

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

DIPLOMOVÁ PRÁCE

2018

Bc. Tereza MATUŠKOVÁ

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

**SEPARACE PORFYRINOVÝCH BARVIV POMOCÍ
KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZY**

Bc. Tereza Matušková

Diplomová práce
2018

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Tereza Matušková**
Osobní číslo: **C16545**
Studijní program: **N1407 Chemie**
Studijní obor: **Analytická chemie**
Název tématu: **Separace porfyrinových barviv pomocí kapilární elektroforézy**
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 přehled a využití porfyrinových barviv v potravinářství a dále práce zabývající se analýzou těchto látek pomocí separačních technik v kapalně fázi (kapalinová chromatografie, kapilární elektroforéza). Popište principy a instrumentaci používanou v kapilárních elektromigračních metodách.
2. Experimentálně ověřte možnosti analýz porfyrinových barviv pomocí kapilární elektroforézy. Proměřte migrační charakteristiky ve vybraných základních elektrolytech. Optimalizujte podmínky analýzy s cílem dosáhnout co nejlepší separace směsi barviv.
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, Ph.D.

Katedra analytické chemie

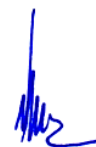
Datum zadání diplomové práce: **20. února 2018**

Termín odevzdání diplomové práce: **11. května 2018**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Karel Ventura,
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2018

Prohlašuji:

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

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

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 7. 5. 2018

Bc. Tereza Matušková

Na tomto místě bych chtěla velmi poděkovat vedoucímu mé diplomové práce doc. Ing. Petru Česlovi, Ph.D. za jeho pomoc a neocenitelné odborné rady, vstřícné jednání a trpělivost. Také bych ráda poděkovala své konzultantce Ing. Janě Váňové, Ph.D. za pomoc při vypracování diplomové práce a cenné připomínky k experimentálnímu měření. Zvláštní poděkování patří mé rodině za podporu a také finanční zabezpečení během mého studia.

ANOTACE

Diplomová práce se zaměřuje na separaci porfyrinových barviv pomocí kapilární elektroforézy. Nejprve byla provedena optimalizace podmínek a byly určeny migrační charakteristiky vzorku sodné soli měďnatého komplexu chlorofylinu a standardních látek ve vybraných elektrolytech. Byl zkoumán vliv složení elektrolytů, pH a dalších parametrů na separaci vzorku. Identifikace látek ve vzorku byla provedena na základě shody migračních časů a UV spekter.

KLÍČOVÁ SLOVA

Porfyrinová barviva, sodná sůl měďnatého komplexu chlorofylinu, chlorin *e*₆, chlorin *e*₄, kapilární elektroforéza, MEKC

TITLE

Separation of porphyrin dyes using capillary electrophoresis

ANNOTATION

The diploma thesis is focused on the separation of porphyrin dyes using capillary electrophoresis. At first the separation conditions were optimized and migration characteristics were determined for the sample of sodium copper chlorophyllin and standard substances in selected electrolytes. The effects of composition of electrolytes, pH and other parameters on sample separation were investigated. Compounds in the sample were identified using migration times of standards and UV spectra.

KEY WORDS

Porphyrin dyes, sodium copper chlorophyllin, chlorin *e*₆, chlorin *e*₄, capillary electrophoresis, MEKC

OBSAH

| | |
|--|-----------|
| ÚVOD | 12 |
| 1 TEORETICKÁ ČÁST | 13 |
| 1.1 Potravinová barviva | 13 |
| 1.1.1 Klasifikace přírodních barviv | 14 |
| 1.2 Tetrapyrroly | 14 |
| 1.2.1 Chlorofyly..... | 15 |
| 1.2.2 Degradace chlorofylu | 16 |
| 1.2.3 Měďnaté komplexy chlorofylů a chlorofylinů | 17 |
| 1.2.4 Chloriny | 17 |
| 1.2.5 Využití porfyrinových barviv | 19 |
| 1.3 Elektromigrační techniky..... | 20 |
| 1.3.1 Kapilární elektroforéza (CE) | 20 |
| 1.3.2 Kapilární zónová elektroforéza (CZE) | 21 |
| 1.3.3 Micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC) | 22 |
| 1.4 Analýza porfyrinových barviv | 25 |
| 2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST | 30 |
| 2.1 Použitá zařízení..... | 30 |
| 2.2 Seznam použitých chemikálií | 30 |
| 2.3 Pracovní postup..... | 34 |
| 2.3.1 Příprava kapiláry..... | 34 |
| 2.3.2 Proplach kapiláry | 34 |
| 2.3.3 Příprava základního elektrolytu (BGE)..... | 34 |
| 2.3.4 Příprava vzorku | 37 |
| 2.3.5 Příprava standardů | 37 |
| 2.4 Podmínky měření | 38 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 3 | VÝSLEDKY A DISKUZE | 39 |
| 3.1 | Boritanový pufr pH 9 | 39 |
| 3.1.1 | Standardy | 39 |
| 3.1.2 | Vzorek SCC a thiomochovina | 42 |
| 3.1.3 | Identifikace látek ve vzorku SCC podle standardů | 43 |
| 3.2 | Fosforečnanový pufr pH 3 | 45 |
| 3.2.1 | Standardy | 45 |
| 3.2.2 | Vzorek SCC | 48 |
| 3.2.3 | Identifikace látek ve vzorku SCC podle standardu | 49 |
| 3.3 | Optimalizace podmínek pro separaci SCC | 50 |
| | ZÁVĚR | 54 |
| | SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY | 55 |
| | PŘÍLOHA 1 | 59 |
| | PŘÍLOHA 2 | 66 |
| | PŘÍLOHA 3 | 73 |

SEZNAM OBRÁZKŮ:

| | |
|--|----|
| Obrázek 1: Základní struktura porfyrinových barviv | 14 |
| Obrázek 2: Chlorofylová barviva <i>a, b, c₁, c₂, c₃, d</i> | 16 |
| Obrázek 3: Degradace chlorofylu..... | 17 |
| Obrázek 4: Struktury chlorinových bází vyskytujících se převážně v sodné soli měďnatého komplexu chlorofylinu. | 18 |
| Obrázek 5: Sternův model elektrické dvojvrstvy. | 21 |
| Obrázek 6: Základní schéma přístroje CZE. | 22 |
| Obrázek 7: Struktura micely..... | 23 |
| Obrázek 8: Migrační okno..... | 23 |
| Obrázek 9: Záznamy jednotlivých vzorků SCC..... | 26 |
| Obrázek 10: Retenční časy jednotlivých složek vzorku SCC. | 27 |
| Obrázek 11: Chromatogramy vzorku čerstvého a skladovaného oleje s přídatkem SCC. | 28 |
| Obrázek 12: Kapilární elektroforéza Agilent CE 7100. | 30 |
| Obrázek 13: Vzorec sodné soli měďnatého komplexu chlorofylinu. | 32 |
| Obrázek 14: Vzorec feoforbidu <i>a</i> | 32 |
| Obrázek 15: Vzorec chlorinu <i>e₄</i> | 33 |
| Obrázek 16: Vzorec chlorinu <i>e₆</i> | 33 |
| Obrázek 17: Vzorec protoporfyrinu IX. | 33 |
| Obrázek 18: Separace SCC vzorku v 25 mM boritanového pufru (pH 9) s 20 mM SDS (A) a v elektrolytu s 20 mM SDS + 10 % ACN (B), napětí 20 kV, teplota 25 °C. | 43 |
| Obrázek 19: Separace SCC vzorku v 25 mM boritanového pufru (pH 9) s 20 mM SDS a 1 mM β-CD, napětí 20 kV, teplota 25 °C. | 44 |
| Obrázek 20: Separace SCC vzorku v elektrolytu z 10 mM fosforečnanového pufru (pH 3) s 20 mM SDS (A) a v elektrolytu s 20 mM SDS + 10 % ACN (B), napětí -20 kV, teplota 25 °C. | 49 |
| Obrázek 21: Separace SCC vzorku v elektrolytu z 10 mM fosforečnanového pufru (pH 3) s 20 mM SDS a 1 mM β-CD, napětí -20 kV, teplota 25 °C. | 49 |

SEZNAM TABULEK:

| | |
|---|----|
| Tabulka 1: Složení nejdůležitějších používaných elektrolytů složených z boritanového pufru a přídatků. | 35 |
| Tabulka 2: Složení nejdůležitějších používaných elektrolytů složených z fosforečnanového pufru a přídatků. | 36 |

SEZNAM GRAFŮ:

| | |
|---|----|
| Graf 1: Závislost zdánlivé pohyblivosti Cu chlorinu e_4 na koncentraci SDS v 25 mM boritanovém pufru bez přídavku a s 10 % ACN a 1 mM β -CD při napětí 20 kV, teplotě 25 °C. | 39 |
| Graf 2: Závislost zdánlivé pohyblivosti Cu protoporfyrinu IX na koncentraci SDS v 25 mM boritanovém pufru bez přídavku a s 10 % ACN při napětí 20 kV, teplotě 25 °C. | 40 |
| Graf 3: Závislost zdánlivé pohyblivosti Cu chlorinu e_6 na koncentraci SDS v 25 mM boritanovém pufru bez přídavku a s 10 % ACN a 1 mM β -CD při napětí 20 kV, teplotě 25 °C.. | 41 |
| Graf 4: Závislost zdánlivé pohyblivosti Cu feoforbidu a na koncentraci SDS v 25 mM boritanovém pufru bez přídavku a s 10 % ACN a 1 mM β -CD při napětí 20 kV, teplotě 25 °C.. | 41 |
| Graf 5: Závislost zdánlivé pohyblivosti složek vzorku SCC na koncentraci SDS v 25 mM boritanovém pufru bez přídavku a s 10 % ACN a 1 mM β -CD při napětí 20 kV, teplotě 25 °C. | 42 |
| Graf 6: Závislost zdánlivé pohyblivosti standardu Cu chlorinu e_4 na koncentraci SDS v 10 mM fosforečnanovém pufru s SDS a v BGE s SDS s přídavky 10 % ACN a 1 mM β -CD při napětí -20 kV, teplotě 25 °C..... | 45 |
| Graf 7: Závislost zdánlivé pohyblivosti standardu Cu protoporfyrinu IX na koncentraci SDS v 10 mM fosforečnanovém pufru v SDS bez a s přídavky 10 % ACN a 1 mM β -CD při napětí -20 kV, teplotě 25 °C..... | 46 |
| Graf 8: Závislost zdánlivé pohyblivosti standardu Cu chlorinu e_6 na koncentraci SDS v 10 mM fosforečnanovém pufru s SDS bez a s přídavky 10 % ACN a 1 mM β -CD při napětí -20 kV, teplotě 25 °C..... | 47 |
| Graf 9: Závislost zdánlivé pohyblivosti standard Cu feoforbid a na koncentraci SDS v 10 mM fosforečnanovém pufru s SDS bez a s přídavky 10 % ACN a 1 mM β -CD při napětí -20 kV, teplotě 25 °C..... | 47 |
| Graf 10: Závislost zdánlivé pohyblivosti vzorku SCC na koncentraci SDS v 10 mM fosforečnanovém pufru s SDS bez a s přídavky 10 % ACN a 1 mM β -CD při napětí -20 kV, teplotě 25 °C..... | 48 |

SEZNAM ZKRATEK

| | |
|------------------------|---|
| β -CD | β -cyklodextrin |
| γ -CD | γ -cyklodextrin |
| ACN | Acetonitril |
| BGE | Základní elektrolyt |
| CD | Cyklodextrin |
| CE | Kapilární elektroforéza |
| CZE | Kapilární zónová elektroforéza |
| CMC | Kritická micelární koncentrace |
| EOF | Elektroosmotický tok |
| HPBC | (2-hydroxypropyl)- β -cyklodextrin |
| HPGC | (2-hydroxypropyl)- γ -cyklodextrin |
| MEKC | Micelární elektrokinetická chromatografie |
| MeOH | Methanol |
| SCC | Sodná sůl měďnatého komplexu chlorofylinu |
| SDeS | Decylsíran sodný |
| SDS | Dodecylsíran sodný |
| UV-VIS (spektrometrie) | Ultrafialovo-viditelná (spektrometrie) |

ÚVOD

Porfyrinová barviva se řadí mezi přírodní barviva, která mají využití hlavně při dobarvování různých potravin. Mají za úkol zlepšit jejich barvu a ovlivnit tak spotřebitele. Existuje několik druhů těchto barviv, avšak pro tuto práci jsou primární barviva chlorofylová, jejichž hlavním znakem je porfyrinový kruh. Tato barviva se dělí podle své rozpustnosti. Mezi barviva rozpustná v tucích se řadí chlorofyly a jejich měďnaté komplexy a mezi barviva rozpustná ve vodě patří jejich deriváty - chlorofyliny. Měďnaté komplexy chlorofylů a chlorofylinů jsou stabilnější díky záměně hořčíku za měď uprostřed porfyrinového kruhu. Nejznámější komerčně dostupnou solí používanou k dobarvení potravin je sodná sůl měďnatého komplexu chlorofylinu (SCC). Tato sůl je podle Evropské unie značena kódem E 141 a skládá se z několika derivátů označovaných jako chloriny. Mezi nejznámější chloriny patří chlorin *e*₄, chlorin *e*₆, feoforbid *a*, rhodin *g*₇, protoporfyrin *IX* a jiné.

Mezi významné vlastnosti těchto barviv se řadí jejich antioxidační, antiklastogenní, antikarcinogenní a antimutagenní účinky. K analýze těchto barviv se nejčastěji využívá HPLC a CE s UV detekcí nebo ve spojení s MS detekcí.

Diplomová práce se zabývá optimalizací podmínek a separací soli SCC hlavně pomocí micelární elektrokinetické chromatografie. Zaměřuje se také na identifikaci dostupných standardů v soli SCC pomocí podobnosti UV spekter a naměřených migračních časů, ze kterých byly určeny zdánlivé pohyblivosti látky.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Potravinová barviva

Potravinová barviva neboli pigmenty určují specifickou barvu v buňkách, která je dána selektivní absorpcí světla. Barviva poskytují potravině lákavější a sytější barvu, která u spotřebitele vyvolá zájem o zakoupení produktu. V posledních letech je povoleno značně větší množství barviv než v minulých letech, proto je vhodné se o barviva alespoň okrajově zajímat a vybírat si ty potraviny, které obsahují barviva bezpečná. V Evropské unii se barviva značí na obalu potraviny pomocí E-kódu, který je složen z písmena E a trojmístného čísla. Seznam těchto kódů a popis o jakou přidanou látku se jedná, je běžně k nalezení na internetu nebo v odborné literatuře.

Barviva lze rozdělit podle několika kritérií, nejběžnější dělení je podle jejich původu na tři hlavní skupiny:

- barviva přírodní,
- barviva syntetická identická s přírodními,
- barviva syntetická.

Přírodní barviva lze charakterizovat jako přirozenou složku potravin jak živočišného, tak i rostlinného původu ovlivněnou genetickou dispozicí daného organismu nebo jako součást organismů, mezi které se řadí řasy, houby, lišejníky a mikroorganismy, z nichž se pigmenty získávají v původním stavu. Mezi přírodní barviva lze řadit barviva získaná technologickými procesy z přírodních surovin (např. karamel), měďnaté komplexy chlorofylů a chlorofylinů. Tyto komplexy se v přírodě nevyskytují vůbec nebo v zanedbatelném množství. Také anorganické pigmenty patří do skupiny přírodních barviv, např. uhličitan vápenatý a některé oxidy kovů.

Syntetická barviva identická s přírodními mají stejnou strukturu jako barviva přírodní, ale získávají se chemickými reakcemi. Syntetická barviva se vyrábějí z vysoce přečištěných ropných produktů a jejich složení musí obsahovat minimálně 85 % čistého barviva, zbytek představují nečistoty (anorganické soli, sloučeniny kovů a organické látky). Syntetická barviva mají na rozdíl od přírodních barviv sytější barvu, jejíž odstín je stálý a jejich chuť a vůně v potravině není specifická. Jejich uplatnění je vysoké, zejména díky nízké ceně a vyšší stabilitě oproti barvivům přírodním [1, 2].

1.1.1 Klasifikace přírodních barviv

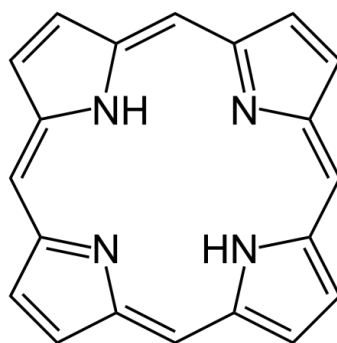
Přírodní barviva se dělí podle několika různých kritérií a to podle struktury, výskytu v biologických materiálech a dalších vlastností jako je např. rozpustnost ve vodě a tucích. Podle struktury lze rozpoznat tyto hlavní skupiny:

- **dusíkaté heterocyklické sloučeniny** - do této skupiny patří barviva odvozená od *pyrrolu*, indolu, isochinolinu, pyrimidinu, purinu, pterinu, flavinu, fenazinu a fenoxazinu. Mezi hlavní zástupce této skupiny patří hemová a *chlorofylová* barviva, melaniny a betakany,
- **kyslíkaté heterocyklické sloučeniny** - tato skupina obsahuje zejména fenolové sloučeniny a hlavním zástupcem jsou flavonoidy a barviva odvozená od isochromenu a xanthonu,
- **fenoly a od nich odvozené chinony** - zahrnují hlavně oligomery a kurkuminoidy,
- **terpenoidy** - sem se řadí karotenoidy, iridoidy a jiná barviva [1].

1.2 Tetrapyrroly

Tetrapyrrolová barviva patří mezi zástupce dusíkatých heterocyklických sloučenin. Nepatří mezi velkou skupinou barviv, ale jejich význam a působnost jsou významné. Struktura těchto barviv obsahuje čtyři pyrrolová jádra, která mohou být uspořádána cyklicky (porfyrinová barviva) nebo lineárně (bilinová barviva). V cyklických tetrapyrrolech jsou pyrrolová jádra spojená pomocí methinových můstků (v poloze α) v tetrapyrrolový neboli porfyrinový kruh. Jak cyklická, tak i lineární barviva obsahují konjugovaný systém dvojných vazeb, který je zodpovědný za barevnost molekuly.

Tato práce je zaměřena na analýzu porfyrinových barviv - chromoforů, které se dělí na dvě základní kategorie metaloproteinů, a to na barviva živočišných tkání, tzv. hemová a barviva rostlinných pletiv, řas a mikroorganismů - chlorofylová. Porfyrinových barviv a jejich prekurzorů je známo 28. Jejich základní struktura je uvedena na obr. 1 [1, 2].



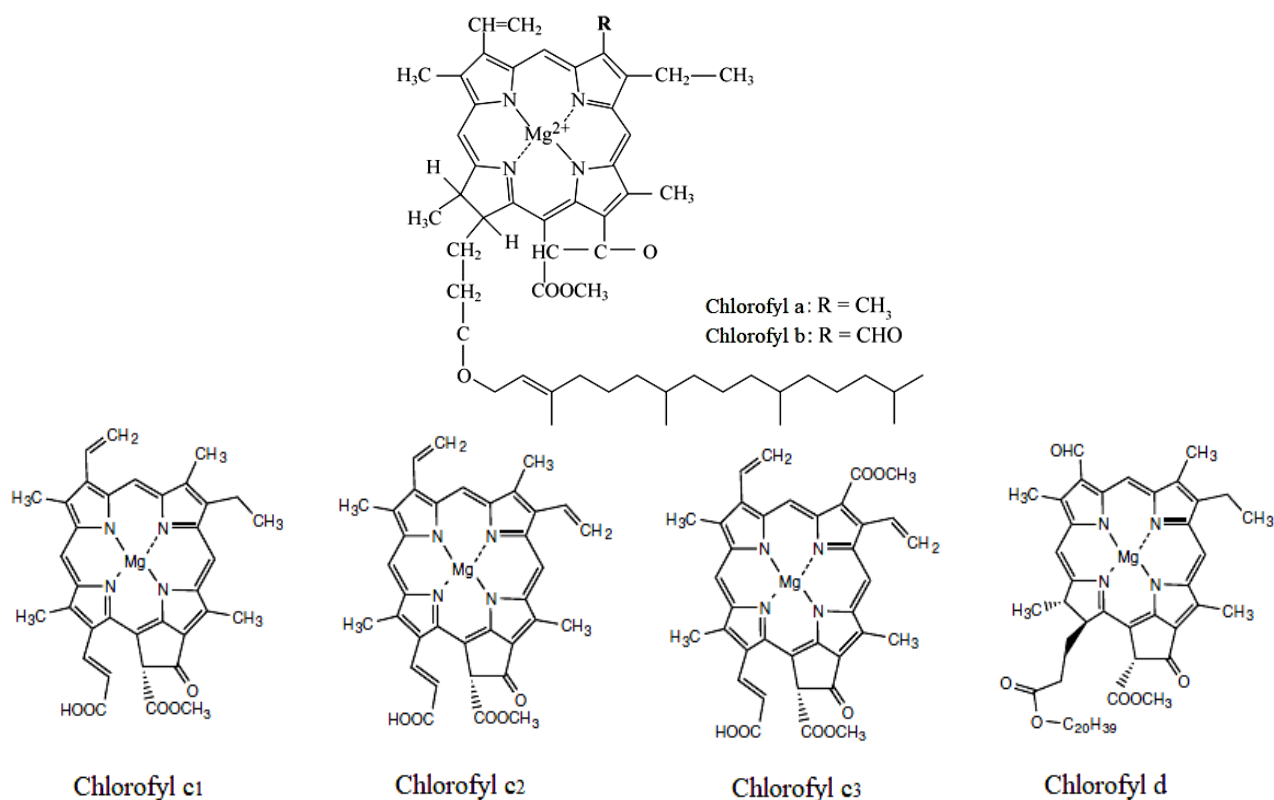
Obrázek 1: Základní struktura porfyrinových barviv [3].

1.2.1 Chlorofyly

Chlorofyl je zelené přírodní barvivo nacházející se ve všech zelených rostlinách, řasách, mechu a některých bakteriích. Chlorofyly se v živých buňkách nacházejí v chloroplastech na membráně tylakoidu. Jeho celková produkce za jeden rok činí asi 1×10^9 tun. Chlorofyl působí jako katalyzátor při jevu zvaném fotosyntéza. Fotosyntéza je jev, při kterém se mění energie světelného záření v energii chemickou. Chlorofyl se nachází ve značném množství zelených rostlin a nejčastějším zdrojem tohoto barviva jsou kopřivy, vojtěšky, tráva a také petrželová nať. Chlorofyl je také součástí lidské stravy, např. ve vinných hroznech, špenátu, a jiných potravinách [1, 4 - 6].

Na trhu se vyskytuje směs zelených barviv rozpustných v tucích, chlorofyly (E 140) a měďnaté komplexy chlorofylů (E 141). Také se vyskytují barviva rozpustná ve vodě, což jsou deriváty chlorofylu - chlorofyliny (E 140) a měďnaté komplexy chlorofylinů (E 141). Existuje šest různých typů chlorofylů, chlorofyly *a* a *b* se vyskytují ve vyšších rostlinách, chlorofyly *c*, *d*, *e* a novější typ *f* se nacházejí v řasách a příbuzné bakteriochlorofyly se vyskytují v bakteriích. Z potravinářského hlediska patří mezi nejvýznamnější chlorofyl *a* a chlorofyl *b*. Jejich přítomnost v rostlinách je přibližně v poměru 3:1. Chlorofyl je tvořen substituovaným tetrapyrrolovým řetězcem s chelátově navázaným centrálním atomem hořčíku ve formě iontu Mg^{2+} . Struktura chlorofylu *a* a *b* s jejich substituenty R je na obrázku 2. Tyto dva typy chlorofylu se liší substituenty na tetrapyrrolovém jádře, chlorofyl *a* má navázanou methylovou ($-CH_3$) skupinu, zatímco chlorofyl *b* aldehydickou ($-CHO$) skupinu. Příklady dalších chlorofylů jsou uvedeny rovněž na obr. 2.

Chlorofyl *a* je těžko získáván z přírodních zdrojů, jedná se o drahý proces a získaný produkt má nízkou stabilitu. Oproti chlorofylu *b*, který je zelený, se liší také zbarvením do modrozelená. Mezi produkty rozkladu a biosyntézy chlorofylu, které jsou také složkami potravin, se řadí feofytiny, chlorofylidy a feoforbid [1, 6 - 11].



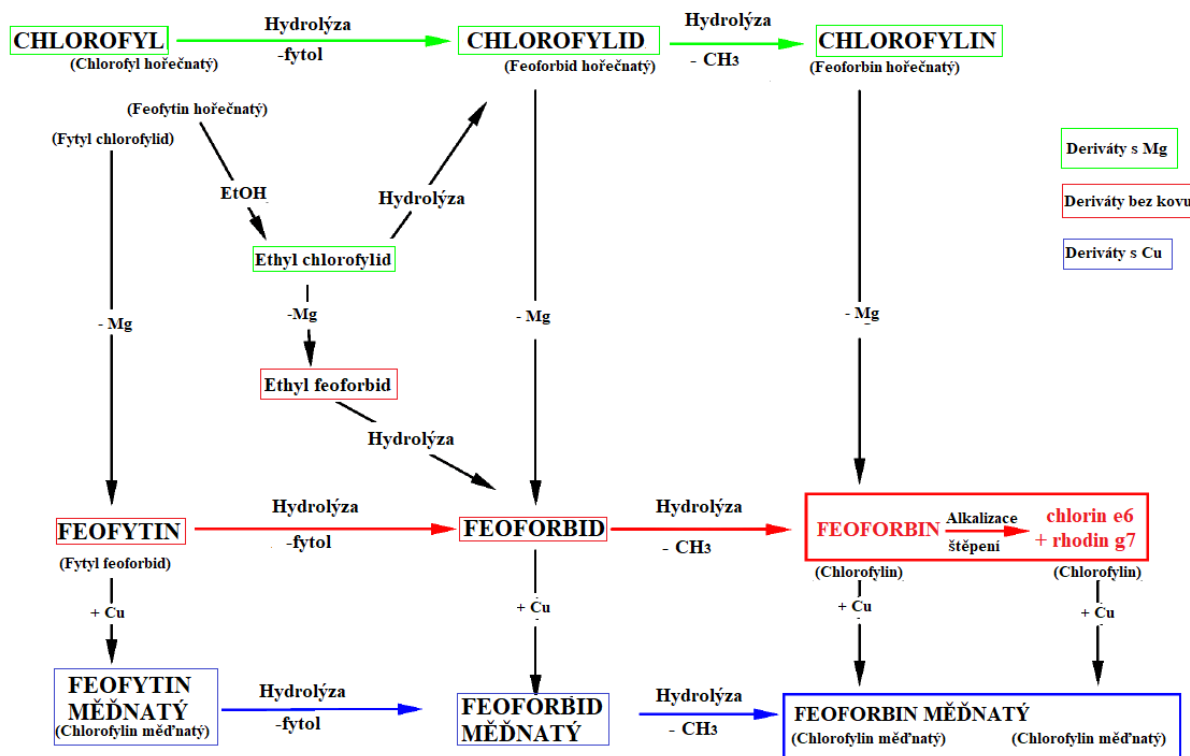
Obrázek 2: Chlorofylová barviva a, b, c₁, c₂, c₃, d [11, 12].

