

UNIVERZITA KARLOVA  
Přírodovědecká fakulta

---

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Nikola Hurychová

ELEKTROFORETICKÉ STANOVENÍ SACHARIDŮ  
V NEKTARU Z KVĚTŮ

Electrophoretic determination of saccharides in flower nectar

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Tomáš Křížek, Ph.D.

Praha 2021

## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

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

V Praze dne 14.6.2021

## Poděkování

Ráda bych poděkovala svému školiteli RNDr. Tomáši Křížkovi, Ph.D. a Mgr. Alici Šimonové za trpělivost, věnovaný čas, a především cenné rady, které mi při vypracování mé bakalářské práce věnovali.

## Abstrakt

Tato práce se zabývá vývojem a základní validací metody stanovení obsahu sacharózy, glukózy a fruktózy v nektaru z květů. Využívá metodu kapilární elektroforézy s bezkontaktní vodivostní detekcí.

V teoretické části jsou obecně popsány funkce sacharidů v nektaru, princip kapilární elektroforézy a bezkontaktní vodivostní detekce. Je zde i stručný přehled konkrétních aplikací při stanovování sacharidů.

Při experimentální části bylo nejprve otestováno dávkování na dlouhém a na krátkém konci kapiláry. Při dalších experimentech byl optimalizován základní elektrolyt, kde byly vyzkoušeny koncentrace NaOH 10 až 50 mmol l<sup>-1</sup>. Optimální podmínky pro experimenty bylo dávkování na kratším konci kapiláry, 40mmol l<sup>-1</sup> NaOH jako základní elektrolyt a separační napětí 15 kV. Poté byla ověřena opakovatelnost, mez detekce a stanovitelnosti a také výtěžnost metody s reálným vzorkem nektaru. Jako vnitřní standard byla použita laktóza o koncentraci 0,2 mg ml<sup>-1</sup>. Relativní směrodatná odchylka stanovení byla pod 2 %. Hodnoty meze detekce byly pod 0,003 mg ml<sup>-1</sup> a hodnoty stanovitelnosti byly pod 0,009 mg ml<sup>-1</sup>. Výtěžnost metody byla 97–105 %. Dále byla proměřena kalibrace, ze které byl stanoven obsah jednotlivých sacharidů ve vzorku. Původní vzorek obsahoval 1,204 ± 0,011 mg (n = 3, 0,1 %) sacharózy, 0,341 ± 0,009 mg (n = 3, 0,08 %) glukózy a 0,358 ± 0,008 mg (n = 3, 0,07 %) fruktózy.

## Klíčová slova

Kapilární elektroforéza, bezkontaktní vodivostní detekce, sacharidy

## Abstract

This work deals with the development and basic validation of a method for determination of sucrose, glucose and fructose content in floral nectar. It uses capillary zone electrophoresis with contactless conductivity detection.

The theoretical part describes the functions of carbohydrates in nectar, principles of capillary zone electrophoresis and contactless conductivity detection. There is also a brief overview of applications in the determination of carbohydrates.

In the experimental part, sample injection at the short and at the long end of capillary were tested. In further experiments, the background electrolyte was optimized. The tested concentrations of NaOH were from 10 to 50 mmol l<sup>-1</sup>. Optimal conditions for the experiments were injection at the short end of the capillary, 40mmol l<sup>-1</sup> NaOH as background electrolyte and separation voltage of 15 kV. Then, the repeatability, limit of detection and quantification and recovery of the method with a real sample of nectar were verified. Lactose was used as an internal standard. Relative standard deviation was below 2 %. Limits of detection were below 0.003 mg ml<sup>-1</sup> and limits of quantification were below 0.009 mg ml<sup>-1</sup>. Recovery of the method was 97–105 %. Furthermore, the calibration dependences were measured, from which the concentration of carbohydrates in the sample was determined. The original sample contained  $1.204 \pm 0.011$  mg (n = 3, 0.1 %) of sucrose,  $0.341 \pm 0.009$  mg (n = 3, 0.08 %) of glucose and  $0.358 \pm 0.008$  mg (n = 3, 0.07 %) fructose.

## Key words

Capillary electrophoresis, contactless conductivity detection, carbohydrates

## Obsah

Seznam použitých zkratk a symbolů .....	7
1. Cíl práce.....	8
2. Teoretická část.....	9
2.1 Sacharidy v nektaru z květů .....	9
2.2 Kapilární zónová elektroforéza.....	9
2.2.1 Instrumentace.....	9
2.2.2 Základní princip.....	10
2.2.3 Bezkontaktní vodivostní detekce.....	11
2.2.4 Stanovení sacharidů pomocí CZE .....	11
2.3 Další metody stanovení sacharidů .....	13
3. Experimentální část .....	14
3.1 Použité chemikálie a materiály .....	14
3.2 Instrumentace .....	14
3.3 Příprava kalibračních roztoků a vzorku .....	14
3.4 Elektroforetické podmínky .....	14
3.5 Výpočty.....	15
4. Výsledky a diskuze.....	16
4.1 Určení pořadí píků .....	16
4.2 Dávkování vzorku.....	16
4.3 Optimalizace koncentrace základního elektrolytu .....	17
4.4 Opakovatelnost metody .....	20
4.5 Kalibrační závislosti .....	21
4.6 Mez detekce a mez stanovitelnosti .....	22
4.7 Ověření stanovení se vzorkem nektaru z květů .....	23
5. Závěr.....	26
6. Použité literární zdroje.....	27

## Seznam použitých zkratek a symbolů

BGE	základní elektrolyt (background electrolyte)
CZE	kapilární zónová elektroforéza (capillary zone electrophoresis)
EOF	elektroosmotický tok (electroosmotic flow)
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie (high performance liquid chromatography)
LOD	mez detekce (limit of detection)
LOQ	mez stanovitelnosti (limit of quantification)
MS	hmotnostní spektrometrie (mass spectrometry)
PAD	pulzní amperometrická detekce (pulse amperometric detection)
RID	refraktometrická detekce (refraction index detection)
RSD	relativní směrodatná odchylka (relative standard deviation)
SD	směrodatná odchylka (standard deviation)
$c_{obs}$	pozorovaná koncentrace
$c_{př}$	koncentrace přídatku
$c_{ref}$	teoretická hodnota koncentrace
$h$	hodnota šumu základní linie
L	interval spolehlivosti
$m$	směrnice přímky
$n$	počet měření
$R_f$	výtěžnost
$\bar{x}$	aritmetický průměr

## 1. Cíl práce

Cílem práce je optimalizace a validace metody kapilární elektroforézy s bezkontaktní vodivostní detekcí pro stanovení sacharózy, glukózy a fruktózy v nektaru z květů.



## 2. Teoretická část

### 2.1 Sacharidy v nektaru z květů

Květinový nektar je tekutina, produkovaná krytosemennými rostlinami, obsahující vodu a sacharidy – především disacharid sacharózu a jeho složky hexózy fruktózu a glukózu. U určitých druhů rostlin tyto sacharidy stopově doprovází např. maltóza, melibióza nebo rafinóza. Nektar jako dobrý zdroj živin je atraktant nejen pro opylovače, kteří právě při konzumaci nektaru rostlinu zároveň opylují, ale také pro mikroby. Proto jako obranu vylučují některé rostliny do nektaru např. peroxid vodíku [1], [2].

Různý poměr sacharózy a monosacharidů v květinových nektarech láká odlišné druhy opylovačů. Relativní množství každého ze sacharidů určuje nektarová invertáza, která hydrolyzuje sacharózu na fruktózu a glukózu.

Záleží také na celkové koncentraci sacharidů v nektaru, protože právě ty jsou hlavním zdrojem energie. Zatímco se zvyšující se koncentrací sacharidů se energetický obsah zvyšuje lineárně, viskozita nektaru se zvyšuje exponenciálně. Takže při nízkých koncentracích je příjem energie omezen nízkým obsahem sacharidů, zatímco při vysokých koncentracích je omezen vysokou viskozitou roztoku [3].

