

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

**Online prekoncentrační techniky v kapilární elektroforéze pro
zakoncentrování z velkého objemu vzorku**

Bc. Jaroslava Sadílková

Diplomová práce
2019

UNIVERSITY OF PARDUBICE
FACULTY OF CHEMICAL TECHNOLOGY

**Online preconcentration techniques in capillary
electrophoresis for preconcentration of large sample volume**

Bc. Jaroslava Sadílková

Thesis

2019

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Jaroslava Sadílková**
Osobní číslo: **C17522**
Studijní program: **N1407 Chemie**
Studijní obor: **Analytická chemie**
Název tématu: **Online prekoncentrační techniky v kapilární elektroforéze pro zakoncentrování z velkého objemu vzorku**
Zadávací 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 teoretické části diplomové práce popište principy kapilární elektroforézy, instrumentaci a vybrané módy separace. Rešeršně zpracujte téma online prekoncentračních technik. Pro vybrané vzorky (přírodní antioxidanty - fenolické kyseliny) popište jejich význam a stručně je charakterizujte.
2. Proměřte migrační chování vybraných vzorků fenolických kyselin v kyselých a bazických elektrolytech. Ověřte možnosti použití online prekoncentračních technik pro snížení mezí detekce analyzovaných látek.
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: **5. února 2019**

Termín odevzdání diplomové práce: **9. května 2019**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Karel Ventura, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2019

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.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 7. 5. 2019

Bc. Jaroslava Sadílková

Poděkování

Zde bych chtěla velmi poděkovat vedoucímu mé diplomové práce, doc. Ing. Petru Česlovi, Ph.D. za jeho pomoc, 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.

Anotace

Cílem diplomové práce bylo ověřit možnosti použití online prekoncentračních technik pro snížení mezí detekce analyzovaných látek, kterými byly přírodní antioxidanty. Práce byla zaměřena na proměření migračního chování vybraných fenolických kyselin v kyselých a alkalických elektrolytech. V alkalickém boritanovém elektrolytu byly testovány podmínky zakoncentrování pomocí zesílení elektrického pole v zóně vzorku.

Klíčová slova

Kapilární elektroforéza, micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC), kritická micelární koncentrace (CMC), metody zakoncentrování, fenolické kyseliny.

Annotation

The aim of this thesis was to verify the possibility of using online preconcentration techniques to reduce the limits of detection of analyzed substances, which were natural antioxidants. The work was focused on the measurement of migration behavior of selected phenolic acids in acidic and alkaline electrolytes. Preconcentration conditions were tested in the alkaline boric electrolyte by amplifying the electric field in the sample zone.

Key words

Capillary electrophoresis, micellar electrokinetic chromatography (MEKC), critical micelle concentration (CMC), preconcentration methods, phenolic acids.

Obsah

ÚVOD.....	19
1 TEORETICKÁ ČÁST	20
1.1 Historie.....	20
1.2 Kapilární elektroforéza.....	21
1.2.1 Elektroosmotický tok.....	21
1.2.2 Základní vztahy v kapilární elektroforéze	24
1.3 Instrumentace	25
1.3.1 Kapiláry	26
1.3.2 Dávkování vzorku	27
1.3.3 Detekce	28
1.3.3.1 Detekce pomocí UV – VIS.....	29
1.3.3.2 Detekce pomocí laserem indukovanou fluorescencí	30
1.3.3.3 Hmotnostní spektrometrie (MS).....	30
1.3.3.4 Elektrochemická detekce.....	31
1.4 Kapilární zónová elektroforéza (CZE).....	32
1.5 Micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC).....	33
1.5.1 Kritická micelární koncentrace (CMC)	35
1.6 Metody používané k zakoncentrování vzorku	36
1.6.1 Online prekoncentrace ionizovatelných analytů	36
1.6.1.1 Zakoncentrování vzorku zesílením pole.....	36
1.6.2 Zakoncentrování vzorku z velkého objemu – LVSS.....	37
1.6.3 Zakoncentrování přechodným pH rozhraním.....	39
1.7 Antioxidanty.....	40
1.7.1 Fenolické kyseliny.....	40
1.8 Charakteristika jednotlivých fenolických kyselin	40
2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	46
2.1 Chemikálie a pomůcky.....	46
2.2 Použité přístroje a vybavení	46
2.3 Příprava základních elektrolytů.....	46
2.4 Příprava vzorků	47
2.5 Postup analýzy	47
3 VÝSLEDKY A DISKUZE	48
3.1 Migrační charakteristiky v základních elektrolytech	48