1.2.2 Degradace chlorofylu

K degradaci chlorofylových barviv dochází při většině technologických procesů a při skladování potravin. Degradaci ovlivňuje teplota, světelné a ionizující záření a přítomnost kyselin a enzymů.

V rostlinné tkáni se chlorofyl uvolňuje z bílkovinného komplexu a následně se eliminuje fytyl a popřípadě probíhá feofytinizace. Transformace chlorofylu na feofytiny je jednoduchým procesem, kdy slabé kyseliny postačují k vyvolání ztráty atomů hořčíku z porfyrinových kruhů a umožňují jeho nahrazení vodíkem. Feofytin vykazuje matně hnědou barvu a proto není vhodný jako potravinářské barvivo. Zatímco pokud feofytin tvoří komplex s mědí (Cu²⁺), zinkem (Zn²⁺), niklem (Ni²⁺) nebo železem (Fe³⁺) místo hořčíku (Mg²⁺), tak je tato forma vysoce stabilní s jasně zelenou barvou nebo lehce odlišnou podle použitého kovu. Nejznámějšími komplexy a také v Evropské unii povolenými barvivy jsou mědnaté komplexy chlorofylů a chlorofylinů.

Degradační proces chlorofylu může probíhat také oxidací na chloriny, což vede k produkci bezbarvých produktů. Další reakcí je enzymatická demetalizace, kdy dochází působením enzymu chlorofylázy ke ztrátě fytylové skupiny a chlorofyl je převeden na chlorofylid. Okyselením lze chlorofyl hydrolyzovat až na feoforbidy. Na obr. 3 je vyobrazeno schéma degradace chlorofylu [1, 4, 6, 11, 13 - 15].



Obrázek 3: Degradace chlorofylu [8].

1.2.3 Měďnaté komplexy chlorofylů a chlorofylinů

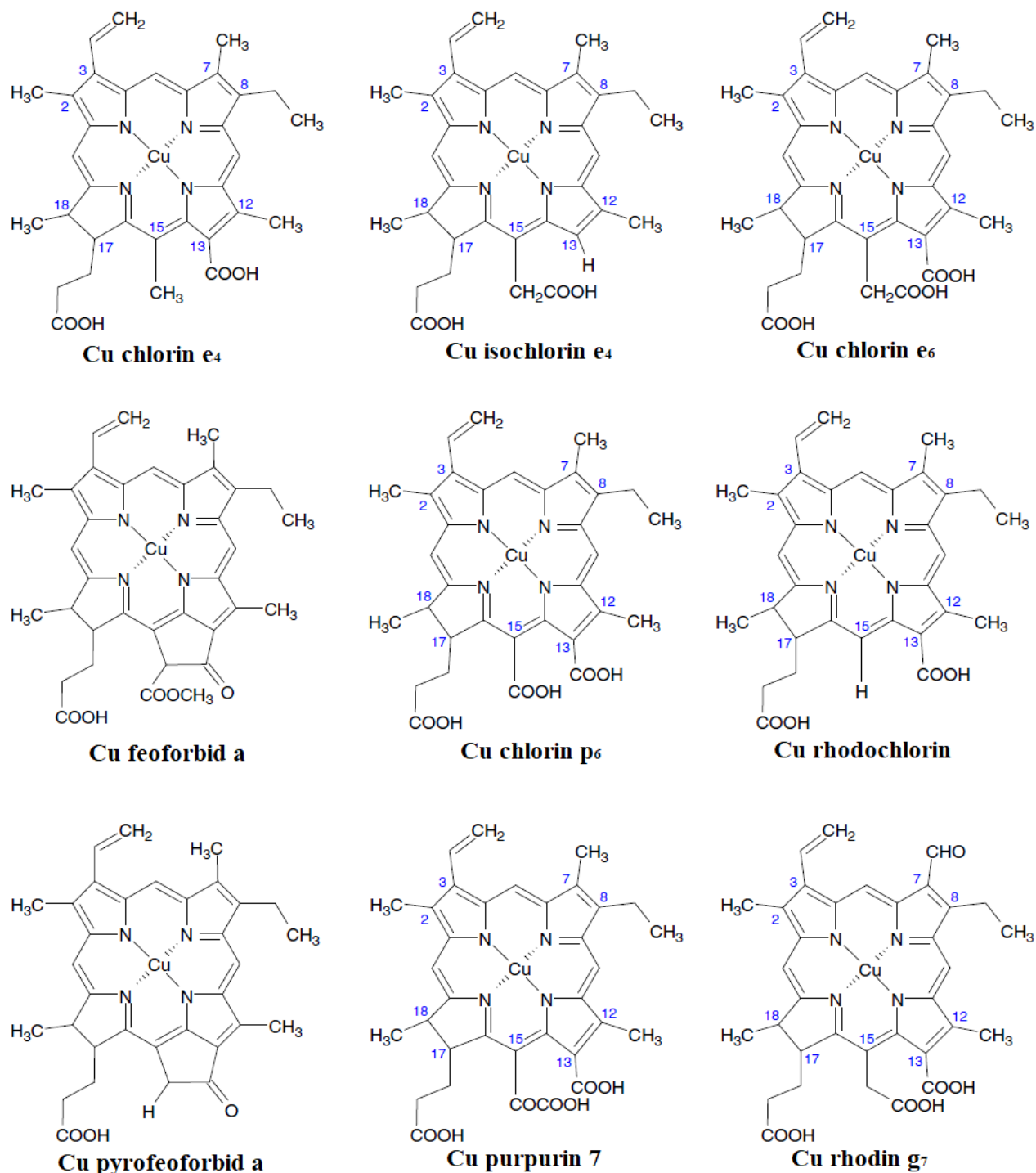
Tyto přírodní komplexy jsou označovány na obalu potravin jako barviva s kódem E 141. Měďnaté chlorofyliny jsou získávány zmýdlením chlorofylu v alkalickém prostředí hydroxidu sodného (NaOH). Tím dojde k otevření isocyklického kruhu, odstranění fytylové skupiny a vzniku sodné soli. Poté je hořečnatý iont nahrazen měďnatým iontem a stává se z něj stabilnější komplex. Komerčně nejznámější sodná sůl měďnatého komplexu chlorofylinu (SCC), se skládá z několika derivátů tohoto komplexu. Mezi tyto deriváty se řadí hlavně Cu(II) feoforbid *a*, Cu(II) chlorin *e*₆, Cu(II) chlorin *e*₄, Cu(II) rhodin *g*₇ [9, 11, 14].

1.2.4 Chloriny

Chloriny jsou deriváty chlorofylu a řadí se mezi základní fotosyntetické pigmenty. Jsou to neutrální, rozměrově velké a vysoce hydrofobní molekuly. Chlorinové deriváty obsahují redukovanou dvojnou vazbu v jedné β-poloze jednoho pyrrolového kruhu. Takováto strukturální modifikace absorbuje záření v modré a červené oblasti UV-VIS spektra okolo hodnot 405 nm a 660 nm. Chloriny mají vyšší absorpční maximum než ostatní molekuly porfyrinového typu, a proto tyto látky nacházejí uplatnění při léčbě rakoviny. Některé chloriny byly schváleny a jsou

přidávány do léků (injekcí), které se používají hlavně při léčení očních vad a nemocí.

Obr. 4 znázorňuje strukturní vzorce chlorinů vyskytujících se hlavně v SCC [16 - 18].



Obrázek 4: Struktury chlorinových bází vyskytujících se převážně v sodné soli měďnatého komplexu chlorofylinu [11].

1.2.5 Využití porfyrinových barviv

Chlorofylová barviva se v potravinářství využívají především k barvení různých druhů těstovin, nápojů (hlavně džusů), sladkostí, polévek, jogurtů a mražených zmrzlin. Dále se chlorofylová barviva nebo jejich degradační produkty (např. feofytiny) přidávají do různých doplňků stravy nebo hubnoucích suplementů jak ve formě prášků, tak i tablet. Podle Hynstové a kol. [19] ve všech zkoumaných vzorcích suplementů (14) převažovalo množství chlorofylu *a* nad chlorofylem *b*, což také odpovídá faktu, že přítomnost těchto barviv v rostlinách je 3:1, jak již bylo zmíněno výše. Tato barviva jsou povolena k dobarvování potravin téměř po celém světě.

Bylo zjištěno, že měďnaté komplexy chlorofylů vykazují antioxidační účinky a chrání buňky před oxidativním stresem a před působením reaktivních sloučenin kyslíku generovaných radiací. Tato potencionální bioaktivita může snížit riziko vzniku několika chronických onemocnění. Mezi další významné účinky při léčbě nemocí patří také antiklastogenní, antimutagenní a antikarcinogenní účinky.

Měďnaté komplexy chlorofylů našly své uplatnění jako přídavek do žvýkaček. Měďnaté komplexy chlorofylů se nelegálně přidávají do olivových olejů kvůli jejich dobarvování a je tedy kladen důraz na kontrolu jejich přítomnosti v těchto olejích. Mnoho spotřebitelů oceňuje tmavě zelenou barvu olivového oleje (hlavně panenských olivových olejů). Olivovníky obsahují zelený pigment rostlin (chlorofyl), který ovlivňuje barvu. Panenské olivové oleje se vyrábějí pouze mechanicky nebo pomocí fyzikálních prostředků, avšak bez použití chemických látek nebo působení tepla. Pro lepší zabarvení oleje se využívá vyšší množství nezralých oliv a přidání listů olivovníku. Měďnatý komplex chlorofylu je stabilnější než chlorofyl vůči působení světla, tepla a dalším oxidačním procesům. Přítomná měď v porfyrinovém kruhu ovlivňuje elektroforetickou mobilitu a následnou separaci přírodních a měďnatých chlorofylů ve směsi. Další uplatnění nacházejí chlorofylová barviva v kosmetickém průmyslu [1, 16, 19, 20].

1.3 Elektromigrační techniky

1.3.1 Kapilární elektroforéza (CE)

Kapilární elektroforéza je jednou z elektromigračních separačních technik, pro které je charakteristický pohyb vzorku separačním prostorem (kapilárou). Působením stejnosměrného elektrického pole dochází k vzájemné separaci nabitých částic vzorku v závislosti na jejich rozdílné pohyblivosti. Jestliže částici nesoucí náboj Q ovlivňuje elektrické pole o určité intenzitě E , tak na ni působí síla F_1 , která uvede částici do pohybu. Vůči této síle stojí odpor prostředí, který je označen jako síla F_2 a ta je přímo úměrná rychlosti náboje. Směr působení síly F_1 na částici ovlivňuje znaménko náboje, proto se kationty pohybují směrem k záporně nabitě elektrodě (katodě) a anionty ke kladně nabitě elektrodě (anodě). Pokud dojde ke stavu, kdy jsou obě síly v rovnováze, lze dopočítat ze známých údajů rychlost částice [21 - 23]:

$$F_1 = Q \cdot E \quad (1)$$

$$F_2 = -6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r \cdot v = -k \cdot v \quad (2)$$

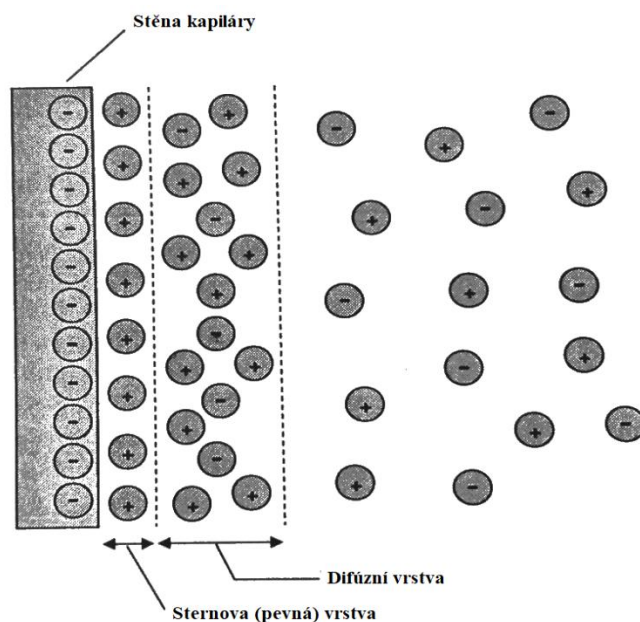
$$v = \frac{Q}{k} \cdot E = \mu \cdot E = \mu \cdot \frac{U}{l} \quad (3)$$

kde: Q = náboj, E = intenzita elektrického pole, η = dynamická viskozita, r = poloměr iontu, k = konstanta, v = elektroforetická rychlost, μ = elektroforetická pohyblivost, U = napětí, l = délka kapiláry.

Důležitým jevem kapilární elektroforézy je objemový tok kapaliny kapilárou, který se nazývá elektroosmotický tok (EOF). V kapilární elektroforéze se nejčastěji používá kapilára z taveného oxidu křemičitého, povrch vnitřku této kapiláry obsahuje ionizovatelné silanolové skupiny (-SiOH), které jsou v kontaktu s používaným pufrům. Tyto silanolové skupiny jsou snadno disociovatelné, čímž stěna kapiláry získá negativní náboj. Proto, když je kapilára naplněna pufrům přitahuje záporně nabitá stěna kapiláry pozitivně nabitě ionty pufru. Tímto vzniká elektrická dvojvrstva, která tvoří u stěny kapiláry elektrokinetický potenciál (ζ - zeta potenciál). Tento proces popisuje Sternův model elektrické dvojvrstvy (obr. 5).

Když je na kapiláru aplikováno napětí, kationty v difúzní vrstvě migrují směrem ke katodě a vlivem tření se pohybuje také celý obsah kapiláry. Elektroosmotický tok je hlavně ovlivňován pH pufru. Při pH větší než 9 jsou silanolové skupiny kompletně disociovány a elektroosmotický tok je největší. Zatímco při pH nižším než 4 je elektroosmotický tok nevýznamný, jelikož ionizace silanolových skupin je velmi malá.

Data získaná pomocí kapilární elektroforézy znázorňuje elektroforegram, což je graf, který popisuje závislost detekční odezvy na migračním čase. Běžný elektroforegram ilustruje to, že nejkratší migrační časy mají kationty, potom neutrální látky a nejdelší čas odpovídá aniontům. Toto se ovšem u některých elektroforetických metod liší [24 - 26].



Obrázek 5: Sternův model elektrické dvojvrstvy [24].

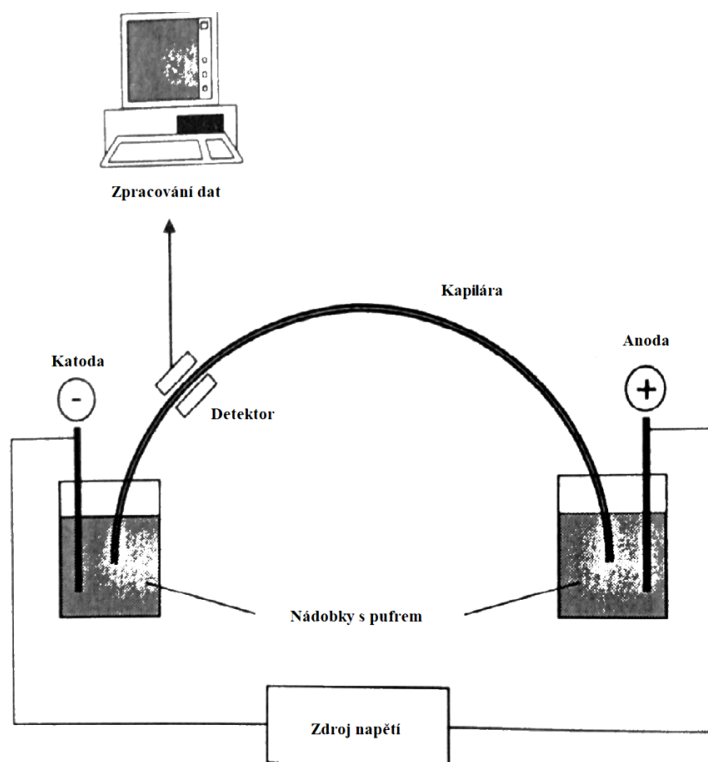
1.3.2 Kapilární zónová elektroforéza (CZE)

Kapilární zónová elektroforéza patří mezi nejuniverzálnější a nejoblíbenější elektroforetické metody. Vzorek je nadávkován do separačního prostředí, které tvoří kapilára naplněná vhodným základním elektrolytem (BGE). Separace je založena na migraci elektricky nabitých látek (molekuly, ionty) v kapiláře, na níž je vkládáno napětí (± 30 kV). Během migrace dochází k separaci jednotlivých komponent analytu a dělí se do jednotlivých zón [21, 23, 27].

Kapiláry bývají nejčastěji zhotoveny z křemene a kvůli zvýšení mechanické odolnosti bývají z vnějšku pokryty vrstvou polyimidu. Průměr kapiláry bývá zpravidla $50 - 100 \mu\text{m}$ a její délka v rozmezí $20 - 100$ cm. Během analýzy jsou oba konce kapiláry ponořeny do elektroforetických nádobek se základním elektrolytem. Dávkovaný objem vzorku je v jednotkách nl. Vzorek lze na vstupní konec kapiláry dávkovat tlakem (hydrodynamicky) nebo napětím (elektrokineticky). Dávkování tlakem je opakovatelnější a používá se častěji než dávkování napětím. K detekci může docházet buď v kapiláře, nebo za kapilárou. Pokud je měrná cela detektoru součástí separační kapiláry, tak je třeba z kapiláry odstranit ochrannou vrstvu polyimidu, aby mohl paprsek ze zdroje projít přes kapiláru s roztokem na detektor. Mezi nepoužívanější detektor patří

spektrofotometrický UV/VIS detektor. Dalšími dostupnými detektory jsou fluorescenční, vodivostní nebo hmotnostní.

Mezi výhody kapilární zónové elektroforézy patří vysoká separační účinnost, nízké hodnoty meze detekce, rychlost analýzy a malá spotřeba vzorku a elektrolytu. Následující obr. 6 graficky popisuje základní schéma přístroje používaného pro kapilární zónovou elektroforézu [21, 23 - 25, 28, 29].



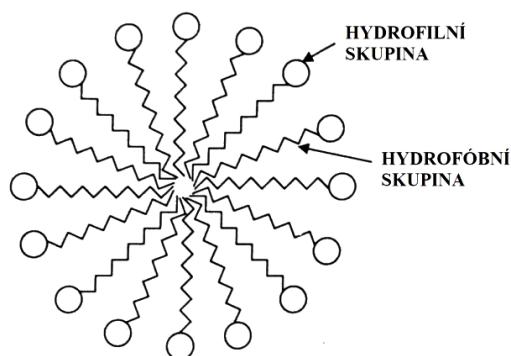
Obrázek 6: Základní schéma přístroje CZE [24].

1.3.3 Micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC)

Během posledních let je micelární elektrokinetická chromatografie řazena mezi přijatelné a spolehlivé analytické metody a je používána pro velké množství látek v rutinní analýze. Tato metoda je považována za jednu z nejmladších elektromigračních metod a byla poprvé představena profesorem S. Terabem a jeho spolupracovníky během roku 1984 [30]. MEKC využívá při separaci dvou jevů. Prvním jevem je elektroforéza a elektroosmóza pod souhrnným názvem elektrokinetický jev a mezi druhý patří princip chromatografie. Micelární elektrokinetická chromatografie se využívá nejen pro analýzu neutrálních látek, ale také pro analyty obsahující náboj. K separaci dochází na základě rozdílné distribuce analytu mezi dvě

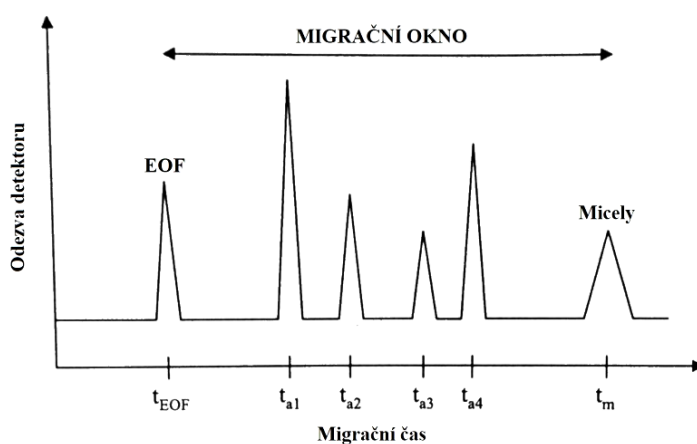
fáze – micelární a základní elektrolyt (BGE). Látky, které silněji interagují s micelami, mají vyšší retenční (migrační) čas oproti látkám, jejichž interakce s micelami jsou slabší.

Přidáním tenzidu (povrchově aktivní látky) do základního elektrolytu o koncentraci vyšší než je kritická micelární koncentrace (CMC) daného tenzidu, dochází ke shlukování tenzidu do micel. Tenzidy jsou látky, které vykazují jak hydrofobní, tak i hydrofilní charakter. Hydrofobní (nepolární) část molekuly je tvořena alkylovým řetězcem a tato část je směřována do středu micely. Hydrofilní (polární) část tenzidu je tvořena funkční skupinou, která může nést náboj, a je na povrchu micely. Na obr. 7 je zobrazena struktura micely.



Obrázek 7: Struktura micely [24].

Nejčastěji používanou povrchově aktivní látkou v MEKC je dodecylsírán sodný (SDS). Micely SDS mají záporný náboj a migrují v opačném směru než elektroosmotický tok (EOF) a to směrem k anodě (+). Z obr. 8 je patrné, že nejdříve na detektor doputují malé neutrální látky, které se v micely nezadržují (např. thiomocovina) a určují tak migrační čas EOF = t_0 . Jako poslední na detektor doputují micely (migrační čas micel = t_m). Mezi těmito dvěma časy se vyskytuje tzv. migrační okno, ve kterém migrují všechny ostatní látky vyskytující se ve vzorku.



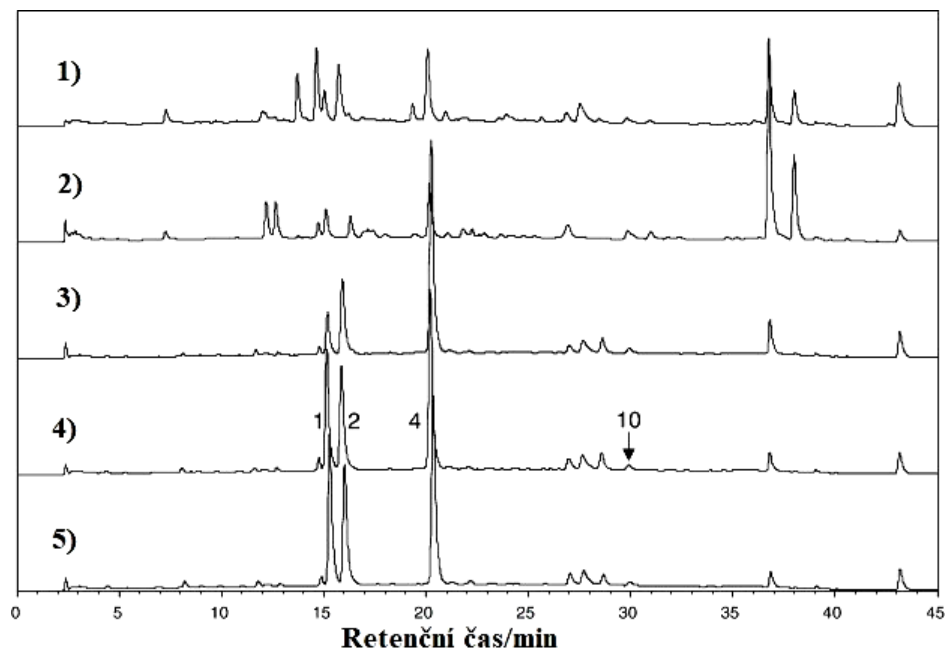
Obrázek 8: Migrační okno [24].

Mezi další známé surfaktanty používané v MEKC patří dodecylsulfonan sodný, dodecyltrimethylammonium bromid (DTAB), cholát sodný nebo směsi neionogenních látek. V MEKC se kromě micel přidávají do roztoku i jiné látky jako např. cyklodextriny (CD) a jejich deriváty. Po přidavku CD do základního elektrolytu probíhá tzv. chirální separace. Cyklodextriny jsou cyklické oligosacharidy tvořené buď šesti (α -CD), sedmi (β -CD) nebo osmi podjednotkami glukózy (γ -CD) a mají několik center chiralit. CD jsou neutrální látky, které v CZE po vzniku komplexu s nabitými enantiomery snižují migrační rychlosti látek. V MEKC se CD obvykle používají v kombinaci s anionickými SDS micelami a dochází k jejich solubilizaci. Proto enantiomery, které tvoří stabilnější komplex s CD, se ve větší míře solubilizují SDS micelami a migrují pomaleji [24, 28, 30 - 35].

1.4 Analýza porfyrinových barviv

Analýza porfyrinových barviv je prováděna nejčastěji pomocí HPLC, HPLC-MS, v menší míře také pomocí kapilární elektroforézy. Kapalinová chromatografie probíhá buď v systému s normálními fázemi (NP-HPLC), nebo obrácenými (RP-HPLC). Jedna studie [4] zkoumala pět komerčně dostupných vzorků sodné soli chlorofylinu (SCC) od různých firem. Mezi tyto firmy patří LKT Laboratories, Inc. z Minnesoty (1), ABCR GmbH & Co. KG z Německa (2), Sigma-Aldrich Denmark A/S z Dánska (3), Indofine Chemical Company, Inc. z New Jersey (4) a Wako Pure Chemical Industries, Ltd. z Německa (5). Pro stanovení látek vyskytujících se v SCC byly využity standardy měďnatých chlorinů (Cu chlorin e_6 , e_4 , Cu isochlorin e_4 , Cu pylochorin, Cu feoforbid a , Cu pyrofeoforbid a , chlorin p_6) pocházejí z firmy Frontier Scientific, Inc. (UK). K detekci byly použity dva typy detektorů, detektor s diodovým polem a hmotnostní spektrometr s chemickou ionizací (APCI) a ionizací elektrosprejem (ESI). Kolona YMC (C₃₀, 3 μ m, 250 x 4,6 mm) byla vyhřátá na 30 °C. Jako mobilní fáze byly zvoleny: A: methanol:voda:kyselina octová (90:10:0,5) a B: terc-butyl methylether:methanol:kyselina octová (100:10:0,5). Průtok mobilní fáze byl používán 1,1 ml/min. Koncentrační gradient byl stanoven pro čtyři analýzy takto: 0-50% B (po dobu analýzy 30 min), 50-100% B (10 min), 100% B (5 min) a 100-0% B (5 min). Analyzované vzorky (celkem 5) o koncentraci 2,5 mg/l byly rozpuštěny v methanolu a před nadávkováním přefiltrovány. Pro detekci s diodovým polem bylo dávkováno 10 μ l avšak pro hmotnostní spektrometr 100 μ l.

