu 10 s.



Obr. 4 Elektroferogram $1,3 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ roztoku 2-hydroxyanthrachinonu; $0,02 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ vodný roztok borátového pufru (pH 9,5), dávkování $3 \cdot 10^3 \text{ Pa}$ po 30 s, napětí 30 kV, $\lambda = 242 \text{ nm}$, $T = 31 \text{ }^\circ\text{C}$, proud $35 \text{ } \mu\text{A}$.



Obr. 5 Elektroferogram $6,4 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ roztoku 1,2-dihydroxyanthrachinonu; $0,02 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ vodný roztok borátového pufru (pH 9,5), dávkování $3 \cdot 10^3 \text{ Pa}$ po 30 s, napětí 30 kV, $\lambda = 250 \text{ nm}$, $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$, proud $33 \text{ } \mu\text{A}$.

Ostatní analyty migrují s elektroosmotickým tokem, což dokumentuje nulová hodnota jejich efektivní pohyblivosti uvedená v tabulce 2. Disociaci těchto látek brání silné intramolekulární vodíkové můstky mezi chinoidním kyslíkem a sousedící hydroxylovou skupinou. Tato vazba je prokázána například teplotou tání těchto derivátů anthrachinonů¹³, spektrální analýzou^{6,7} apod.

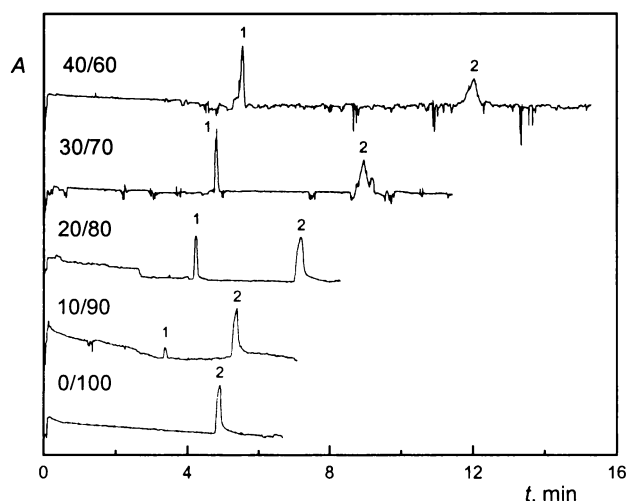
Tab. 2 Efektivní pohyblivosti studovaných analytů v $0,02 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ vodném roztoku borátovém pufru (pH 9,5), napětí 30 kV, kapilára firmy CACO $L_D = 55,8 \text{ cm}$, $L_C = 69,8 \text{ cm}$, $d_i = 75 \text{ } \mu\text{m}$, $d_o = 380 \text{ } \mu\text{m}$.

látko	μ_{eff} $10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$
1-HA	0,00
2-HA	-3,03
1,2-DHA	-2,79
1,4-DHA	0,00
1,2,4-THA	0,00
1,5-DHA	-
1,8-DHA	-

Na elektroferogramech naměřených v základním elektrolytu tvořeném vodným roztokem borátového pufru byla pozorována nestabilní linie základního elektrolytu a vysoká hodnota šumu. Také separační kapilára byla často poloprůchodná či dokonce neprůchodná, což bylo pravděpodobně způsobeno vysrážením analytů ve vodném prostředí uvnitř kapiláry.

4.2.2 Přídavek organického modifikátoru

Vzhledem k tomu, že analyty jsou dobře rozpustné v acetonitrilu (viz zásobní roztoky), byly vyzkoušeny přídavky acetonitrilu do základního elektrolytu. Jako základní elektrolyt byl použit $0,02 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ vodný roztok borátového pufru o pH 9,5 v kombinaci s přídavky organického modifikátoru – acetonitrilu. Tímto způsobem byla připravena následující série základních elektrolytů s různým obsahem acetonitrilu: 0/100; 10/90; 20/80; 30/70 a 40/60 (v/v) acetonitril / $0,02 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ vodný roztok borátového pufru (pH 9,5). Na obrázku 6 je znázorněn posun elektroosmotického toku a změna tvaru píku v závislosti na objemovém přídavku organického modifikátoru. Elektroosmotický tok se s přídavkem acetonitrilu snižuje díky nižší iontové síle, což je patrné z posunu píku označeného číslem 1 (vodný roztok thiomocoviny). Pík, označen číslem 2, představuje $6,4 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ roztok 1,2-dihydroxyanthrachiononu.



Obr. 6 Posun elektroosmotického toku a změna symetrie píky v závislosti na použitém elektrolytu 0/100; 10/90; 20/80; 30/70 a 40/60 (v/v) acetonitril / 0,02 mol · dm⁻³ vodný roztok borátového pufru (pH 9,5). (1) vodný roztok thiomocoviny, (2) roztok 6,4 · 10⁻⁴ mol · dm⁻³ 1,2-dihydroxyanthrachinonu, dávkování 3 · 10³ Pa po 30 s, napětí 30 kV, λ = 250 nm, T = 28 - 29 °C, proud 30 μA.

S rostoucím přidavkem acetonitrilu nedošlo ke zlepšení základní linie, snížila se pohyblivost elektroosmotického toku a doba analýzy se prodloužila. Látky, které bez přidavku organického modifikátoru migrovaly současně s elektroosmotickým tokem, zůstaly opět nedisociované, jen se v přidavku acetonitrilu lépe rozpustily. V elektrolytech s vyšším obsahem acetonitrilu (30 a 40 obj. %) vykazovaly píky značnou nesymetrii. Přídavek acetonitrilu také nezabránil srážení analytů uvnitř kapiláry. Nemodifikovaná kapilára firmy CACO s.r.o. byla kvůli své neprůchodnosti nahrazena nemodifikovanou kapilárou firmy Composite Metal Services Ltd. Především měření byla zopakována pro 0,01 mol · dm⁻³ vodný roztok borátového pufru (pH 9,5) z důvodů vysokých proudů, které zatěžovaly nejen kapiláru, ale i přístroj. Kapilára je chlazená pouze vzduchem a teplota přístroje je tedy závislá i na teplotě vzduchu v laboratoři. Ke zvýšení proudu také přispívá vyšší koncentrace pufru, zvyšující vodivost elektrolytu.

Dle výsledků dosažených pro 1,2-dihydroxyanthrachinon byla provedena měření s přidavkem acetonitrilu pouze 0/100; 20/80 a 40/60 (v/v) acetonitril / 0,01 mol · dm⁻³ vodný roztok borátového pufru (pH 9,5). V tabulce 3 jsou shrnuty výsledky efektivních pohyblivostí analytů pro elektrolyty 0/100 a 20/80 (v/v).

Tab. 3 Efektivní pohyblivosti analyzovaných látek v elektrolytech 0/100 a 20/80 (v/v) acetonitril / 0,01 mol · dm⁻³ vodný roztok borátového pufru (pH 9,5), detekce při jednotlivých lokálních maximech, napětí 30 kV, kapilára firmy Composite Metal Services o $L_D = 55,8$ cm, $L_C = 69,8$ cm, $d_i = 75$ μm, $d_o = 375$ μm.

elektrolyt (v/v)	látka	μ_{eff} $10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$
0/100	1-HA	0,00
	2-HA	-2,78
	1,2-DHA	-2,99
	1,4-DHA	0,00
	1,2,4-THA	-
	1,5-DHA	-
	1,8-DHA	-
20/80	1-HA	0,00
	2-HA	-2,34
	1,2-DHA	-2,32
	1,4-DHA	0,00
	1,2,4-THA	-
	1,5-DHA	-
	1,8-DHA	-

Elektrolyt 40/60 (v/v) acetonitril / 0,01 mol · dm⁻³ vodný roztok borátového pufru (pH 9,5) vykazoval stejné nedostatky, jako v měřeních pro 0,02 mol · dm⁻³ vodný roztok borátového pufru (pH 9,5). Píky byly nesymetrické a doba analýzy byla velmi dlouhá.

Srážení analytů v kapiláře se také nezabránilo. Vylepšení přinesl až nový program promývání³², který mezi jednotlivými měřeními zahrnuje krok promývání 1 mol · dm⁻³ vodným roztokem NaOH.

