

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra analytické chemie

**ANALÝZA EXTRAKTU Z ROSTLINNÉ DROGY *ORTHOSIPHON*
STAMINEUS POMOCÍ KAPILÁRNÍ ZÓNOVÉ ELEKTROFORÉZY**

RIGORÓZNÍ PRÁCE

HRADEC KRÁLOVÉ 2009

Mgr. JAN HAŠEK

První slova patří především školitelce *Doc. RNDr. Marii Pospíšilové, CSc.*, které děkuji za odborné vedení, cenné rady, motivaci a trpělivost při vypracování této práce. Děkuji též *Prof. RNDr. Petru Solichovi, CSc.*, vedoucímu Katedry analytické chemie za umožnění vykonání rigorózní práce. Poděkování dále patří ostatním pracovníkům katedry za ochotu a pomoc.

1. ÚVOD

Kapilární elektroforéza je instrumentální analytická metoda založená na migraci elektricky nabitých stanovovaných látek vlivem stejnosměrného elektrického pole.

Nanejvýš pozoruhodné je množství elektromigračních technik, které se od vzniku kapilární elektroforézy podařilo vyvinout, některé využívají principy i chromatografické. Jsou popsány separace neutrálních molekul, malých iontů i makromolekul, enantiomerů či mikroemulzí.

Velmi vysoká separační účinnost, které je dosahováno v kapilárách s velmi malým vnitřním průměrem, s sebou na druhé straně přináší nižší citlivost stanovení než v porovnání s kapalinovou chromatografií, které ve farmaceutické analýze zaujímá přední místo.

Avšak nižších detekčních limitů lze dosáhnout za pomoci nejrůznějších technik, které citlivost běžné CZE řádově zvýší.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZA

Pojmem kapilární elektroforéza, resp. vysokoučinná kapilární elektroforéza (High-Performance Capillary Electrophoresis, HPCE) je dnes označována celá rodina elektromigračních separačních metod realizovaných v kapilárním instrumentálním formátu.

Kapilární zónová elektroforéza (CZE) dělí ionogenní látky na základě jejich rozdílných elektroforetických pohyblivostí (mobilit) v homogenním prostředí v základním (nosném) elektrolytu.

Kapilární gelová elektroforéza (CGE) se může použít pro separaci biologických makromolekul (bílkovin, DNA). Kapilára je naplněna gelem, který působí jako molekulové síto.

Micelární elektrokinetická kapilární chromatografie (MECC, MEKC) dělí nabitě a především neutrální (hydrofobní a hydrofilní) molekuly na základě jejich rozdílných rozdělovacích koeficientů mezi vodní a micelární fázi.

Elektrochromatografie (EC, CEC) dělí nabitě i neutrální molekuly na základě jejich rozdílných rozdělovacích koeficientů mezi mobilní a stacionární fázi.

Kapilární izoelektrická fokusace (CIEF, IEF) dělí molekuly amfolytů na základě jejich rozdílných izoelektrických bodů.

Kapilární izotachoforéza (CITP, ITP) dělí ionty na základě jejich rozdílných elektroforetických mobilit na rozhraní dvou rozdílných elektrolytů.^{2,3}

Kapilární elektroforézu lze tedy použít pro analýzu jak malých ($M_r < 2000$) tak i velkých ($2000 < M_r < 100\,000$) molekul.

Pro svou účinnost dosahující stovek tisíc až milión teoretických pater a citlivost na úrovni femtomol-zeptomol (10^{-15} - 10^{-21} mol) analytu v nanolitrových objemech analyzovaných vzorků, jsou HPCE techniky považovány za nejúčinnější a nejperspektivnější analytické separační metody. Stávají se stále více uznávaným protějškem, resp. doplňkem dosud nejrozšířenějších separačních metod – různých variant vysokoučinné kapalinové chromatografie (HPLC).³

Separace probíhá v kapiláře, jejíž oba konce jsou ponořeny do nádobek s elektrolytem. K nim jsou připojeny elektrody vysokonapěťového zdroje, které vytváří

elektrické pole nutné k separaci. Na distálním konci kapiláry je umístěn detektor, který snímá elektrický signál. Tento signál je dále zpracován počítačem.⁴

2.1.1. Elektroforetická pohyblivost

Ústřední veličinou elektromigračních separačních metod je elektroforetická pohyblivost (mobilita), m , definovaná jako rychlost pohybu nabitých částic v kapalném prostředí ve stejnosměrném elektrickém poli o jednotkové intenzitě:

$$m = \frac{v}{E}$$

kde v je rychlost pohybu v elektrickém poli o intenzitě E .

Intenzita pole v kapiláře je dána podílem napětí U připojeného ke koncům kapiláry a její délky L a je svázána Ohmovým zákonem s hustotou procházejícího proudu i prostředím o specifické vodivosti κ :

$$E = \frac{U}{L} = \frac{i}{\kappa}$$

Výsledný pohyb iontu v roztoku je výsledkem působení dvou sil. Ion s nábojem q je uváděn do pohybu silou elektrického pole F_e

$$F_e = q \cdot E$$

Tento pohyb iontu o poloměru r je bržděn frikční silou prostředí, F_f , danou Stokesovým zákonem:

$$F_f = -6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r \cdot v,$$

kde v je rychlost iontu a η viskozita prostředí.

Z rovnosti těchto opačně orientovaných sil v ustáleném stavu, tj. $F_e = F_f$ lze pro elektroforetickou pohyblivost m odvodit:

$$m = \frac{v}{E} = \frac{q}{6. \pi. \eta. r}.$$

Z této rovnice vyplývá, že pohyblivost iontu je přímo úměrná jeho náboji a nepřímo úměrná jeho poloměru (velikosti, relativní molekulové hmotnosti) a viskozitě roztoku.³

2.1.2. Iontová pohyblivost

Je to znaménková veličina shodná s nábojem iontu, tedy kladná pro kationty a záporná pro anionty.¹

Kolem každého iontu v roztoku vytvářejí ionty opačného znaménka tzv. iontovou atmosféru. Interakce mezi ionty ovlivňuje pohyblivost sledovaného iontu – s rostoucí koncentrací jeho pohyblivost klesá. Pokud extrapolujeme koncentrační závislost elektroforetické pohyblivosti na nulovou iontovou sílu, získáme pohyblivost iontovou u_0 . S rostoucí teplotou se iontová síla pohyblivosti zvyšuje (zvýšením teploty o 1°C vede ke zvýšení pohyblivosti o 2%).⁴

2.1.3. Skutečná pohyblivost

Skutečná pohyblivost je charakteristickou konstantou daného iontu jen ve zcela definovaném prostředí a závisí na řadě pracovních podmínek, z nichž nejdůležitější je iontová síla a teplota.

2.1.4. Efektivní pohyblivost

Je klíčovým pojmem v elektroforéze slabých elektrolytů. Je vztažena k danému pH, iontové síle a teplotě separačního prostředí. Látka je v roztoku přítomna ve formě různých iontů či neutrálních molekul $A_0, A_1, A_2, \dots, A_n$, s iontovými mobilitami $u_0, u_1, u_2, \dots, u_n$, které jsou mezi sebou v rychlé disociační rovnováze a jejichž rovnovážné koncentrace jsou $c_0, c_1, c_2, \dots, c_n$, migruje v elektrickém poli jako jediná substance s efektivní mobilitou u_a danou vztahem

$$u_a = \sum x_i u_i,$$

kde x_i jsou molární zlomky částic $A_0, A_1, A_2, \dots, A_n$.

Efektivní mobilita je obrazem disociační rovnováhy dané látky, a je tedy velmi závislá na složení roztoku, v němž migrace probíhá. Pro slabé elektrolyty jde především o závislost na pH roztoku.

Pro efektivní mobilitu \bar{u} báze B, která v protonované formě BH^+ má iontovou mobilitu u_{BH} , platí

$$\bar{u}_B = \frac{[H^+] \cdot u_{BH}}{K_{BH} + [H^+]}$$

Pro slabou kyselinu HA platí

$$\bar{u}_A = \frac{[H^+] \cdot u_{HA}}{K_{HA} + [H^+]}$$

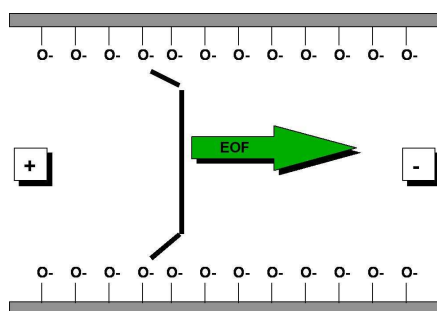
Amfolyty např. aminokyseliny typu mono-amino-mono-karboxy mohou migrovat jak katodicky, tak anodicky podle volby pH. V kyselém prostředí katodicky (jako kationy) a v zásaditém anodicky. Separace se provádí při takovém pH, při kterém jsou rozdíly v efektivních pohyblivostech separovaných látek maximální. Je třeba upozornit na oblast prakticky nulové mobility v určitém rozsahu pH. Zde je izoelektrická oblast, kdy se látka z makroskopického hlediska jeví jako elektroneutrální.^{1,4}

2.1.5. Elektroosmotický tok

Kromě elektroforetického pohybu je častým jevem v kapilárních elektromigračních metodách elektroosmotický tok (EOF). Vzniká působením stejnosměrného elektrického pole na difúzní část elektrické dvojvrstvy na rozhraní pevné a kapalné fáze u vnitřní stěny kapiláry.

Vznik elektrické dvojvrstvy je důsledkem selektivní adsorpce jednoho druhu iontů na stěnu kapiláry a/nebo disociace ionogenních skupin na vnitřním povrchu kapiláry (např. silanolových skupin Si-O⁻ v případě nejčastěji používaných křemenných kapilár). Absorbované nebo disociací vzniklé ionty vytváří na stěně mobilizovanou část elektrické dvojvrstvy, zatímco v její difúzní části směrem do roztoku zůstává přebytek volného náboje. Tím se v blízkosti stěny vytváří potenciální rozdíl, jehož část

vyskytující se v difúzní oblasti elektrické dvojvrstvy se nazývá elektrokinetický potenciál nebo též *zeta* potenciál. Působením stejnosměrného pole v podélném směru kapiláry se uvádí do pohybu nejen difúzní část elektrické dvojvrstvy, ale prostřednictvím vnitřního tření v kapalině i veškerý roztok přítomný v kapiláře. Elektroosmotický tok unáší všechny přítomné ionty stejnou rychlostí, tj. z hlediska separace působí jako neselektivní síla, významně však ovlivňuje výslednou migrační rychlost přítomných analytů a tím i účinnost separace a dobu analýzy.³



Obrázek 1 Elektroosmotický tok

V kapilární zónové elektroforéze může silný elektroosmotický tok v otevřené kapiláře udělit všem látkám vyšší rychlost, než je rychlost elektromigrace a unáší tedy všechny složky jedním směrem (obvykle ke katodě) a detekční celou tak při jednom běhu mohou projít jak kationty, tak i anionty či neutrální látky, a lze tedy získat úplnou analýzu vzorku.¹

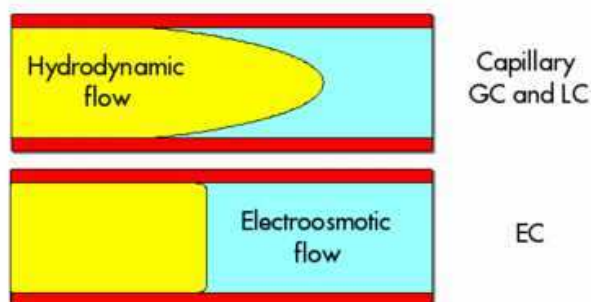
Pro lineární rychlost elektroosmotického toku, který je dán elektroosmotickou pohyblivostí m_{eo} platí vztah

$$v_{eo} = m_{eo} \cdot E = \frac{\varepsilon \cdot \zeta}{\eta} \cdot E,$$

kde ε je dielektrická konstanta prostředí a η jeho viskozita, ζ je elektrokinetický (zeta) potenciál povrchu kapiláry, který je v podstatě určen povrchovou hustotou náboje na vnitřní stěně kapiláry. Jelikož disociace ionogenních silanolových skupin na vnitřním povrchu křemenných kapilárách je závislá na pH roztoku, jímž je kapilára naplněna, je elektroosmotický tok v křemenných kapilárách silně závislý na pH nosného elektrolytu při elektromigračních separacích. Mezi pH 3 – 8 elektroosmotický tok několikanásobně

(4–5 krát) stoupá a elektroosmotická pohyblivost převyšuje elektroforetickou pohyblivost i rychlých malých iontů, např. chloridů.

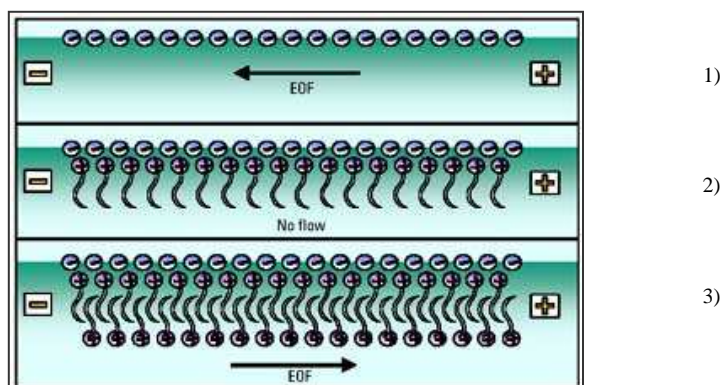
Význačnou předností elektroosmotického toku ve srovnání s laminárním prouděním hydrodynamického toku je jeho téměř pravoúhlý rychlostní profil v celém průřezu kapiláry na rozdíl od parabolického rychlostního profilu hydrodynamického toku, takže jeho příspěvek k celkové disperzi zón je zanedbatelný. Toho se zejména využívá v kombinovaných technikách elektrokinetické chromatografie a elektrochromatografie, kde elektroosmotický tok slouží jako hybná síla mobilních fází.



Obrázek 2 Rychlostní profil proudění
Hydrodynamický tok kapilární chromatografie
Elektroosmotický tok elektroforézy

Elektrokinetický potenciál a tudíž i elektroosmotický tok lze regulovat změnou složení nosného elektrolytu (pH, iontová síla), úpravou vnitřního povrchu kapiláry (kovalentní nebo dynamické povlaky) nebo též vnějším příčným povrchem.³

V praxi kapilární izotachoforézy se pro potlačení elektroosmózy a jejích negativních vlivů na separaci zón (stabilita elektroosmotického toku značně kolísá vlivem adsorpce různých nečistot vzorku či elektrolytu na elektrické dvojvrstvě) využívá zvýšení viskozity roztoku pracovního elektrolytu, snížení elektrokinetického potenciálu přidávkem neionogenních smáčedel.¹



Obrázek 3 Směr elektroosmotického toku
Elektroosmotický tok ke katodě (1)
Potlačený EOF kationaktivním tenzidem (2)
Obrácený EOF s přebytkem kationaktivního tenzidu (3)

2.1.6. Migrační čas

Elektroforetická a elektroosmotická pohyblivost stanovované látky mohou mít stejný nebo opačný směr v závislosti na náboji (kladném nebo záporném) rozpuštěné látky, takže výsledná rychlost rozpuštěné látky v je dána vzorcem:

$$v = v_{ep} \pm v_{eo}$$

Součet nebo rozdíl obou členů se použije podle toho, zda pohyblivost má stejný nebo opačný směr.

Migrační čas t , který rozpuštěná látka potřebuje k migraci po vzdálenosti l , tj. od místa nástřiku po detekční celu (efektivní délka kapiláry), je dán vzorcem:

$$t = \frac{l \cdot L}{m_{ep} \pm m_{eo}} \cdot V,$$

kde L je celková délka kapiláry a V vložené napětí.^{1,2}

2.1.7. Ovlivňování elektroforetické pohyblivosti

Při analýze směsi látek je potřeba maximalizovat rozdíly v migračních časech všech nebo alespoň hlavních komponentů vzorku. Jedna z cest, jak toho dosáhnout, je použití delší kapiláry. Nevýhodou v tomto případě je prodloužení doby analýzy. K tomuto kroku se přistupuje až po vyčerpání dalších možností. Snahou je najít takové podmínky, aby rozdíly elektroforetických pohyblivostí mezi sousedními zónami byly co největší. Toho lze dosáhnout změnou pH pracovního elektrolytu, přidavkem vhodného komplexujícího činidla, látek vytvářejících hostitelské komplexy, detergentů, přidavkem nevodného rozpouštědla nebo použitím gelu.⁴

Vliv pH pracovního elektrolytu

Změna pH pracovního elektrolytu je nejjednodušší krokem vedoucím ke změně elektroforetické pohyblivosti látek povahy slabých kyselin a bází.⁴ pH tlumivého roztoku může ovlivnit separaci změnou náboje nebo přísady např. chirálního selektoru a tím dává možnost (a nebo naopak brání) vznik nových interakcí. Vliv pH se projeví změnou elektroosmotického toku - zvýšením pH se obecně zvyšuje elektroosmotický tok.²

Při hledání optimálního pH pro separaci určitých látek je potřeba vycházet ze závislosti elektromigračních pohyblivostí těchto látek na pH pracovního elektrolytu. Vhodná hodnota pH je taková, při které je rozdíl pohyblivostí největší.⁴

Tvorba komplexů

U analyzovaných látek, které mohou vytvářet komplexy, může dojít vhodným přidáním iontu kovu nebo ligandu k tlumivému roztoku ke zlepšení jejich separace. Elektroforetická pohyblivost vzniklých komplexů se podstatně odlišuje od pohyblivosti samotného analytu. Konstanta stability komplexu závisí na druhu kovu a druhu ligandu, což vede k vysoce selektivní analýze. Takto lze využít tvorbu komplexů při analýze kovů, kde se hledá vhodný ligand a jeho koncentrace na dosažení úplné separace. Analogicky se hledá vhodný kov pro separaci ligandů např. analýza enantiomerních aminokyselin (Cu^{2+} s α -(L)-hydroxyprolinem), dipeptidů obsahující histidin (komplexy Zn^{2+}).^{4,5}

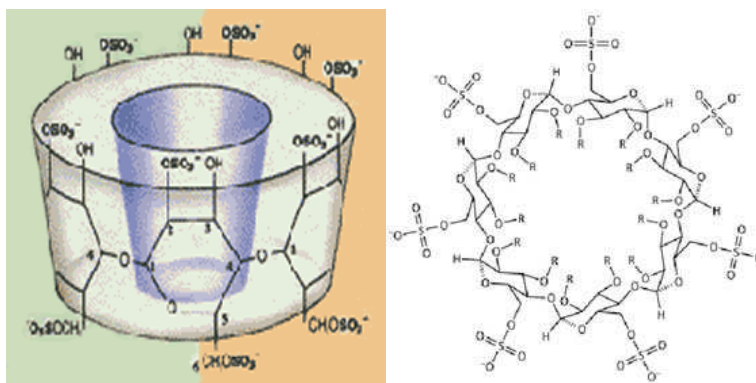
Tvorba iontových asociátů

Tvorba iontových asociátů se využívá ke snížení rychlosti migrace analytů.⁴ Ionty s vyšším nábojem vytváří díky silným coulombickým interakcím iontové asociáty s ionty opačného znaménka. Čím vyšší je náboj interagujících iontů, tím větší je snížení pohyblivosti. Nejčastěji jsou používány kyseliny a baze o vyšším náboji (např. kyselina citrónová, kyselina fytoová, spermin).²

Tvorba hostitelských komplexů

Jedná se o separace v přítomnosti cyklodextrinů (α , β , γ). Cyklodextriny jsou neionogenní oligosacharidy tvořené 6 – 8 molekulami glukózy, které vytvářejí dutý válec, na jehož obvodu jsou hydroxylové skupiny a vnitřní jádro zůstává hydrofobní

s vysokou elektronovou hustotou. Do tohoto jádra mohou vstupovat nepolární analyty nebo jejich hydrofobní skupiny a vznikají tak různé pevné hostitelské komplexy. Vzhledem k tomu, že hydroxylové skupiny na povrchu jsou chirální, vytváří cyklodextriny s chirálními separandy komplexy lišící se stabilitou, což umožňuje jejich separaci a dále rozšiřují možnost použití pro separaci analytu, které sami nenesou vlastní náboj.