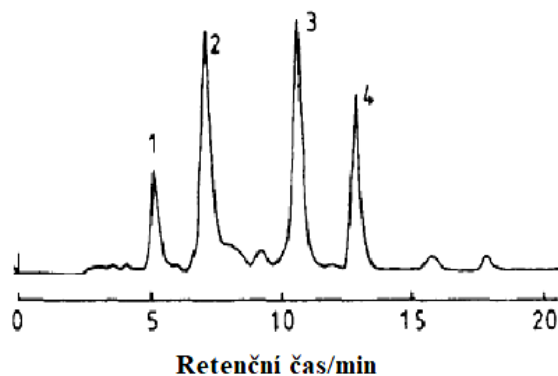
Mezi naměřenými chromatogramy jednotlivých vzorků (obr. 9) byly jasné rozdíly. Chromatogramy vzorku 4 a 5 jsou podobné, jelikož oba mají charakteristický pík s velkou odezvou okolo 20. min. Ve vzorku 3 je také dominantní pík kolem 20. minuty, ale od předchozích se liší minoritními látkami. U ostatních vzorků se jejich složení výrazněji liší. Pomocí MS bylo určeno složení SCC vzorků a také pomocí standardů identifikovány jednotlivé píky. U vzorků 1, 3 a 5 nebyla prokázána velká degradace během měření a nejčastěji se v nich vyskytovaly Cu chlorin e_6 , Cu chlorin p_6 a isochlorin e_4 . Vzorky 2 a 4 byly během analýzy více degradovány a proto jejich komplex obsahoval větší množství porfyrinů. Pouze jeden ze všech pěti vzorků obsahoval Cu rhodin.



Obrázek 9: Záznamy jednotlivých vzorků SCC [4].

Autor [14] se ve studii z roku 1944 zajímal jak o přípravu čisté SCC pomocí semi-preparativní HPLC, tak i o rychlé a přesné stanovení každé složky SCC pomocí analytické HPLC. Pro semi-preparativní HPLC byla používána kolona Develosil ODS (10 μm sférický oktadecyl silikagel, 25 cm x 3 cm I. D.) se smyčkovým dávkovačem (0,59 ml). Analytická HPLC byla realizována na koloně Inertsil ODS-2 (5 μm sférický ODS, 250 mm x 4,6 mm I. D.) a byl také použit injektor s dávkovací smyčkou (20 μl). Teplota kolony byla nastavena na 35 °C. Mobilní fází byl methanol-voda (97:3) s přidavkem 1 % kyseliny octové. Průtok mobilní fáze byl 1,4 ml/min a vstupní tlak 5-10 MPa v závislosti na zvolené mobilní fázi. Analyty byly nejčastěji detekovány pomocí spektrofotometru při vlnové délce 407 nebo 423 nm a hmotnostní spektra byla měřena spektrometrem s ionizací pomocí bombardování rychlými atomy. Byly připraveny zásobní roztoky 50 $\mu\text{g/ml}$ standardů měďnatého chlorofylinu, utěsněny a skladovány v temnu při teplotě 5 °C. Vzorky komerčně dostupných měďnatých chlorofylinů sodné soli byly připraveny z 30 mg této soli, které byly rozpuštěny v 40 ml destilované vody, pH bylo upraveno pomocí HCl. Poté byl tento roztok extrahován 40 ml diethyletheru. Všechny roztoky vzorků byly před dávkováním filtrovány. Obr. 10 znázorňuje separaci SCC s UV detekcí při 423 nm, tento chromatogram obsahuje čtyři rozlišitelné píky, které byly určeny jako rhodin g_7 , chlorin e_6 , chlorin e_4 a feoforbid a , v tomto pořadí. Bylo zjištěno, že retenční časy chlorofylinu měďnatého se snižují s rostoucím počtem karboxylových skupin, protože navázaná karboxylová skupina na porfyrinovém kruhu umožňuje větší interakci s mobilní fází. Pomocí hmotnostní spektrometrie

byly ve vzorku určeny hlavně molekulární ionty M^+ chlorinu e_6 ($657 \Rightarrow M^+$, 45%) a chlorinu e_4 ($613 \Rightarrow M^+$, 65%).



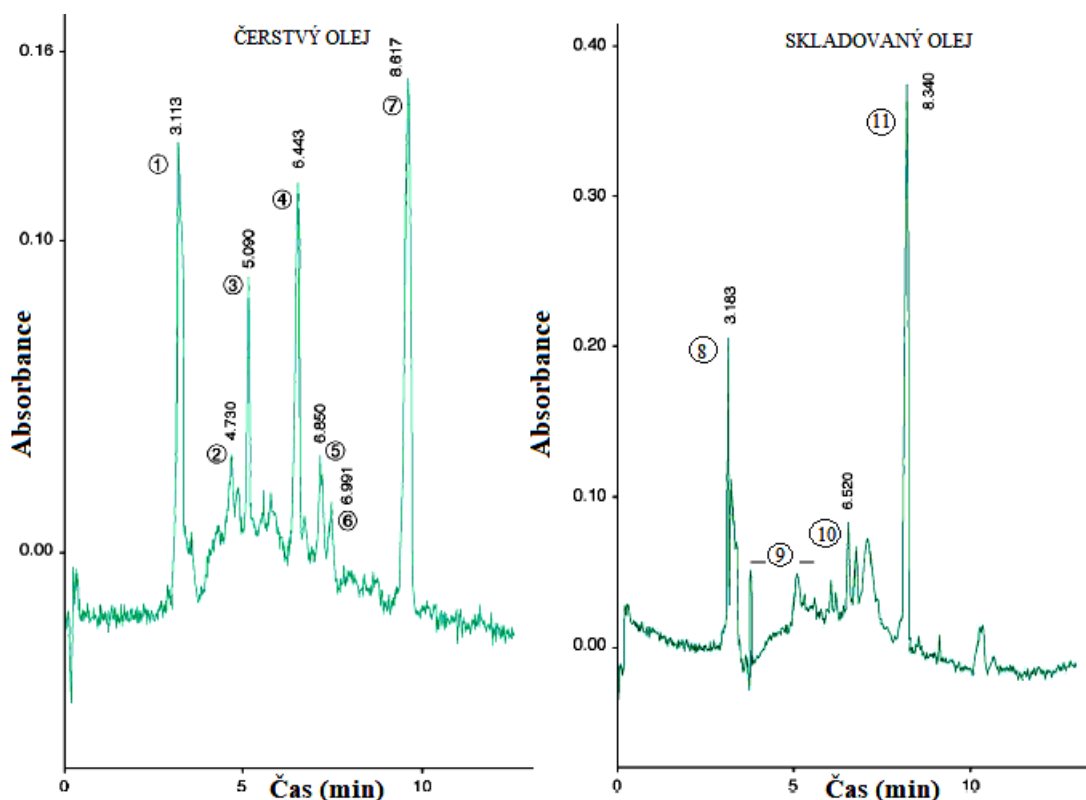
Obrázek 10: Retenční časy jednotlivých složek vzorku SCC [14].

V třetí práci [36] je popsána separace chlorofylu c_1 , c_2 a jejich demetalizovaných forem z čerstvých hnědých řas (*Undula pinnatifida* z Japonska) pomocí micelární elektrokinetické chromatografie. Pigmenty z těchto řas byly extrahovány acetonem, tento extrakt byl protřepán s petroletherem a nasyceným roztokem chloridu sodného kvůli odstranění karotenoidů a chlorofylu a . Chlorofyl c byl převeden z vodné fáze do ethylacetátu a přečištěn na koloně s oktadecylsilikagelem jako stacionární fází v použité mobilní fázi methanol:voda (90:10). Směs chlorofylu c_1 a c_2 byla získána po odstranění rozpouštědla z eluátu a rozdělena pomocí RP-HPLC na chlorofyl c_1 a chlorofyl c_2 . Demetalizací těchto chlorofylů působením 1M HCl byly získány feoporfyrin c_1 a feoporfyrin c_2 .

Pro micelární elektrokinetickou chromatografii byl používán přístroj Jasco Model CE-800 CZE system vybaven kapilárou z taveného křemene (70 cm x 50 μm I. D. x 375 μm O. D.). Do elektrolytu připraveného z 20 mM N-cyklohexyl-3-aminopropansulfonové kyseliny (CAPS) a 17 mM NaOH o pH 11 byl přidán SDS a dimethylformamid (DMF) pro tvorbu micel. Napětí vložené na kapiláru mělo hodnotu 30 kV a teplota byla 25 °C. Látky byly detekovány při 430 nm. Vlivem SDS v roztoku elektrolytu dochází k tomu, že všechny zkoumané látky jsou detekovány v podobném čase a nelze je pořádně separovat. Přídavek DMF k elektrolytu s SDS způsobuje lepší rozdělení.

V další práci [20] autoři separovali měďnatý chlorofyl od přírodního chlorofylu a zkoumali přítomnost měďnatého chlorofylu v olivovém oleji pomocí kapilární zónové elektroforézy s LiF (laserem indukovanou) detekcí při 488 nm. Bylo zkoumáno 15 vzorků panenských olivových olejů a 15 vzorků rafinovaných olivových olejů, všechny pocházely z Itálie a byly před analýzou

extrahovány. Standardy SCC a chlorofylu *a*, *b* izolované ze špenátu pocházely z Sigma-Aldrich. Standardy byly připraveny v koncentraci 1000 mg/l v 80:20 aceton/voda. Vzorky byly proměřovány v základním elektrolytu složeného z borátového pufru (koncentrace 25 mM, pH 8,6). Měření probíhalo v kapiláře o průměru 75 μ m a celkové délce 50 cm. Ta byla před začátkem analýzy promyta 0,1M NaOH a před každou analýzou pufrům. Bylo používáno hydrodynamické dávkování (15 s), napětí 30 kV a teplota 25 $^{\circ}$ C po dobu měření 15 min. Zvolený detektor LiF umožňuje 1000x vyšší citlivost vzhledem k přírodní fluorescenci chlorofylu. Vzorky olejů byly analyzovány před a po přidání 10 μ l SCC pro každý vzorek (čerstvý) 3x a také po několika dnech. V čerstvých zkoumaných vzorcích olivových olejů byl SCC spolehlivě oddělen od přírodních chlorofylů *a*, *b* a také od několika degradačních produktů (feofytin *a*, *b*). Měření vzorku po několika dnech skladování obsahovalo největší množství SCC, šlo snadno oddělit chlorofyl *a*, *b*, avšak degradační produkty bylo složitější rozeznat (obr. 11).



1 - chlorofyl b, 2 - feofytin b, 3 - feofytin b1, 4 - chlorofylin a, 5 - feofytin a, 6 - feofytin a1, 7 - SCC
 8 - chlorofyl b, 9 - degradační produkty, 10 - chlorofyl a, 11 - SCC

Obrázek 11: Chromatogramy vzorku čerstvého a skladovaného oleje s přidavkem SCC [20].

Další studie [16] popisuje separaci několika fotosyntetických pigmentů – chlorofylů a jejich derivátů a karotenoidů pomocí několika metod kapilární elektroforézy. Mezi používané metody se řadí MEKC, kapilární elektrokinetická chromatografie (CEKC) a kapilární elektroforéza

v nevodném prostředí (NACE). Využívaly se kapiláry s povlakem stěny polymerem i bez povlaku o průměru 75 μm , celkové délce 57 cm a efektivní délce 50 cm. K detekci byl používán detektor s diodovým polem. Kapilára byla vytemperována na teplotu 25°C a byla promývána několik minut těmito roztoky: 1 M NaOH, MeOH a BGE. Vzorke pigmentů (β -karoten, lutein a astaxantin z karotenoidů a chlorofyl *a*, *b*, methylester pyrofeoforbidu *a* a ethylester methylpyroporfyriu *XXI* z chlorofylových derivátů) byly rozpuštěny v MeOH v koncentračním rozmezí 0,1 – 1 mM. Jako BGE byl připraven 10 mM pufr (pH = 11) fosforečnanu sodného s přídatkem 50% tetrahydrofuranu. Poté k němu byly přidávány různé koncentrace SDS, hyaminu, chloridu benzyldimethyltetradecylamonného (BDMTDA), bromidu cetyltrimethylamonného (CTAB) a chloridu trikaprylmethylamonného (Aliquat 336). Nejlepších výsledků bylo dosaženo pomocí metody NACE, kdy v BGE s přídatkem MeOH:ACN:THF (5:4:1) a 10 mM Aliquat 336 byly všechny pigmenty odděleny a snadno identifikovány kromě chlorofylu *a*. Chlorofyl *a* byl nejlépe separován pomocí CEKC v BGE s 20 mM Aliquat 336, ale všechny píky se vyskytovaly v podobném čase.

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Použitá zařízení

Pro analýzy byla použita kapilární elektroforéza Agilent CE 7100 (Agilent, Palo Alto, CA, USA) s UV-VIS detektorem. Toto zařízení je vybaveno autosamplermem s padesáti pozicemi pro elektroforetické nádoby, kazetou s vhodnou kapilárou a zdrojem vysokého napětí. Propojením elektroforézy s počítačem bylo možné pomocí programu ChemStation Edition nastavit podmínky jednotlivých metod, sekvencí, spustit analýzu a vyhodnocovat naměřené výsledky. Na obr. 12 je vyfocen používaný přístroj.

Chemikálie pro přípravu roztoků byly navažovány na analytických váhách Sartorius A200S (GMBH Göttingen, Německo). Pro úplné rozpouštění chemikálií byla použita ultrazvuková lázeň Bandelin electronic RK 100 (Berlín, Německo). Hodnoty pH používaných pufrů byly upravovány pomocí pH metru Orion (Boston, USA).



Obrázek 12: Kapilární elektroforéza Agilent CE 7100.

2.2 Seznam použitých chemikálií

| | |
|---|---------------------------------|
| (2-hydroxypropyl)- β -cyklodextrin (HPBC) (Mr ~ 1380 g/mol) | Fluka Chemika, Buchs, Švýcarsko |
| (2-hydroxypropyl)- γ -cyklodextrin (HPGC) (Mr ~ 1580 g/mol) | Fluka Chemika, Buchs, Švýcarsko |

| | |
|---|---|
| β-cyklodextrin 98% (Mr = 1134,98 g/mol) | Sigma-Aldrich, Německo |
| γ-cyklodextrin 98% (Mr = 1297,14 g/mol) | Fluka Chemika, Švýcarsko |
| Acetonitril LC-MS Chromasolv (Mr = 41,05 g/mol) | Honeywell, Německo |
| Decylsírán sodný 99% (Mr= 260,33 g/mol) | Fluka analytical, Sigma-Aldrich, Švýcarsko |
| Deionizovaná voda (Mr = 18 g/mol) | čistěná pomocí zařízení Milli-Q Reference Merck, Německo |
| Dihydrogenfosforečnan draselný 99% (Mr = 136,09 g/mol) | Fluka Chemika, Buchs, Švýcarsko |
| Dihydrogenfosforečnan sodný mohohydrát 99,6% (Mr = 137,99 g/mol) | J. T. Baker, USA |
| Dodecylsírán sodný 98% (Mr = 288,38 g/mol) | Sigma, Německo |
| Hydrogenfosforečnan didraselný trihydrát 95% (Mr = 228,22 g/mol) | Fluka Biochemika, Německo |
| Hydrogenfosforečnan disodný dihydrát 99,5% (Mr = 177,99 g/mol) | Sigma-Aldrich, Německo |
| Chlorid hořečnatý hexahydrát (Mr = 203,31 g/mol) | Penta, Chrudim, ČR |
| Chlorid měďnatý dihydrát (Mr = 170,48 g/mol) | Penta, Chrudim, ČR |
| Kyselina boritá (Mr = 61,83 g/mol) | Merck, Německo |

Kyselina o-fosforečná 85%

Penta, Praha, ČR

(Mr = 98,00 g/mol)

Methanol LC-MS Chromasolv

Sigma Aldrich, Německo

(Mr = 32,04 g/mol)

Tetraboritan sodný dekahydrát

Sigma-Aldrich, Japonsko

99,5 – 105,0% (Mr = 381,37 g/mol)

Thiomočovina

Lachema, Brno, ČR

(Mr = 76,125 g/mol)

Síran zinečnatý heptahydrát

Penta, Chrudim, ČR

(Mr = 287,54 g/mol)

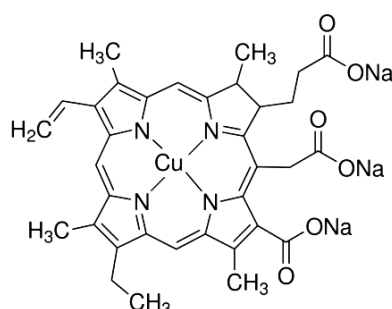
VZOREK:

Sodná sůl měďnatého komplexu

Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA

chlorofylinu - SCC (Mr = 724,15 g/mol)

Na obr. 13 se nachází vzorec používaného SCC.



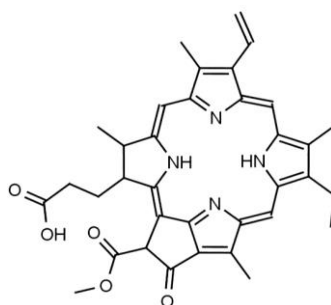
Obrázek 13: Vzorec sodné soli měďnatého komplexu chlorofylinu [37].

STANDARDY:

Feoforbid *a* (Mr = 592,69 g/mol)

Frontier Scientific, USA

Na obr. 14 je vzorec feoforbidu *a*.

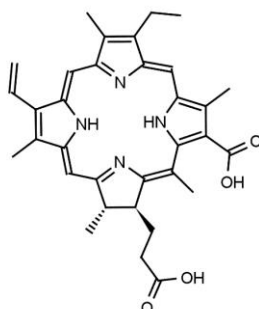


Obrázek 14: Vzorec feoforbidu *a* [38].

Chlorin e_4 (Mr = 552, 663 g/mol)

Frontier Scientific, USA

Na obr. 15 je vzorec chlorinu e_4 .

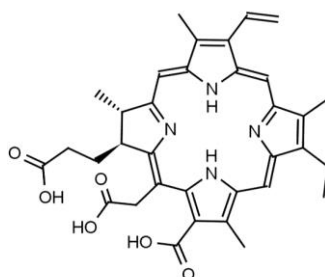


Obrázek 15: Vzorec chlorinu e_4 [38].

Chlorin e_6 (Mr = 596,673 g/mol)

Frontier Scientific, USA

Na obr. 16 je vzorec chlorinu e_6 .

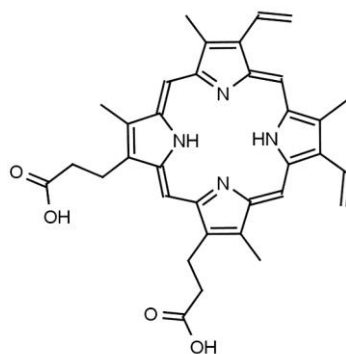


Obrázek 16: Vzorec chlorinu e_6 [38].

Protoporfyriin IX (Mr = 562,66 g/mol)

Frontier Scientific, USA

Na obr. 17 je vzorec protoporyfrinu IX.



Obrázek 17: Vzorec protoporyfrinu IX [38].

2.3 Pracovní postup

2.3.1 Příprava kapiláry

Experimentální měření probíhalo v křemenné kapiláře potažené tenkou vrstvou polyimidu (Agilent Technologies, USA). Pro prvotní měření byla použita kapilára o průměru 50 μm , celkové délce 50 cm a efektivní délce (od začátku po detekční okénko) 42 cm. Následně byla používána kapilára o průměru 75 μm , celkové délce 50 cm a efektivní délce 42 cm.

Příprava kapiláry probíhala následovně: nejprve byla pomocí keramického nože uříznuta potřebná délka kapiláry, v místě detekčního okénka byla opálena vrstva polyimidu a její zbytky byly vyčištěny denaturovaným ethanolem. Takto připravená kapilára byla uchycena do kazety, poté byly seříznuty oba konce kapiláry (vstupní i výstupní) na vhodnou délku, opáleny a očištěny.

2.3.2 Proplach kapiláry

Před každou novou sekvencí byla kapilára promývána 0,1 M roztokem NaOH po dobu 5 minut tlakem 935 mbar a následně deionizovanou vodou také 5 minut. Před každou analýzou se kapilára promývala pomocí základního elektrolytu.

2.3.3 Příprava základního elektrolytu (BGE)

Vzhledem k tomu, že byla prováděna optimalizace separačních podmínek, bylo připravováno několik různých základních elektrolytů, složení nejdůležitějších elektrolytů je shrnuto v tab. 1 a 2. Základní elektrolyt byl tvořen boritanovým a fosforečnanovým pufrům, ke kterému byly přidávány další složky, např. SDS, SDeS, acetonitril, methanol. Byl studován i vliv přídavku Zn^{2+} a Mg^{2+} iontu do BGE. Tyto ionty se přidávaly kvůli odstranění měďnatého iontu z molekuly SCC. Takto připravené elektrolyty byly odpipetovány vždy po 1,5 ml pro každý BGE do tří elektroforetických nádobek. Některé elektrolyty nejsou v tabulce zahrnuty, ale jsou zmíněny v kapitole 3.3, protože nebylo dosaženo separace/migrace látek přes detektor v čase analýzy.

Tabulka 1: Složení nejdůležitějších používaných elektrolytů složených z boritanového pufru a přísad.

| | | | | PŘÍDAVEK | | |
|------------|------------|--------|----|-------------|------------------|--|
| ELEKTROLYT | PUFR | c (mM) | pH | 1 | 2 | |
| 1 | boritanový | 25 | 7 | | | |
| 2 | | | 8 | | | |
| 3 | | | 9 | | | |
| 4 | | | | | | |
| 5 | | | | SDS (8 mM) | 10 % ACN | |
| 6 | | | | | 1 mM β -CD | |
| 7 | | | | | | |
| 8 | | | | SDS (20 mM) | 10 % ACN | |
| 9 | | | | | 1 mM β -CD | |
| 10 | | | | | | |
| 11 | | | | SDS (50 mM) | 10 % ACN | |
| 12 | | | | | 1 mM β -CD | |

Tabulka 2: Složení nejdůležitějších používaných elektrolytů složených z fosforečnanového pufru a přísad.

| | | | | PŘÍDAVEK | | | |
|------------|------------------------------|--------|----|----------------|---------------|--|----------|
| ELEKTROLYT | PUFR | c (mM) | pH | 1 | 2 | | |
| 13 | fosforečnanový (sodný) | 10 | 6 | SDS (20 mM) | | | |
| 14 | | | 7 | | | | |
| 15 | | | 8 | | | | |
| 16 | fosforečnanový (draselný) | | 6 | | SDS (5 mM) | | |
| 17 | | | 7 | | | | |
| 18 | | | 8 | | | | |
| 19 | | | | | | | |
| 20 | | | | | | | 10 % ACN |
| 21 | | | | | | | 1mM β-CD |
| 22 | | | | | | | |
| 23 | | | | | | | |
| 24 | | | | | | | |
| 25 | | | | | | | |
| 26 | | | | | | | |
| 27 | | | | | | | |
| 28 | | | | | | | |
| 29 | | | | | | | |
| 30 | | | | | | | |
| 31 | | | | | | | |
| 32 | | | | | | | |
| 33 | | | | | | | |
| 34 | | | | | | | |
| 35 | | | | | | | |
| 36 | | | | | | | |
| 37 | | | | | | | |
| 38 | | | | | | | |
| 39 | | | | | | | |
| 40 | | | | | | | |
| 41 | | | | | | | |
| 42 | | | | | | | |

2.3.4 Příprava vzorku

Byl připraven zásobní roztok sodné soli měďnatého komplexu chlorofylinu o koncentraci 1 g/l. SCC je tmavě zelený prášek snadno rozpustný ve vodě. Vzorek byl rozpuštěn v deionizované vodě, vložen na 3 minuty do ultrazvukové lázně a po rozpuštění byl roztok SCC doplněn po rysku. Tento zásobní roztok byl opatřen parafilmem (Bemis, USA) a uchován na temném místě v lednici, aby bylo zabráněno přístupu světla a degradaci vzorku. Pro prvotní analýzy byla použita koncentrace SCC 25 mg/l a 50 mg/l a poté byla koncentrace zvýšena na 100 mg/l. Takto připravené roztoky byly převedeny do elektroforetických nádobek.

2.3.5 Příprava standardů

Jednotlivé standardy byly připraveny odvážením 1 mg do šroubovací lékovky a byly rozpuštěny v 1 ml MeOH. Vzhledem k tomu, že standardy chlorinů neobsahovaly v komplexu měď, bylo potřeba do roztoku přidat Cu^{2+} ionty. Proto bylo odváženo 10 mg CuCl_2 a rozpuštěno v 1 ml MeOH. Potom bylo k roztoku standardu přidáno 30 μl roztoku CuCl_2 . Pro analýzy byly vzorky dále ředěny používaným BGE. Výsledná koncentrace byla 50 mg/l.

2.4 Podmínky měření

Některé podmínky měření se lišily podle používaných pufrů a jejich pH.