Efektivní pohyblivosti analytů nejsou příliš ovlivněny použitím kapilár stejných parametrů od různých výrobců. Kapilára firmy Composite Metal Services Ltd. se ukázala být nevhodnou pro tato měření, neboť při jejím delším používání se stala povrchově vodivou. Během analýzy se proud v kapiláře nekontrolovatelně zvyšoval a nebylo možné zachovat stejné podmínky měření. Z těchto důvodů byla pro další analýzy použita pouze nemodifikovaná kapilára firmy CACO s.r.o..

Z uvedených výsledků je patrné, že koncentrace základního elektrolytu významně neovlivní efektivní pohyblivosti analytů, ale podílí se na snížení iontové síly

roztoku, a tím i na snížení procházejícího proudu. Přídavek acetonitrilu do základního elektrolytu nezlepšil separaci jednotlivých analytů, stabilita základní linie při vyšších přídavcích acetonitrilu se naopak zhoršila a obdobně i tvar píku. Proto pro další měření byl použit jako základní elektrolyt $0,01 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ vodný roztok borátového pufru bez přídavku organického modifikátoru.

4.2.3 Volba pH pufru

Jak již bylo uvedeno, při $\text{pH} = 9,5$ vykazují anionogenní charakter pouze dva analyty, a to 2-hydroxyanthrachinon a 1,2-dihydroxyanthrachinon, ostatní migrují s elektro-osmotickým tokem. V alkaličtějším prostředí by měly disociovat i hydroxylové skupiny nacházející se v bezprostřední blízkosti chinoidních kyslíků, a tím by tyto analyty měly migrovat s delšími migračními časy, než je migrační čas elektro-osmotického toku. Zvýšení pH prostředí s sebou nese i zvýšení iontové síly, což opět zvyšuje procházející proud. Z tohoto důvodu bylo separační napětí sníženo na 20 kV, při němž se proud udržel na stabilní hodnotě a rychlost elektroosmotického toku byla ještě dostačující. V tabulce 4 jsou uvedeny efektivní pohyblivosti analytů v $0,01 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ vodném roztoku borátového pufru o $\text{pH} 10,1$. Analyty byly detekovány při stejné vlnové délce $\lambda = 250 \text{ nm}$, jelikož většina z nich vykazuje v jejím okolí lokální absorpční maximum a je vhodná pro detekci směsi analytů.

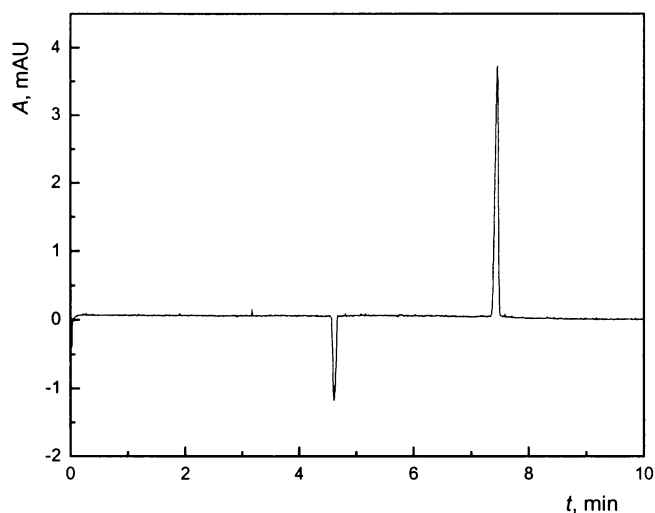
Tab. 4 Efektivní pohyblivosti analyzovaných látek v $0,01 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ vodném roztoku borátového pufru ($\text{pH} 10,1$), detekce při jednotlivých lokálních maximech, napětí 20 kV, kapilára firmy CACO o $L_D = 55,8 \text{ cm}$, $L_C = 69,8 \text{ cm}$, $d_i = 75 \text{ } \mu\text{m}$, $d_o = 375 \text{ } \mu\text{m}$.

látka	μ_{eff} $10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$
1-HA	-2,76
2-HA	-1,76
1,2-DHA	-1,72
1,4-DHA	-2,55
1,2,4-THA	-3,03
1,5-DHA	-
1,8-DHA *	-3,42

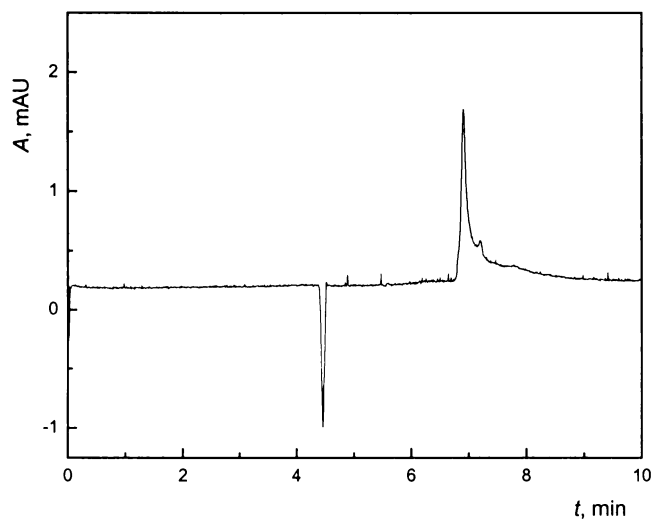
* 1,8-dihydroxyanthrachinon byl ředěn v $\text{pH} 11,0$

Většina analytů již migruje za elektroosmotickým tokem, a má tak anionogenní charakter. Při tomto pH se 1,8-dihydroxyanthrachinon stále choval jako neutrální látka.

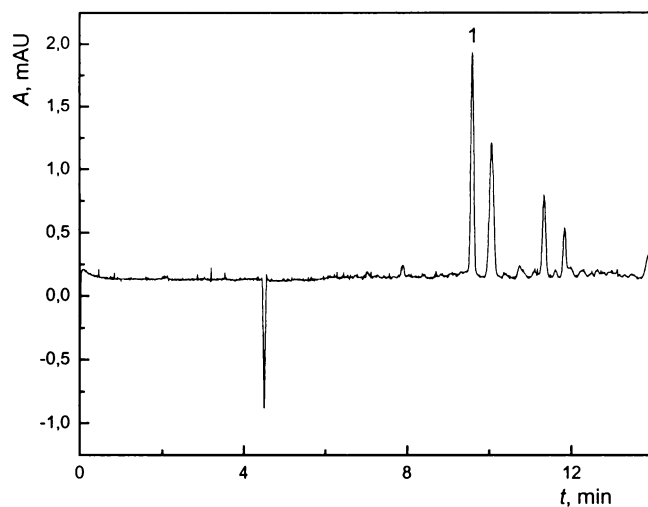
Intramolekulární vodíková vazba mezi hydroxylovými skupinami a chinoidním kyslíkem je velmi silná a stabilní až do velmi alkalických roztoků (pH ~ 11). 1,5-dihydroxyanthrachinon se nepodařilo detekovat ani při tomto vyšším pH základního elektrolytu. Elektroferogramy vybraných analytů jsou uvedeny na obrázcích 7 - 11.



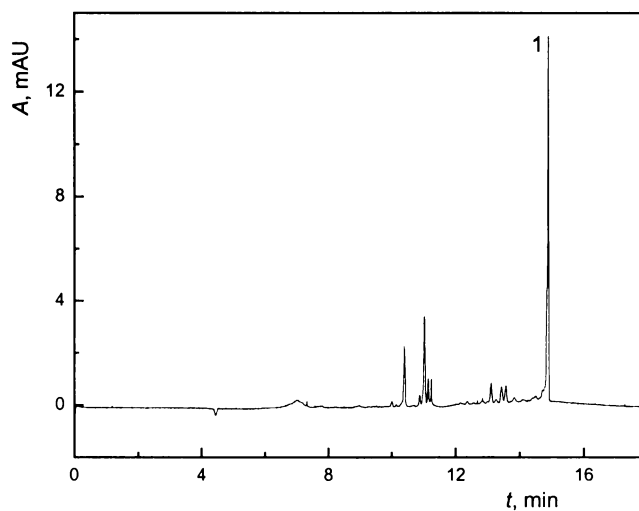
Obr. 7 Elektroferogram $1,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ roztoku 2-hydroxyanthrachinonu; $0,01 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ vodný roztok borátového pufru (pH 10,1), dávkování $2 \cdot 10^3 \text{ Pa}$ po 10 s, napětí 20 kV, $\lambda = 250 \text{ nm}$, $T = 28 \text{ }^\circ\text{C}$, proud 35 - 36 μA .



