

**UNIVERZITA PARDUBICE  
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ**

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

**2012**

**Kateřina HLAVOVÁ**

**Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická**

**SULFONOVANÁ AZOBARVIVA JAKO  
KONTRASTNÍ LÁTKY PŘI ANALÝZE  
IONTŮ V NÁPOJÍCH KAPILÁRNÍ  
ZÓNOVOU ELEKTROFORÉZOU  
S NEPŘÍMOU UV DETEKČÍ**

**Kateřina Hlavová**

**Bakalářská práce  
2012**

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Kateřina Hlavová**  
Osobní číslo: **C09132**  
Studijní program: **B2901 Chemie a technologie potravin**  
Studijní obor: **Hodnocení a analýza potravin**  
Název tématu: **Sulfonovaná azobarviva jako kontrastní látky při analýze iontů v nápojích kapilární zónovou elektroforézou s nepřímou UV detekcí**  
Zadávající katedra: **Katedra analytické chemie**

### Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. V dostupné literatuře vyhledejte a popište práce, zabývající se stanovením aniontů kapilární elektroforézou s nepřímou UV detekcí. Zaměřte se zejména na studie využívající organické sloučeniny jako kontrastní látky.
2. Experimentálně ověřte možnosti separace aniontů s nepřímou UV detekcí s použitím vybraných sulfonovaných azobarviv jako kontrastních látek.
3. Získané výsledky shrňte a diskutujte jejich použitelnost a přínos pro analýzu aniontů v nápojích.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

**Podle pokynů vedoucího práce.**

Vedoucí bakalářské práce:

**Ing. Petr Česla, Ph.D.**

Katedra analytické chemie

Konzultant bakalářské práce:

**doc. Ing. Jan Fischer, CSc.**

Katedra analytické chemie

Datum zadání bakalářské práce:

**20. února 2012**

Termín odevzdání bakalářské práce:

**22. června 2012**



prof. Ing. Petr Lošťák, DrSc.

děkan

L.S.



prof. Ing. Karel Ventura, CSc.

vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2012

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 22.06.2012

Kateřina Hlavová

## **Poděkování**

Chtěla bych poděkovat své rodině, která mě po celou dobu studia podporovala. Velký dík patří také panu Ing. Petru Česlovi, Ph.D, který se mě po celou dobu plně věnoval a vždy mi s prací pomáhal. Přínosem bylo, že jsem si osvojila tyto metody jak z teoretického, tak praktického hlediska.

Děkuji

## **Anotace**

Tato bakalářská práce se zabývá použitím sulfonovaných azobarviv jako kontrastních látek v kapilární zónové elektroforéze s nepřímou UV detekcí a použitím této metody k analýze aniontů v nápojích. V rešeršní části jsou shrnuty analýzy iontů ve vzorcích piva, vína, ovocných džusů, mléka a dalších potravinářských matricích. Významnou roli při účinnosti a rychlosti separace hraje složení základního elektrolytu. Dalším neméně podstatným parametrem ovlivňujícím separaci iontů je vhodná teplota, napětí a vlnová délka při UV detekci. Cílem experimentální části bylo nalézt takové sulfonované azobarvivo, které by plně nahradilo stále nejčastěji využívaný chroman. Během experimentu bylo připraveno několik elektrolytů a bylo použito několik azobarviv. Dosažené výsledky jsou porovnány a diskutovány v závěru bakalářské práce.

**Klíčová slova:** Kapilární zónová elektroforéza, Nepřímá UV detekce, Sulfonovaná azobarviva, Anionty, Kontrastní látka

**Title: Sulphonated Azo Dyes as Contrast Compounds in the Analysis of Anions in Beverages Using Capillary Electrophoresis with Indirect UV Detection**

## **Annotation**

This bachelor work is focused on application of sulphonated azo dyes as contrast compounds in capillary zone electrophoresis with indirect UV detection and with application of this method in the analysis of anions in beverages. Analysis of ions in samples of beer, wine, fruits juices, milk and so on are presented in review part. Composition of background electrolyte is the key parameter influencing the separation efficiency and speed of the analysis. Next very important conditions are temperature, voltage and wavelength during separation. Aim of the experimental part of the bachelor work was to find the suitable sulphonated azo dye, which can replace still used chromate. Several background electrolytes were tested containing different azo dyes. Obtained results are compared and discussed at the end of bachelor work.

**Keywords:** Capillary zone electrophoresis, Indirect UV detection, Sulphonated azo dyes, Anions, Contrast compound

# SEZNAM ZKRATEK

|                 |  |
|-----------------|--|
| <b>ACN</b>      | Acetonitril  |
| <b>BGE</b>      | Základní elektrolyt                                      |
| <b>BIS-Tris</b> | Bis(2-hydroxyethyl)-imino-tris(hydroxymethyl)aminomethan |
| <b>CTAB</b>     | Hexadecyltrimethylamonium bromid                         |
| <b>CZE</b>      | Kapilární zónová elektroforéza                           |
| <b>DETA</b>     | Diethylentriamin   |
| <b>DTAB</b>     | Dodecyltrimethylamonium bromid                           |
| <b>EOF</b>      | Elektroosmotický tok                                     |
| <b>HPLC</b>     | Vysokoúčinná kapalinová chromatografie                   |
| <b>HPMC</b>     | Hydroxypropylmethyl celuloza                             |
| <b>LOD</b>      | Mez detekce  |
| <b>ND</b>       | Nedetkováno  |
| <b>P-AB</b>     | Aminobenzoová kyselina                                   |
| <b>PDC</b>      | 2,6-pyridindikarboxylová kyselina                        |
| <b>PGA</b>      | Kyselina pyroglutamová                                   |
| <b>PMA</b>      | Benzen-1,2,4,5-tetrakarboxylová kyselina                 |
| <b>TEA</b>      | Triethanolamin   |
| <b>Tris</b>     | Tris-(hydroxymethyl)aminomethan                          |
| <b>TTAB</b>     | Tetradecyltrimethylamonium bromid                        |



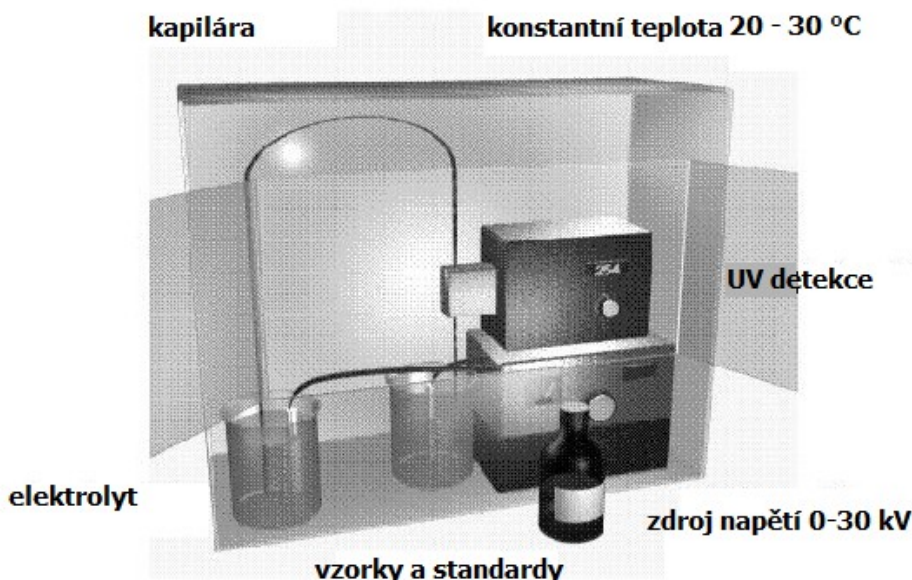
# 1. OBSAH

|   |    |
|---|----|
| 1. Obsah.....   | 9  |
| 2. Elektroforéza .....                                  | 10 |
| 3. Elektroosmotický tok .....                           | 11 |
| 3.1. Úprava velikosti a směru EOF .....                 | 11 |
| 4. Detekce.....   | 13 |
| 5. Sulfonované organické látky.....                     | 14 |
| 6. Aplikace metody v praxi .....                        | 15 |
| 7. Experimentální část.....                             | 23 |
| 7.1. Chemikálie .....                                   | 23 |
| 7.2. Použitá instrumentace .....                        | 23 |
| 7.2.1. Přístroje.....                                   | 23 |
| 7.2.2. Separační kapilára.....                          | 23 |
| 7.2.3. Příprava základních elektrolytů .....            | 23 |
| 7.2.4. Příprava vzorků použitých při experimentech..... | 24 |
| 7.3. Postup analýzy .....                               | 24 |
| 8. Výsledky a diskuse.....                              | 26 |
| 8.1. Separace aniontů s nepřímou UV detekcí.....        | 29 |
| 9. Závěr.....   | 40 |
| 10. Seznam použité literatury .....                     | 41 |

## 2. ELEKTROFORÉZA

Kapilární elektromigrační separační techniky jsou moderní separační techniky využívající k separaci látek elektrické pole [1]. Nejčastěji používaná technika kapilární zónové elektroforézy (CZE) je založena na rozdílné rychlosti migrace ionizovaných látek ve stejnosměrném elektrickém poli [2]. Výhodami CZE je nízká spotřeba vzorku a činidel potřebných pro separaci. Dále velká účinnost separace, velká rychlost analýzy a krátká doba potřebná k optimalizaci separačních podmínek. Mezi nevýhody patří menší reprodukovatelnost a nižší citlivost [1].

V CZE (obr. 1) je prostředí mezi elektrodami tvořeno základním elektrolytem (BGE), který zajišťuje dostatečnou elektrickou vodivost v celém systému [3]. Vlastní separace se provádí v křemenné separační kapiláře o vnitřním průměru několika desítek mikrometrů. Dávkování vzorku probíhá nejčastěji hydrodynamicky, tedy aplikací tlaku na vstupní nádobku se vzorkem po několik sekund. Kapilára je z taveného křemene, potažena polyimidovým povlakem. Detekce probíhá na koloně, zpravidla spektrofotometricky, vodivostně, fluorescenčně [4].



**Obrázek č. 1:** Schéma zapojení kapilární zónové elektroforézy [5]

CZE dělí molekuly s nábojem na základě jejich rozdílných elektroforetických pohyblivostí (mobilit). Elektroosmotický tok BGE unáší kladné i záporné ionty k detektoru

a tyto ionty navíc migrují svou vlastní rychlostí uvnitř BGE, a tím se vzájemně dělí. Výsledkem separace je elektroforegram, tvořený píky. Poloha píku je spojena s kvalitou vzorku a plocha píku s kvantitou [3].

### 3. ELEKTROOSMOTICKÝ TOK

Separační kapilára v elektromigračních technikách je nejčastěji tvořena křemenem. Pokud naplníme kapiláru roztokem vhodného elektrolytu, začne probíhat disociace křemičitanových skupin na vnitřní stěně kapiláry (obr. 2). Vnitřní povrch kapiláry získává negativní náboj a utváří se elektrická dvojvrstva. Po připojení napětí se přítomnost dvojvrstvy navenek projeví pístovým tokem kapaliny, tzv. elektroosmotickým tokem (Electroosmotic flow, EOF).



**Obrázek č. 2:** Ovlivňování EOF vlivem pH [5]

Velikost EOF je značně závislá na pH elektrolytu, do pH 4 je disociace malá a nad pH 9 jsou už prakticky všechny ionty disociovány. Uvolněné vodíkové ionty vytváří pozitivně nabitou vrstvu v roztoku přilehlém k vnitřní stěně kapiláry a po vložení elektrického napětí mezi elektrody na koncích kapiláry dochází k pohybu protonů v elektrickém poli směrem ke katodě. Tyto vodíkové protony solvatované molekulami vody strhávají veškerý roztok uvnitř kapiláry s sebou směrem ke katodě, čímž vzniká EOF [1].

#### 3.1. Úprava velikosti a směru EOF

Chemické vlastnosti vnitřní stěny kapiláry mají velký vliv na průběh separace. Ovlivňují velikost EOF a míru adsorpce analytu na stěnu kapiláry. K eliminaci těchto jevů lze použít pokrytí vnitřního povrchu kapiláry, které lze realizovat navázáním modifikátorů na vnitřní stěnu kovalentní vazbou nebo dynamickou adsorpcí modifikátoru [2].

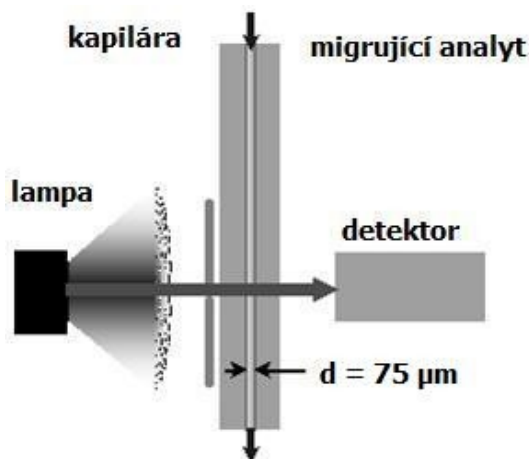
Nejběžnější metodou, která usměrňuje EOF během analýzy je přidavek povrchově aktivních látek do BGE. Tenzidy neboli povrchově aktivní látky (jinak také surfaktanty, podle anglického *surface active agents*) jsou látky amorfního charakteru složené z nepolárního hydrofobního řetězce různé délky a z části nesoucí polární skupinu nebo skupinu s kladným či záporným nábojem. Jejich unikátní vlastnosti jsou známy již dlouhou dobu a jsou široce využívány v různých oborech lidské činnosti, od ryze praktických každodenních aplikací (kosmetika, tukový průmysl, nátěrové hmoty, detergenty apod.) až po aplikace v oblasti základního výzkumu (micelární katalýza, molekulová absorpční a fluorescenční spektrometrie, acidobazické titrace organických, ve vodě nerozpustných, kyselin a bází, aplikace v separačních metodách) [6].

Vzhledem k chemické podstatě mají tenzidy přirozenou tendenci adsorbovat se na povrch pevných látek. Adsorpce je výsledkem kombinace elektrostatických a hydrofobních interakcí s povrchem, přičemž typ povrchu a experimentální podmínky určují, která interakce převažuje. Modifikace povrchu kapiláry pomocí adsorpce tenzidu je označována jako tzv. dynamické pokrytí kapiláry [7]. Mezi nejčastěji používané tenzidy pro dynamické pokrytí křemenných kapilár patří kationtové tenzidy, zejména hexadecyltrimethylamonium bromid (CTAB) [8]. Při nízkém obsahu CTAB v základním elektrolytu dochází k adsorpci monomolekulární vrstvy na kapilární stěnu. Negativní náboj na povrchu křemenné kapiláry je odstíněn tvorbou iontových párů mezi molekulami CTAB a volnými silanoly a EOF je potlačen. Zvyšování koncentrace CTAB vede k adsorpci druhé vrstvy a k otočení elektroosmózy směrem k anodě. Molekuly CTAB jsou orientovány alkylovými řetězci k sobě a kationtovými částmi molekul do roztoku, čímž vzniká na povrchu kapiláry kladný náboj. Dynamické pokrytí kapiláry adsorpcí CTAB je ve velké míře využíváno pro separaci anorganických aniontů kapilární zónovou elektroforézou, při které otočení EOF urychlí migraci aniontů směrem k detektoru (anoda u detekčního konce kapiláry) v porovnání s klasickým průběhem CZE (anoda na začátku kapiláry) [9].