Obrázek 4 Modifikovaný cyklodextrin

Jako chirální selektory se mohou používat také cyklické polyethery (crown ethery), polysacharidy a bílkoviny, popř. makrocyclická antibiotika.^{2,4,5}

Vliv nevodných rozpouštědel

Přídavkem nevodného rozpouštědla k pracovnímu elektrolytu dochází ke změně solvatace separovaných iontů, klesá stupeň disociace a vede ke změně viskozity elektrolytu a zeta potenciálu. Tím dochází k ovlivnění iontové pohyblivosti, což může zlepšit separaci. Zvýšením kritické micelární koncentrace rozpouštědla potlačují tvorbu micel. Nejčastěji se využívá methanol, ethanol, propanol, aceton, acetonitril a dimetylsulfoxid.

Přídavek organických modifikátorů do tlumivého roztoku obecně způsobuje snížení elektroosmotického toku.^{1,2,5}

Vliv síťujícího prostředí

Síťový efekt vykazují klasické, kovalentně prokřížované polyakrylamidové gely a agarózové gely. Dnes se již používají roztoky lineárních polymerů (lineárních polyakrylamid, deriváty celulózy, dextran, agaróza aj.), které na základě nekovalentních interakcí vytváří propletené sítě, vykazující síťový efekt. Ten způsobuje zpomalení rychlosti migrujících částic, tj. výsledná elektroforetická pohyblivost těchto částic je

nepřímo úměrná jejich velikosti a tyto látky jsou oddělovány v prostředí podle vzrůstajících relativních molekulových hmotností. Menší molekuly procházejí gelem snáze, větší molekuly jsou při migraci síťujícím prostředím více zpomalovány. Vliv síťujících prostředí se proto využívá pro dělení látek s rozdílnou molekulovou hmotností a velmi blízkým či identickým specifickým nábojem, např. komplexy bílkovin s ionogenním detergentem dodecylsíránem sodným (SDS), polynuklotidy a nukleové kyseliny.^{4,5}

Vliv ionogenních smáčidel

Využití nachází např. při SDS elektroforéze bílkovin. Po překročení kritické micelární koncentrace začnou ze smáčidel vznikat micely. To je podstatou micelární elektrokinetické chromatografie.³ Používají se anionaktivní, kationaktivní nebo neutrální surfaktanty (SDS, TWEEN), které způsobují modifikaci elektroosmotického toku, solubilizaci hydrofobních analytů.

2.2. KAPILÁRNÍ ZÓNOVÁ ELEKTROFORÉZA

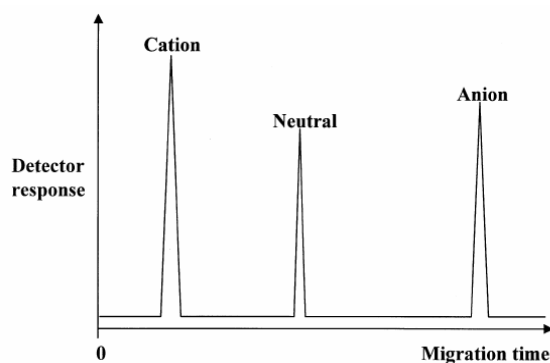
Nejjednodušší elektromigrační technikou je zónová elektroforéza, při které se jednotlivé ionogenní látky lišící se svými pohyblivostmi oddělují v homogenní prostředí základního (nosného) elektrolytu (background electrolyte – BGE). Přitom platí, že složení základního elektrolytu je konstantní podél celé migrační dráhy a nemění se s časem. Tím je samozřejmě dáno, že specifická vodivost v celé kapiláře před analýzou i během analýzy je prakticky konstantní a při průchodu konstantního elektrického proudu tímto roztokem je intenzita elektrického pole podél kapiláry všude konstantní. Odchytky vodivosti v místech, kde právě migrují zóny, jsou významné pro detekci zón, nikoli však z hlediska migrační rychlosti.

Díky konstantnímu složení základního elektrolytu, který nejen vede elektrický proud, ale i pufruje potřebnou vlastnost elektrolytu, např. pH, jsou efektivní mobility, a tím i migrační rychlosti látek vzorku, konstantní během celé analýzy.

Samozřejmě pro separaci je nutné, aby efektivní mobility, a tím i migrační rychlosti různých látek byly navzájem různé. Různé látky tvořící i směsnou zónu urazí určitou část migrační dráhy a při tom se směs rozdělí na zóny jednotlivých látek. Jednotlivé složky směsi putují rozdílnými rychlostmi úměrnými jejich pohyblivostem.

$$v_I = u_I \cdot E$$

Složky vzorku lišící se svými pohyblivostmi se v kapiláře pohybují různými elektroforetickými rychlostmi směrem k detektoru a na tomto principu se oddělují. kromě elektroforetického pohybu nabitých částic je celý objem roztoku uvnitř kapiláry uváděn do pohybu elektroosmotický tokem. V křemenných kapilárách s chemicky nemodifikovaným vnitřním povrchem je tento tok orientován směrem ke katodě a jeho rychlost je relativně vysoká (většinou vyšší než elektroforetická), takže výsledná rychlost pohybu kationů i anionů má stejný směr (katodický) a aniony i kationy mohou být separovány v průběhu jednoho experimentu.



Obrázek 5 Průběh separace dle pořadí analytů⁷

Jakmile je směs takto rozdělena na zóny jednotlivých látek, může dojít k analytickému vyhodnocení pomocí detekčního zařízení. Látky (již separované) migrují kapilárou dále, až všechny postupně projdou určitým místem, kde je detekční cela. Pohyb zón vzorku je nejčastěji sledován pomocí *on-column* UV-VIS absorpčního detektorů. Ze získaného záznamu časového průběhu absorpce, tzv. elektroforeogramu, může být získána kvalitativní a kvantitativní informace o složení analyzovaného vzorku.^{1,3.}

Z principu věci samé se při elektromigraci v kapiláře uplatňují ještě další jevy ovlivňující průběh separace, které mohou působit velmi negativně a tak jsou individuální zóny rozmývány a promíchávány.¹

2.2.1. Jouleovo teplo

Při průtoku elektrického proudu sloupcem elektrolytu o průřezu S (m^2) a měrné vodivosti χ ($\Omega^{-1} \cdot \text{m}^{-1}$) je produkováno Jouleovo teplo:

$$W = \frac{E \cdot I}{S}$$

kde W značí disipovaný elektrický výkon ($\text{W} \cdot \text{m}^{-3}$), I je elektrický proud (A) a E je intenzita elektrického pole ($\text{V} \cdot \text{m}^{-3}$).

Elektrický ohřev je hlavním limitujícím faktorem pro používání velkých elektrických napětí, a tím i proudů, a tedy i elektrických výkonů, při snaze o zrychlení analýzy. Jouleovým ohřevem se zvyšuje střední teplota zón, což má za následek jak ovlivňování efektivních mobilit migrujících látek, tak může vést i k destrukci termolabilních látek, např. k denaturaci proteinů nebo chirálních selektorů. Další problémy plynou z toho, že teplo vzniká v celém objemu sloupce elektrolytu, avšak je odváděno jenom na okrajích, kde se elektrolyt stýká se stěnami separační kolony. Tím je dáno, že vnitřní část sloupce elektrolytu je teplejší než okrajové části. Diference může být i víc než 10 K. Přítomnost teplotních gradientů má za následek nehomogenitu mobility, hustoty, pH atd. Vzhledem k teplotní závislosti mobilit (zvýšení o cca 2% na 1 K) je vliv ohřevu na rozmývání zřejmý.^{1,5}

2.2.2. Difúze

Vlivem difúze dochází k rozmývání elektroforetických zón, u kterých se nezachovává původní šířka a ostré ohraničení. Rozšiřuje zónu symetricky a výsledný je koncentrační profil má tvar Gaussovy křivky. Účinnost separace, vyjádřená jako počet teoretických pater N , dána vzorcem

$$N = \frac{(u_{ep} \pm u_{eo}) \cdot V \cdot I}{2 \cdot D \cdot L},$$

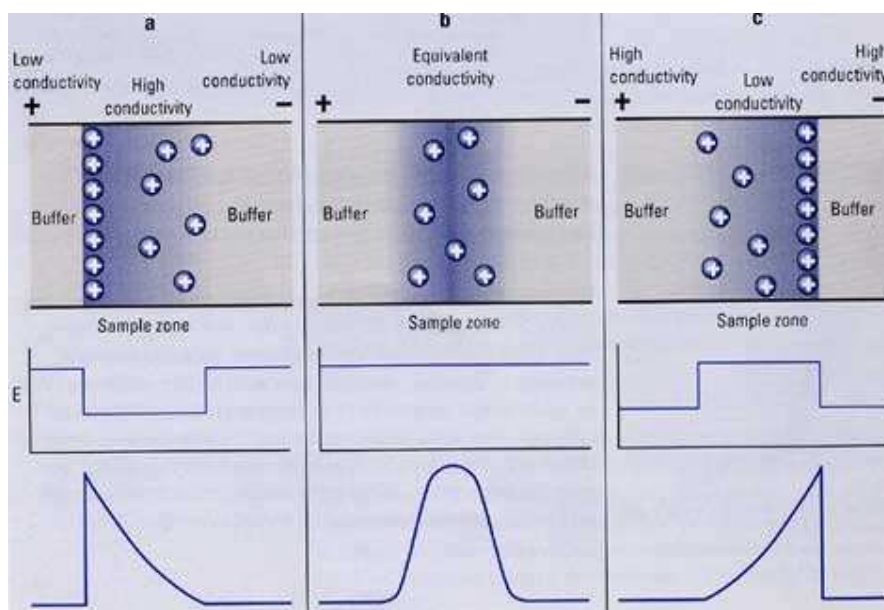
v němž D značí difúzní koeficient rozpuštěné látky v tlumivém roztoku.^{1,4}

2.2.3. Elektromigrační disperze

Elektromigrační disperze rozšiřuje zóny nesymetricky. Jde o to, že elektrická vodivost v zónách separovaných látek se liší od vodivosti základního elektrolytu tak, jak se liší jejich mobility. To způsobí, že se liší intenzita elektrického pole v jednotlivých zónách od intenzity elektrického pole v základním elektrolytu a zmíněná intenzita elektrického pole pak ovlivňuje migraci jednotlivých zón.

Pokud je mobilita vzorku A, u_A větší než mobilita základního elektrolytu u_Z , je intenzita elektrického pole v zóně A nižší než v okolí vyplněném jen základním elektrolytem. Dostane-li se tedy ion A do roztoku základního elektrolytu, pohybuje se vyšší rychlostí než ve své vlastní zóně a již se do ní nevrátí. Čelo migrující zóny A se během analýzy rozmývá, zadní rozhraní zůstává ostré, protože pomalé ionty základního elektrolytu se v zóně vzorku A zpomalí a naopak ionty vzorku A, které se dostanou do základního elektrolytu, migrují zde vyšší rychlostí a rychle se tak navracejí do své vlastní migrační zóny..

Obdobně lze popsat i migraci zóny s mobilitou nižší, než mají ionty základního elektrolytu. Je zřejmé, že během další migrace se koncentrační maximum v zóně dalším rozmíváním neustále snižuje.



Obrázek 6 Elektromigrační disperze

Pro snížení elektromigrační disperze je tedy výhodné dávkovat vzorek o nízké koncentraci.¹

2.2.4. Adsorpce

Vzhledem k tomu, že na upravených stěnách křemenných kapilár (ale i teflonových a zvláště pak skleněných) jsou vždy po naplnění elektrolytem obsaženy ionizovatelné skupiny, dochází k hromadění separovaných látek opačného náboje v blízkosti stěn separační kapiláry. Stěny se pak vůči separovaným iontům chovají jako ionex, což vede ke zvýšené sorpci, zvláště u makromolekul s malými difúzními koeficienty. Tato sorpce vede k rozmývání separovaných zón, což se obvykle projeví silným chvostováním zadního rozhraní. Někdy je fixace stěny je tak silná, že sorbovanou látku již nelze z kapiláry vymýt. Sorbované látky mohou zároveň změnit rozložení náboje podél stěn separační kapiláry, a tím i lokálně ovlivnit elektroosmotický tok. Tyto jevy vedou k rozmývání zón separovaných látek a někdy mohou i zcela znemožnit analýzu.

Tyto jevy lze ovlivnit změnou pH základního elektrolytu a v současnosti nejčastěji deaktivací stěn kapiláry.¹ K potlačení adsorpce cyklodextrinů se stěny kapiláry modifikují polymerními filmy.⁶

2.2.5. Instrumentální uspořádání

Kapilára

Nejběžnější materiál používaný pro kapiláry je tavený křemen, protože je chemicky a elektricky inertní, průhledný pro UV záření, ohebný a levný. Na vnějším povrchu je kapilára chráněna polyamidovým potahem kvůli optické detekci; část ochranného potahu je sejmuta a toto okénko je směřováno do detektoru mezi dvě kulové čočky. Kromě křemenu mohou být užity pro kapiláry i ostatní materiály, např. teflon, který je také průhledný pro UV záření, ale jeho povrch není nabitý.

Vnitřní průměr kapilár bývá v rozsahu od 10 do 100 μm . Běžný je 25 – 75 μm , na vnější straně 350-400 μm . Délka je od 10 cm pro kapiláry plněné gelem do 100 cm pro složitější vzorky. Běžně však 50 – 75 cm.

Regulace teploty

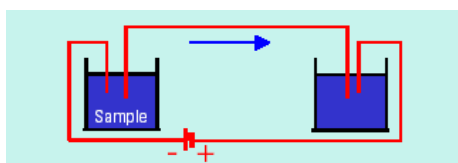
Účinná kontrola teploty kapilára de nezbytné pro reprodukovatelnost. Termostatování je dosaženo rychle proudícím vzduchem nebo kapalinou.⁷

Zdroj vysokého napětí

Zásobníky základního elektrolytu obsahují platinové elektrody pro připojení vysokonapěťového zdroje. Pracovní napětí se pohybuje od 10 do 30 kV při proudech jednotek až desítek mikroampérů.¹

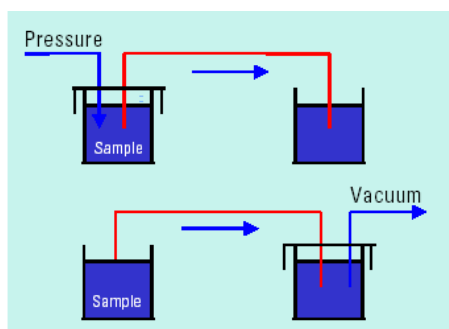
Dávkování vzorku

Je třeba reprodukovatelně dávkovat objemy jednotek nanolitrů a menší. Pro dávkování je využívána buď elektromigrace, nebo přímý vtok vzorku do kapiláry vyvolaný obvykle pod tlakem na její detekční straně.³⁶ Tradiční je dávkování elektrokinetické, kdy se konec kapiláry ponoří do zásobníku se vzorkem a určitou dobu se nechá procházet proud. Nevýhodou je to, že iontů s větší pohyblivostí (při stejné koncentraci složek) se do kapiláry dostane více iontů než iontů s menší pohyblivostí.



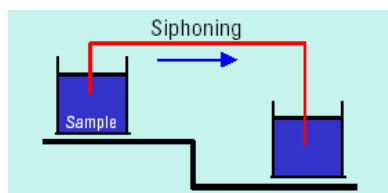
Obrázek 7 Elektrokinetické dávkování

Proto se v současné době používá spíše dávkování hydrodynamické, a to pod tlakem, nebo s využitím vakua.



Obrázek 8 Hydrodynamické dávkování

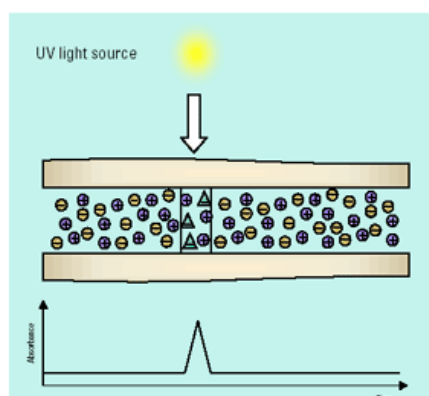
Další metodou je dávkování ponořením konce separační kapiláry do zásobníku se vzorkem a zdvižením tohoto zásobníku na několik sekund. Malé množství vzorku tak volně vteče do kapiláry působením gravitace.³⁶



Obrázek 9 Sifónový efekt

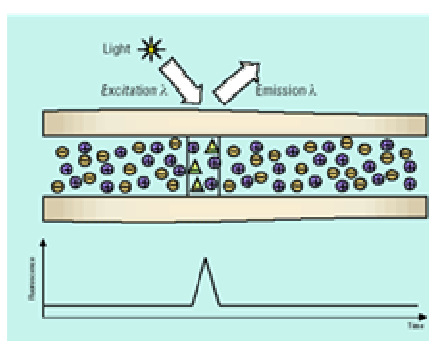
Detekce

Na detektory pro kapilární elektroforézu jsou kladeny značné požadavky – musí být schopni registrovat zónu o objemu jednotek nanolitů při koncentraci látky 0,001M a nižší, v kapiláře o průměru desítek mikrometrů v on-line uspořádání, přičemž separační kapilára je připojena na zdroj vysokého napětí a prochází jí elektrický proud.¹



UV-VIS absorpce

Absorpce v UV-BVIS oblasti je nejběžnější způsob detekce, protože je použitelná pro většinu analytů. Citlivost se udává v řádech 10^{-5} - 10^{-8} (mol/l) a vyšší je za použití nižších vlnových délek. Za použití diodového pole (Diode array) lze získat spektrální informace.



Fluorescence

Je citlivá (10^{-7} - 10^{-9}), ale obvykle vyžaduje derivatizaci vzorků. Před analýzou jsou molekuly analytu chemicky označeny flouorofory a dále separace probíhá již obvyklým způsobem. Jakmile analyt prochází detekčním oknem flouorofory se excitují a vysílají záření o jiné vlnové délce.

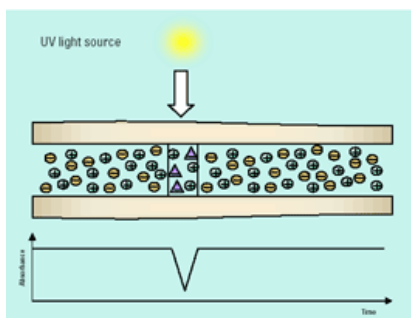
Laserem indukovaná fluorescence je mimořádně citlivá (10^{-14} - 10^{-16}), také obvykle vyžaduje derivatizaci, a je finančně nákladná.

Amperometrická detekce je velmi citlivá (10^{-10} - 10^{-11}), selektivní, ale použitelné pro elektroaktivní analyty. Je umožněna speciální elektronikou a úpravou kapiláry.

Vodivostní detekce je univerzální. Také vyžaduje speciální elektronikou a úpravou kapiláry. Citlivost dosahuje 10^{-7} - 10^{-8} mol/l.