Pro boritanový pufr při pH 7, 8, 9 a fosforečnanový (sodný i draselný) při pH 6, 7, 8 :

- teplota kapiláry: 25 °C
- dávkování vzorku a standardů: 50 mBar/10 s
- vkládané napětí: 15, 20 nebo 25 kV v 0,1 min
- tlak: neplatí pro všechna měření, většina měřena bez tlaku
10 mBar nebo 25 mBar v 0,1 min
- detekce: při 405 nm
- doba analýzy: 20 nebo 30 min

Pro fosforečnanový pufr při pH 3:

- teplota kapiláry: 25 °C
- dávkování vzorku: 50 mBar/10 s
- vkládané napětí: -20 kV v 0,1 min
- detekce: při 405 nm
- doba analýzy: 20 nebo 30 min

3 VÝSLEDKY A DISKUZE

3.1 Boritanový pufr pH 9

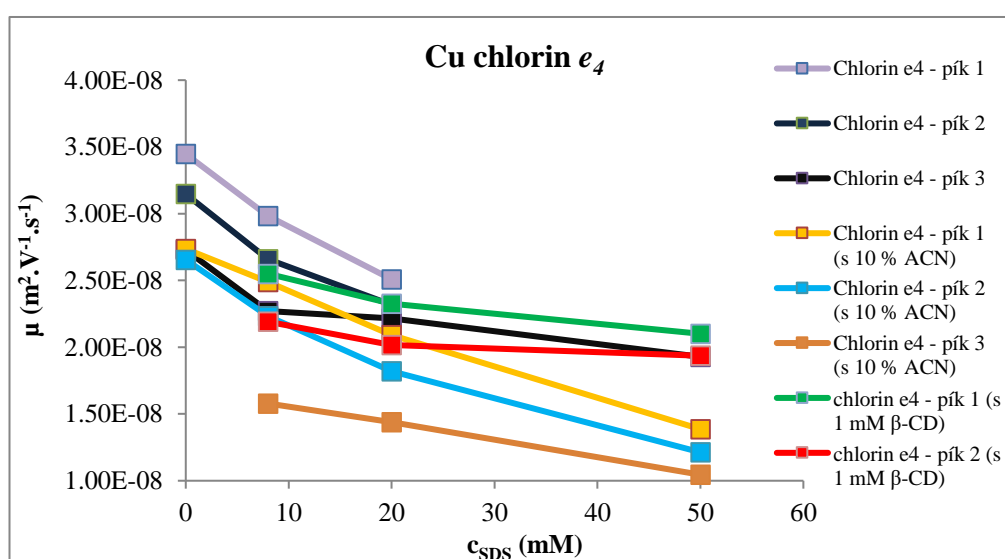
3.1.1 Standardy

V tab. 1 - 3 (příloha 1) jsou uvedeny průměrné hodnoty naměřených migračních časů standardů (ze dvou měření). Ze všech průměrných hodnot migračních časů byla spočítána zdánlivá pohyblivost (viz tab. 4 - 6 příloha 1). Pro výpočet zdánlivé pohyblivosti ve všech následujících odstavcích byla použita rovnice:

$$\mu = \frac{l_d \cdot l_t}{U \cdot t} \quad (4)$$

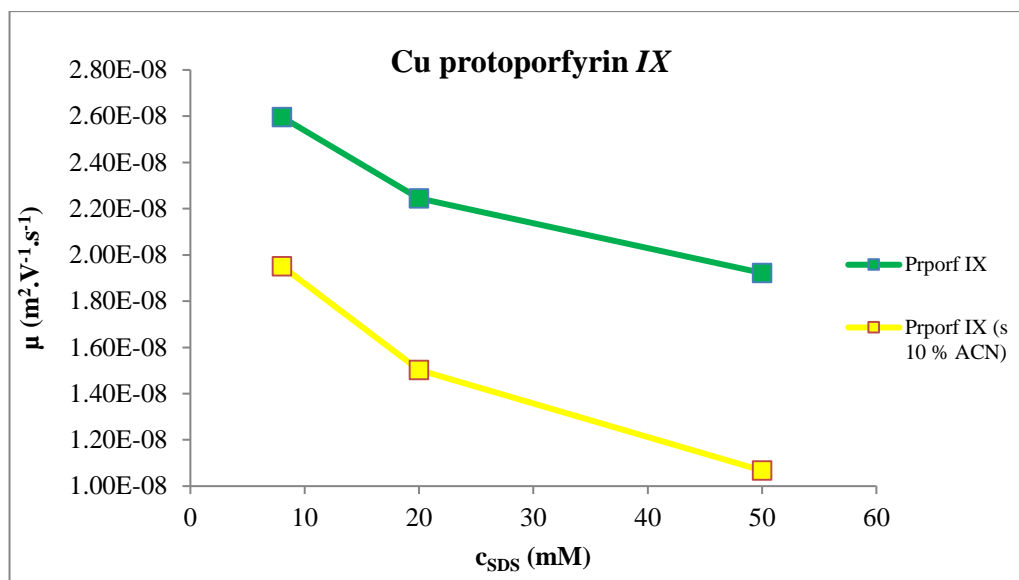
kde: μ = zdánlivá pohyblivost, l_d = efektivní délka, l_t = celková délka, U = napětí, t = migrační/retenční čas látky.

Poté byla vytvořena závislost zdánlivé pohyblivosti na koncentraci SDS. Z grafu 1 pro pufr s přídavkem SDS lze vidět, že připravený Cu chlorin e_4 při všech koncentracích (kromě 50 mM SDS) obsahuje tři píky, které poukazují na to, že ne všechen standard chlorinu e_4 je převeden do komplexu s přidanou mědí. Z tohoto grafu je patrné, že hodnota pohyblivosti iontů klesá se vzrůstající koncentrací SDS, což se nezměnilo ani po přídavku 10 % ACN a 1 mM β -CD. Jediná změna, která proběhla po přidání 10 % ACN byla, že v čistém pufru jsou dva píky a v pufru s 8 mM SDS je navíc čtvrtý pík, který není uveden v grafu z důvodu nízkého rozlišení u dalších koncentrací (viz tab. 1, příloha 1). V pufru s přídavkem β -CD bez SDS nebylo možné naměřit migrační časy tohoto standardu.



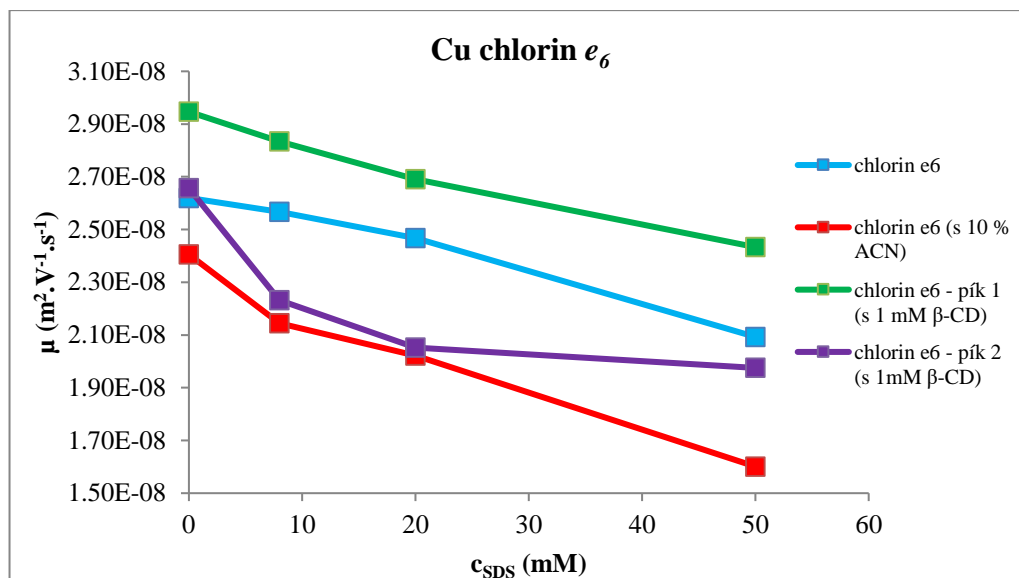
Graf 1: Závislost zdánlivé pohyblivosti Cu chlorinu e_4 na koncentraci SDS v 25 mM boritanovém pufru bez přídavku a s 10 % ACN a 1 mM β -CD při napětí 20 kV, teplotě 25 °C.

V grafu 2 je zobrazena závislost zdánlivé pohyblivosti standardu Cu protoporfyrinu IX (Prporf IX) na koncentraci SDS. Z tohoto grafu je patrné, že s rostoucí koncentrací SDS klesá zdánlivá pohyblivost jak v elektrolytu bez přídavku organické látky, tak i po přídavku 10 % ACN. V čistém boritanovém pufru bez příměsi nebylo možné pík odečíst z důvodu vysokého šumu a nízké odezvy standardu. V elektrolytu s přídavkem 1 mM β -CD a s různými koncentracemi SDS nebyl Cu protoporfyrin IX naměřen ani v jednom z těchto elektrolytů.



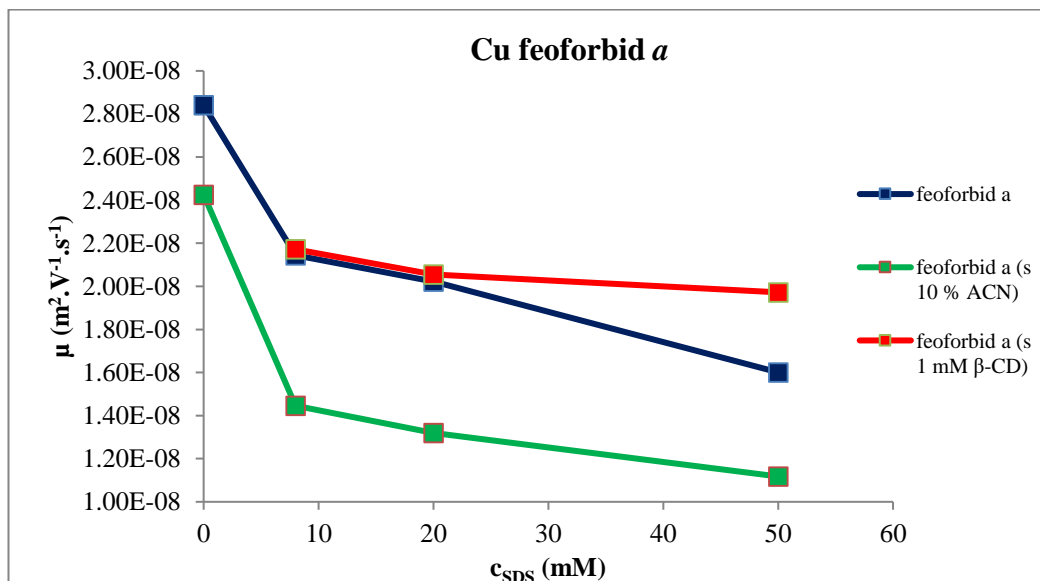
Graf 2: Závislost zdánlivé pohyblivosti Cu protoporfyrinu IX na koncentraci SDS v 25 mM boritanovém pufru bez přídavku a s 10 % ACN při napětí 20 kV, teplotě 25 °C.

V grafu 3 lze vidět, že standard Cu chlorinu e_6 se chová v elektrolytech bez ACN i s 10 % ACN velmi podobně a zdánlivá pohyblivost klesá se vzrůstající koncentrací SDS. Tento standard bylo možné analyzovat ve všech koncentracích i se všemi přídavky a nevyskytují se žádné výrazné odchylky v měřeních. S přídavkem 1 mM β -CD se v naměřených záznamech ve všech koncentracích objevily dva píky pro tento standard. Pro druhý pík dochází k výraznému poklesu pohyblivosti se zvyšující se koncentrací SDS a poté od koncentrace SDS 20 mM začne klesat pomaleji.



Graf 3: Závislost zdánlivé pohyblivosti Cu chlorinu e_6 na koncentraci SDS v 25 mM boritanovém pufru bez přídavku a s 10 % ACN a 1 mM β -CD při napětí 20 kV, teplotě 25 °C.

Z grafu 4 je patrné, že pro všechny koncentrace SDS, bez přídavku i s 10 % ACN, je průběh závislosti pro Cu feoforbid a podobný. Je udržován trend zvyšujících se časů po přídavku ACN a tím nižších hodnot zdánlivých pohyblivostí než bez přídavku organického rozpouštědla. V BGE bez SDS s přídavkem 1 mM β -CD nebylo možné naměřit migrační čas Cu feoforbidu a .



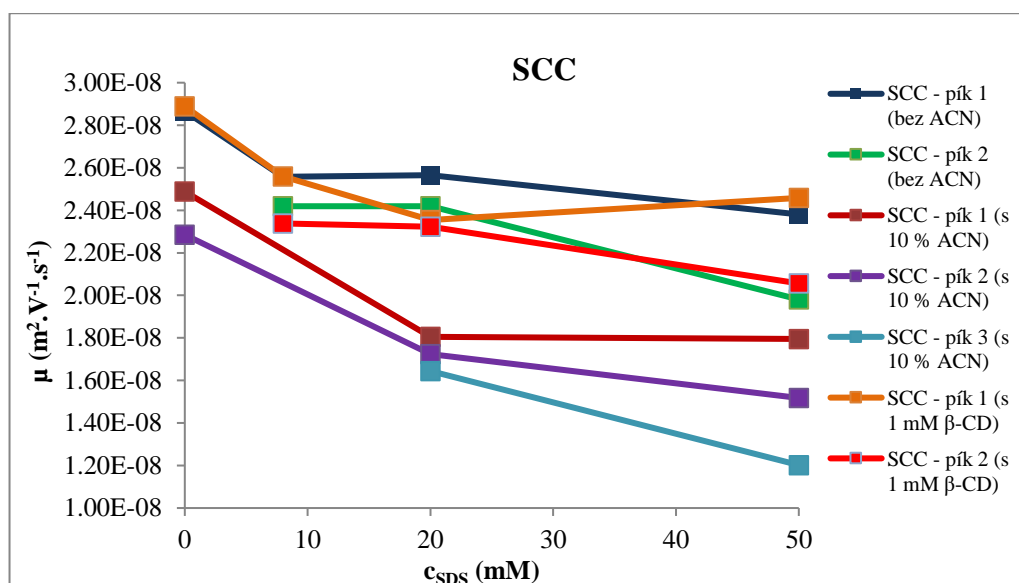
Graf 4: Závislost zdánlivé pohyblivosti Cu feoforbidu a na koncentraci SDS v 25 mM boritanovém pufru bez přídavku a s 10 % ACN a 1 mM β -CD při napětí 20 kV, teplotě 25 °C.

Na obrázcích P2 - P5 (příloha 1) je zobrazeno srovnání separace pro jednotlivé standardy v elektrolytu složeném z 25 mM boritanového pufru o pH 9 s 20 mM SDS, s 20 mM SDS + 10 % ACN a s 20 mM SDS + 1 mM β -CD.

3.1.2 Vzorek SCC a thiomochovina

V tab. 7 - 9 (příloha 1) jsou zaznamenány naměřené migrační časy pro vzorek SCC a thiomochovinu. Z těchto časů byla vypočítána zdánlivá pohyblivost podle rovnice (4), tyto hodnoty jsou uvedeny v tab. 10 - 12 (příloha 1). Jak vyplývá z tabulek 7 – 9, tak jsou hodnoty naměřených migračních časů pro thiomochovinu ve všech elektrolytech podobné a objevovaly se v čase okolo 3. minuty bez ACN i s 1 mM β -CD a kolem 3,5. minuty po přidavku 10 % ACN. Z naměřených hodnot vyplývá, že zdánlivá pohyblivost thiomochoviny je skoro lineární (viz graf P1, příloha 1).

Z vypočtených hodnot zdánlivé pohyblivosti vzorku SCC byl sestaven graf 5, který popisuje závislost zdánlivé pohyblivosti na koncentraci SDS. Z grafu lze vyčíst, že v BGE bez přidavku i s 10 % ACN se zvyšující se koncentrací SDS klesají pohyblivosti analyzovaných látek, a tento trend byl identický pro všechny píky. Ve většině elektrolytů s různými přidavky (tenzidu, ACN CD) vzorek obsahoval dva až tři píky. V elektrolytu s 8 mM SDS a přidavkem 10 % ACN nebylo možné identifikovat žádný pík i přes stabilní proud v kapiláře (obr. P1, příloha 1). Přidavkem 1 mM β -CD k elektrolytu s 50 mM SDS došlo u prvního píku ke snížení migračního času, tudíž ke zvýšení pohyblivosti a křivka, proto nemá postupnou klesající tendenci. Nejlepší separace byla získána v elektrolytu s 20 mM SDS, který obsahoval nejvíce píků jak bez přidavku ACN, tak s přidavkem 10 % ACN. Třetí píky nejsou v grafu zaznamenány u všech měření, jelikož byly odděleny pouze při jedné koncentraci SDS.



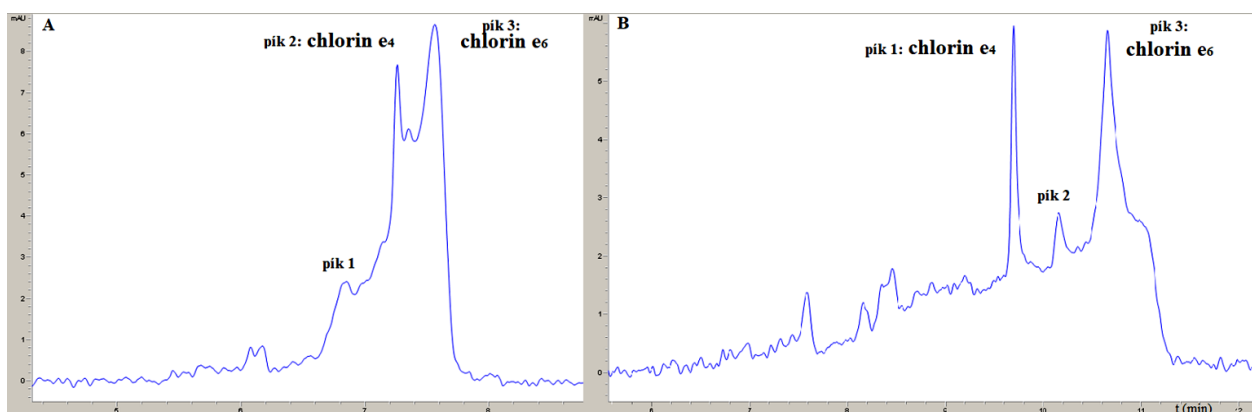
Graf 5: Závislost zdánlivé pohyblivosti složek vzorku SCC na koncentraci SDS v 25 mM boritanovém pufru bez přidavku a s 10 % ACN a 1 mM β -CD při napětí 20 kV, teplotě 25 °C.

3.1.3 Identifikace látek ve vzorku SCC podle standardů

Pouze na základě shody migračních časů nebylo ve většině případů možné identifikovat standardy ve vzorku SCC. Proto byla vytvořena v programu ChemStation Edition knihovna spekter standardů. Podle podobnosti spektra látky ve vzorku se standardem s co nejvyšší procentuální pravděpodobností shody bylo určeno, o jakou látku se jedná.

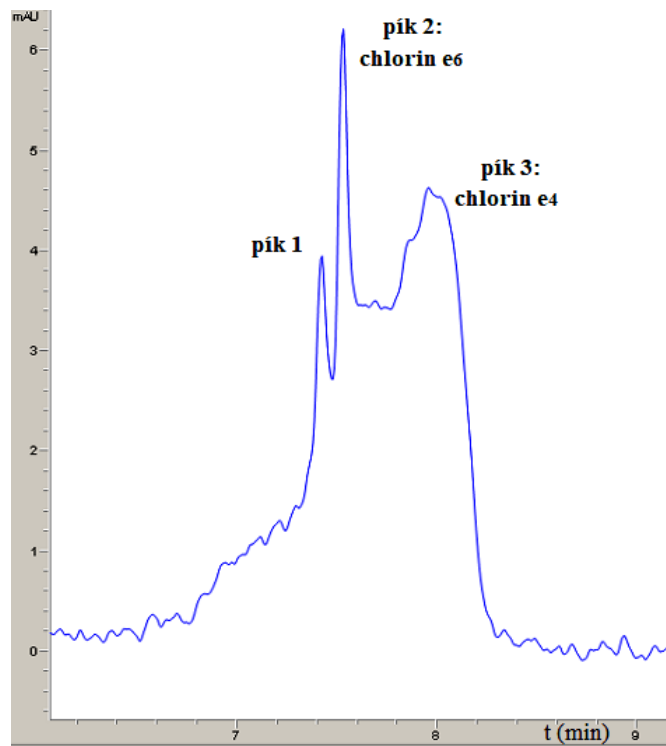
V separaci vzorku SCC v BGE s SDS bez i s přísávkou 10 % ACN a β -CD bylo obtížné identifikovat, o jakou látku se jedná. Podle porovnání knihovny spekter se nejčastěji ve vzorku objevuje chlorin e_4 a chlorin e_6 . Vzhledem k podobnosti spekter je velmi obtížné určit, o kterou látku se jedná.

Na obrázku 18 a 19 jsou zobrazeny nejlepší získané separace v elektrolytu s 20 mM SDS bez a s přísávkou 10 % ACN a 1 mM β -CD. V elektrolytu s různými koncentracemi SDS bez a s 10 % ACN se podařilo rozdělit tři píky, které bylo možné podle považovat za látku, ale identifikovány byly jen dva (obr. 18).



Obrázek 18: Separace SCC vzorku v 25 mM boritanového pufru (pH 9) s 20 mM SDS (A) a v elektrolytu s 20 mM SDS + 10 % ACN (B), napětí 20 kV, teplota 25 °C.

Separace s přísávkou 1 mM β -CD (obr. 19) obsahuje také tři píky, ale pouze u dvou píků bylo možné určit pomocí porovnání s knihovnou spekter, o jaké látky se jedná. Spektra odpovídala opět chlorinu e_4 a chlorinu e_6 . Avšak pořadí těchto píků je opačné než na obr. 18.



Obrázek 19: Separace SCC vzorku v 25 mM boritanového pufru (pH 9) s 20 mM SDS a 1 mM β -CD, napětí 20 kV, teplota 25 °C.

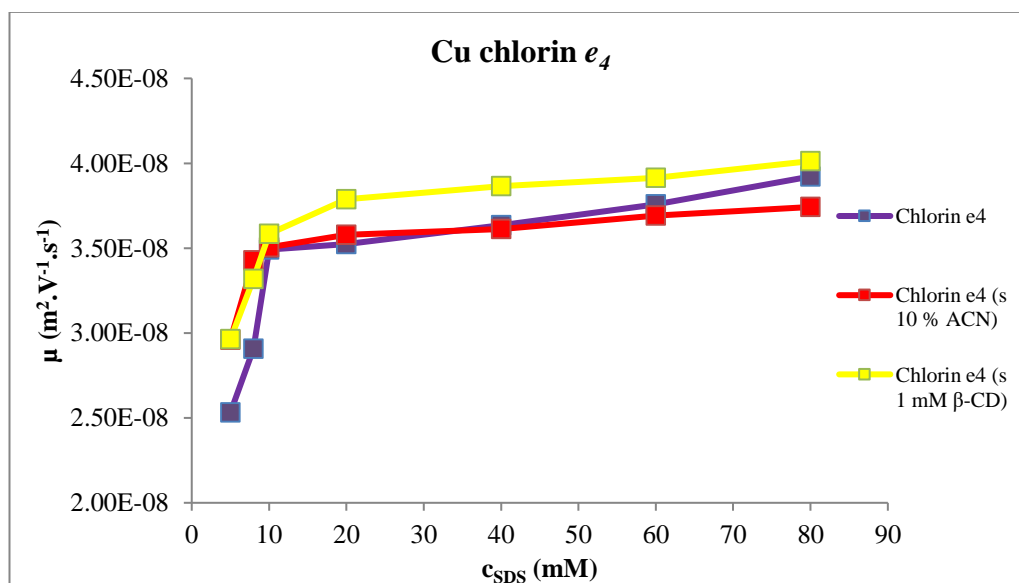
3.2 Fosforečnanový pufr pH 3

V čistém fosforečnanovém pufru bez přítomnosti micel SDS byla rychlost migrace látek nízká, a proto nebylo možné naměřit žádná data. V následujících grafických znázorněních nejsou uvedena data pro nulovou koncentraci SDS. Jelikož bylo aplikováno obrácené napětí a zvolen pufr s kyselým pH, byla disociace silanolových skupin velmi malá a hodnoty pro thiomocovinu jako marker elektroosmotického toku, proto nebyly naměřeny.

3.2.1 Standardy

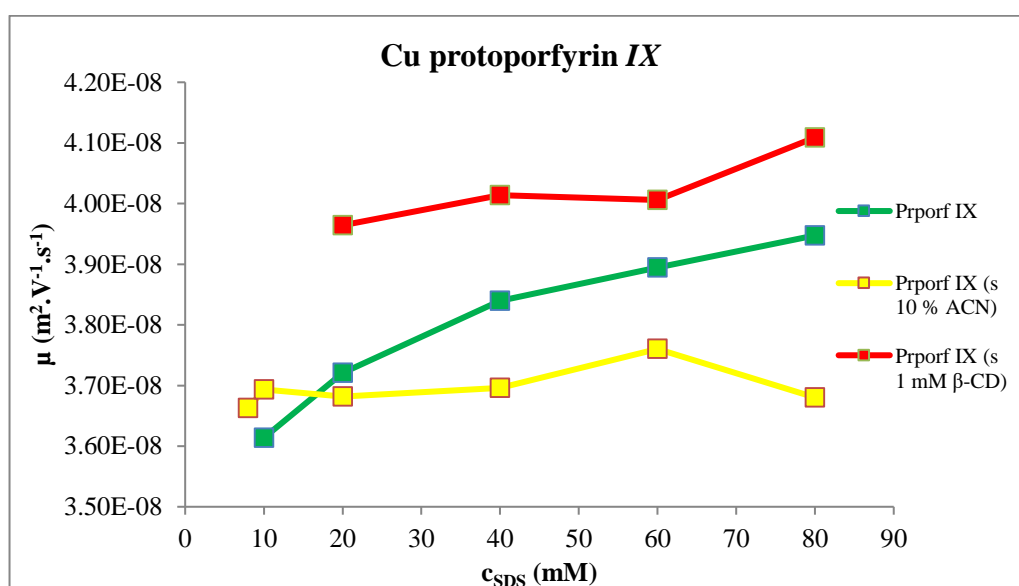
V tab. 13 - 15 (příloha 2) jsou uvedeny průměrné migrační časy ze dvou měření pro jednotlivé standardní látky v elektrolytech s přidávkou různé koncentrace SDS, 10 % ACN a 1 mM β -CD. Z těchto migračních časů byly spočítány zdánlivé pohyblivosti (tab. 16 – 18, příloha 2). Z vypočtených hodnot zdánlivé pohyblivosti jednotlivých standardů byla sestrojena závislost μ na c_{SDS} a v jednotlivých grafech jsou porovnány rozdíly standardu také v BGE s přidávkou 10 % ACN a 1 mM β -CD.

Podle grafu 6 pro standard Cu chlorinu e_4 lze říci, že se průběh závislosti nemění ať už pro separace jen v BGE s SDS nebo s SDS a přidávkou 10 % ACN a 1 mM β -CD. Při nižších koncentracích dochází k výraznější změně migračních časů látek, a tudíž nárůst zdánlivé pohyblivosti je strmější. Při vyšších koncentracích SDS se časy liší minimálně a pohyblivost je téměř konstantní a nezávislá na koncentraci SDS.