Mezi další povrchově aktivní látky patří tetradecyltrimethylamonium bromid (TTAB), dodecyltrimethylamonium bromid (DTAB) a diethylentriamin (DETA).

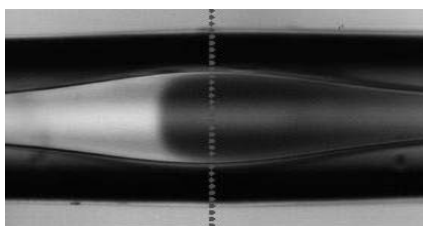
## 4. DETEKCE

Většina elektroforetických přístrojů využívá optický UV detektor. Schéma optické UV detekce pro CZE je uvedeno na obrázku 3. Další možností je i fluorescenční detektor, který je velice citlivý, ale je omezen na fluoreskující látky. Třetí nejpoužívanější detektor je vodivostní. Při napojení hmotnostního spektrometru na kapiláru, lze hovořit o detektoru hmotnostním, který dává strukturální informace o separovaných zónách.



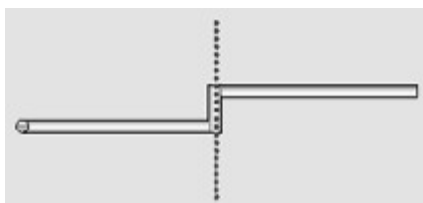
**Obrázek č. 3:** Obrázek detekce [5]

Jedním z problémů kapilární elektroforézy je nízká citlivost detekce. Proto byly zkonstruovány tzv. bublinové cely, tzv. „bubble cells“, kde je lokálně zvětšen vnitřní průměr kapiláry, a tedy je prodloužena optická dráha detekční cely (obr. 4).



**Obrázek 4:** Kapilára s rozšířenou celou [5]

Dalším řešením nízké citlivosti jsou Z-cely, kde je kapilára přerušena, radiálně posunuta a optická dráha paprsku je tak několikanásobně prodloužena (obr. 5).



**Obrázek 5:** Schéma Z cely [5]

Detektory jsou běžně spojeny s počítačem, který řídí sběr dat a umožňuje pohodlnou kvantitativní analýzu [5].

Klasická přímá UV-VIS detekce využívá schopnosti molekul absorbovat záření určité vlnové délky. Molekula musí obsahovat ve své struktuře tzv. chromofor, což je část molekuly absorbující záření. Úměrně koncentraci detekovaného analytu stoupá absorbance a lze ji tak využít pro kvantitativní stanovení. Některé látky však nemají vhodné chromofory, nebo neabsorbují záření v UV-VIS oblasti. Tyto látky je možné stanovit s užitím tzv. nepřímé detekce.

Pro tuto detekční metodu se užívá vhodný ion obsahující chromofor (např. ftalát, chromát), tvořící silně absorpční prostředí základního elektrolytu. Tento ion se nazývá vizualizující co-ion [10]. Když neabsorbující část (analyt) přijde do detektoru, způsobí pokles koncentrace a tím i absorbance základního elektrolytu a zobrazí se negativní pík směřující pod základní linii absorbance. Tento negativní pík může být vyhodnocen stejně jako ve stanovení přímou detekcí. Nepřímá UV-VIS detekce je univerzální metoda detekce, ale poskytuje nižší citlivost než přímé metody. Detekční limit může být 10-100 krát nižší [11].

## 5. SULFONOVANÉ ORGANICKÉ LÁTKY

Z hlediska významu, důležitosti v chemickém průmyslu a ochrany životního prostředí patří na první místa sulfonovaných organických látek benzen- a naftalensulfonované kyseliny, antrachinonsulfonované kyseliny a sulfonovaná barviva [9].

Aromatické sulfonované kyseliny a jejich amino- a hydroxy- deriváty jsou široce používány jako meziprodukty při výrobě syntetických barviv, optických zjasňovačů, a fluorescenčních bělicích látek [12].

Benzensulfonované kyseliny se nejčastěji používají při výrobě barviv, katalyzátorů, pesticidů, farmaceutik a chemikálií pro organické syntézy. Naftalensulfonované kyseliny také nacházejí využití při produkci sulfonových barviv.

Sulfonovaná barviva našla uplatnění především pro vybarvování textilií a jako potravinářská barviva. V textilním průmyslu je každým rokem vyprodukováno  $7 \cdot 10^5$  tun barviv s přibližně 10-15% únikem do odpadních vod v průběhu výroby [13].

Textilní sulfonovaná barviva jsou nejčastěji reaktivní barviva, která se kovalentně vážou na textilní vlákna. Používání syntetických sulfonovaných potravinářských barviv

je regulováno národními a mezinárodními předpisy. Mezi potravinářská sulfonovaná barviva patří některá azobarviva, xathenová barviva, některé fenoly. Azobarviva jsou barviva s azoskupinou  $-N=N-$ , která je chromoforem [14]. Analytické problémy spojené s potravinářskými barvivy zahrnují stanovení barviv v jídle a nápojích a dále kontrolu čistoty a stability barviv v průběhu zpracování a skladování potravin [9].

## 6. APLIKACE METODY V PRAXI

C. W. Klampf [15] prezentuje dvě metody pro analýzu aniontů ve vzorcích piva pomocí kapilární zónové elektroforézy. První metoda umožňuje kvalitativní stanovení aniontů v pivu s využitím jak nepřímé UV detekce, tak vodivostní detekce. Druhá analýza popisuje rychlé stanovení organických kyselin (karboxylové kyseliny, aminokyseliny) bez nutnosti úpravy vzorku. Pro stanovení anorganických aniontů a karboxylových kyselin byl použit elektrolyt skládající se ze 7,5 mM aminobenzoové kyseliny (p-AB), histidinu (upravuje pH na 5,75), 0,12 mM tetradecyltrimethylammonium bromidu (TTAB obrací elektroosmotický tok). Pro analýzu aminokyselin byl použit jiný BGE. Skládal se z 10 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 30 mM oktansulfonové kyseliny a pH bylo upraveno přidávkem  $\text{H}_3\text{PO}_4$  na 2,36. Na přípravu všech roztoků byla použita velmi čistá voda s odporem 18 M $\Omega$ . Nová kapilára byla před analýzou ošetřena 0,5 M NaOH a vodou po dobu 30 minut před vlastní separací. Před každou separací byla kapilára promývána elektrolytem po dobu 3 minut. Dávkování probíhalo hydrodynamicky na katodové straně pro analýzu anorganických aniontů a karboxylových kyselin a na straně anodové pro aminokyseliny. UV detekce probíhala při vlnové délce 254 a 185 nm. Standardní roztoky byly připraveny rozpuštěním příslušných solí nebo karboxylových kyselin ve velmi čisté vodě. Vzorky piva byly pro první analýzu (anionty a karboxylové kyseliny) zředěny 10 krát a pro stanovení aminokyselin 4 krát. Před separací byly vzorky odplyněny 15 minut v ultrazvukové lázni.

Bylo zjištěno, že vodivostní detekce je citlivější pro rychle migrující anionty, zatímco UV detekce byla citlivější pro anionty s podobnou hodnotou mobilit s p-AB. Při současném použití obou detektorů bylo možné stanovit chloridy až sukcináty pomocí vodivostní detekce a anionty kyseliny pyrohroznové až pyroglutamáty pomocí nepřímé UV detekce. Uvedený přístup přinesl vynikající meze detekce (LOD). Stanovené obsahy aniontů se pro jednotlivé vzorky piva lišily, protože při fermentačním procesu a při vaření piva byla použita různě kvalitní voda. Zatímco fosforečnany a laktáty byly stanoveny ve všech vzorcích piva, šťavelany, mravenčany a sukcináty byly stanoveny ve velmi

malých množstvích. V nealkoholickém pivu byly stanoveny nízké koncentrace sukcinátů, aniontů kyseliny pyrohroznové a pyroglutamátů v porovnání s ostatními vzorky, ale na rozdíl od ostatních vzorků piva obsahovalo nealkoholické největší množství chloridů. Čínské rýžové pivo obsahovalo nejvíce síranů a nejvíce fosforečnanů obsahovalo pivo bílé.

T. Soga a kol. [16] ve svém článku prezentují jejich analýzu organických a anorganických aniontů. Systém aplikovali na vzorky piva, jako ve článku [15]. Ve vzorku stanovili chloridy, sírany, šřavelany, mravenčany, maláty, citráty, sukcináty, anionty kyseliny pyrohroznové, octany, laktáty, fosforečnany a pyroglutamáty. Jako BGE použili 5 mM 2,6-pyridindikarboxylové kyseliny (PDC), 0,5 mM CTAB a pH bylo upraveno 1 M NaOH na 5,6. Elektrolyt byl složen z jiných chemikálií oproti experimentu [15]. Měření koncentrací aniontů v různých fázích kvašení piva by mohlo být použito ke sledování kvašení a k jeho regulaci. Všechny anionty detekovali nepřímou UV detekcí, využili jiný elektrolyt i jinou kontrastní látku.

Swallow a kol. [17] vyvinuli metodu pro stanovení chloridů, síranů a dusičnanů pomocí CZE v pomerančových džusech, šťávách z druhého lisování dužiny (tzv. pulpwash) a ve vzorcích vody, která byla použita v procesu zpracování pomerančů. Koncentrace chloridů a síranů byly stanoveny nepřímou fotometrickou detekcí při 254 nm a dusičnany přímou UV detekcí při 214 nm. Vzorky džusu a pulpwashe byly vedle CZE metody analyzovány také iontovou chromatografií a stanovené koncentrace byly porovnány. Dále autoři ověřovali účinky přídavku vápenatých iontů a sacharidů do BGE.

Vzorky pomerančového džusu a pulpwashe byly naředěny na cukernatost 10° Brix (10 g sacharózy ve 100 ml). Dále byly vzorky centrifugovány a supernatant byl po filtraci analyzován. Vlastní separace aniontů probíhala v křemenné kapiláře. Do systému se vkládalo napětí 20 kV a vzorek byl dávkován hydrostaticky z výšky 10 cm po dobu 30 s. BGE pro stanovení chloridů a síranů obsahoval 5 mM chroman sodný, 0,40 mM NICE-Pak OFM Anion-BT a pH bylo upraveno na 8,0 pomocí kyseliny mléčné. Elektrolyt pro stanovení dusičnanů se skládal z 10 mM chromanu sodného, 0,40 mM NICE-Pak OFM Anion-OH s pH upraveném hydroxidem sodným na hodnotu 8.

Analýza poskytla rychlé stanovení aniontů do 4 minut. Rychlá analýza aniontů byla způsobena vysokým obsahem kyseliny citronové, která je nejvíce zastoupenou organickou kyselinou v pomerančových džusech. Přítomnost kyseliny citronové zvýšila iontovou sílu v kapiláře a migrační časy aniontů se snížily. Při přídavku hydroxidu vápenatého (5 - 200  $\mu$ L 10% roztoku k 50 mL elektrolytu) došlo ke zvýšení migračního času síranů, a to z důvodu jejich komplexace s vápníkem. Přídavky glukosy do elektrolytu (0-20%)



zhoršily reprodukovatelnost retenčních časů a poklesly výšky píků kvůli vlivu viskozity glukosy.

Porovnáním džusů různého původu bylo zjištěno, že pomerančový džus z Brazílie měl konstantně nižší obsah chloridů než džusy z Floridy, Izraele, Kalifornie, Arizony, Mexika. Koncentrace aniontů v těchto vzorcích byly následující: 7,7 - 97,4 ppm ( $\text{Cl}^-$ ); 19,1 - 107,6 ppm ( $\text{SO}_4^{2-}$ ); 0,2 - 3,52 ppm ( $\text{NO}_3^-$ ) pro pomerančové džusy; 12,3 - 60,2 ppm ( $\text{Cl}^-$ ); 71,5 - 128,3 ppm ( $\text{SO}_4^{2-}$ ); <0,2 - 1,13 ppm ( $\text{NO}_3^-$ ) pro pulpwash; 21,7 - 92,9 ppm ( $\text{Cl}^-$ ); 19,1 - 96,2 ppm ( $\text{SO}_4^{2-}$ ); <0,2 - 13,3 ppm ( $\text{NO}_3^-$ ) pro vodu z výrobního procesu.

M. Arellano a kol. [18] analyzovali metodou CZE chloridy, dusičnany, sírany, šřavelany, tetráty, maláty, sukcináty, citráty, fosforečnany, octany a laktáty ve 3 vzorcích, a to v červeném vínu, bílém vínu a jablečném džusu. Elektrolyt se skládal z 3 mM benzen-1,2,4,5-tetrakarboxylové kyseliny (pyromellitic acid - PMA), 3 mM DETA a pH bylo upraveno na 7,5 pomocí Tris pufru. Detekce byla nepřímá při 220 nm. Tento systém byl vyhodnocen jako ideální pro analýzu anorganických i organických aniontů v nápojích. Oproti autorům z článku [17] se zaměřili na šřířší spektrum aniontů a využili i jiný elektrolyt.

Stanovením anorganických aniontů ve vzorcích, které mají vysoký obsah bílkovin, např. krevní sérum nebo mléko se zabývali Yang a Zhang [19]. Analýzy chloridů, síranů, fosforečnanů a hydrogenuhličitanů byly prováděny v CZE přístroji sestaveném v laboratoři. Vzorky se dávkovaly hydrostaticky, napětí bylo 5 kV, kapilára byla krátká 11 cm a detekce byla nepřímá. Základní elektrolyt byl složen z 6 mM chromanu sodného (kontrastní látka), 2,5 mM cetyltrimethylammonium bromidu (CTAB jako modifikátor EOF) a z 3,6% acetonitrilu (brání adsorpci bílkovin na stěny kapiláry). pH elektrolytu bylo upraveno na 9,3 pomocí 100 mM NaOH. Všechny roztoky byly připraveny z deionizované, dvakrát destilované vody. Byly také přefiltrovány a odplyněny v ultrazvukové lázni. Před vlastní separací byla kapilára promývána 30 minut 0,2 M NaOH, 5 minut deionizovanou dvakrát destilovanou vodou a 30 minut elektrolytem. Ve své studii se autoři věnovali vlivu pH, koncentraci elektrolytu a koncentraci modifikátoru EOF na rychlost separace.

Vliv pH byl zkoumán v rozmezí hodnot 8,0-11,0. Migrační časy v tomto rozmezí hodnot mírně klesaly. Systém byl optimalizován v rozmezí pH 9,0-9,5. Dále byl studován vliv koncentrace chromanu sodného. Zvýšení koncentrace chromanu sodného přineslo snížení EOF, a tím i zvýšení migračních časů. Při koncentraci 2 mM a 10 mM chromanu sodného nebyly sírany a dusičnany dostatečně odděleny. Jako ideální byla vybrána

koncentrace 6 mM chromanu sodného v BGE. K objasnění vlivu koncentrace CTAB bylo použito šest roztoků. Jejich koncentrace byla od 1 mM po 3,5 mM CTAB. Pokud byla koncentrace CTAB vyšší, tak došlo k rychlejší separaci. Nakonec byla použita koncentrace 2,5 mM CTAB. Experiment s přidavkem ACN do systému byl proveden s různými koncentracemi od 1% po 6 % ACN. S rostoucí koncentrací ACN rostly i migrační časy. Byla použita koncentrace 3,6% ACN.