Hmotnostní detekce je citlivá 10^{-8} - 10^{-9} a poskytuje strukturální informace.

Nepřímá UV, fluorescenční, amperometrické detekce je desetkrát až stokrát méně



citlivá, než přímé metody. Univerzální nepřímá UV zahrnuje použití pufru v kapiláře, který absorbuje záření. Jakmile analyt, který neabsorbuje projde detekčním oknem, sníží absorpci UV záření. Nepřímá detekce se používá běžně pro stanovení anorganických iontů, které neabsorbují UV.⁸

Aplikace

Metody kapilární elektroforézy mají obecně v praxi velmi široké využití. Nejranější aplikace kapilární elektroforézy byly vyvíjeny v oblasti biomolekul, např. DNA, proteinů a peptidů.

Analýzy menších molekul jako jsou např. farmaceutické substance a agrochemikálie, byly zpočátku prováděny především metodami kapalinové chromatografie HPLC. Metody CE byly zpočátku zaváděny jako alternativní metody k těmto metodám.

Z dalších aplikací CE je třeba zmínit možnosti analýzy klinických vzorků a vzorků pro soudní lékařství (např. stanovení dusičnanů v tekutinách biologického původu – sérum, mozkomíšní tekutina, moč, upravené vzorky tkáně) a v neposlední řadě anorganických (a částečně organických) anionů a kationů. Byla popsána možnost separace 26 kationtů (alkalické kovy, kovy alkalických zemin, přechodné kovy i lanthanoidy), dále se nabízí možnost screeningu anionů v široké řadě farmaceutických

preparátů, resp. jejich meziproductů. Analýza anionů a kationů v potravinách, nápojích a krmivu, sledování chlorovaných fenolů, herbicidů aj.⁹

V oblasti analýzy přírodních látek bylo např. popsáno stanovení fenolických kyselin, flavonoidů, diterpenů.^{10,11} V analýze léčiv byla metoda využita ke stanovení sildenafilu a jeho metabolitů,¹² chinolonových antibiotik v plazmě,¹³ z kationických látek jsou to např. alkaloidy.¹⁴

Významnou předností kapilární elektroforézy je možnost využití v analýze enantiomerních látek. Za zmínku stojí např. chirální separace léčiv za použití sulfatovaných cyklodextrinů: β – blokátorů, psychofarmak, aminokyselin, warfarinu, ketoprofenu a mnohých dalších.¹⁵

Český lékopis 2005 používá kapilární elektroforézu ke zkouškám na čistotu v článku *Levocabastini hydrochloridum*.²

2.3. DALŠÍ ELEKTROMIGRAČNÍ METODY

2.3.1. Izotachoforéza (ITP)

Izotachforéza je elektroforéza realizovaná v diskontinuálním systému elektrolytů. Vzorek, obsahující směs iontů jednoho typu náboje (anionty, nebo kationty), jež mají být odděleny, a téměř libovolné protionty, je vložen mezi tzv. vedoucí a koncový elektrolyt, přičemž pohyblivost dělených iontů musí být intermediární vzhledem k pohyblivosti vedoucího iontu vedoucího elektrolytu a koncového iontu koncového elektrolytu. Protiion vedoucího elektrolytu je volen tak, aby měl pufrační kapacitu při daném pH separace, protiion koncového elektrolytu je do značné míry libovolný. Pokud k takto definovanému systému připojíme stejnosměrné elektrické pole, dojde po určitém čase k vytvoření tzv. ustáleného stavu, ve kterém jednotlivé ionty vzorku putují stejnou rychlostí v bezprostředně sousedních zónách s velmi ostrými rozhraními, jejichž ostrost se díky samozastřujícímu efektu s časem nemění. V důsledku koncentračního efektu diskontinuálního elektrolytového systému je koncentrace separované látky v ITP zóně nezávislá na původní koncentraci ve vzorku, ustavuje se podle Kohlrauschovy regulační funkce a je konstantní v celém objemu zóny.³

2.3.2. Micelární elektrokinetická chromatografie

Jde o kombinovanou separační techniku, která využívá jevy elektrokinetické (elektroforézu a elektroosmózu) i principy chromatografické, tj. distribuci analyzovaných látek mezi pseudofázi tvořenou např. micelami ionogenního detergentu a vodnou fází roztoku nosného elektrolytu.³

Při micelární elektrokinetické chromatografii se separace provádí v elektrolytovém roztoku, který obsahuje tenzid v koncentraci vyšší než kritická micelární koncentrace (cmc). Molekuly rozpuštěné látky jsou rozděleny podle jejich rozdělovacích koeficientů mezi vodný tlumivý roztok a pseudostacionární fází tvořenou micelami. Je to metoda, která může být použita pro separaci jak neutrálních, tak nabitých látek při zachování účinnosti, rychlosti a instrumentální vhodnosti kapilární elektroforézy. Jedním z nejbližší používaných tenzidů v MEKC je aniontový tenzid dodecylsírán sodný, ačkoli se také používají jiné, např. kationtové tenzidy, jako jsou soli cetyltrimethylamonné.

Separací mechanismus je následující. Při neutrálním a alkalickém pH se tvoří silný elektroosmotický tok, který unáší ionty i neutrální molekuly separačního tlumivého roztoku směrem ke katodě. Pokud je jako tenzid použit dodecylsírán sodný, má elektroforetická migrace aniontových micel opačný směr, tj. k anodě. Výsledkem je, že celková rychlost migrace micel je zpomalena ve srovnání s objemovým tokem elektrolytu. V případě neutrálních rozpuštěných látek, kdy se stanovovaná látka může rozdělit mezi micely a vodný tlumivý roztok a nemá elektroforetickou pohyblivost, bude migrační rychlost stanovované látky záviset pouze na rozdělovacím koeficientu mezi micelou a vodným tlumivým roztokem. Na elektroforeogramu jsou píky nenabitých látek vždy mezi indikátorem elektroosmotického toku a indikátorem micel (čas ohraničený těmito dvěma píky se nazývá separační okno). Migrační rychlost elektricky nabitých látek závisí jak na jejich rozdělovacím koeficientu mezi micelami a vodným tlumivým roztokem, tak na jejich elektroforetické pohyblivosti v roztoku neobsahujícím micely.²

Téměř pravoúhlý (pístový) profil elektroosmotického toku, na rozdíl od parabolického profilu hydrodynamického toku přispívá k vyšší separační účinnosti ve srovnání s klasickou chromatografií.³

2.3.3. Elektrochromatografie

Kapilární elektrochromatografie (CEC) je technika analogická kapilární HPLC, tj. separační prostor je tvořen plněnou kapilární kolonou, jejíž nosič představuje stacionární fázi. Na rozdíl od HPLC však pohyb mobilní fáze není realizován tlakově vyvolaným hydrodynamickým tokem, ale elektroosmotickým tokem vyvolaným stejnosměrným elektrickým polem připojeným k oběma koncům kolony ponořených do roztoku mobilní fáze v elektrodových nádobkách. Předností je opět pravoúhlý profil elektroosmotického toku. Kromě toho v CEC lze díky absenci zpětného tlaku kolony užít menší částice sorbetu než v HPLC, což též zvyšuje účinnost separace. V některých případech může k separaci přispívat též elektrodesorbce.³

2.3.4. Izoelektrická fokusace

Izoelektrická fokusace (IEF) umožňuje dělení amfoterních látek podle jejich izoelektrických bodů, tj. podle distribuce kladných a záporných nábojů v jejich molekulách. Elektromigrace probíhá v prostředí gradientu pH, který je tvořen působením elektrického pole na komplexní směs elektrolytů, jež tvoří nosný elektrolyt této metody. Dělené látky v tomto prostředí migrují, dokud nedoputují do té části separačního prostředí, jehož pH je rovno jejich izoelektrickému bodu. Po dosažení ustáleného stavu je třeba fokusované zóny mobilizovat, aby mohly být detekovány UV-detektorem pevně umístěným u jednoho z konců kapiláry. Mobilizace se uskutečňuje buď hydrodynamickým tokem vyvolaným přetlakem nebo pod tlakem u konců kapiláry, nebo elektroelucí. Elektroeluce se vyvolá změnou složení anolytu (elektrodový roztok u anody) nebo katolytu (elektrodový roztok u katody), např. náhradou kyseliny bází nebo přidávkem solí, které způsobí anodický nebo katodický pohyb pH gradientu, a tudíž i pohyb fokusovaných zón k detektoru. K přirozené mobilizaci zón dochází při IEF v přítomnosti elektroosmotického toku v křemenných kapilárách s neupraveným vnitřním povrchem.³

2.3.5. Kapilární gelová elektroforéza

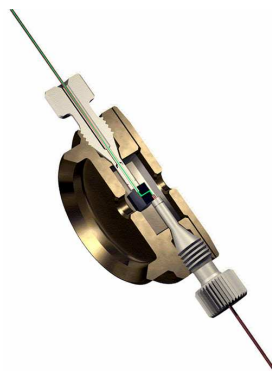
V kapilární gelové elektroforéze se separace provádí v kapiláře naplněné gelem, který působí jako molekulové síto. V tomto uspořádání se při daném poměru náboje k hmotnosti pohybují menší složky kapilárou rychleji než větší. Kapilární gelová elektroforéza se může použít pro separaci biologických makromolekul (bílkovin a fragmentů DNA) podle jejich molekulové hmotnosti. V kapilární elektroforéze se používají dva typy gelů: chemické a fyzikální. Chemické gely, jako je zesíťovaný polyakrylamid, jsou připravovány v kapiláře polymerací monomerů. Jsou obvykle navázány na křemennou stěnu a nemohou být odstraněny, aniž by nebyla zničena kapilára. Vzhledem k tuhosti těchto gelů se může používat pouze elektrokinetický nástřik.

Fyzikální gely jsou hydrofilní polymery, jako lineární polyakrylamid, deriváty celulosy, dextran atd., které mohou být rozpuštěny ve vodných separačních tlumivých roztocích za vzniku separačního média, které rovněž působí jako molekulové síto. Rozpuštěním těchto polymerů v tlumivém roztoku vznikají roztoky s nízkou viskozitou, proto se může použít jak hydrodynamický, tak elektrokinetický nástřik.²

2.4. MOŽNOSTI ZVÝŠENÍ CITLIVOSTI KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZY

Vysoká separační účinnost v kapilární zónové elektroforéze je dosažena použitím kapilár o malém vnitřním průměru (10-100 μm), což je spojeno s krátkou optickou dráhou paprsku a malým dávkovacím objemem. To limituje použití CZE v analýze velmi ředěných vzorků za přímé fotometrické detekce. Citlivost se uvádí obvykle o dva řády nižší než ve srovnání s HPLC.

Pro zvýšení citlivosti byly zkonstruovány tzv. *bubble cells*, kde je lokálně zvětšen vnitřní průměr kapiláry, nebo Z-cely, kde je kapilára přerušena, radiálně posunuta a optická dráha paprsku je tak několikanásobně prodloužena.



Obrázek 10 Z-cela

Zlepšení citlivosti lze také dosáhnout využitím jiných detekčních technik: laserem indukované fluorescenční detekce (LIF), elektrochemickou detekcí nebo hmotnostní spektroskopií. Nicméně tyto detekční systémy jsou použitelné pouze pro ty analyty, které mají vhodné vlastnosti pro detekci, nebo po jejich derivatizaci, podrobněji viz kap. 2.2.5. Tyto možnosti jsou však technicky náročnější a ekonomicky méně výhodné než on-line prekoncentrace.

Malý dávkovací objem vzorku, který nezpůsobuje přetížení kapiláry a rozmývání zón, představuje obvykle 1% objemu kapiláry. Větší objemy lze řešit on-line zakoncentrováním vzorku, a tím se počáteční délka zóny vzorku zredukuje procesem zvaný *stacking*. Ten nastane pokud vodivost nadávkované zóny vzorku je menší, než vodivost okolního elektrolytu. Po zapnutí napětí jsou ionty vzorku nuceny nést proud, který mimo zónu obstarávají ionty elektrolytu. Ionty vzorku proto musí doputovat na rozhraní vzorek/elektrolyt, čímž jsou vlastně zakoncentrovány. Proto je často výhodné mít vzorek připraven v neionizované vodě, případně zředěném elektrolytu.^{16,17,18,30}

2.4.1. Zakoncentrování z velkého objemu vzorku se změnou polaritý (Large-volume sample stacking with polarity switching)

Tato technika je jednou z *on-column* zakoncentrovávacích technik, která zvyšuje citlivost detekce. Některými autory je proces označován jako polem zvýšené dávkování vzorku - *field-amplified sample injection (FASI)*. Metoda spočívá v nadávkování velkého objemu vzorku do kapiláry a vytlačení nevodivé matrice z kapiláry vlivem elektroosmotického toku.¹²

Zakoncentrovací techniku lze použít jak v CZE, tak i v MEKC.^{12,30}

Metoda je prováděna následovně:

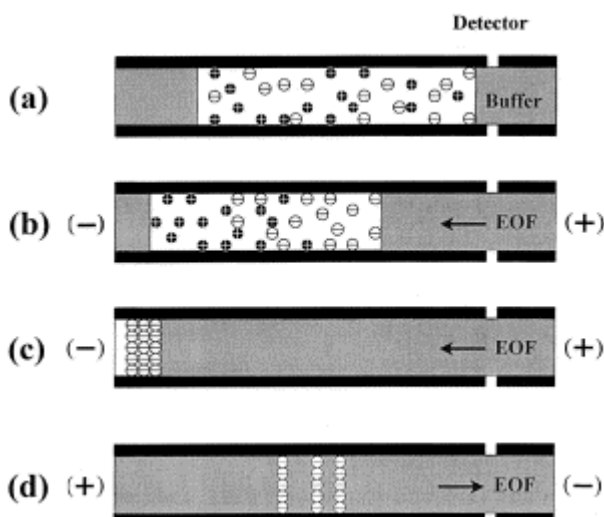
Prvním krokem je hydrodynamické dávkování velkého objemu vzorku rozpuštěného buď v pufru s nízkou vodivostí nebo pouze ve vodě. Zóna vzorku může dosahovat až k detekčnímu oknu, což je dosažitelné maximum. Představuje 50 až 85% celkového objemu kapiláry (za standartních podmínek při konvenční CZE činí množství vzorku do 1% objemu kapiláry).¹³

Druhým krokem je aplikace napětí s reverzní polaritou. Elektroda na dávkovacím konci kapiláry je nabita záporně a proto je směr elektroosmotického toku, nikoli směrem k detektoru, ale injekčnímu konci kapiláry. Anionty migrují velmi rychle přes oblast s nízkou vodivostí a postupně dosahují injekčního konce kapiláry. Absolutní hodnota napětí s reverzní polaritou během zakoncentrování může být nižší¹³ nebo stejná jako hodnota separačního napětí v modu konvenční CZE. Postupné zvyšování proudu ukazuje odstraňování matrice vzorku z kapiláry. Analyty migrují směrem k rozhraní vzorku a BGE.⁴⁰

V tomto kroku je třeba pečlivě monitorovat proud. Dlouhý čas zakoncentrování může vést ke ztrátě analytů z kapiláry a neadekvátní fokusaci a tím i špatným výsledkům.

Polarita je obrácena v okamžiku, kdy proud dosáhne hodnoty blízké původní hodnotě (95-99%), která se zjistí předchozím měřením proudu v kapiláře naplněnou pouze základním elektrolytem v normálním modu CZE. V tomto okamžiku zóna analytů dosáhla začátku kapiláry.

Třetím krok následuje po přepnutí polarity, kde je kapilára kompletně naplněná základním elektrolytem a separace probíhá za normálních podmínek. Anionty migrují ke katodě elektroosmotickým tokem.⁴⁰



Obrázek 11 Schéma procesu:
(a) hydrodynamické dávkování,
(b) a (c) aplikace reverzní polarity,
(d) klasický separační proces po přepnutí polarity

Celkový migrační čas (t_c) měřený na elektroforeogramu odpovídá času potřebného pro zakoncentrovací proces (t_z), času přepnutí polarity (t_{+-}) a migračnímu času analytu (t_m):

$$t_c = t_m + t_z + t_{+-}$$

I přesto, že některé komerční přístroje neumožní měnit polaritu, je možné zkoncentrování z velkého objemu bez přepínání polarity uskutečnit. Lze využít elektrokinetického dávkování. Vzorek je rovněž připraven tak, aby měl nízkou vodivost. Následně je proveden elektrokinetický nástřik, který zajišťuje selektivní dávkování buď jenom kationtů, nebo jenom aniontů. Pokud je elektroosmotický tok v opačném směru proti migraci nástřikovaných iontů, je nutné, aby rychlost elektroosmotického toku byla menší než rychlost migrace dávkovaných analytů. Zakoncentrování při elektrokinetickém dávkování poskytuje větší navýšení citlivosti detekce, než nabízí elektrokinetický nástřik. To je vysvětleno skutečností, že u hydrodynamického nástřiku je velikost nástřiku limitována délkou kapiláry. V tomto případě lze dosáhnout prekoncentračního faktoru víc než tisíc, což jsou nejvyšší hodnoty dosažitelné při zkoncentrování s hydrodynamickým nástřikem.³⁰

2.4.2. Izotachofóreza-kapilární elektroforéza v jedné kapiláře (single capillary isotachopheresis-zone electrophoresis)

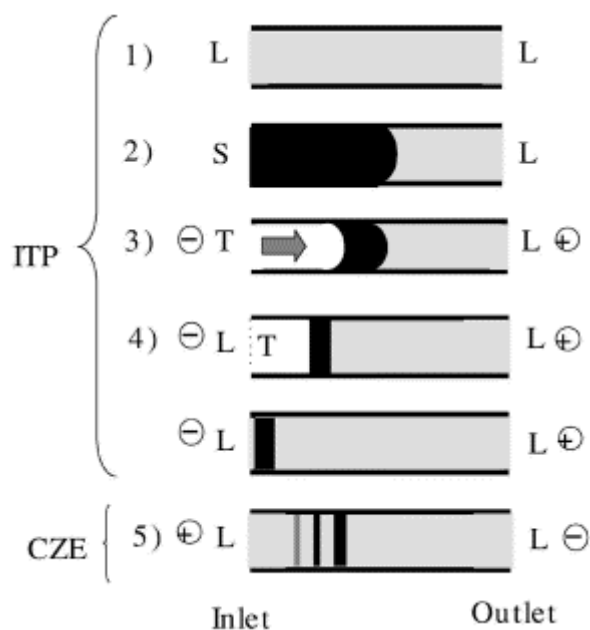
V uspořádání zónové elektroforézy s ITP zakoncentrováním vzorku v jedné kapiláře se vzorek vkládá mezi vedoucí elektrolyt, který má pohyblivost vyšší než vzorek a koncový elektrolyt s pohyblivostí nižší. Tímto diskontinuálním systémem se liší od FASI. Všechny analyty s iontovou pohyblivostí mezi LE a TE jsou zakoncentrovány v úzké zóně a migrují izotachoforeticky. Po ITP fokusaci následuje separace CZE.