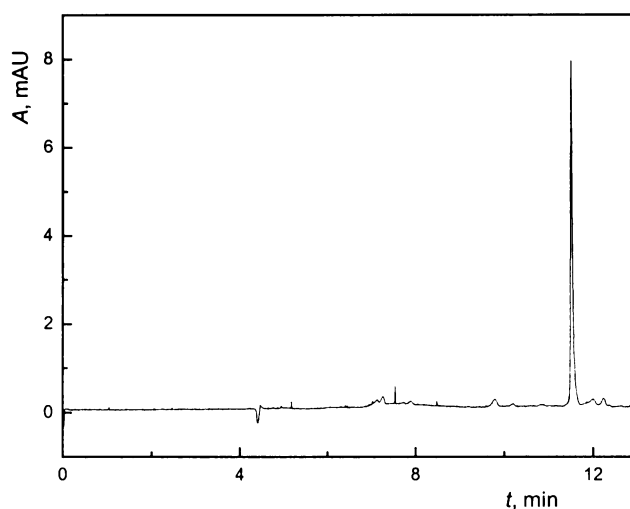
Obr. 8 Elektroferogram $2,7 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ roztoku 1,2-dihydroxyanthrachinonu; $0,01 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ vodný roztok borátového pufru (pH 10,1), dávkování $2 \cdot 10^3 \text{ Pa}$ po 10 s, napětí 20 kV, $\lambda = 250 \text{ nm}$, $T = 29 \text{ }^\circ\text{C}$, proud 35 μA .



Obr. 9 Elektroferogram $2,7 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ roztoku 1,4-dihydroxyanthrachinonu; $0,01 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ vodný roztok borátového pufru (pH 10,1), dávkování $2 \cdot 10^3 \text{ Pa}$ po 10 s, napětí 20 kV, $\lambda = 250 \text{ nm}$, $T = 29 \text{ }^\circ\text{C}$, proud $35 \text{ } \mu\text{A}$. Podle píku 1 byla počítána efektivní pohyblivost.



Obr. 10 Elektroferogram $2,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ roztoku 1,8-dihydroxyanthrachinonu; $0,01 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ vodný roztok borátového pufru (pH 10,1), dávkování $2 \cdot 10^3 \text{ Pa}$ po 10 s, napětí 20 kV, $\lambda = 250 \text{ nm}$, $T = 28 \text{ }^\circ\text{C}$, proud $37 \text{ } \mu\text{A}$. Podle píku 1 byla počítána efektivní pohyblivost.



Obr. 11 Elektroferogram $1,7 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ roztoku 1,2,4-trihydroxyanthrachinonu; $0,01 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ vodný roztok borátového pufru (pH 10,1), dávkování $2 \cdot 10^3 \text{ Pa}$ po 10 s, napětí 20 kV, $\lambda = 250 \text{ nm}$, $T = 29 \text{ }^\circ\text{C}$, proud 35 - 37 μA .

Z elektroferogramů 9 a 10 je patrné, že tyto analyty v sobě obsahují příměsi, což prokazuje přítomnost dalších píků. To ztížilo identifikaci těchto analytů ve směsi. V případě 1,4-dihydroxyanthrachinonu jsou jednotlivé píky separovány až na základní linii, čehož se může využít v praxi k určování čistoty této látky. Pro určení efektivních pohyblivostí byly použity píky, jejichž plochy byly největší.

Pro výběr základního elektrolytu bylo použito několik modifikací borátového pufru, které jsou shrnuty v tabulce 5. Z uvedených výsledků byl vybrán $0,01 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ vodný roztok borátového pufru o pH 10,1 bez přídavku organického modifikátoru jako vhodný základní elektrolyt pro identifikaci analytů ve směsi.

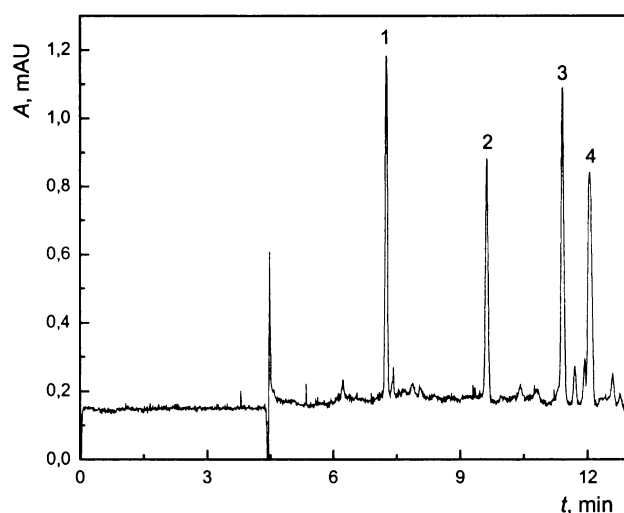
Tab. 5 Nosné elektrolyty borátového pufru testované pro separaci analytů.

c $10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$	pH	přídavek CH_3CN %
20	9,5	0, 10, 20, 30, 40
10	9,5	0, 20, 40
10	10,1	0

Jako nejvhodnější podmínky z hlediska měření směsí byl zvolen: základní elektrolyt 0/100 (v/v) acetonitril / 0,01 mol · dm⁻³ vodný roztok tetraboritanu sodného o pH 10,1; dávkování tlakem 2 · 10³ Pa po dobu 10 s; napětí 20 kV; detekce při vlnové délce 250 nm. Teplota kapiláry při měření bohužel nemohla být optimalizována kvůli nedostačujícímu chlazení, což znemožnilo kapiláru temperovat na jednu určitou teplotu. S teplotou okolí v laboratoři a počtem měření, při kterém se přístroj zahřívá, teplota stále rostla v intervalu od 25 °C do 31 °C.

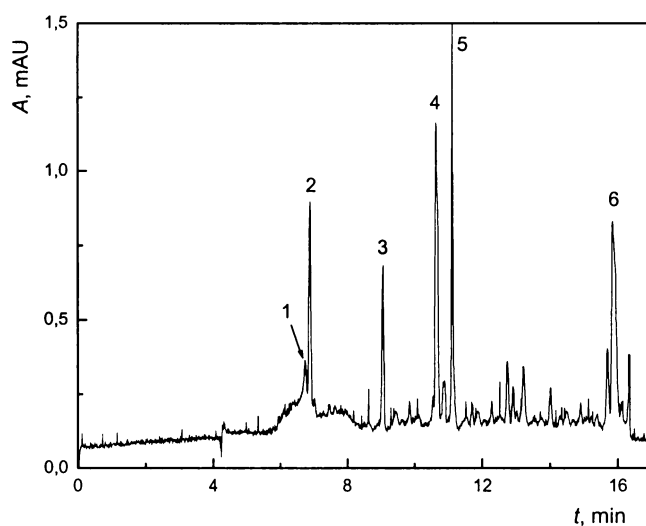
4.2.4 Identifikace ve směsi

V základním elektrolytu o složení 0,01 mol · dm⁻³ vodný roztok tetraboritanu sodného o pH 10,1 byly změřeny elektroferogramy směsných vzorků. Nejprve byla připravena směs čtyř analytů, jejichž efektivní pohyblivosti se nejvíce lišily. Směs byla tvořena 20 µl zásobního roztoku 1,5 · 10⁻⁴ mol · dm⁻³ 1-hydroxyanthrachinonu, 20 µl 1,5 · 10⁻⁴ mol · dm⁻³ 2-hydroxyanthrachinonu, 20 µl 1,2 · 10⁻³ mol · dm⁻³ 1,4-dihydroxyanthrachinonu a 30 µl 1,7 · 10⁻⁴ mol · dm⁻³ 1,2,4-trihydroxyanthrachinonu. Na obrázku 12 je ukázán elektroferogram této směsi. Majoritní píky jednotlivých analytů byly identifikovány podle efektivních pohyblivostí uvedených v tabulce 4.



Obr. 12 Směs čtyř analytů: (1) roztok 2-hydroxyanthrachinonu, (2) roztok 1,4-dihydroxyanthrachinonu, (3) roztok 1-hydroxyanthrachinonu a (4) roztok 1,2,4-trihydroxyanthrachinonu; 0,01 mol · dm⁻³ vodný roztok borátového pufru (pH 10,1), dávkování 2 · 10³ Pa po 10 s, napětí 20 kV, $\lambda = 250$ nm, $T = 29$ °C, proud 35 - 36 µA.