**Tabulka č. 1:** Migrační časy a plochy píků separovaných aniontů

|              | RSD (n = 6) (%) |                              |                               |                              |                |                                |                               |
|--------------|-----------------|------------------------------|-------------------------------|------------------------------|----------------|--------------------------------|-------------------------------|
|              | Cl <sup>-</sup> | NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> | SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> | NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> | F <sup>-</sup> | HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> | HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> |
| Migrační čas | 1,0             | 1,5                          | 1,0                           | 1,3                          | 1,2            | 1,8                            | 1,6                           |
| Plocha píku  | 2,5             | 6,4                          | 3,6                           | 4,1                          | 3,5            | 4,8                            | 3,0                           |

Z tabulky č. 1 lze porovnat migrační časy standardních roztoků. Ve vzorku krevního séra a ve vzorku mléka byly nalezeny studované anionty s výjimkou dusitanů, dusičnanů, fluoridů. V krevním séru bylo stanoveno nejvíce chloridů, a to 3680 a 3716 mg/l, síranů bylo 42 a 47 mg/l, hydrogenfosforečnanů 91 a 83 mg/l, hydrogenuhličitanů 1583 a 1608 mg/l. Ve vzorku mléka 1873 a 2168 mg/l chloridů, 152 a 180 mg/l síranů, 1965 a 2116 mg/l hydrogenfosforečnanů a 1476 a 1579 mg/l hydrogenuhličitanů.

Klampfl a kol. [20] ve svém článku prezentují separaci anorganických a organických aniontů metodou kapilární zónové elektroforézy s nepřímou UV detekcí a vodivostní detekcí. UV detektor pracoval při vlnové délce 254 nm. Základní elektrolyt byl složen ze 7,5 mM 4-aminobenzoové kyseliny, 10,5 mM BIS-Tris [bis(2-hydroxyethyl)-imino-tris(hydroxymethyl)aminomethan] a dále obsahoval 0,1 mM TTAB, pH 7,0 upraveno LiOH. Kapilára byla regenerována 0,5 M NaOH a promývána BGE 30 minut. Dávkování vzorku probíhalo hydrodynamicky pomocí tlaku 25 mbar po dobu 0,2 minuty. Bylo použito napětí -30 kV. Po změření molárních absorpčních koeficientů při 254 nm, 214 nm a mobility, byla vybrána jako koion 4-aminobenzoová kyselina. Byla vhodnou složkou elektrolytu, protože umožňovala obojí detekci. BIS-Tris a Tris byli použity jako protiionty. S jejich pomocí bylo možné analýzu provádět v rozmezí pH 6-9. Pro demonstraci CZE metody byly vybrány vzorky bílého vína, které obsahuje anionty o různých hodnotách mobilit. Vodivostní detekce byla použita pro chloridy, sírany, šřavelany, tetráty, maláty, aukcináty, adipáty, glutaráty. Nepřímá UV detekce byla využita pro octany, laktáty, butyráty, valeráty, shikimáty. Autoři použili vyvinutou metodu

pro analýzu vzorků vína Veltlínské zelené po naředění 1:100. Byly stanoveny takovéto koncentrace aniontů: 0,84 mg/l chloridů, 1,76 mg/l síranů, pod mezí detekce šřavelanů, 0,97 mg/l tetrátů, 3,50 mg/l malátů, 6,11 mg/l sukcinátů, 0,98 mg/l adipátů, 0,46 mg/l glutarátů, 2,61 mg/l octanů, 8,20 mg/l laktátů, butyráty nenalezeny, pod mezí detekce valerátů, 4,47 mg/l shikimátů.

Yang a kol. [21] prezentují techniku kapilární zónové elektroforézy pro analýzu chloridů, dusitanů, síranů, dusičnanů, fluoridů a hydrogenuhličitanů ve vzorcích vody. Jako elektrolyt použili chroman sodný, CTAB a acetonitril. Měření probíhalo na laboratorně sestaveném přístroji a použity byly dva módy dávkování vzorku, a to pomocí gravitace (hydrodynamické) a elektrokinetické. Elektrokinetické dávkování probíhalo s napětím 0,5 kV po dobu 6 s a jako vnitřní standard byla použita kyselina pyroglutamová (PGA). Byla zvolena, protože její migrační čas je dost rozdílný od ostatních aniontů a nemohlo tedy dojít k překryvu píků. Výskyt této kyseliny ve vzorcích vody se nepředpokládal. Separační napětí bylo 5 kV a kapilára byla na vnitřní stěně potažena polyimidem. Detekce byla nepřímá při vlnové délce 254 nm. Základní roztoky byly připraveny ředěním (bylo použito 0,7 ml 270 mM chromanu sodného, 3,75 ml 20 mM CTAB, 1,05 ml 99,9% acetonitrilu, pH upraveno 100 mM NaOH a doplněno na objem 30 ml). Před separací byla kapilára promývána 0,2 M NaOH 1-2 minuty, deionizovanou vodou 5 minut a elektrolytem 30 minut.

Byl sledován vliv pH elektrolytu na separaci v rozmezí hodnot 8-11. S rostoucím pH rostl také migrační čas, optimálních časů bylo dosaženo při pH 9-9,5, a proto autoři zvolili elektrolyt s pH 9 pro další analýzy. Dále byl zkoumán vliv koncentrace chromanu sodného na separaci v rozmezí koncentrací 2-10 mM. Při nižších koncentracích kolem 2 mM nebyly dostatečně rozděleny dusitany a sírany, při koncentracích okolo hodnoty 10 mM se neseparovali už vůbec. Proto byla zvolena optimální koncentrace  $\text{Na}_2\text{CrO}_4$  6 mM. Jako další důležitá podmínka se ukázala koncentrace CTAB jako modifikátoru EOF. Autoři prověřovali účinnost separace s šesti různě koncentrovanými roztoky CTAB (1-3,5 mM). Jako problém se opět ukázaly píky dusitanů a síranů. Při nízké koncentraci CTAB (<1,5 mM) nebyly píky dostatečně odděleny. Podobné výsledky byly i na druhé straně při koncentracích >3,5 mM CTAB. Nakonec získali nejlepší výsledky s koncentrací 2,5 mM CTAB. Vliv koncentrace ACN byl pozorován v rozmezí 1-6% roztoků. Jako optimální byla zvolena koncentrace 3,5% ACN. Nosný elektrolyt se skládal tedy z 6 mM  $\text{Na}_2\text{CrO}_4$ , 2,5 mM CTAB a 3,5% ACN. Aplikaci předvedli na 4 vzorcích balené vody, 2 vzorcích vody z kohoutku a 1 vzorku říční vody (tabulka č. 2).

**Tabulka č. 2:** Výsledky analýzy [21]

| Vzorek               | Koncentrace (mg/l) |                  |                               |                  |                |                               |
|----------------------|--------------------|------------------|-------------------------------|------------------|----------------|-------------------------------|
|                      | Cl <sup>-</sup>    | NO <sup>2-</sup> | SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> | NO <sup>3-</sup> | F <sup>-</sup> | HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> |
| Balená voda č. 1     | 4,00               | 0,77             | 9,90                          | 4,46             | ND             | 358,00                        |
| Balená voda č. 2     | 34,40              | 1,20             | 23,80                         | 9,20             | ND             | 218,00                        |
| Balená voda č. 3     | 17,10              | ND               | 5,40                          | 4,00             | ND             | 4,40                          |
| Balená voda č. 4     | 20,00              | ND               | 7,00                          | 4,30             | 0,50           | 6,00                          |
| Voda z kohoutku č. 1 | 21,80              | ND               | 17,80                         | 1,20             | 0,60           | 20,00                         |
| Voda z kohoutku č. 2 | 35,00              | 0,44             | 8,40                          | 1,60             | 0,70           | 17,40                         |
| Říční voda           | 59,50              | ND               | 22,20                         | 3,90             | 1,40           | 1,70                          |

Johns a kol. [22] publikovali ve svém článku využití barviv jako kontrastních látek při technice kapilární zónové elektroforézy. Zabývají se dvěma barvivy, a to barvivem naftol yellow S a tetrazinem. Tato barviva byla použita ( $c = 0,5 \text{ mM}$ ) spolu s amfolytickým histidinem ( $c = 10 \text{ mM}$ ) a 0,05% HPMC (hydroxymethylpropyl celulóza, modifikátor EOF) při pH 7,7. Detekce byla nepřímá fotometrická při 476 nm pro naftol yellow S elektrolyt a při 258 nm pro tetrazinový elektrolyt. Separace probíhala dvěma způsoby v křemenné kapiláře, kde dávkování analytu bylo provedeno hydrodynamicky pomocí tlaku 16,9 kPa po dobu 0,6 s i hydrostaticky. Obě barvy byly nejprve dvakrát přečištěny, a to rozpuštěním v horké vodě a následnou rekrystalizací a filtrací. Čistoty barviv byly ověřovány také pomocí CZE analýzy metodou standardního přídávku v chromanovém elektrolytu.

Nepřímou detekci aniontů ve vzorku ovlivnilo několik parametrů. Hlavní roli hrály molekulární struktura, rozpustnost a spektrální vlastnosti. Barviva musela být rozpustná ve vodě a nesměla se adsorbovat na kapilární stěnu. Test chování čistého a nečistého barviva ukazoval, že barvivo s příměsmi zkreslovalo a otáčelo píky. Experimenty byly provedeny na standardní směsi 18 aniontů s naftol yellow S (tento elektrolyt použit i pro reálné vzorky) a s 20 anionty pro tetrazin. Aby autoři potvrdili účinnost a funkčnost tohoto systému, na reálných vzorcích vody z vodovodu, minerálních vodách a 10% roztoku piva. Nejpraktičtější byla shledána metoda pro analýzu vody z vodovodu, protože vzorek se nemusí ani ředit. Stanoveny zde byly chloridy, fluoridy a fosforečnany.

Využitím sulfonovaného barviva se zabýval i G. A. B. Heras a kol. [23] Použili Orange G a další látky pro separaci v CZE. Experimentálně hledali nejlepší složení elektrolytu pro CZE s nepřímou detekcí. Optimální elektrolyt se skládal z 4 mM Orange G

(1-fenylazo-2-naftol-6,8-disulfonová kyselina), 20 mM TEA (triethanolamin) v čistém MeOH a z 0,05 mM HPC (hydroxypropylcelulosa). Standardní směs aniontů se skládala z dusičnanů, chloridů, mravenčanů, aniontů kyseliny ethansulfonové a propansulfonové, octanů, propionátů a z aniontů kyseliny máselné a valerové. Složení elektrolytu bránilo adsorpci barviva na stěnu kapiláry. Zde autoři detailněji zkoumali použití Orange G jako kontrastní látky. Přehled výše uvedených prací je shrnut v tabulce 3.

**Tabulka č. 3:** Přehled vybraných separací

| <b>Aplikace</b>                               | <b>Analyt</b>  | <b>Separční podmínky</b>   | <b>Meze detekce/<br/>vlnová délka</b>                            | <b>Odkaz</b> |
|---|--|--|--|--------------|
| <b>Bez aplikace</b>                           | dusičnany, chloridy, mravenčany, anionty kyseliny ethansulfonové a propansulfonové, octany, propionáty a aniontů kyseliny máselné a valerové | 4 mM Orange G<br>20 mM TEA<br>MeOH<br>0,05 mM HPC                            | 0,10 - 0,18 $\mu$ M<br>478 nm                                    | [23]         |
| <b>Červené víno, bílé víno, jablečný džus</b> | chloridy, dusičnany, sírany, šťavelany, tetráty, maláty, sukcináty, citráty, fosforečnany, octany a laktáty                                  | 3 mM PMA, 3 mM DETA, Tris (pH 7,5)   | 0,006 - 1,072 mg/l<br>220 nm                                     | [18]         |
| <b>Krevní sérum, mléko</b>                    | chloridy, sírany, fosforečnany, hydrogenuhličitan  | 6 mM Na <sub>2</sub> CrO <sub>4</sub> , 2,5 mM CTAB, 3,5% ACN, NaOH (pH 9,3) | 0,3 - 1,0 mg/l/<br>254 nm, 214 nm                                | [19]         |
| <b>Pivo</b>                                   | chloridy, sírany, šťavelany, mravenčany, maláty, citráty, sukcináty, pyruváty, octany, laktáty, fosforečnany a pyroglutamáty                 | 5 mM PDC, 0,5 mM CTAB, NaOH (pH 5,6)   | 0,9 - 2,5 mg/l<br>350 nm   | [16]         |
| <b>Pivo</b>                                   | chloridy, sírany, fosforečnany   | 7,5 mM p - AB, 0,12 mM TTAB, histidin (pH 5,75)                              | 0,02 mg/l chloridy,<br>0,41 mg/l fosforečnany/<br>254 nm, 185 nm | [15]         |

**Pokračování tabulky č. 3: Přehled vybraných separací**

| <b>Aplikace</b>   | <b>Analyt</b>   | <b>Separáčn</b><br><b>podm</b><br><b>ínky</b>  | <b>Meze detekce/<br/>vlnová délka</b> | <b>Odkaz</b> |
|---|---|--|---------------------------------------|--------------|
| <b>Pomerančový džus, pulpwash, voda z provozu</b>       | chloridy, sírany, dusičnany   | 5 mM Na <sub>2</sub> CrO <sub>4</sub> , 0,40 mM Nice - Pak OFM Anion BT, kyselina mléčná (pH 8,0; pro Cl <sup>-</sup> a SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> ) 10 mM chroman sodný, 0,40 mM Nice - Pak anion BT, NaOH (pH 8, pro NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ) | 0,2 ppm/<br>254 nm, 214 nm            | [17]         |
| <b>V</b><br><b>íno</b>                                  | chloridy, sírany, šřavelany, tetráty, maláty, sukcináty, adipáty, glutaráty, octany, laktáty, valeráty, shikimáty | 7,5 mM aminobenzoová kyselina, 10,5 mM Bis - Tris, 0,1 mM TTAB, LiOH (pH 7,0)  | 0,131 - 0,510 mg/l/<br>254 nm, 214 nm | [20]         |
| <b>Voda z vodovodu, balená voda, řiční voda</b>         | chloridy, dusitany, sírany, dusičnany, fluoridy, hydrogenuhličitany   | 6 mM chromanu sodného, 2,5 mM CTAB, 3,5% ACN (pH 9,0)  | 0,07 - 0,3 mg/l/<br>254 nm            | [21]         |
| <b>Voda z vodovodu, minerální voda, 10% roztok piva</b> | chloridy, fluoridy, fosforečnany  | 0,5 mM naftol yellow S nebo tetralin, 10 mM histidin, 0,05% HPMC (pH 7,7)  | 476 nm, 258 nm                        | [22]         |

## **7. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST**

### **7.1. Chemikálie**

Kyselina trihydrogenboritá, >99,5% - Fluka (Buchs, Švýcarsko)

Deionizovaná voda - připravena na zařízení Demiwa 5ROI (Watek, Ledec nad Sázavou)  
a SG Ultra Clear UV (SG, Hamburg, Německo)

Acetonitril, čistota pro HPLC - Sigma - Aldrich (St. Louis, MO, USA)

Methanol, pro HPLC - Sigma - Aldrich (St. Louis, MO, USA)

Barviva (dl - I kyselina, I - kyselina, vz. 43, vz. 230, yellow 3R, bordo B, orange R)

### **7.2. Použitá instrumentace**

#### **7.2.1. Přístroje**

Analýzy byly prováděny pomocí kapilární elektroforézy Capel 105-M (Lumex, St. Peterburg, Rusko) a Beckman P/ACE Systém 2100 (Beckman - Coulter Orange Country, CA, USA). Vzorky byly analyzovány při teplotě 25°C. Standardy i směsi byly proměřeny při napětí -20 kV. Všechna měření byla provedena při vlnové délce 254 nm. Při měření UV spekter byl použit spektrofotometr GBC 918 (GBC, Sydney, Austrálie).