Sledování obsahu sacharidů v nektaru z květů je důležité pro pochopení interakcí mezi opylovačem a rostlinou. Obsah sacharidů v nektaru je jednou z vlastností rostliny, které rozhodují o atraktivnosti nektaru pro daný druh opylovače. Kvůli chybějícím datům z různých oblastí světa stále není jasný jejich přesný význam či obecný vzorec při výběru nektaru opylovačem [4].

V této práci bude stanovován obsah sacharózy, glukózy a fruktózy v nektaru z květů *Bidens Manii* metodou kapilární elektroforézy.

### 2.2 Kapilární zónová elektroforéza

Kapilární zónová elektroforéza (CZE, capillary zone electrophoresis) je nejběžněji používaná elektroforetická metoda, založená na rozdílech elektroforetických mobilit.

#### 2.2.1 Instrumentace

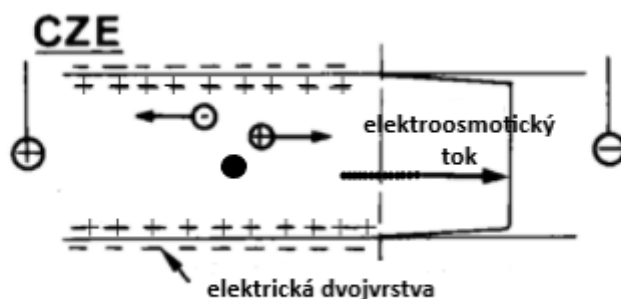
Kapilární zónová elektroforéza je poměrně jednoduchá na instrumentaci. Skládá se z kapiláry, jejíž konce ústí do dvou nádobek, ve kterých jsou elektrody. V běžném

uspořádání je detektor umístěn blízko katody. Elektrody jsou polarizovatelné, takže v případě výhodnějšího opačného uspořádání lze elektrody pouze přepólovat.

### 2.2.2 Základní princip

Nejčastěji používané kapiláry v CZE jsou kapiláry křemenné, na jejichž povrchu jsou ionizovatelné silanolové skupiny (-Si-OH). Na elektrody je vloženo vysoké napětí a na rozhraní povrchu křemenné kapiláry a základního elektrolytu (BGE, background electrolyte) pak vzniknou tři vrstvy – negativně nabitý povrch kapiláry (při  $\text{pH} > 2$ ), imobilizovaná vrstva kationtů (Sternova vrstva) a difúzní vrstva kationtů. Kationty, které jsou v těsné blízkosti negativně nabitého povrchu, tvoří elektrickou dvojvrstvu. Vzdálenější kationty migrují ke katodě a strhávají s sebou i molekuly rozpouštědla, tím vzniká elektroosmotický tok (EOF, electroosmotic flow). Rychlost elektroosmotického toku je obvykle větší než rychlost migrace iontů analytu.

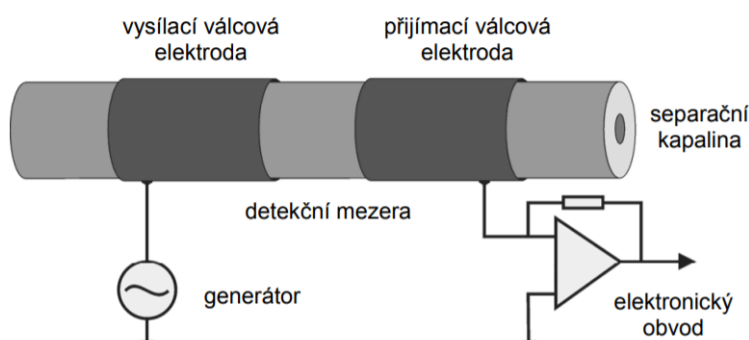
Separační mechanismus je založen na různých velikostech solvatovaných iontů a na jejich náboji, který v případě slabých elektrolytů závisí na  $\text{pH}$  základního elektrolytu. Na Obr. 2.1 je znázorněno, že ionty i neutrální látky jsou unášeny elektroosmotickým tokem směrem ke katodě, u které je v tomto uspořádání umístěn i detektor. Zatímco anionty jsou zpomalovány svou tendencí migrovat k anodě, kationty jsou naopak svou tendencí migrovat ke katodě urychlovány. Takto dojde k separaci jednotlivých iontů do zón. Pořadí iontů putujících k detektoru je určeno jejich rozdílnou rychlostí migrace v základním elektrolytu, přičemž tato rychlost je dána velikostí molekuly a náboje [5].



Obr. 2.1: Znázornění principu dělení iontů metodou CZE. Převzato z [5] a upraveno.

### 2.2.3 Bezkontaktní vodivostní detekce

Bezkontaktní detekční cely se skládají z elektrod, které jsou izolovány od měřeného roztoku (Obr. 2.2). Elektrody se skládají z tenké vodivé kovové vrstvy, která je nanášena přímo na polyimidový povrch kapiláry nebo, jak je to v našem případě, z kovové trubice, kterou kapilára prochází [6]. Na první elektrodu je vložen střídavý signál z generátoru, ten je přenášen povrchem kapiláry a přijímán elektrodou druhou. Elektrody jsou od sebe odděleny detekční mezerou, takže přijímaný signál je ovlivněn vodivostí zóny v detekční mezeře [7]. Tento způsob bezkontaktní detekce je výhodný, protože odpadá jakákoliv modifikace kapiláry nebo jejího polyimidového povrchu a čištění či proplachování detekční cely [8].



Obr. 2.2: Schéma bezkontaktního vodivostního detektoru v CZE. Převzato z [7].

### 2.2.4 Stanovení sacharidů pomocí CZE

Kapilární elektroforézou se dají stanovit sacharidy v různorodých vzorcích např. farmaceutických, medicínských a potravinářských. Separovat se dají i jinak těžko rozlišitelné izomery rozdílné jen v jedné vazbě.

Aby se daly sacharidy stanovit pomocí CZE, je třeba nejdříve zajistit, aby byly nabitě. Toho lze dosáhnout použitím silně alkalického základního elektrolytu, komplexací sacharidů (nejčastěji s boráty) nebo derivatizací [9].

Pro použití CZE s bezkontaktní vodivostní detekcí je třeba použít elektrolyt, jehož koiont má výrazně jinou mobilitu, než má disociovaný sacharid. Tento rozdíl zajistí dobrou citlivost, protože se vodivost výrazně změní v zóně analytu. Disociovaný sacharid má velmi nízkou mobilitu, proto je možné použít hydroxid sodný. Ten je navíc kompatibilní s velkým rozsahem vzorků a aditiv [10].

Metoda pro stanovení mono- a disacharidů v nápojích, potravinách a potravinových aditivech [11] používá křemennou kapiláru o vnitřním průměru 5  $\mu\text{m}$  a efektivní délce 18,3 cm. Separace byla prováděna při napětí 15 kV, jako optimální BGE byl použit 75  $\text{mmol l}^{-1}$  NaOH, kdy byla základní linie bezkontaktní vodivostní detekce stabilní a sacharidy byly dostatečně odděleny (pouze manóza a fruktóza byly odděleny částečně kvůli jejich velmi podobným disociačním konstantám). Tyto experimentální podmínky zajistily velmi rychlé separace s migračními časy do 134 s a meze detekce menší než 1  $\mu\text{mol l}^{-1}$ .

Metoda pro stanovení sacharidů v energetických nápojích [12] používá křemennou kapiláru o vnitřním průměru 10  $\mu\text{m}$ , délce 10 cm a efektivní délce 4 cm. Separační napětí bylo 5 kV, jako optimální BGE byl zvolen 75  $\text{mmol l}^{-1}$  NaOH. Je však uvedeno, že pro stanovení směsi sacharózy, glukózy a fruktózy, které mají dostatečně odlišné migrační rychlosti, je vhodné jako BGE použít KOH díky vyšší citlivosti detekce a kratší době separace.