3.2	Měření naplnění kapiláry při dávkování	49
3.3	Metoda zakoncentrování přechodným pH rozhraním.....	50
3.4	Zakoncentrování vzorku z velkého objemu zesílením elektrického pole	53
3.4.1	Zakoncentrování v boritanovém elektrolytu o vysoké koncentraci	58
3.4.2	Vzorky rozpuštěné v deionizované vodě nebo čistém acetonitrilu	64
3.4.3	Vliv rozpouštědla vzorků na zakoncentrování a separaci	66
3.4.4	Směs vody a acetonitrilu jako rozpouštědla vzorků	69
3.5	Metoda zakoncentrování pomocí micel	74
4	ZÁVĚR	78
5	POUŽITÁ LITERATURA	80
6	PŘÍLOHA . 1	87

Seznam obrázků

Obrázek 1: Vznik elektroosmotického toku, převzato a upraveno z [9].	22
Obrázek 2: A) pístový profil toku (CE), B) parabolický profil toku (LC), převzato a upraveno z [10].	23
Obrázek 3: Obecné schéma elektroforézy, převzato z [13].	26
Obrázek 4: Možnosti zvýšení citlivosti detekce A) bublinková cela, B) Z - cela, převzato a upraveno z [21].	29
Obrázek 5: Typy vodivostní detekce A) kontaktní vodivostní detekce, B) bezkontaktní vodivostní detekce, převzato z [34].	32
Obrázek 6: Rozdělení látek A a B do svých zón, převzato a upraveno z [37].	33
Obrázek 7: Micely, převzato z [41].	34
Obrázek 8: Schéma principu separace v micelární elektrokinetické chromatografii (MEKC), převzato a upraveno z [42].	34
Obrázek 9: Změna fyzikálních vlastností roztoku tenzidu při dosažení CMC, převzato z [46].	35
Obrázek 10: LVSS s přepnutou polaritou, A) dávkování vzorku připraveného v matrici s nízkou vodivostí a aplikace napětí s opačnou polaritou, než je použita pro separaci zón a odstranění matrice vzorku, B) anionty jsou zaostřeny do úzké zóny a je odstraněno co nejvíce matrice vzorku, hodnota vkládaného napětí = 0 V, C) aplikace napětí s kladnou polaritou pro separaci a detekci zaostřených zón, převzato a upraveno z [52].	38
Obrázek 11: LVSS bez přepínání polarity, A) dávkování vzorku připraveného v matrici s nízkou vodivostí a vložení napětí se zápornou polaritou pro zaostření zón a odstranění matrice vzorku B) anionty jsou zaostřeny do úzké zóny a většina matrice je ze vzorku odstraněna, napětí je zachováno, protože rychlost EOF je vždy pomalejší než elektroforetická rychlost aniontů C) separace a následná detekce zaostřených zón, převzato a upraveno z [52].	39
Obrázek 12: Kyselina syringová, převzato z [59].	41
Obrázek 13: Kyselina salicylová, převzato z [61].	41
Obrázek 14: Kyselina kávová, převzato z [63].	42
Obrázek 15: Kyselina 4 - hydroxybenzoová, převzato z [65].	42
Obrázek 16: Kyselina ferulová, převzato z [67].	43
Obrázek 17: Kyselina gallová, převzato z [69].	43
Obrázek 18: Kyselina vanilová, převzato z [71].	44

