

UNIVERZITA PARDUBICE  
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

DIPLOMOVÁ PRÁCE

2017

Bc. Simona Dominiková

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko – technologická

Analýza kyseliny vinné a citronové kapilární zónovou elektroforézou

Bc. Simona Dominiková

Diplomová práce

2017

University of Pardubice

Faculty of chemical - technology

Analysis of tartaric and citric acid using capillary zone electrophoresis

Bc. Simona Dominiková

Thesis

2017

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2016/2017

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Simona Dominiková**  
Osobní číslo: **C15579**  
Studijní program: **N1407 Chemie**  
Studijní obor: **Analytická chemie**  
Název tématu: **Analýza kyseliny vinné a citronové kapilární zónovou elektroforézou**  
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 vědecké literatuře vyhledejte a rešeršně zpracujte práce zabývající se stanovením kyselin vinné a citronové kapilární zónovou elektroforézou. Porovnejte přístupy využívající přímou a nepřímou UV detekci.
2. Optimalizujte separaci kyselin vinné a citronové pomocí kapilární zónové elektroforézy. Zaměřte se také na stanovení migračních charakteristik v závislosti na složení základního elektrolytu a porovnejte výsledky s použitím různých typů detekce.
3. Získaná experimentální data kriticky zhodnoťte a diskutujte.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

**Podle pokynů vedoucího práce.**

Vedoucí diplomové práce:

**doc. Ing. Petr Česla, Ph.D.**

Katedra analytické chemie

Konzultant diplomové práce:

**Ing. Jana Váňová**

Katedra analytické chemie

Datum zadání diplomové práce:

**20. února 2017**

Termín odevzdání diplomové práce:

**12. května 2017**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.  
děkan

L.S.



prof. Ing. Karel Ventura, CSc.  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2017

## **Prohlášení**

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 18. 5. 2017

Bc. Simona Dominiková

## **Poděkování**

Tímto bych ráda poděkovala svému vedoucímu práce panu doc. Ing. Petru Česlovi, Ph.D. za jeho cenné rady, odbornou pomoc a čas, který mi věnoval při zpracování diplomové práce.

Velký dík patří mým rodičům a prarodičům, kteří mi umožnili studium na vysoké škole a při studiu mě velmi podporovali.

Děkuji

## **Anotace**

Cílem diplomové práce bylo optimalizovat separaci kyseliny vinné a citronové pomocí kapilární zónové elektroforézy. Práce byla zaměřena na stanovení migračních charakteristik v závislosti na složení základního elektrolytu. Byly porovnány výsledky separace s přímou detekcí a nepřímou detekcí.

## **Klíčová slova**

Kyselina citronová, kyselina vinná, kapilární elektroforéza, on-line prekoncentrační techniky, přímá detekce, nepřímá detekce.

## **Title**

Analysis of tartaric and citric acid using capillary zone electrophoresis

## **Annotation**

The aim of my thesis was the optimization of the separation of tartaric acid and citric acid by capillary zone electrophoresis. Thesis was focused on determining the migration characteristics depending on the composition of the background electrolyte. The separation results were compared with direct detection and indirect detection.

## **Keywords**

Citric acid, tartaric acid, capillary electrophoresis, on-line preconcentration techniques, direct detection, indirect detection.



# Obsah

Obsah .....	9
Seznam obrázků .....	10
Seznam zkratk .....	11
Úvod.....	10
1 Teoretická část .....	11
1.1 Elektromigrační separační metody.....	11
2 Kapilární elektroforéza.....	14
2.1 Dávkování v kapilární elektroforéze .....	16
2.2 Účinnost separace v kapilární elektroforéze .....	18
2.3 Detekce v kapilární elektroforéze .....	20
3 On-line prekoncentrační techniky používané v CZE .....	25
3.1 On-line prekoncentrace ionizovatelných analytů.....	26
3.2 Prekoncentrace neutrálních a ionizovatelných látek .....	27
4 Analýza kyseliny vinné a citronové kapilární zónovou elektroforézou .....	30
5 Experimentální část.....	32
5.1 Chemikálie a pomůcky.....	32
5.2 Použité přístroje a instrumentace .....	32
5.3 Příprava základní elektrolytů .....	33
5.4 Příprava vzorků .....	33
5.5 Postup analýzy .....	34
6 Výsledky a diskuze .....	35
6.1 Separace kyselin s přímou UV detekcí .....	35
6.1.1 Separace v elektrolytu v kyselé oblasti pH .....	37
6.1.2 Separace v elektrolytu v zásadité oblasti pH.....	39
6.1.3 Kalibrace v 180 mM elektrolytu .....	40
6.1.4 Kalibrace v 18 mM elektrolytu .....	42
6.1.5 Kalibrace v 60 mM elektrolytu .....	43
6.2 Separace kyselin s nepřímou UV detekcí.....	45
6.2.1 Optimalizace koncentrace pracovního elektrolytu.....	48
6.2.2 Zakoncentrování pomocí techniky nametení .....	50
7. Závěr .....	54
8 Seznam použité literatury.....	55
PŘÍLOHY .....	59

## Seznam obrázků

Obrázek 1 Elektrická dvojvrstva: znázorněna kapilární stěna, difuzní vrstva a Sternova vrstva, převzato z [5]...	11
Obrázek 2 Nahoře: vznik elektrické dvojvrstvy a vytvoření zeta potenciálu, dole: elektroosmotický tok, převzato z [5].....	14
Obrázek 3 Schéma zařízení pro kapilární elektroforézu, převzato z [6]. .....	15
Obrázek 4 Dávkování v kapilární elektroforéze, A -tlakem, B- hydodynamické, C- elektrokinetické, převzato z [19].....	17
Obrázek 5 Schéma procesů elektrodisperze, převzato z [5].....	19
Obrázek 6 Rozdíl mezi kontaktní a bezkontaktní vodivostní detekcí, převzato z [2]. .....	23
Obrázek 7 Schéma elektroforegramu s nepřímou UV detekcí, převzato z [17].....	25
Obrázek 8 Možnosti prekoncentrací v kapilární elektroforéze, převzato z [10]. .....	26

## Seznam zkratk

BGE	základní elektrolyt
CEC	kapilární elektrochromatografie
CIEF	kapilární isoelektrická fokusace
CGE	kapilární gelová elektroforéza
CTAB	cetytrimethylammonium bromid
CZE	kapilární zónová elektroforéza
DAD	detektor s diodovým polem
EOF	elektroosmotický tok
FASS	zakoncentrování vzorku zesílením pole
ITP	isotachoforéza
LIF	laserem indukovaná fluorescence
LOD	limit detekce
LOQ	limit kvantifikace
LE	vedoucí elektrolyt
LVSS	zakoncentrování vzorku z velkého objemu
MEKC	micelární elektrokinetická kapilární chromatografie
PS	pseudostacionární fáze
TE	koncový elektrolyt
tITP	přechodná izotachoforéza

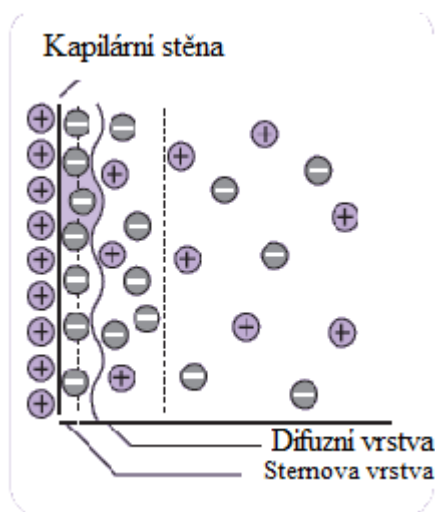
## Úvod

Elektromigrační separační metody se staly vhodným nástrojem pro separaci směsí látek různých fyzikálně-chemických vlastností. Výhody těchto metod spočívají v rychlosti analýzy a malé spotřebě vzorku a ostatních činidel, díky tomu i malý odpad. Na druhou stranu poskytují nižší citlivost detekce, to vede k zavádění on-line prekoncentrace. Použití on-line prekoncentrace umožní zaostření složek analytu do velmi úzkých zón. Pro analyty, které neobsahují ve své struktuře vhodný chromofor, je nepřímá detekce v kapilární elektroforéze výhodná. Diplomová práce je zaměřena na použití přímé a nepřímé detekce při optimalizaci separace kyseliny citronové a vinné. Tyto kyseliny se vedle sebe obtížně separují a detekují. Proto byla použita technika zakoncentrování tzv. sweepingem (nametení) a lépe byly detekovány nepřímou UV detekcí než přímou UV detekcí.

# 1 Teoretická část

## 1.1 Elektromigrační separační metody

Elektromigrační separační metody využívají k transportu látek elektroforetickou pohyblivost a elektroosmotický tok. V prostředí elektrolytu stýkajícího se se stěnou kapiláry se vytváří elektrická dvojvrstva [1-3]. Vznik elektrické dvojvrstvy je způsoben selektivní adsorpcí jednoho druhu iontů na stěnu kapiláry nebo disociací ionogenních skupin na vnitřním povrchu kapiláry v prostředí silně zásaditého elektrolytu. Ionty vzniklé adsorpcí nebo disociací vytvářejí na stěně kapiláry imobilizovanou vrstvu, tzv. Sternovu vrstvu, zatímco v její difuzní části směrem do roztoku zůstává přebytek volného náboje. Tak se v blízkosti kapilární stěny vytváří rozdíl potenciálů, jehož část nacházející se v difuzní části elektrické dvojvrstvy se nazývá zeta potenciál  $\zeta$  (obrázek 1) [4,5]. Časem se ustaví rovnováha v rozložení nábojů. V elektromigračních technikách je na toto prostředí připojeno stacionární elektrické pole, které způsobí porušení rovnováhy v rozložení nábojů a vyvolá jejich pohyb [1].



Obrázek 1 Elektrická dvojvrstva: znázorněna kapilární stěna, difuzní vrstva a Sternova vrstva, převzato z [5].

Elektroforetická pohyblivost způsobí, že po aplikaci napětí se nabitě částice pohybují k opačně nabitě elektrodě [5,3]. Elektroforetická pohyblivost je definována jako rychlost pohybu nabitých částic v kapalném prostředí ve stejnosměrném elektrickém poli o jednotkové intenzitě [4]. Na začátku separace jsou částice v jednom místě. Během separace se postupně dostávají dopředu ty nabitě částice, které mají větší pohyblivost a opožďují se ty

částice, které mají nižší pohyblivost. V roztocích slabých elektrolytů se nacházejí molekuly disociované a nedisociované. Podíl nabitých částic je dán stupněm disociace  $\alpha$ . V tomto případě vykazuje molekula efektivní pohyblivost:

$$u' = \alpha u \quad (1)$$

kde  $u$  je pohyblivost disociované molekuly. Volbou pH prostředí lze ovlivňovat disociaci slabých kyselin a zásad a tím ovlivňovat i jejich separaci [6].

Elektroosmotický tok způsobí, že po aplikaci napětí se v křemenné kapiláře pohybuje elektrolyt k záporné elektrodě (obrázek 2). Elektroosmotický tok je silně závislý na pH. Při vysokém pH jsou silanolové skupiny deprotonovány a elektroosmóza je podstatně vyšší než při nízkém pH, kdy jsou silanolové skupiny nedisociované [5]. Narozdíl od elektroforetické pohyblivosti, při které putují pouze nabití ionty a zbytek roztoku je v klidu, při elektroosmóze se celý roztok pohybuje najednou [7]. Elektroosmotický tok transportuje všechny ionty přítomné v kapiláře stejnou rychlostí, působí jako neselektivní síla, ale i přesto významně ovlivňuje výslednou migrační rychlost přítomných analytů a tím i účinnost separace a dobu analýzy. Lze ho regulovat pomocí změny složení nosného elektrolytu nebo úpravou vnitřního povrchu separační kapiláry [4].

Principem separace složek vzorku je rozdílná rychlost jejich migrace, protože nabité částice různých složek se v určitém prostředí liší svou elektroforetickou pohyblivostí [1].

#### **Pohyblivost elektroosmotického toku vyjadřuje rovnice:**

$$\mu_{eos} = \frac{\varepsilon \cdot \zeta}{4 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r} \quad (2)$$

kde  $\mu_{eos}$  vyjadřuje pohyblivost elektroosmotického toku,  $\varepsilon$  vyjadřuje permitivitu základního elektrolytu,  $\eta$  označuje viskozitu,  $\zeta$  vyjadřuje zeta potenciál a  $r$  je poloměr kapiláry. Z této rovnice je patrné, že elektroosmotický tok je závislý na celé řadě vlastností základního elektrolytu a poloměru kapiláry.

### **Rychlost elektroosmotického toku se vypočítá:**

$$v_{eos} = \mu_{eos} \cdot E = \mu_{eos} \cdot \frac{U}{l} \quad (3)$$

kde  $E$  vyjadřuje intenzitu elektrického pole,  $U$  je vkládané stejnosměrné napětí,  $l$  je délka separační kapiláry.

Nabité částice mají v přítomnosti elektroosmotického toku celkovou pohyblivost  $\mu_2$ , která vyjadřuje rychlost toku iontů:

$$\mu_2 = \mu_e + \mu_{eos} \quad (4)$$

Současně je celková rychlost pohybu částice součtem lineární rychlosti elektroosmotického toku a elektroforetické rychlosti částic:

$$v = v_e + v_{eos} \quad (5)$$

Kladně nabitě ionty se pohybují rychleji v porovnání s elektroosmotickým tokem, záporně nabitě ionty se pohybují pomaleji a neutrální částice mají rychlost pohybu stejnou s elektroosmotickým tokem. Závisí to na jejich elektroforetické pohyblivosti [6,8].

### **Migrační čas:**

Jedná se o čas potřebný k migraci částice k detektoru ve vzdálenosti délky kapiláry  $l$  [8]:

$$t = \frac{l}{v_e + v_{eos}} \quad (6)$$

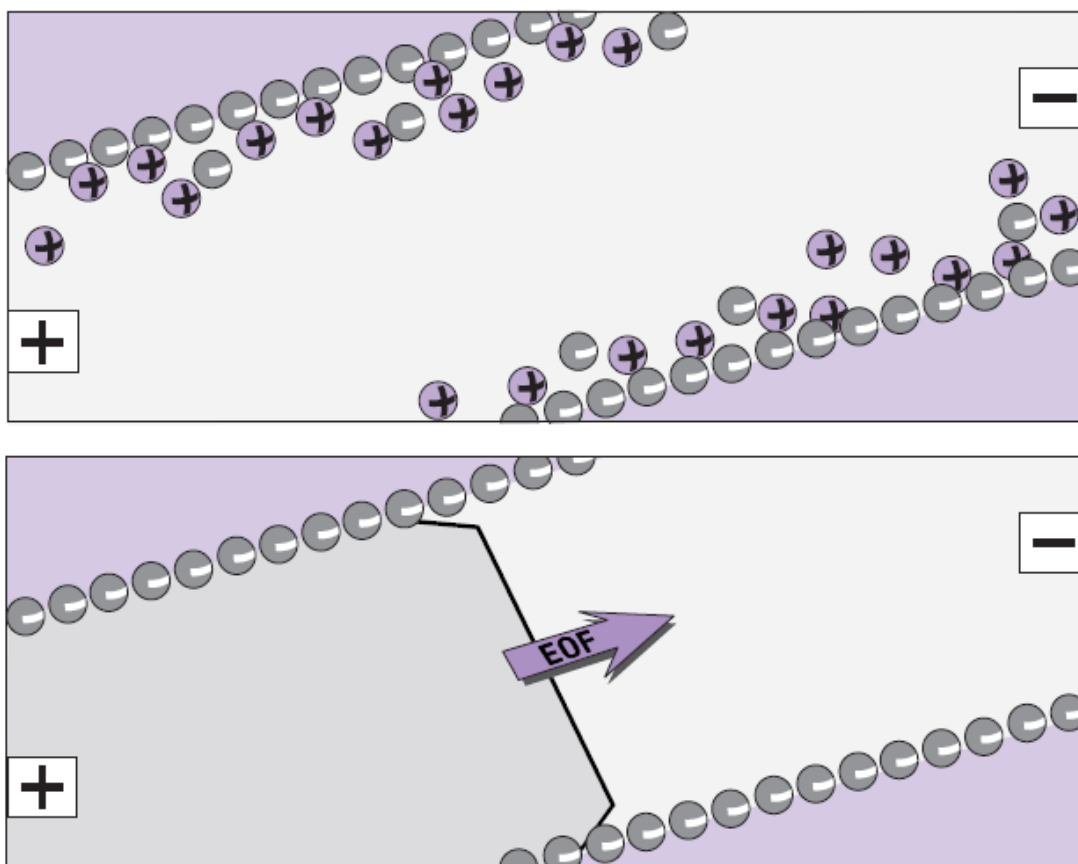
Efektivní pohyblivost se vypočítá:

$$\mu = \frac{l_{det} \cdot l_{celk}}{U} \cdot \left( \frac{1}{t_1} - \frac{1}{t_{eos}} \right) \quad (7)$$

Zdánlivá pohyblivost je určena:

$$\mu = \frac{l_{det} \cdot l_{celk}}{U} \cdot \left( \frac{1}{t_r} \right) \quad (8)$$

kde  $l_{det}$  je délka kapiláry k detektoru,  $l_{celk}$  je celková délka kapiláry a  $t_r$  je migrační čas analytu [9].



Obrázek 2 Nahoře: vznik elektrické dvojvrstvy a vytvoření zeta potenciálu, dole: elektroosmotický tok, převzato z [5].

## 2 Kapilární elektroforéza

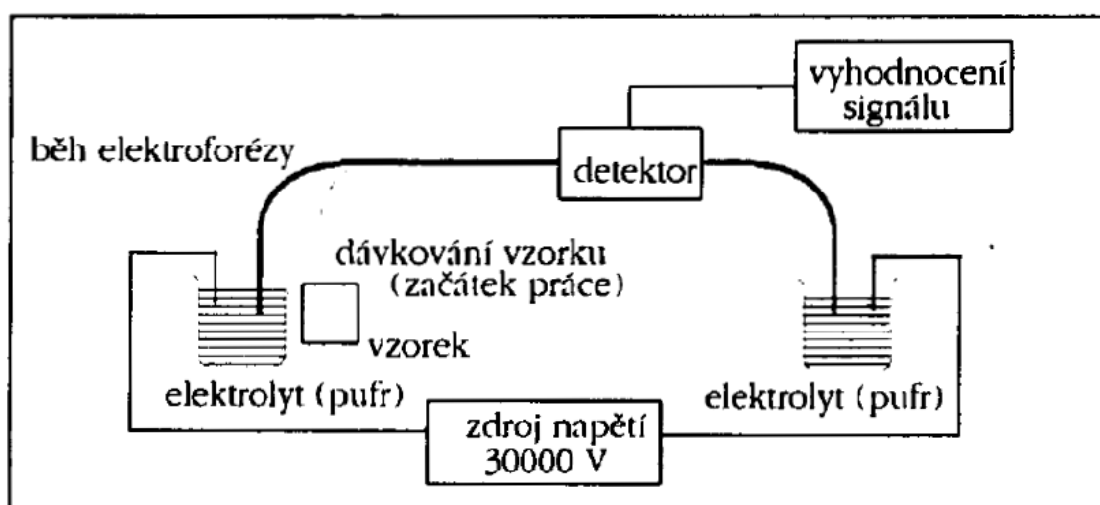
Kapilární elektroforéza je účinná mikrokolonová separační technika vhodná pro separaci velké řady analytů v různých matricích. Nevýhodou pro ni je nízká koncentrační citlivost v porovnání s vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií. Důvodem je dávkování velmi malých objemů vzorku a krátká absorpční dráha detekčního paprsku [10-14]. Kapilární elektroforéza má oproti jiným separačním technikám několik výhod jako je např. vysoká separační účinnost, minimální požadavky na úpravu vzorků, minimální množství vzorku a organických rozpouštědel [12-16]. Kapilární elektroforéza nabízí rozlišení, které u mnohých analytů nemůže být dosaženo pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Může být použita samostatně nebo ve spojení s hmotnostním spektrometrem [1,16].

Separací kapilára je nejčastěji vyrobena z taveného křemene. Má vnitřní průměr 10-100  $\mu\text{m}$  a délku 50-100 cm. Díky malému vnitřnímu průměru kapiláry je zabráněno promísění separovaných částic podélnou difuzí [6]. Také malý průměr separační kapiláry umožňuje účinně odvádět Jouleovo teplo, což umožňuje použití vysokých intenzit elektrického pole a



tím i dosažení vysokých účinností a rychlosti separace [4]. Kapilára je určena pro více použití, proto po každé práci musí být její povrch pročištěn a uveden do opakovatelného stavu [17].

Pro kapilární zónovou elektroforézu (CZE) je charakteristické, že vzorek migruje v základním elektrolytu (BGE). Ten se nachází v kapiláře a vede proud. Složení základního elektrolytu je konstantní v celé kapiláře a také v čase. Nutnou podmínkou pro separaci je fakt, že efektivní mobilita a migrační rychlost pro různé látky je různá [18]. Konce kapiláry jsou ponořeny do zásobníku s elektrolytem, společně s elektrodami z inertního materiálu (Pt). Mezi elektrody se aplikuje vysoké napětí (10 – 30 kV). Malý objem vzorku se dávkuje na konec kapiláry. Kapilára prochází přes detektor (obrázek 3) [1,18].



Obrázek 3 Schéma zařízení pro kapilární elektroforézu, převzato z [6].

Byla vypracována celá řada separačních módů, které doplňují kapilární zónovou elektroforézu o další aplikační možnosti:

- Micelární elektrokinetická kapilární chromatografie (MECC, MEKC) se používá k separaci neutrálních sloučenin a využívá povrchové aktivity micel.
- Kapilární gelová elektroforéza (CGE) využívá molekulově síťového efektu rozpuštěných látek v prostředí gelu.
- Kapilární isoelektrická fokusace (CIEF) slouží k separaci amfolytů v gradientu pH.
- Kapilární elektrochromatografie (CEC) využívá k pohybu mobilní fáze elektroosmotického toku a separace nastává podobně jako v kapalinové chromatografii, kde inertní je stacionární fáze [1,2,17].