Metoda pro stanovení sacharidů ve vzorcích medu s nepřímou UV detekcí [13] používá křemennou kapiláru s vnitřním průměrem 50  $\mu\text{m}$ , délkou 68 cm a efektivní délkou 58 cm. Jako BGE byl použit 10  $\text{mmol l}^{-1}$  benzoát sodný s 1,5  $\text{mmol l}^{-1}$  cetyltrimethylamonium bromid, který byl přidán z důvodu otočení směru EOF. Separační napětí bylo -25 kV.

Další metoda pro stanovení sacharidů ve vzorcích medu s amperometrickou detekcí [14] využívá křemennou kapiláru s vnitřním průměrem 25  $\mu\text{m}$  a celkovou délkou 57 cm. K amperometrické detekci je použit tříelektrodivý systém, který se skládal z pracovní pastové uhlíkové elektrody modifikované nano-NiO, nasycené kalomelové referentní elektrody a platinové protielektrody. Jako BGE byl použit 50  $\text{mmol l}^{-1}$  NaOH a separační napětí bylo 10 kV. Potenciál vložený na pracovní elektrodu byl 0,55 V. Meze detekce byly 0,3  $\mu\text{mol l}^{-1}$  pro glukózu i fruktózu a 0,6  $\mu\text{mol l}^{-1}$  pro sacharózu.

Metoda pro stanovení sacharidů ve forenzních a farmaceutických vzorcích [15] využívá křemennou kapiláru o vnitřním průměru 50  $\mu\text{m}$ , celkové délce 60 cm a efektivní délce 50 cm. Základní elektrolyt byl složen z 98  $\text{mmol l}^{-1}$  NaOH a 120  $\text{mmol l}^{-1}$  NaCl. Pro otočení směru EOF byl použit hexadimetrin bromid. Separační napětí bylo -14 kV. Přímá UV detekce byla založena na tvorbě absorbujícího meziprojektu fotooxidací.

## 2.3 Další metody stanovení sacharidů

Metoda pro stanovení sacharidů v rostlinných materiálech pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC, high performance liquid chromatography) s refraktometrickou detekcí (RID, refraction index detection) [16] využívá kolonu Nucleosil CHO 682 (Pb) s předkolonou s délkou 21 mm a vnitřním průměrem 4,6 mm a hlavní kolonou s délkou 300 mm a vnitřním průměrem 7,8 mm. Kolona byla temperována na 85 °C. Byla použita isokratická eluce vodou, průtoková rychlost byla 0,4 ml min<sup>-1</sup>. Měření trvalo 50 min, nejdelší retenční čas měla ribóza, a to necelých 45 min. Tyto podmínky zajistily vynikající separaci nejvíce frekventovaných mono- a disacharidů. Relativní směrodatná odchylka stanovení byla do 5 %.

Metoda stanovení sacharidů ve víně a džusech uspořádáním HPLC-RID [17] byla provedena koloně Hi-Plex H o délce 300 mm a průměru 7,7 mm s rozměry vnitřních částic 8 μm, která byla chráněna předkolonou. Kolona byla temperována na 70 °C. Aplikovaná rychlost průtoku byla 0,5 ml min<sup>-1</sup>. Jako mobilní fáze byla použita 4M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Délka jedné analýzy byla 20 min. Mez detekce byla maximálně 0,05 g l<sup>-1</sup>.

Metoda pro současné stanovení 13 sacharidů [18] byla provedena pomocí uspořádání vysokoúčinné aniontově výměnné chromatografie s pulzní amperometrickou detekcí (PAD, pulse amperometric detection) nebo s hmotnostní spektrometrií (MS, mass spectrometry). Byla použita kolona CarnoPac PA20 s délkou 150 mm a průměrem 3 mm. Optimální průtoková rychlost byla 0,45 ml min<sup>-1</sup>. Analýza všech 13 sacharidů byla provedena během 23 min. Mez detekce při použití PAD byla maximálně 0,1 μg kg<sup>-1</sup> a mez stanovitelnosti 1,2 μg kg<sup>-1</sup>; při použití MS byla mez detekce maximálně 1,5 μg kg<sup>-1</sup> a mez stanovitelnosti 5,5 μg kg<sup>-1</sup>.

### 3. Experimentální část

#### 3.1 Použité chemikálie a materiály

Hydroxid sodný, p.a. (Penta, Česká republika)

Deionizovaná voda, systém Milli-Q (Millipore, USA)

Glukóza,  $\geq 99,5$  % (Sigma-Aldrich, USA)

Fruktóza,  $\geq 99,5$  % (Sigma-Aldrich, USA)

Sacharóza,  $\geq 99,5$  % (Sigma-Aldrich, USA)

Laktóza,  $\geq 99,5$  % (Sigma-Aldrich, USA)

Vzorek nektaru z 20 květů *Bidens Mannii* (Kamerun, 11/2019)

#### 3.2 Instrumentace

Analytické váhy Precisa (Precisa, Švýcarsko)

Kapilární elektroforéza Agilent Technologies 7100 s bezkontaktním vodivostním detektorem (Agilent Technologies, Německo)

Stolní centrifuga Eppendorf MiniSpin (Eppendorf, Německo)

#### 3.3 Příprava kalibračních roztoků a vzorku

Zásobní roztoky glukózy, fruktózy, sacharózy a laktózy o koncentraci  $5 \text{ mg ml}^{-1}$  byly připraveny odvážením 25 mg daného sacharidu na analytických vahách do 5ml odměrných baněk, které byly následně doplněny po rysku deionizovanou vodou. Kalibrační roztoky o koncentracích 0,5, 0,3, 0,1, 0,08, 0,04 a  $0,01 \text{ mg ml}^{-1}$  byly připraveny ředěním těchto zásobních roztoků. Jako vnitřní standard byla použita laktóza o koncentraci  $0,2 \text{ mg ml}^{-1}$ .

Vzorek nektaru z květů byl dodán skupinou RNDr. Roberta Tropka, Ph.D. z Katedry ekologie, PřF UK. Nektar byl z květů opláchnut vodou, která byla následně odpařena do sucha. K analýze byl dodán suchý odparek v polypropylenové mikrozkušavce. Ke vzorku bylo přidáno 100  $\mu\text{l}$  deionizované vody, poté byl 10 minut centrifugován na stolní centrifuze při 13,5 tis. otáčkách za minutu.

#### 3.4 Elektroforetické podmínky

Elektroforetické stanovení bylo provedeno s bezkontaktní vodivostní detekcí. Měření byla provedena v křemenné kapiláře o průměru 20  $\mu\text{m}$  (Polymicro technologies, USA),

celková délka byla 50,0 cm, efektivní délka byla 35,0 cm při dávkování z dlouhého konce kapiláry a 15,0 cm při dávkování z krátkého konce kapiláry. Na začátku dne byla kapilára vždy nejdříve promývána 10 minut hydroxidem sodným o koncentraci 1 mol l<sup>-1</sup> a poté deionizovanou vodou. V optimalizované metodě byl vzorek dávkován hydrodynamicky z krátkého konce kapiláry tlakem 5,0 kPa po dobu 20 sekund, pracovní napětí bylo 15 kV (anoda na krátkém konci kapiláry), systémem protékal proud přibližně 10 µA. Teplota kazety s kapilárou byla 25 °C. Po optimalizaci byl jako základní elektrolyt zvolen hydroxid sodný o koncentraci 40 mmol l<sup>-1</sup>. Všechna měření byla prováděna v triplicátech.

### 3.5 Výpočty

Směrodatná odchylka: 
$$SD = \sqrt{\frac{\sum_i(x_i - \bar{x})^2}{n-1}}, \quad (3.1)$$

$x_i$  je prvek ze statistického souboru o indexu  $i$ ,  $\bar{x}$  je aritmetický průměr hodnot a  $n$  je počet měření.