Jednotlivé analyty byly separovány s rozlišením $R_{1,2} = 19,9$; $R_{2,3} = 13,7$ a $R_{3,4} = 3,7$. K této směsi byly přidány přídavky 30 μl zásobního roztoku $2,7 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ 1,2-dihydroxyanthrachinonu a 17 μl roztoku $2,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ 1,8-dihydroxy-anthrachinonu. Záznam elektroferogramu směsi sestávající se ze šesti analytů je uveden na obrázku 13. Píky odpovídající 1,2- (1) a 1,8-dihydroxy-anthrachinonu (6) byly přiřazeny opět podle vypočtených efektivních pohyblivostí z měření optimalizace podmínek. Ostatní píky představují nečistoty obsažené v zásobním roztoku 1,4-dihydroxyanthrachinonu a 1,8-dihydroxyanthrachinonu. Elektroferogram se tak stává hůře čitelný a nepřehledný.



Obr. 13 Směs šesti analytů: (1) roztok 1,2-dihydroxyanthrachinonu, (2) roztok 2-hydroxyanthrachinonu, (3) roztok 1,4-dihydroxyanthrachinonu, (4) roztok 1-hydroxyanthrachinonu, (5) roztok 1,2,4-trihydroxyanthrachinonu a (6) roztok 1,8-dihydroxyanthrachinonu; $0,01 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ vodný roztok borátového pufru (pH 10,1), dávkování $2 \cdot 10^3 \text{ Pa}$ po 10 s, napětí 20 kV, $\lambda = 250 \text{ nm}$, $T = 29 \text{ }^\circ\text{C}$, proud 35 - 36 μA .

Z obrázku 13 je zřejmé, že 1,2-dihydroxyanthrachinon (1) a 2-hydroxyanthrachinon (2) migrují přibližně stejnou rychlostí. Obdobná pohyblivost 2-hydroxyanthrachinonu a 1,2-dihydroxyanthrachinonu může být způsobena vznikem vodíkové vazby mezi hydroxylovou skupinou v poloze 1 a chinoidním kyslíkem v případě 1,2-dihydroxy derivátů, takže hydroxylová skupina, ovlivňující elektroforetickou pohyblivost, se v obou analytech nachází v pozici 2. Analyty byly separovány s rozlišením $R_{1,2} = 2,9$; $R_{2,3} = 17,3$; $R_{3,4} = 11,1$; $R_{4,5} = 4,0$ a $R_{5,6} = 31,2$.

Z výše uvedených důvodů byla vyzkoušena metoda micelární kapilární elektroforézy, která není založena na pohyblivosti iontů analytů, nýbrž využívá neutrální charakter analytů.

Z dosažených výsledků je zřejmé, že navržený separační systém kapilární elektroforézy poskytuje dostatečně dobré rozlišení mezi jednotlivými deriváty anthrachiononu (s výjimkou 2-hydroxyanthrachiononu a 1,2-dihydroxyanthrachiononu), bohužel však dostatečně nezajišťuje úplnou rozpustnost všech studovaných analytů, projevující se zejména nestabilní linií základního elektrolytu a nesymetrií píků.

4.3 OPTIMALIZACE SEPARAČNÍCH PODMÍNEK PRO MEKC

4.3.1 Detekce

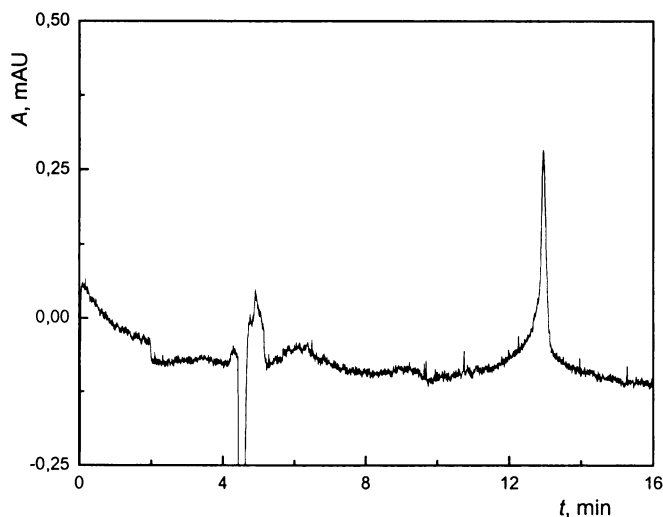
Jako základní elektrolyt pro micelární systém byl zvolen opět borátový pufr s přídavkem anionogenního tenzidu SDS (dodecyl síran sodný). Studované analyty byly detekovány při vlnové délce 250 nm. V oblasti nižších vlnových délek absorbuje samotný tenzid, čím se zvýší absorbance základního elektrolytu. Tím byla snížena citlivost detekce pro roztoky 1,5-dihydroxyanthrachiononu a 1,8-dihydroxyanthrachiononu, které vykazují lokální maxima při nižších vlnových délkách.

4.3.2 Volba koncentrace micel

Neutrálního charakteru analytů v mírně alkalickém prostředí lze využít pro jejich separaci v micelární fázi, která naopak v tomto prostředí vykazuje anionogenní charakter. Během analýzy dochází k rozdělení analytu mezi vodnou a micelární fázi. Jako vodnou fázi jsme použili $0,01 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ vodný roztok tetraboritanu sodného o pH 9,7. Při tomto pH většina analytů má převážně neutrální charakter, a tím se více rozpouští v micelární fázi, kterou zde tvořil vodný roztok SDS. V závislosti na kritické micelární koncentraci aniontového tenzidu SDS, která se v literatuře²⁹ uvádí jako $8,3 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, lze použít jako nejnižší koncentraci vedoucí k tvorbě micel $0,01 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ vodný roztok SDS.

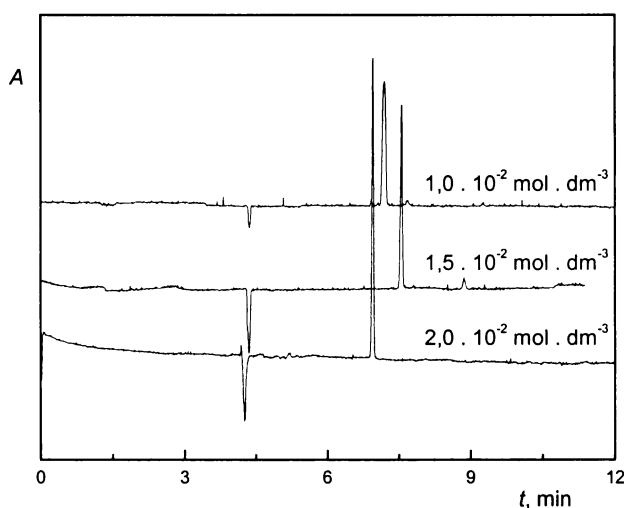
K zjištění horní meze elučního okna v micelární fázi byl do základního elektrolytu ($0,01 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ vodný roztok tetraboritanu sodného o pH 9,7) nadávkován $10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ roztok sudanu III v acetonitrilu. Roztok sudanu III vykazuje maximum absorbance při vlnové délce 362 nm, při níž byl detekován. Záznam měření je uveden na obrázku 14, z jehož je patrné, že studované analyty by měly migrovat v rozmezí mezi elektroosmotickým tokem a migračním časem sudanu III, který je v okolí 13. minuty.

Pro optimalizaci podmínek měření analytů v micelární fázi je důležitá jejich rozpustnost v micelách, s jejíž růstem se zvyšuje citlivost metody, a tím dochází i k dosažení nižších hodnot meze detekce. Vliv koncentrace SDS na rozpustnost analytů v micelách byl studován pro $1,0 \cdot 10^{-2}$; $1,5 \cdot 10^{-2}$ a $2,0 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ roztoky SDS v základním elektrolytu. Vyšší koncentrace nebyly použity kvůli vysokému povrchovému napětí tenzidu, jež způsobuje vysokou pěnovost roztoku a tak možný vznik vzduchových bublin, komplikujících vlastní měření v kapiláře.



Obr. 14 Elektroferogram $1,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ roztoku sudanu III v acetonitrilu; $0,01 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ vodný roztok borátového pufru (pH 9,7) s $0,01 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ SDS, dávkování $2 \cdot 10^3 \text{ Pa}$ po 10 s, napětí 20 kV, $\lambda = 362 \text{ nm}$, $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$, proud 38 - 42 μA .