Tato technika je také použitelná, pokud vzorky (biologický materiál) nejsou rozpuštěny ve vodě, ale obsahují rovněž i vodivé ionty. K hlavní výhodě uspořádání

v jedné kapiláře patří snadná automatizace a jednoduché přístrojové vybavení. Je publikována až 100-násobně vyšší citlivost oproti konvenční CZE.^{14,17}

Metoda se skládá z následujících kroků:

- Nejprve je kapilára kompletně naplněna vedoucím elektrolytem (1).
- Druhým krokem je hydrodynamické dávkování vzorku (2). Množství vzorku představuje maximálně 55 resp. 70% celkového objemu kapiláry, aniž by došlo k rozšíření zón. Vyšší objem může způsobit asymetrii píků, přetížení kapiláry a neshodu v pohyblivosti mezi analyty a co-ionty.
- Za zónu vzorku se vpraví koncový elektrolyt v množství asi 1% objemu kapiláry.
- V dalším kroku se vloží napětí s negativní polaritou ve spojení s pozitivním hydrodynamickým tlakem (3). Pozitivní tlak je směřován k detekčnímu konci kapiláry a brání migraci aniontů ven z kapiláry elektroosmotickým tokem.
- Hydrodynamický tok nezpůsobí rozmývání zón díky samozaostřujícímu efektu ITP. Doba trvání fokusačního kroku roste s délkou zóny dávkovaného vzorku a závisí na jeho matici (4).
- Jakmile se vzorek přiblíží k dávkovacímu konci kapiláry, je zóna TE z kapiláry odstraněna.
- Nádobka obsahující TE je vyměněna za nádobku s LE a polarita je přepnuta (5). Okamžik přepnutí nastává v momentě, kdy proud dosáhne asi 95% hodnoty proudu generovaného v kapiláře naplněné pouze LE.
K určení času přepnutí polarity lze využít viditelný marker jako např. bromfenolovou modř.
- Pokud je kapilára naplněna LE (=BGE) a vzorkem začne separace CZE ze normální polarity bez hydrodynamického tlaku.



Obrázek 12 Schéma ITP-CZE v jedné kapiláře

- 1) kapilára naplněná LE, 2) hydrodynamické dávkování vzorku,
- 3) zakoncentrovací krok s reverzní polaritou a pozitivním hydrodynamickým tokem,
- 4) postupné zkracování zóny TE a výměna TE za LE,
- 5) CZE separace s normální polaritou

Správné načasování okamžiku přepnutí modu ITP a CZE je velmi důležité. Jestliže ITP proces pokračuje dlouho, zóny vzorku migrují ven z kapiláry do nádoby s TE. Pokud je polarita přepnuta příliš brzo, zóna TE ještě zůstane v kapiláře a naruší homogenitu elektrického pole nezbytného pro CZE, čímž dojde k rozšíření píků.^{17,41}

2.4.3. Přechodná izotachoforéza (t-ITP)

Vhodnou kombinací dvou nebo více rozdílných pracovních elektrolytů v jedné separační kapiláře lze docílit jevu, který je označován jako přechodná izotachoforéza.

Jestliže základní elektrolyt obsahuje co-ion s nižší efektivní mobilitou než analyt, musí samotný vzorek být obohacen o vedoucí ion (např. pro separace kationtů je možno použít K^+ , NH_4^+ , Na^+) k dosažení t-ITP. Co-ion se pak chová jako koncový ion. To může být výhodou pro biologické vzorky, které často přirozeně obsahují dostatečné množství iontů s vysokou mobilitou pro uskutečnění ITP prekoncentrace. Alternativou je přidavek takovýchto solí do samotného vzorku.³⁰

Pro úspěšnou ITP prekoncentraci musí být eliminován elektroosmotický krok, polyakrylamidovým povrchem, působením TMS a přidavek 0,1% hydroxylethylcelulózy.³¹

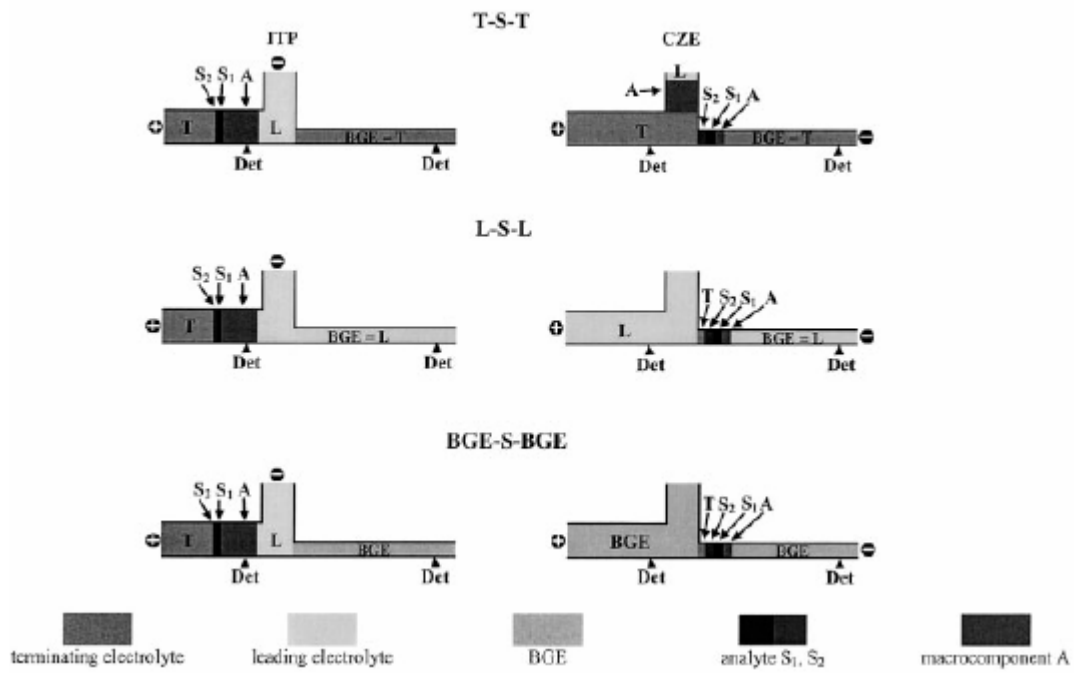
2.4.4. Kombinace ITP-CZE ve dvou kapilárách (column-coupling)

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

Výhoda techniky spočívá v zakoncentrovacím efektu ITP, která dovoluje dávkovat velký objem ředěného vzorku (10-100 μ l). Interferující a nestanovované součásti vzorku mohou být odstraněny na konci ITP kapiláry nebo je jim zabráněno vstupu do CZE kapiláry vyplavením předseparační kapiláry základním CZE elektrolytem. V ideálním případě vstoupí do separační kapiláry pouze úzká zakoncentrovaná zóna analytu. Zde hraje klíčovou roli výběr vhodného elektrolytového systému a nalezení optimálního času přepnutí proudu z předseparační do separační kapiláry.

V zásadě jsou tři způsoby k dosažení ITP-CZE separace. Ten nejjednodušší používá TE z ITP fáze jako BGE během CZE separace (T-S-T). Druhá varianta je založena na užití LE jako BGE (L-S-L). Třetí a nejkomplicovanější způsob označovaný jako (BGE-S-BGE) má zcela odlišný LE, TE a BGE.²⁶

Vnitřní průměr předseparační kapiláry je obvykle širší (0,8 mm). Kapilára musí být vybavena detektorem umožňujícím detekovat zóny makrokomponent a umožnit přesné načasování přechodu z ITP do CZE. Separační kapilára má průměr menší (0,3 mm), je naplněna BGE, kde jednotlivé zóny migrují samostatně.²⁶



Obrázek 13 Schéma variant ITP-CZE ve dvou kapilárách.

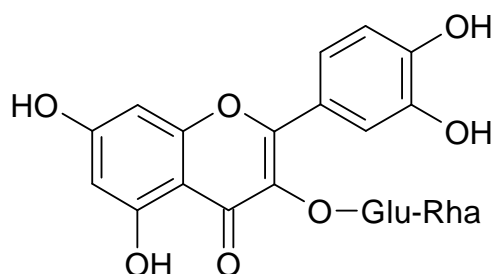
Levá část zobrazuje ITP v ustáleném stavu, pravá část začátek separace CZE.

2.5. ROSTLINNÉ POLYFENOLY

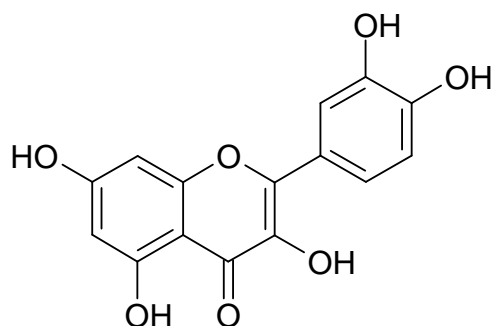
V rostlinách se vyskytují strukturně velmi různorodé fenolové sloučeniny. Nejběžnějšími jsou flavonoidy, fenolické kyseliny a lignany. V současnosti roste zájem o studium těchto přírodních látek, protože jejich příjem v potravě je dáván do souvislosti se snížením výskytu závažných onemocnění jako je rakovina a kardiovaskulární choroby. Předpokládá se, že na protektivním účinku se podílí schopnost rostlinných polyfenolů zhaset reaktivní kyslíkové radikály a zamezovat jejich tvorbu chelatací iontů přechodných kovů, především železa, které jsou schopny generovat vysoce reaktivní hydroxylové radikály. Chrání lipoproteidy o nízké hustotě před oxidační modifikací, která je považována za jeden z klíčových dějů při rozvoji aterosklerózy. Mohou také působit proti vzniku krevních sraženin a tímto způsobem snižovat riziko infarktu myokardu nebo mozkové mrtvice.¹⁹

Flavonoidy se rozdělují v závislosti na oxidačním stavu heterocyklu obsahující atom kyslíku. V rostlinách se vyskytují převážně jako β -glykosidy.

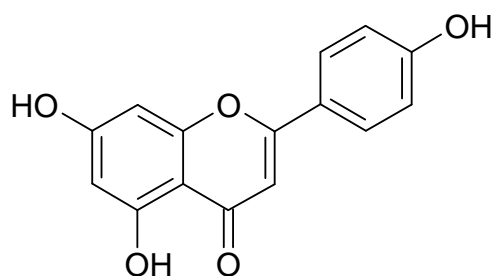
Rutin (kvercetin-3-gamnoglukosid) se používá jako venofarmakum.



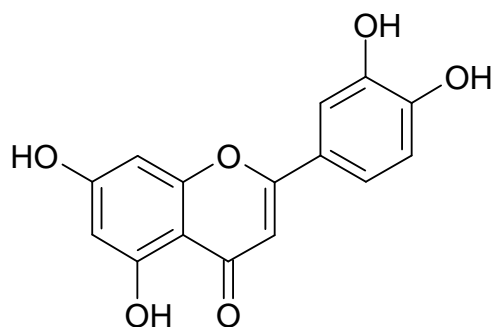
Kvercetin (3,3',4',5,7-pentahydroxyflavon) je inhibitor mitochondriální ATPázy a fosfodiesterázy. Má antiproliferační účinek na nádorové buňky.



Apigenin (4',5,7-trihydroxyflavon) zastavuje proliferaci buněk v G₂/M fázi buněčného cyklu.

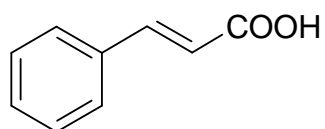


Luteolin (3',4',5,7-tetrahydroxyflavon) je silný antioxidant a zhášec volných radikálů. Uchovávání při 2-8°C.²⁰

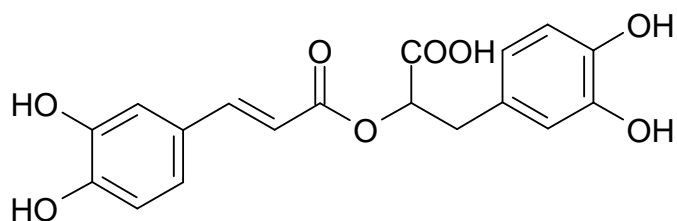


Fenolické kyseliny se nejčastěji nachází v rostlinách ve formě esterů, v nichž se váží karboxylem na hydroxylové skupiny organických kyselin nebo sacharidů.

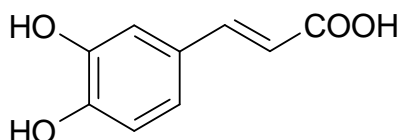
Kyselina skořicová nemá fenolickou skupinu, je v *trans* konformaci.



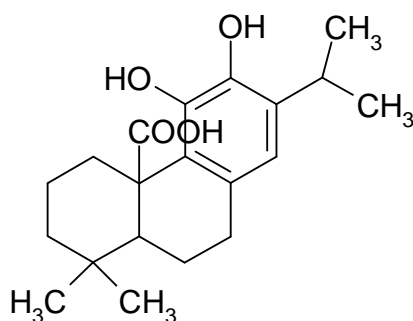
Kyselina rozmarýnová také zháší volné radikály, má též protivirový efekt.



Kyselina kávová inhibuje syntézu leukotrienů, zabraňuje Cu^{2+} -indukovanou LDL oxidaci.



Kyselina karnosolová patří mezi fenolické diterpeny s výraznými antioxidačními vlastnostmi, inhibuje peroxidaci, které je způsobena NADH a NADPH. Uchovávání -20°C .



Flavonoidy, deriváty kyseliny kávové a kyselina karnosolová jsou často obsaženy v rostlinách z čeledi hluchavkovitých (*Lamiaceae*). Karnosol a kyselina karnosolová zejména v šalvěži lékařské (*Salvia officinalis* L.) a rozmarýnu lékařském (*Rosmarinus officinalis* L.).²¹

2.6. ORTHOSIPHONIS FOLIUM

Drogu tvoří úločky usušených listů a vrcholků stonků druhu *Orthosiphon stamineus* BENTH. (*Orthosiphon aristatus* MIQ.; *Orthosiphon spicatus* BAK.).

Orthosiphon stamineus, trubkove tyčinkovitý je polokeř vyskytující se v jihovýchodní Asii (Malajsie), Austrálii a tropické Americe. Používá se jako diuretikum, při onemocnění ledvin a močového měchýře.



Obrázek 14 *Orthosiphon stamineus*

O. stamineus obsahuje chemicky aktivní složky jako terpenoidy (diterpeny a triterpeny), polyfenoly (lipofilní flavonoidy a fenolické kyseliny) a steroly.

Lipofilní flavonoidy vykazují zhášecí aktivitu proti volným radikálům a inhibují 15-lipooxygenázu. Sinensetin, eupatorin a 3'-hydroxy-5,6,7,4'-tetrametoxyflavon mají diuretický účinek. Polymethoxylované flavony se vyskytují vzácně, methoxyskupina na C-5 je u flavonoidů ojedinělý strukturní rys.

O. stamineus dále obsahuje kyselinu kávovou a její deriváty, jako je kyselina rozmarýnová a 2,3-dicaffeoyltartarová (cichorová).^{2,23,24,25}

2.7. METODY POUŽÍVANÉ PRO ANALÝZU FOLIUM ORTHOSIPHONIS

Český lékopis 2005 v monografii uvádí jako zkoušku totožnosti kromě makro- a mikroskopického hodnocení také tenkovrstvou chromatografií. Methanolický extrakt se porovnává s roztokem sinensetinu v ultrafialovém světle při 366 nm. Stacionární fázi tvoří silikagel, mobilní směs methanolu, ethylacetátu a toluenu.

Pro stanovení obsahu sinensetinu předepsána RP-HPLC směsí tetrahydrofuranu, kyseliny octové, vody a methanolu za UV detekce při 258 nm.

Publikované práce pro stanovení obsahu přírodních látek využívají kapalinovou chromatografií a jsou to:

- Separace a stanovení tří methoxylovaných flavonoidů a kyseliny rozmarýnové a kávové pomocí HPLC s reverzní fází²³
- Práce věnovaná analýze tří methoxylovaných flavonoidů a kyseliny rozmarýnové a jejich antioxidační aktivitě. Pro separaci byla použita HPLC s UV detekcí²⁴
- HPLC stanovení kyseliny kávové, cichorové a rozmarýnové, sinensetinu a eupatorinu s UV-Vis detekcí ve vodně-ethanolickém roztoku²⁵

2.8. METODY POUŽÍVANÉ PRO STANOVENÍ FENOLICKÝCH KYSELIN A FLAVONOIDŮ

ČL 2005 uvádí tenkovrstvou chromatografií jako zkoušku totožnosti rutinu, kvercetin, apigenin, kyseliny kávové. Detekce se provádí po derivatizaci pomocí UV záření. Pro stanovení obsahu kyseliny skořicové je užitá alkalimetrie.

V uveřejněných pracích se však využívají moderní separační techniky:

- Analýza fenolických sloučenin v rostlině *Perrila frutescens* L. za použití kapilární elektroforézy s elektrochemickou detekcí. Ve 100 mM borátovém pufru (pH 8,7) byl separován apigenin, luteolin, rozmarýnová a kávová kyselina²²
- Spojením ITP-CZE byl v rostlinných extraktech analyzován rutin, kvercetin, kávová a skořicová kyselina. Základní elektrolyt obsahoval rutin, 25 mM MOPSO, 50 mM TRIS a 10 mM kyseliny bortié.²⁶
- Rovněž spojením ITP-CZE byl separovány flavonoidy a fenolické kyseliny za použití analogického BGE. Obsah polyfenolů byl stanoven v červeném víně.³⁹
- Separace flavonoidů a fenolických kyselin v propolisu. Součástí BGE byl 30mM borát o pH 9.²⁷
- S využitím hmotnostního detektoru v CZE byly analyzovány flavonoidy, kyselina rozmarýnová a karnosolová v rozmarýnovém extraktu. Pufr obsahoval octan amonný, pH 9.²⁸
- Stanovení devíti flavonoidů ve víně kapalinovou chromatografií a kapilární elektroforézou v borátovém pufru.²⁹
- Separace fenolických diterpenů (kyselina karnosolová) kapilární elektroforézou v borátovém pufru a kapalinovou chromatografií včetně dalších fenolických sloučenin (apigenin).¹¹

3. CÍL PRÁCE

Cílem rigorózní práce bylo vypracování metody kapilární zónové elektroforézy s využitím stacking technik k separaci a stanovení osmi fenolických sloučenin, srovnání citlivostí stacking technik v modelové směsi a aplikace optimalizované metody na stanovení vybraných látek v extraktu z rostlinné drogy *Orthosiphon stamineus*.

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1. CHEMIKÁLIE A ROZTOKY

- Kyselina skořicová, p.a., Mr = 148,16, Sigma-Aldrich, Praha
- Kyselina kávová , p.a., Mr = 180,16, Sigma-Aldrich, Praha
- Kyselina rozmarýnová, 97%, Mr = 360,31, Sigma-Aldrich, Praha
- Kyselina karonosolová, Carnosic acid from *Rosmarinus officinalis*, Mr = 332,4, uchovávaní při -20°C, Sigma-Aldrich, Praha
- Apigenin, p.a., Mr = 270,24, Sigma-Aldrich, Praha
- Luteolin, $\geq 99\%$, Mr = 286,24, Sigma-Aldrich, Praha
- Rutin, p.a., Mr = 664,57, Rutin trihydrát 95%, Sigma-Aldrich, Praha
- Kvercetin, kvercetin dihydrát 98%, Mr = 338,36, Sigma-Aldrich, Praha
- Kyselina 4- chlorbenzoová, 99%, Mr = 156,57, Sigma-Aldrich, Praha
- p-nitrofenol, p.a., Mr = 139,11, Sigma-Aldrich, Praha
- 2,6 – dinitrofenol, p.a., Mr = 184,11 Loba – Chemie, Sien
- Kyselina chinolin-2-karboxylová, p.a. 98%, Mr = 173,17, Sigma-Aldrich, Praha
- Pyrokatechol, Mr = 110,11
- β – alanin, $> 99\%$, Mr = 89,1, Fluka, Buchs, Švýcarsko
- TASP, kyselina N- tris(hydroxymethyl)methyl-3-aminopropansulfonová, 99,5%, Mr = 243,3, Sigma-Aldrich, Praha
- TRISMA[®] BASE, tris(hydroxymethyl)aminomethan, 9,9%, Mr = 121,1, Sigma-Aldrich, Praha
- MOPSO, 3-(N-morfolino)-2-hydrohypropansulfonová kyselina, $> 99\%$, Mr = 225,3, Sigma-Aldrich, Praha
- α – cyklodextrin, p.a., Mr = 972,86, Sigma-Aldrich, Praha
- Hydroxid sodný p.ai, Mr = 40,00, Merck
- Tetraboritan sodný, p.a., Mr = 381,37, Lachema Brno
- Methanol Chromasol[®] for HPLC, Mr = 32,04, Sigma-Aldrich, Praha
- Kyselina fosforečná, p.a., Lachema Neratovice
- Orthosiphon stamineus, trubkovec tyčinkovitý, 50 g, surovina pro bylinný čaj, Natura, zakoupeno v Lékárně Pharmacentrum, Bří. Štefanů 895, 500 02 Hradec Králové

4.1.1. Příprava roztoků

Příprava standardních a pracovních roztoků

Připravoval jsem dvě sady roztoků, první obsahoval fenolické kyseliny a druhá flavonoidy.