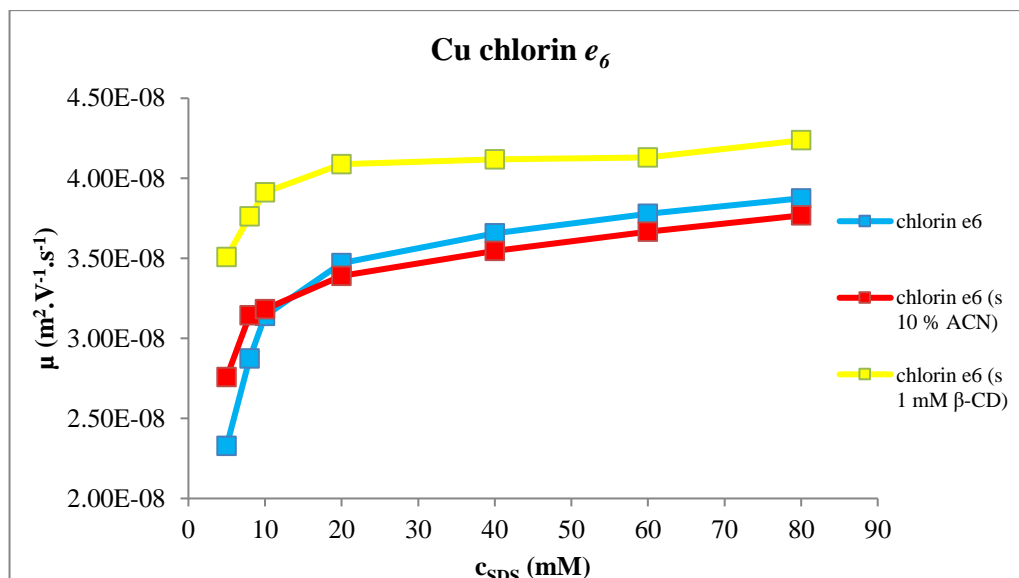
Graf 6: Závislost zdánlivé pohyblivosti standardu Cu chlorinu e_4 na koncentraci SDS v 10 mM fosforečnanovém pufru s SDS a v BGE s SDS s přidávkou 10 % ACN a 1 mM β -CD při napětí -20 kV, teplotě 25 °C.

Z grafu 7 pro standard Cu protoporfyrinu IX je na první pohled jasné, že průběh závislosti μ na c_{SDS} je pro různé přísady (tenzidu, ACN, CD) odlišný. Pro BGE s různými koncentracemi SDS se pohyblivost Cu protoporfyrinu IX zvyšuje s rostoucí koncentrací SDS. Při nižších koncentracích SDS nebylo možné z elektroforegramu časy odečíst. S přísadkou 10 % ACN není v závislosti zdánlivé pohyblivosti zjevný trend. Při nižších koncentracích SDS se zdánlivá pohyblivost pomalu zvyšuje, u koncentrace 20 mM SDS začne klesat a poté opět lehce stoupat a při 80 mM SDS se hodnota opět snížila. Po přísadku 1 mM β -CD dochází k postupnému nárůstu zdánlivé pohyblivosti, avšak při 60 mM SDS jsou hodnoty skoro shodné jako u 40 mM SDS.



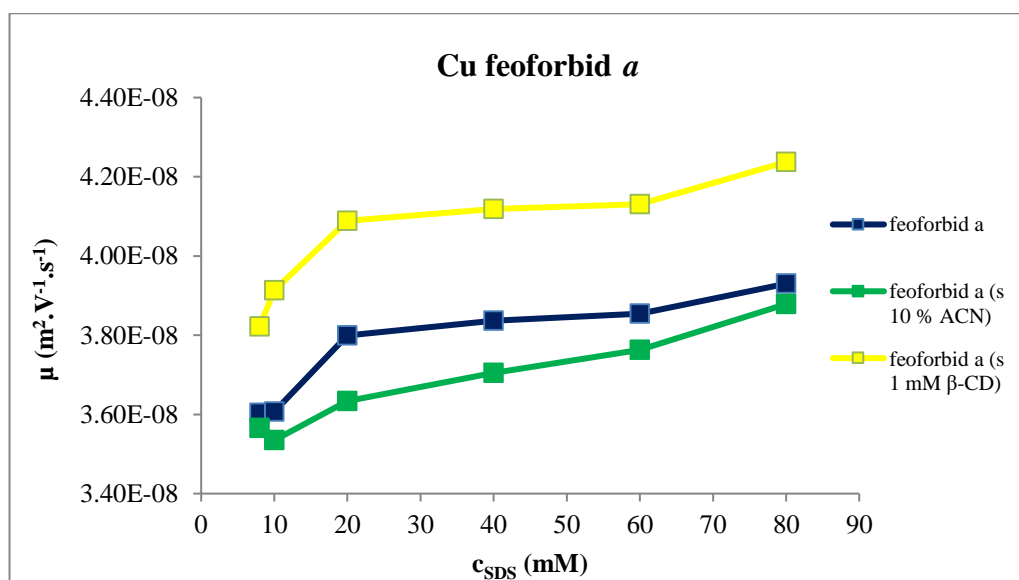
Graf 7: Závislost zdánlivé pohyblivosti standardu Cu protoporfyrinu IX na koncentraci SDS v 10 mM fosforečnanovém pufru v SDS bez a s přísadky 10 % ACN a 1 mM β -CD při napětí -20 kV, teplotě 25 °C.

Z vypočtených zdánlivých pohyblivostí pro Cu chlorin e_6 (graf 8) lze říci, že průběh závislosti pohyblivosti na koncentraci SDS se pomalu zvyšuje s rostoucí koncentrací tenzidu, jen u nižších koncentrací SDS je strmější nárůst podobně jako u chlorinu e_4 (graf 6). Pouze hodnoty migračních časů s přísadkou 1 mM β -CD (tab. 15, příloha 2) byly nižší oproti časům v BGE s přísadkou 10 % ACN nebo pouze v BGE s SDS bez dalšího přísadku.



Graf 8: Závislost zdánlivé pohyblivosti standardu Cu chlorinu e_6 na koncentraci SDS v 10 mM fosforečnanovém pufru s SDS bez a s přidavky 10 % ACN a 1 mM β -CD při napětí -20 kV, teplotě 25 °C.

Graf 9 popisuje závislost rostoucí zdánlivé pohyblivosti na zvyšující se koncentraci SDS pro standardní látku Cu feoforbidu a . Všechny tři křivky mají podobný průběh, tudíž u všech elektrolytů pohyblivost roste podobně. Jediná odchylka je u koncentrace 8 mM SDS s 10 % ACN, kdy je migrační čas nižší a zdánlivá pohyblivost vyšší než už 10 mM SDS s 10 % ACN a až poté probíhá nárůst. U elektrolytů s nulovou koncentrací SDS a 5 mM SDS nebylo možné migrační časy naměřit.



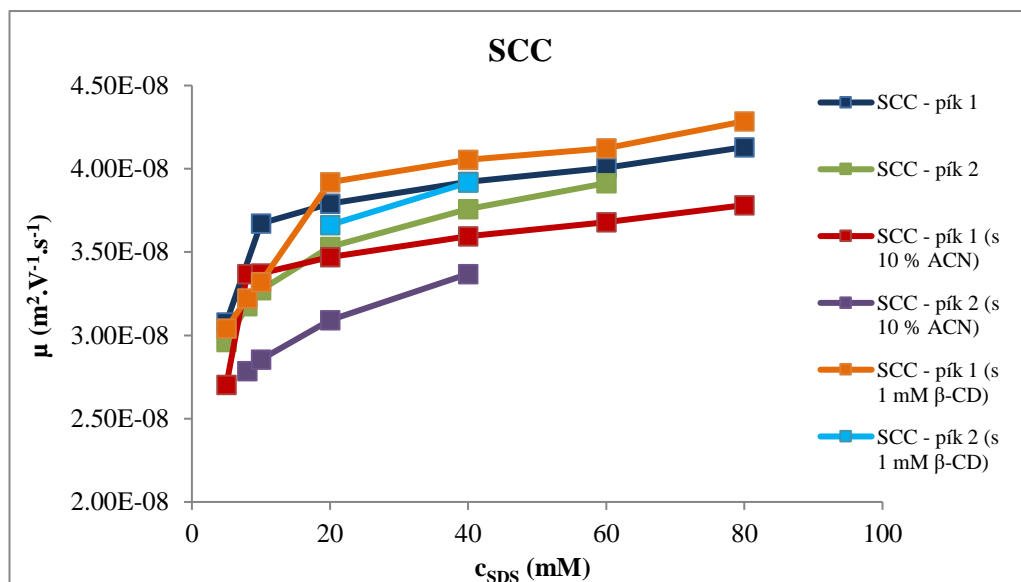
Graf 9: Závislost zdánlivé pohyblivosti standardu Cu feoforbidu a na koncentraci SDS v 10 mM fosforečnanovém pufru s SDS bez a s přidavky 10 % ACN a 1 mM β -CD při napětí -20 kV, teplotě 25 °C.

Z grafů závislostí zdánlivých pohyblivostí na koncentraci SDS bez a s přidavkem β -CD lze vyvodit závěr, že studovaná porfyrinová barviva jsou silně vázána do micel SDS a tuto rovnováhu s výjimkou Cu protoporfyrinu IX dále podpoří přítomnost β -CD.

Na obrázcích P6 - P9 (příloha 2) je zobrazeno srovnání separace pro jednotlivé standardy v elektrolytu složeném z 10 mM fosforečnanového pufru o pH 3 s 80 mM SDS, s 80 mM SDS + 10 % ACN a s 80 mM SDS + 1 mM β -CD.

3.2.2 Vzorek SCC

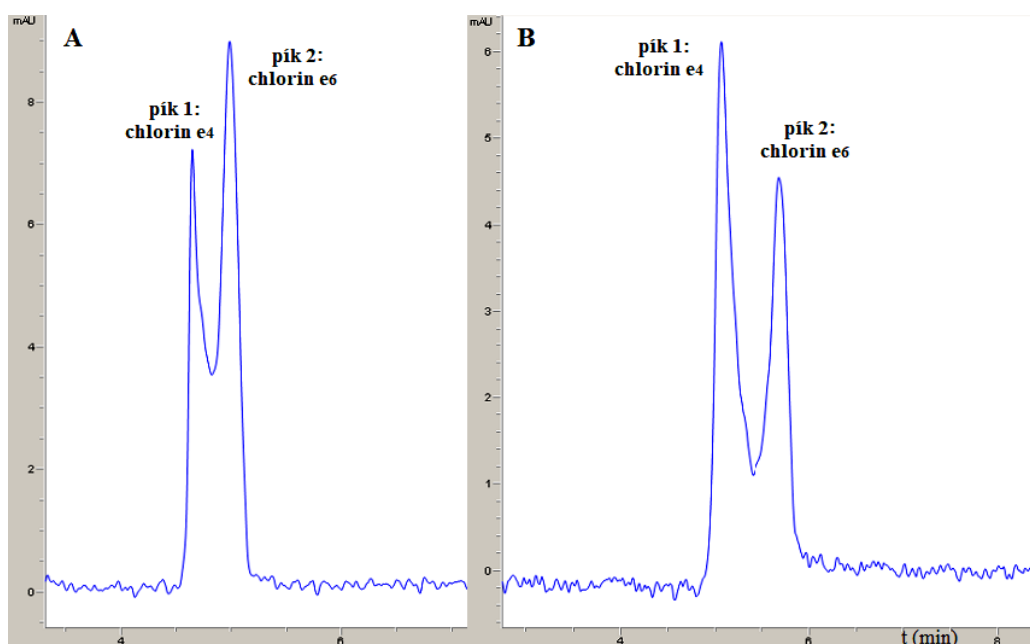
V tab. 19 – 21 (příloha 2) jsou uvedeny průměrné migrační časy ze dvou měření pro vzorek SCC v jednotlivých pufrech. Z těchto hodnot byly spočítány zdánlivé pohyblivosti, jejichž hodnoty jsou uvedeny v tab. 22 – 24 (příloha 2). Byl sestaven graf 10 závislosti μ na c_{SDS} z kterého lze vidět, že trend, kdy při nižším času roste pohyblivost, je velmi podobný u všech elektrolytů (s přidavky SDS, s SDS a 10 % ACN i 1 mM β -CD). Největší odchylky byly vždy u druhého píku v separaci u elektrolytů s 60 a 80 mM SDS (s přidavky i bez), kde látky nebyly dostatečně odděleny. U elektrolytu s β -CD byly odchylky v měření také pro koncentrace 5, 8 a 10 mM SDS, tudíž k separaci na dva píky dochází pouze v přítomnosti 20 a 40 mM SDS.



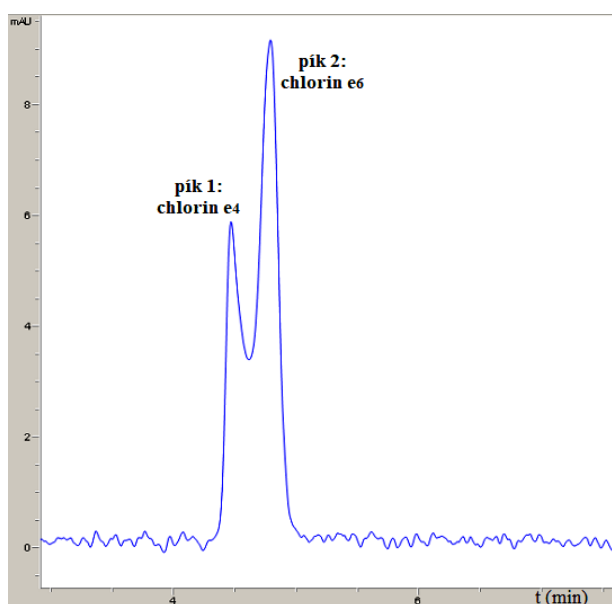
Graf 10: Závislost zdánlivé pohyblivosti vzorku SCC na koncentraci SDS v 10 mM fosforečnanovém pufru s SDS bez a s přidavky 10 % ACN a 1 mM β -CD při napětí -20 kV, teplotě 25 °C.

3.2.3 Identifikace látek ve vzorku SCC podle standardu

Látky byly opět identifikovány podle podobnosti spekter ve vytvořené knihovně. Pro ukázkou byly vybrány separace vzorku SCC v 20 mM SDS bez přídavku a s 10 % ACN a 1 mM β -CD, kde se ve všech BGE vyskytovaly dva píky. Tyto píky byly opět identifikovány jako chlorin e_4 a chlorin e_6 . Jejich pořadí se neměnilo jako u boritanového pufru, ale zvyšovaly se jejich odezvy. Separace se samotným SDS a s přídavkem 1 mM β -CD jsou téměř identické, pouze chlorin e_4 má o trochu vyšší odezvu bez přídavku CD (obr. 20, 21).



Obrázek 20: Separace SCC vzorku v elektrolytu z 10 mM fosforečnanového pufru (pH 3) s 20 mM SDS (A) a v elektrolytu s 20 mM SDS + 10 % ACN (B), napětí -20 kV, teplota 25 °C.



Obrázek 21: Separace SCC vzorku v elektrolytu z 10 mM fosforečnanového pufru (pH 3) s 20 mM SDS a 1 mM β -CD, napětí -20 kV, teplota 25 °C.

3.3 Optimalizace podmínek pro separaci SCC

Vzorek SCC byl separován v několika různých elektrolytech uvedených v tab. 1 a 2, ale také v jiných, ovšem ne všechny zkoušené podmínky a vybrané elektrolyty vedly alespoň k dílčímu výsledku. V prvotních měřeních byl vzorek SCC o koncentraci 25 mg/l a 50 mg/l proměřován v elektrolytu složeném z boritanového pufru (pH 9) a 20 mM SDS při napětí 20 kV a teplotě kapiláry 20 °C a poté byly podmínky změněny na 25 kV a 25 °C. Koncentrace SCC soli byla velmi nízká, a proto byla zvýšena na 100 mg/l. Takto připravený vzorek doplněný vodou byl při napětí 25 kV a tlaku 10 mBar proměřen ve stejném elektrolytu, ale s přidávkou 5, 10, 15 % ACN a MeOH a také byl vzorek SCC v těchto elektrolytech proměřen bez přidaného tlaku na kapiláru, aby měl vzorek delší čas na separaci. Avšak žádná z těchto analýz nevedla k pozitivnímu výsledku.

Dalšími zkoušenými elektrolyty byla řada pufrů o různé hodnotě pH. Použity byly boritanový pufr (pH 7, 8, 9) a fosforečnanový sodný pufr (pH 6, 7, 8) při napětí 20 kV. Ve všech elektrolytech byl proměřován vzorek SCC i thiomocovina pro určení EOF. U všech měření se pro vzorek SCC objevoval pouze jeden pík. Ze získaných hodnot migračních časů (tab. 25, příloha 3) pro všechny tyto elektrolyty byly spočítány zdánlivé pohyblivosti (tab. 26, příloha 3). Pro vzorek SCC byly zaznamenány nižší pohyblivosti než pro EOF, což indikuje, že molekuly chlorofylinu jsou záporně nabitě a v mírně alkalickém pH migrují směrem k anodě. V samotném elektrolytu však nejsou rozdíly v migraci dostatečné pro úspěšnou separaci.

Mnohem lepší elektroforegramy poskytovaly analýzy vzorku v elektrolytu z fosforečnanového pufru při všech hodnotách pH, kde pík byl symetričtější a poskytoval mnohem vyšší odezvu než u elektrolytu boritanového. Poté byly vzorek SCC i thiomocovina proměřeny v elektrolytu z fosforečnanového (draselného) pufru o stejných hodnotách pH, aby bylo zjištěno, zda má draselný iont vliv na separaci vzorku. V grafu P2 (příloha 3) je znázorněna závislost zdánlivé pohyblivosti vzorku SCC na hodnotách pH pufru. Na obrázcích P2, P3, P4 (příloha 3) jsou vidět drobné rozdíly mezi jednotlivými druhy pufrů. Pro elektrolyt s draselnými ionty a sodnými ionty byly stanoveny obdobné pohyblivosti SCC. V elektrolytu z fosforečnanu draselného byl zaznamenán vyšší proud (20 μ A pH 6 oproti 14 μ A u sodného).

Vzhledem k tomu, že nedocházelo při žádných podmínkách k separaci, byl připraven fosforečnanový pufr o pH 3 s příměsí 20 mM SDS. Na kapiláru bylo aplikováno opačné napětí (-20 kV). Při těchto podmínkách bylo dosaženo alespoň částečného rozdělení píku na dva, jak lze vidět ze záznamu, viz obr. 20. Tento pufr byl proto používán pro další analýzy a byly ověřeny vlivy přítomnosti micel na separaci. Vzorek byl nejdříve proměřován v několika elektrolytech s vyššími přídávky SDS a s 5, 10, 15 % ACN a MeOH. U většiny těchto analýz se pro koncentrace 20 a 40 mM SDS objevovaly pouze dva píky látky, u 60 a 80 mM SDS pouze jeden. Výrazné rozdíly nebyly zaznamenány ani po přidavku organického rozpouštědla k elektrolytu, pouze se měnily migrační časy. Elektrolyt obsahující 20 mM SDS a 5, 10, 15 % MeOH byl proměřován při různých podmínkách a byly proto změněny hodnoty vkládaného napětí takto: -15 kV a -25 kV. Změna hodnoty vloženého napětí neměla na separaci vliv, pouze časy píků byly při -15 kV posunuty k vyšším hodnotám a při -25 kV k nižším hodnotám (obr. P5, příloha 3).

Vzhledem k vysoké retenci zkoumané směsi SCC v micelách SDS, kdy i při otočené polaritě napětí byly zaznamenány pouze jeden až dva píky s nízkým migračním časem, byl dále testován fosforečnanový pufr o pH 3 a přídávky nižší koncentrace SDS (5, 8, 10 mM SDS) a k tomu také 5, 10, 15 % ACN i MeOH. Nižší koncentrace SDS a tedy i koncentrace micel by měla vést k nižší retenci SCC a ke zlepšení separace. Elektrolyty s přídávky MeOH se zakalily, a proto v následujících měřeních byl MeOH jako přídatek vynechán. Měření s přídávkem 10 % ACN poskytují nejlepší rozdělení – opět dva píky látek. Proto byl přídatek 10 % ACN používán i pro proměřované standardy u obou pufrů, viz kapitoly 3.1, 3.2. Také bylo pH pufru upraveno na hodnotu 3,5 avšak ani tato úprava nevedla k výrazné změně, a proto bylo pH pufru ponecháno na původní hodnotě 3.

Dalšími přídávky k fosforečnanovému pufru s 8 mM SDS byly 1, 3, 5 mM β -CD, γ -CD, HPBC, HPGC, ať už samotné nebo s dalším přídávkem 5, 10, 15 % ACN. Přídávkem cyklodextrinů byl získán pouze jeden pík pro všechna měření, zatímco navíc s přídávkem ACN se u nižší koncentrace CD objevovaly píky dva. Lze říci, že přídatek ACN má pozitivní vliv na separaci vzorku SCC, avšak při změně druhu CD nedocházelo k výraznému ovlivnění separace, proto byly standardy proměřovány pouze s příměsí 1 mM β -CD (výsledky v předchozí kapitole).

Poté byl zkoumán ve fosforečnanovém pufru vliv přidavku SDeS (30 mM) bez i s ACN a také s přidavky různých druhů cyklodextrinů a solí Mg^{2+} a Zn^{2+} . Po přidavku ACN záznam obsahoval pouze jeden pík, zatímco vzorek SCC měřen v elektrolytu bez přidavku nebo s 1 mM CD obsahoval píky dva (obr. P6, příloha 3). Přídavek soli Mg^{2+} způsobil posunutí času k vyšším hodnotám, objevují se dva píky – první větší, druhý výrazně menší. Zatímco přidavkem Zn^{2+} byly píky opět dva, avšak druhý pík neměl o tolik nižší intenzitu než první (obr. P7, příloha 3). Různé koncentrace těchto solí neměly také na separaci vliv.

V dalším kroku byly testovány přidavky vyšších koncentrací ACN. Proto bylo k fosforečnanovému pufru s 8, 20 mM SDS a 30 mM SDeS přidáno 20, 30, 40, 50 % ACN. U těchto analýz byl zaznamenán velmi vysoký šum patrně související se stabilitou micel a záznam nebylo možné vyhodnotit.

Vzhledem k tomu, že separace v elektrolytu s kyselým pH nebyly úspěšné, byly dále testovány analýzy v boritanovém pufru o pH 9, ke kterému bylo přidáno 20 mM a 50 mM SDS s 20, 30, 40 % ACN. Tyto analýzy byly provedeny při napětí 20 kV a teplotě 25°C. Úspěšnější separace bylo dosaženo v 20 mM SDS s 20 a 30 % ACN, kde byly odděleny tři píky. Ovšem (na obr. P8, příloha 3) podle porovnání spektra standardních látek se spektry látek ve vzorku nebylo možné jednoznačně rozhodnout, že se jedná skutečně o rozdílné látky (dle porovnání s knihovnou spekter v programu ChemStation Edition se jednalo o jednu a tu samou látku – chlorin e_6).

K těmto elektrolytům s 20 mM SDS a přítomností 20 a 30 % ACN byly přidány soli Zn^{2+} a Mg^{2+} a také všechny čtyři cyklodextriny (1, 3, 5 mM). Přidavky solí nevedly k žádnému zlepšení separace, navíc proud v kapiláře byl vyšší a často kolísal z důvodu ucpané kapiláry. Píky na záznamu z měření vzorku SCC v elektrolytu s přidavky cyklodextrinů byly velmi rozmyté, a proto nebylo možné identifikovat, o které látky se jedná. Následně byla připravena nová kapilára a vloženo na ni napětí 20 kV a tlak 25 mBar. Vzorek SCC (rozpuštěn v H_2O i v BGE) byl takto proměřen v boritanových elektrolytech s příměsí 20 mM SDS + 30 % ACN + čtyři druhy cyklodextrinů o různých koncentracích, jak již bylo zmíněno. Ani tyto vybrané elektrolyty a podmínky nevedly k výraznějším změnám v separacích. Proto lze říci, že vyvíjený tlak na kapiláru nemá na separaci vliv. Mezi různými druhy cyklodextrinů nebyla nijak výrazná odlišnost, platí však trend, že při nižší koncentraci CD byla separace lepší.

Z porovnání dosažených výsledků s publikovanými daty vyplývá, že kapalinová chromatografie poskytuje vyšší selektivitu pro separaci směsi SCC a pomocí MEKC za testovaných podmínek nebylo dosaženo dostatečné separace pravděpodobně díky strukturní podobnosti látek přítomných ve směsi SCC. Druhým faktorem, který mohl negativně ovlivnit dosažené výsledky je nízká citlivost detekce v porovnání např. s fluorescenční detekcí (viz obr. 11) nebo detekcí s diodovým polem.

ZÁVĚR

Cílem diplomové práce byla optimalizace podmínek, separace komerčně dostupného barviva sodné soli měďnatého komplexu chlorofylinu (E 141) a identifikace derivátů – chlorinů v této soli pomocí MEKC. Proměřovanými deriváty (standardními látkami) byly feoforbid *a*, chlorin *e₄*, chlorin *e₆* a protoporfyrin *IX*. Vzorek SCC i standardy byly proměřovány v několika různých elektrolytech, které byly tvořeny nejčastěji z boritanového nebo fosforečnanového pufru a různými přísadkami (SDS, ACN, β -CD). Ze všech naměřených hodnot migračních časů byly vypočteny zdánlivé pohyblivosti a z nich byly následně vytvořeny závislosti zdánlivé pohyblivosti látek na koncentraci SDS. U elektrolytů z boritanového pufru (pH 9) zdánlivá pohyblivost klesá, zatímco u fosforečnanového pufru (pH 3) tato závislost roste. Z jednotlivých grafů závislostí je možné říci, že jsou tato studovaná barviva silně vázána do micel SDS, což je také posíleno přísadkou β -CD, kromě protoporfyrinu *IX*, jehož záznamy neměly podobný trend. Ve fosforečnanovém pufru byly separace přehlednější, ale bylo odděleno méně píků, zatímco v pufru boritanovém docházelo k separaci více píků, avšak u těchto záznamů nebyla tolik stabilní nulová linie.