Jednotlivá měření byla prováděna v $0,01 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ vodném roztoku tetraboritanu sodného o pH 9,7; napětí 20 kV; detekce při $\lambda = 250 \text{ nm}$; při postupně rostoucím dávkování v rozmezí $(5 - 20) \cdot 10^2 \text{ Pa}$ po dobu 5 s a $20 \cdot 10^2 \text{ Pa}$ po dobu 10 s. Na obrázku 15 jsou uvedeny elektroferogramy 2-hydroxyanthrachiononu v různých elektrolytech lišících se koncentrací tenzidu při maximálním dávkování, tedy při tlaku $2 \cdot 10^3 \text{ Pa}$ po 10 s, a detekci 250 nm. Ačkoliv se jedná o jeden analyt, který by měl migrovat se stejným migračním časem, píky analytu se nepřekrývají. Je to způsobeno odlišnými migračními časy, které závisí na řadě faktorů, zde převážně na teplotě. Pseudoefektivní pohyblivosti se přibližně rovnají. Jak je z obrázku vidět, dochází ke zmenšení šířky píku, což při zachování stejné plochy píku vede k nárůstu jeho výšky. Je zřejmé, že při nejvyšší proměřované koncentraci SDS je dosaženo nejcitlivější detekce.



Obr. 15 Vliv koncentrace tenzidu SDS na tvar píku pro $1,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ roztok 2-hydroxyanthrachiononu; $0,01 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ vodný roztok borátového pufru (pH 9,7) s $(1,0; 1,5; 2,0) \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ SDS, dávkování $2 \cdot 10^3 \text{ Pa}$ po 10 s, napětí 20 kV, $\lambda = 250 \text{ nm}$, $T = 29 - 30 \text{ }^\circ\text{C}$.

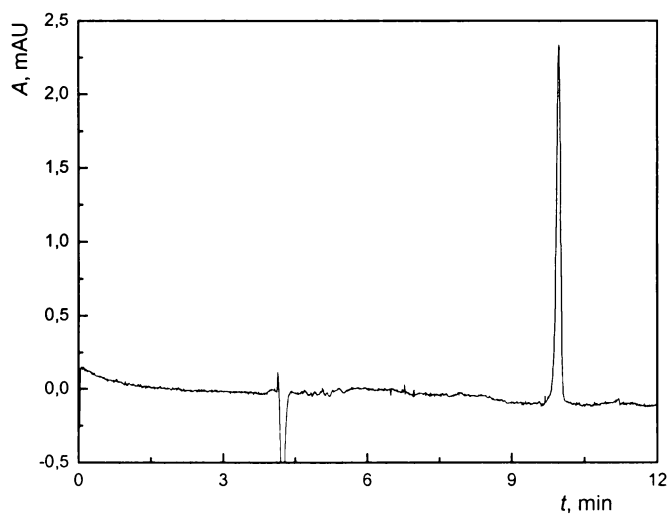
Při této nejvyšší koncentraci pseudostacionární fáze vykazuje základní linie nejstabilnější průběh. Vyšší rozpustnost analytů v micelární fázi umožnila separaci i 1,8- a 1,5-dihydroxyanthrachiononu. V tabulce 6 jsou uvedeny pseudoefektivní pohyblivosti jednotlivých analytů při všech třech proměřovaných koncentracích povrchově aktivní látky SDS. Některé analyty v sobě obsahují nečistoty, jak již bylo prokázáno výše, a jejich elektroferogramy obsahují více píku. Pro tyto látky byly pseudoefektivní pohyblivosti počítány z migračního času píku, který se objevuje

v záznamech pro všechny koncentrace SDS s podobným migračním časem a zaujímá co největší plochu. Všechny analyty tedy migrují v elučním okně micelárního systému, jen 1,2,4-trihydroxyanthrachinon migruje na samém konci elučního okna a jeho pseudoefektivní pohyblivost je velmi podobná pseudoefektivní pohyblivosti sudanu III, který je zcela rozpuštěn v micelách.

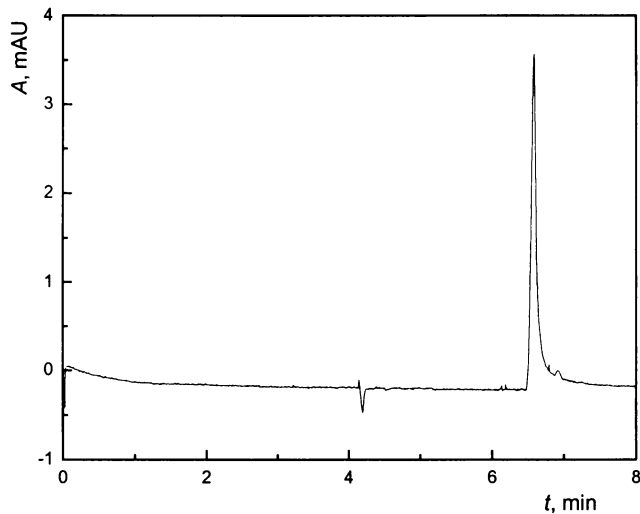
Tab. 6 Srovnání pseudoefektivních pohyblivostí jednotlivých analytů v $0,01 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ vodném roztoku borátového pufru (pH 9,7) s různou koncentrací SDS, detekce při $\lambda = 250 \text{ nm}$, napětí 20 kV, kapilára firmy CACO o $L_D = 55,8 \text{ cm}$, $L_C = 69,8 \text{ cm}$, $d_i = 75 \text{ } \mu\text{m}$, $d_o = 375 \text{ } \mu\text{m}$.

látka	$\mu_{\text{eff}}^{\text{ps}} (10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1})$ pro různé koncentrace SDS ($\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$)		
	$1,0 \cdot 10^{-2}$	$1,5 \cdot 10^{-2}$	$2,0 \cdot 10^{-2}$
1-HA	-2,80	-2,52	-2,93
2-HA	-1,96	-1,90	-1,97
1,2-DHA	-1,68	-1,80	-1,88
1,4-DHA	-2,53	-2,58	-2,91
1,2,4-THA	-3,14	-3,06	-3,12
1,5-DHA	-	-	-2,99
1,8-DHA	-	-	-2,97
sudan III	-3,12	-	-

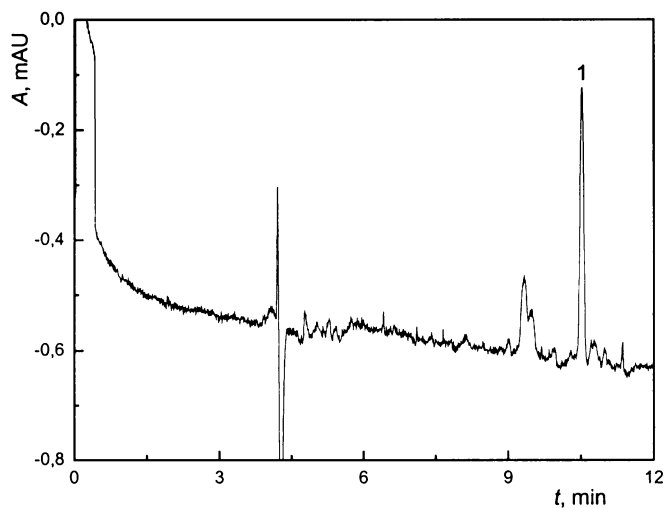
Pro ilustraci jsou na obrázcích 15 - 19 uvedeny elektroferogramy jednotlivých derivátů anthrachinonu (s výjimkou 1,4-dihydroxyanthrachinonu a 1,2,4-trihydroxyanthrachinonu) separovaných v základním elektrolytu obsahující nejvyšší proměřovanou koncentraci SDS ($2,0 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$). Všechny uvedené záznamy analýz byly měřeny při dávkování $2 \cdot 10^3 \text{ Pa}$ po dobu 10 s, při napětí 20 kV.



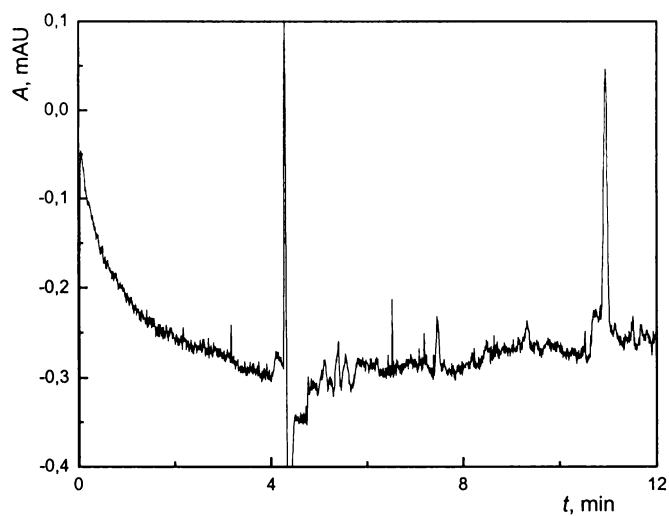
Obr. 16 Elektroferogram $1,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ roztoku 1-hydroxyanthrachinonu; $0,01 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ vodný roztok borátového pufru (pH 9,7) s $2,0 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ SDS, dávkování $2 \cdot 10^3 \text{ Pa}$ po 10 s, napětí 20 kV, $\lambda = 250 \text{ nm}$, $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$, proud 44 - 48 μA .