Relativní směrodatná odchylka: 
$$RSD = 100 \left( \frac{SD}{\bar{x}} \right) [\%], \quad (3.2)$$

kde SD je směrodatná odchylka a  $\bar{x}$  je aritmetický průměr hodnot.

Mez detekce (LOD, limit of detection) a mez stanovitelnosti (LOQ, limit of quantification):

$$LOD = \frac{3 \times h}{m}, \quad (3.3)$$

$$LOQ = \frac{10 \times h}{m}, \quad (3.4)$$

$h$  je hodnota výšky šumu základní linie a  $m$  je směrnice kalibrační přímky závislosti výšky píků na koncentraci jednotlivých sacharidů.

Výtěžnost metody: 
$$R_f = \frac{c_2 - c_1}{c_{př}} \times 100, \quad (3.5)$$

$c_2$  odpovídá pozorované koncentraci s přidavkem standardu,  $c_1$  odpovídá pozorované koncentraci bez přidavku standardu a  $c_{př}$  odpovídá skutečné koncentraci přidavku standardu.

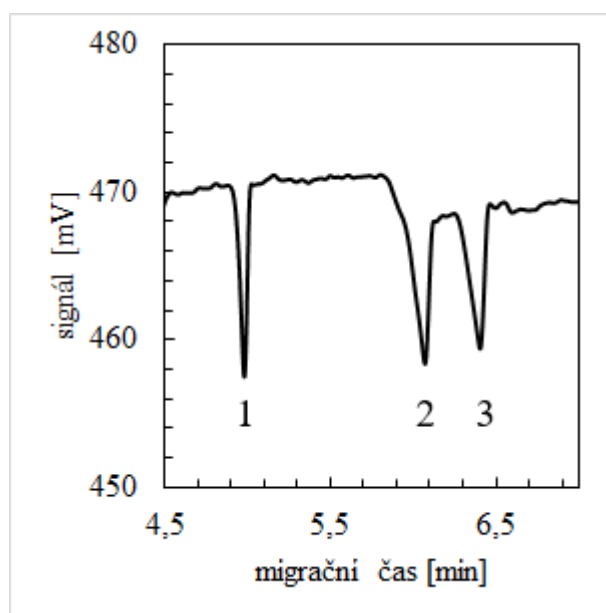
Interval spolehlivosti: 
$$L = 1,96 \left( \frac{SD}{\sqrt{n}} \right), \quad (3.6)$$

hodnota 1,96 je konstanta vyjadřující hladinu spolehlivosti 0,05, SD je směrodatná odchylka a  $n$  je počet měření.

## 4. Výsledky a diskuze

### 4.1 Určení pořadí píků

Při první sérii měření bylo nejprve ověřeno pořadí píků jednotlivých sacharidů (glukóza, fruktóza a sacharóza) v elektroferogramu tak, že byl měřen vzorek všech sacharidů o koncentraci  $0,2 \text{ mg ml}^{-1}$  (Obr. 4.1). Poté bylo ke vzorku vždy přidáno malé množství daného sacharidu a na elektroferogramu sledováno, který pík vzrostl a odpovídá tedy přidanému sacharidu. Jako základní elektrolyt byl použit NaOH o koncentraci  $40 \text{ mmol ml}^{-1}$ , separační napětí  $15 \text{ kV}$ .

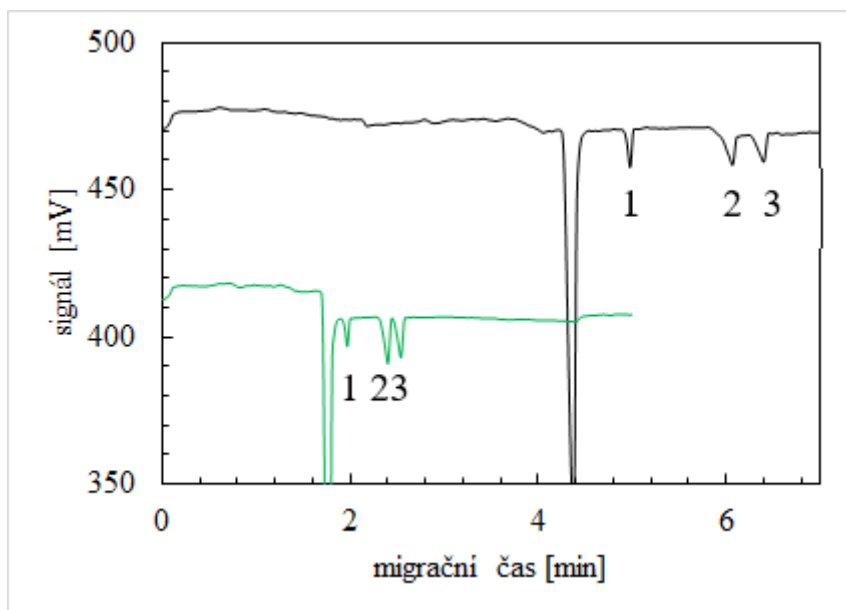


Obr. 4.1: Elektroferogram měřených sacharidů ( $c = 0,2 \text{ mg ml}^{-1}$ ). Základní elektrolyt  $40 \text{ mmol l}^{-1}$  NaOH, vnitřní průměr kapiláry  $20 \text{ }\mu\text{m}$ , celková délka  $50,0 \text{ cm}$ /efektivní délka  $35,0 \text{ cm}$ , dávkování  $5 \text{ kPa} \times 20 \text{ s}$ , separační napětí  $15 \text{ kV}$ ; (1) sacharóza, (2) glukóza, (3) fruktóza

### 4.2 Dávkování vzorku

Při prvních měřeních bylo použito dávkování vzorku hydrodynamicky z dlouhého konce kapiláry tlakem  $5 \text{ kPa}$  po dobu  $20 \text{ s}$ , doba analýzy byla necelých  $7 \text{ min}$ . Následně bylo aplikováno dávkování tlakem  $5 \text{ kPa}$  po dobu  $20 \text{ s}$  z krátkého konce kapiláry, tato změna způsobila zkrácení celkové doby analýzy na necelé  $3 \text{ min}$  při zachování separace všech tří analytů na základní linii, viz Obr. 4.2. Proto při dalších měřeních bylo vždy použito dávkování na kratším konci kapiláry.



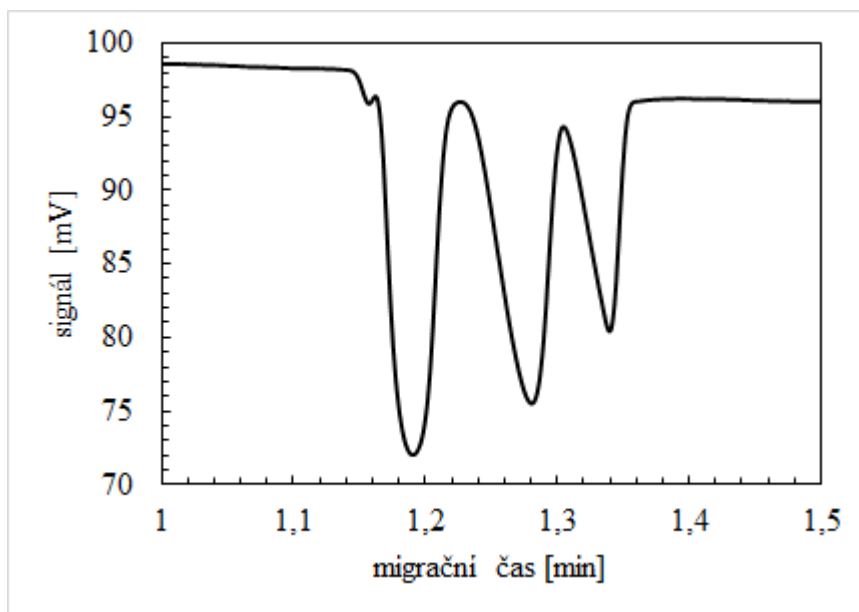


Obr. 4.2: Porovnání separace sacharidů ( $c = 0,2 \text{ mg ml}^{-1}$ ) na dlouhém konci (černá) a na krátkém konci (zelená). Základní elektrolyt  $40 \text{ mmol l}^{-1} \text{ NaOH}$ , vnitřní průměr kapiláry  $20 \text{ }\mu\text{m}$ , dávkování  $5 \text{ kPa} \times 20 \text{ s}$ , vkládané napětí  $15 \text{ kV}$  (anoda na dávkovacím konci kapiláry, délka kapiláry  $50,0/35,0 \text{ cm}$  či  $50,0/15,0 \text{ cm}$ ; (1) sacharóza, (2) glukóza, (3) fruktóza