## 2.1 Dávkování v kapilární elektroforéze

Vzorek je dávkován do konce kapiláry vzdálenější detektoru. Dávkuje se běžně 10 - 100 nl a zóna vzorku tvoří asi 1-2% délky kapiláry [17,19,20]. Pokud není omezujícím faktorem citlivost detekce, mělo by být vstříkováno co nejmenší množství vzorku. Naopak přetížení separační kapiláry vzorkem způsobí zhoršení rozlišení tím, že rozšiřuje píky nebo zkreslí tvary píků tak, že poté neodpovídají vodivosti mezi pracovním elektrolytem a vzorkem [5]. Dávkování je možné více způsoby:

**Dávkování tlakem:** Konec kapiláry je ponořen do nádoby se vzorkem a je aplikován zvýšený tlak [17,19,20].

**Dávkování hydrodynamické:** Hydrodynamické dávkování vzorku je nejpoužívanější metoda. Může být dosaženo pomocí aplikace tlaku na konci nástřiku nebo pomocí vloženého vakua na výstupním konci kapiláry. Je založeno na principu spojených nádob [17,19-21]. Nadávkovaný vzorek pomocí této techniky není ovlivněn matricí. Objem nadávkovaného vzorku závisí na rozměrech kapiláry, viskozitě pracovního elektrolytu, aplikovaném tlaku a době po kterou je vzorek dávkován. Objem lze vypočítat pomocí Hagen-Poiseuilleova rovnice:

$$V_{inj} = \frac{\Delta P d^4 \pi t}{128 \eta L} \quad (9)$$

kde  $\Delta P$  - změna tlaku kapiláry,  $d$  - vnitřní průměr kapiláry,  $t$  - čas,  $\eta$  - viskozita pracovního elektrolytu a  $L$  - celková délka kapiláry [5,20].

Typické vstřikovací tlaky a časy se pohybují v rozmezí od 25 - 100 mBar a 0,5 - 5 s v uvedeném pořadí. Pokud je kapilára krátká nebo má široký průměr, může být problém s nástřikem opakovatelného množství vzorku. To může významně zlepšit celkový tlak. Dále je důležité přesné držení teploty v kapiláře ( $\pm 0,1$  °C), které je nutné k nástřiku konstantního objemu vzorku. Liší se množství nadávkovaného vzorku na 1 °C o 2-3 % u migračních časů a viskozity pracovního elektrolytu v kapiláře. Dále je důležité, aby doba vstřikování byla co nejkratší. Také hladina kapaliny v dávkovací elektroforetické nádobce by měla být stejná jako hladina kapaliny v nádobce pro pracovní elektrolyt [5,20].

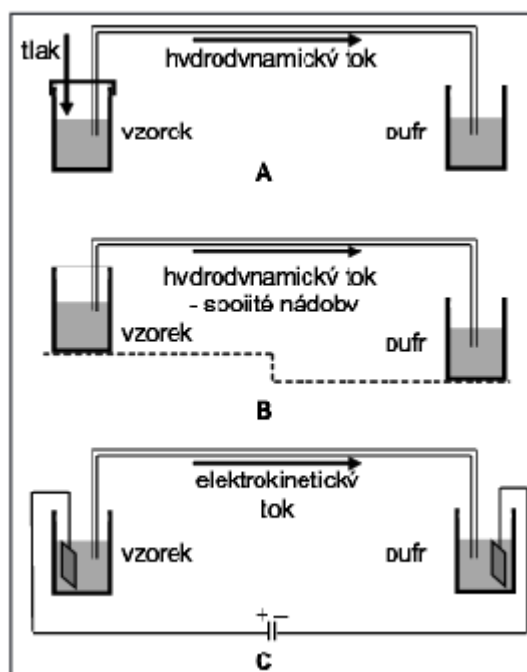
**Dávkování elektrokinetické:** Jedná se o snadné dávkování, nevyžaduje žádné další přístroje. Výhodné je pokud v kapiláře jsou viskózní elektrolyty nebo gely. Konec kapiláry je ponořen do nádoby se vzorkem a je přivedeno napětí. Obvykle je elektrické napětí 3 - 5 krát nižší, než které by bylo použito pro separaci. Jedinečná vlastnost tohoto dávkování je, že

nastříknuté množství vzorku závisí na elektroforetické mobilitě jednotlivých rozpuštěných látek. Nevýhodou je nepoměr mezi původním složením vzorku a složením po dávkování, protože do kapiláry migruje více pohyblivých částic než méně pohyblivých [5,17,19,22]. Kvůli matici může kolísat vodivost a to může mít za následek pokles vloženého napětí. Kvůli tomu není elektrokinetické dávkování tak reprodukovatelné jako hydrodynamické. Celkový nástřik  $Q$  (g nebo mol) lze vypočítat:

$$Q = \frac{(\mu_e + \mu_{EOS})V\pi r^2 C t}{L} \quad (10)$$

kde  $\mu_e$  - elektroforetická mobilita analytu,  $\mu_{eos}$  - elektroosmoza,  $V$  - napětí,  $r$  - poloměr kapiláry,  $C$  - koncentrace analytu,  $t$  - čas a  $L$  - celková délka kapiláry [5].

Alternativní a jednodušší způsob pro zesílení signálů je použití elektro-injekce vzorků. Vzorky jsou připraveny ve vysoce zředěném pufru. V konvenční elektro-injekci pro vysokoúčinnou kapilární elektroforézu se vzorky připravují v roztoku pufru, který má stejnou koncentraci jaká je použita při separaci. Množství nadávkovaného vzorku do kolony je omezené [20,21].



Obrázek 4 Dávkování v kapilární elektroforéze, A -tlakem, B- hydrodynamické, C- elektrokinetické, převzato z [19].

## 2.2 Účinnost separace v kapilární elektroforéze

Molekuly analytu se difuzí dostávají do různě vzdálených míst od středu kapiláry. Pokud se liší rychlost v různých místech kapiláry, molekuly se od sebe vzdalují a dochází k rozšiřování zón jako je tomu u kapalinové chromatografie. Jiný případ je CE, kde díky elektroosmotickému toku, který má pístový profil a je generován po celé délce toku kapiláry, je výsledkem stejný průtok po celé délce kapiláry.

### Difuze:

Hlavní příčinou rozšiřování zón je molekulární difuze rozpuštěných složek při průchodu kapilárou. Je nejmenší u velkých molekul, protože mají malé difuzní koeficienty. Pro tyto analyty je možné dosahovat počtu teoretických pater v řádu milionů, pro menší látky v řádu set tisíc [19,23].

### Elektromigrační disperze:

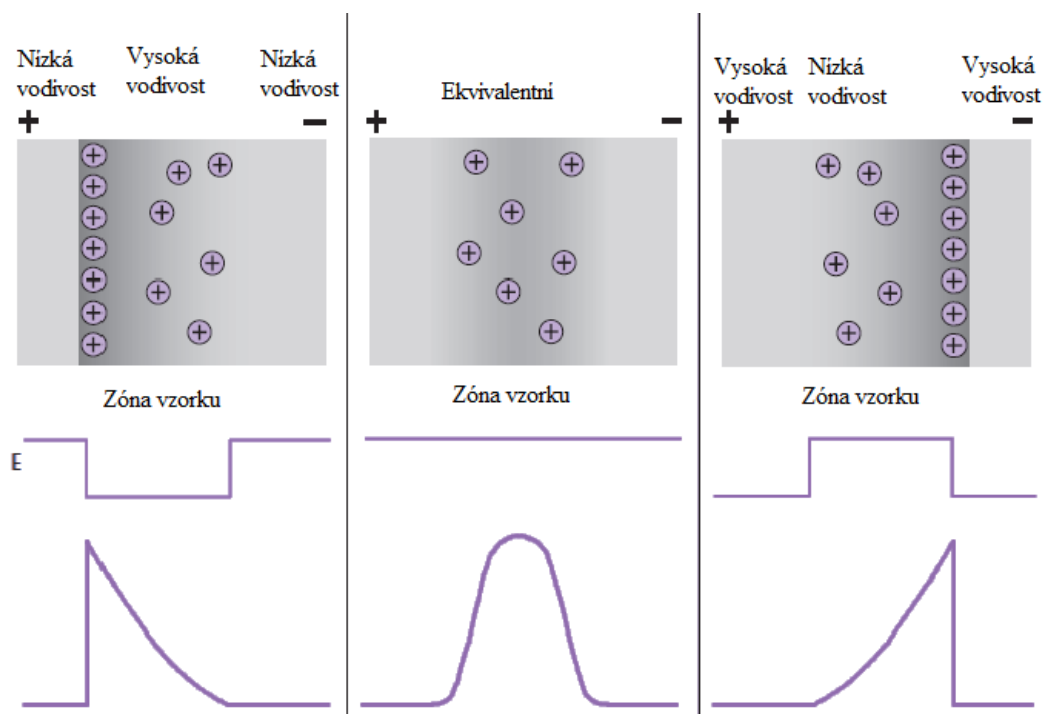
Rozdíly ve vodivosti v zónách rozpuštěného analytu a zóně pracovního elektrolytu se projeví v deformaci píku na elektroforegramu. Rozdíly mají za následek tři hlavní účinky:

- 1) zkosení tvaru píku
- 2) zaostření analytu, při nízké vodivosti vzorku
- 3) stav přechodné izotachoforézy, kvůli přebytku určitého iontu např.  $\text{Cl}^-$  [5].

Když ion analytu migruje základním elektrolytem s ko-iontem  $C$ , změny vodivosti ( $\Delta K$ ) roztoku lze vypočítat pomocí Kohlrauschovy rovnice:

$$\frac{\Delta K}{k^\beta} = \frac{\mu_a - \mu_b}{\mu_a} \cdot \frac{C_A^\xi}{C_B^\beta} \quad (11)$$

kde  $\Delta K$  je změna vodivosti,  $k^\beta$  je vodivost základního elektrolytu,  $C_A^\xi$  je koncentrace zóny analytu,  $C_B^\beta$  je koncentrace zóny v základním elektrolytu [2].



Obrázek 5 Schéma procesů elektrodisperze, převzato z [5].

Tyto deformace tvarů píků na elektroforegramu jsou způsobeny rozdílem vodivosti v zóně vzorku a základního elektrolytu. Když má ion analytu vyšší pohyblivost (vyšší vodivost, nižší odpor) než ko-ion v pracovním elektrolytu dostane se tak do místa s nižším napětím. Pokud ionty na přední hraně migrují ze své zóny, jsou urychleny v místě, kde je vyšší elektrické napětí, tak čelní hrana je plošší v porovnání s prostou difuzí. Ovšem pokud ion opustí zónu ze zadní hrany a dostane se do místa o vyšší intenzitě, je zde urychlen a vrácen do původní pozice. Jiná možnost je pokud má ion analytu nižší pohyblivost než ko-ion v pracovním elektrolytu. Mechanismus deformace tvaru píků je stejný. Neutrální látky jsou nedotčeny změnami vodivosti [5,23].

### **Dávkování:**

Rozšiřování zón způsobené dávkováním je další faktor, který nepříznivě ovlivňuje účinnost separace. Dávkování vzorku může vytvořit startovní zónu analytu dosahující několik mm délky kapiláry. Za těchto okolností je elektrické pole silnější ve startovní zóně než ve zbytku kapiláry vyplněné pracovním elektrolytem. Kationty vzorku se pohybují ve své zóně rychle vpřed, dokud nenarazí na rozhraní se základním elektrolytem, kde je intenzita elektrického pole menší, což jejich rychlost sníží. Tak se startovní zóna vzorku i více než desetinásobně zaostří [19].

### **Adsorpce:**

Přítomnost ionizovatelných skupin na vnitřní stěně kapiláry může ovlivňovat separaci analytů. Může se k nim sorbovat analyt, nejvíce pokud je molekula analytu větší a tím pádem má menší difuzní koeficient. V důsledku tohoto procesu dochází k rozmývání separovaných zón. Projeví se to deformací tvaru píků a nebo nemožností separace. Lze tomu předejít potažením celé kapiláry ochranným filmem [23].

### **Jouleovo teplo:**

Vznik Jouleova tepla je vyvolán průchodem elektrického proudu kapilárou. Může vést k rozmývání separovaných zón. Pokud se zahřeje obsah kapiláry, znemožňuje to použití vyššího elektrického napětí, protože by to vedlo k zvýšení pohyblivosti separovaných iontů a tím i ke zkrácení doby analýzy. Dále pokud by v základním elektrolytu byla přítomna organická sloučenina s nízkou teplotou varu, mohla by se odpařit a tím znemožnit celou analýzu. Jouleovo teplo vzniká v celé separační kapiláře a jediným izolantem jsou stěny kapiláry. Vede to k různým teplotám uvnitř kapiláry a na stěnách, což má za následek, že se ionty pohybují nejrychleji ve středu separační kapiláry. Teplotní rozdíly vedou k nehomogenně pohyblivosti, pH a detektor to zaznamenává rozšířením zóny [5,23].

## **2.3 Detekce v kapilární elektroforéze**

Stále je zkoumán výběr a použití citlivé a selektivní detekce v CE. Mezi jednotlivými typy detekčních systémů mají výhody elektrochemické detektory nad ostatními. Výhoda spočívá v tom, že mohou být spojeny např. s nanomateriály, které zlepšují citlivost, mez detekce a robustnost těchto detekčních systémů. Nanomateriály na elektrodách mohou působit jako katalyzátory a příznivě ovlivňovat detekci analytů [2].

### **Fotometrická detekce v UV oblasti**

Je využívána často kvůli svému univerzálnímu použití [24]. Mnoho organických látek může být detekováno při vlnových délkách 195-210 nm. V této oblasti vlnových délek jsou molární absorpční koeficienty nízké. V podstatě všechny organické molekuly absorbují při vlnových délkách 160-180 nm. Při těchto vlnových délkách může detekci negativně ovlivňovat absorpce světla a vzdušných plynů [25]. Fotometrická detekce v UV oblasti spektra (200-400 nm) nedosahuje takové citlivosti detekce jako u kapalinové

chromatografie [24]. V CE se to projeví vyššími hodnotami limitu detekce (LOD). K absorpci záření v CE dochází na velice krátké optické dráze, která je rovna vnitřnímu průměru separační kapiláry (20-100  $\mu\text{m}$ ). Pro použití je důležité, aby analyt obsahoval chromofor, který je možné detekovat [16,26]. V určitém místě kapiláry je měřena absorbance roztoku v místě průchodu světelného paprsku o dané vlnové délce. Ze získaného záznamu časového průběhu absorpce – elektroforegramu může být získána informace jak o kvalitě tak i kvantitě analytu. Kvalita analytu je dána migračním časem píku a kvantita analytu je přímo úměrná ploše píku [4].

### **Fluorescenční detekce**

Označovaná ve zkratce jako FD je mnohem citlivější než fotometrická detekce v UV oblasti. Stejně jako u fotometrické detekce v UV oblasti, tak i zde je potřeba, aby analyt obsahoval fluorofory, které je možné detekovat. Nejvíce se jedná o laserem indukovanou fluorescenci (LIF) [16,26]. LIF je jedna z nejvíce citlivých detekčních metod u CE, má dobré detekční limity. LIF má různá uspořádání včetně on-colum i post-colum LIF detekce [2,16,25]. Detektor využívající laserem indukovanou fluorescenci je drahý [19].

### **Elektrochemická detekce**

Elektrochemická detekce (ECD) je založena na oxidaci nebo redukci analytu na elektrodě. Vyznačuje se vysokou selektivitou a citlivostí. Detekce je možná po převedení analytů na jejich elektrochemicky aktivní deriváty. Detektory nejsou komerčně dostupné a jednotlivé laboratoře si je musejí vyrábět samy [26]. Výhodou této detekce je, že může být prováděna i ve velmi úzkých kapilárách, protože citlivost není závislá na šířce kapiláry [27]. Elektrochemická detekce pro CE může být rozdělena do tří kategorií: potenciometrická, vodivostní a amperometrická. Vodivostní a potenciometrické detektory obvykle poskytují odezvu s dobrou citlivostí. Elektrochemická detekce v CE může být obtížná a zdlouhavá od přípravy senzoru přes jeho výrobu.

### **Potenciometrická detekce:**

Potenciometrická detekce je založena na principu iontově-selektivních elektrod. Vybraný ion se dostává z roztoku vzorku přes lipofilní membránu do detektoru. Přítomnost analytů vytvoří změnu v rozdílu potenciálu mezi roztokem vzorku a roztokem v detektoru. Potenciálový rozdíl je měřen pomocí iontové aktivity, která je dána Nernstovou rovnicí a je přímo úměrná koncentraci iontu [25].

### **Amperometrická detekce**

Amperometrická detekce pracuje na základě přenosu elektronů ze vzorku analytu do povrchově selektivní elektrody, kde je aplikováno stejnosměrné elektrické napětí. Výsledkem přenosu elektronů je redoxní reakce na elektrodě, která produkuje proud, ten je přímo úměrný koncentraci analytu. Selektivita amperometrické detekce je řízena elektrodovým potenciálem potřebným pro sledované analyty. Pokud je pro analýzu určitého analytu potřeba vysoká citlivost detekce, snižuje se tím selektivita detekce [2]. Hlavní nevýhodou amperometrické techniky je silná adsorpce meziproductů na elektrodový povrch (uhlíková elektroda), která vede k snižování použitelnosti elektrody k detekci. Je možné povrch elektrody chemicky modifikovat, aby se zabránilo adsorpci meziproductů a nezanášela se [2]. Jiný způsob řešení tohoto problému spočívá v použití pulzní amperometrické detekce. Pulzní amperometrická detekce je prováděna ve třech krocích: prvním krokem je detekce, druhým krokem je anodické čištění povrchu elektrody a třetím krokem je reaktivace elektrody [25].

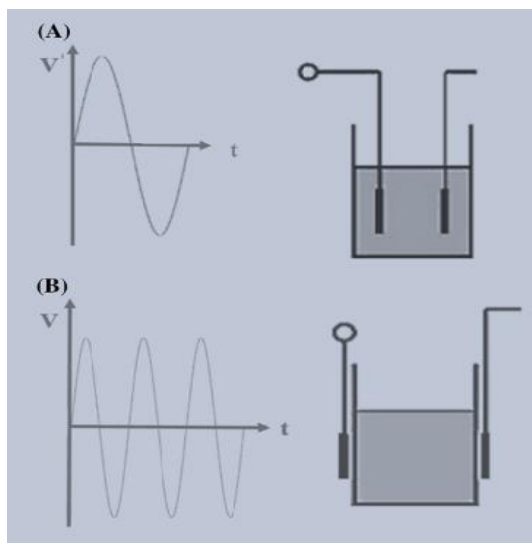
### **Vodivostní detekce**

Vodivostní detekce je univerzálním způsobem detekce. Vodivostní detekce je jedinou elektrochemickou detekcí, kde jsou detektory komerčně dodávány. Má nevýhodu v malé selektivitě. Pokud je kombinována ještě s další separační technikou stává se citlivým detektorem.

Je založena na měření elektrické vodivosti roztoku v detekční cele mezi dvěma kovovými elektrodami, které jsou umístěny na konci separační kapiláry [2,25]. V tomto



uspořádání nedosáhla vodivostní detekce širokého uplatnění. Obecně platí, že existuje dvojí uspořádání a to kontaktní nebo bezkontaktní vodivostní detekce [2].



Obrázek 6 Rozdíl mezi kontaktní a bezkontaktní vodivostní detekcí, převzato z [2].

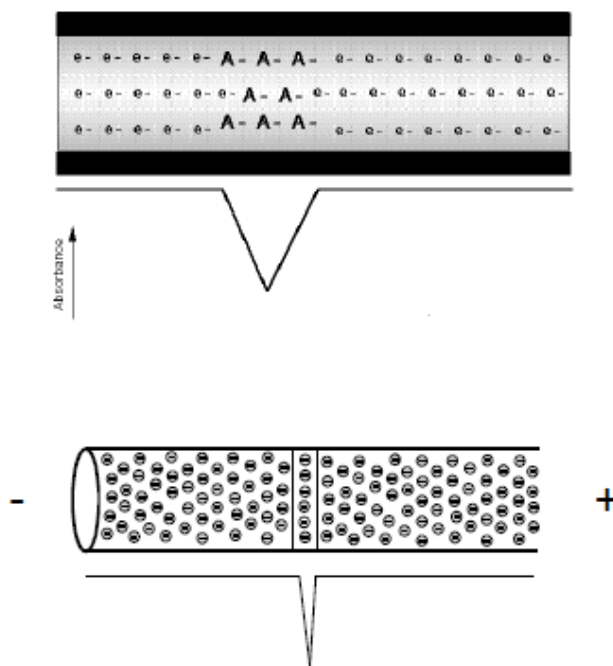
U vodivostní detekce v bezkontaktním uspořádání se jedná o detektory CCD, tvořené dvěma tubulárními elektrodami, které jsou umístěny za sebou podél separační kapiláry a jsou od sebe odděleny detekční mezerou. Na jednu elektrodu je vložen střídavý signál z generátoru, ten prochází přes stěnu separační kapiláry. Signál z generátoru je ovlivněn vodivostí zóny v detekční mezeře a poté snímán druhou vodivostní elektrodou. Uspořádání elektrod za sebou podél separační kapiláry přispělo k výraznému zvýšení citlivosti CCD v CE v porovnání s původním snímáním vodivostního signálu v jednom místě napříč kapilárou. Umožňuje navíc měřit vodivost při nízkých frekvencích střídavého signálu, to vede k výraznému zjednodušení elektronického zpracování signálu detektoru. Největší výhodou CCD je fakt, že měřicí elektrody nejsou v přímém kontaktu s analyzovaným roztokem. Látky se neadsorbují na povrch elektrody, nerozpouští se materiál elektrody a neprobíhají děje které přispívají ke stárnutí elektrody. Kombinací CCD s CE je vyřešen problém s interferencí silného separačního elektrického pole se signálem vodivostního detektoru [2,26,28].

## Nepřímá detekce

Nepřímá fotometrická detekce a nepřímá fluorescenční detekce je přínosem při stanovení mnoha analytů, které mají nevyhovující vlastnosti jako chromofory nebo fluorofory. Obě tyto techniky poskytují na elektroforegramu pokles signálu pozadí. Z těchto dvou technik je běžnější nepřímá fotometrická detekce. Lze to přičítat tomu, že chromofory jsou běžnější než fluorofory [22,29,40].