Ve vzorku SCC bylo velmi obtížné přesně určit, o který standard se jedná, jelikož všechny látky se vyznačovaly charakteristickým píkem v podobném čase. V SCC byly nejčastěji odděleny pouze dva píky, v některých elektrolytech dokonce tři, avšak podle podobnosti spektra ve vytvořené knihovně v programu ChemStation Edition byly identifikovány v elektroforegramu pouze chlorin *e₄* a chlorin *e₆*. Protoporfyrin *IX* a feoforbid *a* nebylo možné identifikovat a s největší pravděpodobností byly součástí některého z píků a nebyly dostatečně separovány.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] VELÍŠEK, Jan, HAJŠLOVÁ Jana. *Chemie potravin II.*, 3. vyd. Tábor: OSSIS, 2009. ISBN 978-80-86659-16-9.
- [2] KLESCHT, Vladimír, HRNČIŘÍKOVÁ, Iva, MANDELOVÁ, Lucie. *Éčka v potravinách*. Brno: Computer Press, 2006. Zdraví pro každého. ISBN 80-251-1292-6.
- [3] Dostupné z: <http://www.scs.illinois.edu/suslick/porphyrin.html>
- [4] MORTENSEN, Alan, GEPPEL, Asger. HPLC-MS analysis of the green food colorant sodium copper chlorophyllin. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 2007, 8, 419 – 425
- [5] BLANKENSHIP, Robert E. Molecular mechanisms of photosynthesis. 2nd ed. *Chichester: Wiley Blackwell*, 2014, ISBN 978-1-4051-8976-7.
- [6] DELGADO-VARGAS, Francisco, PAREDES-LOPEZ, Octavio. Natural colorants for food and nutraceutical uses. *Boca Raton: CRC Press*. c200, ISBN 1-58716-076-5.
- [7] CHEN, M., SCHLIEP, M., WILLOWS, R. D., CAI, Z. L., NEILAN, B. A., & SCHEER, H. A red-shifted chlorophyll. *Science*. 2010, 329 (5997), 1318-1319.
- [8] HUMPHREY, A. M. Chlorophyll as a Color and Functional Ingredient. *Journal of food science*. 2004, 69 (5), 422-425.
- [9] SCOTTER, Michael J., CASTLE, Laurence, ROBERTS, Dominic. Method development and HPLC analysis of retail foods and beverages for copper chlorophyll (E141[i]) and chlorophyllin (E141[ii]) food colouring materials. *Food Additives and Contaminants*. 2005, 22 (12), 1163–1175.
- [10] TANAKA, Ryouichi, TANAKA, Ayumi. Chlorophyll cycle regulates the construction and destruction of the light-harvesting complexes. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2011, 1807, 968–976.
- [11] TUMOLO, Tathyana, LANFER-MARQUEZ, Ursula Maria. Copper chlorophyllin: A food colorant with bioactive properties?. *Food Research International*. 2012, 46, 451–459.

- [12] Dostupné z: <http://eng.thesaurus.rusnano.com/wiki/article1955>
- [13] RODRIGUEZ-AMAYA, Delia B. Natural food pigments and colorants. *Current Opinion in Food Science*. 2016, 7, 20–26.
- [14] INOUE, H., YAMASHITA, H., FURUYA, K., NONOMURA, Y., YOSHIKAWA, N., LI, S. Determination of copper (II) chlorophyllin by reversed-phase high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 1994, 679, 99 -104.
- [15] SCOTTER, Michael J. Methods for the determination of European Union-permitted added natural colours in foods: a review. *Food Additives and Contaminants*. 2011, 28 (5), 527-596.
- [16] BELIN, G. K., Gülacar, F. O. Separation of Chlorins and Carotenoids in Capillary Electrophoresis. *Journal of Chromatographic Science*. 2007, 45 (9), 593 – 599.
- [17] SZURKO, Agnieszka, RAMS, Marzena, SOCHANIK, Aleksander, SIERON´STOŁTNY, Karolina, KOZIELEC, Agnieszka Maria, MONTFORTS, Franz-Peter, WRZALIK, Roman, RATUSZNA, Alicja. Spectroscopic and biological studies of a novel synthetic chlorin derivative with prospects for use in PDT. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2009, 17, 8197–8205.
- [18] LINARES, Irwin A. P., T. DE OLIVEIRA, Kleber, RODRIGUES PERUSSI, Janice. Chlorin derivatives sterically-prevented from self-aggregation with high antitumor activity for photodynamic therapy. *Dyes and Pigments*. 2017, 145, 518 – 527.
- [19] HYNSTOVÁ Veronika, STĚRBOVÁ Dagmar, KLEJDUS Bořivoj, HEDBAVNÝ Josef, HUSKA Dalibor, ADAM Vojtěch. Separation, identification and quantification of carotenoids and chlorophylls in dietary supplements containing *Chlorella vulgaris* and *Spirulina platensis* using High Performance Thin Layer Chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2018, 148, 108–118.
- [20] GIOVINE L. Del, FABIETTI F. Copper chlorophyll in olive oils: identification and determination by LIF capillary electrophoresis. *Food control*. 2005, 16, 267 – 272.
- [21] OPEKAR, František, JELÍNEK, Ivan, RYCHLOVSKÝ, Petr, PLZÁK, Zbyněk. *Základní analytická chemie*. Praha: Karolinum. 2010, ISBN 978-80-246-1775-6.
- [22] VOLKA, Karel a kol. *Analytická chemie II*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická. 1995, ISBN 80-7080-227-8.

- [23] SOMMER, Lumír a kol. *Základy analytické chemie*. Brno: VUTIUM. 2000, ISBN 80-214-1742-0.
- [24] FRAZIER, Richard A., AMES, Jennifer M., NURSTEN, Harry E. *Capillary Electrophoresis for Food Analysis: Method Development*. Cambridge: The Royal Society of Chemistry. 2000, ISBN 0-85404-492-2.
- [25] LANDERS, James P. *Handbook of capillary electrophoresis*. Boca Raton: CRC Press. 1994, ISBN 0-8493-8690-X.
- [26] GROSSMAN, Paul D., COLBURN Joel C. *Capillary electrophoresis: theory & practice*. San Diego: Academic Press. 1992. ISBN 0-12-304250-X.
- [27] LI, S. F. Y., Y. WU, S. *Capillary Electrophoresis*. *Electrophoresis*. 2000, 1176-1187.
- [28] Dostupné z: <https://faf.vfu.cz/pub-files/ustavy/ustav-chemickych-leciv/vyuka-predmetu/analyticka-chemie-i-ii/separacni-metody---elektroforeza.pdf>
- [29] LI, S. F. Y. *Capillary Electrophoresis: Principles, Practice and Applications*. Journal of chromatography library – svazek 52. Elsevier. 1992. ISBN.
- [30] TERABE, S., OTSUKA, K., ANDO, T. *Anal. Chem.* 1985, 57, 834.
- [31] Manuel. *Micellar electrokinetic chromatography: A practical overview of current methodological and instrumental advances*. *Electrophoresis*. 2011, 32, 149–165.
- [32] CHENG, Y.F., FUCHS, M., ANDREWS, D., CARSON, W., J. *Chromatogr.* 1992, 608, 109.
- [33] Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/1997_05_320-329.pdf
- [34] TERABE, Shigeru *Twenty-five years of micellar electrokinetic chromatography*. *Procedia Chemistry*. 2010, 2, 2–8.
- [35] Kim, Jong-Bok, Terabe, Shigeru. *On-line sample preconcentration techniques in micellar electrokinetic chromatography*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2003, 30, 1625-1643.

[36] SAITOH, Koichi, KATO, Hisashi, TERAMAE, Norio. Separation of chlorophyll -c₁ and -c₂ by micellar electrokinetic capillary chromatography. *Journal of chromatography A*. 1994, 687, 149 – 153.

[37] Dostupné z:

<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/c6003?lang=en®ion=CZ>

[38] Dostupné z:

<http://orders.frontiersci.com/Orders/WebPlugin/searchresults.aspx?class=Porphyrins&subclass=All&attrib=All&fmla=&cas=&name=&struct=>

PŘÍLOHA 1
Boritanový pufr

1.1 Standardy

Tabulka 1: Migrační časy jednotlivých standardů v boritanovém pufru o pH 9 (25 mM) s různými přídávky SDS, při napětí 20 kV, teplotě 25 °C.

| Druh elektrolytu | čas - t (min) – průměr, n = 2 | | | | | |
|------------------------------|-------------------------------|-------|-------|------------------|---------------|---------------|
| | chlorin e_4 | | | protoporfyrin IX | chlorin e_6 | feoforbid a |
| | pík 1 | pík 2 | pík 3 | pík 1 | pík 1 | pík 1 |
| Boritanový pufr pH 9 (25 mM) | | | | | | |
| čistý pufr | 5,078 | 5,561 | 6,413 | - | 6,680 | 6,160 |
| 8 mM SDS | 5,870 | 6,582 | 7,708 | 6,741 | 6,817 | 8,161 |
| 20 mM SDS | 6,977 | 7,553 | 7,903 | 7,795 | 7,093 | 8,656 |
| 50 mM SDS | - | - | 9,076 | 9,106 | 8,363 | 10,931 |

Tabulka 2: Migrační časy jednotlivých standardů v boritanovém pufru o pH 9 (25 mM) s různými přídávky SDS a 10 % ACN, při napětí 20 kV, teplotě 25 °C.

| Druh elektrolytu | čas - t (min) - průměr, n = 2 | | | | | | |
|------------------------------|-------------------------------|--------|--------|--------|------------------|---------------|---------------|
| | chlorin e_4 | | | | protoporfyrin IX | chlorin e_6 | feoforbid a |
| | pík 1 | pík 2 | pík 3 | pík 4 | pík 1 | pík 1 | pík 1 |
| Boritanový pufr pH 9 (25 mM) | | | | | | | |
| čistý pufr + 10 % ACN | 6,396 | 6,591 | - | - | - | 7,276 | 7,215 |
| 8 mM SDS + 10 % ACN | 7,031 | 7,837 | 11,089 | 11,831 | 8,968 | 8,161 | 12,101 |
| 20 mM SDS + 10 % ACN | 8,369 | 9,611 | 12,158 | - | 11,652 | 8,656 | 13,267 |
| 50 mM SDS + 10 % ACN | 12,627 | 14,427 | 16,747 | - | 16,394 | 10,931 | 15,659 |

Tabulka 3: Migrační časy jednotlivých standardů v boritanovém pufru o pH 9 (25 mM) s různými přídávky SDS a 1 mM β -CD, při napětí 20 kV, teplotě 25 °C.

| Druh elektrolytu | čas - t (min) - průměr, n = 2 | | | | | |
|-------------------------------|-------------------------------|-------|------------------|---------------|-------|---------------|
| | chlorin e_4 | | protoporfyrin IX | chlorin e_6 | | feoforbid a |
| | pík 1 | pík 2 | pík 1 | pík 1 | pík 2 | pík 1 |
| Borátový pufr pH 9 (25 mM) | | | | | | |
| čistý pufr + 1 mM β -CD | - | - | - | 5,939 | 6,588 | - |
| 8 mM SDS + 1 mM β -CD | 6,864 | 7,989 | - | 6,176 | 7,842 | 8,058 |
| 20 mM SDS + 1 mM β -CD | 7,522 | 8,678 | - | 6,505 | 8,527 | 8,515 |
| 50 mM SDS + 1 mM β -CD | 8,331 | 9,038 | - | 7,192 | 8,860 | 8,873 |

Tabulka 4: Zdánlivá pohyblivost jednotlivých standardů v boritanovém pufru o pH 9 (25 mM) s různými přídávky SDS, při napětí 20 kV, teplotě 25 °C.

| Druh elektrolytu | zdánlivá pohyblivost - μ ($m^2 \cdot V^{-1} \cdot s^{-1}$) | | | | | |
|------------------------------|--|----------|----------|------------------|---------------|---------------|
| | chlorin e_4 | | | protoporfyrin IX | chlorin e_6 | feoforbid a |
| | pík 1 | pík 2 | pík 3 | pík 1 | pík 1 | pík 1 |
| Boritanový pufr pH 9 (25 mM) | | | | | | |
| čistý | 3,45E-08 | 3,15E-08 | 2,73E-08 | - | 2,62E-08 | 2,84E-08 |
| 8 mM SDS | 2,98E-08 | 2,66E-08 | 2,27E-08 | 2,60E-08 | 2,57E-08 | 2,14E-08 |
| 20 mM SDS | 2,51E-08 | 2,32E-08 | 2,21E-08 | 2,25E-08 | 2,47E-08 | 2,02E-08 |
| 50 mM SDS | - | - | 1,93E-08 | 1,92E-08 | 2,09E-08 | 1,60E-08 |

Tabulka 5: Zdánlivá pohyblivost jednotlivých standardů v boritanovém pufru o pH 9 (25 mM) s různými přídávky SDS a 10 % ACN, při napětí 20 kV, teplotě 25 °C.

| Druh elektrolytu | zdánlivá pohyblivost - μ ($\text{m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) | | | | | | |
|------------------------------|---|----------|----------|----------|------------------|---------------|---------------|
| | chlorin e_4 | | | | protoporfyrin IX | chlorin e_6 | feoforbid a |
| | pík 1 | pík 2 | pík 3 | pík 4 | pík 1 | pík 1 | pík 1 |
| Boritanový pufr pH 9 (25 mM) | | | | | | | |
| čistý pufr + 10 % ACN | 2,74E-08 | 2,66E-08 | - | - | - | 2,41E-08 | 2,43E-08 |
| 8 mM SDS + 10 % ACN | 2,49E-08 | 2,23E-08 | 1,58E-08 | 1,48E-08 | 1,95E-08 | 2,14E-08 | 1,45E-08 |
| 20 mM SDS + 10 % ACN | 2,09E-08 | 1,82E-08 | 1,44E-08 | - | 1,50E-08 | 2,02E-08 | 1,32E-08 |
| 50 mM SDS + 10 % ACN | 1,39E-08 | 1,21E-08 | 1,04E-08 | - | 1,07E-08 | 1,60E-08 | 1,12E-08 |

Tabulka 6: Zdánlivá pohyblivost jednotlivých standardů v boritanovém pufru o pH 9 (25 mM) s různými přídávky SDS a 1 mM β -CD, při napětí 20 kV, teplotě 25 °C.

| Druh elektrolytu | zdánlivá pohyblivost - μ ($\text{m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) | | | | | |
|-------------------------------|---|----------|------------------|---------------|----------|---------------|
| | chlorin e_4 | | protoporfyrin IX | chlorin e_6 | | feoforbid a |
| | pík 1 | pík 2 | pík 1 | pík 1 | pík 2 | pík 1 |
| Borátový pufr pH 9 (25 mM) | | | | | | |
| čistý pufr + 1 mM β -CD | - | - | - | 2,95E-08 | 2,66E-08 | - |
| 8 mM SDS + 1 mM β -CD | 2,55E-08 | 2,19E-08 | - | 2,83E-08 | 2,23E-08 | 2,17E-08 |
| 20 mM SDS + 1 mM β -CD | 2,33E-08 | 2,02E-08 | - | 2,69E-08 | 2,05E-08 | 2,06E-08 |
| 50 mM SDS + 1 mM β -CD | 2,10E-08 | 1,94E-08 | - | 2,43E-08 | 1,98E-08 | 1,97E-08 |

1.2 Vzorek SCC a thiomocovina

Tabulka 7: Migrační časy vzorku SCC a thiomocoviny v boritanovém pufru o pH 9 (25 mM) s různými přídávky SDS, při napětí 20 kV, teplotě 25 °C.

| Druh elektrolytu | čas - t (min) - průměr, n = 2 | | | |
|------------------------------|-------------------------------|-------|-------|-------|
| | thiomocovina | SCC | | |
| | pík 1 | pík 1 | pík 2 | pík 3 |
| Boritanový pufr pH 9 (25 mM) | | | | |
| čistý pufr | 2,985 | 6,105 | - | - |
| 8 mM SDS | 2,868 | 6,841 | 7,234 | - |
| 20 mM SDS | 2,905 | 6,823 | 7,234 | 7,545 |
| 50 mM SDS | 3,036 | 7,351 | 8,835 | - |

Tabulka 8: Migrační časy vzorku SCC a thiomocoviny v boritanovém pufru o pH 9 (25 mM) s různými přídávky SDS a 10 % ACN, při napětí 20 kV, teplotě 25 °C.

| Druh elektrolytu | čas - t (min) - průměr, n = 2 | | | |
|------------------------------|-------------------------------|-------|--------|--------|
| | thiomocovina | SCC | | |
| | pík 1 | pík 1 | pík 2 | pík 3 |
| Boritanový pufr pH 9 (25 mM) | | | | |
| čistý pufr + 10 % ACN | 3,547 | 7,034 | 7,659 | - |
| 8 mM SDS + 10 % ACN | 3,440 | - | - | - |
| 20 mM SDS + 10 % ACN | 3,421 | 9,699 | 10,151 | 10,644 |
| 50 mM SDS + 10 % ACN | 3,642 | 9,749 | 11,531 | 14,559 |

Tabulka 9: Migrační časy vzorku SCC a thiomocoviny v boritanovém pufru o pH 9 (25 mM) s různými přídávky SDS a 1 mM β -CD, při napětí 20 kV, teplotě 25 °C.

| Druh elektrolytu | čas - t (min) - průměr, n = 2 | | | |
|-------------------------------|-------------------------------|-------|-------|-------|
| | thiomocovina | SCC | | |
| | pík 1 | pík 1 | pík 2 | pík 3 |
| Borátový pufr pH 9 (25 mM) | | | | |
| čistý pufr + 1 mM β -CD | 2,976 | 6,059 | - | - |
| 8 mM SDS + 1 mM β -CD | 2,924 | 6,838 | 7,485 | - |
| 20 mM SDS + 1 mM β -CD | 2,972 | 7,433 | 7,536 | 7,980 |
| 50 mM SDS + 1 mM β -CD | 3,015 | 7,118 | 8,511 | - |

Tabulka 10: Zdánlivá pohyblivost vzorku SCC a thiomocoviny v boritanovém pufru o pH 9 (25 mM) s různými přídávky SDS , při napětí 20 kV, teplotě 25 °C.

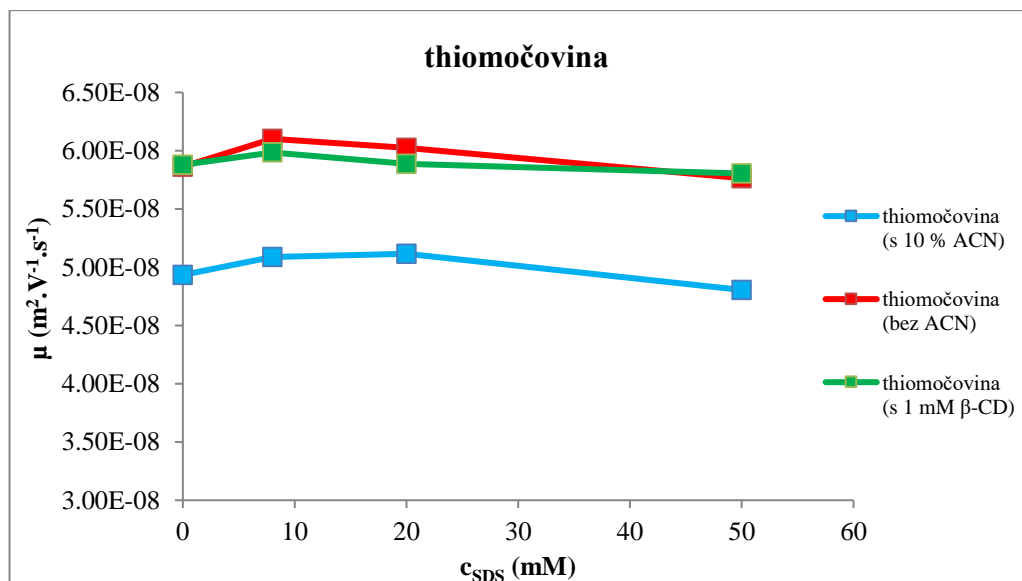
| Druh elektrolytu | zdánlivá pohyblivost - μ ($m^2.V^{-1}.s^{-1}$) | | | |
|---------------------------------|--|----------|----------|----------|
| | thiomocovina | SCC | | |
| | pík 1 | pík 1 | pík 2 | pík 3 |
| Boritanový pufr pH 9 (25 mM) | | | | |
| čistý | 5,86E-08 | 2,87E-08 | - | - |
| 8 mM SDS | 6,10E-08 | 2,56E-08 | 2,42E-08 | - |
| 20 mM SDS | 6,03E-08 | 2,56E-08 | 2,42E-08 | 2,32E-08 |
| 50 mM SDS | 5,76E-08 | 2,38E-08 | 1,98E-08 | - |

Tabulka 11: Zdánlivá pohyblivost vzorku SCC a thiomocoviny v boritanovém pufru o pH 9 (25 mM) s různými přídávky SDS a 10 % ACN, při napětí 20 kV, teplotě 25 °C.

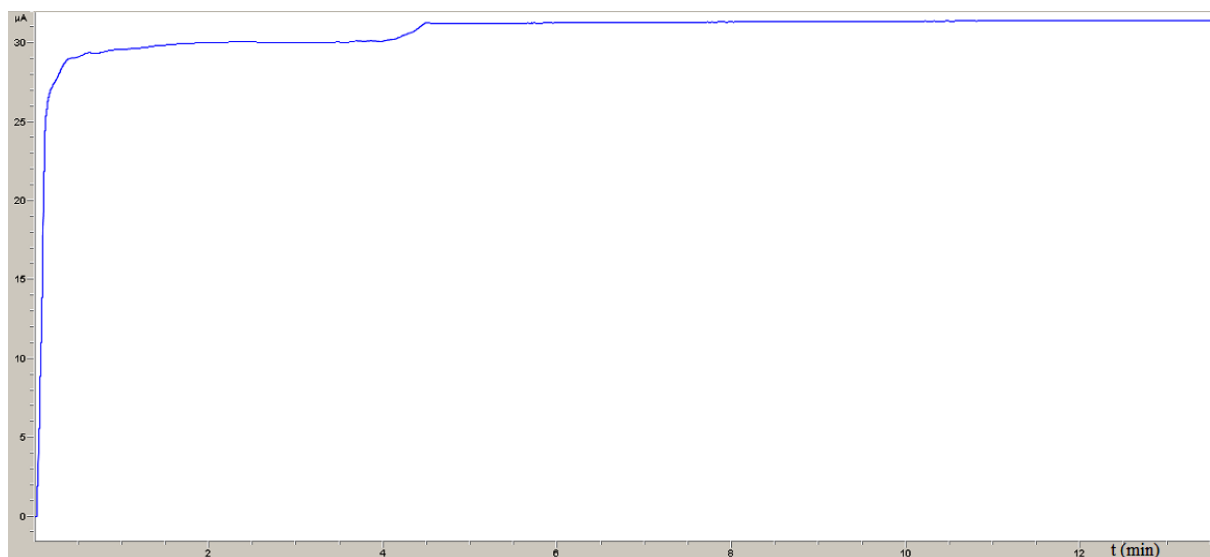
| Druh elektrolytu | zdánlivá pohyblivost - μ ($m^2.V^{-1}.s^{-1}$) | | | |
|---------------------------------|--|----------|----------|----------|
| | thiomocovina | SCC | | |
| | pík 1 | pík 1 | pík 2 | pík 3 |
| Boritanový pufr pH 9 (25 mM) | | | | |
| čistý pufr + 10 % ACN | 4,93E-08 | 2,49E-08 | 2,29E-08 | - |
| 8 mM SDS + 10 % ACN | 5,09E-08 | - | - | - |
| 20 mM SDS + 10 % ACN | 5,12E-08 | 1,80E-08 | 1,72E-08 | 1,64E-08 |
| 50 mM SDS + 10 % ACN | 4,81E-08 | 1,80E-08 | 1,52E-08 | 1,20E-08 |

Tabulka 12: Zdánlivá pohyblivost vzorku SCC a thiomocoviny v boritanovém pufru o pH 9 (25 mM) s různými přídávky SDS a 1 mM β -CD, při napětí 20 kV, teplotě 25 °C.

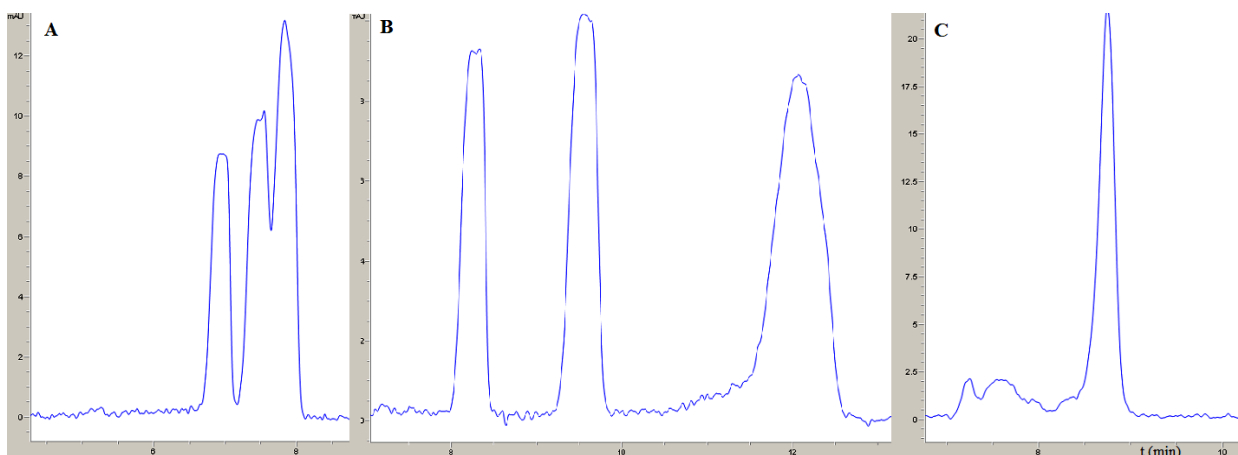
| Druh elektrolytu | zdánlivá pohyblivost - μ ($m^2.V^{-1}.s^{-1}$) | | | |
|-------------------------------|--|----------|----------|----------|
| | thiomocovina | SCC | | |
| | pík 1 | pík 1 | pík 2 | pík 3 |
| Borátový pufr pH 9 (25 mM) | | | | |
| čistý pufr + 1 mM β -CD | 5,88E-08 | 2,89E-08 | - | - |
| 8 mM SDS + 1 mM β -CD | 5,98E-08 | 2,56E-08 | 2,34E-08 | - |
| 20 mM SDS + 1 mM β -CD | 5,89E-08 | 2,35E-08 | 2,32E-08 | 2,19E-08 |
| 50 mM SDS + 1 mM β -CD | 5,80E-08 | 2,46E-08 | 2,06E-08 | - |



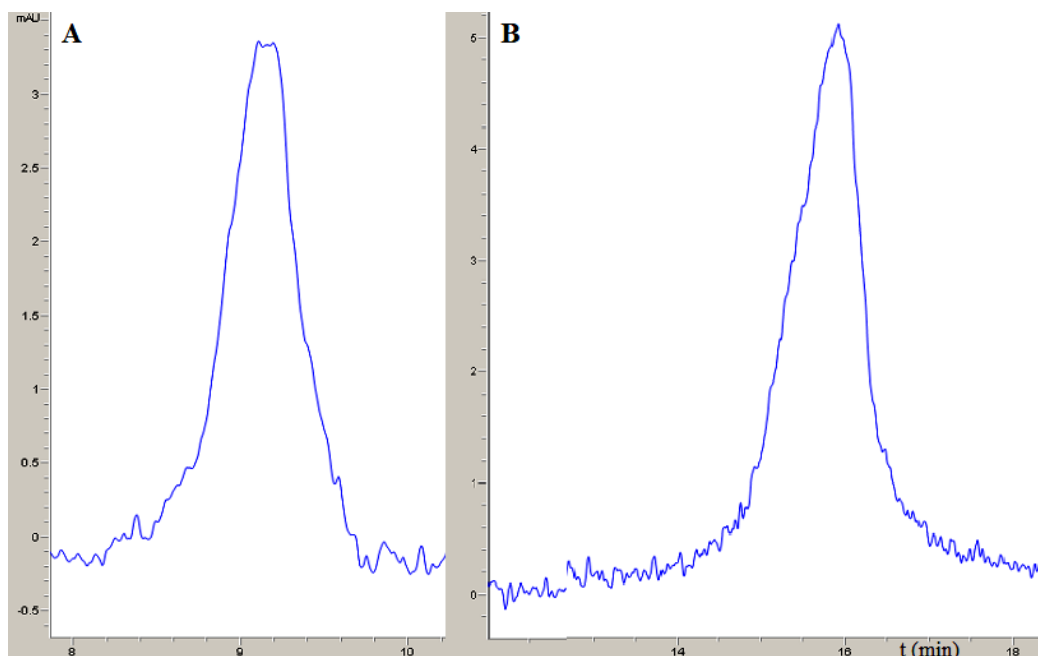
Graf P1: Závíslost zdánlivé pohyblivosti na koncentraci SDS v 25 mM boritanovém pufru bez přídavku a s 10 % ACN a 1 mM β -CD pro thiomočovinu při napětí 20 kV, teplotě 25 °C.