Obr. 17 Elektroferogram $2,7 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ roztoku 1,2-dihydroxyanthrachinonu; $0,01 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ vodný roztok borátového pufru (pH 9,7) s $2,0 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ SDS, dávkování $2 \cdot 10^3 \text{ Pa}$ po 10 s, napětí 20 kV, $\lambda = 250 \text{ nm}$, $T = 31 \text{ }^\circ\text{C}$, proud 48 μA .



Obr. 18 Elektroferogram $2,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ roztok 1,8-dihydroxyanthrachinonu; $0,01 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ vodný roztok borátového pufru (pH 9,7) s $2,0 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ SDS, dávkování $2 \cdot 10^3 \text{ Pa}$ po 10 s, napětí 20 kV, $\lambda = 250 \text{ nm}$, $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$, proud $46 \text{ } \mu\text{A}$. Z migračního času píku (1) byla počítána pseudoefektivní pohyblivost.

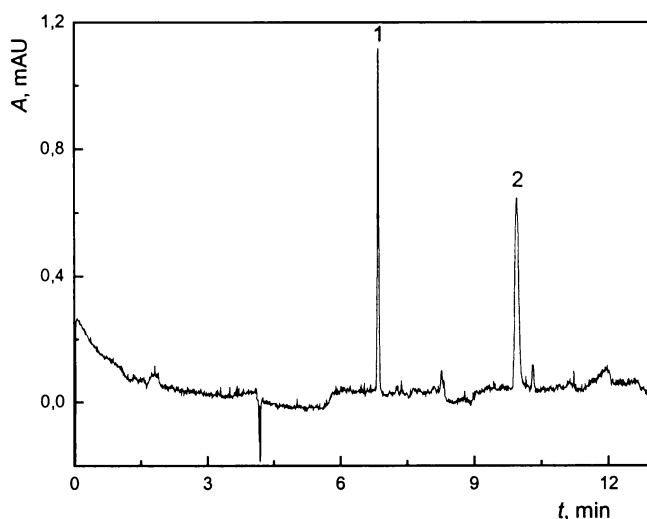


Obr. 19 Elektroferogram $2,7 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ roztok 1,5-dihydroxyanthrachinonu; $0,01 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ vodný roztok borátového pufru (pH 9,7) s $2,0 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ SDS, dávkování $2 \cdot 10^3 \text{ Pa}$ po 10 s, napětí 20 kV, $\lambda = 250 \text{ nm}$, $T = 29 \text{ }^\circ\text{C}$, proud $50 \text{ } \mu\text{A}$.

Na elektroferogramech 18 a 19 je vidět vysoký šum, jenž je dán nastavením vysoké citlivosti detekce kvůli nižší odezvě těchto dvou derivátů. Oba analyty jsou obecně velmi špatně rozpustné a podařilo se je detekovat až při nejvyšší použité koncentraci tenzidu.

4.3.3 Identifikace ve směsi

Z hlediska elektroforetického chování lze studované deriváty rozdělit do dvou základních skupin, a to na ty, které mají všechny hydroxylové skupiny v těsné blízkosti chinoidních kyslíků – jejich elektroforetické chování je obdobné jako 1-hydroxyanthrachinonu, a na ostatní, které mají jednu hydroxylovou skupinu v poloze 2. Jejich elektroforetické chování je pak podobné 2-hydroxyanthrachinonu. Díky těmto podobným pseudoefektivním pohyblivostem v rámci jedné skupiny nebylo možné rozdělit tyto látky ve směsi. Podařilo se rozdělit jen látky, jejichž pohyblivosti jsou dostatečně rozdílné. Na obrázku 20 je pro názornost uveden záznam měření směsi složené z $1,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ roztoku 1-hydroxyanthrachinonu (2) a 2-hydroxyanthrachinonu (1).



Obr. 20 Identifikace látek ve směsi. (1) $1,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ roztok 2-hydroxyanthrachinonu, (2) $1,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ roztoku 1-hydroxyanthrachinonu; $0,01 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ vodný roztok borátového pufru (pH 9,7) s $2,0 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ SDS, dávkování $2 \cdot 10^3 \text{ Pa}$ po 10 s, napětí 20 kV, $\lambda = 250 \text{ nm}$, $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$, proud $44 \text{ } \mu\text{A}$.

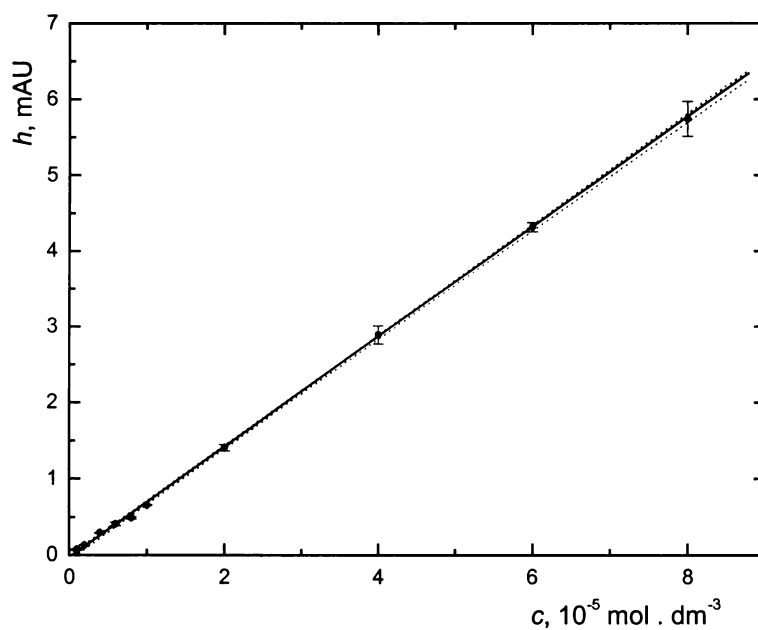
Z dosažených výsledků vyplynulo, že pro identifikaci a následnou kvantifikaci studovaných analytů se nejlépe osvědčily následující experimentální podmínky: $0,01 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ vodný roztok tetraboritanu sodného o pH 9,7 s $0,02 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ SDS, napětí 20 kV; detekce při $\lambda = 250 \text{ nm}$, dávkování $2 \cdot 10^3 \text{ Pa}$ po dobu 10 s.

4.4 KVANTIFIKACE

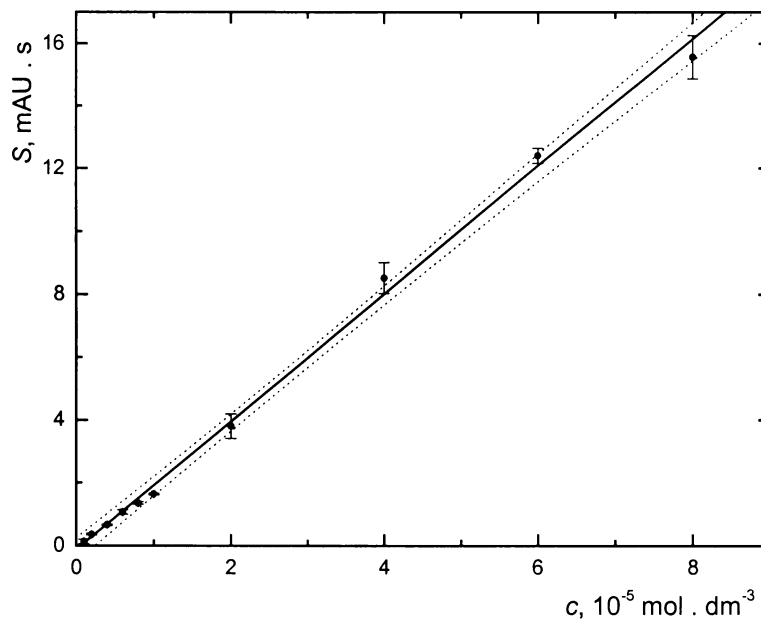
Z časových důvodů byla kvantifikace provedena pouze pro derivát 2-hydroxyanthrachinon za výše uvedených experimentálních podmínek. Vzhledem k problematické rozpustnosti hydroxyderivátů anthrachinonu musela být navážka (0,68 mg) pevného 2-hydroxyanthrachinonu nejprve rozpuštěna v 10 ml acetonitrilu a poté byla doplněna separačním pufrem ($0,01 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ vodného roztoku tetraboritanu sodného o pH 9,7 s $0,02 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ SDS) na celkový objem 30 ml. Z takto připraveného zásobního roztoku 2-hydroxy-anthrachinonu o koncentraci $1,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ byly připraveny jednotlivé koncentrace ředěním tak, aby byl ve výsledném vzorku přítomen acetonitril v poměru 33/67 (v/v) acetonitril / separační elektrolyt.