#### **7.2.2. Separační kapilára**

K analýze byla použita křemenná kapilára (Agilent, Palo Alto, CA, USA) o vnitřním průměru 75  $\mu\text{m}$  a délce 50 cm, efektivní délka kapiláry činila 40 cm. V této vzdálenosti bylo tedy vytvořeno detekční okénko pomocí zapalovače. Stejně tak byly opáleny i konce kapiláry. Vždy před analýzou byla kapilára promyta 5 minut vodou a 10 minut základním elektrolytem.

#### **7.2.3. Příprava základních elektrolytů**

Do 100 ml baněk byly nejprve připraveny zásobní roztoky jednotlivých barviv. Navažováno bylo 10 mg. Dalším zásobním roztokem byl roztok CTAB o koncentraci

65 mmol l<sup>-1</sup>. Tento roztok byl připraven do 25 ml odměrné baňky a byl 15 minut ponořen do ultrazvukové lázně. Základní elektrolyt vznikl odměřením požadovaných objemů jednotlivých roztoků. Složení elektrolytů je uvedeno v tabulce č. 4.

**Tabulka č. 4:** Přehled složení elektrolytů

| <b>Elektrolyt č.</b> | <b>Kontrastní látka</b>                                 | <b>Složení elektrolytu</b>    |   |
|----------------------|---|-------------------------------|---|
| <b>č. 1</b>          | 4 mmol l <sup>-1</sup> dI-I                             | 65 mmol l <sup>-1</sup> CTAB  | 3,5 %ACN  |
| <b>č. 2</b>          | 4 mmol l <sup>-1</sup> I                                | 65 mmol l <sup>-1</sup> CTAB  | 3,5 %ACN  |
| <b>č. 3</b>          | 4 mmol l <sup>-1</sup> 230                              | 65 mmol l <sup>-1</sup> CTAB  | 3,5 %ACN  |
| <b>č. 4</b>          | 4 mmol l <sup>-1</sup> 43                               | 65 mmol l <sup>-1</sup> CTAB  | 3,5 %ACN  |
| <b>č. 5</b>          | 0,4 mmol l <sup>-1</sup> dI-I                           | 65 mmol l <sup>-1</sup> CTAB  | 3,5 %ACN  |
| <b>č. 6</b>          | 0,4 mmol l <sup>-1</sup> I                              | 65 mmol l <sup>-1</sup> CTAB  | 3,5 %ACN  |
| <b>č. 7</b>          | 4 mmol l <sup>-1</sup> 230                              | 2,6 mmol l <sup>-1</sup> CTAB | 3,5 % CH <sub>3</sub> OH                              |
| <b>č. 8</b>          | 4 mmol l <sup>-1</sup> 230                              | 2,6 mmol l <sup>-1</sup> CTAB | 3,5 % CH <sub>3</sub> OH                              |
| <b>č. 9</b>          | 4 mmol l <sup>-1</sup> 230                              | 35 μmol l <sup>-1</sup> CTAB  | 3 mmol l <sup>-1</sup> H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> |
| <b>č. 10</b>         | 4 mmol l <sup>-1</sup> 230                              | 35 μmol l <sup>-1</sup> CTAB  | 3 mmol l <sup>-1</sup> H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> |
| <b>č. 11</b>         | 4 mmol l <sup>-1</sup> Na <sub>2</sub> CrO <sub>4</sub> | 65 mmol l <sup>-1</sup> CTAB  | 3,5 % ACN   |

#### **7.2.4. Příprava vzorků použitých při experimentech**

Byly připraveny zásobní roztoky jednotlivých standardů aniontů o koncentraci 1 g l<sup>-1</sup>. Jednotlivé látky byly rozpuštěny ve vodě a objemy byly doplněny na 100 ml. Z těchto standardů byly dále připravovány roztoky k analýzám. Roztoky byly připraveny přímo do elektroforetických nádobek a naředěny destilovanou vodou. Koncentrace proměřovaného roztoku směsi aniontů činila 0,2 g l<sup>-1</sup>.

### **7.3. Postup analýzy**

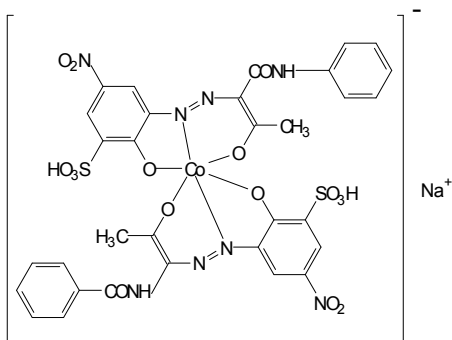
Proměřovány byly všechny elektrolyty s dávkováním směsi aniontů o koncentraci 0,2 g l<sup>-1</sup>. Směsi byly proměřeny při vlnové délce 254 nm.



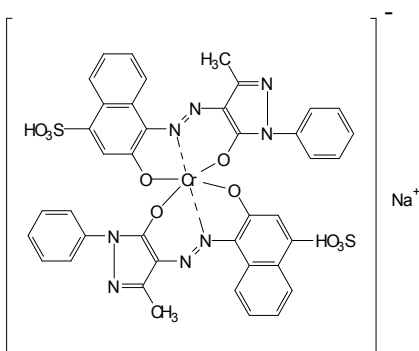
Analýzy probíhaly podle následujícího programu:

1. Promytí kapiláry základním elektrolytem 2 minuty a tlakem 1 Bar.
2. Dávkování vzorku tlakem 30 mBar po 10 sekund.
3. Analýza při napětí -20 kV při teplotě 25°C. Analyzované látky byly detekovány nepřímou UV detekcí při vlnové délce 254 nm.

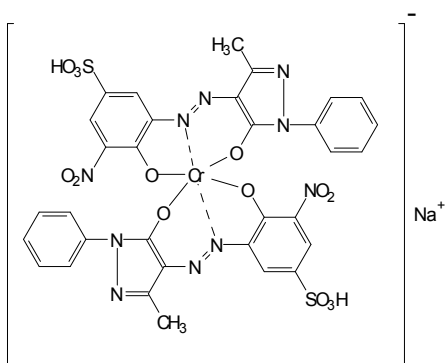
Struktury jednotlivých barviv:



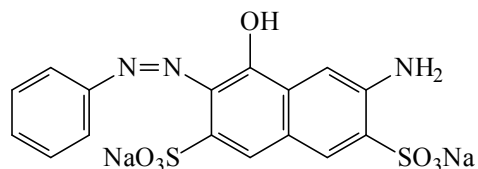
**Yellow 3R (C.I. Acid Yellow 194)**



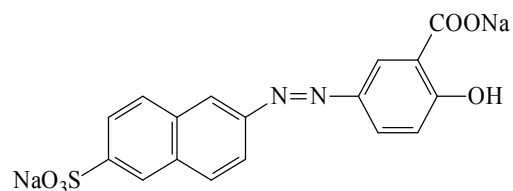
**Bordo B (C. I. Acid Violet 90)**



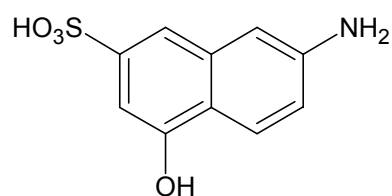
**Orange R (C. I. Acid Orange 142)**



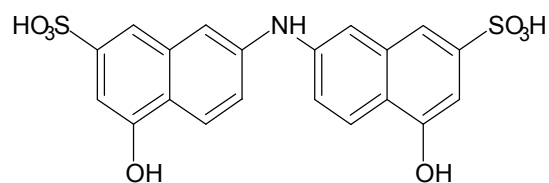
**vz. 43 (C.I. Acid Red)**



**vz. 230 (C. I. Mordant Yellow 3)**



**I - kyselina**



**dI - I kyselina**

## 8. VÝSLEDKY A DISKUSE

### 8.1. Stanovení molárních absorpčních koeficientů příslušných barviv

U kontrastních látek použitých pro separaci aniontů byly nejprve proměřovány absorpční spektra v UV oblasti v rozmezí vlnových délek 200 - 400 nm.

Připravené roztoky barviv měly koncentraci 100 mg l<sup>-1</sup>. Tato koncentrace nemohla být použita k měření absorpčních spekter z důvodu vysoké absorbance, proto bylo tohoto roztoku pipetováno 1 ml do 10 ml odměrné baňky a koncentrace barviva se snížila na 0,1 mg l<sup>-1</sup>. Takto zředěné roztoky byly proměřeny na spektrofotometru proti destilované vodě. Z hodnot absorbancí při absorpčním maximu a při vlnové délce 254 nm používané nejčastěji pro nepřímou UV detekci byly pomocí Lambert - Beerova zákona vypočítány molární absorpční koeficienty  $\epsilon_{(\text{abs.max})}$ .

Vztah pro výpočet molárních absorpčních koeficientů:

$$\epsilon_{\lambda} = \frac{A_{\lambda}}{d \cdot c}$$

kde:  $\epsilon_{\lambda}$ .....molární absorpční koeficient při dané vlnové délce

$A_{\lambda}$ .....absorbance při dané vlnové délce

d .....délka kyvety

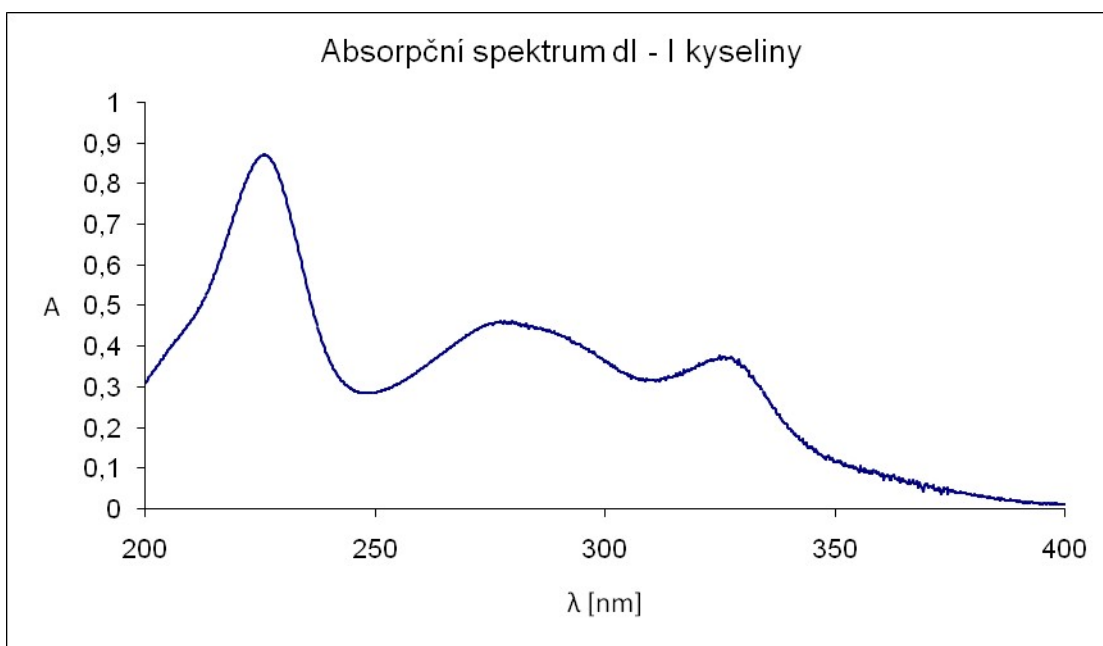
c .....koncentrace

Stanovené hodnoty molárních absorpčních koeficientů a vlnové délky absorpčních maxim použitých barviv a meziproduktů jsou uvedeny v tabulce č. 5.

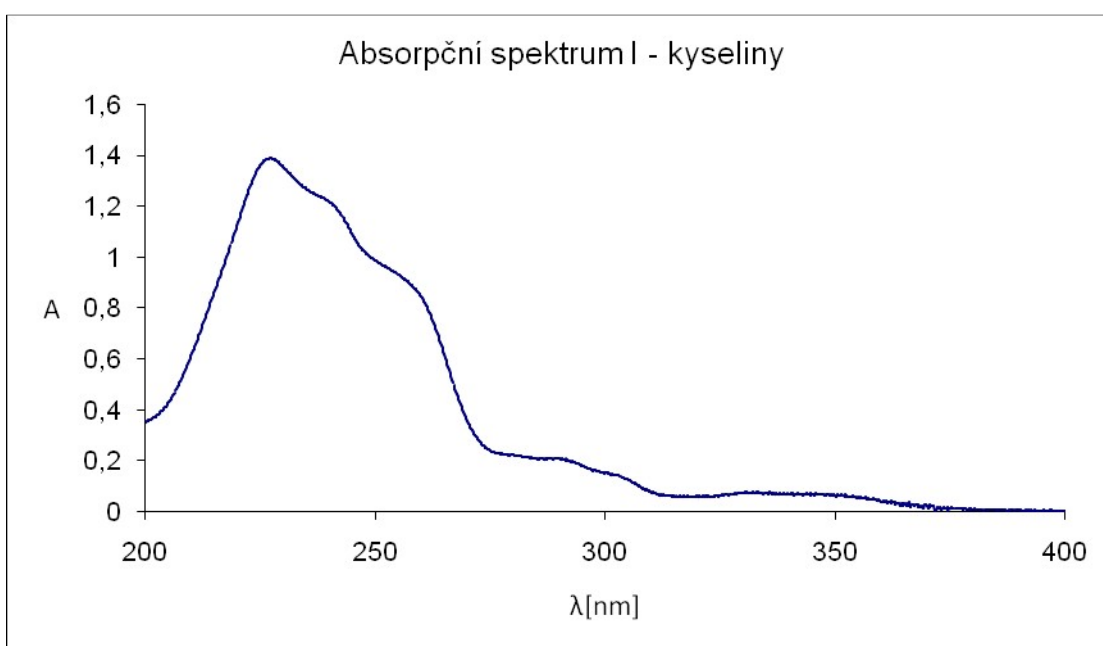
**Tabulka č. 5:** Přehled použitých barviv

| Barvivo   | vlnová délka abs.maxima [nm] | $\epsilon_{(\text{abs.max})}$ [l mol <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> ] | $\epsilon_{254 \text{ nm}}$ [l mol <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> ] |
|-----------|------------------------------|---|---|
| dI-I kys. | 359                          | 37720   | 13040   |
| I-kys.    | 226                          | 33961   | 22968   |
| vz. 43    | 259                          | 7404  | 6828  |
| vz. 230   | 212                          | 25525   | 12685   |