Na analytických vahách jsem postupně odvážil přesně 0,0500 g kyseliny skořicové, karnosolové, rozmarýnové a kávové, které jsem kvantitativně převedl methanolem do 50 ml odměrné baňky. Po rozpuštění jsem methanolem doplnil po značku a roztok zbavil plynů v ultrazvukové lázni po dobu 10 min. Koncentrace kyselin v tomto roztoku byla 100 µg/ml. Analogicky jsem dále na analytických vahách postupně navážil přesně 0,0500 g rutinu, kvercetin, apigenin, luteolin rozpustil v methanolu, doplnil po rysku a odplynil v ultrazvukové lázni. Tím vznikl roztok s obsahem 100 µg/ml flavonoidů. Zásobní roztoky jsem uchovával v lednici. V čas potřeby jsem naředěním ultračistou vodou a methanolem připravil pracovní roztoky tak, aby každý obsahoval 10% methanolu.

Příprava kalibračních roztoků

Vycházel jsem ze standardních methanolického roztoku analytů o koncentraci 100 µg/ml. Naředěním ultračistou vodou a methanolem jsem připravil sadu kalibračních roztoků o koncentraci 0,2; 0,6; 1,0; 1,4 resp. 1,8 µg/ml, roztoky obsahovaly 10% methanolu.

Příprava pracovního elektrolytu

Vypočítané množství tetraboritanu sodného (0,9534 g) jsem rozpustil v 45 ml vody. Po rozpuštění jsem přidávkem kyseliny fosforečné 0,1 M upravil pH na požadovanou hodnotu a doplnil vodou v odměrné baňce na 50 ml po rysku. Tak jsem připravil roztok 50 mM tetraboritanu sodného o pH 9.

Příprava vzorku

K přípravě vzorku jsem použil 1,000 g sušené natě trubkovce tyčinkovitého. Droga byla předem upráškována v mixéru. Po převedení do odměrné baňky na 25 ml jsem doplnil methanolem po rysku. Směs byla ponechána v ultrazvukové lázni na 30 min a zfiltrována přes filtrační papír. Tento výluh byl uchováván v lednici a v případě potřeby byl naředěn vodou v poměru 1:10 a přefiltrován membránovým filtrem

Millex[®] - LCR 0,45 μm a odplyněn v ultrazvuku. Získal jsem roztok, který jsem použil pro měření. Roztok obsahoval 10% methanolu jako měřené roztoky standardní směsi.

4.2. PŘÍSTROJE

- Kapilární elektroforetický systém P / ACE[™]MDQ, Beckman Coulter
- Laboratorní digitální pH metr PNM 220, Radiometr Kopenhagen, přístroj byl kalibrován standardními pufrů (pH 7,00 a 10,012)
- Ultrazvuková lázeň Badelin Sonorex RK 31
- Automatické analytické váhy Sartorius 2004 MP, Göttingen, Německo
- Elektromagnetické míchačka MM 2A, Laboratorní přístroje Praha

4.2.1. Kapilární elektroforetický systém P / ACE[™]MDQ

Přístroj byl vybaven PDA detektorem (Photo diode array detektor). Separace probíhala v křemenné nepotažené kapiláře o vnitřním průměru 50 μm a o efektivní délce 50 cm a celkové délce 60 cm. Komunikaci s počítačem a řízení analýzy zajišťoval program 32 Karat Software verze 4.01 pracující pod operačním systémem Microsoft Windows NT 4.0.



Obrázek 15 Kapilární elektroforetická systém P/ACE MDQ

4.3. PRACOVNÍ A VÝPOČETNÍ POSTUPY

4.3.1. Pracovní postup

Před začátkem analýzy jsem uvedl do chodu počítač a elektroforetický systém. V programu jsem nastavil parametry pro měření. Před vlastním měřením jsem kapiláru proplachoval 15 minut 1 M roztokem NaOH a 10 minut ultračistou vodou. K docílení lepší reprodukovatelnosti migračních časů jsem kapiláru proplachoval 2 minuty 1 M NaOH, 2 minuty 0,1 M NaOH a 3 minuty roztokem pracovního elektrolytu při tlaku 137,9 kPa.

Po ukončení všech měření jsem kapiláru proplachoval 30 minut 1 M NaOH a 30 minut ultračistou vodou.

Dávkování vzorku bylo hydrodynamické při tlaku 234 mBar po dobu 99 sec.

Kapilára byla termostatována na 25°C. Detekce probíhala v UV oblasti při 200 nm, resp. 270 nm, resp. 280 nm.

4.3.2. Vývoj a optimalizace metody

Sledoval jsem tyto vlivy:

- koncentrace borátového pufru v rozmezí 10 – 50 mM,
- oblast pH 8,4 – 9,4. Úpravu pH jsem prováděl kyselinou fosforečnou 0,1 M.
- použití pufru MOPSO/TRIS/kyselina boritá a vliv pH v rozmezí 8,3 – 9,3
- použití fosfátového pufru
- separace v systému TAPS/TRIS/kyselina boritá
- přidavek 10mM α -cyklodextrinu do roztoků jednotlivých elektrolytů
- volba vhodného vnitřního standardu
- testování jednotlivých stacking technik s použitím různých elektrolytových systémů
- testování délky fokusačního kroku, množství nadávkovaného vzorku

4.3.3. Měření kalibrační závislosti

Pro měření kalibrační závislosti jsem jako pracovní elektrolyt používal 50 mM borát. Roztokem kyseliny fosforečné jsem pH upravil na hodnotu 9,0. Získal jsem záznamy pro následující koncentrace kyselin: 0,2 µg/ml, 0,6 µg/ml, 1,0 µg/ml, 1,4 µg/ml, 1,8 µg/ml, a použil jsem metodu přidavku vnitřního standardu. Vnitřním standardem byla kyselina 4-chlorbenzoová o koncentraci 0,5 µg/ml.

Pracovní roztoky pro měření kalibrační závislosti jsem naředil v čas potřeby ze zásobních roztoků s koncentrací 100 µg/ml.

Pro každou koncentraci jsem provedl 3 paralelní měření.

Kalibrační závislost byla hodnocena pomocí programu lineární regrese na PC jako závislost ploch píků na koncentraci kyselin metodou s vnitřním standardem.

4.3.4. Detekční limit (limit of detection, LOD)

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

4.3.5. Opakovatelnost metody

Pro zjištění opakovatelnosti metody jsem provedl 6 měření roztoku směsi kyselin a flavonoidů o koncentraci 1 µg/ml a vnitřního standardu 0,5 µg/ml.

Hodnoty průměrů, směrodatné odchytky a relativní směrodatné odchytky jsem vypočítal podle následujících vztahů:

Směrodatná odchytky s

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

n je počet měření, x_i je jednotlivý výsledek měření a \bar{x} (*s pruhem*) průměr hodnot výsledků měření.

Relativní směrodatná odchytky s_r (v %):

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

4.3.6. Rozlišení

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

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

kde $t_{1,2}$ jsou migrační časy látek (s) a $w_{1,2}$ šířka píku při základní linii.

4.3.7. Výpočet obsahu analyzovaných látek v droze

Metodou za použití vnitřního standardu jsem získal koncentraci látky v dávkované směsi ($\mu\text{g/ml}$). Jelikož byl vzorek naředěn je třeba hodnotu vynásobit faktorem zředění, tím se získá koncentrace analytu v neředěném extraktu. Obsah analyzované látky v droze se pak vypočte:

$$m = \frac{A_{vz} \cdot c_{st} \cdot f \cdot V}{A_{st} \cdot nav},$$

kde m je obsah analyzované látky ($\mu\text{g/g}$ práškované drogy), A_{vz} , A_{st} je poměr plocha vzorku a vnitřního standardu, resp. standardu, c_{st} koncentrace standardu ($\mu\text{g/ml}$), f je faktor ředění, V celkový objem extraktu (ml) a nav značí navážku drogy (g). Po úpravě je vzorec následující:

$$m = \frac{A_{vz} \cdot c_{st} \cdot 250}{A_{st} \cdot nav}.$$

5. VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 VÝVOJ A OPTIMALIZACE METODY PRO SEPARACI A STANOVENÍ FENOLICKÝCH KYSELIN A FLAVONOIDŮ

Předmětem práce bylo nalézt vhodný elektrolytový systém pro analýzu kyseliny skořicové, rozmarýnové, karnosolové, kávové, rutinu, kvercetin, apigeninu a luteolinu, kde by došlo k jejich úplné separaci se symetrickými píky a co největší plochou. Dále bylo nutné nalézt vhodnou metodu pro zakoncentrování velmi ředěných roztoků směsi kyselin a flavonoidů s cílem zvýšit citlivost analýzy a stanovit obsah kyselin a flavonoidů v rostlinném materiálu.

A. OPTIMALIZACE CZE V KLASICKÉM MODU

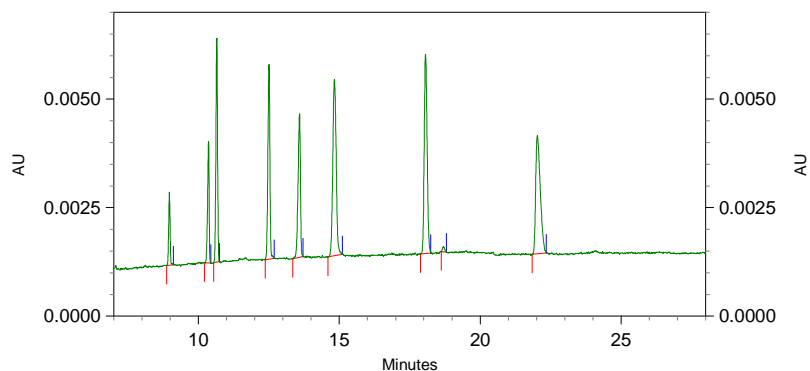
Volba pracovního elektrolytu

Jako první elektrolyt jsem vyzkoušel borátový pufr vzhledem k možnosti komplexace o-fenolických skupin kyselin a flavonoidů s boráty, který se také často vyskytuje v uveřejněných pracích jako základ pracovního elektrolytu zónové elektroforézy nebo micelární elektrokinetické chromatografie.^{27,28,32,33,34}

Dále jsem použil fosfátové pufr. Avšak i tento se v literatuře vyskytuje velmi často a to nejen v analýze přírodních polyfenolů. Proto jsem se snažil vyzkoušet méně běžné systémy jako MOPSO/TRIS/kyselina boritá nebo TAPS/TRIS/kyselina boritá, které byly s úspěchem použity jako základní elektrolyt CZE kroku při separaci flavonoidů a fenolických kyselin ve spojení s ITP jako prekoncentrační technikou v kolonovém uspořádání.^{26,35,39}

Také jsem sledoval vliv přídavku α -cyklodextrinu na kvalitu separace.

Podle očekávání přijatelné výsledky poskytovala separace v borátovém elektrolytu, píky byly velmi symetrické, rozdělené až na základní linii, která byla i při nízké koncentraci analytů relativně vodorovná. Rovněž časová náročnost separace (9 – 22 minuta) byla vzhledem k množství separovaných látek odpovídající. Na následujícím obrázku je elektroforeogram kyselin a flavonoidů s koncentrací 10 $\mu\text{g/ml}$ při pH 9 v 50mM borátovém pufru a napětí 25 kV. V tomto separačním prostředí již mohly být analyty kompletně identifikovány.

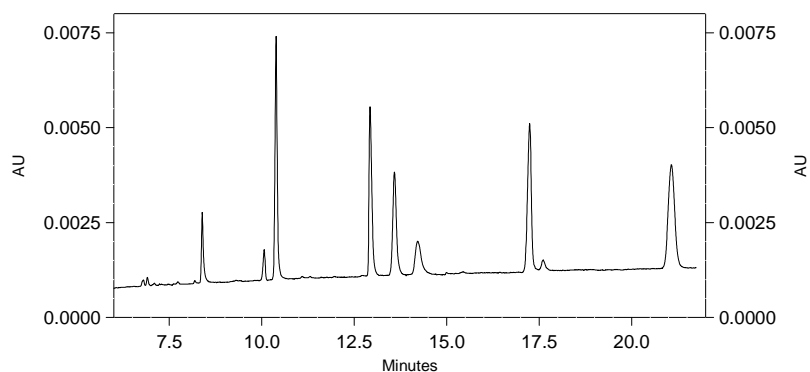


Obrázek 16 Záznam separace v borátovém pufru

50 mM Borát, pH 9, 25 kV

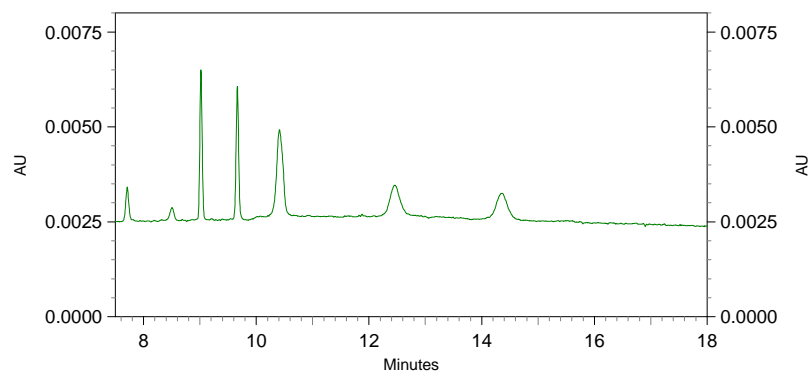
(Rutin, k. karnosolová, k. skořicová, apigenin, luteolin, kvercetin, k. rozmarýnová, k. kávová)

Rovněž separační vlastnosti fosfátového pufru byly uspokojivé. Píky byly také rozdělené na základní linii i jejich symetrie byla dobrá, avšak k úplné separaci všech osmi látek došlo až při použití ve směsi s kyselinou boritou. Následující záznam analýzy ve směsi 60mM fosfátového pufru s 20mM kyseliny borité o pH 9 ovšem ukazuje, že citlivost analýzy pro všechny látky není stejně citlivá.



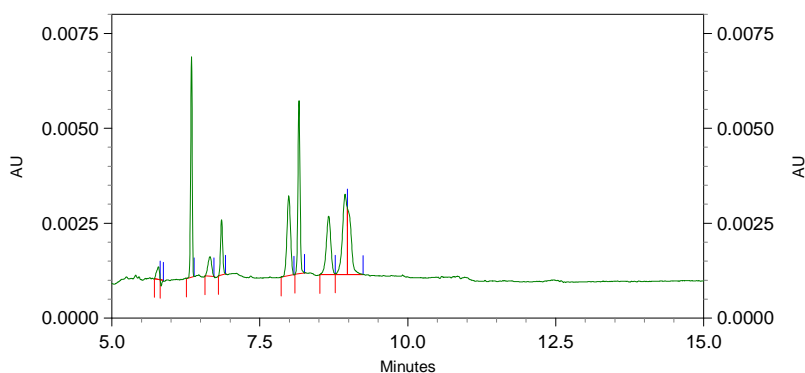
Obrázek 17 Záznam separace ve fosfátovém pufru s kyselinou boritou pH 9

Poněkud horší výsledky poskytoval pufr obsahující MOPSO, TRIS a kyselinu boritou. Vyzkoušel jsem rozmezí pH od 8,3 do 9,3; koncentrace MOPSO 25mM, TRIS 50mM a kyseliny borité 50mM. Analýza se sice zrychlila, ale při vyšším pH pravděpodobně část analytů migrovala téměř s elektroosmotický tokem a došlo k posunu základní linie. Situace se mírně zlepšila za použití diethanolaminu místo TRIS a zvýšením koncentrace MOPSO na 50 mM, kterou znázorňuje následující obrázek.



Obrázek 18 Systém MOPSO 50mM , DEA a H₃BO₃ 50mM; pH 9

Podobné vlastnosti vykazoval elektrolyt obsahující 25mM TAPS, 50mM TRIS a 55mM kyseliny borité. Měřil jsem při pH 8,75 a 9.



Obrázek 19 Systém TAPS, TRIS a H₃BO₃

Dalším bodem optimalizace složení pracovního elektrolytu byl přidavek α -cyklodextrinu v koncentraci 10 mM do výše popsaných pufrů, tj. 50 mM borát, 60 mM fosfát, 25 mM MOPSO, resp. TAPS.

Ve všech případech došlo k urychlení analýzy, ale pozitivní vliv měl přidavek cyklodextrinu pouze v případě fosfátového pufru. V borátu se zhoršila rovnost základní linie, v MOPSO symetrie píků s delším migračním časem a v TAPS byly rozdíly ve výškách jednotlivých píků.

Vliv koncentrace borátového pufru

B (III) má schopnost selektivní tvorby komplexů s analyty obsahující

o-hydroxylové skupiny za vzniku negativně nabitých komplexů a tím dochází k usnadnění jejich separace.³² Strukturální předpoklad splňuje kyselina rozmarýnová, kávová, karnosolová a z flavonoidů glykosid rutin, dále pak kvercetin a luteolin.

Zjišťoval jsem vliv koncentrace elektrolytu při pH = 9 na separaci z hlediska rozlišení píků a délky analýzy. Proměřil jsem koncentrace 10, 25 a 50 mM.

Vysoká koncentrace elektrolytu může snížit sorpci na stěny kapiláry, ale může být příčinou vysoké tvorby Jouleova tepla. Nízká koncentrace zvýší elektroosmotický tok a způsobí krátký čas analýzy.

S rostoucí koncentrací se prodlužovala délka analýzy avšak rozlišení se významně nelišilo. Symetrie píků a velikost jejich plochy byla přijatelná při koncentraci 50 mM.