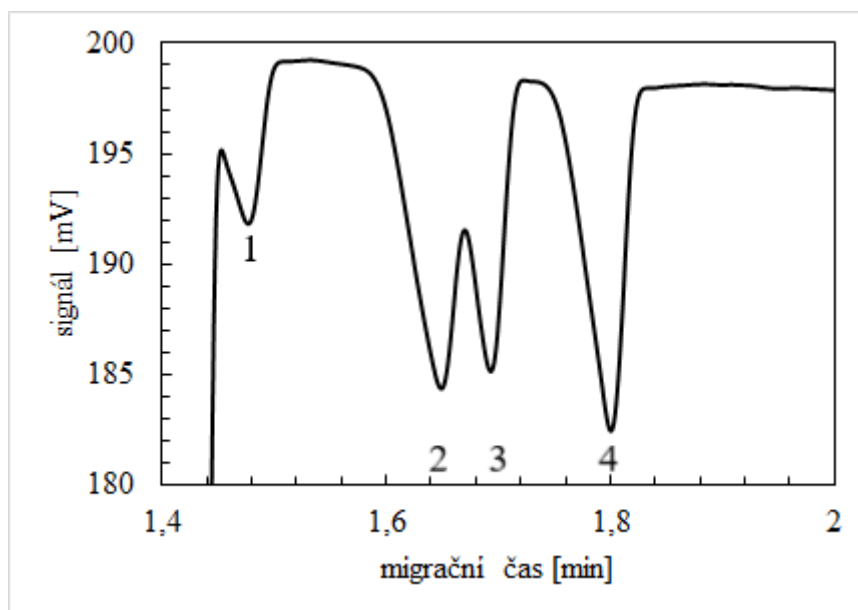
### 4.3 Optimalizace koncentrace základního elektrolytu

Při optimalizaci BGE byly použity roztoky NaOH o koncentracích 50, 40, 30, 20 a  $10 \text{ mmol l}^{-1}$ . Koncentrace sacharidů byla  $0,2 \text{ mg ml}^{-1}$ . Jako vnitřní standard byla přidána laktóza, jelikož se dalo s jistotou předpokládat, že vzorek nektaru z květů tento sacharid obsahovat nebude. Také splňovala podmínku podobné mobility jako stanovované analyty a zároveň dostatečné rozlišení.

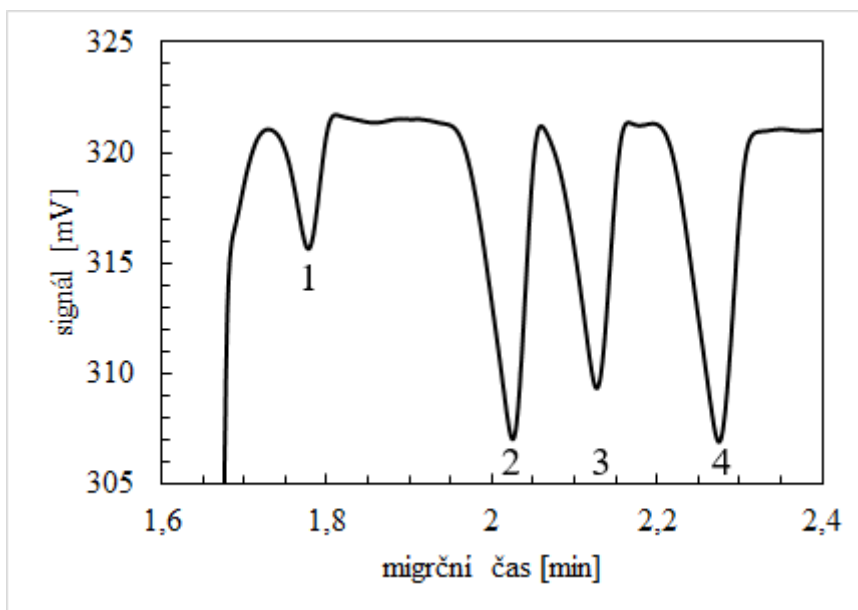
Bylo pozorováno (viz Obr. 4.3 až 4.7), že se snižující se koncentrací NaOH se snižuje doba analýzy, což bylo způsobeno zvýšením rychlosti elektroosmotického toku. Snižovaná koncentrace NaOH dále způsobila i snížení pH BGE, takže  $-\text{OH}$  skupiny sacharidů byly méně disociované, což způsobilo jejich nižší elektroforetickou pohyblivost. Píky sacharidů se při koncentraci NaOH  $10 \text{ mmol l}^{-1}$  (Obr. 4.3) a  $20 \text{ mmol l}^{-1}$  (Obr. 4.4) dokonce překrývaly a nebyly tedy od sebe dostatečně separované. Se zvyšující se koncentrací hydroxidu roste pH a vodivost základního elektrolytu a tím i proud protékající systémem, s vyšším proudem pak dochází k přehřívání základního elektrolytu vlivem vzniku Jouleova tepla a ke zhoršení šumu základní linie. Jako optimální koncentrace NaOH byla zvolena původní koncentrace  $40 \text{ mmol l}^{-1}$ , při které byly píky sacharidů dostatečně separovány, píky byly nejvíce symetrické a šum základní linie byl přijatelný.



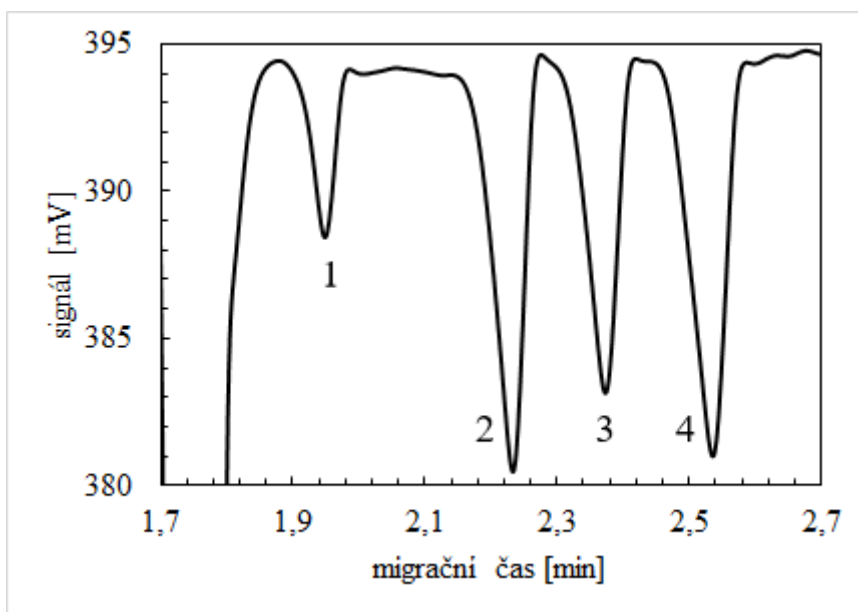
Obr. 4.3: Elektroferogram měřených sacharidů ( $c = 0,2 \text{ mg ml}^{-1}$ ). Základní elektrolyt  $10 \text{ mmol l}^{-1} \text{ NaOH}$ , vnitřní průměr kapiláry  $20 \text{ }\mu\text{m}$ , celková délka  $50,0 \text{ cm}$ /efektivní délka  $15,0 \text{ cm}$ , dávkování  $5 \text{ kPa} \times 20 \text{ s}$ , separační napětí  $15 \text{ kV}$ .