Při nepřímé detekci se přidává silně absorbující látka do pracovního elektrolytu. Ion pracovního elektrolytu by měl být vybrán tak, aby měl stejné znaménko náboje jako sledovaný analyt, to znamená, aby byl jeho ko-iontem. Vlivem separace je v zóně migrujícího analytu nižší koncentrace absorbujícího ko-iontu než v okolním pracovním elektrolytu. Ve fotometrickém detektoru se projeví průchod této zóny snížením odezvy detektoru a zóna je na elektroforegramu patrná jako záporný pík [22,26,27,29]. Nepřímá detekce může být prováděna ve stejném zařízení jako přímá. Výhodou nepřímé detekce je, že je univerzální a dá se aplikovat na různé druhy sloučenin bez potřeby pre- nebo post-kolonové derivatizace, další výhodou je, že její citlivost je vysoká.

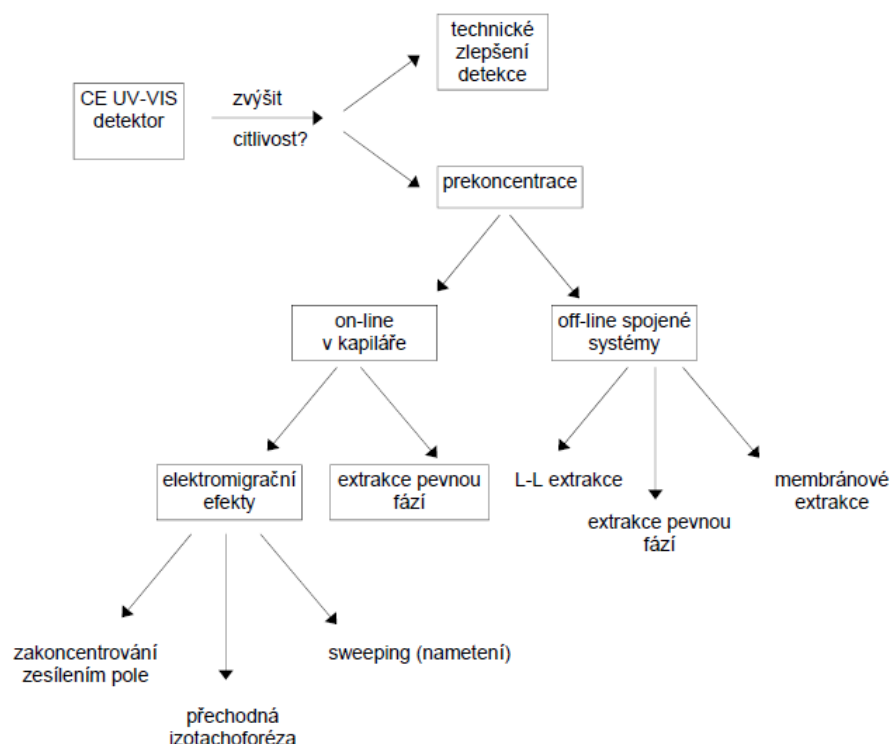
Jako aditivum jsou vybírány nabitě chromoforní (fluoroforní) ionty s vysokým molárním absorpčním koeficientem, které neinteragují se stěnou kapiláry ani s analyty a mají elektroforetickou pohyblivost blízkou analytům. Aditiva nesou pouze jeden náboj a díky tomu mají dobré číslo přeměny, to znamená, počet molekul chromoforu nahrazených jednou molekulou analytu. Výhodná je také přibližně stejná efektivní mobilita analytu a aditiva, díky tomu nedochází k chvostování migrujícího solutu v zónách [27]. Důležité je najít vhodnou koncentraci aditiva. Při vyšších koncentracích aditiva se snižuje odezva, protože na detekční fotodiodu dopadá méně světla. Naopak při nižších koncentracích aditiva citlivost klesá z důvodu relativně vysoké koncentrace hydroxidových iontů, které nahrazují nabitě molekuly analytu v zónách [27].



Obrázek 7 Schéma elektroforegramu s nepřímou UV detekcí, převzato z [17].

### 3 On-line prekoncentrační techniky používané v CZE

Možností jak zvýšit koncentrační citlivost je více. Využívají se detektory s vyšší citlivostí, které jsou ovšem konstrukčně náročnější. Jsou to detektory nebo techniky realizované prostřednictvím elektrického a chemického pole přímo v kapiláře. Vysoce citlivé detektory jsou ty, které využívají např. laserem indukovanou fluorescenci (LIF) nebo detektor chemiluminiscenční či elektrochemický [15]. Použití prekoncentračních technik umožní zaostření složek analytu do velmi úzkých zón. Zakoncentrování – stacking je označena prekoncentrace analytů on-line přímo v kapiláře [10]. On-line zakoncentrování vzorku se provádí dávkováním velkého objemu roztoku vzorku bez úpravy přístroje. Z tohoto důvodu je on-line zakoncentrování velmi užitečnou technikou [12,15].



Obrázek 8 Možnosti prekoncentrací v kapilární elektroforéze, převzato z [10].

### 3.1 On-line prekoncentrace ionizovatelných analytů

U těchto analytů je rychlost migrace ovlivněna změnou některých vlastností pracovního elektrolytu (pH, vodivost, teplota). Lze říci, že pro on-line prekoncentraci ionizovatelných analytů je možné využít tyto principy: zakoncentrování vzorku zesílením pole – field amplified sample stacking (FASS), přechodná izotachoforéza – transient isotachopheresis (tITP), zakoncentrování pomocí organického rozpouštědla např. acetonitrilu – acetonitrilový stacking, samozakoncentrování vzorku – sample self-stacking, přechodné pH rozhraní – dynamic pH junction, nametení – sweeping [10-12,15,22,24,30,31].

Podstata zakoncentrování vzorku zesílením pole (FASS) spočívá v interakci elektrického silového pole a pole koncentračního. Koncentrační pole je vytvářeno díky různé vodivosti základního elektrolytu a nadávkované zóny vzorku [10,32]. Do kapiláry se základním elektrolytem, který má vysokou vodivost je hydrodynamicky nadávkován vzorek s nízkou vodivostí. Elektroforetická pohyblivost ionizovatelných analytů je poté větší v zóně vzorku než v zóně základního elektrolytu. Aplikací stejnosměrného elektrického pole dojde díky rozdílným vodivostem zón základního elektrolytu a zóny vzorku k zakoncentrování dávkované zóny [30,32]. K zakoncentrování analytů dochází na rozhraní obou zón [10]. Jedná se o nejběžnější techniku on-line prekoncentrace [30,32].

Přirozené zakoncentrování je nejjednodušší způsob zakoncentrování. Je označován jako normal stacking mode (NSM) [10,31].

Zakoncentrování vzorku z velkého objemu (LVSS) je technika, kdy je nadávkované množství vzorku větší než je optimální nástřiková délka v NSM. U této techniky je zapotřebí, aby matrice vzorku naopak migrovala ven z kapiláry nastřikovaným koncem. Pohyb matrice z kapiláry je docílen pomocí elektroosmotického toku nebo použitím externího tlaku [30]. Nevýhodou LVSS techniky prekoncentrace je, že je možné ji použít pouze pro kationty nebo anionty během jedné analýzy. Po nástřiku vzorku do kapiláry dojde ke změně polarity zdroje na opačnou, než jaká bude použita pro vlastní separaci. Na základě toho dojde k migraci matrice ven z kapiláry a analyty se zakoncentrují ve formě úzké zóny na počátku kapiláry. Do základního elektrolytu se dává většinou aditivum, které obrací směr elektroosmotického toku. Nevýhodou této techniky je nízká opakovatelnost a obtížné technické provedení [10,31].

Dalším způsobem zakoncentrování v CZE je přechodné pH rozhraní – dynamic pH junction. Je známo, že pH základního elektrolytu je velmi důležité pro optimalizaci separace v CZE. Hodnota pH v blízkosti  $pK_a$  analytů je obecně vhodnou volbou pro separaci. To je způsobeno tím, že u této hodnoty jsou ionizační stavy analytů nejvíce rozdílné pokud mají  $pK_a$  blízko sebe [15,31]. Využíváme vlastnosti, že efektivní mobilita slabě kyselých a slabě zásaditých analytů je silně závislá na pH základního elektrolytu. Nejjednodušší aplikací této techniky je využití rozdílných hodnot pH mezi dávkovanou zónou vzorku a základním elektrolytem. Docílit toho je možné buď pomocí pufrů o stejném složení nebo lze využít dvou pufrů o rozdílném pH a rozdílném složení [10].

### **3.2 Prekoncentrace neutrálních a ionizovatelných látek**

Nametení (sweeping) je nová technika, která zlepšuje citlivost stanovení. Používá se pro ionizovatelné a hydrofobní analyty. Podstata techniky vychází z interakcí analytu a micel. Používá se přidavku micelotvorných látek do základního elektrolytu. Kapilára ani vzorek micelotvorné činidlo neobsahují [10,11]. Jde o interakci mezi analytem a pseudostacionární fází (PS). Interakce je založena na chromatografickém principu, to znamená, že se liší rychlost migrace analytu v komplexu s pseudostacionární fází a bez pseudostacionární fáze [11,15,30]. Interakce analytů a PS fáze je usnadněna pomocí elektroforetické pohyblivosti a naopak nezávisí na elektroosmóze [11]. Pseudostacionární

fáze může být složena z aditiv jako jsou např. iontové a neiontové micely, tenzidy a cyklodextriny (dodecyl sulfát sodný, SDS). Pseudostacionární fáze proniká do široké zóny vzorku, kde dojde k zakoncentrování (nametení) vzorku. Technika umožňuje odstranění matricových nečistot. Zakoncentrování pomocí techniky nametení probíhá optimálně, pokud je vodivost vzorku podobná vodivosti základního elektrolytu [10].

U některých aniontových analytů se k zlepšení techniky nametení používají kationtové nebo neiontové tenzidy v alkalickém prostředí. Pomocí neutrální pseudostacionární fáze mohou být separovány jen nabitě analyty. Zakoncentrování neutrálních nebo kationtových analytů se děje pomocí aniontových tenzidů [10].

### **3.2.1 Přejíhodná izotachofóreza v kapilární zónové elektroforéze**

Izotachofóreza (ITP) je zvláštním druhem kapilární elektroforézy. Izotachofórezou analyty migrují podle své mobility mezi vedoucím (leading) a koncovým (terminating) elektrolytem. Vedoucí elektrolyt má vyšší elektroforetickou pohyblivost a koncový elektrolyt má nižší elektroforetickou pohyblivost než ionty analytu ve vzorku.

Vzorek je vnášen mezi rozhraní elektrolytů [3,15,19,33]. Vodící elektrolyt se nachází na začátku izotachofórey v katodovém prostoru a v koloně, koncový elektrolyt v anodovém prostoru [6]. Protiion vedoucího elektrolytu je volen tak, aby měl pufrální kapacitu při daném pH separace a protiion koncového elektrolytu se volí téměř libovolně [4]. Po připojení stejnosměrného napětí se udržuje konstantní proud a vzorek se začne dělit podle pohyblivosti jeho složek. Po nějakém čase se ustaví stacionární stav. V něm tvoří jednotlivé ionty zóny seřazené za sebou podle klesající pohyblivosti iontů [6]. Při pohybu v elektrickém poli se analyzované ionty separují, ale nevzdalují se od sebe a zůstávají jeden za druhým v zónách. Po separaci se všechny zóny pohybují stejnou rychlostí [7]. V důsledku koncentračního efektu 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 [4].

Separují se buď pouze kationty nebo anionty. Kromě separovaných iontů jsou vždy přítomny i opačně nabitě ionty (protiionty), aby byla dodržena podmínka elektroneutrálnosti v zóně. Je vhodné, aby protiionty byly stejné ve všech elektrolytech [19]. Pokud vzorek obsahuje více určitých iontů vytvoří se širší zóna. Skutečnost, že se méně pohyblivé ionty

pohybují stejnou rychlostí jako více pohyblivé ionty je dána tím, že v každé zóně je jiný potenciálový spád. Potenciálový spád se vytváří tím vyšší, čím méně pohyblivé ionty se v zóně nacházejí. Díky tomu na méně pohyblivé ionty působí větší hnací síla [6,19]. Kvůli samozaostřujícímu efektu izotachoforézy odolávají rozhraní mezi zónami vzorku difuzi a zůstávají ostrá [7]. Pokud se stane, že ion opustí svou zónu kvůli difuzi a dostane se do zóny méně pohyblivých iontů, kde na něj působí větší gradient potenciálu, je zvýšením hnací síly ion zahnán zpět do své zóny. Opačným vlivem působí pokles gradientu potenciálu a tím i hnací síly v případě, že se ion dostane do zóny pohyblivějších iontů [6,19].

Detektory pro izotachoforézu se rozdělují do dvou skupin: univerzální a speciální. Univerzální detektory se vyznačují tím, že jejich odezva je určena pohyblivostí iontů v zóně. Patří mezi ně vodivostní detektor, ten měří vodivost zóny procházející přes detektor a teplotní detektor, který měří teplotu v určitém místě kapiláry. U specifických detektorů je jejich odezva určena jinými vlastnostmi látky než je elektroforetická pohyblivost iontů v zóně. Jedná se například o fotometrický detektor, ten sleduje absorpci ultrafialového záření [19].

Isotachoforegram je záznam ITP separace, má charakteristický stupňovitý průběh, ve kterém výška stupně odpovídá kvalitě separované látky a délka stupně je přímo úměrná její kvantitě [4].

Princip izotachoforézy může být aplikován pro zakoncentrování analytů pomocí CZE a je pojmenován jako přechodná izotachoforéza. Přechodné izotachoforézy (tITP) je docíleno správnou kombinací dvou nebo více rozdílných pracovních elektrolytů v jedné separační kapiláře [3,21,33]. Přechodné izotachoforézy je možno docílit dvěma způsoby. První způsob spočívá v tom, že základní elektrolyt je zvolen tak, že ion má vyšší efektivní mobilitu než analyty, ITP migrace je dosažena pomocí vhodného koncového elektrolytu za zónou vzorku. Ion zde přebírá úlohu vedoucího elektrolytu. Dávkování vzorku je hydrodynamické, a po vložení elektrického pole dojde k vytvoření přechodného ITP stavu. Druhý způsob spočívá v tom, že základní elektrolyt obsahuje ion s nižší efektivní mobilitou než analyt. V tomto případě musí samotný vzorek být obohacen o vedoucí elektrolyt k dosažení tITP [10,15]. V poslední době se zakoncentrování pomocí této techniky hodně využívá ve spojení s MS detekcí [30].

## 4 Analýza kyseliny vinné a citronové kapilární zónovou elektroforézou

### Přímá UV detekce:

Saavedra a kolektiv analyzovali organické kyseliny z ovocných šťáv a to kyseliny citronovou, izocitronovou, vinnou a jablečnou pomocí kapilární zónové elektroforézy. Vzorky jen naředili a filtrovali přes 0,45  $\mu\text{m}$  filtr. Nejlepší separace dosáhli při 200 mM fosfátovém pufru, pH 7,5 a aplikovaném potenciálu -14 kV a s kapilárou o délce 57 cm. Detekci prováděli při 200 nm [34].

Mato a kolektiv se zabývali vývojem jednoduché, přesné a rychlé metody pro analýzu organických kyselin z hroznové šťávy a vína pomocí kapilární zónové elektroforézy. Stanovovali kyselinu vinnou, citronovou a jablečnou v hroznové šťávě a kyselinu jantarovou, octovou, vinnou, jablečnou, mléčnou ve víně. Separace dosáhli za pouhé tři minuty pouze ředěním a filtrací vzorku. Vzorek nadávkovali hydrodynamicky. Aplikovali napětí -25 kV a teplotu 25 °C při pH 6,4. Při režimu detekce UV přímá při 185 nm. Elektrolyt byl složen z fosfátu jako pufru (7,5 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  a 2,5 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), 2,5 mM tetradecyltrimethylammonium hydroxid (TTAOH) jako elektroosmotický modifikátor a 0,24 mM  $\text{CaCl}_2$  jako modifikátor selektivity [35].

Vorarat a kolektiv analyzovali alfa-hydroxy kyseliny jako je kyselina jablečná, citronová, vinná, glykolová a mléčná pomocí kapilární elektroforézy s přímou UV detekcí při 200 nm. Separační kapilára o délce 50 cm a průměru 50  $\mu\text{m}$  a při aplikovaném záporném potenciálu -15 kV. Separační elektrolyt byl složen z 180 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  a 1 mM cetyltrimethylammonium bromidu a rozpuštěn v 15 % (v/v) methanolu. Elektrolyt byl upraven na hodnotu pH 7,2 pomocí kyseliny fosforečné. Získané parametry byly přiměřené a limity detekce byly 2,5 a 5  $\mu\text{g/ml}$  pro citronovou kyselinu a jablečnou v tomto pořadí [36].



### **Nepřímá UV detekce:**

De Viliers a kolektiv analyzovali uvedené kyseliny pomocí kapilární elektroforézy s nepřímou UV detekcí. Metoda je založena na použití kyseliny 2,6-pyrididikarboxylové (PDC) jako pozadí základního elektrolytu (BGE). Analyzovali kyselinu vinnou, jablečnou, citronovou, jantarovou, octovou a mléčnou. K základnímu elektrolytu přidali kyselinu ethylendiamintetrakarboxylovou (EDTA) kvůli rušení stopových látek na analýzu kyseliny citronové. Separaci prováděli pomocí elektroforetického systému vybaveného detektorem s diodovým polem. Délka kapiláry byla použita 80 nebo 110 cm. Pracovní elektrolyt byl připraven z 0,5 mM CTAB a 0,5 mM EDTA. Konečné podmínky byly upraveny pro separaci na pH 5,6 pomocí 1M roztoku hydroxidu sodného. Nástřik prováděli buď hydrodynamicky tlakem 50 mBar po dobu 3 s nebo elektrokineticky aplikací napětí -10 kV po dobu 2 s. Nepřímá UV detekce se prováděla při 350 nm s referenční vlnovou délkou 210 nm při teplotě kapiláry 15 °C [37].

Wang a kolektiv analyzovali organické kyseliny v rostlinách pomocí kapilární elektroforézy s nepřímou UV detekcí. Separace probíhala ze podmínek: elektrolyt byl připraven z 15 mM ftalátu s 0,6 mM tetradecyltrimethylamonium bromidu. Analýza probíhala při pH 5,6 které bylo upraveno pomocí 0,1M NaOH. Aplikované napětí bylo -15 kV a teplota 25 °C. Délka kapiláry byla 57 cm a průměr 75 µm. Nepřímá UV detekce byla prováděna při vlnové délce 254 nm. Nejprve bylo potřeba kapiláru promýt methanolem 5 minut, poté redestilovanou vodou 2 minuty, dále 0,1 M HCl po dobu 5 minut, poté 2 minuty redestilovanou vodou, dále 0,1 M NaOH po dobu 5 minut a nakonec 2 minuty ještě redestilovanou vodou [38].

Wu a kolektiv se zabývali analýzou kyselin ve vzorcích potravin pomocí kapilární elektroforézy s nepřímou UV detekcí. Zkoumali vhodnost použití několika chromoforů jako je chroman, p-hydroxybenzoát, ftalát, tereftalát v základním elektrolytu a přísadku vhodného tenzidu jako je CTAB, DTAB, TTAB. Byla použita separační kapilára o průměru 75 µm a délce 70 cm. Vzorky byly nadávkovány hydrodynamicky po dobu 3 s. Aplikované napětí pro separaci bylo -20 kV při teplotě 25 °C [39].

## 5 Experimentální část

### 5.1 Chemikálie a pomůcky

Kyselina citronová monohydrát p.a.	PENTA, Praha
Kyselina vinná čistá	PENTA, Praha
Kyselina benzoová p.a.	LACHEMA N. P, Brno
Cetyltrimethylammonium bromid	JANSSEN CHIMICA, Burse, Belgie
Trihydrát hydrogenfosfátu di-draselného p.a.	FLUKA, Buchs, Švýcarsko
Hydroxid sodný, perličky p.a.	PENTA, Praha
Kyselina o-fosforečná 85% p.a.	PENTA, Praha
Kyselina chlorovodíková	PENTA, Praha
Kyselina ftalová	LACHEMA N. P, Brno
Methanol	PENTA, Praha
Deionizovaná voda – připravená na zařízení Milli-Q Reference (MERCK, Billerica, MA, USA)	
0,45 µm membránové filtry	FISCHER SCIENTIFIC
0,2 µm membránové filtry	LABICOM, Olomouc

### 5.2 Použité přístroje a instrumentace

Kapilární elektroforetický systém Agilent 7100 (Agilent, Palo Alto, CA, USA)

pH-metr 827 Metrohm pH lab. Švýcarsko

## **Separáční kapilára**

K analýze byla použita kremenn kapilára (Agilent, Palo Alto, CA, USA) o vnitřním průměru 50  $\mu\text{m}$  a délce 50 cm, efektivní délka činila 41 cm. V této vzdálenosti bylo zapalovačem vytvořeno detekční okénko. Stejn tak byly opaleny i konce kapiláry. Vždy před analýzou byla kapilára řadn promyta a po analýze byla uvedena do opakovatelného stavu, tím že byla také promyta.

### **5.3 Příprava základní elektrolytů**

Pro prnou detekci byly prpraveny roztoky elektrolytů smícháním:

180 mM trihydrátu hydrogenfosfátu di-draselného + 1 mM cetyltrimethylammonium bromidu

18 mM trihydrátu hydrogenfosfátu di-draselného + 1 mM cetyltrimethylammonium bromidu

60 mM trihydrátu hydrogenfosfátu di-draselného + 1 mM cetyltrimethylammonium bromidu

rozpuštěny v 15 % (v/v) methanolu. Každý upraven pomocí kyseliny fosforen nejprve na hodnotu pH 7,2 poté 6 a 4. Urava hodnoty pH byla prováděna na pH-metru, kter byl nejprve nakalibrován pomocí kalibračních roztoků o pH 4; 7 a 9.

Pro neprnou detekci byly prpraveny roztoky elektrolytů smícháním:

0,6 mM cetyltrimethylammonium bromidu + 15 mM kyselina ftalov

0,6 mM cetyltrimethylammonium bromidu + 25 mM kyselina ftalov

0,6 mM cetyltrimethylammonium bromidu + 10 mM kyselina ftalov

rozpuštěny v deionizovan vodě. Upraven na hodnotu pH 5. Dále upraveny na hodnotu pH 4, 5,5 a 6.