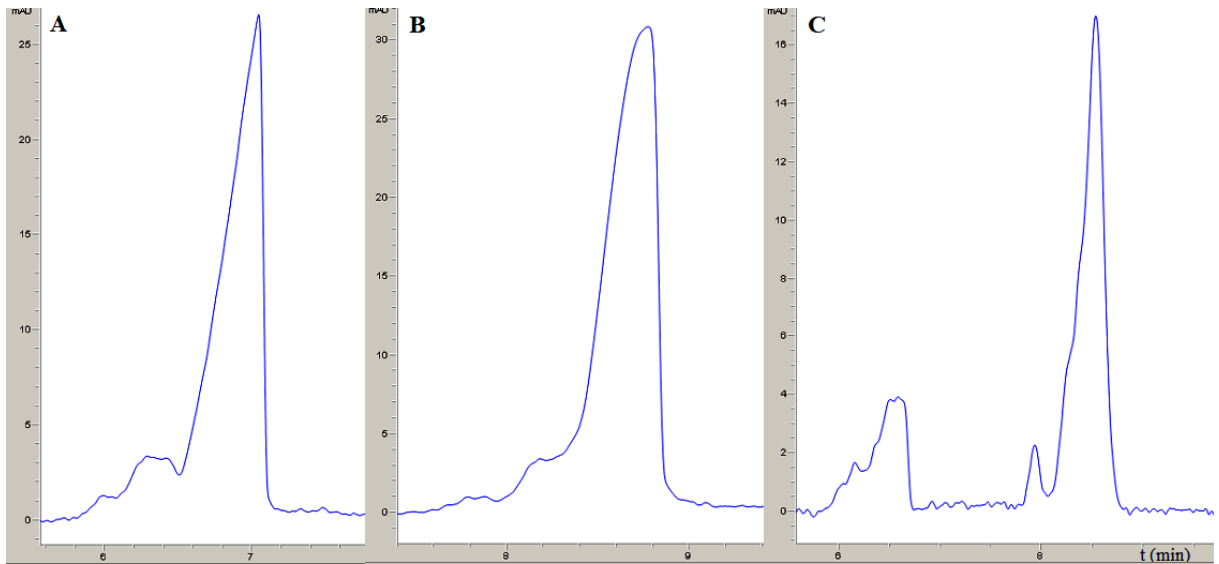
Obrázek P1: Stabilita proudu v kapiláře, elektrolyt z 25 mM boritanového pufru (pH 9) s 8 mM SDS + 10 % ACN pro vzorek SCC, napětí 20 kV, teplota 25 °C.



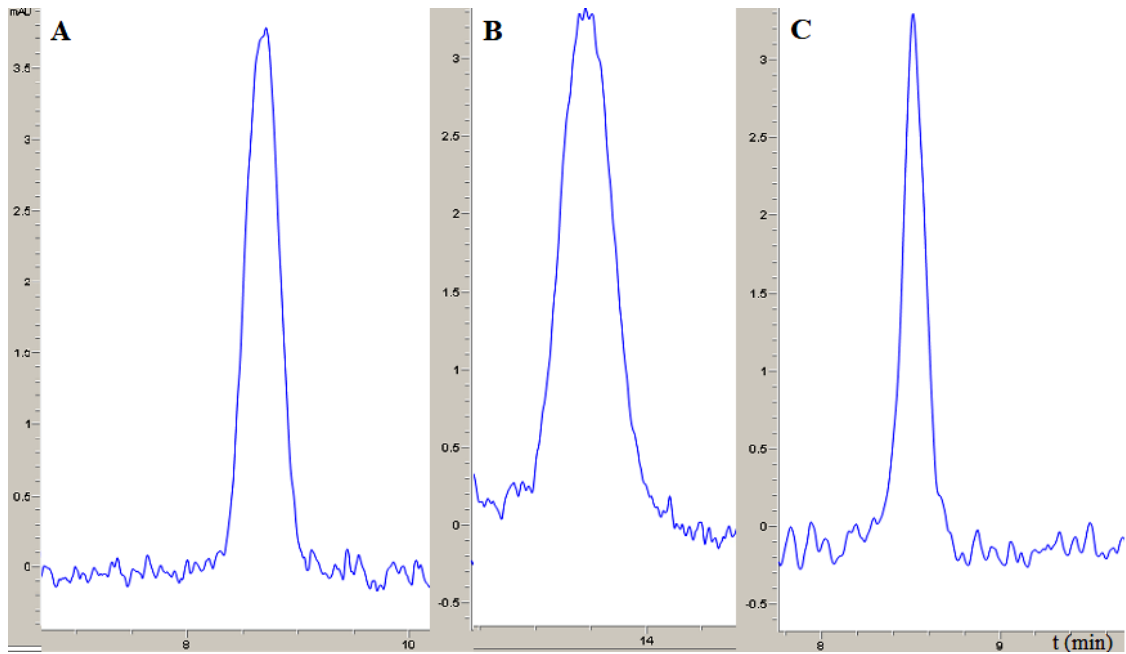
Obrázek P2: Srovnání standardu chlorinu *e4* v 25 mM boritanovém pufru (pH 9) s 20 mM SDS (A), s 20 mM SDS + 10 % ACN (B) a s 20 mM SDS + 1 mM β -CD (C) při napětí 20 kV, teplotě 25 °C.



Obrázek P3: Srovnání standardu protoporphyrinu *IX* v 25 mM boritanovém pufru (pH 9) s 50 mM SDS (A), s 50 mM SDS + 10 % ACN (B) při napětí 20 kV, teplotě 25 °C.



Obrázek P4: Srovnání standardu chlorinu e_6 v 25 mM boritanovém pufru (pH 9) s 20 mM SDS (A), s 20 mM SDS + 10 % ACN (B) a s 20 mM SDS + 1 mM β -CD (C) při napětí 20 kV, teplotě 25 °C.



Obrázek P5: Srovnání standardu feoforbidu a v 25 mM boritanovém pufru (pH 9) s 20 mM SDS (A), s 20 mM SDS + 10 % ACN (B) a s 20 mM SDS + 1 mM β -CD (C) při napětí 20 kV, teplotě 25 °C.

PŘÍLOHA 2
Fosforečnanový pufr

2.1 Standardy

Tabulka 13: Migrační časy jednotlivých standardů ve fosforečnanovém pufru o pH 3 (10 mM) s různými přídávky SDS, při napětí -20 kV, teplotě 25 °C.

| Druh elektrolytu | čas - t (min) - průměr, n = 2 | | | |
|----------------------------------|-------------------------------|------------------|-------------------------------|--------------------|
| | chlorin <i>e</i> ₄ | protoporfyrin IX | chlorin <i>e</i> ₆ | feoforbid <i>a</i> |
| Fosforečnanový pufr pH 3 (10 mM) | pík | pík | pík | pík |
| čistý pufr | - | - | - | - |
| 5 mM SDS | 6,912 | - | 7,513 | - |
| 8 mM SDS | 6,018 | - | 6,087 | 4,856 |
| 10 mM SDS | 5,012 | 4,843 | 5,571 | 4,852 |
| 20 mM SDS | 4,967 | 4,704 | 5,043 | 4,606 |
| 40 mM SDS | 4,814 | 4,558 | 4,787 | 4,562 |
| 60 mM SDS | 4,657 | 4,494 | 4,632 | 4,540 |
| 80 mM SDS | 4,462 | 4,433 | 4,516 | 4,453 |

Tabulka 14: Migrační časy jednotlivých standardů ve fosforečnanovém pufru o pH 3 (10 mM) s různými přídávky SDS a 10 % ACN, při napětí -20 kV, teplotě 25 °C.

| Druh elektrolytu | čas - t (min) - průměr, n = 2 | | | |
|----------------------------------|-------------------------------|------------------|-------------------------------|--------------------|
| | chlorin <i>e</i> ₄ | protoporfyrin IX | chlorin <i>e</i> ₆ | feoforbid <i>a</i> |
| Fosforečnanový pufr pH 3 (10 mM) | pík | pík | pík | pík |
| čistý pufr + 10 % ACN | - | - | - | - |
| 5 mM SDS + 10 % ACN | 5,911 | - | 6,342 | - |
| 8 mM SDS + 10 % ACN | 5,105 | 4,778 | 5,565 | 4,908 |
| 10 mM SDS + 10 % ACN | 4,992 | 4,739 | 5,501 | 4,951 |
| 20 mM SDS + 10 % ACN | 4,890 | 4,753 | 5,162 | 4,817 |
| 40 mM SDS + 10 % ACN | 4,845 | 4,735 | 4,934 | 4,724 |
| 60 mM SDS + 10 % ACN | 4,741 | 4,654 | 4,773 | 4,651 |
| 80 mM SDS + 10 % ACN | 4,676 | 4,755 | 4,644 | 4,512 |

Tabulka 15: Migrační časy jednotlivých standardů ve fosforečnanovém pufru o pH 3 (10 mM) s různými přídávky SDS a 10 % ACN a 1 mM β-CD, při napětí -20 kV, teplotě 25 °C.

| Druh elektrolytu | čas - t (min) - průměr, n = 2 | | | |
|----------------------------------|-------------------------------|------------------|-------------------------------|--------------------|
| | chlorin <i>e</i> ₄ | protoporfyrin IX | chlorin <i>e</i> ₆ | feoforbid <i>a</i> |
| Fosforečnanový pufr pH 3 (10 mM) | pík | pík | pík | pík |
| čistý pufr + 1 mM β-CD | - | - | - | - |
| 5 mM SDS + 1 mM β-CD | 5,906 | - | 4,988 | - |
| 8 mM SDS + 1 mM β-CD | 5,274 | - | 4,653 | 4,579 |
| 10 mM SDS + 1 mM β-CD | 4,882 | - | 4,527 | 4,472 |
| 20 mM SDS + 1 mM β-CD | 4,621 | 4,415 | 4,359 | 4,280 |
| 40 mM SDS + 1 mM β-CD | 4,529 | 4,360 | 4,301 | 4,249 |
| 60 mM SDS + 1 mM β-CD | 4,471 | 4,369 | 4,304 | 4,237 |
| 80 mM SDS + 1 mM β-CD | 4,361 | 4,259 | 4,221 | 4,130 |

Tabulka 16: Zdánlivá pohyblivost jednotlivých standardů ve fosforečnanovém pufru o pH 3 (10 mM) s různými přídávky SDS, při napětí -20 kV, teplotě 25 °C.

| Druh elektrolytu | zdánlivá pohyblivost - μ ($\text{m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) | | | |
|----------------------------------|---|------------------|---------------|---------------|
| | chlorin e_4 | protoporfyrin IX | chlorin e_6 | feoforbid a |
| Fosforečnanový pufr pH 3 (10 mM) | pík | pík | pík | pík |
| čistý pufr | - | - | - | - |
| 5 mM SDS | 2,53E-08 | - | 2,33E-08 | - |
| 8 mM SDS | 2,91E-08 | - | 2,88E-08 | 3,60E-08 |
| 10 mM SDS | 3,49E-08 | 3,61E-08 | 3,14E-08 | 3,61E-08 |
| 20 mM SDS | 3,52E-08 | 3,72E-08 | 3,47E-08 | 3,80E-08 |
| 40 mM SDS | 3,64E-08 | 3,84E-08 | 3,66E-08 | 3,84E-08 |
| 60 mM SDS | 3,76E-08 | 3,89E-08 | 3,78E-08 | 3,85E-08 |
| 80 mM SDS | 3,92E-08 | 3,95E-08 | 3,88E-08 | 3,93E-08 |

Tabulka 17: Zdánlivá pohyblivost jednotlivých standardů ve fosforečnanovém pufru o pH 3 (10 mM) s různými přídávky SDS, při napětí -20 kV, teplotě 25 °C.

| Druh elektrolytu | zdánlivá pohyblivost - μ ($\text{m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) | | | |
|----------------------------------|---|------------------|---------------|---------------|
| | chlorin e_4 | protoporfyrin IX | chlorin e_6 | feoforbid a |
| Fosforečnanový pufr pH 3 (10 mM) | pík | pík | pík | pík |
| čistý pufr + 10 % ACN | - | - | - | - |
| 5 mM SDS + 10 % ACN | 2,96E-08 | - | 2,76E-08 | - |
| 8 mM SDS + 10 % ACN | 3,43E-08 | 3,66E-08 | 3,14E-08 | 3,57E-08 |
| 10 mM SDS + 10 % ACN | 3,51E-08 | 3,69E-08 | 3,18E-08 | 3,53E-08 |
| 20 mM SDS + 10 % ACN | 3,58E-08 | 3,68E-08 | 3,39E-08 | 3,63E-08 |
| 40 mM SDS + 10 % ACN | 3,61E-08 | 3,70E-08 | 3,55E-08 | 3,70E-08 |
| 60 mM SDS + 10 % ACN | 3,69E-08 | 3,76E-08 | 3,67E-08 | 3,76E-08 |
| 80 mM SDS + 10 % ACN | 3,74E-08 | 3,68E-08 | 3,77E-08 | 3,88E-08 |

Tabulka 18: Zdánlivá pohyblivost jednotlivých standardů ve fosforečnanovém pufru o pH 3 (10 mM) s různými přídávky SDS a 1 mM β -CD, při napětí -20 kV, teplotě 25 °C.

| Druh elektrolytu | zdánlivá pohyblivost - μ ($\text{m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) | | | |
|----------------------------------|---|------------------|---------------|---------------|
| | chlorin e_4 | protoporfyrin IX | chlorin e_6 | feoforbid a |
| Fosforečnanový pufr pH 3 (10 mM) | pík | pík | pík | pík |
| čistý pufr + 1 mM β -CD | - | - | - | - |
| 5 mM SDS + 1 mM β -CD | 2,96E-08 | - | 3,51E-08 | - |
| 8 mM SDS + 1 mM β -CD | 3,32E-08 | - | 3,76E-08 | 3,82E-08 |
| 10 mM SDS + 1 mM β -CD | 3,58E-08 | - | 3,91E-08 | 3,91E-08 |
| 20 mM SDS + 1 mM β -CD | 3,79E-08 | 3,96E-08 | 4,09E-08 | 4,09E-08 |
| 40 mM SDS + 1 mM β -CD | 3,86E-08 | 4,01E-08 | 4,12E-08 | 4,12E-08 |
| 60 mM SDS + 1 mM β -CD | 3,91E-08 | 4,01E-08 | 4,13E-08 | 4,13E-08 |
| 80 mM SDS + 1 mM β -CD | 4,01E-08 | 4,11E-08 | 4,24E-08 | 4,24E-08 |

2.2 Vzorek SCC

Tabulka 19: Migrační časy vzorku SCC ve fosforečnanovém pufru o pH 3 (10 mM) s různými přídávky SDS, při napětí -20 kV, teplotě 25 °C.

| Druh elektrolytu | čas - t (min) - průměr, n = 2 | |
|-------------------------------------|-------------------------------|-------|
| Fosforečnanový pufr pH 3 (10 mM) | SCC | |
| | pík 1 | pík 2 |
| čistý pufr | - | - |
| 5 mM SDS | 5,684 | 5,910 |
| 8 mM SDS | - | 5,509 |
| 10 mM SDS | 4,766 | 5,349 |
| 20 mM SDS | 4,617 | 4,955 |
| 40 mM SDS | 4,463 | 4,656 |
| 60 mM SDS | 4,368 | 4,471 |
| 80 mM SDS | 4,237 | - |

Tabulka 20: Migrační časy vzorku SCC ve fosforečnanovém pufru o pH 3 (10 mM) s různými přídávky SDS a 10 % ACN, při napětí -20 kV, teplotě 25 °C.

| Druh elektrolytu | čas - t (min) - průměr, n = 2 | |
|-------------------------------------|-------------------------------|-------|
| Fosforečnanový pufr pH 3 (10 mM) | SCC | |
| | pík 1 | pík 2 |
| čistý pufr + 10 % ACN | - | - |
| 5 mM SDS + 10 % ACN | 6,474 | - |
| 8 mM SDS + 10 % ACN | 5,194 | 6,281 |
| 10 mM SDS + 10 % ACN | 5,189 | 6,128 |
| 20 mM SDS + 10 % ACN | 5,042 | 5,662 |
| 40 mM SDS + 10 % ACN | 4,867 | 5,195 |
| 60 mM SDS + 10 % ACN | 4,756 | - |
| 80 mM SDS + 10 % ACN | 4,627 | - |

Tabulka 21: Migrační časy vzorku SCC ve fosforečnanovém pufru o pH 3 (10 mM) s různými přídávky SDS a 1 mM β -CD, při napětí -20 kV, teplotě 25 °C.

| Druh elektrolytu | čas - t (min) - průměr, n = 2 | |
|-------------------------------------|-------------------------------|-------|
| Fosforečnanový pufr pH 3 (10 mM) | SCC | |
| | pík 1 | pík 2 |
| čistý pufr + 1 mM β -CD | - | - |
| 5 mM SDS + 1 mM β -CD | 5,753 | - |
| 8 mM SDS + 1 mM β -CD | 5,433 | - |
| 10 mM SDS + 1 mM β -CD | 5,272 | - |
| 20 mM SDS + 1 mM β -CD | 4,464 | 4,778 |
| 40 mM SDS + 1 mM β -CD | 4,317 | 4,467 |
| 60 mM SDS + 1 mM β -CD | 4,244 | - |
| 80 mM SDS + 1 mM β -CD | 4,084 | - |

Tabulka 22: Zdánlivá pohyblivost vzorku SCC ve fosforečnanovém pufru o pH 3 (10 mM) s různými přídávky SDS, při napětí -20 kV, teplotě 25 °C.

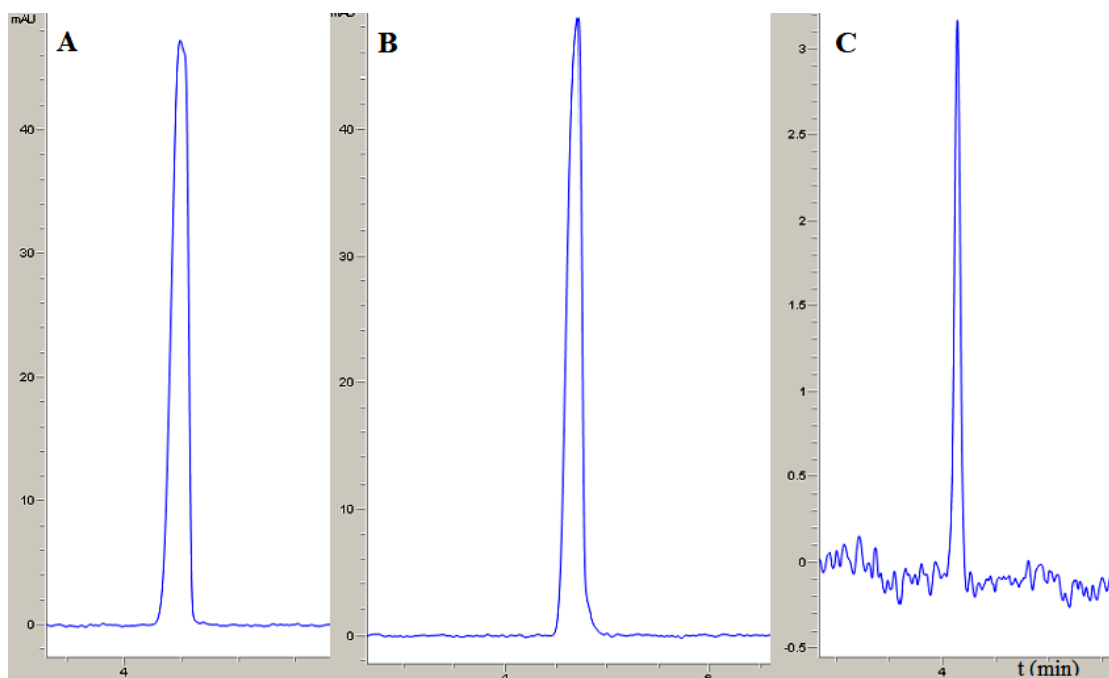
| Druh elektrolytu | zdánlivá pohyblivost - μ ($\text{m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) | |
|-------------------------------------|---|----------|
| Fosforečnanový pufr pH 3 (10 mM) | SCC | |
| | pík 1 | pík 2 |
| čistý pufr | - | - |
| 5 mM SDS | 3,08E-08 | 2,96E-08 |
| 8 mM SDS | - | 3,18E-08 |
| 10 mM SDS | 3,67E-08 | 3,27E-08 |
| 20 mM SDS | 3,79E-08 | 3,53E-08 |
| 40 mM SDS | 3,92E-08 | 3,76E-08 |
| 60 mM SDS | 4,01E-08 | 3,91E-08 |
| 80 mM SDS | 4,13E-08 | - |

Tabulka 23: Zdánlivá pohyblivost vzorku SCC ve fosforečnanovém pufru o pH 3 (10 mM) s různými přídávky SDS a 10 % ACN, při napětí -20 kV, teplotě 25 °C.

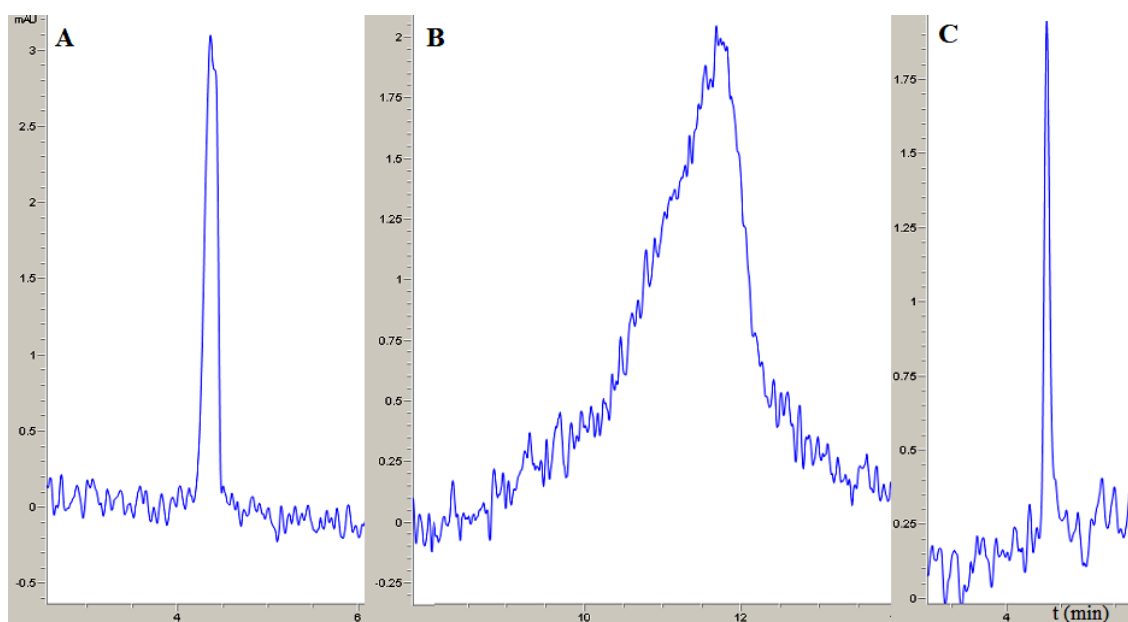
| Druh elektrolytu | zdánlivá pohyblivost - μ ($\text{m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) | |
|-------------------------------------|---|----------|
| Fosforečnanový pufr pH 3 (10 mM) | SCC | |
| | pík 1 | pík 2 |
| čistý pufr + 10 % ACN | - | - |
| 5 mM SDS + 10 % ACN | 2,70E-08 | - |
| 8 mM SDS + 10 % ACN | 3,37E-08 | 2,79E-08 |
| 10 mM SDS + 10 % ACN | 3,37E-08 | 2,86E-08 |
| 20 mM SDS + 10 % ACN | 3,47E-08 | 3,09E-08 |
| 40 mM SDS + 10 % ACN | 3,60E-08 | 3,37E-08 |
| 60 mM SDS + 10 % ACN | 3,68E-08 | - |
| 80 mM SDS + 10 % ACN | 3,78E-08 | - |

Tabulka 24: Zdánlivá pohyblivost vzorku SCC ve fosforečnanovém pufru o pH 3 (10 mM) s různými přídávky SDS a 1 mM β -CD, při napětí -20 kV, teplotě 25 °C.