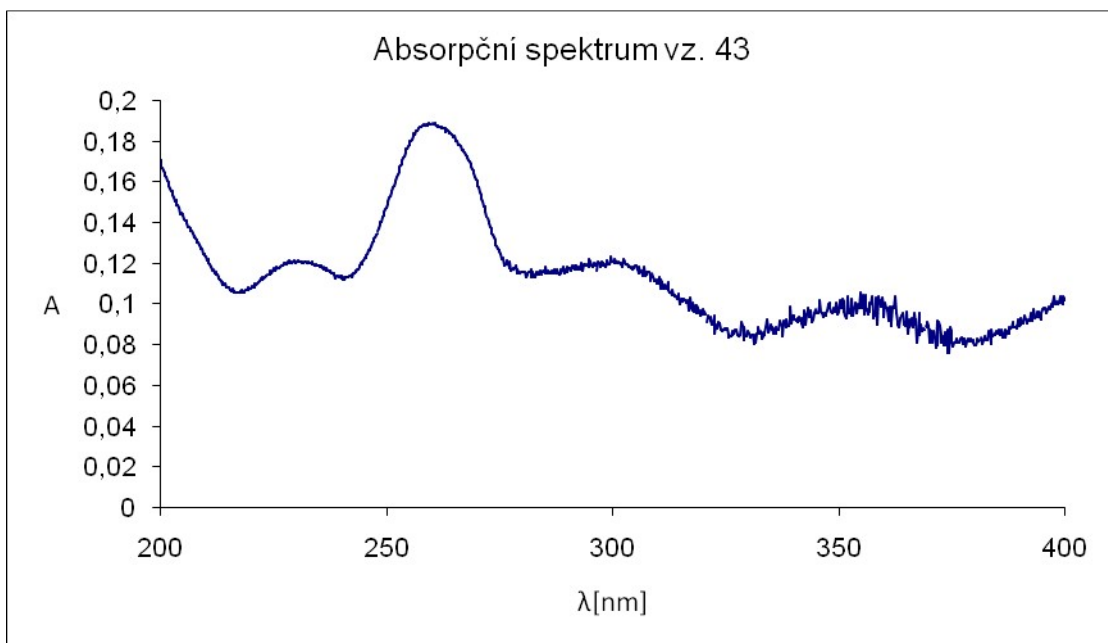
Absorpční spektra použitých barviv a meziproductů v UV oblasti spektra jsou zobrazeny na obrázcích č. 6 – 9. Pro každé z použitých barviv lze nalézt jiné absorpční maximum v UV oblasti. Při použití nejběžnější detekční vlnové délky, která je 254 nm, se jako nejvhodnější jeví I-kyselina (obrázek č. 7) a dále vzorek barviva 43 (obrázek č. 8) a vzorek barviva 230 (obrázek č.9).



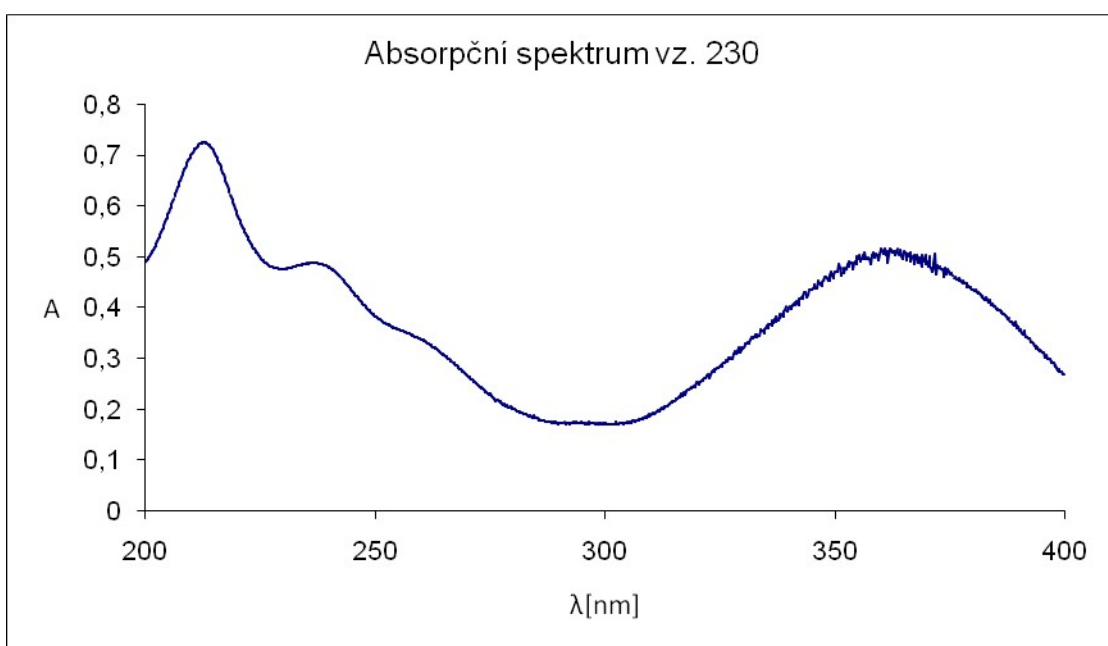
**Obrázek č. 6:** Absorpční spektrum dI - I kyseliny



**Obrázek č. 7:** Absorpční spektrum I - kyseliny



**Obrázek č. 8:** Absorpční spektrum vz. 43

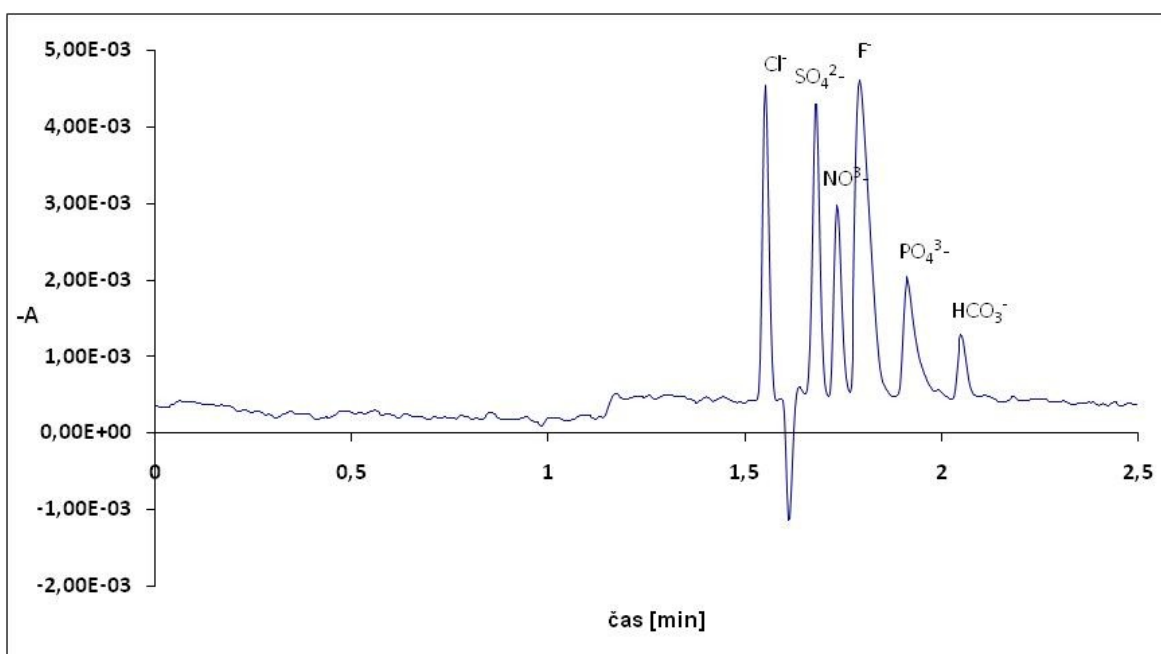


**Obrázek č. 9:** Absorpční spektrum vz. 230

## 8.2. Separace aniontů s nepřímou UV detekcí

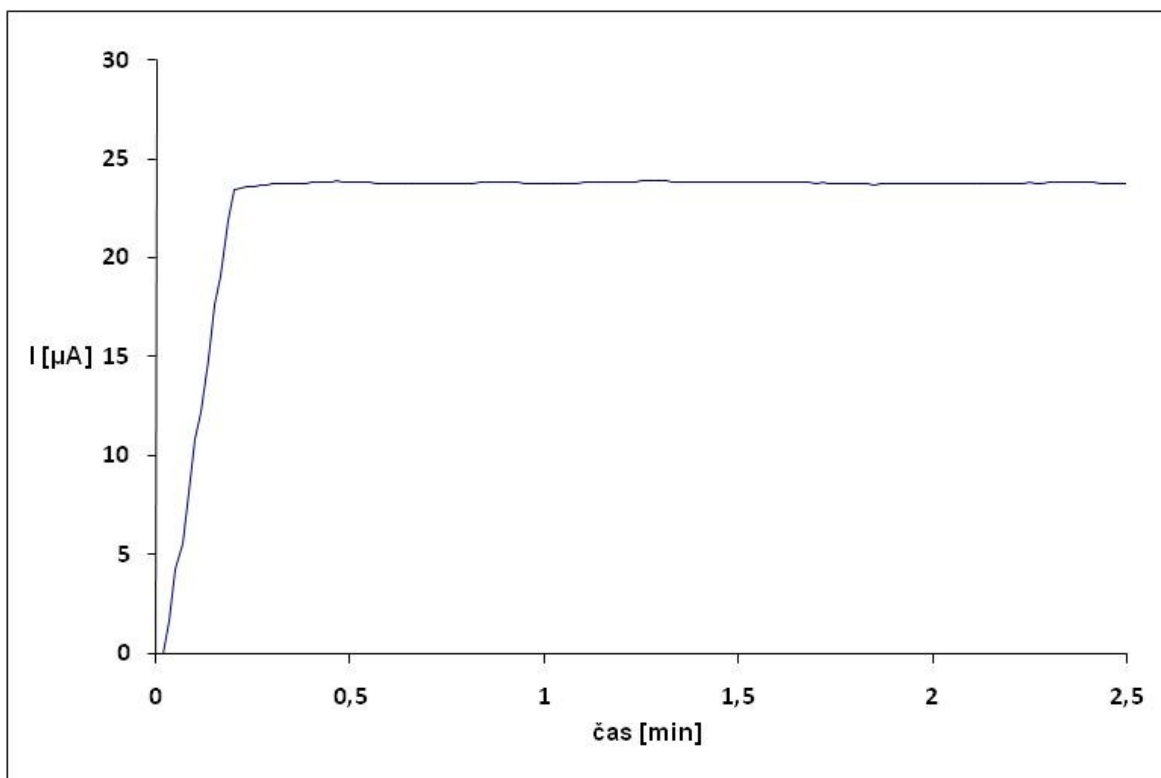
Předlohou k této analýze aniontů s nepřímou UV detekcí byla úloha z laboratorních cvičení [14]. V této úloze byl jako kontrastní látka využit chroman sodný. Ten je ale toxický, a proto se od jeho použití ustupuje a hledají se látky, které by ho v praxi nahradily. To bylo i cílem této práce, najít mezi sulfonovanými azobarvivy sloučeninu použitelnou jako kontrastní látku v kapilární zónové elektroforéze s nepřímou UV detekcí.

Pro porovnání prováděných separací byl připraven elektrolyt s obsahem chromanu sodného (elektrolyt č. 11, tabulka č. 4). V tomto elektrolytu byla provedena separace pěti aniontů s nepřímou UV detekcí. Záznam separace je uveden na obrázku č. 10.



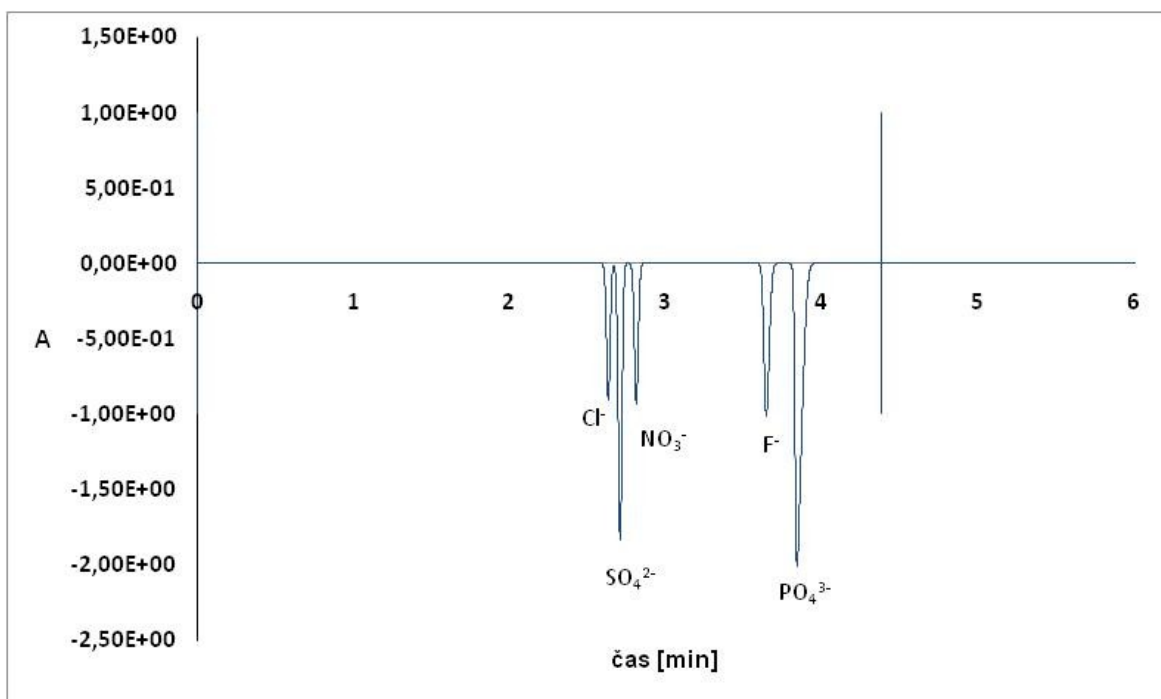
**Obrázek č. 10:** Separace aniontů v chromanovém elektrolytu

Jak je patrné z uvedeného záznamu, dochází k dělení všech analyzovaných aniontů v relativně krátké době analýzy. Stabilní podmínky během separace dokumentuje záznam proudu na čase, který je uveden na obrázku č. 11. V době 0 – 0,2 min stoupá napětí na používanou hodnotu -20 kV a roste dle Ohmova zákona také proud. Od 0,2 min je průběh proudu konstantní díky konstantnímu složení elektrolytu uvnitř separační kapiláry.