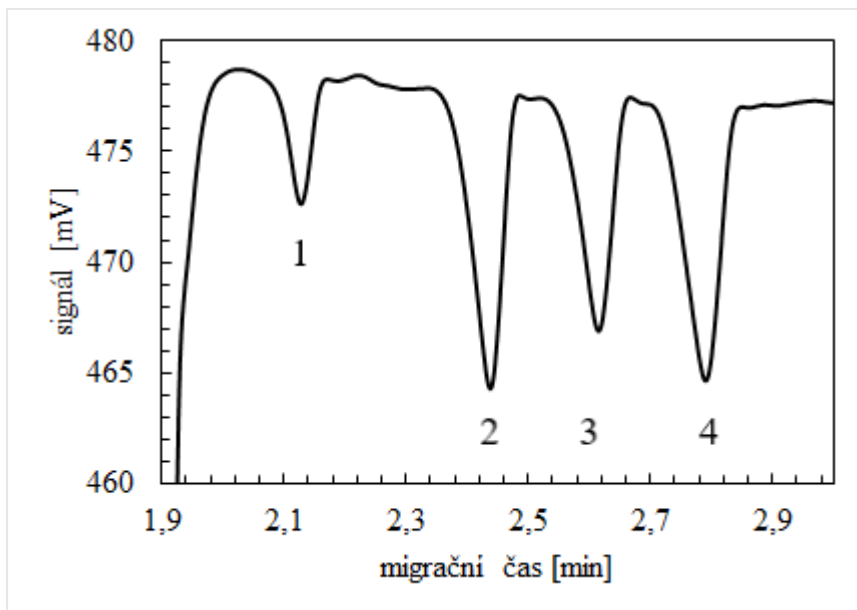
Obr. 4.4: Elektroferogram měřených sacharidů ( $c = 0,2 \text{ mg ml}^{-1}$ ). Základní elektrolyt  $20 \text{ mmol l}^{-1} \text{ NaOH}$ , vnitřní průměr kapiláry  $20 \text{ }\mu\text{m}$ , celková délka  $50,0 \text{ cm}$ /efektivní délka  $15,0 \text{ cm}$ , dávkování  $5 \text{ kPa} \times 20 \text{ s}$ , separační napětí  $15 \text{ kV}$ ; (1) sacharóza, (2) laktóza (3) glukóza, (4) fruktóza



Obr. 4.5: Elektroferogram měřených sacharidů ( $c = 0,2 \text{ mg ml}^{-1}$ ). Základní elektrolyt  $30 \text{ mmol l}^{-1} \text{ NaOH}$ , vnitřní průměr kapiláry  $20 \text{ }\mu\text{m}$ , celková délka  $50,0 \text{ cm}$ /efektivní délka  $15,0 \text{ cm}$ , dávkování  $5 \text{ kPa} \times 20 \text{ s}$ , separační napětí  $15 \text{ kV}$ ; (1) sacharóza, (2) laktóza (3) glukóza, (4) fruktóza



Obr. 4.6: Elektroferogram měřených sacharidů ( $c = 0,2 \text{ mg ml}^{-1}$ ). Základní elektrolyt  $40 \text{ mmol l}^{-1} \text{ NaOH}$ , vnitřní průměr kapiláry  $20 \text{ }\mu\text{m}$ , celková délka  $50,0 \text{ cm}$ /efektivní délka  $15,0 \text{ cm}$ , dávkování  $5 \text{ kPa} \times 20 \text{ s}$ , separační napětí  $15 \text{ kV}$ ; (1) sacharóza, (2) laktóza (3) glukóza, (4) fruktóza



Obr. 4.7: Elektroferogram měřených sacharidů ( $c = 0,2 \text{ mg ml}^{-1}$ ). Základní elektrolyt  $50 \text{ mmol l}^{-1} \text{ NaOH}$ , vnitřní průměr kapiláry  $20 \text{ }\mu\text{m}$ , celková délka  $50,0 \text{ cm}$ /efektivní délka  $15,0 \text{ cm}$ , dávkování  $5 \text{ kPa} \times 20 \text{ s}$ , separační napětí  $15 \text{ kV}$ ; (1) sacharóza, (2) laktóza (3) glukóza, (4) fruktóza

#### 4.4 Opakovatelnost metody

Pro stanovení opakovatelnosti metody bylo provedeno deset měření roztoků standardů sacharidů o koncentraci  $0,2 \text{ mg ml}^{-1}$ .

Pro výpočet směrodatné odchylky (SD, standard deviation) a relativní směrodatné odchylky (RSD, relative standard deviation) byly použity vztahy (3.1) a (3.2). Do vztahu byly dosazeny plochy píků resp. migrační časy, hodnoty RSD pak byly do  $4,3 \%$  pro plochy a do  $2,3 \%$  pro migrační časy. Vztažením ploch resp. migračních časů k vnitřnímu standardu laktóze došlo ke zvýšení opakovatelnosti. Hodnoty vypočtených RSD relativních ploch byly do  $2,5 \%$  (Tab. 4.1), metoda tedy umožní precizní stanovení obsahu sacharidů ve vzorcích. V případě relativních migračních časů byly hodnoty RSD do  $0,4 \%$  (Tab. 4.2), vysoká opakovatelnost migračních časů zaručuje spolehlivou identifikaci jednotlivých analytů.

Tab. 4.1: Opakovatelnost metody – relativní plochy píků vztažené na vnitřní standard laktózu (koncentrace sacharidů 0,2 mg ml<sup>-1</sup>)

Měření č.	Relativní plocha píku		
	Sacharóza	Glukóza	Fruktóza
1	0,642	0,749	1,087
2	0,663	0,753	1,048
3	0,652	0,775	1,038
4	0,663	0,759	1,032
5	0,645	0,740	1,017
6	0,662	0,734	0,998
7	0,655	0,756	1,029
8	0,670	0,748	0,996
9	0,645	0,742	1,035
10	0,665	0,737	1,012
SD	0,009	0,012	0,025
RSD [%]	1,40	1,55	2,45

Tab. 4.2: Opakovatelnost metody – relativní migrační časy vztažené na vnitřní standard laktózu (koncentrace sacharidů 0,2 mg ml<sup>-1</sup>)

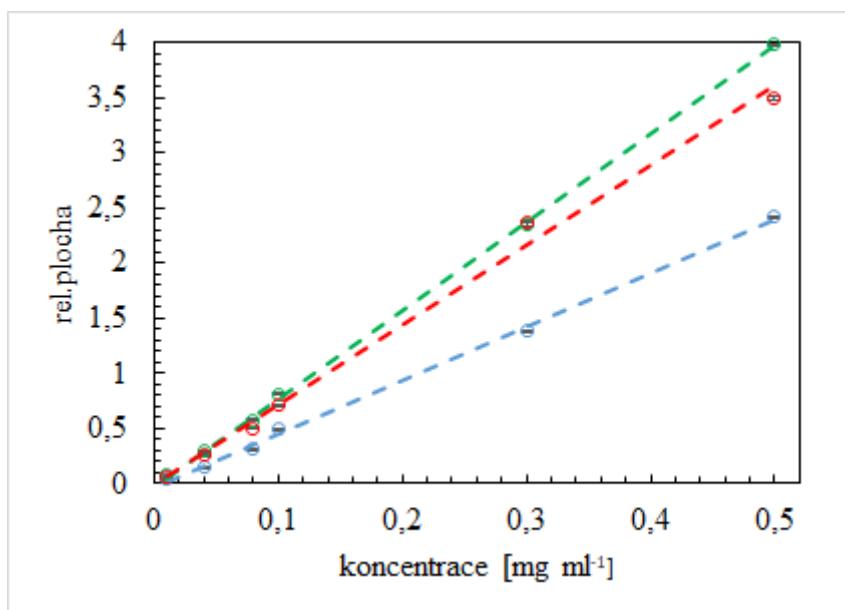
Měření č.	Relativní migrační čas		
	Sacharóza	Glukóza	Fruktóza
1	0,870	1,058	1,137
2	0,871	1,057	1,137
3	0,870	1,057	1,138
4	0,873	1,059	1,137
5	0,873	1,059	1,137
6	0,873	1,058	1,137
7	0,866	1,062	1,145
8	0,877	1,056	1,145
9	0,877	1,056	1,146
10	0,878	1,055	1,132
SD	0,004	0,002	0,004
RSD [%]	0,40	0,17	0,39

#### 4.5 Kalibrační závislosti

Koncentrace roztoků sacharózy, glukózy a fruktózy použitých pro kalibraci byly 0,5, 0,3, 0,1, 0,08, 0,04 a 0,01 mg ml<sup>-1</sup>. Jako vnitřní standard byla použita laktóza o koncentraci 0,2 mg ml<sup>-1</sup>. Každé měření bylo prováděno v triplicátech.