### **5.4 Příprava vzorků**

Byly prpraveny zásobní roztoky standardů kyseliny citronov o koncentraci 1000  $\mu\text{g/ml}$ , kyseliny vinn o koncentraci 1000  $\mu\text{g/ml}$  a kyseliny benzoov o koncentraci 500  $\mu\text{g/ml}$ . Látky byly rozpuštěny v deionizovan vodě. Z těchto roztoků byly dále prpraveny roztoky k analýzám.

Nakonec byly vzorky napipetovány do 1 ml elektroforetických nádobek o konečné koncentraci 1000 a 100 µg/ml pro kyselinu citronovou a vinnou a o koncentraci 500 a 50 µg/ml pro kyselinu benzoovou.

Dále byly připraveny směsi těchto kyselin o různých koncentracích (100, 250, 300, 350, 450, 500, 1000, 2000 µg/ml). Tyto směsi byly napipetovány do 1 ml elektroforetických nádobek.

## **5.5 Postup analýzy**

### Přímá UV detekce:

Analýzy byly prováděny pomocí jednotlivých elektrolytů a o různém pH. Byly testovány různé hodnoty pH od kyselých (4; 5; 5,5; 6; 6,5) po alkalickou oblast (7; 7,5; 8; 8,5; 9). Vzorky byly nadávkovány pomocí tlaku 50 mBar po dobu 10 s. Elektrolyt i jednotlivé roztoky standardů byly přefiltrovány přes membránový filtr 0,45 µm. Před analýzou bylo třeba kapiláru promýt a to 0,1 M NaOH po dobu 5 minut, poté deionizovanou vodou a elektrolytem také po dobu 5 minut. Nakonec po analýze opět promyto po dobu 5 minut 0,1 M NaOH a deionizovanou vodou. Detekce probíhala při vlnové délce 200 nm. Každý vzorek byl proměřen dvakrát. Analýza probíhala při aplikovaném napětí -30 kV a teplotě 20 °C. Poté byly zkoušeny i jiné hodnoty napětí a teploty.

### Nepřímá UV detekce:

Vzorky byly nadávkovány pomocí tlaku 50 mBar po dobu 10 s. Elektrolyt i jednotlivé roztoky standardů byly přefiltrovány přes membránový filtr 0,2 µm. Elektrolyt byl upraven 0,1 M NaOH na hodnotu pH 5. Detekce probíhala při vlnové délce 254 nm. Před analýzou bylo potřeba kapiláru promýt methanolem 5 minut, deionizovanou vodou 2 minuty, 0,1 M HCl 5 minut, deionizovanou vodou 2 minuty dále 0,1 M NaOH 5 minut. Každý vzorek byl proměřen dvakrát. Mezi jednotlivými analýzami byla kapilára promývána 0,1 M NaOH 2 minuty, deionizovanou vodou 2 minuty a elektrolytem 2 minuty. Analýza probíhala při aplikovaném napětí -15 kV a teplotě 25 °C. Poté byly zkoušeny i jiné hodnoty napětí a teploty.

Dále byly zkoušeny elektrolyty s koncentrací kyseliny ftalové 10 mM a 25 mM a upraveny na hodnoty pH 4; 5,5 a 6.

## 6 Výsledky a diskuze

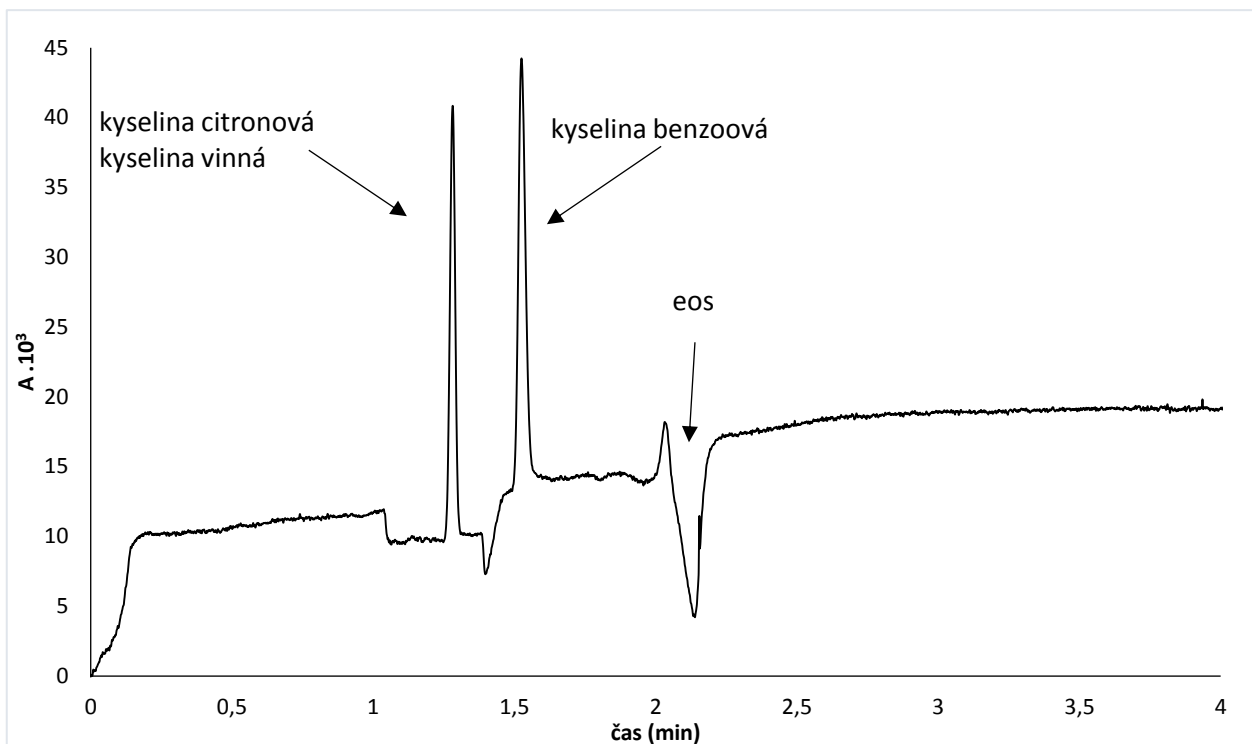
Při vypracování diplomové práce byly testovány možnosti separace kyselin vinné a citronové a to s přímou i nepřímou UV detekcí. Byly sledovány vlivy vloženého napětí, teploty a složení základního elektrolytu (koncentrace složek, pH) na migrační charakteristiky kyselin. Dále byly ověřeny možnosti kvantitativního stanovení (kalibrační křivky) a možnosti zvýšení citlivosti metod pomocí metody nametení.

### 6.1 Separace kyselin s přímou UV detekcí

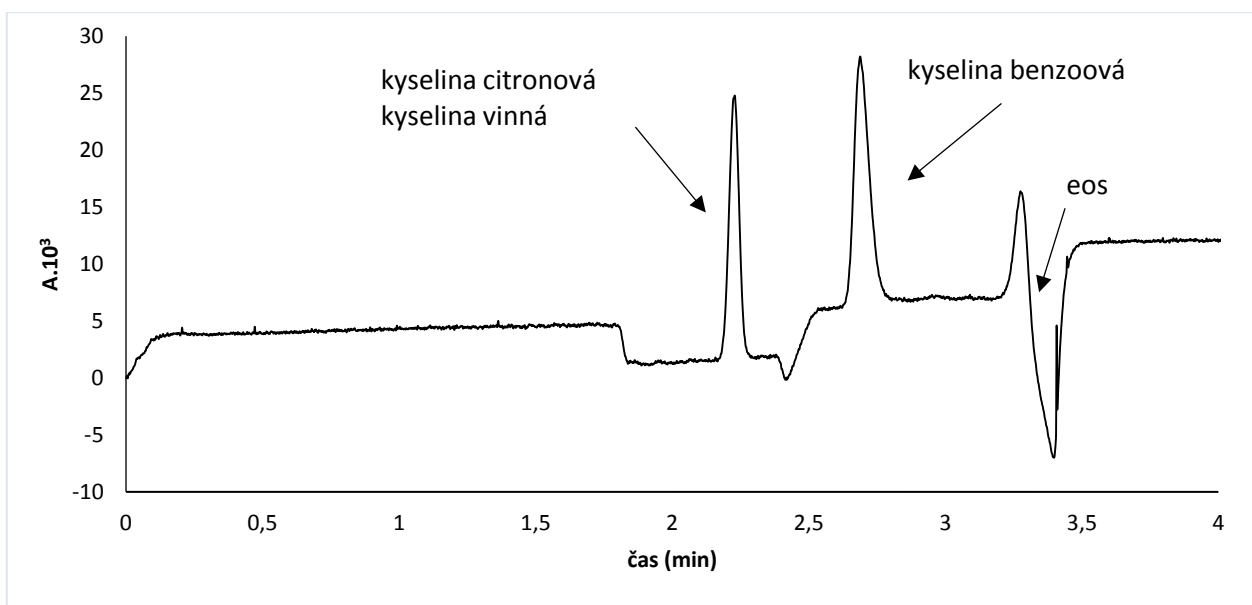
Nejprve byly zkoušeny různé hodnoty napětí a teplot pro optimální separaci kyseliny citronové a vinné. Byly změřeny jak standardy kyseliny citronové a kyseliny vinné, tak tyto kyseliny ve směsích. Hodnoty migračních časů a elektroosmotického toku jsou shrnuty v tabulkách I (v příloze). Příklady separací kyselin při napětí -30 kV, -15 kV jsou uvedeny v grafech 1-3.

Z měření bylo zjištěno, že nejlepší podmínky pro separaci kyselin dávají tyto kombinace napětí a teplot -30 kV při 20 °C nebo -15 kV při 20 °C nebo -30 kV při 25 °C. Elektrolyt byl zvolen jako 180 mM trihydrát hydrogenfosfátu di-draselného a 1 mM cetyltrimethylammonium bromid. Cetyltrimethylammonium bromid byl do BGE přidán z důvodu otočení směru elektroosmózy. Všechny analyzované látky migrují směrem k anodě a při běžném uspořádání v CZE (směr elektroosmózy ke katodě) by byly zaznamenány příliš vysoké migrační časy. Po přidavku CTAB a otočení polarity napětí migrují kyseliny v souhlasném směru s elektroosmózou.

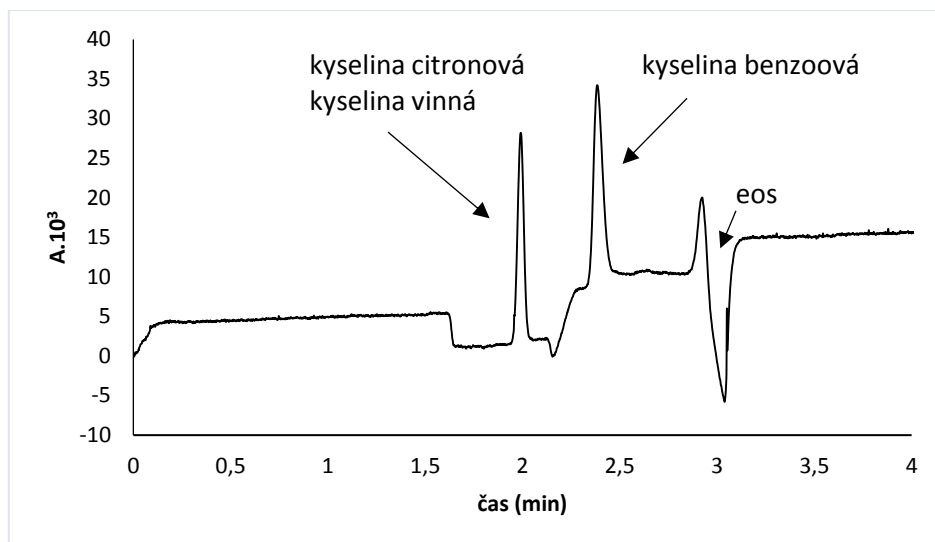
Na elektroforegramu nebyly kyseliny vinná a citronová odděleny. K separaci byla použita ještě kyselina benzoová, ta obsahuje benzenové jádro, které je dobře detekovatelné při UV detekci. Díky tomu bylo možné částečně odvodit, polohu píků obou kyselin. Kyselina benzoová má v daném systému nižší efektivní pohyblivost než kyseliny vinná a citronová a migruje blíže elektroosmotickému toku (grafy 1-3).



Graf 1: Separace směsi kyselin citronové, vinné a benzoové o koncentraci 1000  $\mu\text{g/ml}$  pro kyselinu citronovou a vinnou a 50  $\mu\text{g/ml}$  pro kyselinu benzoovou při napětí -30 kV a teplotě 20  $^{\circ}\text{C}$ . V elektrolytu 180 mM trihydrát hydrogenfosfátu di-draselného s 1 mM CTAB. Elektrolyt upraven na hodnotu pH 7,2. Dávkované byly tlakem 50 mBar po 10 s pro kyselinu citronovou a vinnou a 50 mBar po 5 s pro kyselinu benzoovou. Detekce probíhala při 200 nm.



Graf 2: Separace směsi kyselin citronové, vinné a benzoové o koncentraci 1000  $\mu\text{g/ml}$  pro kyselinu citronovou a vinnou a 50  $\mu\text{g/ml}$  pro kyselinu benzoovou při napětí -15 kV a teplotě 20  $^{\circ}\text{C}$ . V elektrolytu 180 mM trihydrát hydrogenfosfátu di-draselného s 1 mM CTAB. Elektrolyt upraven na hodnotu pH 7,2. Dávkované byly tlakem 50 mBar po 10 s pro kyselinu citronovou a vinnou a 50 mBar po 5 s pro kyselinu benzoovou. Detekce probíhala při 200 nm.

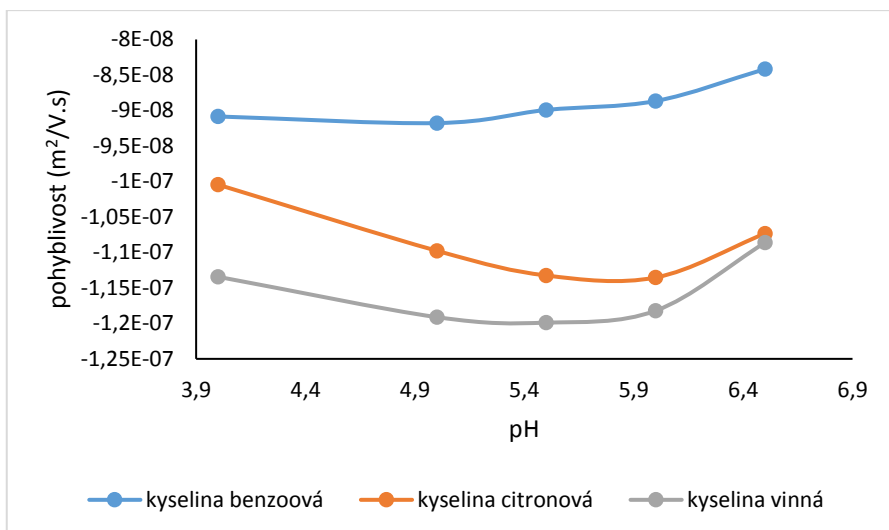


Graf 3: Separace směsi kyselin citronové, vinné a benzoové o koncentraci 1000  $\mu\text{g/ml}$  pro kyselinu citronovou a vinnou a 50  $\mu\text{g/ml}$  pro kyselinu benzoovou při napětí -30 kV a teplotě 25  $^{\circ}\text{C}$ . V elektrolytu 180 mM trihydrát hydrogenfosfátu di-draselného s 1 mM CTAB. Elektrolyt upraven na hodnotu pH 7,2. Dávkované byly tlakem 50 mBar po 10 s pro kyselinu citronovou a vinnou a 50 mBar po 5 s pro kyselinu benzoovou. Detekce probíhala při 200 nm.

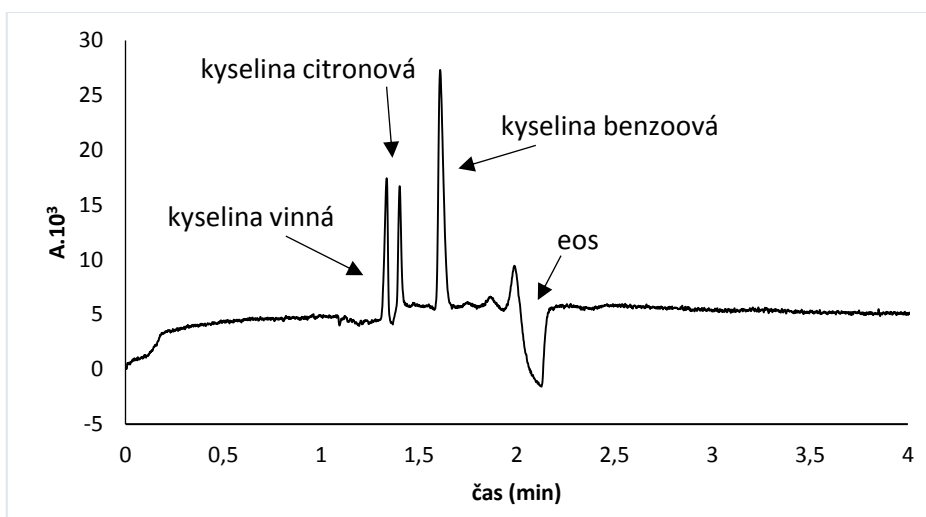
V režimu CZE separace s přímou detekcí byly ověřovány vlivy pH a koncentrace BGE na separaci kyselin, které jsou diskutovány v následujících kapitolách.

### 6.1.1 Separace v elektrolytu v kyselé oblasti pH

Byl zkoušen elektrolyt upravený na různé hodnoty pH v kyselé oblasti. Rozsah zkoušených hodnot pH byl od 4 po 6,5. Separace byly prováděny při již zjištěných vhodných kombinacích hodnot napětí a teploty (-15 kV a 20  $^{\circ}\text{C}$ , -30 kV a 20  $^{\circ}\text{C}$ ). Výsledky migračních časů, elektroosmózy a vypočítaných efektivních pohyblivostí jsou shrnuty v tabulkách II (v příloze). Vypočítané pohyblivosti v závislosti na pH ukazuje graf 4 a ukázkou separace zobrazuje graf 5.



Graf 4: Závislost pohyblivostí kyseliny citronové, vinné a benzoové na pH základního elektrolytu při napětí -30 kV a teplotě 20 °C.



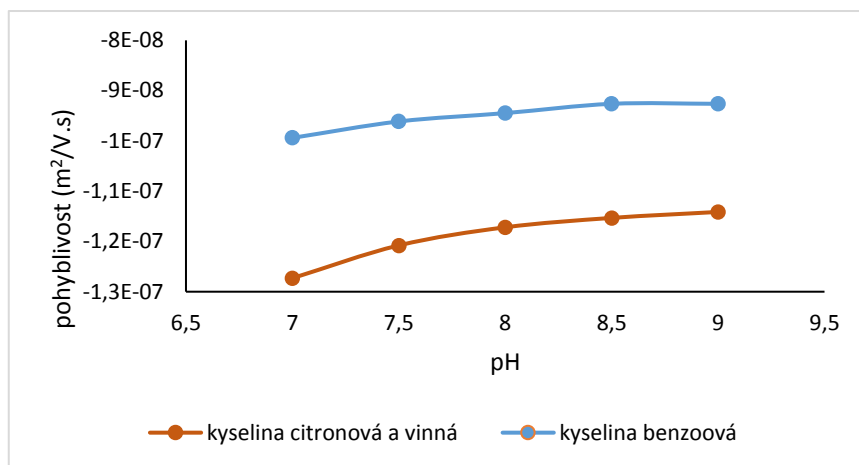
Graf 5: Separace směsi kyselin citronové, vinné a benzoové o koncentraci 1000 µg/ml pro kyselinu citronovou a vinnou a 100 µg/ml pro kyselinu benzoovou při napětí -30 kV a teplotě 20 °C. V elektrolytu 180 mM trihydrát hydrogenfosfátu di-draselného s 1 mM CTAB. Elektrolyt upraven na hodnotu pH 5,5. Dávkované byly tlakem 50 mBar po 10 s pro kyselinu citronovou a vinnou a 50 mBar po 5 s pro kyselinu benzoovou. Detekce probíhala při 200 nm.

Ze závislosti uvedené v grafu 4 vyplývá, že v rozsahu hodnot pH 4-6 se podstatně mění disociace kyseliny vinné a citronové a pH BGE výrazně ovlivňuje rozlišení kyselin.