**Obrázek č. 11:** Závislost proudu na čase během separace aniontů s chromanem

Pro navržení separačních podmínek s použitím sulfonovaných azobarviv a jejich meziproduktů jako kontrastních látek byla nejprve provedena simulace výsledku analýzy směsi aniontů s použitím programu Peakmaster [24]. Nejprve byla simulačním programem ověřena shoda naměřených dat pro elektrolyt s chromanem a simulovaného záznamu, který je uveden na obrázku č. 12. Jak je vidět z porovnání obou elektroforegramů, rozdělení aniontů je velice podobné. Dále byl simulační program použit pro odhad výsledků separací směsi aniontů s použitím barviv a jejich meziproduktů.



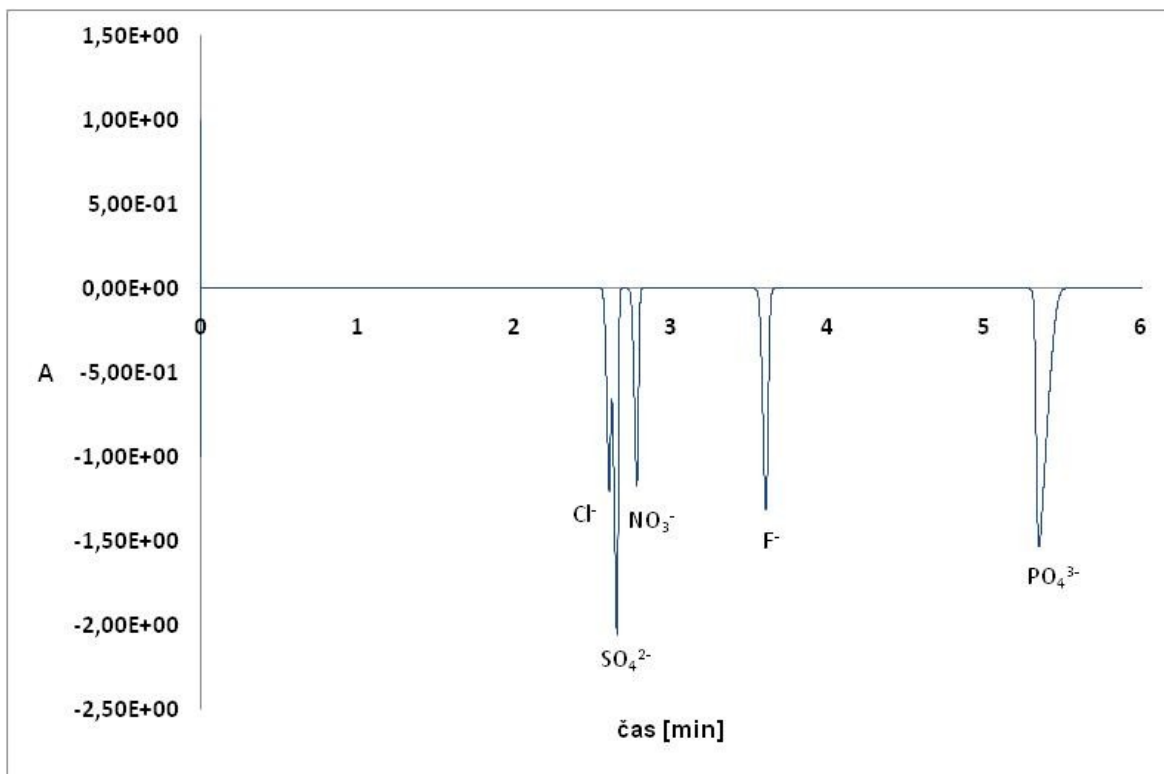
**Obrázek č. 12:** Modelová situace s využití programu Peakmaster

Pro náhradu chromanu sodného byly vybírány barviva s podobnou elektroforetickou mobilitou jako mobilita chromanu, což představuje podmínku nutnou pro dosažení úspěšné separace a nepřímou UV detekcí. Pohyblivosti jednotlivých barviv a meziproduktů získané z literatury jsou uvedeny v tabulce č. 6.

**Tabulka č. 6:** Tabulka pohyblivosti jednotlivých barviv

| kontrastní látka       | mobilita [ $\times 10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ] | odkaz |
|------------------------|---|-------|
| <b>DI - I kyselina</b> | -40,0   | [12]  |
| <b>I - kyselina</b>    | -33,9   | [12]  |
| <b>Orange R</b>        | -36,1   | [25]  |
| <b>Yellow 3R</b>       | -37,3   | [25]  |
| <b>Bordo B</b>         | -35,4   | [25]  |
| <b>vz. 43</b>          | -34,8   | [26]  |
| <b>vz. 230</b>         | -43,3   | [26]  |

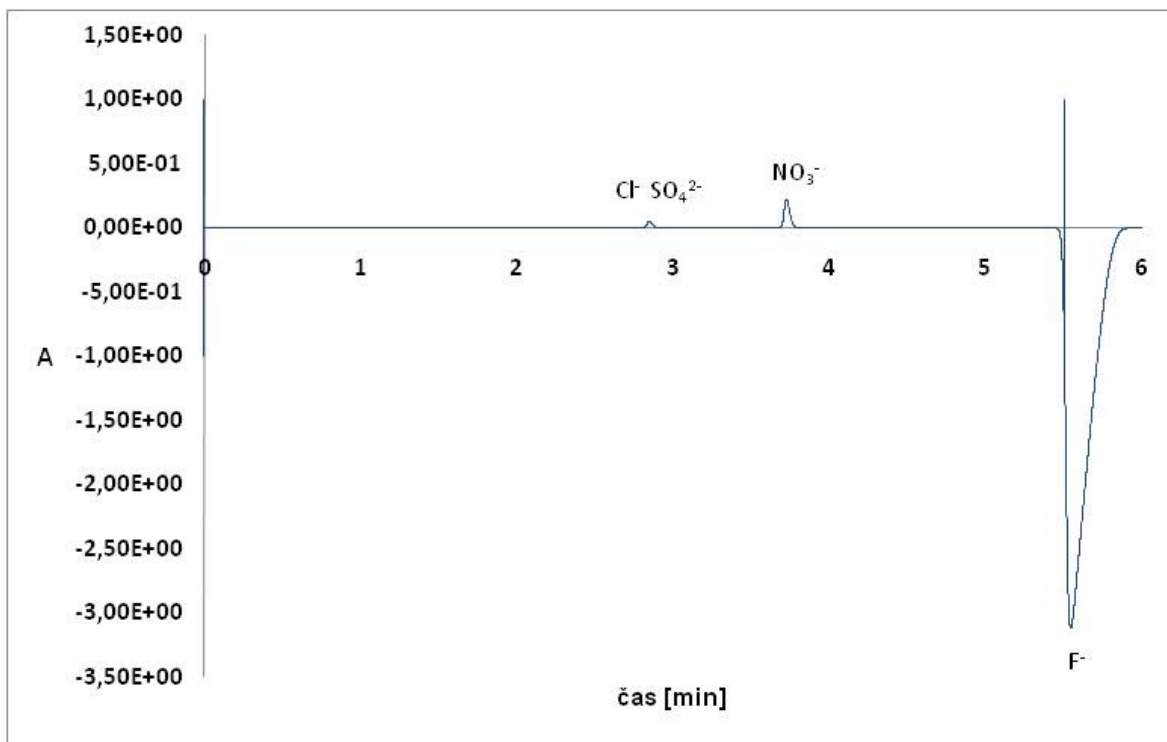
Na základě uvedených pohyblivostí použitých barviv a jejich meziproductů a na základě navržených složení základních elektrolytů (tabulka č. 4) byly provedeny simulace separací aniontů pomocí programu Peakmaster. Nejprve bylo simulováno složení elektrolytu  $3 \text{ mmol.l}^{-1}$  kyseliny borité a  $4 \text{ mmol.l}^{-1}$  I-kyseliny. V tomto elektrolytu by dle simulace zobrazené na obrázku č. 13 mělo dojít k separaci tří aniontů, pouze sírany a chloridy nejsou zcela oddělené.



**Obrázek č. 13:** Simulace separace s I – kyselinou

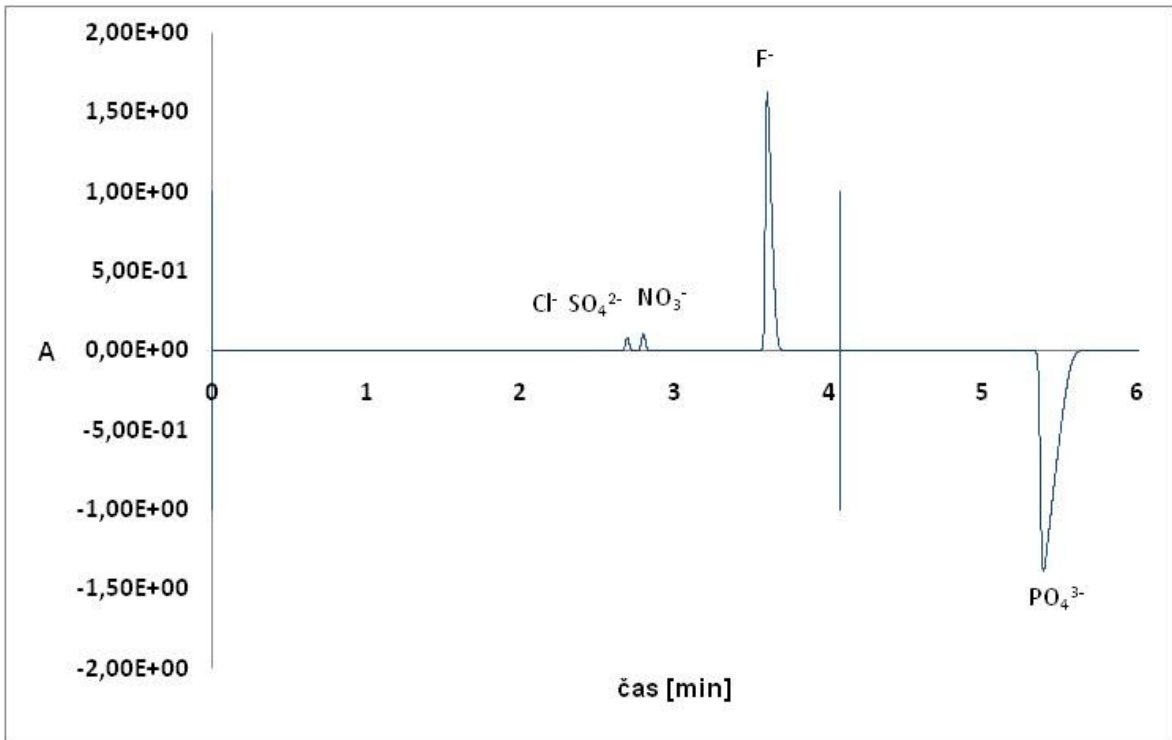
Dále byly ověřeny vlivy solí na rozdělení aniontů pomocí simulačního programu. Soli jsou často přítomny v komerčně dostupných azobarvivech. Proto byla provedena simulace separace s obsahem chloridu sodného o koncentračním poměru s I – kyselinou 1:4, 1:1 a 4:1 (obrázky č. 14-16). Simulace separace v elektrolytu s poměrem I – kyseliny a chloridu sodného 4:1 ( $4 \text{ mmol.l}^{-1}$  I – kyseliny,  $1 \text{ mmol.l}^{-1}$  chloridu sodného) nebyly chloridy a sírany rozděleny vůbec a píky byly zaznamenány jako pozitivní změna absorbance (obrázek č. 14).



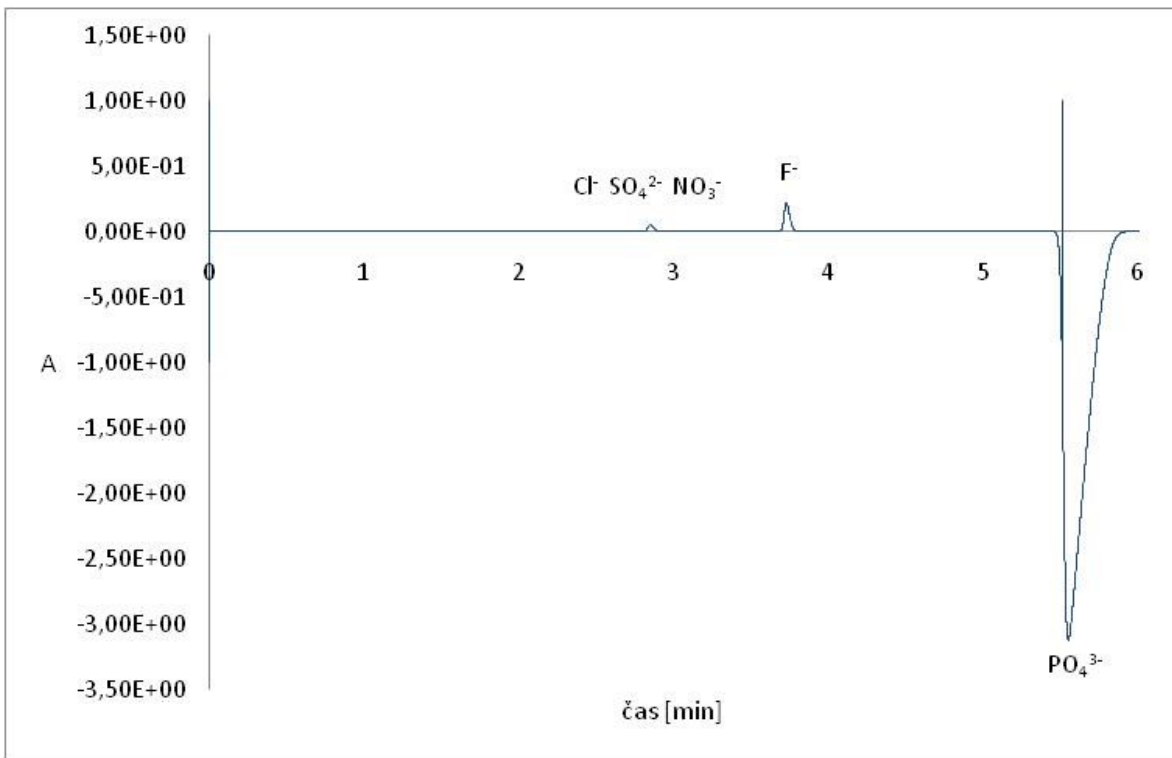


**Obrázek č. 14:** Modelace separace poměr 1:4 NaCl : I – kyselina

Při zvyšování koncentrace chloridu sodného v simulovaném základním elektrolytu dochází k podstatné změně záznamu separace aniontů. Simulace při ekvimolárním poměru koncentrací je uvedena na obrázku č. 15 a separace při čtyřnásobně vyšší koncentraci chloridu sodného v porovnání s I – kyselinou je uvedena na obrázku č. 16.