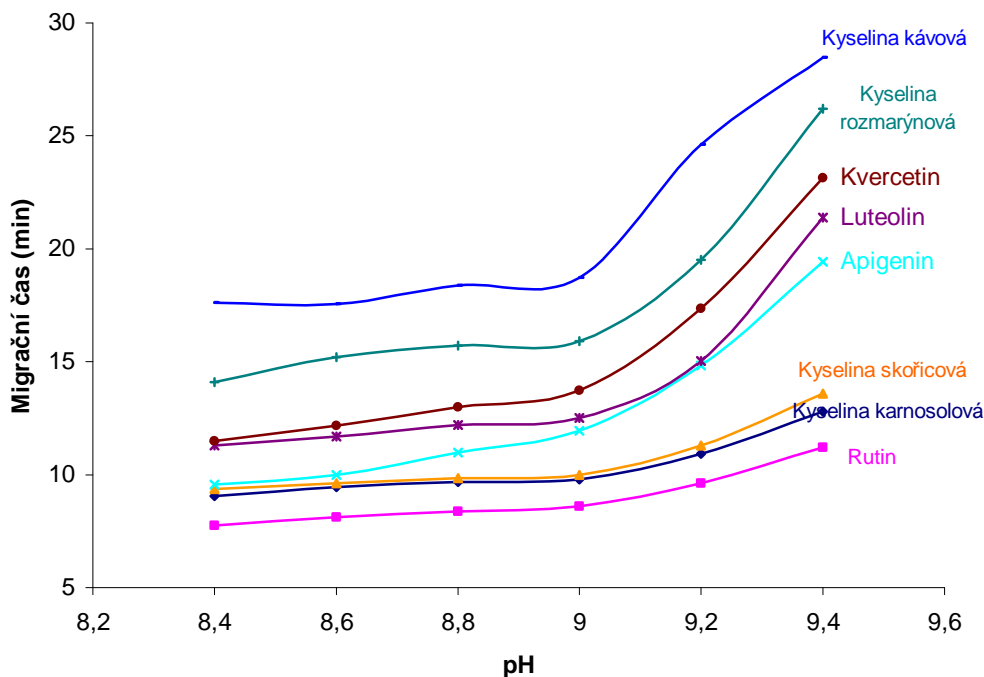
Vliv pH

pH základního elektrolytu je velmi důležitým parametrem ovlivnění elektroosmotického toku a stupně ionizace každého analytu.

Vyzkoušel jsem vliv pH na separaci při hodnotách 8,4; 8,6; 8,8; 9,0; 9,2; 9,4 v borátovém pufru s koncentrací 50mM. V této oblasti jsou kyseliny s hodnotou pK_a 3,0 – 4,5 kompletně ionizovány.³² pK_a fenolických skupin flavonoidů leží mezi hodnotou 9 a 11.²⁶

Při nižších hodnotách pH 8,4 a 8,6 byly velmi velmi blízké migrační časy píků s pořadovým číslem 2, 3 a 4 a při pH 8,4 se navíc vzájemně neseparovaly píky s pořadovým číslem 5 a 6. Při pH 8,8 nebyl vzájemně rozlišen druhý a třetí pík na elektroforeogramu při pH 9,2 zase čtvrtý a pátý pík. Při vysoké hodnotě pH 9,4 jednak došlo v nárůstu doby analýzy a rovněž ke zhoršení kvality základní linie.

Hodnotu pH 9 separačního elektrolytu jsem zvolil jako optimální, avšak poněkud problematickým místem zůstává oblast píku číslo 2 a 3 patřící kyselině karnosolové a skořicové, které se od sebe i přes velké strukturální odlišnosti podařilo separovat až na základní linii velmi těsně (obrázek 15 a 19). Hodnota pH 9 se shoduje např. s prací autora N. Volpi, který rovněž separoval flavonoidy a fenolické kyseliny.²⁷ Na následujícím grafu je znázorněn vývoj migračních časů všech analytů.



Obrázek 20 Vliv pH na separaci (50 mM Borát, pH 8,4 – 9,4)

Závislost na pH jsem dále zkoumal u základního elektrolytu obsahující 25 mM MOPSO, 50 mM TRIS a 50 mM kyseliny borité při hodnotách pH 8,3, 8,6, 9 a 9,3.

Zde nastává opět problém v účinném rozdělení dvojice kyselina karnosolová-kyselina skořicová. Ta při pH 8,3 dokonce migruje rychleji než kyselina karnosolová. Při pH 9,3 již rutin (komplexovaný borátem nejen fenolickými skupinami, ale i hydroxyly monosacharidů) migruje současně s elektroosmotický tokem patrně vlivem silného tažení k anodě. Mění se pořadí i ostatních analytů a vytváří se tak dvojice píků flavonoidů, které téměř nejsou rozděleny na základní linii.

Elektrolyt obsahující 25 mM MOPSO, 50 mM TRIS a 10 mM kyseliny borité s hodnotou pH 9 se naopak osvědčil jako BGE v kroku elektroforézy v systému ITP-CZE v kolonovém uspořádání autora M. Urbánka et al.²⁶

V tomto provedení měla však teflonová separační kapilára vnitřní průměr 0,3 mm a analyty migrovaly elektroforeticky tj. vlastní pohyblivostí, což je také patrné z pořadí analytů ze záznamu, kde nejrychleji migrující byla kyselina kávová následovaná skořicovou a nejpomalejší látkou je rutin.

Vliv obsahu α – cyklodextrinu

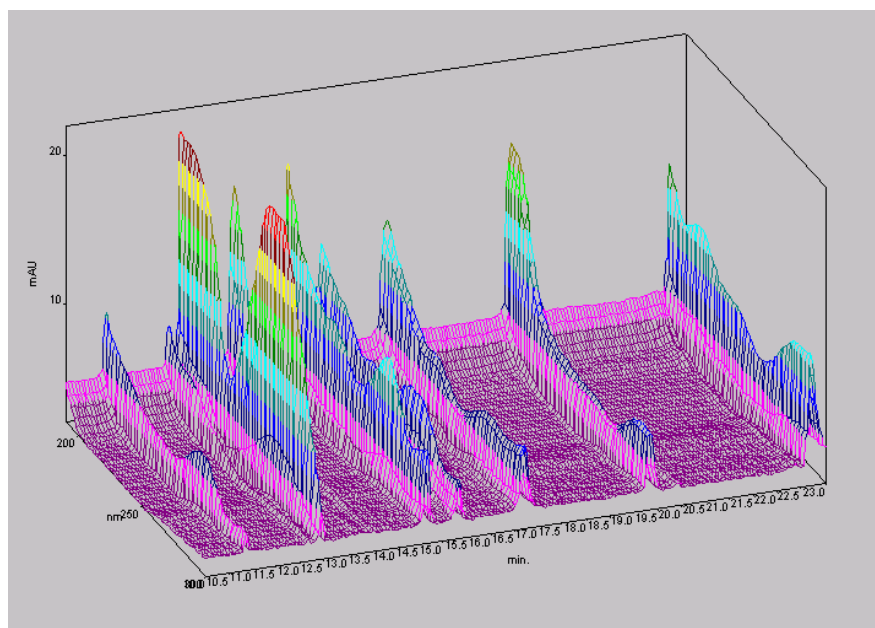
10 mM α – cyklodextrinu byl přidán do následujících elektrolytů: 50 mM borát, 60 mM fosfát s 20 mM kyseliny borité, dále 25 mM TAPS, 50 mM TRIS a 55 mM kyseliny borité a 25 mM MOPSO, 50 mM TRIS, 50 mM kyselina boritá. Hodnota pH byla nastavena na 9.

V borátu s cyklodextrinem byla celkem dobrá symetrie píků, ale došlo k mírnému rozkmitání základní linie oproti borátu samotnému. V MOPSO a fosfátu byly některé píky mírně rozšířené, převážně ty s delším migračním časem. V TAPS neměla základní linie vodorovný průběh.

Obsah cyklodextrinu nepřineslo výrazné zlepšení a proto jsem se rozhodl jej jako součást pracovního elektrolytu nepřidávat.

Detekce

Pro detekci jsem používal PDA detektor, maximum absorbance kyselin a flavonoidů bylo při vlnové délce 200 nm, další absorpční maximum některých látek je při vlnové délce 270 nm, při které např. kyselina karnosolová neabsorbovala prakticky vůbec. Následujícím obrázkem je trojrozměrný elektroforeogram směsi rutinu, kyseliny karnosolové, skořicové, apigeninu, luteolinu, kvercetinu, kyseliny rozmarýnové a kávové.

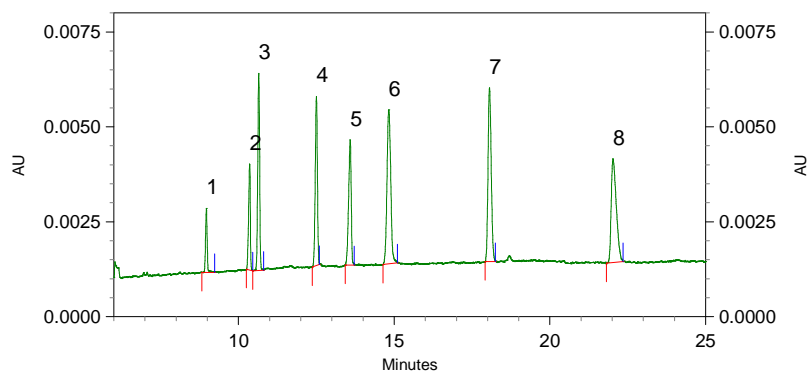


Obrázek 21 3D elektroforeogram fenolických kyselin a flavonoidů (50 mM Borát, pH 9)

Optimální podmínky separace CZE v klasickém modu shrnuje následující tabulka:

Tabulka 1 Optimální podmínky separace

OPTIMÁLNÍ PODMÍNKY SEPARACE	
BGE	Borát 50 mM
pH	9,0
Rozpouštědlo	Ultračistá voda
Teplota	25°C
Napětí	25 kV
Nástrik	50 mBar; 10 sec
Detekce	UV při 200 nm
Kapilára	Křemenná nepotažená 50 µm Délka 60 cm, efektivní 50 cm



Obrázek 22

Vzorový elektroforeogram směsi analytu při koncentraci 10 µg/ml za optimálních podmínek (tab.1)

1. Rutin, 2. K. karnosolová, 3. K. skořicová, 4. Apigenin, 5. Luteolin, 6. Kvercetin, 7. K. rozmarýnová, 8. K. kávová

Identifikace kyselin byla prováděna přidáním konkrétního analytu, což vedlo ke zvýšení výšky a plochy daného píku a porovnáním absorbance při různých vlnových délkách. Migrační časy analytů (v min) jsou: Rutin 8,9; K. karnosolová 10,3; K. skořicová 10,7; Apigenin 12,5; Luteolin 13,5; Kvercetin 14,8; K. rozmarýnová 18,0; K. kávová 22,0.

B. OPTIMALIZACE CZE ANALÝZY S VYUŽITÍM STACKING TECHNIK

Stacking techniky umožňují zakoncentrovat analyty z velkého objemu zředěného vzorku do úzké zóny, která je pak separována konvenčním způsobem.

Celkově byly vyzkoušeny následující techniky:

- Zakoncentrování z velkého objemu vzorku se změnou polarity
- Izotachoforéza-kapilární elektroforéza v jedné kapiláře
- Přechodná izotachoforéza

Výpočet délky zóny vzorku v kapiláře

Jelikož běžný nástřik v klasické kapilární zónové elektroforéze činí přibližně 1% délky separační kapiláry bylo nutné vypočítat parametry nástřiku, který by představoval asi 30, 50 i 80% délky. K tomu sloužil následující vzorec:

$$P \cdot t = \frac{plug \cdot 3200 \cdot \eta \cdot L}{d^2},$$

kde jednotlivé symboly znamenají:

P	tlak	(mBar)
plug	délka zóny	(mm)
η	viskozita	(pro vodné roztoky = 1)
L	delka kapiláry	(cm)
d	průměr kapiláry	(μm),

a po úpravě dostáváme rovnici:

$$plug = \frac{P \cdot t \cdot d^2}{3200 \cdot \eta \cdot L}.$$

Software přístroje umožňoval dobu nástřiku maximálně 99 sec a proto byl proměnnou veličinou při použití kapiláry 60 cm x 50 μm tlak. Parametry nástřiku shrnuje tabulka 2.

Tabulka 2 Údaje o dávkování vzorku

ÚDAJE O DÁVKOVÁNÍ VZORKU		
Délka zóny vzorku odpovídá objemu kapiláry kapiláry:	Tlak (mBar)	Čas (sec)
1%	50	9,2
30%	139,63	99
50%	232,7	99
80%	372,4	99

ZAKONCENTROVÁNÍ Z VELKÉHO OBJEMU VZORKU SE ZMĚNOU POLARITY

Princip techniky je uveden v kap.2.4.1. Systém byl aplikován na směs fenolických kyseliny a flavonoidů, při optimálních podmínkách uvedených v tabulce 1. Dávkování vzorku bylo nejprve při 100 mBar a 99 sec, přičemž bylo u dalších měření postupně zvyšováno na 140 mBar, 232,7 mBar a 372,4 mBar po dobu 99 sec. Separace začínala reverzní polaritou, tj. na dávkovacím konci kapiláry je záporná a je obrácena v okamžiku, kdy proud dosáhne hodnoty blízké původní hodnotě, kterou jsem zjistil předchozím měřením proudu v kapiláře naplněnou pouze základním elektrolytem v normálním modu CZE. Hodnota proudu se držela na 61,2 μ A.

Okamžik přepnutí polarity, resp. délka fokusačního kroku je pochopitelně přímo úměrná množství vzorku, což souvisí odstraňováním nevodivé matrice zředěného vzorku a tedy je třeba pečlivě sledovat proudový záznam analýzy. Při dávkování 100 mBar po dobu 99 sec trvá délka zakoncentrování 0,9 min.

Cílem optimalizace bylo nelézt co nejvyšší hodnoty odezvy detektoru a tím citlivost stanovení při zachování dobré opakovatelnosti a symetrie píků všech analytů.

Optimalizace velikosti nástřiku

Zvyšováním dávkovaného množství vzorku roste i plocha píků jednotlivých analytů, mírně vzrostla i délka analýzy, ale hlavně bylo obtížné určit přesný okamžik přepnutí polaroty.

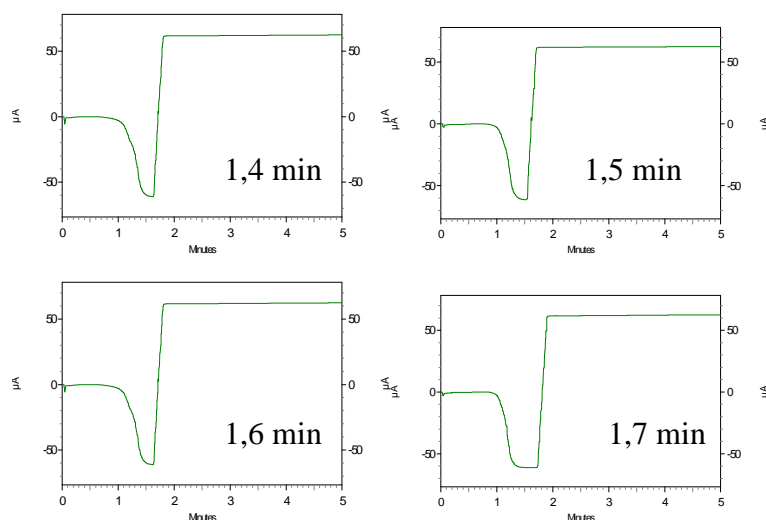
Při nástřiku, kdy zóna vzorku zaujímá asi 80% délky kapiláry (372,4 mBar, 99 sec) bylo na proudovém záznamu patrné jen velmi pozvolné dosažení hodnoty proudu (2,4 min), což s sebou přináší i riziko úniku rychleji migrujících analytů.

Proto jsem jako optimální hodnotu zvolil nástřik 234 mBar, 99 sec, který odpovídá zaujmutí asi 50% délky kapiláry.

Optimalizace délky fokusačního kroku

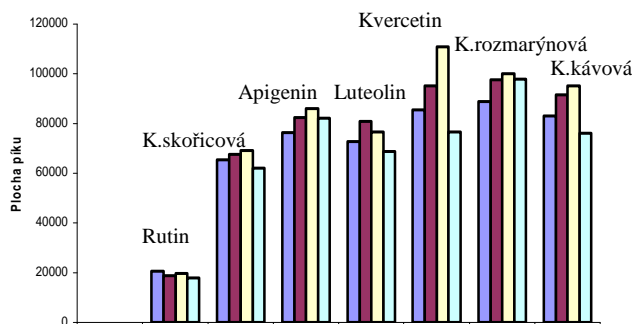
Testoval jsem vliv přepnutí polaroty na citlivost separace směsi analytů o koncentraci 1 $\mu\text{g/ml}$ za optimálních podmínek při nástřiku 234 mBar, 99 sec.

Měřil jsem plochu píků jednotlivých látek při analýzách s okamžikem přepnutí polaroty v 1,4; 1,5; 1,6 a 1,7 min.



Obrázek 23 Proudové záznamy, doba přepnutí polaroty

Z grafu vyplývá, že plochy píků se výrazněji nemění a nejvyšší citlivost stanovení je během měření s přepnutím v 1,6 min a na proudovém záznamu je patrná několikanásobná prodleva téměř konstantního proudu při - 61,2 μA .



Obrázek 24 Vliv doby přepnutí polarity na plochu píků

1,4 min, 1,5 min, 1,6 min, 1,7 min

Volba vnitřního standardu

V rámci zpřesnění analýzy jsem se rozhodl použít vnitřní standard, neboť jeho použití je požadováno v obecných člancích platného lékopisu u separačních metod.

Vyzkoušel jsem několik látek povahy karboxylových kyselin – kyselina 4-hydroxybenzoová, 4-chlorbenzoová a chinolin-2-karboxylová, dále trolox (syntetický flavonoid) a deriváty fenolu – pyrokatechol, p-nitronaftol, 2,4-dinitrofenol.

Pořadí látek je uvedeno v následující tabulce:

tabulka 3

Migrační čas	Analyt	Umístění na elektroforeogramu
9,56 min	Trolox	pík mezi rutinem a kyselou karnosolovou
11,9 min	Kyselina chinolin-2-karboxylová	migruje současně s kyselinou skořicovou
12,0 min	Pyrokatechol	také migruje současně s kyselinou skořicovou
13,2 min	Kyselina 4-chlorbenzoová	pík mezi kyselinou skořicovou a apigeninem
15,0 min	p-nitronaftol	pík se překrývá s luteolinem
15,1 min	2,4-dinitrofenol	migruje těsně za luteolinem
17,5 min	Kyselina 4-hydroxybenzoová	objevuje se mezi luteolinem a kyselinou rozmarýnovou

Z uvedeného vyplývá, že mezi látky použitelné jako vnitřní standardy patří trolox, kyselina 4-chlorbenzoová a kyselina 4-hydroxybenzoová. Trolox migruje poněkud brzy a

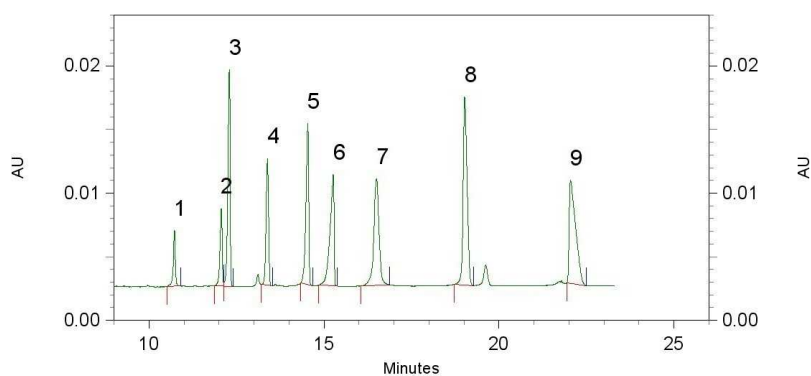
kyselina 4-hydroxybenzoová být využita nemůže, protože může být přítomna v rostlinných materiálech.²¹

Pro daný účel byl teda tedy vybrána kyselina 4-chlorbenzoová.

Optimální podmínky separace CZE se zakoncentrováním z velkého objemu vzorku se změnou polaroty shrnuje následující tabulka.