Kalibrační závislost byla proměřena v koncentračním rozsahu $1 \cdot 10^{-6} - 8 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ při následujících experimentálních podmínkách: $0,01 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ vodný roztok tetraboritanu sodného o pH 9,7 s $0,02 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ SDS, při napětí 20 kV, detekce při $\lambda = 250 \text{ nm}$, dávkování $2 \cdot 10^3 \text{ Pa}$ po dobu 10 s. Metodou lineární regrese (software Origin 6.1) byla zpracována jak výška, tak plocha jednotlivých píků. Každý bod kalibrační křivky byl proměřen šestkrát a do grafu byla vynesena jeho průměrná hodnota. Kalibrační parametry byly získány jak z výšky, tak i z plochy píku.

Na obrázku 21 je uvedena kalibrační závislost získaná z výšky píku a na obrázku 22 závislost koncentrace analytu na ploše píku. V obou obrázcích jsou úsečkami vyznačeny směrodatné odchylky jednotlivých hodnot, čárkovaně je ohraničena oblast pětiprocentní chyby od lineární aproximace.



Obr. 21 Kalibrační závislost výšky píku na koncentraci 2-hydroxyanthrachinonu; $0,01 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ vodný roztok tetraboritanu sodného o pH 9,7 s $0,02 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ SDS, při napětí 20 kV, detekce při $\lambda = 250 \text{ nm}$, dávkování $2 \cdot 10^3 \text{ Pa}$ po dobu 10 s.



Obr. 22 Kalibrační závislost plochy píku na koncentraci 2-hydroxyanthrachinonu; $0,01 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ vodný roztok tetraboritanu sodného o pH 9,7 s $0,02 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ SDS, při napětí 20 kV, detekce při $\lambda = 250 \text{ nm}$, dávkování $2 \cdot 10^3 \text{ Pa}$ po dobu 10 s.

Kalibrační závislost je lineární v koncentračním rozmezí $1 \cdot 10^{-6}$ - $8 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Vypočítané parametry regresní analýzy jsou uvedeny v tabulce 7, ze které je patrné, že lepšího korelačního koeficientu bylo dosaženo vyhodnocením výšek píků.

Tab. 7 Parametry kalibračních křivek pro výšku a plochu píku v závislosti na koncentraci 2-hydroxyanthrachinonu; $0,01 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ vodný roztok tetraboritanu sodného o pH 9,7 s $0,02 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ SDS, při napětí 20 kV, detekce při $\lambda = 250 \text{ nm}$, dávkování $2 \cdot 10^3 \text{ Pa}$ po dobu 10 s.

odezva	směrnice přímky k	průsečík s osou y q	korelační koeficient r^2
výška	$0,7226 \cdot 10^2 \text{ AU mol}^{-1} \text{ dm}^3$	$-0,0294 \cdot 10^{-3} \text{ AU}$	0,9999
plocha	$2,0225 \cdot 10^2 \text{ AU s mol}^{-1} \text{ dm}^3$	$-0,1210 \cdot 10^{-3} \text{ AU s}$	0,9986

Mez detekce (LOD) a mez stanovitelnosti (LOQ) byly vypočítány z regresní rovnice pro výšku píku jako trojnásobek (3σ), resp. desetinásobek (10σ) průměrné výchylky šumu základní linie. Vypočtené hodnoty jsou: $\text{LOD} = 1,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $\text{LOQ} = 2,6 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$.

5 ZÁVĚR

Pro separaci analyzovaných látek, mono-, di- a trihydroxyderivátů anthrachinonu, byly použity metody kapilární zónové elektroforézy (CZE) a micelární kapilární elektroforézy (MEKC).

Měření byla komplikována jednak špatnou rozpustností hydroxyderivátů anthrachinonu, jež způsobila neprůchodnost kapiláry, tak i problémy s vlastními separačními kapilárami, jejichž polyimidový povrch se stal při dlouhodobém měření vodivým, čímž docházelo k nekontrolovatelnému nárůstu procházejícího proudu kapilárou. Kapilára musela být několikrát měněna a polyimid z povrchu kapiláry ve vstupní části byl odstraněn. Přes tyto velké obtíže byly nalezeny optimální podmínky jak pro separaci analytů, tak pro kvantifikaci.

Pro separaci analytů v CZE je důležité, aby studované analyty byly nabitě a nemigrovaly tak společně s elektroosmotickým tokem. Proto bylo nutné pracovat v základním elektrolytu o vysoké hodnotě pH (~10). Za experimentálních podmínek: $0,01 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ vodný roztok tetraboritanu sodného o pH 10,1; dávkování tlakem $2 \cdot 10^3 \text{ Pa}$ po dobu 10 s; napětí 20 kV; detekce při vlnové délce 250 nm, migrovaly všechny deriváty anthrachinonu do 17 minut. Při těchto podmínkách se podařilo rozdělit i směsné vzorky, obsahující až šest analytů s dostatečně vysokým rozlišením (v rozmezí 2,9 – 31,2) s výjimkou částečné koeluce 2-hydroxyanthrachinonu a 1,2-dihydroxyanthrachinonu.

V micelárním systému se základním elektrolytem $0,01 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ vodným roztokem tetraboritanu sodného o pH 9,7 byl proměřen vliv koncentrace SDS na elektromigrační chování analytů. Bylo zjištěno, že zatímco migrace se s rostoucí koncentrací SDS významně nemění, při nejvyšší proměřované koncentraci SDS ($0,02 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) poskytují studované analyty nejcitlivější odezvu v důsledku vyšší rozpustnosti analytů, což je výhodné pro kvantifikační účely.

Při experimentálních podmínkách: $0,01 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ vodný roztok tetraboritanu sodného o pH 9,7 s $0,02 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ SDS, napětí 20 kV, detekce při $\lambda = 250 \text{ nm}$,

dávkování $2 \cdot 10^3$ Pa po dobu 10 s, byly identifikovány i 1,5- a 1,8-dihydroxy-anthrachinon, které byly velmi obtížně detekovatelné v kapilární zónové elektroforéze. Z hlediska elektroforetického chování lze studované deriváty rozdělit do dvou základních skupin. První skupinu tvoří látky, jejichž elektroforetické chování je obdobné jako 1-hydroxyanthrachinonu (mají všechny hydroxylové skupiny v těsné blízkosti chinoidních kyslíků), a druhou skupinu tvoří ostatní látky, jejichž elektroforetické chování je podobné 2-hydroxyanthrachinonu (mají jednu hydroxylovou skupinu v poloze 2). Díky těmto podobným pseudoefektivním pohyblivostem v rámci jedné skupiny nebylo možné rozdělit tyto látky ve směsi.

V micelárním systému ($0,01 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ vodný roztok tetraboritanu sodného o pH 9,7 s $0,02 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ SDS, napětí 20 kV, detekce při $\lambda = 250 \text{ nm}$, dávkování $2 \cdot 10^3$ Pa po dobu 10 s) byla proměřena kalibrační závislost pro 2-hydroxy-anthrachinon. Byl určen lineární dynamický rozsah ($1,0 \cdot 10^{-6} - 8,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$), mez detekce $1,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a mez stanovitelnosti $2,6 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$.

Závěrem lze říci, že metoda CZE poskytuje účinnější separaci látek ve směsi při pH vyšším než je pK jednotlivých analytů (pH~10) na základě rozdílných efektivních pohyblivostí. Metoda MEKC je výhodnější pro kvantifikaci látek, díky vyšší rozpustnosti hydroxyderivátů anthrachinonu v micelárním systému, a tím i vyšší citlivosti.