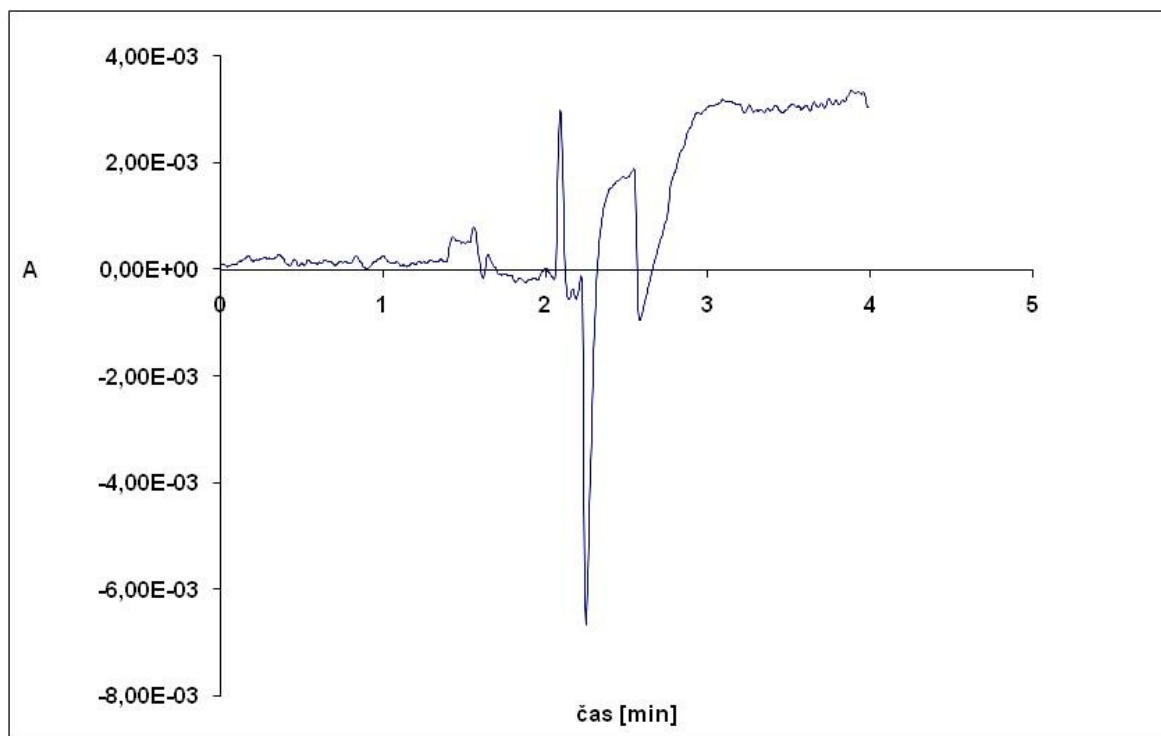


**Obrázek č. 15:** Modelace separace poměr 1:1 NaCl : I – kyselina



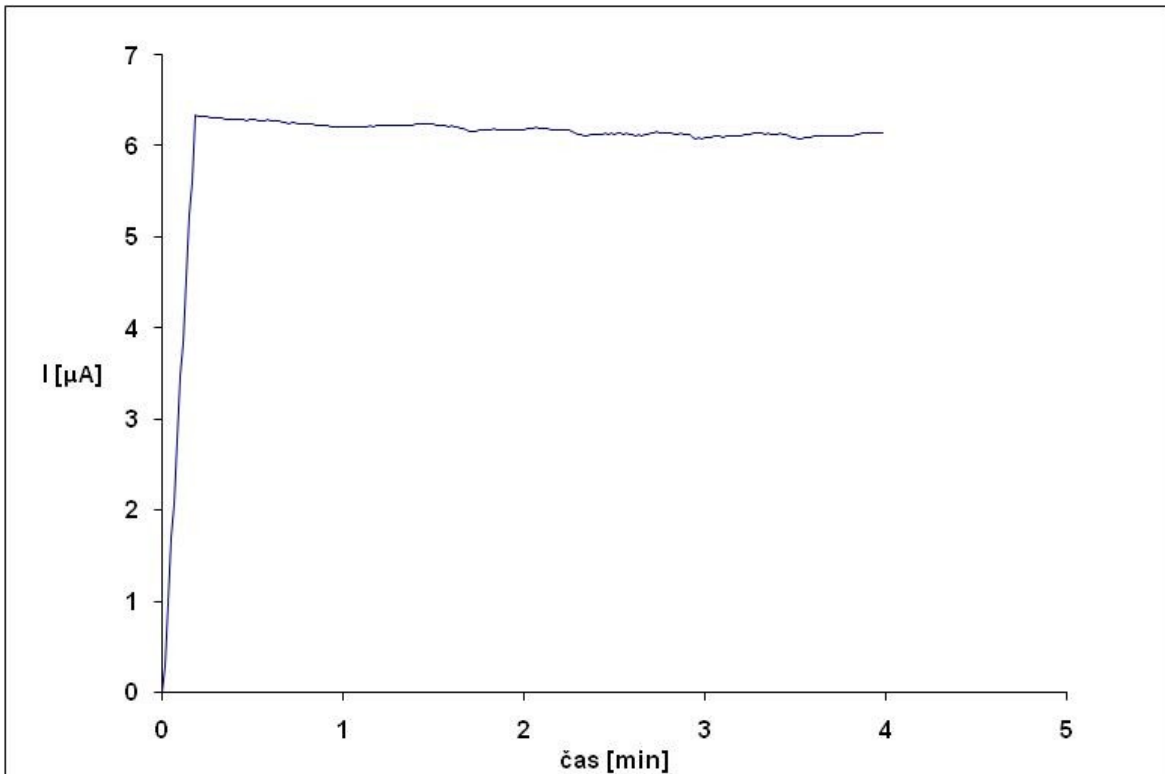
**Obrázek č. 16:** Modelace separace poměr 4:1 NaCl : I – kyselina

Po provedení simulovaných separací byly vyzkoušeny také separace v reálném systému s použitím I – kyseliny jako kontrastní látky. Vzhledem k dosaženému záznamu je patrné, že použitá I – kyselina obsahovala soli, jejichž přítomnost vedla k špatnému dělení směsi aniontů (obrázek č. 17). Tuto skutečnost lze pozorovat také na záznamu proudu v průběhu analýzy, který po ustálení napětí na -20 kV vykazuje mírné odchylky od konstantní hodnoty, což může být způsobeno právě přítomností solí v základním elektrolytu (obrázek č. 18).

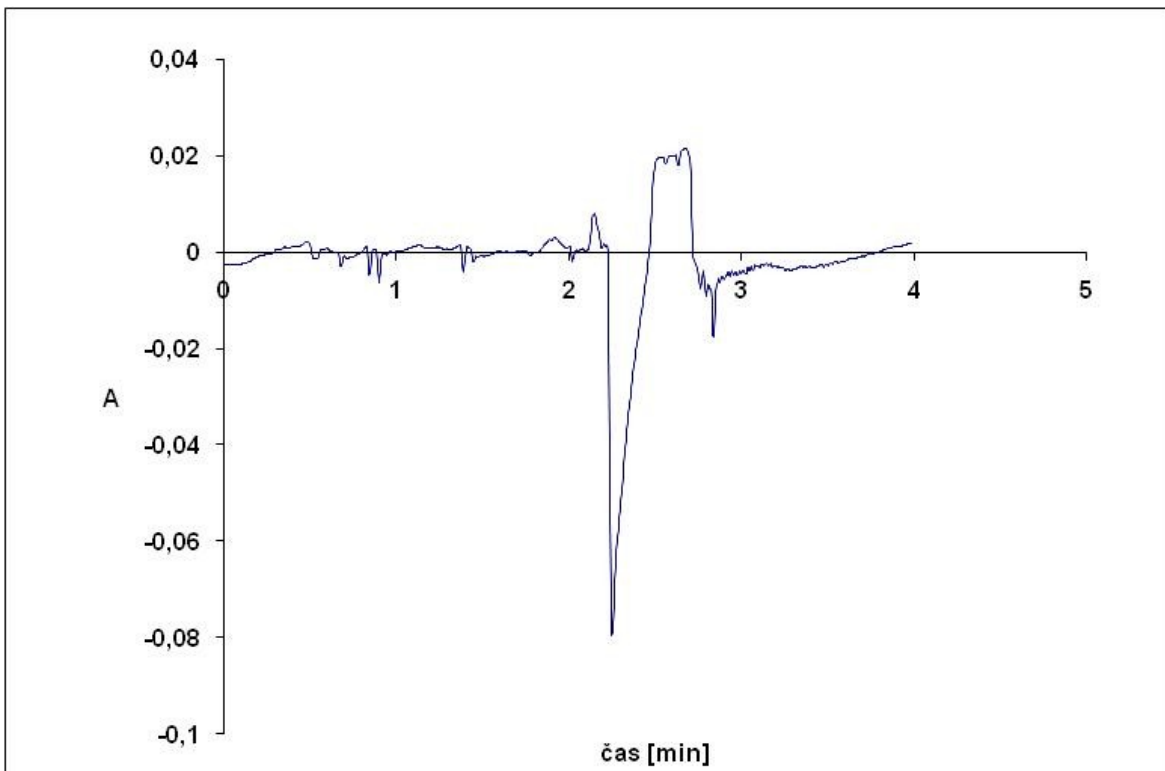


**Obrázek č. 17:** Skutečná separace I - kyselina

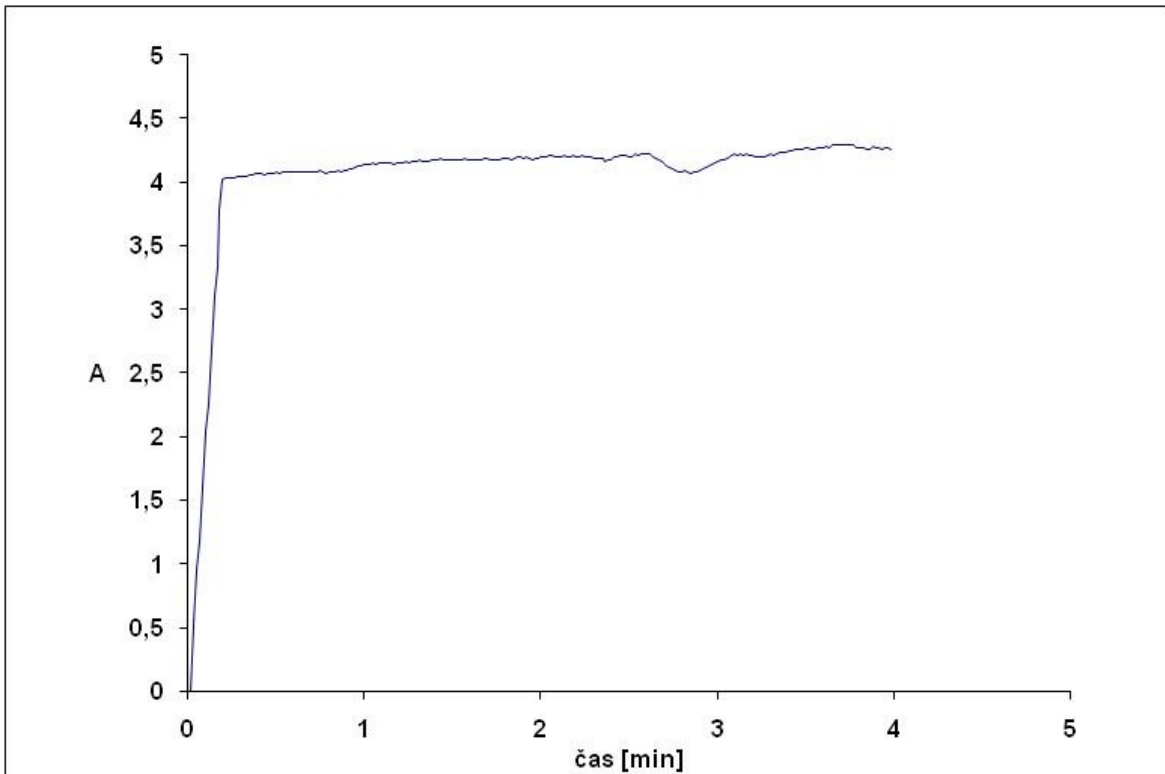
Dále byly provedeny separace směsi pěti aniontů v elektrolytech s přidávkou dalších meziproduktů a azobarviv. Výsledné záznamy vedly k obdobným pozorováním jako v případě I – kyseliny, jak pro záznam absorbance na čase (obrázky č. 19, 21, 23), tak pro záznamy proudu (obrázky č. 20, 22, 24). U těchto sloučenin se opět mohlo vyskytovat větší množství solí, které vedly k znehodnocení separace. Pro provedení úspěšné separace by tedy bylo nutné použité chemikálie zbavit přítomnosti solí, které výrazně ovlivňují tvary píků jednotlivých aniontů. U dalších použitých barviv (tabulka č. 6) nejsou záznamy separací zobrazeny vzhledem k tomu, že opět nebylo dosaženo úspěšné separace.