Tabulka 4

OPTIMÁLNÍ PODMÍNKY SEPARACE	
BGE	Borát 50 mM
pH	9,0
Rozpouštědlo	Ultračistá voda
Teplota	25°C
Napětí	25 kV
Nástřik	234 mBar; 99 sec
Čas přepnutí polaroty	1,6 min
Detekce	UV při 200 nm
Kapilára	Křemenná nepotažená 50 µm Délka 60 cm, efektivní 50 cm



Obrázek 25 Elektroforeogram směsi analytu při koncentrace 1 ug/ml za optimálních podmínek

(1. rutin 10,9; 2. k. karnosolová 12,2; 3. k. skořicová 12,5; 4. k. 4-chlorbenzoová (IS) 13,6; 5. apigenin 14,7; 6. luteolin 15,3; 7. kvercetin 16,8; 8. k. rozmarýnová 19,3; 9. k. kávová 22,8 min)

IZOTACHOFORÉZA-KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZA V JEDNÉ KAPILÁŘE

Tato technika se od předchozí liší tím, že proces zakoncentrování vzorku se děje mezi dvěma odlišnými elektrolyty. Jako koncový elektrolyt během izotachoforézy, který byl současně separační elektrolyt zónové elektroforézy jsem vyzkoušel 50 mM borát o pH 9, a fosfát 50 mM při pH 9 a 10. Jako vedoucí elektrolyt v izotachoforetickém kroku jsem zkoušel β -alanin pH 9 a 9,7.

Software přístroje musel být naprogramován tak, aby se umožnilo nadávkování vzorku do kapiláry obsahující BGE, za něj krátké zóny TE a během separace s obrácenou polaritou současně působit hydrodynamickým tlakem (backpressure) o velikosti 50mBar. Po kroku zakoncentrování musela být nádobka obsahující TE vyměněna za nádobku s BGE, kdy začala klasická CZE.

Volba elektrolytů

Při použití fosfátu, pH 10 jako BGE a β -alaninu, pH 9,7 se na elektroforeogramu objevil jeden dominantní pík a několik malých, nerozdělených. Pokud se pH fosfátu snížilo na 9, objevily se 4 větší píky a 2 nerozdělené. Pokud oba elektrolyty měly pH 9 došlo k téměř úplné separaci většiny látek, analýza nebyla citlivá pro všechny analyty stejně a rovněž je objevil jeden pík negativní.

Použití borátu jako BGE a β -alaninu při pH 10 se ukázalo jako nevhodné a optimální výsledky byly dosaženy za použití elektrolytů s pH 9.

Optimalizace velikosti nástřiku a trvání délky fokusačního froku

Dávkování se řídilo stejnými pravidly jako u předchozí metody, jenom s tím rozdílem, že za vzorek byl ještě nadávkován TE po dobu 4 sec.

Velikost zóny vzorku přesahující 50% délky kapiláry zvyšuje pravděpodobnost nejen ztížení určení přesného okamžiku přepnutí polarity, ale navíc zvýší riziko promíchávání vzorku s elektrolyty během fokusace vlivem působení pozitivního hydrodynamického tlaku, což by mělo za následek rozšíření píků.

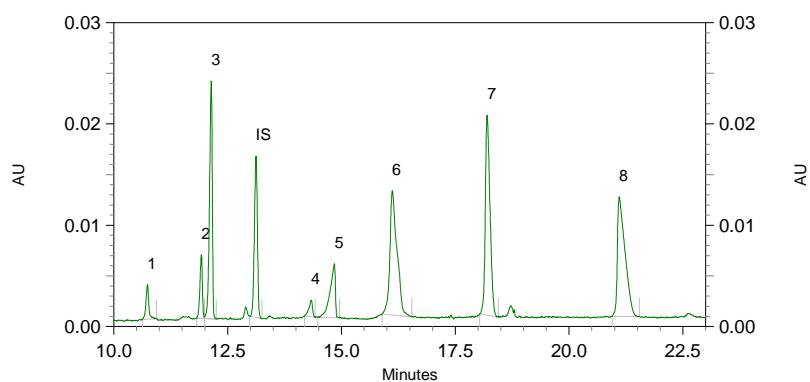
Okamžik přepnutí polarity byl asi v 1,4 min, resp. 2,9 min při dávkování odpovídajícímu 30% resp. 80% objemu kapiláry. Před vlastní CZE separací nebyla

polarita změněna skokem, ale napětí bylo přerušeno na několik vteřin z důvodu výměny nádobek s elektrolyty.

Optimální podmínky separace ITP-CZE v jedné kapiláře uvádí následující tabulka:

Tabulka 5

OPTIMÁLNÍ PODMÍNKY SEPARACE	
BGE = TE	Borát 50 mM, pH 9
LE	β -alanin 50 mM, pH 9
Rozpouštědlo	Ultračistá voda
Teplota	25°C
Napětí	25 kV
Nástřik	234 mBar; 99 sec + 4 sec TE
Čas přepnutí polarity	1,8 min
Hydrodynamický tlak	(+) 40 mBar
Detekce	UV při 200 nm
Kapilára	Křemenná nepotažená 50 μ m Délka 60 cm, efektivní 50 cm



Obrázek 26 Elektroforeogram směsi analytu při koncentraci 1 μ g/ml
(1. rutin, 2. k. karnosolová, 3. k. skořicová, 4. apigenin, 5. luteolin,
6. kvercetin, 7. k. rozmarýnová, 8. k. kávová)

Z obrázku je patrné, že se podařilo separovat všechny analyty, ale výška píků apigeninu, luteolinu a kvercetinu (č. 4,5,6) je mnohem nižší, než u předchozí metody.

PŘECHODNÁ IZOTACHOFOTÉZA

Při vývoji této metody jsem principiálně vycházel z publikované práce autorského kolektivu Chao-Cheng Wanga, který se zaměřil na separaci polyhydroxylových sloučenin rovněž s využitím komplexace boráty.³¹

Jako terminální elektrolyt a zároveň separační elektrolyt v CZE jsem použil borát a vedoucí elektrolyt – TRIS/HCl byl součástí vzorku. K potlačení elektroosmózy byl požit 0,1% roztok hydroxyethylcelulózy.

Kapilára byla naplněna 80 mm borátem, pH 10, vzorek byl dávkován na katodický konec, dále pak vedoucí elektrolyt, který obsahoval 180 mM TRIS/HCl o pH 7,5.

V dalších měřeních byla snížena koncentrace a pH borátového pufru na již osvědčených 50 mM při pH 9. Avšak ani při změnách různých parametrů měření se nepodařilo získat elektroforeogram s reprodukovatelnými a měřitelnými hodnotami. Příčinou může být např. nedostatečné zabránění elektroosmotického toku, který je v tenké křemenné kapiláře při pH kolem 9 až 10 intenzivní. C.-C. Wang použil navíc modifikaci alkyl-silanovou derivatizací kapiláry pomocí TMS.

Jako optimální metodu pro další měření jsem vybral **zakoncentrování z velkého objemu vzorku se změnou polarity** (Sample stacking polarity switching). Její předností je jednodušší provedení za použití pouze jednoho separačního elektrolytu, lepší reprodukovatelnost a především dobrá citlivost pro většinu měřených analytů. Parametry výše popisované metody shrnuje tabulka 4.

Způsobilost systému

Pro kontrolu chování elektroforetického systému kapilární zónové elektroforézy se využívají parametry způsobilosti systému. Proto byly vypočteny rozlišení (R_s) a počet teoretických pater (N).

Rozlišení (R_s)

Pro zjištění hodnot rozlišení analyzovaných látek včetně vnitřního standardu (kyseliny 4-chlorbenzoové) jsem použil software přístroje při měření za optimálních podmínek a údaje zaznamenal do následující tabulky.

Tabulka 6 Rozlišení analyzovaných látek a vnitřního standardu

Analyty	Rozlišení
Rutin – K. karnoslová	12,8
K. karnoslová – K. skořicová	2,0
K. skořicová – IS	8,9
IS – Apigenin	8,3
Apigenin – Luteolin	4,0
Luteolin – Kvercetin	5,6
Kvercetin – K. rozmarýnová	11,2
K. rozmarýnová – K. kávová	11,4

Hodnota R_s je vyšší než 1,5 a v daném systému došlo k úplnému rozlišení.

Účinnost separace

Měřítkem účinnosti separace je počet teoretických pater N

$$N = 5,545 \left(\frac{t_m}{y_{H/2}} \right)^2$$

t_m – migrační čas (s)

$y_{H/2}$ – šířka píku v polovině jeho výšky (s)

K výpočtu počtu dosažených teoretických byl rovněž použit software. Výsledky jsou uvedeny v tabulce:

Tabulka 7 Počet teoretických pater N

Analyty	N
Rutin	198945
Kyselina karnosolová	194933
Kyselina skořicová	177463
Apigenin	159156
Luteolin	81480
Kvercetin	70667
Kyselina rozmarýnová	134732
Kyselina kávová	58123

Počet teoretických pater je dostatečně vysoký a tím účinnost CZE systému dostatečná. Navržený CZE systém s využitím zakoncentrovávací techniky analytu z velkého objemu vzorku a přepnutím polaritu se ukázal jako způsobilý pro předpokládanou analýzu směsi fenolických kyselin a flavonoidů.

5.2 KVANTITATIVNÍ ANALÝZA

Kalibrační závislost

Kalibrační závislost jsem proměřil za použití optimálního pracovního elektrolytu, velikosti nástřiku a času přepnutí polarity, za použití vnitřního standardu (kyselina 4-chlorbenzoová). Jako kvantitativní parametr jsem použil plochy píků elektroforeogramu získaného pomocí UV detektoru. Plocha píků byla vyhodnocena automaticky počítačovým programem. Pro každou koncentraci jsem provedl tři měření a vypočítal aritmetický průměr. Kalibrační závislost jsem zpracoval pomocí lineární regrese na počítači.

Obecný tvar regresní rovnice (směrnice tvar přímky):

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

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

y - plocha píku/plocha píku IS

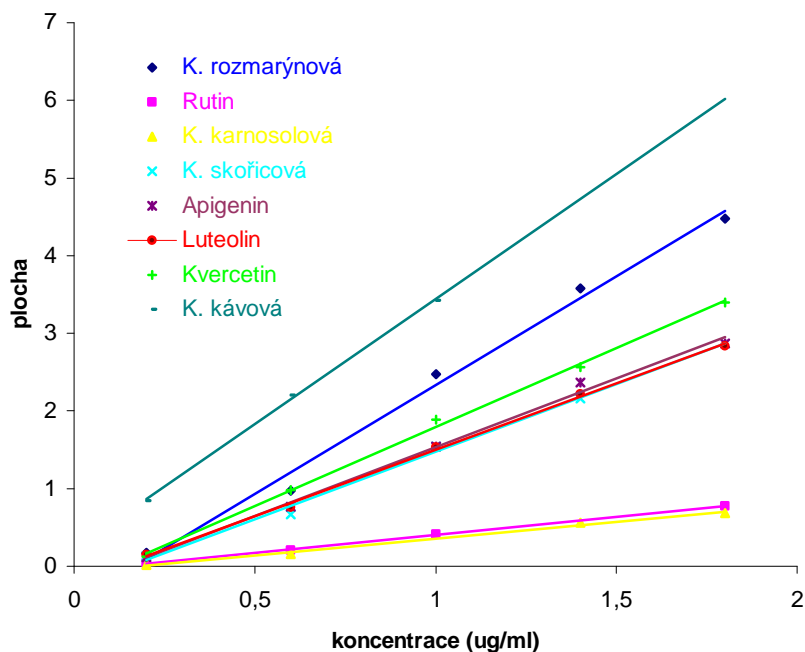
k - směrnice přímky

q - absolutní člen

Záznamy byly získány pro následující koncentrace analytů 0,2 $\mu\text{g/ml}$, 0,6 $\mu\text{g/ml}$, 1,0 $\mu\text{g/ml}$, 1,4 $\mu\text{g/ml}$, 1,8 $\mu\text{g/ml}$ a výsledky jsou uvedeny v tabulce č. 8:

Tabulka 8 Kalibrační závislosti včetně odhadu směrodatných odchylek regresních dat

Analyt	Korelační koeficient (r)	Rovnice regrese přímky	S_k	S_q	S_{res}
Rutin	0,9994	$y = 0,4644x - 0,0595$	0,011341	0,012214	0,013418
K. karnosolová	0,9972	$y = 0,4325x - 0,0762$	0,022461	0,026577	0,028412
K. skořicová	0,9959	$y = 1,745x - 0,2704$	0,102315	0,102315	0,099849
Apigenin	0,9974	$y = 1,7744x - 0,2427$	0,111635	0,08411	0,092602
Luteolin	0,9993	$y = 1,7099x - 0,2111$	0,037987	0,043644	0,04805
Kvercetin	0,9990	$y = 2,0346x - 0,2433$	0,053142	0,061055	0,067219
K. rozmarýnová	0,9956	$y = 2,8027x - 0,4672$	0,151674	0,17426	0,191854
K. kávová	0,9913	$y = 2,7748x - 0,5615$	0,118284	0,124433	0,066911



Obrázek 27 Kalibrační přímky standardů

Sledovaná závislost plochy píku/plocha píku IS na koncentraci koncentračním rozmezí 0,2– 1,8 µg/ml je lineární.

Hodnota korelačního koeficientu se pohybuje mezi 0,9913 (Kyselina kávová) a 0,9994. (Rutin)

Detekční limit a kvantitativní limit

Detekční limit byl určen analýzou látek příslušné koncentrace odpovídající poměru signálu k šumu s hodnotou 3. Nejvyšší limit vykazuje rutin, kyselina karnosolová (0,016 µg/ml) a kávová (0,014 µg/ml). Nižší detekční limit má kyselina rozmarýnová a kvercetin (0,012 µg/ml), nejnižší kyselina skořicová (0,006 µg/ml), apigenin (0,007 µg/ml) a luteolin (0,009 µg/ml).

Kvantitativní limit pro rutin a kyselinu karnosolovou je 0,053 µg/ml, pro kyselinu kávovou 0,046 µg/ml, pro kyselinu rozmarýnovou a kvercetin 0,040 µg/ml, pro kyselinu skořicovou 0,020 µg/ml, pro apigenin 0,023 µg/ml a luteolin 0,03 µg/ml.

Zakoncentrování

Porovnáním korigovaných ploch (plocha píků/migrační čas) fenolických kyselin a flavonoidů konvenční CZE se standardním nástřikem a CZE se zkoncentrováním jsem získal v průměru 60 násobné zvýšení ploch píků.

V pracích ostatních autorů je možno naleznout údaje až o 100 násobném zakoncentrování⁴⁰, většinou však literatura uvádí 40-75 násobné zvýšení citlivosti²¹.

5.3. OPAKOVATELNOST METODY

Pro ověření opakovatelnosti ploch píků a migračních časů jsem provedl šest měření pro danou koncentraci. Směrodatnou odchylku jsem vypočítal podle vztahu v kap. 4.3.5. Výsledky uvádí následující přehled:

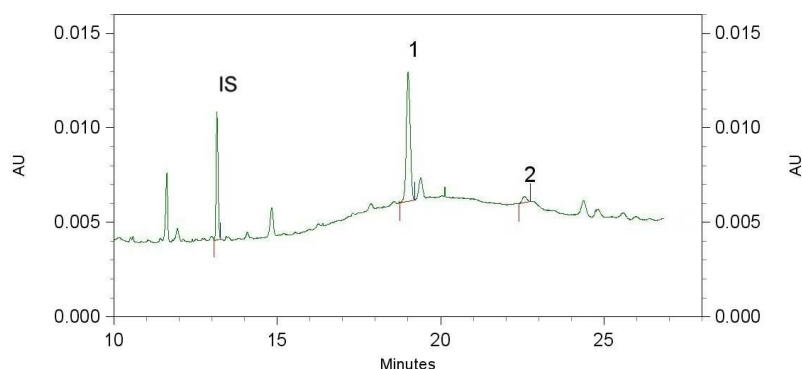
Tabulka 9 Opakovatelnost ploch píků a migračních časů při koncentraci 1,0 µg/ml

Látka	Plocha píku	Migrační čas	
	Relativní směrodatná odchylka (%)	Aritmetický průměr	Relativní směrodatná odchylka (%)
Rutin	9,30	10,81	0,13
K. karnosolová	1,99	12,05	0,11
K. skořicová	1,63	12,26	0,06
IS			
Apigenin	3,59	14,41	0,36
Luteolin	4,41	15,03	0,15
Kvercetin	5,66	16,28	0,39
K. rozmarýnová	2,36	18,53	0,30
K. kávová	3,73	21,52	0,57

Z výsledků vyplývá, že relativní směrodatná odchylka pro plochy píků se pohybuje v rozmezí 1,63 – 5,66. Poněkud vyšší hodnotu má rutin (9,30), který v systému migruje nejrychleji a stává se tak citlivější na přesnost průběhu zkoncentrování. Migrační časy mají relativní směrodatnou odchylku v rozmezí 0,06 – 0,57.

5.4. STANOVENÍ OBSAHU KYSELIN V ROSTLINNÉM EXTRAKTU

Analyzované látky obsažené v nati trubkovce byly identifikovány podobně jako u směsi standardů přidavkem konkrétního analytu, což vedlo ke zvýšení výšky a plochy daného píku. Identifikaci rovněž usnadnil překryv elektroforeogramů z analýzy extraktu a záznamu s přidavkem standardu. Pro identifikaci jsem dále použil PDA detektor a porovnal spektra píků se standardy a dále plochy píků analyzovaných látek při různých vlnových délkách. Ke kvantifikaci jsem použil vzorec v kap 4.3.7. Záznamy získané z analýzy extraktu trubkovce jsou uvedeny na elektroforeogramu.



Obrázek 28 Záznam analýzy extraktu z *Orthosiphon stamineus*

Z celé škály testovaných přírodních látek byly však v extraktu identifikovány pouze dvě. Jedné se o kyselinu rozmarýnovou, které náleží největší pík celého elektroforeogramu a dále pak kyselina kávová. Mimo rámec standardů kyselin a flavonoidů byla navíc zkoušena přítomnost kyseliny ferulové a p-kumarové, ale nebyly v extraktu identifikovány. Obsah daných konstituentů je uveden v tabulce:

Tabulka 10 Obsah stanovených látek (n = 3)

Analyzovaná látka	obsah v droze		Relativní směrodatná odchylka (%)
Kyselina rozmarýnová	0,7109 mg/g	0,0711 %	2,36
Kyselina kávová	0,0382 mg/g	0,0038 %	3,73

Kvalitativní rozbor je v souladu s literaturou, která jako hlavní fenolickou kyselinu rovněž uvádí kyselinu rozmarýnovou, dále pak kyselinu kávovou a její derivát cichorovou. Jako další obsahové látky droga obsahuje methoxylované flavony (sinensetin, eupatorin aj.), které nebyly předmětem této práce.²³

Předložená metoda, vzhledem k počtu analyzovaných látek, má přijatelnou dobu analýzy (do 25 min), srovnatelnou s publikovanými pracemi věnované konvenční CZE,^{27,28} případně rychlejší než použitím metody ITP-CZE uspořádané v dvou kapilárách.^{26,35,39}

Z hlediska dosažených detekčních limitů jsou parametry srovnatelné i s metodou HPLC, přičemž v případě některých analytů (rutin, luteolin, kvercetin kyselina kávová, kyselina rozmarýnová) je citlivost vyšší^{38,36,37}. Lepší výsledky techniky zakoncentrování z velkého objemu vzorku využitím přepnutí polarit jsou i ve srovnání se spojením ITP-CZE ve dvou kapilárách, v případě kvercetinu a rutinu jsou detekční limity nižší řádově.^{26,39}

Ve srovnání s mobilní fází HPLC nejsou součástí základního elektrolytu CZE organická rozpouštědla (methanol, acetonitril, tetrahydrofuran),^{11,23} čímž se metoda CZE stává ekonomicky a environmentálně přijatelnou.