Po proměření kalibračních roztoků byl sestrojen graf závislosti relativní plochy píku na koncentraci daného sacharidu v roztoku (Obr. 4.8). Vynesenými body byly proloženy regresní přímky a vypočteny koeficienty determinace. Hodnoty koeficientů byly 0,9985 pro kalibrační přímku roztoků sacharózy, 0,9997 pro roztoky glukózy a 0,9940 pro roztoky

fruktózy (Tab. 4.3). Závislost relativní plochy píku na koncentraci sacharidů je tedy lineární v celém měřeném rozsahu koncentrací.



Obr. 4.8: Kalibrační graf závislosti relativní plochy píků na koncentraci roztoků sacharózy (modrá), glukózy (zelená) a fruktózy (červená). Základní elektrolyt 40mmol l<sup>-1</sup> NaOH, vnitřní průměr kapiláry 20 μm, celková délka 50,0 cm/efektivní délka 15,0 cm, dávkování 5 kPa × 20 s, separační napětí 15 kV

Tab. 4.3: Parametry kalibračních přímek (závislost relativní plochy píku na koncentraci)

	Směrnice (chyba) [mV mg <sup>-1</sup> ml]	Úsek (chyba) [mV]	Koeficient determinace
Sacharóza	4,84 (0,09)	- 0,03 (0,02)	0,9985
Glukóza	7,97 (0,07)	- 0,02 (0,02)	0,9997
Fruktóza	7,22 (0,28)	- 0,01 (0,07)	0,9940

#### 4.6 Mez detekce a mez stanovitelnosti

Po proměření kalibračních roztoků (viz kap. 4.5) byl sestaven také graf závislosti výšek píků na koncentraci jednotlivých sacharidů, vynesnými body byly proloženy regresní přímky a jejich směrnice (63,2 mV mg<sup>-1</sup> ml pro sacharózu, 49,3 mV mg<sup>-1</sup> ml pro glukózu a 42,3 mV mg<sup>-1</sup> ml pro fruktózu) byly použity ve výpočtech. Z elektroferogramu byl určen šum základní linie (0,04 mV) a poté podle rovnice (3.3) vypočtena LOD a dle rovnice (3.4) LOQ.

Tab. 4.4: Vypočtené hodnoty LOD a LOQ.

	Sacharóza	Glukóza	Fruktóza
LOD [mg ml <sup>-1</sup> ]	0,002	0,002	0,003
LOD [μmol l <sup>-1</sup> ]	6	11	17
LOQ [mg ml <sup>-1</sup> ]	0,006	0,008	0,009
LOQ [μmol l <sup>-1</sup> ]	18	44	50

#### 4.7 Ověření stanovení se vzorkem nektaru z květů

Při optimalizovaných podmínkách bylo provedeno ověření selektivity, opakovatelnosti a výtěžnosti metody proměřením vzorku nektaru z květů.

Nejdříve byl měřen 10× ředěný vodný roztok vzorku nektaru z květů, ale výsledné relativní plochy píků ležely mimo kalibrační přímku, proto byl následně měřen vzorek ředěný 50×, jehož hodnoty relativních ploch píků již ležely uvnitř rozsahu kalibrační přímky. Stanovení opakovatelnosti bylo tedy provedeno deseti měřeními 50× ředěného vzorku nektaru s obsahem vnitřního standardu laktózy 0,2 mg ml<sup>-1</sup>. K výpočtu SD a RSD byly, stejně jako v kap. 4.4, použity relativní plochy píků (Tab. 4.5) resp. relativní migrační časy (Tab. 4.6). Hodnoty RSD byly pod 2 % pro relativní plochy píků a pod 0,25 % pro relativní migrační časy, což ukazuje, že složení matrice vzorku nemá na opakovatelnost stanovení vliv.

Tab. 4.5: Opakovatelnost metody – relativní plochy píků vztažené na vnitřní standard laktózu

Měření č.	Relativní plocha píku		
	Sacharóza	Glukóza	Fruktóza
1	1,124	0,520	0,528
2	1,147	0,520	0,529
3	1,143	0,526	0,524
4	1,135	0,522	0,521
5	1,151	0,532	0,525
6	1,143	0,528	0,522
7	1,138	0,525	0,516
8	1,137	0,535	0,511
9	1,121	0,510	0,498
10	1,128	0,517	0,507
SD	0,010	0,007	0,010
RSD [%]	0,84	1,32	1,83

Tab. 4.6: Opakovatelnost metody – relativní migrační časy vztažené na vnitřní standard laktózu

Měření č.	Relativní migrační čas		
	Sacharóza	Glukóza	Fruktóza
1	0,875	1,059	1,121
2	0,875	1,059	1,121
3	0,874	1,059	1,123
4	0,873	1,060	1,124
5	0,873	1,060	1,125
6	0,873	1,060	1,125
7	0,874	1,059	1,124
8	0,874	1,060	1,124
9	0,874	1,060	1,124
10	0,868	1,063	1,131
SD	0,002	0,001	0,003
RSD [%]	0,23	0,12	0,23

Ověření výtěžnosti bylo provedeno proměřením 50× ředěného vzorku s přidavkem 0,1 mg ml<sup>-1</sup> sacharózy, glukózy a fruktózy. Měření bylo provedeno třikrát. Výpočet výtěžnosti byl proveden dle vztahu (3.5). Vypočítané hodnoty koncentrací před přidavkem a po přidavku 0,1 mg ml<sup>-1</sup> daného standardu viz Tab. 4.7. Hodnoty výtěžnosti byly 97 % pro sacharózu, 100 % pro glukózu a 105 % pro fruktózu, což dokazuje vysokou míru správnosti metody a zanedbatelný vliv matrice vzorku na stanovení.

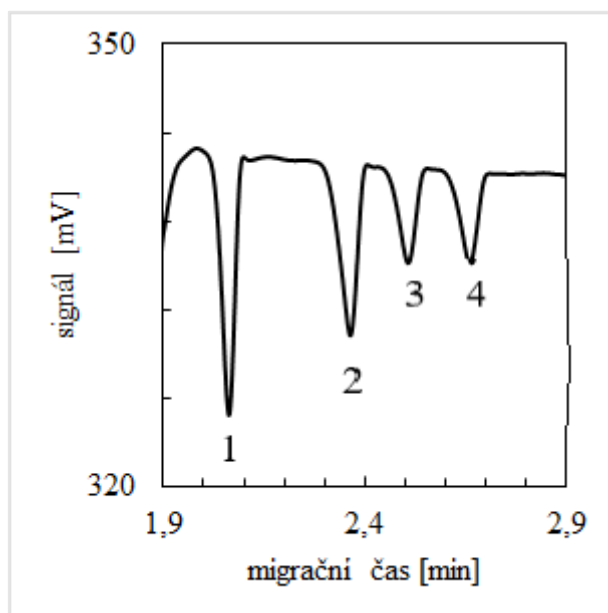
Tab. 4.7: Vypočtené hodnoty koncentrací sacharidů před a po přidavku standardu a výtěžnosti měření.