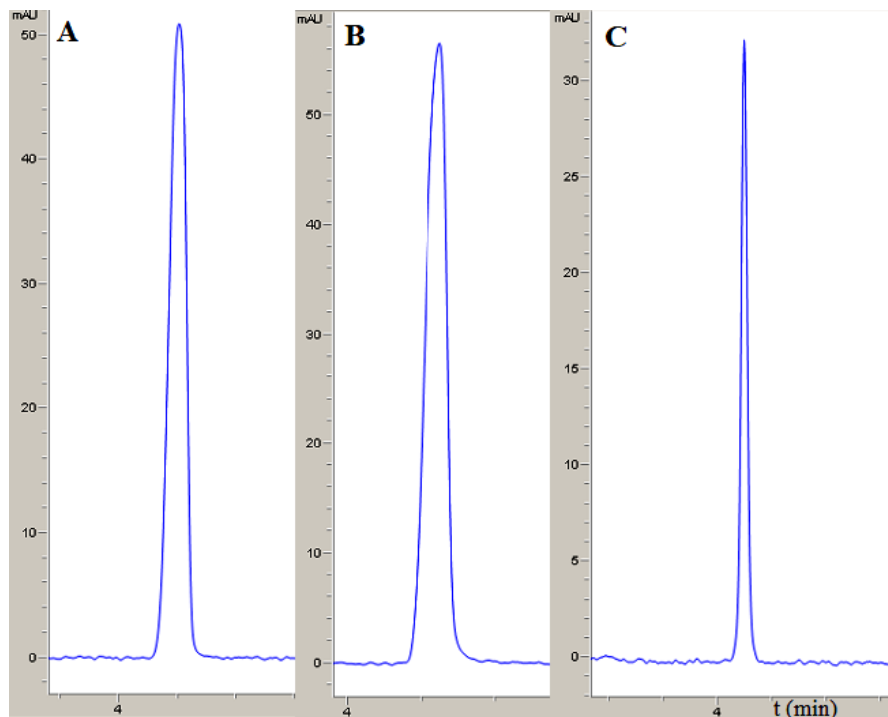
| Druh elektrolytu | zdánlivá pohyblivost - μ ($\text{m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) | |
|-------------------------------------|---|----------|
| Fosforečnanový pufr pH 3 (10 mM) | SCC | |
| | pík 1 | pík 2 |
| čistý pufr + 1 mM β -CD | - | - |
| 5 mM SDS + 1 mM β -CD | 3,04E-08 | - |
| 8 mM SDS + 1 mM β -CD | 3,22E-08 | - |
| 10 mM SDS + 1 mM β -CD | 3,32E-08 | - |
| 20 mM SDS + 1 mM β -CD | 3,92E-08 | 3,66E-08 |
| 40 mM SDS + 1 mM β -CD | 4,05E-08 | 3,92E-08 |
| 60 mM SDS + 1 mM β -CD | 4,12E-08 | - |
| 80 mM SDS + 1 mM β -CD | 4,29E-08 | - |



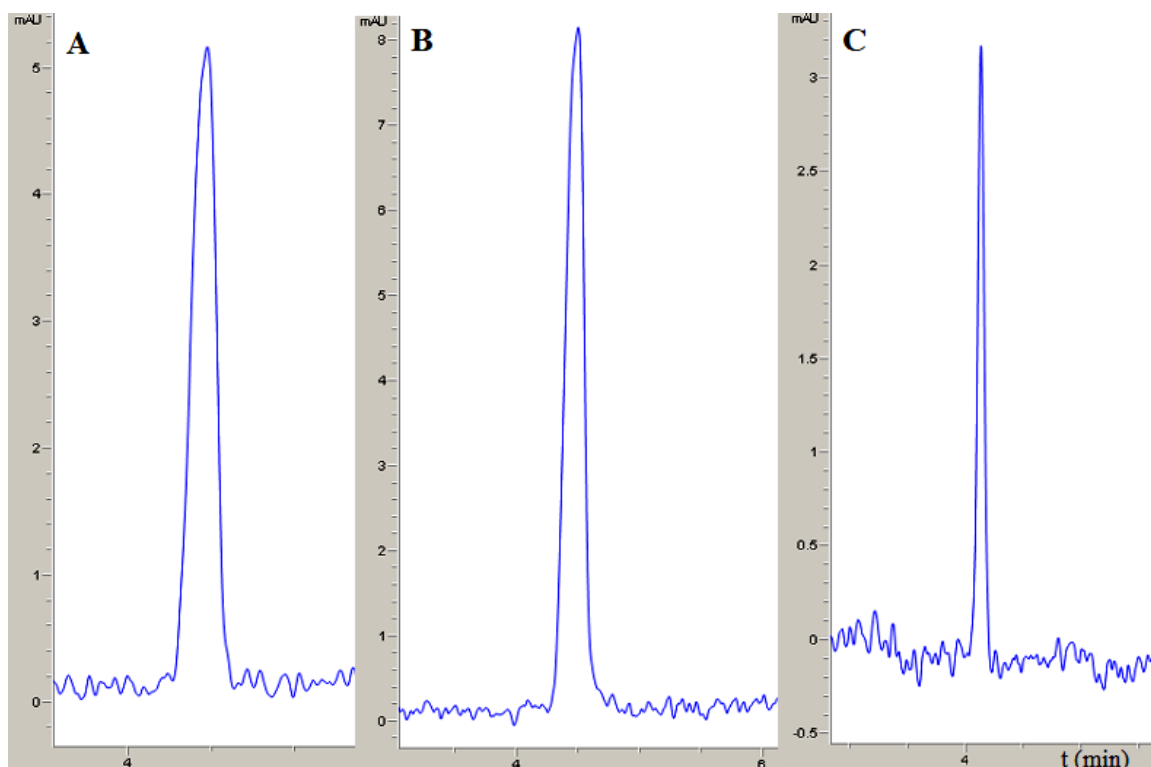
Obrázek P6: Srovnání standardu chlorinu *e₄* v 10 mM fosforečnanovém pufru (pH 3) s 80 mM SDS (A), s 80 mM SDS + 10 % ACN (A) a s 80 mM SDS + 1 mM β -CD (C) při napětí -20 kV, teplotě 25 °C.



Obrázek P7: Srovnání standardu protoporphyrinu *IX* v 10 mM fosforečnanovém pufru (pH 3) s 80 mM SDS (A), s 80 mM SDS + 10 % ACN (B) a s 80 mM SDS + 1 mM β -CD (C) při napětí -20 kV, teplotě 25 °C.



Obrázek P8: Srovnání standardu chlorinu e_6 v 10 mM fosforečnanovém pufru (pH 3) s 80 mM SDS (A), s 80 mM SDS + 10 % ACN (B) a s 80 mM SDS + 1 mM β -CD (C) při napětí -20 kV, teplotě 25 °C.



Obrázek P9: Srovnání standardu feoforbidu a v 10 mM fosforečnanovém pufru (pH 3) s 80 mM SDS (A), s 80 mM SDS + 10 % ACN (B) a s 80 mM SDS + 1 mM β -CD (C) při napětí -20 kV, teplotě 25 °C.

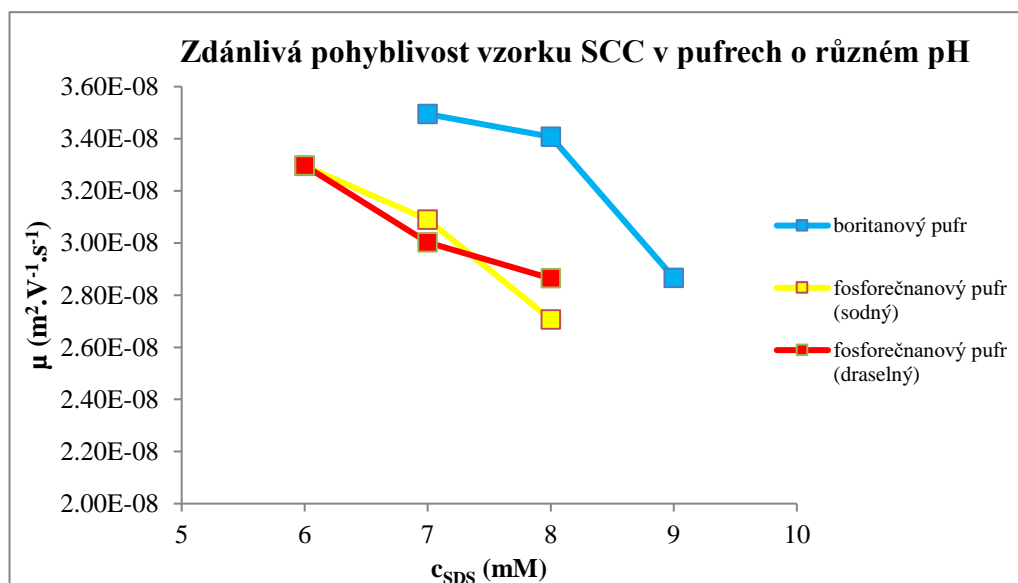
PŘÍLOHA 3
Optimalizace podmínek pro separaci SCC

Tabulka 25: Migrační časy vzorku SCC v pufrch o různém složení a pH, při napětí 20 kV, teplotě 25 °C

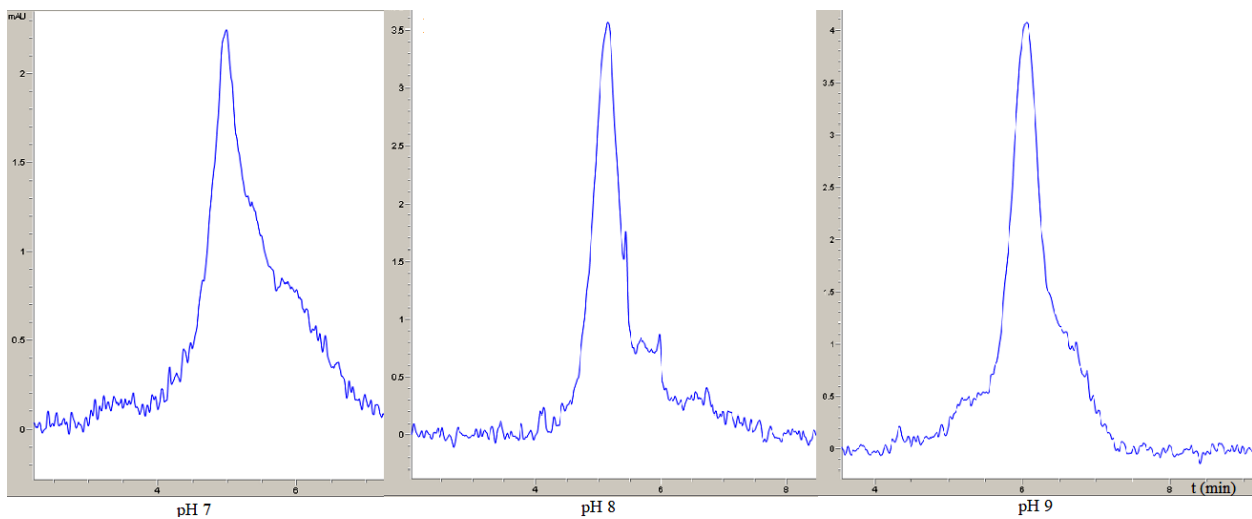
| Druh elektrolytu | koncentrace | pH | čas - t (min) - průměr, n = 2 | |
|--------------------------------|-------------|----|-------------------------------|-------|
| | | | thiomočovina | SCC |
| boritanový pufr | 25 mM | 7 | 2,483 | 5,008 |
| boritanový pufr | | 8 | 2,576 | 5,136 |
| boritanový pufr | | 9 | 2,985 | 6,105 |
| fosforečnanový pufr (sodný) | 10 mM | 6 | 2,826 | 5,310 |
| fosforečnanový pufr (sodný) | | 7 | 2,646 | 5,664 |
| fosforečnanový pufr (sodný) | | 8 | 2,847 | 6,465 |
| fosforečnanový pufr (draselný) | | 6 | 2,670 | 5,308 |
| fosforečnanový pufr (draselný) | | 7 | 2,709 | 5,830 |
| fosforečnanový pufr (draselný) | | 8 | 2,670 | 6,110 |

Tabulka 26: Zdánlivá pohyblivost vzorku SCC v pufrch o různém složení a pH, při napětí 20 kV, teplotě 25 °C

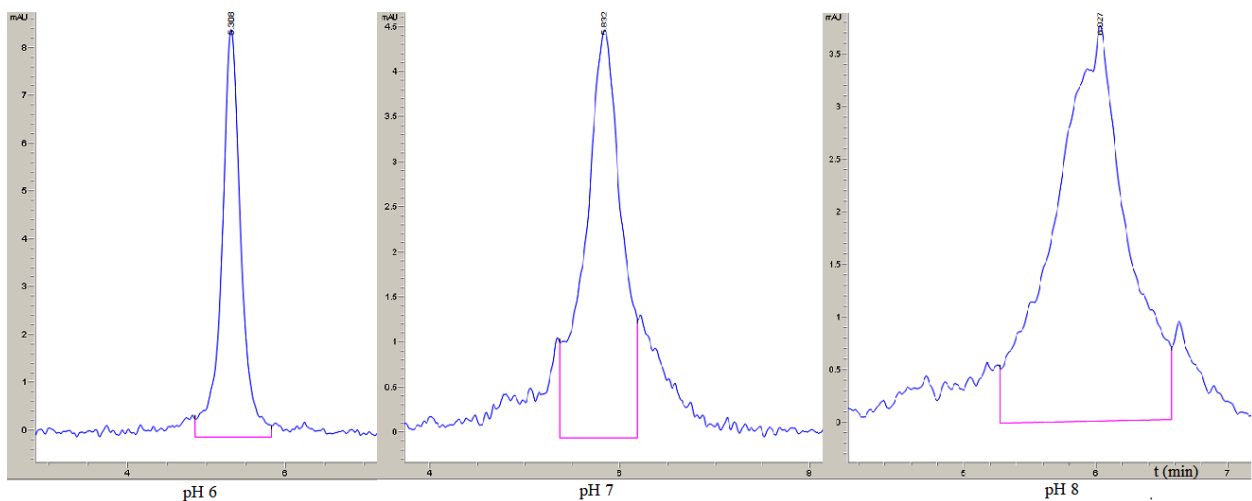
| Druh elektrolytu | koncentrace | pH | zdánlivá pohyblivost - μ ($\text{m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) | |
|--------------------------------|-------------|----|---|----------|
| | | | thiomočovina | SCC |
| boritanový pufr | 25 mM | 7 | 7,05E-08 | 3,49E-08 |
| boritanový pufr | | 8 | 6,79E-08 | 3,41E-08 |
| boritanový pufr | | 9 | 5,86E-08 | 2,87E-08 |
| fosforečnanový pufr (sodný) | 10 mM | 6 | 6,19E-08 | 3,30E-08 |
| fosforečnanový pufr (sodný) | | 7 | 6,61E-08 | 3,09E-08 |
| fosforečnanový pufr (sodný) | | 8 | 6,15E-08 | 2,71E-08 |
| fosforečnanový pufr (draselný) | | 6 | 6,55E-08 | 3,30E-08 |
| fosforečnanový pufr (draselný) | | 7 | 6,46E-08 | 3,00E-08 |
| fosforečnanový pufr (draselný) | | 8 | 6,55E-08 | 2,86E-08 |



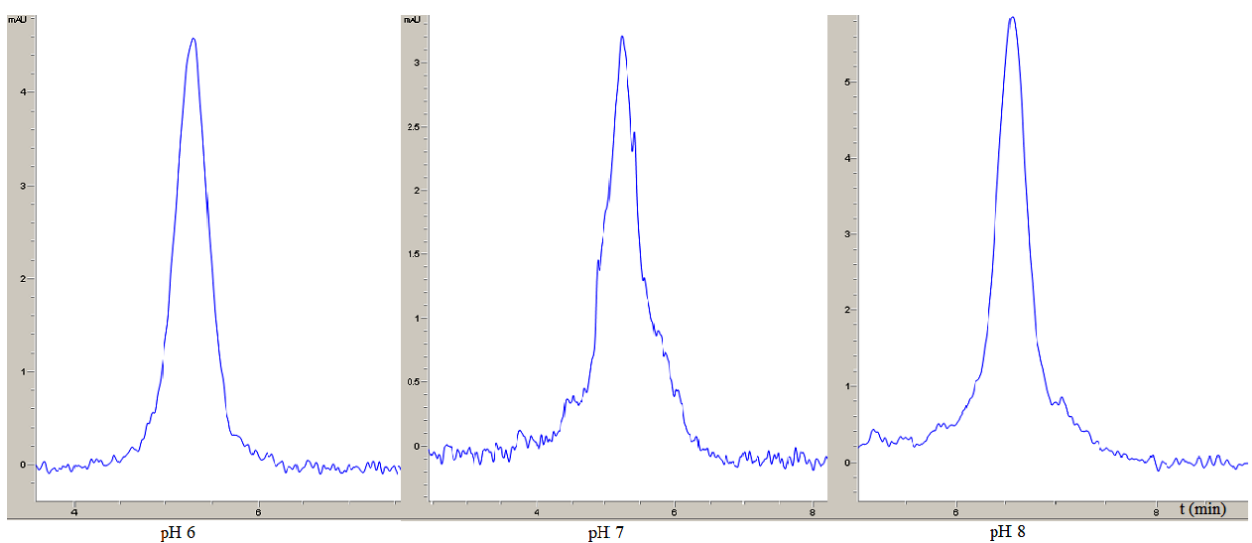
Graf P2: Zdánlivá pohyblivost vzorku SCC v pufrch o různém pH, napětí 20 kV, teplota 25 °C.



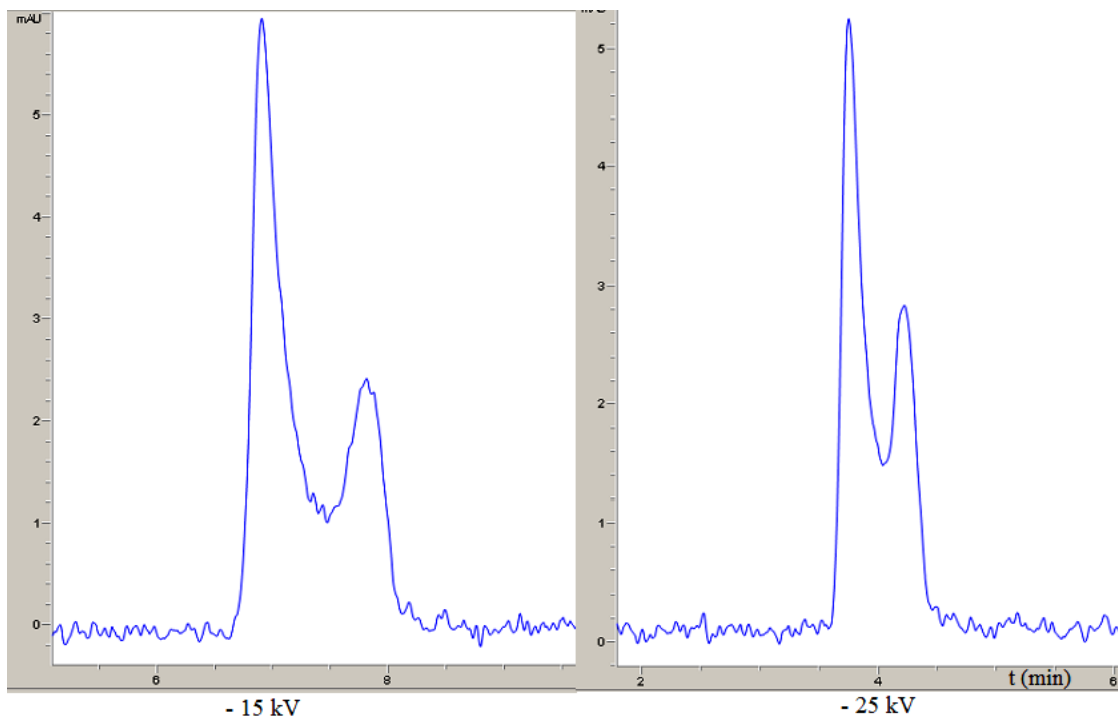
Obrázek P10: Vzorek SCC v 25 mM boritanovém pufru o pH 7, 8, 9 při napětí 20 kV a teplotě 25 °C.



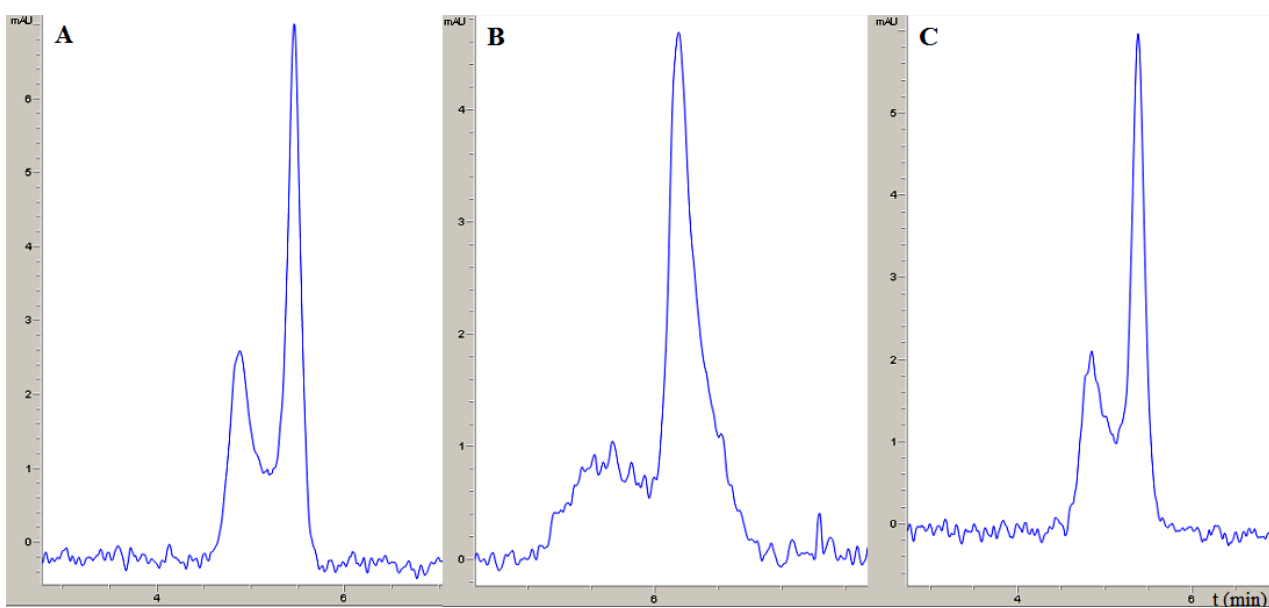
Obrázek P11: Vzorek SCC v 10 mM fosforečnanovém (draselném) pufru o pH 6, 7 a 8 při napětí 20 kV a teplotě 25 °C.



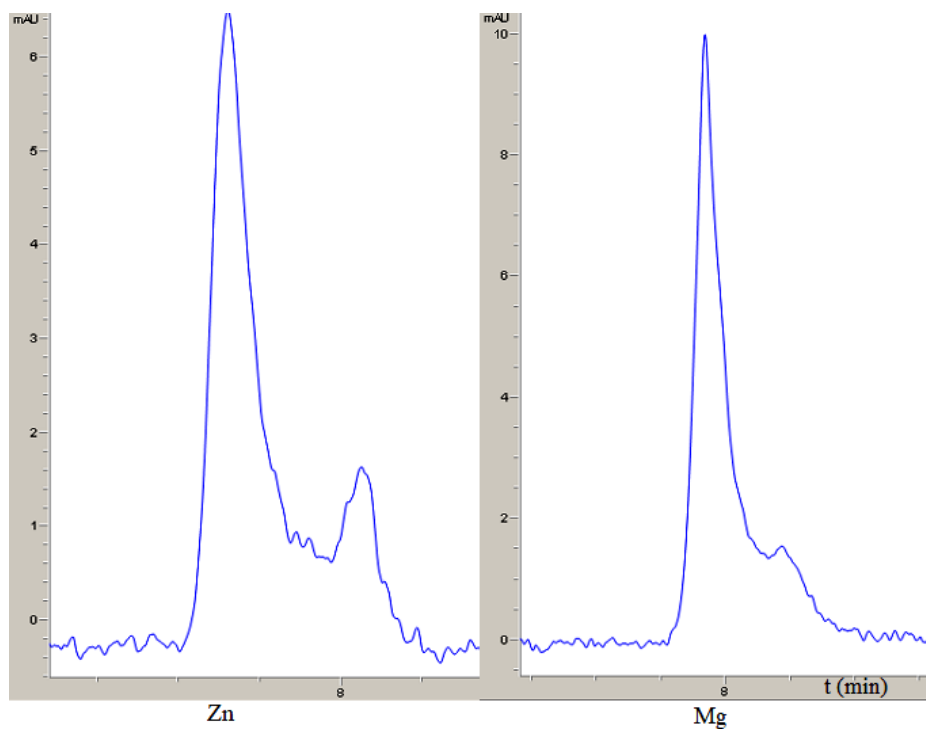
Obrázek P12: Vzorek SCC v 10 mM fosforečnanovém (sodném) pufru o pH 6, 7, 8 při napětí 20 kV a teplotě 25 °C.



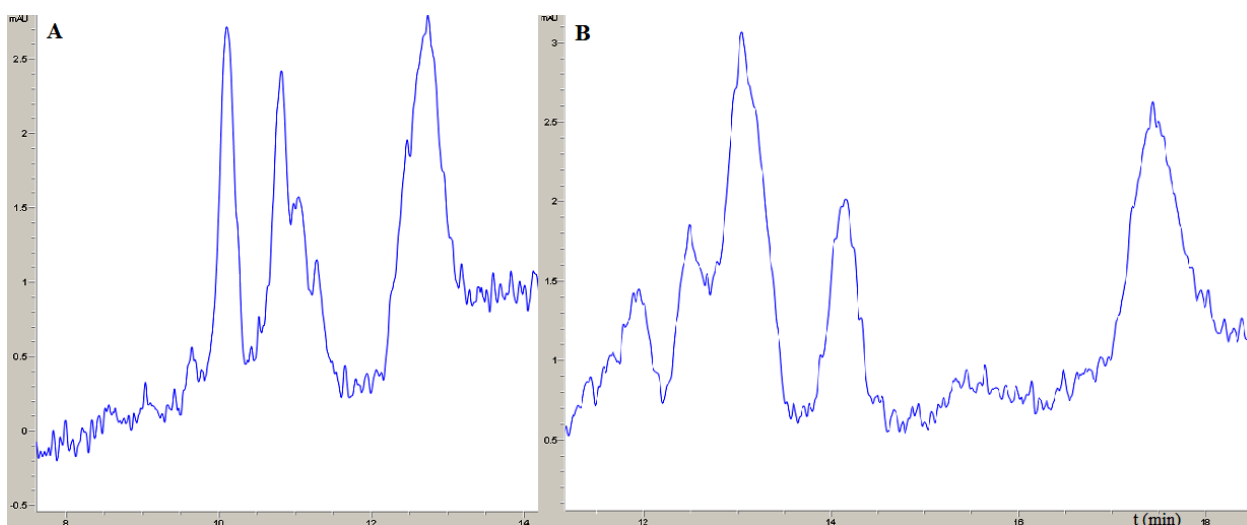
Obrázek P13: Srovnání separace vzorku SCC v 10 mM fosforečnanovém pufru (pH 3) s přidavkem 20 mM SDS a 10 % ACN při napětí -15 kV a -25 kV, teplota 25 °C.



Obrázek P14: Srovnání separace vzorku SCC v 10 mM fosforečnanovém pufru (pH 3) s přidavkem 30 mM SDeS (A) a s 30 mM SDeS a 10 % ACN a s 30 mM SDeS (B) a 1 mM β -CD (C) při napětí -20 kV, teplota 25 °C.



Obrázek P15: Srovnání separace vzorku SCC v 10 mM fosforečnanovém pufru (pH 3) s přidavkem 30 mM SDeS a Zn^{2+} a s 30 mM SDeS a Mg^{2+} při napětí -20 kV, teplota 25 °C.



Obrázek P16: Srovnání separace vzorku SCC v 25 mM boritanovém pufru (pH 9) s přidavkem 20 mM SDS a 20 % ACN (A) a s 20 mM SDS a 30 % ACN (B), napětí 20 kV, teplota 25 °C.