6. ZÁVĚRY

Z výsledků mé rigorózní práce vyplývají tyto závěry:

A. ANALÝZA CZE V KLASICKÉM PROVEDENÍ, KONVENČNÍ NÁSTRÍK VZORKU

1. Pomocí kapilární zónové elektroforézy bylo analyzováno osm přírodních látek: rutin, apigenin, kvercetin, luteolin a kyselina skořicová, karnosolová, rozmarýnová a kávová.
2. Byla provedena separace v borátovém, fosfátovém pufru, dále pak v BGE obsahující MOPSO nebo TAPS. Nejlepší výsledky vykazoval opakovaně borátový pufr.
3. Byl sledován vliv koncentrace borátu na kvalitu separace v intervalu 10 – 50 mM. Pro další měření byla zvolena koncentrace 50 mM.
4. Byl studován vliv pH borátového pracovního elektrolytu na kvalitu analýzy v rozmezí 8,4 - 9,4. Jako optimální byla zvolena hodnota pH = 9.
Dále byl studován vliv pH pracovního elektrolytu obsahující MOPSO/TRIS v rozmezí hodnot 8,3 - 9,3.
5. Byl sledován vliv přídavku α – cyklodextrinu k borátovému, fosfátovému základním elektrolytu a soustavě MOPSO/Tris/kyselina boritá a TAPS/Tris/kyselina boritá. Přídavek 10mM α – cyklodextrinu nepřinesl zlepšení kvality separace v žádném separačním elektrolytu.
6. Elektroforetická separace probíhala při vloženém napětí 25 kV. Kapilára o efektivní délce 50 cm a celkové délce 60 cm byla termostatována na 25°C. Detekce probíhala při vlnové délce 200 nm. Průběh analýzy byl do 23 min.

B. CZE ANALÝZA S VYUŽITĚM STACKING TECHNIKY

Byl testovány tyto zakoncentrovávací techniky:

Zakoncentrování z velkého objemu vzorku se změnou polarity

Izotachoforéza-kapilární elektroforéza v jedné kapiláře

Přechodná izotachoforéza

7. Sledoval se vliv množství dávkovaného vzorku na kvalitu separace při hodnotách 30, 50 a 80% celkového objemu kapiláry . Jako optimální se ukázal dávkování v rozsahu 50% objemu kapiláry, které je dosaženo nástřikem 234mBar po dobu 99 sec. Doba přepnutí polarity v 1,6 min umožňovala dosáhnout nejvyšší citlivosti pro většinu analytu. Použitý BGE obsahoval borátový pufr jako u konvenční CZE.
8. Byla testována řada vnitřních standardů: kyselina 4-hydroxybenzoová, 4-chlorbenzoová a chinolin-2-karboxylová, déle trolox, pyrokatechol, p-nitronaftol, 2,4-dinitrofenol. Jako vnitřní standard byla zvolena kyselina 4-chlorbenzoová.
9. Z uvedených stacking technik byla vybrána pro další měření zakoncentrování z velkého objemu vzorku se změnou polarity (Large-volume sample stacking with polarity switching).
10. Byly měřeny kalibrační závislosti pro analyzované látky metodou s použitím vnitřního standardu v rozmezí koncentrací 0,2 µg/ml až 1,8 µg/ml. Korelační koeficienty se pohybují s rozmezí 0,9913 až 0,9994.
11. Byly zjištěny detekční limity analytu, které se pohybují v rozmezí 0,006-0,014 µg/ml; kvantitativní limity v rozmezí 0,053 – 0,03 µg/ml.
12. Vypočítané dosažené zkoncentrování analytu bylo 60 násobné.
13. Byla ověřena opakovatelnost migračních časů pro šest měření. Pro koncentraci analytů 1 µg/ml leží relativní směrodatná odchylka mezi hodnotou 0,06 – 0,57%. Pro ověření

ploch píků bylo provedeno šest jdoucích měření, relativní směrodatná odchylka se pohybuje v rozmezí 1,63 – 5,66% (pro rutin 9,30).

14. Bylo vypočítáno rozlišení mezi jednotlivými píky. Hodnoty R_S se pohybují v rozmezí 4,005 – 12,809. Mimo toto rozmezí leží dvojice kyselin karnosolová – skořicová s hodnotou R_S 2,0.

15. Byl stanoven obsah kyselin v methanolickém extraktu *Orthosiphon stamineus*. Obsah kyseliny rozmarýnové je 0,7109 mg/g (RDS = 2,36 %) práškované drogy a kyseliny kávové 0,0382 mg/g (RDS = 3,73%).

7. LITERATURA

1. Churáček J. a kol.: Nové trendy v teorii a instrumentaci vybraných analytických metod, Akademia, Praha, 1993
2. Český lékopis 2002, Grada Publishing, Praha 2002
3. Kašička V.: Teoretické základy a separační principy kapilárních elektromigračních metod, Chem. Listy 91, 320-329 (1997)
4. Dolník V.: Úvod do kapilární elektroforézy, Ústav analytické chemie Akademie věd ČR v Brně a spol. Chomspec s. r. o., Brno, 1994
5. Ševčík J, Tesařová, Stránský Z.: Separacie chirálních látek kapilární elektroforezou, Chem. Listy 95, 2001, s. 139-146
6. Wurst M., Pacáková V., Štulík K.: Vysokoučinné separační metody při analýze fenyلكarboxylových kyselin, Chem. Listy 95, 2001, s 270-277
7. <http://www.ceandcec.com/>, datum náhledu: 1.4. 2006
8. <http://www.chemsoc.org>: Royal Society of Chemistry's chemical science network, datum náhledu: 1.4. 2006
9. Pavonič M.: Možnosti využití metod kapilární elektroforézy pro analýzu malých iontů ve vodách, Výzkum vodohospodářský T. G. Masaryka Praha, Praha 2002
10. Volpi N.: Separation of flavonoids and phenolic acids from propolis by capillary zone electrophoresis, Electrophoresis 24, 2002, s. 1872 – 1878
11. Sáenz-López R., Fernández-Zubrano P., Tena M. T.: Capillary electrophoretic separation of phenolic diterpens from rosemary, J. Chromatogr. A, 953, 2002, s. 251-256
12. J. J. Berzas Nevado, J. Rodríguez Flores, G. Castañeda Peñalvo and N. Rodríguez Fariñas: Determination of sildenafil citrate and its main metabolite by sample stacking with polarity switching using micellar electrokinetic chromatography, J. of Chromatogr. A, 953, 2002, s. 279-286
13. Hernández M., Aquilar C., Borrull F., Calull M.: Determination of ciprofloxacin, enrofloxacin and flumequine in pig plasma samples by capillary isotachopheresis-cappillary zone electrophoresis, J.Chromatogr. B, 2002, 772, s. 163-172
14. Reinhoud N.J., Tjaden U.R., J. van der Greef: Strategy for setting up single-capillary isotachopheresis zone electrophoresis, J. Chromatogr.A, 653, 1993, s. 303 – 312

15. Methods development strategy for enantiomer analysis using the P/ACE MDQ chiral system: Chapman J., Whatley H., Fu-Tai A. Chen, Beckman Coulter, Inc. 2001
16. Quirino J.P., Terabe S.: Sample stacking of fast-moving in capillary zone electrophoresis with pH-suppressed electroosmotic flow, *J. Chromatogr.*, 850, 1999, s. 339 – 344
17. Reinhoud N.J., Tjaden U.R., J. van der Greef: Automated isotachopheric analyte focusing for capillary zone electrophoresis in a single capillary using hydrodynamic back-pressure programming, *J. Chromatogr.*, 641, 1993, s. 155-162
18. Urbánek M., Křivánková L., Boček P.: Stacking phenomena in electromigration: From basic principles to practical procedures, *Electrophoresis*, 24, 2003, s. 466-485
19. Slanina J., Táborská E.: Příjem, biologická dostupnost a metabolismus rostlinných polyfenolů u člověka, *Chem. Listy* 98, 2004, s. 239-245
20. <http://www.sigmaaldrich.com>, datum náhledu: 1.4. 2006
21. Zhorka G., Gowniak K.: Variation of free phenolic acids in medicinal plants belonging to the Lamiaceae family, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 26, 2001, s. 79-87
22. Peng Y., Ye J., Kong J.: Determination of phenolic compounds in *Perilla frutescens* L. by capillary electrophoresis with electrochemical detection, *J. Agric. Food Chem.*, 21, 2004, s. 8141-7
23. Akowuah G. A., Zhari I., Norhayati I., Sadikun A. a Khamsah S. M.: Sinensetin, eupatorin, 3'-hydroxy-5, 6, 7, 4'-tetramethoxyflavone and rosmarinic acid contents and antioxidative effect of *Orthosiphon stamineus* from Malaysia, *Food Chemistry*, 87, 2004, s. 559-566
24. Akowuah G.A., Ismail Z., Norhayati I. a Sadikun A.: The effects of different extraction solvents of varying polarities on polyphenols of *Orthosiphon stamineus* and evaluation of the free radical-scavenging activity, *Food Chemistry*, 93, 2005, s. 311-317
25. Olah Neli-Kinga, Radub L., Mogoanc C., Hanganuc D., a Gocan S.: Phytochemical and pharmacological studies on *Orthosiphon stamineus* Benth. (Lamiaceae) hydroalcoholic extracts, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 33, 2003, s. 117-123
26. Urbánek M., Pospíšilová M., Poláček M.: On-line coupling of capillary isotachopheresis and zone electrophoresis for the assay of phenolic compounds in plant extracts, *Electrophoresis*, 23, 2002, s. 1045-1052
27. Volpi N.: Separation of flavonoids and phenolic acids from propolis by capillary zone electrophoresis, *Electrophoresis (2002)*, 24, s. 1872 – 1878

28. Kanndler E., Cifuentes A. et al.: Pressurized liquid extraction–capillary electrophoresis–mass spectrometry for the analysis of polar antioxidants in rosemary extracts, *J. Chromatogr. A*, 1084, 2005, s. 71-79
29. Shu-Ping Wang a Kuo-Jun Huang: Determination of flavonoids by high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis, *J. Chromatogr.*, 1032, 2004, s. 273-279
30. Horáková J., Maier V., Ševčík J.: On-line prekoncentrační techniky v kapilární elektroforéze; *Chem. Listy*, 100, 2006, s. 163-168
31. Chao-Cheng Wang, William P. McCann a Stephen C. Beale: Measurement of adenosine by capillary zone electrophoresis with on-column isotachophoretic preconcentration; *J.Chromatogr. B* 676, 1996, s. 19-28
32. Pomponio R., Gotti R., Hudaib M., Cavrini V.: Analysis of phenolic acids by micellar electrokinetic chromatography: application to *Echinacea purpurea* plant extracts, *J. Chromatogr. A*, 945, 2002, s. 239-247
33. Vlček J., Klejdus B., Kubáň V.: Stanovení fenolických látek v rostlinném materiálu kapilární elektroforézou a kapalinovou chromatografií, *Chem. Listy* 96, 2002, s. 39-44
34. Hiermann A., Radl B.: Analysis of aromatic plant acids by capillary zone electrophoresis, *J. Chromatogr.A*, 803, 1998, s. 311 – 314
35. Urbánek M., Blechtová L., Pospíšilová M., Polášek M.: On-line coupling of capillary isotachphoresis and capillary zone electrophoresis for the determination of flavonoids in methanolic extracts of *Hypericum perforatum* leaves or flowers, *J. Chromatogr.A*, 958, 2002, s. 271-271
36. Michalkiewicz A., Biesaga M., Pyrzynska K.: Solid-phase extraction procedure for determination of phenolic acids and some flavonols in honey, *J. Chromatogr.A*, 1187, 2008, s. 18-24
37. Gong-Jun Yang, et all.: The simultaneous separation and determination of six flavonoids and troxerutin in rat urine and chicken plasma by reversed-phase high-performance liquid chromatography with ultraviolet–visible detection, *J. Chromatogr.B*, 856, 2007, s. 222-228.
38. Križman M., Baričević D. and Prošek M.: Determination of phenolic compounds in fennel by HPLC and HPLC–MS using a monolithic reversed-phase column, *J. Pharm. Biomed. Anal*, 43, 2007, s. 481-485.

39. Hamoudová R., Urbánek M., Pospíšilová M., Polášek M.: Assay of phenolic compounds in red wine by on-line combination of capillary isotachopheresis with capillary zone electrophoresis, *J.Chromatogr.*, 1032, 2004, s. 281-287
40. Wang-Hsien Ding, Chi-Hung Liu: Analysis of linear alkylbenzenesulfonates by capillary zone electrophoresis with large-volume sample stacking, *J. Chromatogr. A*, 929, 2001, s. 143-150
41. Cugat M. J., Aquilar C., Marcé R. M., Borrull F., Calull M.: Isotachophoretic focusing and mass spectrometry detection as tools for improving the determination of aromatic sulfonates in capillary electrophoresis, *Electrophoresis*, 23, 2002, s. 2279-2287

8. SEZNAM ZKARATEK

BGE - základní elektrolyt
CEC - kapilární elektrochromatografie
CGE - kapilární gelová elektroforéza
CTAB - cetyltrimethylamonium bromid
DNA - deoxyribonukleová kyselina
EOF - elektroosmotický tok
HPCE - vysokoúčinná kapilární elektroforéza
HPLC - vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IEF- izoelektrická fokusace
ITP - izotachoforéza
LE - vedoucí elektrolyt
LDL – lipoproteiny o nízké hustotě
LLE - liquid-liquid extrakce
MEKC - micelární elektrokinetická chromatografie
MS - hmotnostní detektor
NADPH - nikotinamid adenin dinukleotid fosfát
PDA - Photo diode array detektor
SDC –deoxycholát sodný
SDS - dodecylsírán sodný
TE - koncový elektrolyt
TLC - tenkovrstvá chromatografie
TMS - tetramethylsilan

Abstrakt

Metoda kapilární zónové elektroforézy byla užita pro separaci látek rostlinného původu ze skupiny fenolických kyselin (skořicová, karnosolová, rozmarýnovám kávová) a flavonoidů (rutin, apigenin, kveretin luteolin). Postupnou optimalizací složení testovaných pufrů se jako nejvhodnější ukázalo použití 50 mM borátového základního elektrolytu s pH 9. Separace probíhala v kapiláře s vnitřním průměrem 50 μm o efektivní délce 50 cm. UV – detekce probíhala při vlnové délce 200 nm a doba analýzy trvala přibližně 23 min. Pro zvýšení citlivosti UV – detekce byly vyvíjeny metody využívající zakoncentrování z velkého objemu vzorku. Dobré výsledky poskytovalo využití zakoncentrování se změnou polaritv umožňující dávkování vzorku představující asi 50% celkového objemu kapiláry. Dosažené detekční limity při 60 násobném zakoncentrování se pohybují v rozmezí 0,006-0,014 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Systém byl použit na analýzu rostlinného materiálu, v methanolickém extraktu byl stanoven obsah kyseliny rozmarýnové 710,9 μg (RDS = 2,36%) a kyseliny kávové 38,2 μg (RDS = 3,73%) na g práškové nati *Orthosiphon stamineus*.

Capillary zone electrophoresis with UV detection at 200 nm was developed for the determination of four phenolic acids and four flavonoids in plant material. The electrophoretic behavior of phenolic compounds was investigated to optimize their separation as a function of buffer pH, buffer concentration. A 50m mM borate buffer, pH 9 was found most favorable. The separation was obtained with fused-silica capillary column (50 cm x 50 μm I.D.) an applied voltage of 25 kV and a temperature of 25°C. For increase injection volume and decrease the detection limits was performed by applying *Large-volume sample stacking with polarity switching*. The limits of detection were between 0,006 and 0,014 $\mu\text{g}/\text{ml}$. The method was used to determine these compounds in methanolic extract of *Orthosiphon stamineus* leaves that contained 710,9 $\mu\text{g g}^{-1}$ pulverized drug of rosmarinic acid and 38,2 $\mu\text{g g}^{-1}$ of caffeic acid. About a 60-fold enhancement in sensitivity, relative to a conventional injection, was demonstrated in a real sample.

9. OBSAH

1.	ÚVOD	3
2.	TEORETICKÁ ČÁST	5
2.1.	KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZA	6
2.1.1.	Elektroforetická pohyblivost	7
2.1.2.	Iontová pohyblivost	8
2.1.3.	Skutečná pohyblivost	8
2.1.4.	Efektivní pohyblivost	8
2.1.5.	Elektroosmotický tok	9
2.1.6.	Migrační čas	12
2.1.7.	Ovlivňování elektroforetické pohyblivosti	12
2.2.	KAPILÁRNÍ ZÓNOVÁ ELEKTROFORÉZA	15
2.2.1.	Jouleovo teplo	17
2.2.2.	Difúze	17
2.2.3.	Elektromigrační disperze	18
2.2.4.	Adsorpce	19
2.2.5.	Instrumentální uspořádání	19
2.3.	DALŠÍ ELEKTROMIGRAČNÍ METODY	23
2.3.1.	Izotachoforéza (ITP)	23
2.3.2.	Micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC)	24
2.3.3.	Elektrochromatografie (CEC)	25
2.3.4.	Kapilární izoelektrická fokusace (IEF)	25
2.3.5.	Kapilární gelová elektroforéza	25
2.4.	MOŽNOSTI ZVÝŠENÍ CITLIVOSTI KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZY...	26
2.4.1.	Zakoncentrování z velkého objemu vzorku změnou polarity	27
2.4.2.	Izotachoforéza-kapilární elektroforéza v jedné kapiláře	29
2.4.3.	Přechodní izotachoforéza (t-ITP-CE)	31
2.4.4.	Kombinace ITP-CZE ve dvou kapilárách (column-coupling)	31
2.5.	ROSTLINNÉ POLYFENOLY	33
2.6.	ORTHOSIPHONIS FOLIUM	36
2.7.	METODY POUŽÍVANÉ PRO ANALÝZU ORTHOSIPHONIS FOL.	37
2.8.	METODY STANOVENÍ FENOLICKÝCH KYS. A FLAVONOIDŮ	38
3.	CÍL PRÁCE	39
4.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	41

4.1.	CHEMIKÁLIE A ROZTOKY	43
4.1.1.	Příprava roztoků	44
4.2.	PŘÍSTROJE	44
4.2.1.	Kapilární elektroforetický systém P / ACETMMMDQ	44
4.3.	PRACOVNÍ A VÝPOČETNÍ POSTUPY	45
4.3.1.	Pracovní postup	45
4.3.2.	Vývoj a optimalizace metody	45
4.3.3.	Měření kalibrační závislosti	45
4.3.4.	Detekční limit (limit of detection, LOD)	46
4.3.5.	Opakovatelnost metody	46
4.3.6.	Rozlišení	47
4.3.7.	Výpočet obsahu analyzovaných látek v droze	47
5.	VÝSLEDKY A DISKUZE	48
5.1.	VÝVOJ A OPTIMALIZACE METODY PRO SEPARACI A STANOVENÍ FENOLICKÝCH KYSELIN	49
5.2.	KVANTITATIVNÍ ANALÝZA	66
5.3.	OPAKOVATELNOST METODY	69
5.4.	STANOVENÍ OBSAHU KYSELIN V ROSTLINNÉM EXTRAKTU	70
6.	ZÁVĚRY	72
7.	LITERATURA	76
8.	SEZNAM ZKRATEK	81
9.	OBSAH	84