Před přidavkem	Koncentrace [mg ml <sup>-1</sup> ]		
	Sacharóza	Glukóza	Fruktóza
Medián	0,241	0,068	0,072
SD	0,002	0,002	0,001
RSD [%]	0,84	2,30	1,87
Po přidavku			
Medián	0,327	0,168	0,179
SD	0,003	0,001	0,001
RSD [%]	1,03	0,40	0,41
		Výtěžnost [%]	
Medián	96,8	99,5	105,1
SD	1,2	1,0	0,48
RSD [%]	1,24	1,04	0,45

Z kalibrační přímky (Obr. 4.8) byl vypočten obsah jednotlivých sacharidů ve vzorku. Jak již bylo zmíněno v kap. 4.7, byl měřen 50× ředěný vzorek, jehož relativní plochy píků



ležely v rozsahu kalibrační přímky. Z elektroferogramu (Obr. 4.9) je zřejmé, že metoda je dostatečně selektivní, jelikož se píky analytů nepřekrývají s žádnými píky jiných složek matrice.



Obr. 4.9: Elektroferogram 50× ředěného vzorku nektaru z květů. Základní elektrolyt 40mmol l<sup>-1</sup> NaOH, vnitřní průměr kapiláry 20 μm, celková délka 50,0 cm/efektivní délka 15,0 cm, dávkování 5 kPa × 20 s, separační napětí 15 kV; (1) sacharóza, (2) laktóza, (3) glukóza, (4) fruktóza

Vypočtený obsah sacharidů v neředěném vzorku byl 12,04 ± 0,11 mg ml<sup>-1</sup> (n = 3, 0,1 %) sacharózy, 3,41 ± 0,09 mg ml<sup>-1</sup> (n = 3, 0,08 %) glukózy a 3,58 ± 0,08 mg ml<sup>-1</sup> (n = 3, 0,07 %) fruktózy. Obsah sacharidů v neupraveném vzorku tedy byl určen na 1,204 ± 0,011 mg (n = 3, 0,1 %) sacharózy, 0,341 ± 0,009 mg (n = 3, 0,08 %) glukózy a 0,358 ± 0,008 mg (n = 3, 0,07 %) fruktózy. Interval spolehlivosti byl vypočítán dle vztahu (3.6).

## 5. Závěr

V rámci této práce byla provedena optimalizace a základní validace metody pro stanovení sacharózy, glukózy a fruktózy v nektaru z květů.

Díky použití dávkování na kratším konci kapiláry byla doba analýzy zkrácena na necelé 3 minuty. Dále bylo optimalizováno použití základního elektrolytu, jako optimální byl zvolen  $40\text{mmol l}^{-1}$  hydroxid sodný. Opakovatelnost byla ověřována deseti měřeními vzorku roztoku standardů sacharidů a následně i proměřením reálného vzorku. Bylo zjištěno, že složení matrice nemá na stanovení vliv. Dále byla ověřována také mez stanovitelnosti a mez detekce, hodnoty LOQ byly menší než  $0,009\text{ mg ml}^{-1}$  a LOD menší než  $0,003\text{ mg ml}^{-1}$ . Dalším ověřovaným parametrem byla výtěžnost, která byla vypočtena pro sacharózu, glukózu a fruktózu: 97 %, 100 % a 105 %, tím bylo zjištěno, že stanovení touto metodou je dostatečně správné.

Obsah sacharidů v neupraveném vzorku byl  $1,204 \pm 0,011\text{ mg}$  ( $n = 3, 0,1\%$ ) sacharózy,  $0,341 \pm 0,009\text{ mg}$  ( $n = 3, 0,08\%$ ) glukózy a  $0,358 \pm 0,008\text{ mg}$  ( $n = 3, 0,07\%$ ) fruktózy.

## 6. Použité literární zdroje

- [1] A. Brandenburg, A. Dell'Olivo, R. Bshary, and C. Kuhlemeier, "The sweetest thing. Advances in nectar research," *Current Opinion in Plant Biology*, vol. 12, 2009, 486–490
- [2] G. R. Wykes, "An investigation of the sugars present in the nectar of flowers of various species," *New phytology*, vol. 51, 1952, 210–215
- [3] S. W. Nicolson and R. W. Thornburg, "Nectar chemistry," in *Nectaries and Nectar*, Springer Netherlands: Dordrecht, 2007
- [4] Š. Janeček *et al.*, "Differences in Nectar Traits between Ornithophilous and Entomophilous Plants on Mount Cameroon," *Plants*, vol. 10, 2021, 1161
- [5] S. F. Y. Li, *Capillary electrophoresis: principles, practice and applications*, vol. 52. Elsevier Science Publishers B.V.: Amsterdam, 1992.
- [6] A. J. Zemann, E. Schnell, D. Volgger, and nther K. Bonn, "Contactless Conductivity Detection for Capillary Electrophoresis," *Analytical chemistry*, vol. 70, 1998, 563–567
- [7] P. Tůma and E. Samcová, "Stanovení volných aminokyselin v biologických tekutinách kapilární elektroforézou," *Chemické listy*, vol. 101, 2007, 200–207
- [8] A. J. Zemann, "Capacitively coupled contactless conductivity detection in capillary electrophoresis," *Electrophoresis*, vol. 24, 2003, 2125–2137
- [9] J. Židková and J. Chmelík, "Kapilární elektroforéza sacharidů," *Chemické listy*, vol. 94, 2000, 1093–1103
- [10] A. Zatkovskis Carvalho, J. A. F. da Silva, and C. L. do Lago, "Determination of mono– and disaccharides by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection," *Electrophoresis*, vol. 24, 2003, 2138–2143
- [11] P. Tůma, K. Málková, E. Samcová, and K. Štulík, "Rapid monitoring of mono– and disaccharides in drinks, foodstuffs and foodstuff additives by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection," *Analytica Chimica Acta*, vol. 698, 2011, 1–5
- [12] B. Vochyánová, F. Opekar, P. Tůma, and K. Štulík, "Rapid determinations of saccharides in high-energy drinks by short-capillary electrophoresis with contactless conductivity detection," *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 404, 2012, 549–1554

- [13] M. A. Dominguez, J. Jacksén, Å. Emmer, and M. E. Centurión, “Capillary electrophoresis method for the simultaneous determination of carbohydrates and proline in honey samples,” *Microchemical Journal*, vol. 129, 2016, 1–4
- [14] X. Cheng, S. Zhang, H. Zhang, Q. Wang, P. He, and Y. Fang, “Determination of carbohydrates by capillary zone electrophoresis with amperometric detection at a nano-nickel oxide modified carbon paste electrode,” *Food Chemistry*, vol. 106, 2008, 830–835
- [15] C. Sarazin, N. Delaunay, C. Costanza, V. Eudes, and P. Gareil, “Application of a new capillary electrophoretic method for the determination of carbohydrates in forensic, pharmaceutical, and beverage samples,” *Talanta*, vol. 99, 2012, 202–206
- [16] K. Weiß and M. Alt, “Determination of single sugars, including inulin, in plants and feed materials by high-performance liquid chromatography and refraction index detection,” *Fermentation*, vol. 3, 2017
- [17] E. M. Coelho *et al.*, “Simultaneous analysis of sugars and organic acids in wine and grape juices by HPLC: Method validation and characterization of products from northeast Brazil,” *Journal of Food Composition and Analysis*, vol. 66, 2018, 160–167
- [18] D. Zhao *et al.*, “Simultaneous determination of 13 carbohydrates using high-performance anion-exchange chromatography coupled with pulsed amperometric detection and mass spectrometry,” *Journal of Separation Science*, vol. 40, 2017, 1843–1854