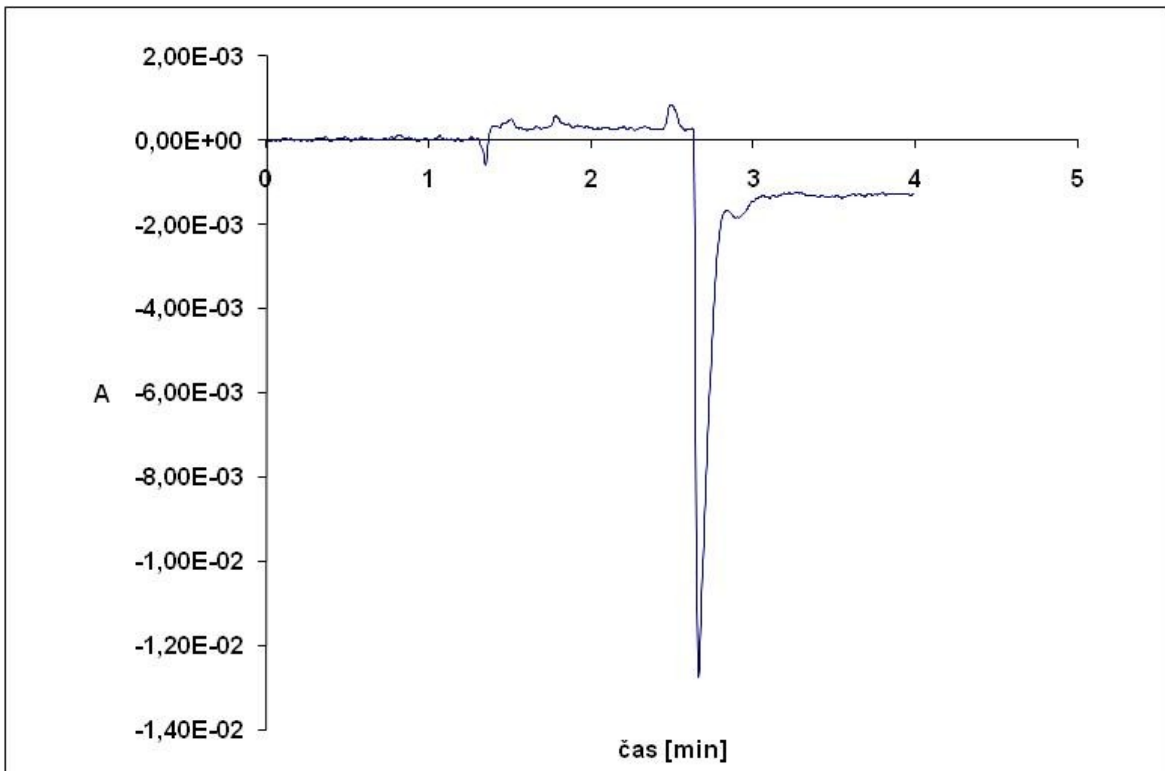
**Obrázek č. 18:** Závislost proudu na čase při skutečné separaci I - kyseliny



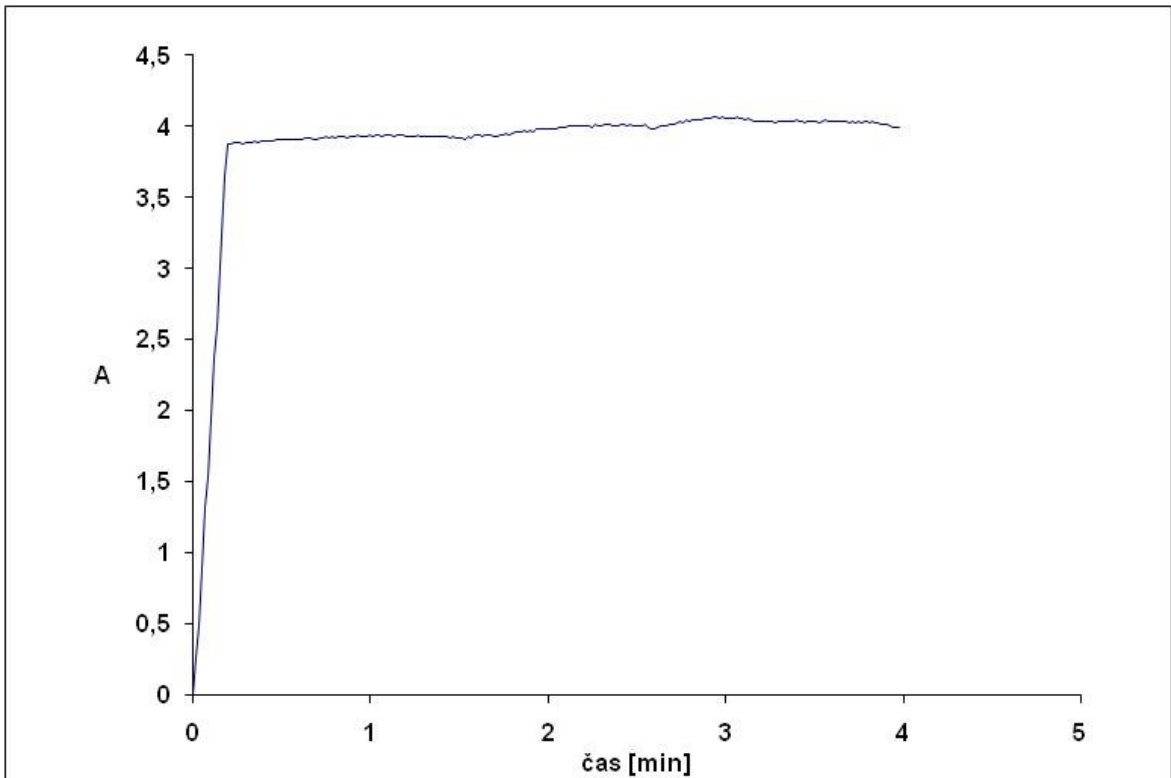
**Obrázek č. 19:** Skutečná separace dI - I kyselina



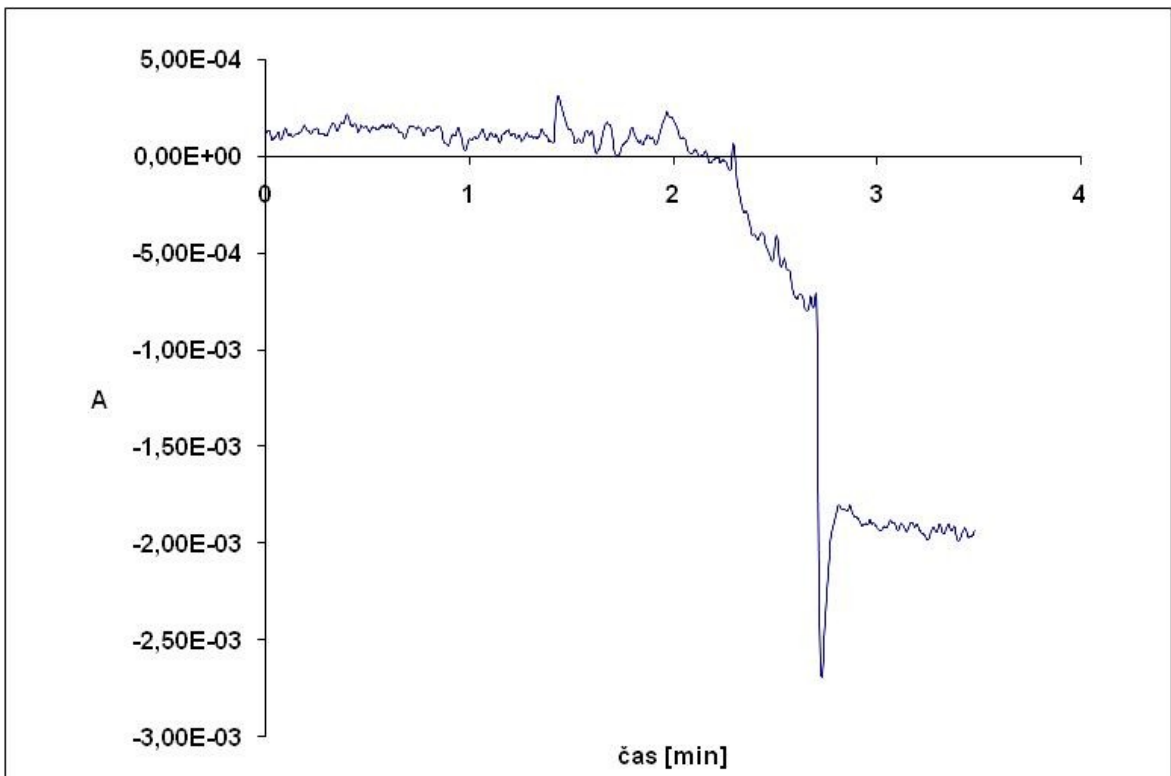
**Obrázek č. 20:** Závislost proudu na čase při skutečné separaci dI - I kyselina



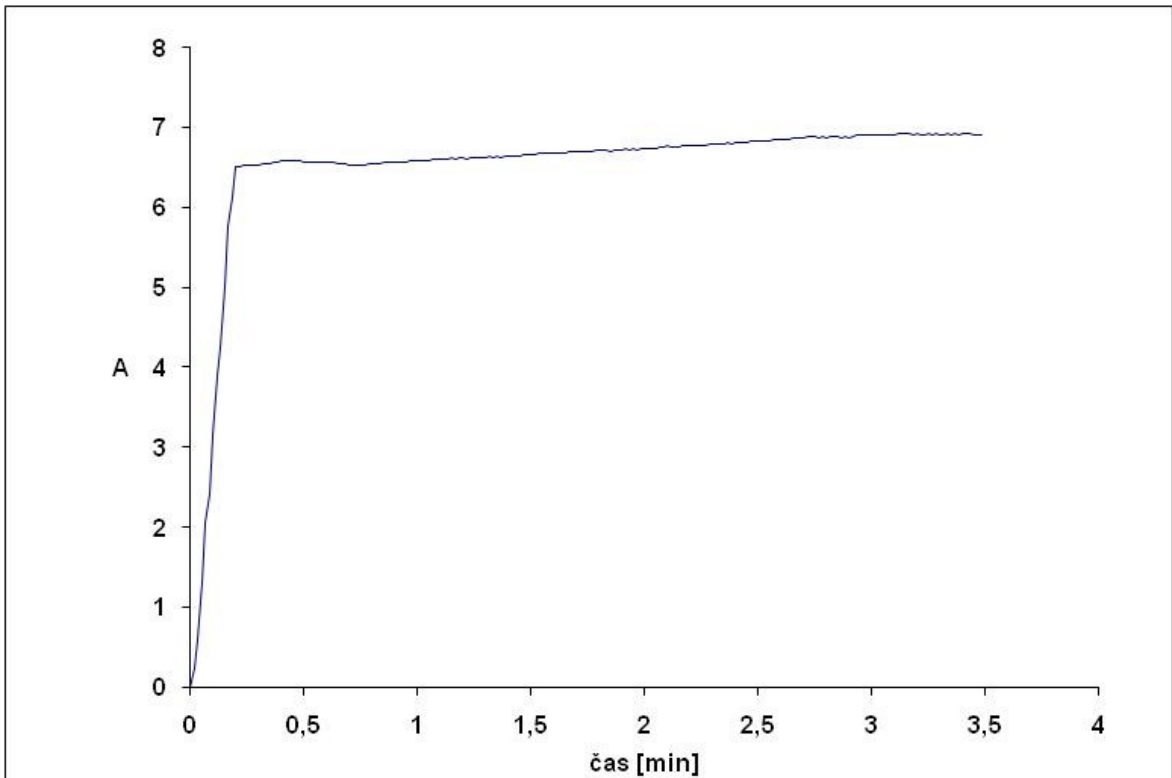
**Obrázek č. 21:** Skutečná separace vz. 230 zředěný



**Obrázek č. 22:** Závislost proudu na čase vz. 230 zředěný



**Obrázek č. 23:** Skutečná separace vz. 43 zředěný



**Obrázek č. 24:** Závislost proudu na čase vz. 43 zředěný

## 9. ZÁVĚR

Metoda kapilární zónové elektroforézy je velmi často využívána k analýze iontů ve vzorcích nápojů a dalších potravinářských vzorcích. V předchozím textu jsou formou literární rešerše uvedeny metody analýzy aniontů v nápojích pomocí kapilární zónové elektroforézy s nepřímou UV detekcí a v některých případech i s využitím sulfonovaných azobarviv jako kontrastní látky.

Na základě úlohy z laboratorních cvičení [2] byla provedena analýza aniontů v elektrolytovém systému s použitím chromanu sodného jako kontrastní látky. Dále byly simulovány separace aniontů v elektrolytech s azobarvivy a jejich meziprodukty. Vybraná barviva a jejich meziprodukty byly poté aplikovány v reálném systému na separaci aniontů. Vzhledem ke složení a čistotě barviv, které byly k dispozici, nebylo dosaženo srovnatelné separace pěti aniontů jako v případě elektrolytu s chromanem sodným. Přesto jsou studované podmínky využitelné z hlediska dalšího vývoje metod s použitím sulfonovaných azobarviv jako kontrastních látek při UV detekci. Jelikož nebylo dosaženo úspěšné separace, tak se podmínky separace neaplikovaly na skutečné vzorky.



## 10. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] P. COUFAL, Elektroforetické separace organických sloučenin, Analýza organických látek. Sborník přednášek z kurzu. Český Těšín: 2 Theta, 1999. s. 211-227. ISBN 80-902432-9-0.
- [2] P. ČESLA, Návod pro laboratorní cvičení z pokročilé instrumentální analýzy – Kapilární zónová elektroforéza, stanovení aniontů, Univerzita Pardubice, 2008.
- [3] P. KLOUDA, *Moderní analytické metody*, Ostava (2003), s. 34-35.
- [4] P. ČESLA, Přednášky z Instrumentálních metod analytických, Univerzita Pardubice, 2007.
- [5] J. PAZOUREK, *Elektroforetické analytické metody*, Moderní elektroforetické analytické metody, (2003) 36-37.
- [6] J. FISCHER, P. ČESLA, *XLII. seminář o tenzidech a detergentech*, Sborník přednášek, (2009), s. 37-51, ISBN 978-80-7395-211-2.
- [7] F. M. MORA, J. FELHOFER, A. AYON, C. D. GARSIA, *Anal. Lett.* 41 (2008) 312-334.
- [8] P. ČESLA, J. FISCHER, *XLII. seminář o tenzidech a detergentech*, Sborník přednášek, (2009), s. 53-59, ISBN 978-80-7395-211-2.
- [9] P. ČESLA, *Analýza sulfonovaných organických sloučenin kapilární elektroforézou*, Univerzita Pardubice, 2005.
- [10] Z. MALÁ, R. VESPALEC, P. BOČEK, *Electrophoresis*, **15** (1994), 1526-1530.
- [11] R. A. FRAZIER, J. M. AMES, H. E. NURSTEN, *Capillary Electrophoresis for Food Analysis :Method Development*. 1st edition. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2000. 127 s. ISBN 0-85404-492-2.
- [12] J. FISCHER, P. JANDERA, P. ČESLA, V. STAŇĚK, *J. Sep. Sci.*, **26** (2003), 1035-1044.
- [13] J. T. SPADARO, M. H. GOLD, V. RENGANATHAN, *Appl. Environ. Microbiol.* **58** (1992) 2397.
- [14] <http://cs.wikipedia.org/wiki/Kategorie:Azobarviva>, staženo 10. 3. 2012
- [15] CH. W. KLAMPFL, *J. Agric. Food Chem.*, **47** (1999), 987-990.
- [16] T. SOGA, G. A. ROSS, *J. Chromatogr. A*, **767** (1997), 223-230.
- [17] K. W. SWALLOW, N. H. LOW, *J. Agric. Food Chem.*, **42** (1994), 2808-2811.
- [18] M. ARELLANO, J. ANDRIANARY, F. DEDIEU, F. COUDERC, P. PUIG, *J. Chromatogr. A*, **765** (1997), 321-328.

- [19] W. YANG, Z. ZHANG, *Anal. Lett.*, **36** (2003), 465-477.
- [20] CH. W. KLAMPFL, M. U. KATZMAYR, W. BUCHBERGER, *Electrophoresis*, **19** (1998), 2459-2464.
- [21] W. P. YANG, B. O'FLAHERTY, A. L. CHOLLI, *J. Environ. Sci. Health*, **A36(7)** (2001), 1271-1285.
- [22] C. JOHNS, M. MACKA, P. R. HADDAD, *Electrophoresis*, **21** (2000), 1312-1319.
- [23] G. A. B. HERAS, M. C. BREADMORE, C. JOHNS, J. P. HUTCHINSON, E. F. HILDER, P. LOPÉZ - MAHÍA, P. R. HADDAD, *Electrophoresis*, **29** (2008), 3032-3037.
- [24] Peakmaster 5.2, Michal Jaroš, Milan Štědrý, Vlastimil Hruška, Iva Zusková, Bob Gaš, volně dostupné na <http://web.natur.cuni.cz/gas/>.
- [25] P. ČESLA, J. FISCHER, E. TESAŘOVÁ, P. JANDERA, V. STANĚK, *J. Chromatogr. A*, **1149** (2007), 358-367.
- [26] P. ČESLA, nepublikované výsledky, 2008.