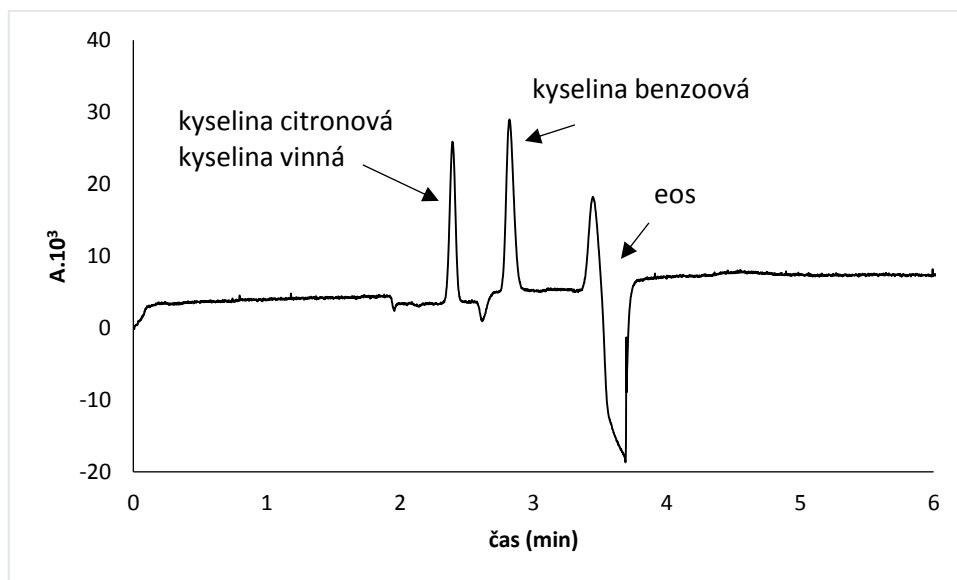


### 6.1.2 Separace v elektrolytu v zásadité oblasti pH

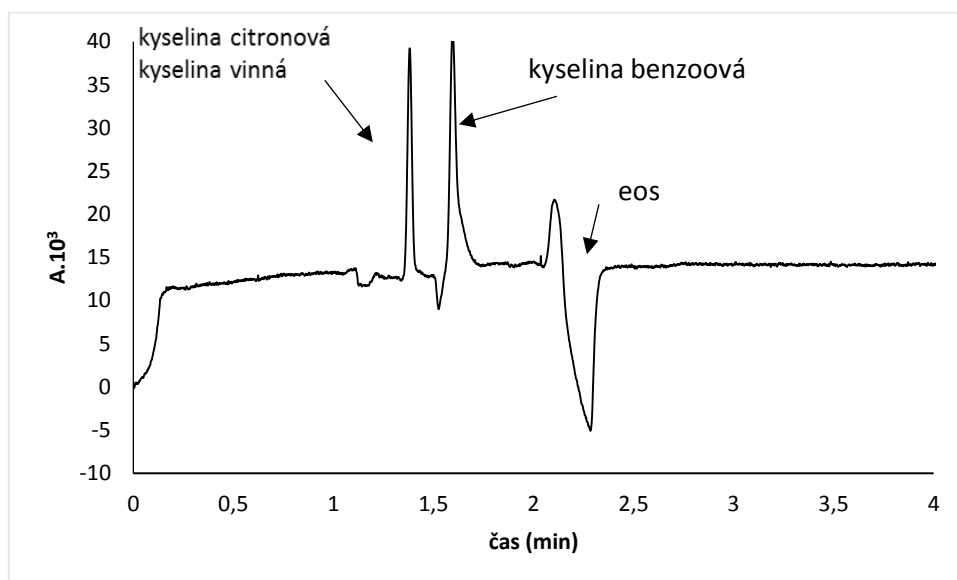
Byl zkoušen elektrolyt upravený na různé hodnoty pH v zásadité oblasti. Rozsah zkoušených hodnot pH byl od 7 po 9. Separace byly prováděny při již zjištěných vhodných kombinacích hodnot napětí a teploty (-15 kV a 20 °C, -30 kV a 20 °C). Výsledky migračních časů, elektroosmózy a vypočítaných pohyblivostí jsou shrnuty v tabulkách III (v příloze). Vypočítané pohyblivosti v závislosti na pH zobrazuje graf 6 a dále grafy 7 a 8 ukazují separaci v elektrolytu v zásadité oblasti pH.



Graf 6: Závislost pohyblivosti kyseliny citronové, vinné a benzoové na pH základního elektrolytu při napětí -30 kV a teplotě 20 °C.



Graf 7: Separace směsi kyselin citronové, vinné a benzoové o koncentraci 1000 µg/ml pro kyselinu citronovou a vinnou a 100 µg/ml pro kyselinu benzoovou při napětí -15 kV a teplotě 20 °C. V elektrolytu 180 mM trihydrát hydrogenfosfátu di-draselného s 1 mM CTAB. Elektrolyt upraven na hodnotu pH 8. Dávkované byly tlakem 50 mBar po 10 s pro kyselinu citronovou a vinnou a 50 mBar po 5 s pro kyselinu benzoovou. Detekce probíhala při 200 nm.

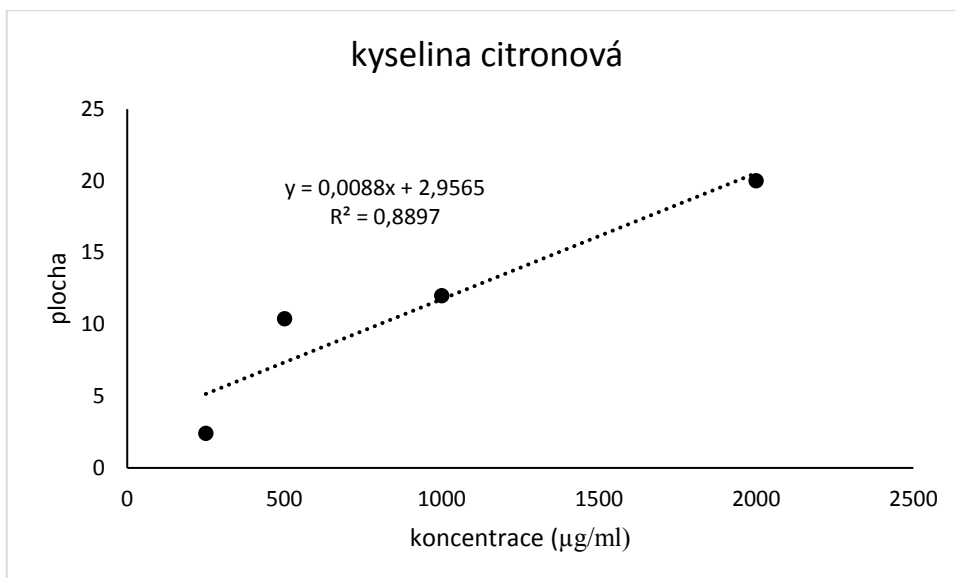


Graf 8: Separace směsi kyselin citronové, vinné a benzoové o koncentraci 1000  $\mu\text{g/ml}$  pro kyselinu citronovou a vinnou a 100  $\mu\text{g/ml}$  pro kyselinu benzoovou při napětí -30 kV a teplotě 20 °C. V elektrolytu 180 mM trihydrát hydrogenfosfátu di-draselného s 1 mM CTAB. Elektrolyt upraven na hodnotu pH 8,5. Dávkované byly tlakem 50 mBar po 10 s pro kyselinu citronovou a vinnou a 50 mBar po 5 s pro kyselinu benzoovou. Detekce probíhala při 200 nm.

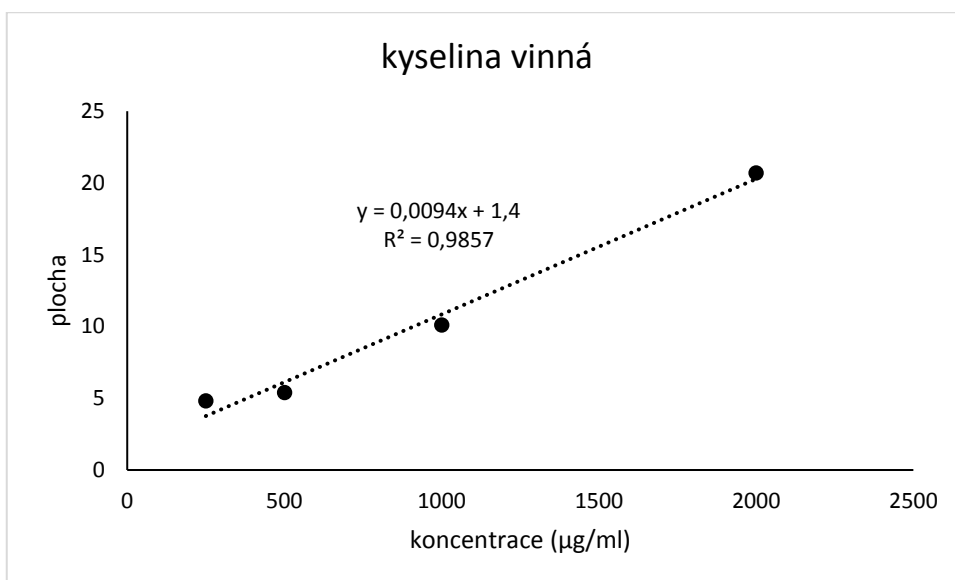
Z naměřených dat vyplývá, že v neutrální až alkalické oblasti pH BGE nedochází k separaci kyseliny vinné a citronové vzhledem k přibližně stejným efektivním pohyblivostem (graf 6).

### 6.1.3 Kalibrace v 180 mM elektrolytu

Nejlepší podmínky pro separaci byly nalezeny při hodnotách pH 4, což je blízko hodnot  $pK_a$  obou kyselin, dále také při hodnotě pH 5,5 a 6. Dále jsem měřila kalibrační řadu pro jednotlivé kyseliny o koncentraci 100, 250, 500, 1000 a 2000  $\mu\text{g/ml}$  při pH 4 a 6 a při napětí -30 kV a teplotě 20 °C. Hodnoty z měření kalibrační křivky jsou shrnuty v tabulkách IV (v příloze) a grafech 9 a 10.



Graf 9: Kalibrační křivka pro kyselinu citronovou, měřeno při pH 6 BGE.

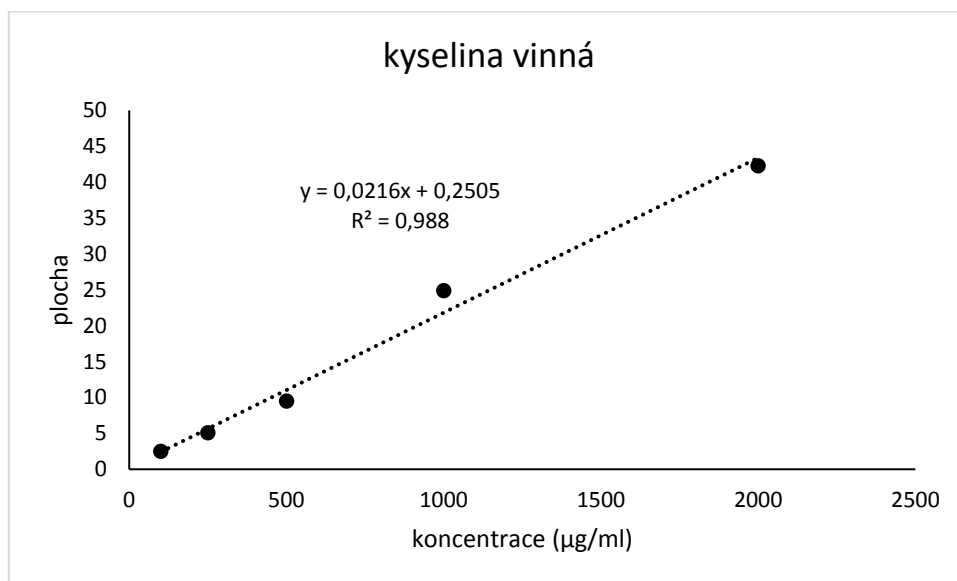


Graf 10: Kalibrační křivka pro kyselinu vinnou, měřeno při pH 6 BGE.

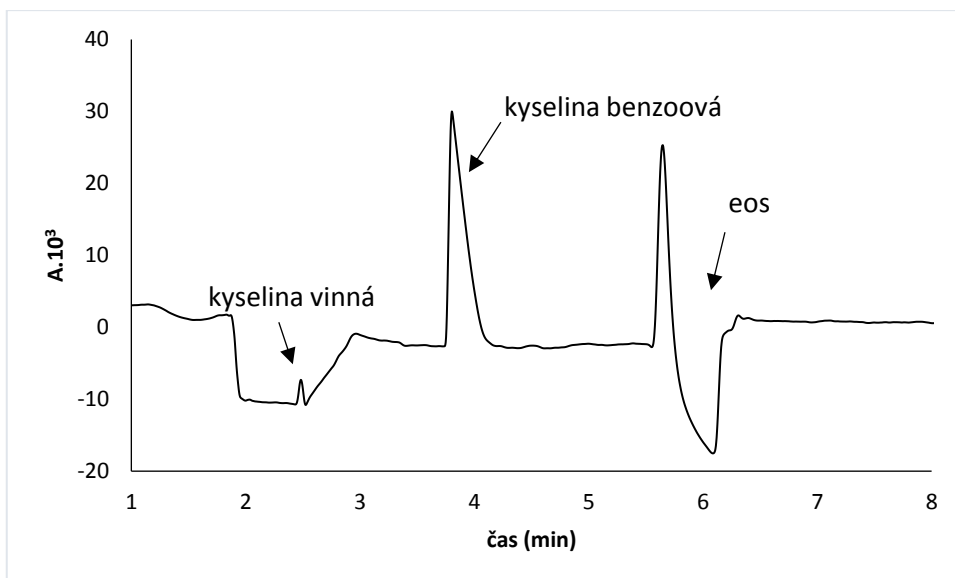
Z uvedených grafů vyplývá, že linearita a kalibračních křivek a citlivost (směrnice kalibrační křivky) detekce jsou nízké. Stabilita systému při použité vysoké koncentraci BGE (180 mM trihydrátu hydrogenfosfátu di-draselného) je také nízká a docházelo k ucpávání separační kapiláry. Proto byly následně testovány možnosti separace a stanovení kyselin v zředěnějších roztocích BGE.

#### 6.1.4 Kalibrace v 18 mM elektrolytu

Při měření kalibrační křivky v elektrolytu 180 mM docházelo po krátké době analýzy (2-3 min) ke kolísání proudu spojené často s ucpáváním separační kapiláry. Vysoké koncentrace BGE dále vedly ke krystalizaci složek elektrolytu na elektrodách a k nutnosti častějšího čištění přístroje. Kvůli tomu byl vyzkoušen nový elektrolyt o nižší koncentraci trihydrátu hydrogenfosfátu di-draselného. Výsledky jsou uvedeny v tabulkách V (v příloze) a grafech 11,12. Z uvedených záznamů vyplývá, že BGE s nižší koncentrací poskytuje stabilnější separační prostředí a rovněž citlivější kvantitativní stanovení.



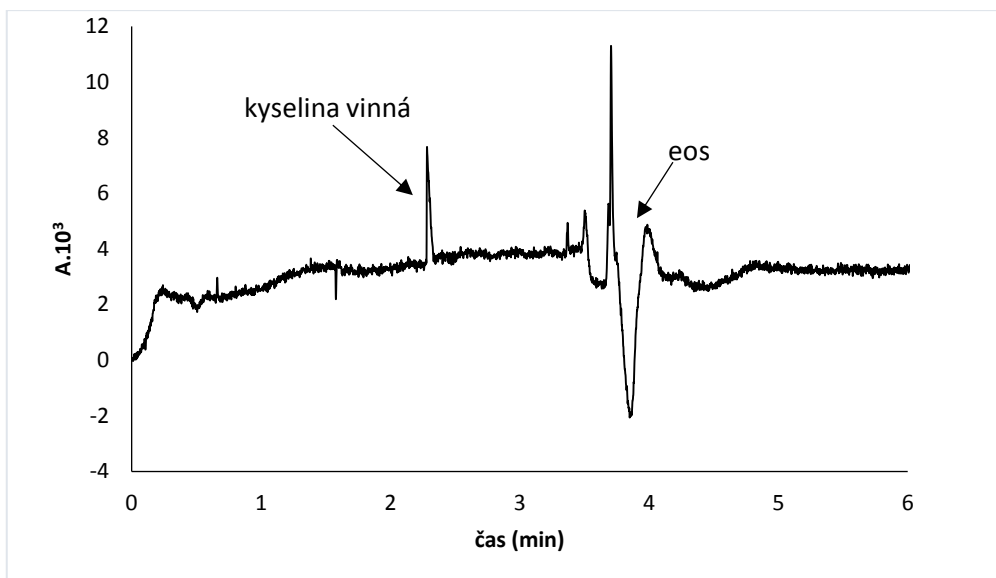
Graf 11: Kalibrační křivka pro kyselinu vinnou v elektrolytu 18 mM trihydrát hydrogenfosfátu di-draselného s 1 mM CTAB při pH 6.



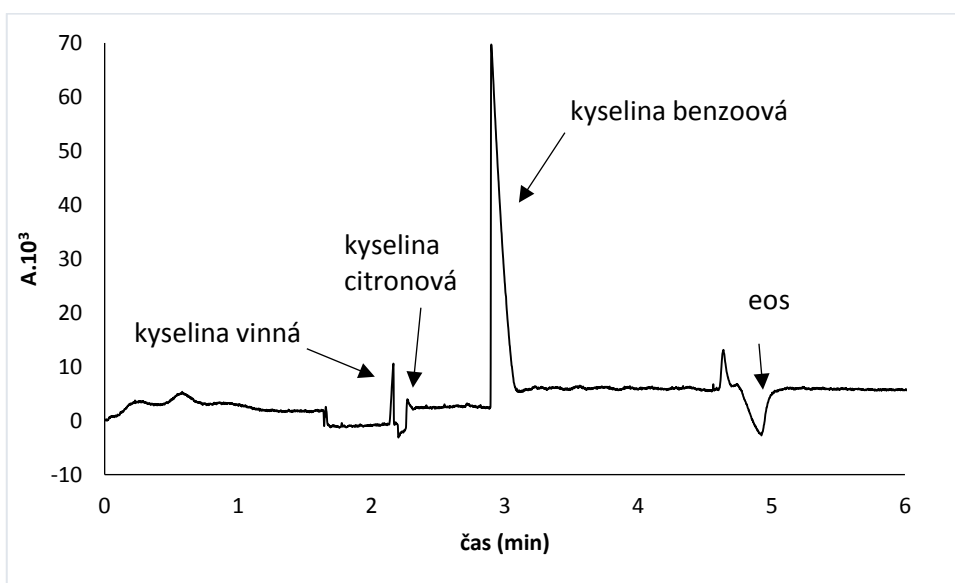
Graf 12: Separace kyseliny vinné a benzoové o koncentraci 500  $\mu\text{g/ml}$  při napětí -30 kV a teplotě 20  $^{\circ}\text{C}$ . V elektrolytu 18 mM trihydrát hydrogenfosfátu di-draselného s 1 mM CTAB. Elektrolyt upraven na hodnotu pH 6. Dávkované byly tlakem 50 mBar po 5 s. Detekce probíhala při 200 nm.

### 6.1.5 Kalibrace v 60 mM elektrolytu

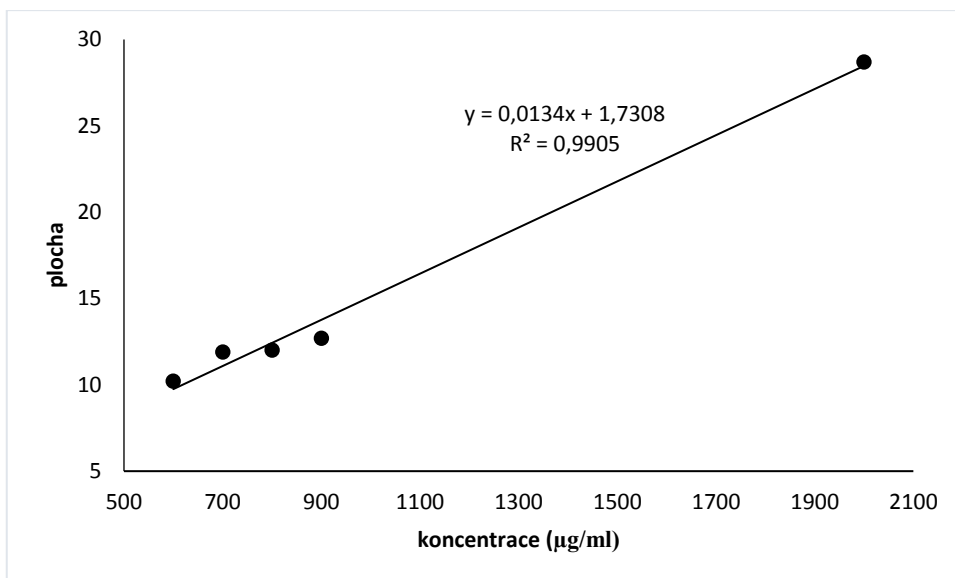
Dále byl zkoušen elektrolyt o 60 mM koncentraci trihydrát hydrogenfosfátu di-draselného s 1 mM CTAB. Výsledky jsou uvedeny v tabulkách VI (v příloze) a grafech 13-15. Pro kyselinu benzoovou byla kalibrace provedena v rozmezí koncentrací 100-450  $\mu\text{g/ml}$ , zatímco pro obě další kyseliny byla díky nižší citlivosti provedena separace až do koncentrací 2000  $\mu\text{g/ml}$ . Analyty byly měřeny při hodnotě pH pracovního elektrolytu 6 a 4. Byly měřeny jednotlivé standardy a poté kyseliny ve směsích. Kyselina citronová se zde nepodařila separovat.



Graf 13: Separace kyseliny vinné o koncentraci 500  $\mu\text{g/ml}$  v 60 mM trihydrát hydrogenfosfátu di-draselného s 1 mM CTAB při napětí -30 kV a teplotě 20 °C, elektrolytu upraven na hodnotu pH 4.



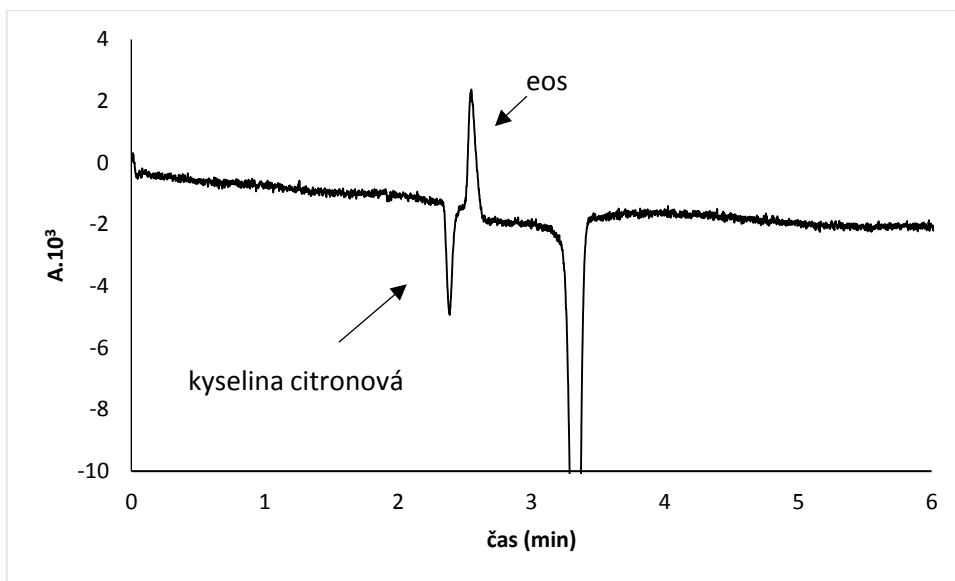
Graf 14: Separace směsi kyselin o koncentraci 350  $\mu\text{g/ml}$  v 60 mM trihydrát hydrogenfosfátu di-draselného s 1 mM CTAB při hodnotě napětí -30 kV a teplotě 20 °C, elektrolyt upraven na hodnotu pH 6.