6 LITERATURA

- [1] Avery, M. L.: Avian repellents. In: *Encyklopedia of Agrochemicals 1*, Plimmer, J. R. (ed.). New Jersey: John Wiley & Sons 2002, p. 122-128.
- [2] Novotná, P.: *Stanovení barviv vyskytujících se v historických textiliích metodami HPLC a CE*. Diplomová práce. PřF UK v Praze, Katedra analytické chemie 1998.
- [3] Grygar, T.; Kučková, Š.; Hradil, D.; Hradilová, J.: Electrochemical analysis of natural solid organic dyes and pigments. *Journal of Solid State Electrochemistry* **7**, 706-713 (2003).
- [4] Robinson, E. A.; Earley, J. E.: Metal-ligand electronic interactions in mononuclear and dinuclear triethylenetetraminecobalt(III) complexes containing the anion of quinizarin (1,4-dihydroxy-9,10-anthraquinone). *Collection of Czechoslovak Chemical Communication* **58**, 62-70 (1993).
- [5] Němcová, I.; Čermáková, L.; Rychlovský, P.: *Spektrometrické analytické metody I*. Skriptum Univerzity Karlovy v Praze. Praha, Nakladatelství Karolinum 2004
- [6] Cho, S. H.; Huh, H.; Kim, H. M.; Kim, N. J.; Kim, S. K.: Infrared-visible and visible-visible double resonance spectroscopy of 1-hydroxy-9,10-anthraquinone-(H₂O)_n (n = 1,2) complexes. *Journal of Chemical Physics* **122**, 034305 (2005) (10 pages).
- [7] Cho, D. W.; Kim, S. H.; Yoon, M.; Jeoung, S. C.: Transient Raman spectroscopic studies on the excited-state intramolecular reverse proton transfer in 1-hydroxy-anthraquinone. *Chemical Physics Letters* **391**, 314-320 (2004).
- [8] Čechák, T.; Gerndt, J.; Musílek, L.; Kopecká, I.: Analysis of Fresco Paintings by X-Ray Fluorescence Method. *Radiation Physics and Chemistry* **61**, 717-719 (2001).
- [9] Jacquemin, D.; Preat, J.; Charlot, M.; Wathelet, V.; André, J. M.; Perpète, E. A.: Theoretical investigation of substituted anthraquinone dyes. *Journal of Chemical Physics* **121** (4), 1736-1743 (2004).
- [10] Shamsipur, M.; Hemmateenejad, B.; Akhond, M.; Sharghi, H.: Quantitative structure-property relationship study of acidity constants of some 9,10-anthraquinone derivatives using multiple linear regression and partial least-squares procedures. *Talanta* **54**, 1113-1120 (2001).

- [11] NAIST – Integrated Spectral Database System of Organic Compounds (Data are provided by the National Institut of Advanced Industrial Science and Technology (Japan)), vyhledáno v Chemical Abstract [cit. 20.4.2006]
- [12] Cui, J.; Li, Z. L.; Hong, X. Y.: Studies on the antioxidant of anthraquinone derivatives and beta-carotene. *Acta Chimica Sinica* **62** (12), 1095-1100 (2004).
- [13] Večeřa, M.; Gasparič, J.; Churáček, J.; Borecký, J.: *Chemické tabulky organických sloučenin*. Praha, SNTL – Nakladatelství technické literatury 1975.
- [14] Novotná, P.; Pacáková, V.; Bosáková, Z.; Štulík, K.: High-performance liquid chromatographic determination of some anthraquinone and naphthoquinone dyes occurring in historical textiles. *Journal of Chromatography A* **863**, 235-241 (1999).
- [15] Bosáková, Z.; Peršl, J.; Jegorov, A.: Determination of Lucidin in *Rubia tinctorum* Aglycones by an HPLC Method with Isocratic Elution. *Journal of High Resolution Chromatography* **23** (10), 600-602 (2000).
- [16] Puchalska, M.; Orlińska, M.; Ackacha, M. A.; Połec-Pawlak, K.; Jarosz, M.: Identification of anthraquinone coloring matters in natural red dyes by electrospray mass spectrometry coupled to capillary electrophoresis. *Journal of Mass Spectrometry* **38**, 1252-1258 (2003).
- [17] Weng, W. C.; Sheu, S. J.: Separation of Anthraquinones by Capillary Electrophoresis and High-Performance Liquid Chromatography. *Journal of High Resolution Chromatography* **23** (2), 143-148 (2000).
- [18] Aubert, S.; Schwitzguébel, J. P.: Capillary Electrophoretic Separation of Sulphonated Anthraquinones in a Variety of Matrices. *Chromatographia* **56**, 693-697 (2002).
- [19] Wang, D.; Yang, G.; Song, X.: Determination of pKa values of anthraquinone compounds by capillary electrophoresis. *Electrophoresis* **22**, 464-469 (2001).
- [20] Koyama, J.; Morita, I.; Kawanishi, K.; Tagahara, K.; Kobayashi, N.: Capillary Electrophoresis for Simultaneous Determination of Emodin, Chrysophanol, and Their 8- β -D-Glucosides. *Chemical Pharmaceutical Bulletin* **51** (4), 418-420 (2003).
- [21] Koyama, J.; Morita, I.; Fujiyoshi, H.; Kobayashi, N.: Simultaneous Determination of Anthraquinones, Their 8- β -D-Glucosides, and Sennosides of *Rhei Rhizoma* by Capillary Electrophoresis. *Chemical Pharmaceutical Bulletin* **53** (5), 573-575 (2005).
- [22] Qi, S.; Cui, S.; Chen, X.; Hu, Z.: Rapid and sensitive determination of anthraquinones in Chinese herb using 1-butyl-3-methylimidazolium-based ionic

- liquid with β -cyclodextrin as modifier in capillary zone electrophoresis. *Journal of Chromatography A* **1059**, 191-198 (2004).
- [23] Koyama, J.; Morita, I.; Tagahara, K.; Bakari, J.; Aqil, M.: Capillary Electrophoresis of Anthraquinones from *Cassia siamea*. *Chemical Pharmaceutical Bulletin* **50** (8), 1103-1105 (2002).
- [24] Shang, X.; Yuan, Z.: Determination of hydroxyanthraquinoids in Rhubarb by cyclodextrin-modified micellar electrokinetic chromatography using a mixed micellar system of sodium dodecyl sulfate and sodium cholate. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **31**, 75-81 (2003).
- [25] Shang, X.; Yuan, Z.: Separation and Determination of Active Components in Rhubarb by Cyclodextrin-Modified Micellar electrokinetic Chromatography Using a Mixed Micellar System. *Analytical Letters* **36** (1), 203-214 (2003).
- [26] Sheu, S. J.; Chen, H. R.: Determination of five major anthraquinoids in Chinese herbal preparations by micellar electrokinetic capillary electrophoresis. *Analytica Chimica Acta* **309**, 361-367 (1995).
- [27] Shang, X.; Yuan, Z.: Determination of Active Components in Rhubarb and Study of Their Hydrophobicity by Micellar Electrokinetic Chromatography. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **13**, 617-622 (2003).
- [28] Atanabe, T.; Terabe, S.: Analysis of natural food pigments by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A* **880**, 311-322 (2000).
- [29] Bosáková, Z.; Coufal, P.; Jelínek, I.; Pacáková, V.; Ševčík, J. G. K.; Štulík, K.: *Analytické separační metody*. Skriptum Univerzity Karlovy v Praze. 1. vydání. Praha, Nakladatelství Karolinum 2004.
- [30] Coufal, P.: *Capillary Zone Electrophoresis, CZE*. Dostupné z URL: <http://www.natur.cuni.cz/~pcoufal/cze.html> [cit. 24.4.2006]
- [31] Coufal, P.: *Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography, MECC*. Dostupné z URL: <http://www.natur.cuni.cz/~pcoufal/mecc.html> [cit. 24.4.2006]
- [32] Bernabé-Zafón, V.; Torres-Lapasió, J. R.; Ortega-Gadea, S.; Simó-Alfonso, E. F.; Ramis-Ramos, G.: Resolution of overlapped non-absorbing and absorbing solutes using either an absorption null-balance detection window or multivariate deconvolution applied to capillary electrophoresis of anionic surfactants. *Journal of Chromatography A* **1036**, 205-216 (2004).