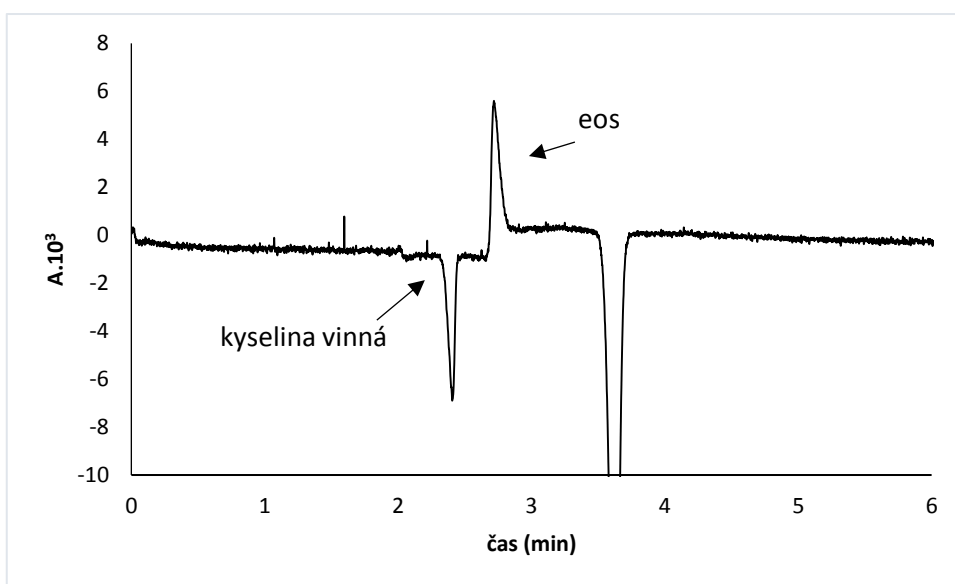
Graf 15: Kalibrační křivka pro kyselinu vinnou v 60 mM trihydrát hydrogenfosfátu di-draselného s 1 mM CTAB při hodnotě pH 6.

## 6.2 Separace kyselin s nepřímou UV detekcí

Nejprve byla měřena separace kyseliny vinné a citronové při napětí -15 kV a teplotě 25 °C. Poté byly zkoušeny i jiné hodnoty napětí a teplot. Separace probíhala v základním elektrolytu 0,6 mM cetyltrimethylammonium bromidu s 15 mM kyselinou ftalovou. Kyselina ftalová zde slouží jako kontrastní látka, jejíž absorbance je zaznamenávána a v průběhu průchodu analyzovaných kyselin detekční celou je pozorován pokles absorbance kyseliny ftalové. Pracovní elektrolyt byl upraven pomocí 0,1 M NaOH na hodnotu pH 5. Také byly proměřeny směsi kyselin o koncentraci 100, 250, 300, 350, 450, 500 a 1000 µg/ml. Výsledky jsou shrnuty v tabulkách VII (v příloze) a grafech 16-20. Při módu CZE s nepřímou detekcí se na elektroforegramu detekuje záporný pík.

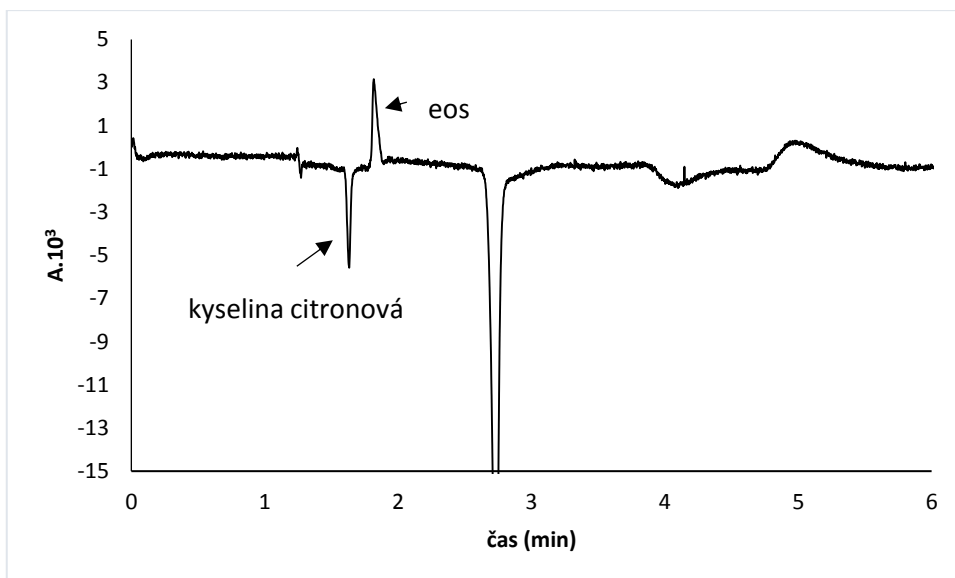


Graf 16: Separace kyseliny citronové o koncentraci 500  $\mu\text{g/ml}$  pracovní elektrolyt při hodnotě napětí -15 kV a teplotě 25  $^{\circ}\text{C}$  elektrolyt byl upraven na hodnotu pH 5. Detekce probíhala při 254 nm.

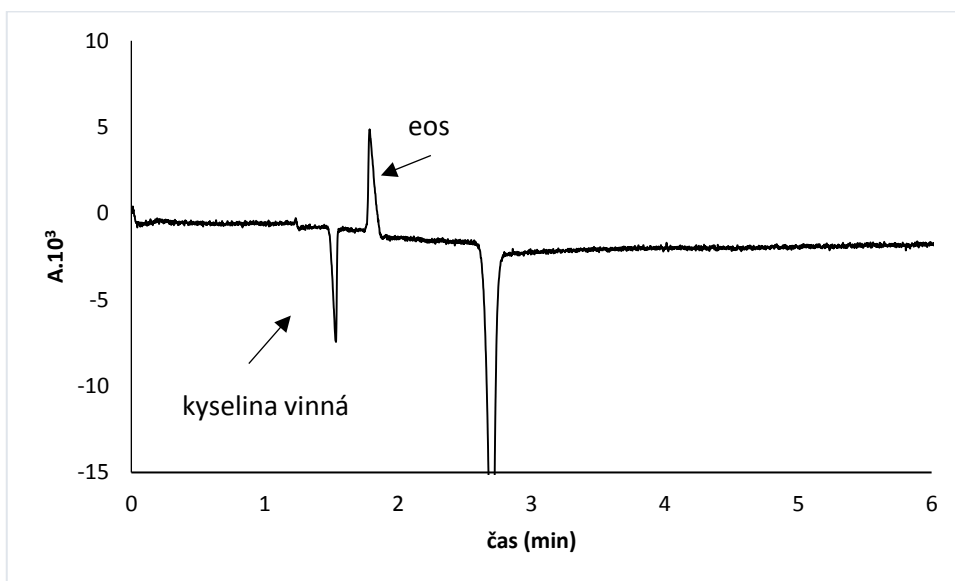


Graf 17: Separace kyseliny vinné o koncentraci 500  $\mu\text{g/ml}$  pracovní elektrolyt při hodnotě napětí -15 kV a teplotě 25  $^{\circ}\text{C}$ , elektrolyt byl upraven na hodnotu pH 5. Detekce probíhala při 254 nm.

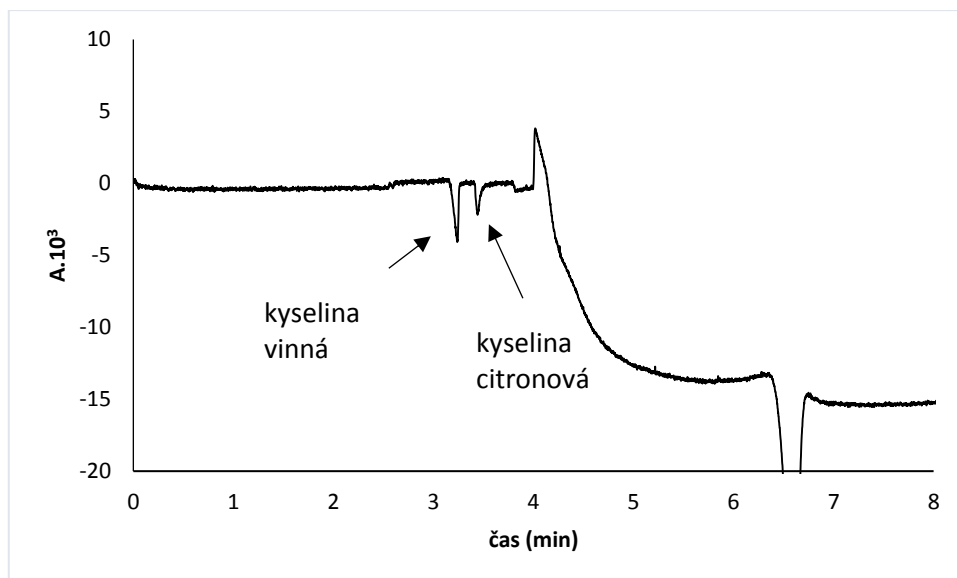




Graf 18: Separace kyseliny citronové o koncentraci 500  $\mu\text{g/ml}$  při hodnotě napětí -30 kV a teplotě 25 °C. Pracovní elektrolyt upraven na hodnotu pH 5. Detekce probíhala při 254 nm.



Graf 19: Separace kyseliny vinné o koncentraci 500  $\mu\text{g/ml}$  při hodnotě napětí -30 kV a teplotě 25 °C. Pracovní elektrolyt upraven na hodnotu pH 5. Detekce probíhala při 254 nm.

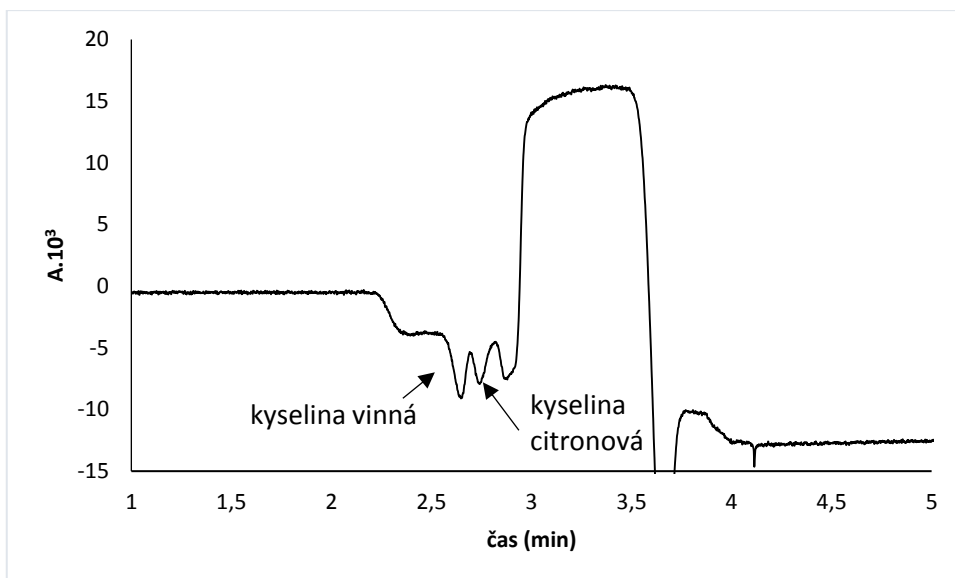


Graf 20: Separace kyseliny vinné a citronové o koncentraci 500  $\mu\text{g/ml}$  v pracovním elektrolytu upraveném na hodnotu pH 5 při hodnotě napětí -15 kV a teplotě 25  $^{\circ}\text{C}$ . Detekce probíhala při 254 nm.

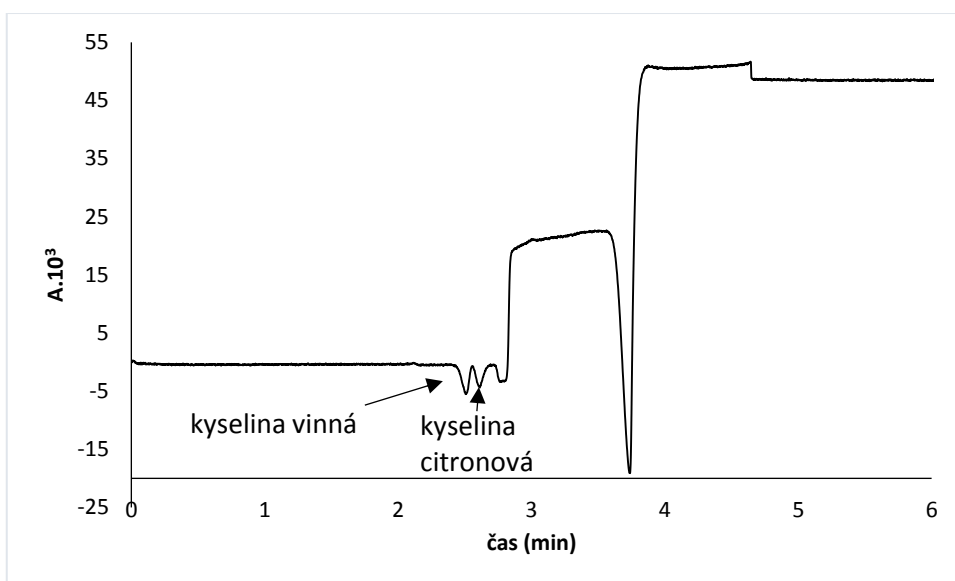
Z uvedených dat vyplývá, že při nepřímé detekci je vhodná kombinace napětí a teplot -30 kV a 25  $^{\circ}\text{C}$  i -15 kV a 25  $^{\circ}\text{C}$ . Pro další měření byla použita kombinace hodnot napětí a teplot -15 kV a 25  $^{\circ}\text{C}$ , při které jsou obě studované kyseliny dostatečně rozděleny (graf 20).

### 6.2.1 Optimalizace koncentrace pracovního elektrolytu

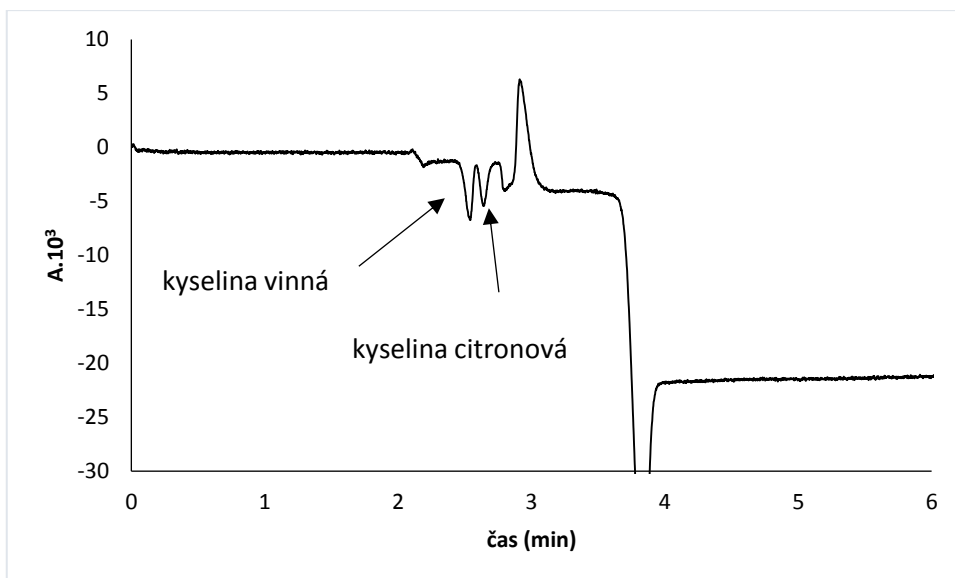
Byly vyzkoušeny různé koncentrace pracovního elektrolytu pro optimalizaci separace. Vzorky kyselin byly měřeny při koncentraci BGE 10 mM a 25 mM kyseliny ftalové a při hodnotách pH 4; 5,5 a 6. Tyto hodnoty pH byly použity i při přímé detekci a zdály se být nejvhodnější pro separaci kyselin. Výsledky jsou shrnuty v tabulkách VIII (v příloze) a grafech 21-24.



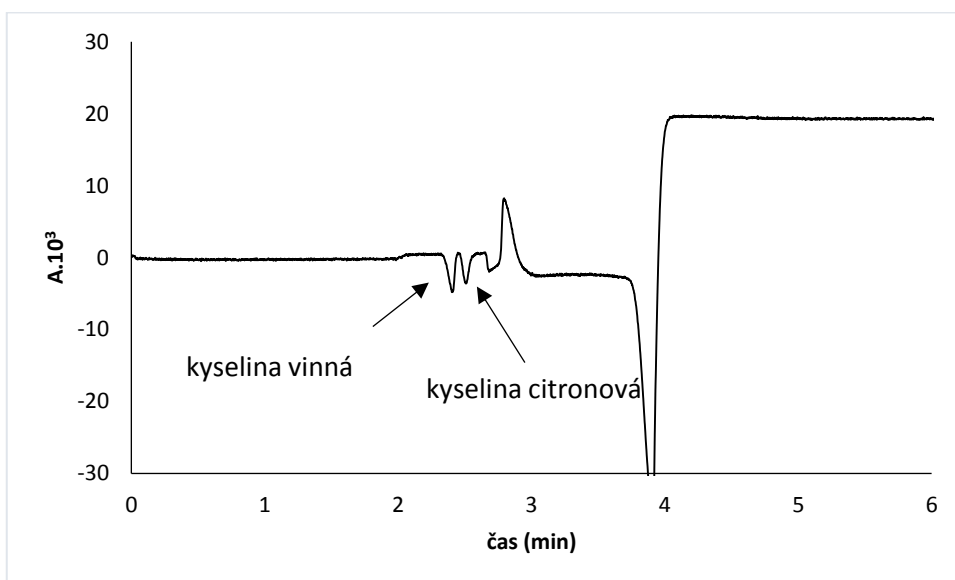
Graf 21: Separace kyseliny vinné a citronové o koncentraci 500  $\mu\text{g/ml}$  v 10 mM elektrolytu při hodnotě pH 4. Detekce probíhala při 254 nm.



Graf 22: Separace kyseliny vinné a citronové o koncentraci 500  $\mu\text{g/ml}$  v 25 mM elektrolytu při hodnotě pH 4. Detekce probíhala při 254 nm.



Graf 23: Separace kyseliny vinné a citronové o koncentraci 500  $\mu\text{g/ml}$  v 10 mM elektrolytu při hodnotě pH 5,5. Detekce probíhala při 254 nm.



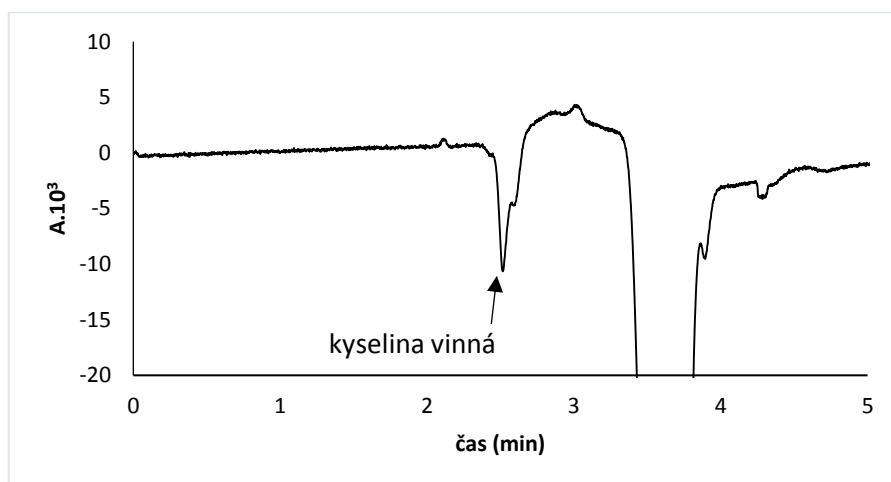
Graf 24: Separace kyseliny vinné a citronové o koncentraci 500  $\mu\text{g/ml}$  v 25 mM elektrolytu při hodnotě pH 5,5. Detekce probíhala při 254 nm.

Bylo zjištěno, že studovaný rozsah koncentrací nemá výrazný vliv na separaci kyselin. Koncentrace BGE se zdála být vhodná jak 10 mM tak i 25 mM. Pro další analýzy byla vybrána koncentrace BGE 25 mM. U pH základního elektrolytu docházelo k mírně lepší separaci při hodnotě 5,5, která byla použita v dalších experimentech.

### 6.2.2 Zakoncentrování pomocí techniky nametení

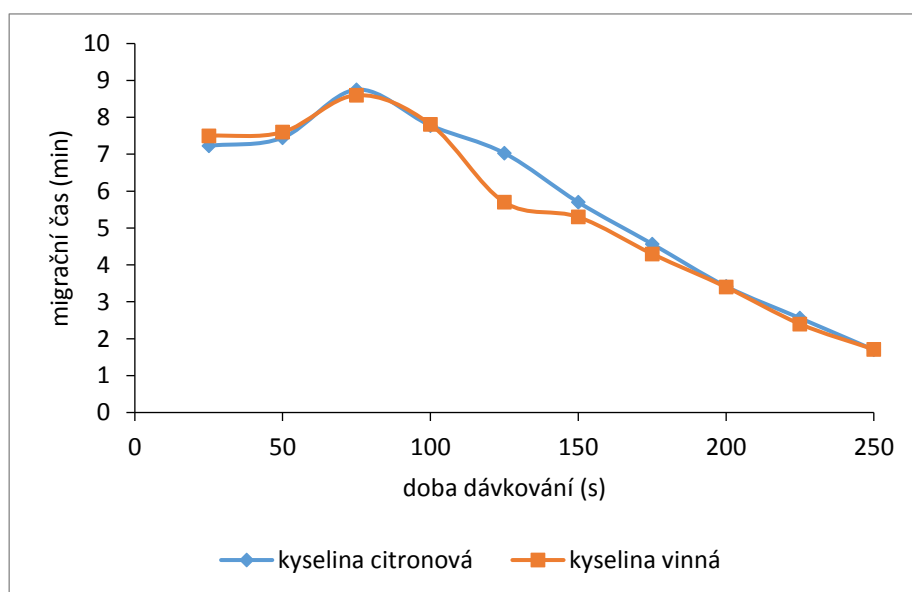
Separace se zakoncentrováním byly prováděny s použitím hydrodynamického dávkování vzorků do kapiláry nejprve tlakem 50 mBar po 5 s, dále 50 mBar po 50 s a nakonec 100 mBar po 25 s (poslední dvě hodnoty by měly poskytovat srovnatelné výsledky). Separace probíhala při hodnotě napětí -15 kV a teplotě 25  $^{\circ}\text{C}$  v elektrolytu o koncentraci 25

mM a upraven na hodnotu pH 5,5. Stejně jako při separaci bez zakoncentrování byly nejdříve proměřeny jednotlivé standardy kyselin o koncentraci 5  $\mu\text{g/ml}$  a poté byly provedeny analýzy směsí kyselin. Výsledky jsou uvedeny v tabulkách IX (v příloze) a grafech 25-27. Bylo zjištěno, že píky rostou jen po dobu dávkování do 75 s, poté se začínají výrazně rozmývat.

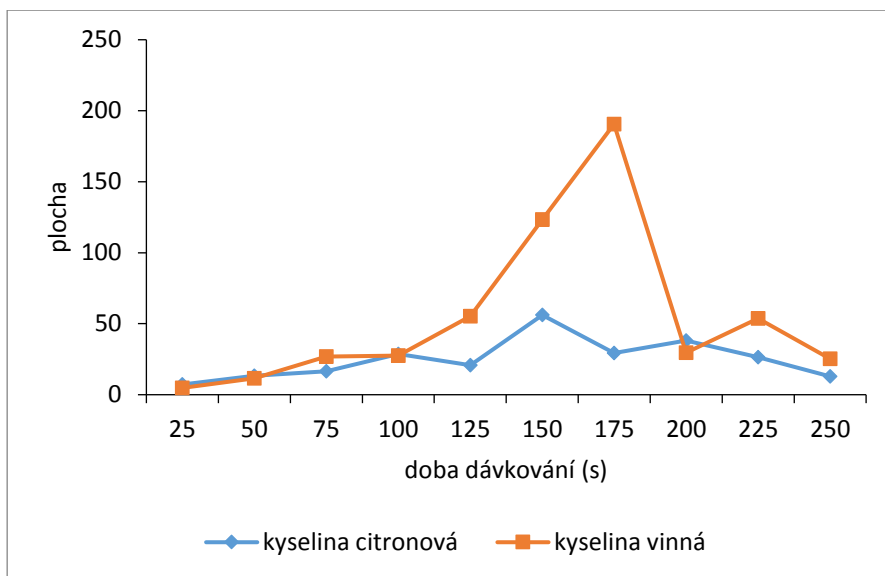


Graf 25: Separace kyseliny vinné o koncentraci 5  $\mu\text{g/ml}$  v 25 mM elektrolytu při hodnotě pH 5,5. Kyselina byla dávkována pomocí 50 mBar po dobu 50 s. Detekce probíhala při 254 nm.

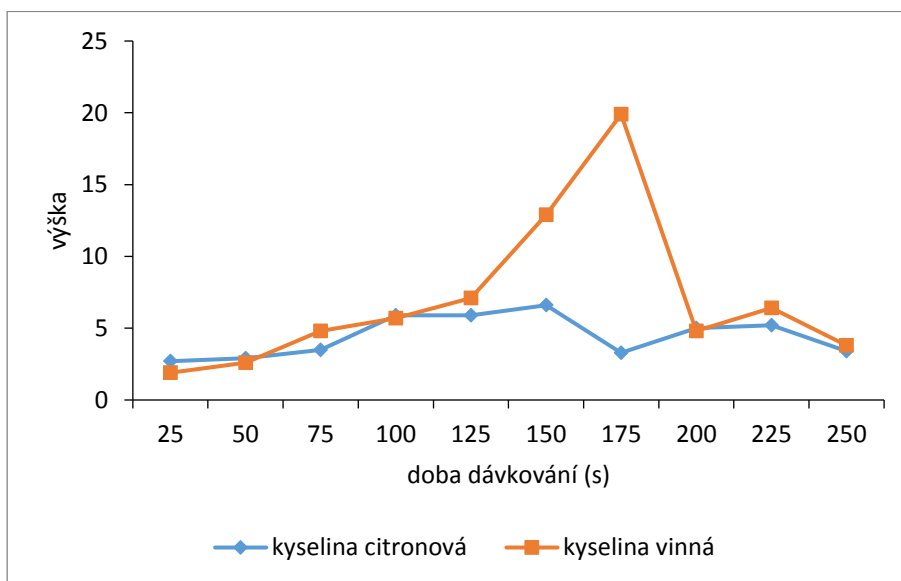
Dále bylo zkoušeno různé dávkování při tlaku 100 mBar po dobu 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225 a 250 s. Byly změřeny při hodnotě napětí -15 kV a teplotě 25  $^{\circ}\text{C}$  v 25 mM elektrolytu upraveném na hodnotu pH 5,5. Nejdříve byly měřeny standardy kyselin poté směsi. Výsledky jsou shrnuty v tabulce X (v příloze).



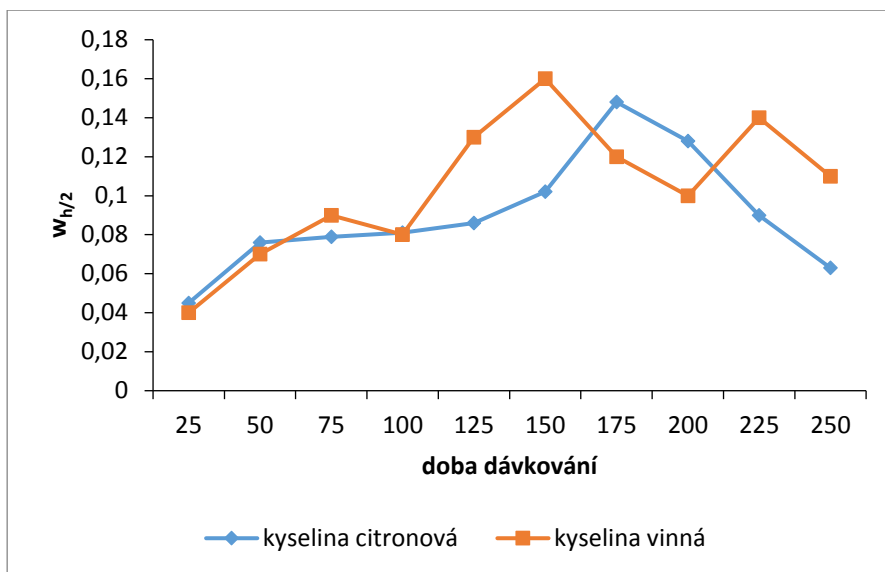
Graf 26: Závislost migračních časů na době dávkování pro kyselinu citronovou a vinnou o koncentraci 5  $\mu\text{g/ml}$ .



Graf 27: Závislost plochy píku na době dávkování pro kyselinu citronovou a vinnou o koncentraci 5 µg/ml.



Graf 28: Závislost výšky píku na době dávkování pro kyselinu citronovou a vinnou o koncentraci 5 µg/ml.



Graf 28: Závislost šířky píku v polovině výšky na době dávkování pro kyselinu citronovou a vinnou o koncentraci 5 µg/ml.

Na grafech 26-28 jsou znázorněny závislosti experimentálně určených parametrů (migrační časy, plocha a výška píků, šířka v polovině výšky) na době dávkování. Při větší době dávkování než 100 s dochází ke snižování migračních časů kyselin díky kratší dráze, kterou musí tyto ionty urazit k detektoru. Se zkracováním migračních časů také dochází ke snižování jejich rozdílů a tedy ke ztrátě rozlišení (graf 26). V uvedeném rozsahu doby dávkování (25-100 s) dochází přibližně k lineárnímu nárůstu plochy a výšky píků kyselin (grafy 27 a 28) a současně pouze k minimálnímu ovlivnění šířky píků (graf 28). Při vyšších dobách dávkování a tedy s vyšším objemem zóny vzorku docházelo k výraznějšímu rozmývání zón, snižování účinnosti separace a rozlišení (graf 28). Na základě uvedených výsledků je možné zvolit vhodnou dobu dávkování, která s prekoncentračním krokem činila 75 s při tlaku 100 mBar. Při porovnání s dávkováním použitým u měření kalibračních závislostí (grafy 9,10,11 a 15) v systému s přímou UV detekcí je tedy dávkován přibližně 30krát větší objem zóny vzorků kyselin.

## 7 Závěr

Předložená diplomová práce se zabývá optimalizací separace kyseliny citronové a vinné pomocí kapilární zónové elektroforézy. V práci byly teoreticky popsány různé prekoncentrační techniky používané v kapilární zónové elektroforéze, různá detekce používaná v kapilární zónové elektroforéze.

Analýzy kyseliny vinné a citronové s přímou UV detekcí byly prováděny v elektrolytu obsahující 180 mM trihydrátu hydrogenfosfátu di-draselného s 1 mM cetyltrimethylammonium bromidu rozpuštěno v 15 % (v/v) metanolu. Separace probíhala při napětí -30 kV a teplotě 20 °C. Byly zkoušeny i jiné elektrolyty s nižší koncentrací trihydrátu hydrogenfosfátu di-draselného. Dále byly zkoušeny různé hodnoty napětí a teplot, různé hodnoty pH. Z výsledku je patrné, že při přímé detekci je možné kyseliny rozdělit, ovšem citlivost stanovení je nízká díky neselektivní absorpci UV záření.

Při nepřímé detekci separace probíhala v elektrolytu s 15 mM kyselinou ftalovou a 0,6 mM CTAB při napětí -15 kV a teplotě 25 °C pH bylo upraveno na hodnotu 5. Byly zkoušeny i jiné teploty a napětí, různé hodnoty pH. Dále byla zkoušena různá doba dávkování. Z výsledků je patrné, že v systému s nepřímou detekcí lze kyseliny lépe separovat a detekovat. Byly ověřeny možnosti zakoncentrování kyselin při dávkování dlouhých zón do separační kapiláry.



## 8 Seznam použité literatury

- [1] Klouda, Pavel. Moderní analytické metody. 2. přepracované vydání. Ostrava: Vyd. Pavel Klouda, 2003. [cit.20.2.2017]. ISBN 978-80-86369-07-05.
- [2] Sima, Najafi. Gamat., L. Fotouhil., Z. Talebpour. The application of electrochemical detection in capillary electrophoresis. *Iranian Chemical Society* [online]. 2017, (14): 717-725 [cit. 28.3.2017]
- [3] Jozef, L. Beckers., Petr Boček. Sample stacking in capillary zone electrophoresis: Principles, advantages and limitations. *Electrophoresis* [online]. 2000. (21): 2747-2767 [cit. 27.3.2017]
- [4] Kašička, Václav. Teoretické základy a separační principy kapilárních elektromigračních metod. *Chemické listy* [online]. 1997, (91): 320-329 [cit. 16.1.2017].
- [5] Heiger, David. High performance capillary electrophoresis. Agilent Technologies. [online]. 2000 [cit. 22.2.2017]. Dostupné z: <http://hpst.cz/analyticka-chemie/kapilarni-elektroforeza/agilent-7100-capillary-electrophoresis-system>
- [6] <http://www.vscht.cz/> [on-line]. [cit. 8.4.2004]. Dostupné z: [http://www.vscht.cz/ktk/www\\_324/lab/texty/cze/CZE.pdf](http://www.vscht.cz/ktk/www_324/lab/texty/cze/CZE.pdf)
- [7] <http://casopis.vesmir.cz/> [on-line]. [cit. 27.2.2017] Dostupné z: <http://casopis.vesmir.cz/clanek/kapilarni-elektroforeza>
- [8] Honegr, J.: Využití elektroforetických metod v analýze látek přírodního původu. Diplomová práce. Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy. Katedra analytické chemie. Hradec Králové 2007, 68 s
- [9] Jandera, P. Separační analytické metody. Přednáška. Pardubice: Univerzita Pardubice, 26.11.2015
- [10] Horáková, Jana., Maier Vítězslav., Ševčík Juraj. On-line prekoncentrační techniky v kapilární elektroforeze. *Chemické listy* [online]. 2006, (100): 163-168 [cit. 23.2.2017]
- [11] Joselito, P. Quirino., Jong-Bok. Kim., Schigeru Terabe. Sweeping: concentration mechanism and applications to high-sensitivity analysis in capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A* [online]. 2002, (965): 357-373 [cit. 27.3.2017]

- [12] Lee. Yien. Thang., Michael C. Breadmore., Hong Heng See. Elektrokinetic supercharging in nonaqueous capillary electrophoresis for online preconcentration and determination of tamoxifen and its metabolites in human plasma. *Journal of Chromatography A* [online]. 2016. (1461): 185-191 [cit. 27.3.2017]
- [13] Jan, Petr., Vítková Kateřina, Václav Ranc, Joanna Znaleźiona, Vítězslav Maier, Radim Knob, Juraj Ševčík. Determination of some phenolic acids in *Majorana hortensis* by capillary electrophoresis with on-line elektrokinetic preconcentration. *Journal of agricultural and food chemistry*, [online]. 2008. (56): 3940-3944 [cit. 27.3.2017]
- [14] Laszlo, Hajba., Andras Guttman. Recent advances in column coatings for capillary electrophoresis of proteins. *Trends in Analytical chemistry* [online]. 2017. (90): 38-44 [cit. 27.3.2017]
- [15] Steven, L., et al., On-line sample preconcentration in capillary electrophoresis Fundamentals and applications. *Journal of chromatography A* [on-line]. 2008, (1184) : 504-541 [cit. 21.2.2017]
- [16] Ximena, Paéz., Luis Hernández. Biomedical applications of capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *Biopharmaceutics and drug disposition* [online]. 2001. (22): 273-289 [cit. 27.3.2017]
- [17] Pazourek, Jiří. Moderní elektroforetické analytické metody. <http://faf.vfu.cz/> [online]. 2003 [cit. 26.1.2017]. Dostupné z: <https://faf.vfu.cz/pub-files/ustavy/ustav-chemickych-leciv/vyuka-predmetu/analyticka-chemie-i-ii/separacni-metody-elektroforeza.pdf>
- [18] Churáček, Jaroslav a kolektiv. *Advanced Instrumental Methods of Chemical Analysis*. Praha: vyd. Academia Praha, 1993. ISBN 80-200-0424-6.
- [19] Pavel Klouda. Nakladatelství Pavko: Odborné učební texty [online]. [cit. 16.3.2017] Dostupné z: [http://knihy.pavko.cz/userFiles/mam\\_soubory/elektromigr.pdf](http://knihy.pavko.cz/userFiles/mam_soubory/elektromigr.pdf)
- [20] García, D. Carlos., Chumbimuni-Torres, Karin., Carilho, Emanuel. Capillary Electrophoresis and Microchip Capillary Electrophoresis. Principles, Applications, and Limitations. The University of Texas at San Antonio, TX, USA, 2013. ISBN 9780470572177.

- [21] Chien, Ring-Ling., Dean S. Burgi. Field amplified sample injection in high-performance capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography* [online]. 1991, (559): 141-152 [cit. 25.3.2017]
- [22] Maria, Luisa Marina., Angel Ríos, Miguel Valcárcel. Analysis and detection by capillary electrophoresis. *Elsevier*, [online]. 2005. ISBN 0-444-51718-9.
- [23] Dolník, V.: Úvod do kapilární elektroforézy. 1. vydání Brno: Ústav analytické chemie Akademie věd České republiky, Chromspec, 1994.
- [24] Domgínuéz-Vega, Elena., Cristina Montealegre, Maria Luisa Marina. Analysis of antibiotics by CE and their use as chiral selectors: An update. *Electrophoresis*, [online]. 2016. (37): 189-211 [cit. 27.3.2017]
- [25] Swinney, Kelly., Darryl J. Bornhop. Detection in capillary electrophoresis. *Electrophoresis* [online]. 2000, (21): 1239-1250 [cit. 20.3.2017]
- [26] Tůma, Petr., Eva Samcová. Stanovení volných aminokyselin v biologických tekutinách kapilární elektroforézou. *Chemické listy* [online]. 2007, (101): 202-207 [cit. 15.3.2017]
- [27] Žídková, Jitka., Josef Chmelík. Kapilární elektroforéza sacharidů. *Chemické listy* [online]. 2000, (94): 1093-1103 [cit. 19.3.2017]
- [28] Zemann, J. Andreas. Capacitively coupled contactless conductivity detection in capillary electrophoresis. *Electrophoresis* [online]. 2003, (24): 2125-2137 [cit. 23.3.2017]
- [29] Shahab. A. Shamsi. Indirect detection methods in capillary electrophoresis. *Encyclopedia of Analytical Chemistry* [online]. 2006. [cit. 27.3.2017]
- [30] Fumihiko, Kitagawa and Otsuka, Koji. Recent applications of on-line sample preconcentration techniques in capillary electrophoresis. *Journal of chromatography A* [on-line]. 2014, (1335): 43-60 [cit. 24.2.2017].
- [31] Joselito, P. Quirino., Schigeru Terabe. Sample stacking of cationic and anionic analytes in capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A* [online]. 2000, (902): 119-135 [cit. 27.3.2017]
- [32] Damon, M. Osbourn., David, J. Weiss, Craig, E. Lunte. On-line preconcentration methods for capillary electrophoresis. *Electrophoresis* [online]. 2008. (14): 2768-2779 [cit. 27.3.2017]

- [33] D. Martínez., F. Borrul., M. Calull. Sample stacking using field-amplified sample injection in capillary zone electrophoresis in the analysis of phenolic compounds. *Journal of Chromatography A* [online]. 1997, (788): 185-193 [cit. 27.3.2017]
- [34] Saavedra, L., A. García., C. Barbas. Development and validation of a capillary electrophoresis method for direct measurement of isocitric, citric, tartaric and malic acids as adulteration markers in orange juice. *Journal of Chromatography A* [online]. 2000, (881): 395-401 [cit. 28.3.2017]
- [35] Mato, Ínés., Silvia Suárez-Luque., José F. Huidobro. Simple determination of main organic acids in grape juice and wine by using capillary zone electrophoresis with direct UV detection. *Food Chemistry* [online]. 2007, (102): 104-112 [cit. 29.3.2017]
- [36] Vorarat, Suwanna., Chantana Aromdee., Yodporn Podokmai. Determination of alpha hydroxy acids in fruit by capillary electrophoresis. *Analytical sciences* [online]. 2002, (18): 893-897 [cit. 30.3.2017]
- [37] De Viliers, André., Frederic Lynen., Andrew Crouch. A robust capillary electrophoresis method for the determination of organic acids in wines. *Eur. food Res. Technol.* [online]. 2003, (217): 535-540 [cit. 30.3.2017]
- [38] Wang, Min., Feng Qu., Xiao-Quan Shan, Jin-Ming Lin. Development and optimization of a method for the analysis of low-molecular -mass organic acids in plants by capillary electrophoresis with indirect UV detection. *Journal of Chromatography A* [online]. 2003, (989): 285-292 [cit. 30.3.2017]
- [39] C. H. Wu., Y. S. Lo., Y.-H. Lee., T.-I. Lin. Capillary electrophoretic determination of organic acids with indirect detection. *Journal of Chromatography A* [online]. 1995. (716): 291-301 [cit. 27.3.2017]
- [40] Andersson, E. Per., William D. Pfeffer., Lars G. Blomberg. Indirect detection in capillary electrophoresis Comparison between indirect UV and direct laser-induced fluorescence detection for the determination of isoprenyl pyrophosphates. *Journal of chromatography A* [online]. 1995, (699): 323-330 [cit. 23.3.2017]

## PŘÍLOHY

## Tabulky I Separace kyselin s přímou UV detekcí

Tabulka 1a: Naměřené migrační charakteristiky pro kyselinu citronovou v 180 mM trihydrátu hydrogenfosfátu di-draselného s 1 mM cetyltrimethylammonium bromidu při zkoušce různých hodnot napětí a teplot.

teplota (°C)	napětí (kV)	migrační čas (s)	elektroosmóza (s)	ef. pohyblivost (m <sup>2</sup> /V.s)
17	-30	76,8	126,6	-3,50E-08
	-15	146,4	223,8	-3,23E-08
	-10	203,4	281,4	-2,79E-08
	-5	283,2	344,4	-2,57E-08
20	-30	78	131,4	-3,56E-08
	-15	133,2	202,8	-3,52E-08
	-10	190,8	266,4	-3,05E-08
	-5	261,6	319,2	-2,83E-08
25	-30	117,6	180	-2,01E-08
	-15	117,6	180	-4,03E-08
	-10	168,6	236,4	-3,49E-08
	-5	232,8	286,2	-3,29E-08

Tabulka 1b: Naměřené migrační charakteristiky pro kyselinu vinnou v 180 mM trihydrátu hydrogenfosfátu di-draselného s 1 mM cetyltrimethylammonium bromidu při zkoušce různých hodnot napětí a teplot.

teplota (°C)	napětí (kV)	migrační čas (s)	elektroosmóza (s)	ef. pohyblivost (m <sup>2</sup> /V.s)
17	-30	76,8	124,8	-3,42E-08
	-15	144	223,8	-3,38E-08
	-10	205,2	283,8	-2,77E-08
	-5	282,6	344,4	-2,60E-08
20	-30	76,8	127,2	-3,53E-08
	-15	133,2	202,8	-3,52E-08
	-10	190,8	267	-3,07E-08
	-5	261,6	318,6	-2,80E-08
25	-30	118,8	181,2	-1,99E-08
	-15	118,2	180	-3,97E-08
	-10	168,6	236,4	-3,49E-08
	-5	233,4	286,2	-3,24E-08

Tabulka 1c: Naměřené migrační charakteristiky pro kyselinu benzoovou v 180 mM trihydrátu hydrogenfosfátu di-draselného s 1 mM cetyltrimethylammonium bromidu při zkoušce různých hodnot napětí a teplot.

teplota (°C)	napětí (kV)	migrační čas (s)	elektroosmóza (s)	efektivní pohyblivost (m <sup>2</sup> /V.s)
17	-30	92,4	132	-2,22E-08
	-15	171,6	216,6	-1,65E-08
	-10	242,4	282,6	-1,20E-08
	-5	321,6	342,6	-7,81E-09
20	-30	91,2	126	-2,07E-08
	-15	159	201	-1,80E-08
	-10	226,8	267	-1,36E-08
	-5	296,4	318	-9,40E-09
25	-30	259,8	284,4	-2,28E-09
	-15	259,8	284,4	-4,56E-09
	-10	197,4	236,4	-1,71E-08
	-5	259,8	284,4	-1,36E-08

## Tabulky II Separace v elektrolytu v kyselé oblasti

Tabulka 2a: Naměřené a spočítané migrační charakteristiky pro kyselinu citronovou, vinnou a benzoovou v elektrolytu 180 mM trihydrátu hydrogenfosfátu di-draselného s 1 mM cetyltrimethylammonium při hodnotě napětí -15 kV a teplotě 20 °C.

analyt	pH	migrační čas (s)	elektroosmóza (s)	ef. pohyblivost (m <sup>2</sup> /V.s)
kyselina citronová	4	195	270	-1,9E-08
	5	192	270,6	-2,1E-08
	5,5	194,4	277,8	-2,1E-08
	6	194,4	284,4	-2,2E-08
	6,5	198	294	-2,3E-08
kyselina vinná	4	190,2	270,6	-2,1E-08
	5	187,2	273	-2,3E-08
	5,5	188,4	277,8	-2,3E-08
	6	190,2	282,6	-2,3E-08
	6,5	195	294	-2,4E-08
kyselina benzoová	4	232,8	271,8	-8,4E-09
	5	234	276	-8,9E-09
	5,5	235,8	279	-9,0E-09
	6	237,6	285	-9,6E-09
	6,5	240	294	-1,0E-08



Tabulka 2b: Naměřené a spočítané migrační charakteristiky pro kyselinu citronovou, vinnou a benzoovou v elektrolytu 180 mM trihydrátu hydrogenfosfátu di-draselného s 1 mM cetyltrimethylammonium při hodnotě napětí -30 kV a teplotě 20 °C.

analyt	pH	migrační čas (s)	elektroosmóza (s)	ef. pohyblivost (m <sup>2</sup> /V.s)
kyselina citronová	4	87,6	123	-2,2E-08
	5	82,8	123,6	-2,7E-08
	5,5	81,6	126	-3,0E-08
	6	82,2	129,6	-3,0E-08
	6,5	87,6	140,4	-2,9E-08
kyselina vinná	4	81	123,6	-2,9E-08
	5	78,6	124,8	-3,2E-08
	5,5	78,6	126,6	-3,3E-08
	6	80,4	132	-3,3E-08
	6,5	87	141	-3,0E-08
kyselina benzoová	4	94,2	126	-1,8E-08
	5	93,6	126	-1,9E-08
	5,5	94,8	126	-1,8E-08
	6	97,8	133,8	-1,9E-08
	6,5	103,2	141,6	-1,8E-08

### Tabulky III Separace v elektrolytu v zásadité oblasti

Tabulka 3a: Naměřené migrační charakteristiky pro směs kyselin citronové, vinné a benzoové v elektrolytu 180 mM trihydrátu hydrogenfosfátu di-draselného s 1 mM cetyltrimethylammonium při hodnotě napětí -15 kV a teplotě 20 °C. Směs byla vytvořena pomocí nastaveného dávkování na elektroforéze. V prvním řádku jsou vždy hodnoty migračního času, elektroosmózy a efektivní pohyblivosti pro kyselinu citronovou a vinnou a ve druhém řádku pro kyselinu benzoovou.

pH	migrační čas (s)	elektroosmóza (s)	ef. pohyblivost (m <sup>2</sup> /v.s)
9	144,6	224,4	-1,7E-08
9	168,6	224,4	-1,0E-08
8,5	144,6	223,2	-1,7E-08
8,5	168,6	223,2	-9,9E-09
8	144	222,6	-1,7E-08
8	169,8	222,6	-9,5E-09
7,5	142,8	221,4	-1,7E-08
7,5	169,8	221,4	-9,4E-09
7	139,8	214,8	-1,7E-08
7	168	214,8	-8,9E-09

Tabulka 3b: Naměřené migrační charakteristiky pro směs kyselin citronové, vinné a benzoové v elektrolytu 180 mM trihydrátu hydrogenfosfátu di-draselného s 1 mM cetyltrimethylammonium při hodnotě napětí -30 kV a teplotě 20 °C. Směs byla vytvořena pomocí nastaveného dávkování na elektroforéze. V prvním řádku jsou vždy hodnoty migračního času, elektroosmózy a efektivní pohyblivosti pro kyselinu citronovou a vinnou a ve druhém řádku pro kyselinu benzoovou.

pH	migrační čas (s)	elektroosmóza (s)	ef. pohyblivost (m <sup>2</sup> /v.s)
9	83,4	137,4	-3,2E-08
9	96	137,4	-2,1E-08
8,5	82,8	137,4	-3,3E-08
8,5	96	137,4	-2,1E-08
8	81	132,6	-3,3E-08
8	93,6	132,6	-2,1E-08
7,5	79,2	132	-3,5E-08
7,5	92,4	132	-2,2E-08
7	75,6	127,8	-3,7E-08
7	89,4	127,8	-2,3E-08

Tabulka 3c: Naměření migrační charakteristiky pro směs kyselin citronové, vinné a benzoové v elektrolytu 180 mM trihydrátu hydrogenfosfátu di-draselného s 1 mM cetyltrimethylammonium při hodnotě napětí -30 kV a teplotě 25 °C. Směs byla vytvořena pomocí nastaveného dávkování na elektroforéze. V prvním řádku jsou vždy hodnoty migračního času, elektroosmózy a efektivní pohyblivosti pro kyselinu citronovou a vinnou a ve druhém řádku pro kyselinu benzoovou.

pH	migrační čas (s)	elektroosmóza (s)	ef. pohyblivost (m <sup>2</sup> /v.s)
9	80,4	135	-3E-08
9	92,4	135	-2E-08
8,5	79,8	133,2	-3E-08
8,5	91,8	133,2	-2E-08
8	78	129,6	-3E-08
8	90	129,6	-2E-08
7,5	76,2	127,8	-4E-08
7,5	88,8	127,8	-2E-08
7	71,4	120,6	-4E-08
7	84	120,6	-2E-08

## Tabulky IV Kalibrace v 180 mM elektrolytu

Tabulka 4a: Naměřené migrační charakteristiky pro jednotlivé kyseliny v elektrolytu 180 mM trihydrátu hydrogenfosfátu di-draselného s 1 mM cetyltrimethylammonium při hodnotě napětí -30 kV a teplotě 20 °C pH bylo upraveno na hodnotu 4.

	koncentrace ( $\mu\text{g/ml}$ )	migrační čas (min)	plocha	výška	elektroosmóza (min)
benzoová	1000	2,43	320,5	89,2	4,6
	500	2,43	215,8	73,7	4,52
	250	2,43	128	46,1	4,45
	100	2,45	46,9	25,1	4,38
vinná	2000	1,83	20,3	23,4	4,3
	1000	1,82	9,8	18,4	4,2
	500	1,81	10,5	7,7	4,1
	250	1,81	6,7	7,2	4
citronová	2000	1,89	22,6	22,2	3,75
	1000	1,91	10,9	13,4	3,65
	250	2,5	10,7	16,3	3,45
	100	2,71	11,1	6,6	3,41

Tabulka 4b: Naměřené migrační charakteristiky pro jednotlivé kyseliny v elektrolytu 180 mM trihydrátu hydrogenfosfátu di-draselného s 1 mM cetyltrimethylammonium při hodnotě napětí -30 kV a teplotě 20 °C pH bylo upraveno na hodnotu 6.

	koncentrace ( $\mu\text{g/ml}$ )	migrační čas (min)	plocha	výška	elektroosmóza (min)
benzoová	1000	2,66	371,9	106	5
	500	2,65	239,1	86	4,9
	250	2,67	132,3	50,3	4,9
	100	2,69	53,7	28,8	4,94
vinná	2000	1,95	20,7	26,2	4,81
	1000	1,93	10,1	18,7	4,75
	500	1,92	5,4	11,9	4,71
	250	1,92	4,8	9,4	4,7
citronová	2000	2,01	20	21,6	4,61
	1000	1,9	12	17,3	4,55
	500	1,98	10,4	12,3	4,44
	250	1,97	2,4	5,5	4,34

## Tabulky V Kalibrace v 18 mM elektrolytu

Tabulka 5a: Naměřené migrační charakteristiky pro jednotlivé kyseliny v elektrolytu 18 mM trihydrátu hydrogenfosfátu di-draselného s 1 mM cetyltrimethylammonium při hodnotě napětí -30 kV a teplotě 20 °C pH bylo upraveno na hodnotu 4.

	koncentrace ( $\mu\text{g/ml}$ )	migrační čas (min)	plocha	výška	elektroosmóza (min)
benzoová	1000	3,42	712,9	56,9	5,39
	500	3,56	322,3	32,9	5,37
	250	3,47	503,2	43,7	5,3
	100	3,63	181,1	22,4	5,3
vinná	2000	2,51	37,3	20,7	5,15
	1000	2,5	15	7,1	5,2
citronová	1000	2,83	7,7	6,3	4,47
	500	2,81	1,3	1,3	4,47
	250	2,84	2,7	1,6	4,6

Tabulka 5b: Naměřené migrační charakteristiky pro jednotlivé kyseliny v elektrolytu 18 mM trihydrátu hydrogenfosfátu di-draselného s 1 mM cetyltrimethylammonium při hodnotě napětí -30 kV a teplotě 20 °C pH bylo upraveno na hodnotu 6.

	koncentrace ( $\mu\text{g/ml}$ )	migrační čas (min)	plocha	výška	elektroosmóza (min)
benzoová	1000	3,53	678,9	60	5,66
	500	3,64	313,3	35,7	5,63
	250	3,57	501,2	48	5,6
	100	3,7	163,8	25,1	5,55
vinná	2000	2,5	42,3	12,6	5,5
	1000	2,46	24,9	9,7	5,45
	500	2,46	9,5	8	5,4
	250	2,45	5,1	5,8	5,34
	100	2,46	2,5	4,2	5,35

## Tabulky VI Kalibrace v 60 mM elektrolytu

Tabulka 6a: Naměřené migrační charakteristiky pro jednotlivé kyseliny v elektrolytu 60 mM trihydrátu hydrogenfosfátu di-draselného s 1 mM cetyltrimethylammonium při hodnotě napětí -30 kV a teplotě 20 °C.

pH	koncentrace (µg/ml)	analyt	migrační čas (min)	plocha	výška	elektroosmóza (min)
6	500	kyselina citronová	2,31	7,3	2,8	4,64
		kyselina vinná	2,17	10,3	8,8	4,64
		kyselina benzoová	2,94	244,1	48,9	4,71
4	500	kyselina citronová	2,51	3,8	1,9	3,72
		kyselina vinná	2,28	6,7	4,1	3,9

Tabulka 6b: Naměřené migrační charakteristiky pro směsi kyselin v elektrolytu 60 mM trihydrátu hydrogenfosfátu di-draselného s 1 mM cetyltrimethylammonium při hodnotě napětí -30 kV a teplotě 20 °C a upraveno pH na 4.

koncentrace (µg/ml)	migrační čas (min)	plocha	výška	elektroosmóza (min)
450	2,18	2,4	3,7	4,31
	2,22	10,1	37,6	
	2,67	379,1	66,8	
350	2,17	9,8	6,1	4,3
	2,25	10,7	41,4	
	2,69	349,3	63,1	
300	2,3	2,4	1,9	4,22
	2,25	5,5	32,4	
	2,7	264	67,3	
250	2,18	3,5	4	4,1
	2,3	1	12,1	
	2,7	137,7	30,1	
100	2,2	2,3	2,4	4
	2,34	4	12,6	
	2,71	159,9	30,1	

Tabulka 6c: Naměřené migrační charakteristiky pro směsi kyselin v elektrolytu 60 mM trihydrátu hydrogenfosfátu di-draselného s 1 mM cetyltrimethylammonium při hodnotě napětí -30 kV a teplotě 20 °C a upraveno pH na 6.

koncentrace (µg/ml)	migrační čas (min)	plocha	výška	elektroosmóza (min)
450	2,15	7,3	9,9	4,9
	2,26	8,4	5,1	
	2,9	345,5	76,7	
350	2,16	12	12,8	4,9
	2,27	9,8	4,9	
	2,9	324,9	71,7	
300	2,17	3,5	6,1	4,9
	2,31	13,4	2,5	
	2,91	274,2	58	
250	2,18	4,9	7,5	4,9
	2,4	11,9	1,9	
	2,9	135,2	35,4	
100	2,2	2,6	6,1	4,9
	2,3	4,8	1,4	
	2,9	148,6	37,3	

Tabulka 6d: Naměřené migrační charakteristiky pro jednotlivé kyseliny v elektrolytu 60 mM trihydrátu hydrogenfosfátu di-draselného s 1 mM cetyltrimethylammonium při hodnotě napětí -30 kV a teplotě 20 °C a upraveno pH na 4.

	koncentrace (µg/ml)	migrační čas (min)	plocha	výška	elektroosmóza (min)
kyselina vinná	2000	2,1	69,4	5,6	4,8
	1000	2,1	18,8	12,9	4,8
	900	2,1	13,9	11,6	4,7
	800	2,1	13,8	11	4,72
	700	2,1	12,2	10,8	4,64
	600	2,1	10,4	9,7	4,6
kyselina citronová	2000	2,2	33,9	19,1	5,02
	1000	2,2	20,5	15,2	5,11

## Tabulka VII Nepřímá UV detekce

Tabulka 7a: Naměřené migrační charakteristiky pro jednotlivé kyseliny při nepřímé UV detekci při různých teplotách a napětí pro optimalizaci separace v elektrolytu 0,6 mM cetyltrimethylammonium bromidu s 15 mM kyselinou ftalovou elektrolyt upraven na hodnotu pH 5.

analyt	teplota (°C)	napětí (kV)	migrační čas (min)	elektroosmóza (min)	ef. pohyblivost (m <sup>2</sup> /V.s)
kyselina vinná	25	-30	1,53	2,7	-3,23E-08
		-10	2,9	3,9	-3,03E-08
		-5	3,64	4,4	-3,24E-08
	20	-30	1,75	3,3	-3,06E-08
		-15	2,7	4,21	-3,03E-08
		-10	3,24	4,6	-3,12E-08
		-5	4,3	5,3	-3,00E-08
	17	-30	1,95	3,9	-2,92E-08
		-15	3,3	5,7	-2,91E-08
		-10	4,4	7,5	-3,21E-08
		-5	5,22	6,8	-3,04E-08
	kyselina citronová	25	-30	1,62	2,7
-10			2,9	3,9	-3,02E-08
-5			3,7	4,4	-2,94E-08
20		-30	1,9	3,3	-2,54E-08
		-15	2,8	4,2	-2,71E-08
		-10	3,4	4,6	-2,62E-08
		-5	4,2	5	-2,60E-08
17		-30	1,9	3,6	-2,83E-08
		-15	3,8	6,7	-2,59E-08
		-10	4,3	6,4	-2,61E-08
		-5	5,7	7,2	-2,50E-08



Tabulka 7b: Naměřené migrační charakteristiky pro směsi kyselin při nepřímé UV detekci v elektrolytu 0,6 mM cetyltrimethylammonium bromidu s 15 mM kyselinou ftalovou, elektrolyt upraven na pH 5.

koncentrace ( $\mu\text{g/ml}$ )	migrační čas (min)	elektroosmóza (min)	ef. pohyblivost ( $\text{m}^2/\text{V}\cdot\text{s}$ )
1000	3,16	6,2	-3,53E-08
	3,3	6,2	-3,23E-08
500	3,24	6,6	-3,58E-08
	3,4	6,6	-3,25E-08
450	3,1	5,9	-3,49E-08
	3,3	5,9	-3,04E-08
350	3,1	5,8	-3,42E-08
	3,2	5,8	-3,19E-08
300	2,9	5,7	-3,86E-08
	3,2	5,7	-3,12E-08
250	2,98	5,6	-3,58E-08
100	3	5,5	-3,45E-08

## Tabulky VIII Optimalizace koncentrace BGE

Tabulka 8a: Naměřené migrační charakteristiky pro směsi kyselin při nepřímé UV detekci v elektrolytu 0,6 mM cetyltrimethylammonium bromidu s 25 mM kyselinou ftalovou.

pH	koncentrace ( $\mu\text{g/ml}$ )	migrační čas (min)	elektroosmóza (min)	ef. pohyblivost ( $\text{m}^2/\text{V}\cdot\text{s}$ )
6	1000	2,45	4,1	-3,74E-08
		2,54	4,1	-3,41E-08
	500	2,4	4	-3,80E-08
		2,5	4	-3,42E-08
	450	2,39	3,9	-3,69E-08
		2,5	3,9	-3,27E-08
5,5	1000	2,45	3,9	-3,46E-08
		2,55	3,9	-3,09E-08
	500	2,41	3,9	-3,61E-08
		2,5	3,9	-3,27E-08
	450	2,41	3,9	-3,61E-08
		2,52	3,9	-3,20E-08
4	1000	2,5	3,8	-3,12E-08
		2,6	3,8	-2,77E-08
	500	2,5	3,7	-2,95E-08
		2,6	3,7	-2,60E-08
	450	2,5	3,7	-2,95E-08
		2,6	3,7	-2,60E-08

Tabulka 8b: Naměřené migrační charakteristiky pro směsi kyselin při nepřímé UV detekci v elektrolytu 0,6 mM cetyltrimethylammonium bromidu s 10 mM kyselinou ftalovou.

pH	koncentrace (µg/ml)	migrační čas (min)	elektroosmóza (min)	ef. pohyblivost (m <sup>2</sup> /V.s)
6	1000	2,57	3,8	2,87E-08
		2,67	3,8	2,54E-08
	500	2,53	3,9	3,01E-08
		2,64	3,9	2,79E-08
	450	2,54	3,9	3,13E-08
		2,7	3,9	2,60E-08
5,5	1000	2,6	3,9	2,92E-08
		2,7	3,9	2,60E-08
	500	2,5	3,9	3,27E-08
		2,6	3,9	2,92E-08
	450	2,5	3,8	3,27E-08
		2,7	3,8	2,44E-08
4	1000	2,67	3,6	2,54E-08
		2,77	3,6	1,90E-08
	500	2,65	3,7	2,27E-08
		2,74	3,7	2,16E-08
	450	2,65	3,9	2,44E-08
		2,8	3,9	2,29E-08

Tabulka 8c: Naměřené migrační charakteristiky pro směsi kyselin při nepřímé UV detekci v různých elektrolytech a při různé hodnotě pH.

10 mM pH 5,5	analyt	koncentrace (µg/ml)	migrační čas (min)	plocha	výška	elektroosmóza (min)
10 mM pH 5,5	k. citronová	500	2,7	17,5	4,3	4
	k. vinná	500	2,6	22,2	6	4
10 mM pH 6	k. citronová	500	2,73	62,1	18,2	4,1
	k. vinná	500	2,6	24,3	6,3	4,1
15 mM pH 5	k. citronová	500	2,49	13,8	4,2	3,5
	k. vinná	500	2,41	19,4	5,9	3,6
25 mM pH 5,5	k. citronová	500	2,6	14,7	4,4	4,1
	k. vinná	500	2,5	18,9	6,2	4,1
25 mM pH 6	k. citronová	500	2,56	13,9	4,6	4,2
	k. vinná	500	2,5	19,8	6,5	4,2

## Tabulky IX Zkouška zakoncentrování

Tabulka 9a: Naměřené migrační charakteristiky při nepřímé UV detekci a různém dávkování pro kyselinu citronovou v elektrolytu 0,6 mM cetyltrimethylammonium bromidu s 25 mM kyselinou ftalovou, při hodnotě napětí -15 kV a teplotě 25 °C a pH bylo upraveno na 5,5.

koncentrace (µg/ml)	dávkování	migrační čas	plocha	výška	w <sub>h/2</sub>
0,5	50 mBar 50 s	2,7	6,4	1,5	0,0702
	100 mBar 25 s	3,04	7,5	1,7	0,0722
5	50 mBar 50 s	2,7	13,3	2,3	0,096
	100 mBar 25 s	2,6	17,5	3,1	0,094

Tabulka 9b: Naměřené migrační charakteristiky při nepřímé UV detekci a různém dávkování pro kyselinu vinnou v elektrolytu 0,6 mM cetyltrimethylammonium bromidu s 25 mM kyselinou ftalovou, při hodnotě napětí -15 kV a teplotě 25 °C a pH bylo upraveno na 5,5.

koncentrace (µg/ml)	dávkování	migrační čas	plocha	výška	w <sub>h/2</sub>
0,5	50 mBar 50 s	2,73	2,5	0,94	0,044
	100 mBar 25 s	2,72	7,3	1,8	0,067
5	50 mBar 50 s	2,52	69,8	11,3	0,03
	100 mBar 25 s	2,52	55,5	10,2	0,09

## Tabulky X Zakoncentrování pomocí metody nametení

Tabulka 10a: Naměřené migrační charakteristiky při nepřímé UV detekci a různém dávkování pro kyselinu citronovu o koncentraci 5 µg/ml v elektrolytu 0,6 mM cetyltrimethylammonium bromidu s 25 mM kyselinou ftalovou, při napětí -15 kV a teplotě 25 °C a pH bylo upraveno na 5,5.

čas (s)	migrační čas (min)	plocha	výška	w <sub>h/2</sub>
25	7,23	7,2	2,7	0,045
50	7,45	13,4	2,9	0,076
75	8,75	16,6	3,5	0,079
100	7,78	28,7	5,9	0,081
125	7,03	20,7	5,9	0,086
150	5,7	56,1	6,6	0,102
175	4,57	29,4	3,3	0,148
200	3,42	38,2	5	0,128
225	2,56	26,5	5,2	0,09
250	1,7	12,8	3,4	0,063

Tabulka 10b: Naměřené migrační charakteristiky při nepřímé UV detekci a různém dávkování pro kyselinu vinnou o koncentraci 5 µg/ml v elektrolytu 0,6 mM cetyltrimethylammonium bromidu s 25 mM kyselinou ftalovou, při napětí -15 kV a teplotě 25 °C a pH bylo upraveno na 5,5.

čas (s)	migrační čas (min)	plocha	výška	w <sub>h/2</sub>
25	7,5	4,8	1,9	0,04
50	7,6	11,5	2,6	0,07
75	8,6	26,9	4,8	0,09
100	7,81	27,5	5,7	0,08
125	5,7	55,3	7,1	0,13
150	5,3	123,3	12,9	0,16
175	4,3	190,6	19,9	0,12
200	3,4	29,6	4,8	0,1
225	2,4	53,6	6,4	0,14
250	1,71	25,2	3,8	0,11