Obrázek 19: Kyselina <i>p</i> -kumarová, převzato z [74].	44
Obrázek 20: Kyselina chlorogenová, převzato z [76].	45
Obrázek 21: Směs fenolických kyselin, elektrolyt boritanový pufr o pH 8,5, prvních 10 s – 30 kV, poté až do konce analýzy napětí 30 kV, dávkování 50 mBar (~5,1 kPa)/30 s.	54
Obrázek 22: Směs fenolických kyselin, elektrolyt boritanový pufr o pH 8,5, napětí 30 kV, dávkování 50 mBar (~5,1 kPa)/30 s.	55
Obrázek 23: Směs fenolických kyselin, elektrolyt boritanovém pufr o pH 8, napětí 30 kV, dávkování 50 mBar (~5,1 kPa)/20 s.	57
Obrázek 24: Směs fenolických kyselin, elektrolyt boritanový pufr o pH 8, napětí 30 kV, dávkování 50 mBar (~5,1 kPa)/5 s. 1 – kys. ferulová, 2 – kys. syringová, 3 – kys. <i>p</i> -kumarová, 4 – kys. vanilová, 5 – kys. 4 –hydroxybenzoová, 6 – kys. salicylová a chlorogenová, 7 – kys. kávová, 8 – kys. gallová.	60
Obrázek 25: Směs fenolických kyselin, elektrolyt boritanový pufr o pH 8, napětí 30 kV, dávkování 50 mBar (~5,1 kPa)/5 s. 1 – kys. ferulová, 2 – kys. syringová, 3 – kys. <i>p</i> -kumarová, 4 – kys. vanilová, 5 – kys. 4 – hydroxybenzoová, 6 – kys. salicylová a chlorogenová, 7 – kys. kávová, 8 – kys. gallová.	61
Obrázek 26: Směs fenolických kyselin, elektrolyt boritanový pufr o pH 8, napětí 30 kV, dávkování 50 mBar (~5,1 kPa)/10 s. 1 – kys. ferulová, 2 – kys. syringová, 3 – kys. <i>p</i> -kumarová, 4 – kys. vanilová, 5 – kys. 4 – hydroxybenzoová, 6 – kys. salicylová a chlorogenová, 7 – kys. kávová, 8 – kys. gallová.	62
Obrázek 27: Směs fenolických kyselin, elektrolyt boritanový pufr o pH 8, napětí 30 kV, dávkování 50 mBar (~5,1 kPa)/20 s. Jednotlivé složky směsi se nepodařilo identifikovat.	63
Obrázek 28: Směs fenolických kyselin, elektrolyt boritanový pufr o pH 8, napětí 30 kV, dávkování 50 mBar (~5,1 kPa)/30 s. U této směsi již nelze identifikovat, o jaký analyt se jedná. Píky mají tendenci se spojovat do jednoho velkého píku.	64
Obrázek 29: Směs fenolických kyselin ve vodě, elektrolyt boritanový pufr o pH 8, napětí 30 kV, dávkování 50 mBar (~5,1 kPa)/10 s.	65
Obrázek 30: Směs fenolických kyselin v acetonitrilu, elektrolyt boritanový pufr o pH 8, napětí 30 kV, dávkování 50 mBar (~5,1 kPa)/10 s.	65
Obrázek 31: Směs fenolických kyselin ve vodě, elektrolyt boritanový pufr o pH 8, napětí 30 kV, dávkování 50 mBar (~5,1 kPa)/20 s.	66
Obrázek 32: Směs fenolických kyselin ve vodě, elektrolyt boritanový pufr o pH 8, napětí 30 kV, dávkování 50 mBar (~5,1 kPa)/5 s.	67

Obrázek 33: Směs fenolických kyselin v acetonitrilu, elektrolyt boritanový pufr o pH 8, napětí 30 kV, dávkování 50 mBar (~5,1 kPa)/5 s.....	67
Obrázek 34: Směs fenolických kyselin ve vodě, elektrolyt boritanový pufr o pH 8, napětí 30 kV, dávkování 50 mBar (~5,1 kPa)/10 s.....	68
Obrázek 35: Směs fenolických kyselin v acetonitrilu, elektrolyt boritanový pufr o pH 8, napětí 30 kV, dávkování 50 mBar (~5,1 kPa)/10 s.....	68
Obrázek 36: Směs fenolických kyselin ve vodě, elektrolyt boritanový pufr o pH 8, napětí 30 kV, dávkování 50 mBar (~5,1 kPa)/20 s.....	69
Obrázek 37: Směs fenolických kyselin ve vodě (0 % acetonitrilu), elektrolyt boritanový pufr o pH 8, napětí 30 kV, dávkování 50 mBar (~5,1 kPa)/5 s.....	70
Obrázek 38: Směs fenolických kyselin ve 20 % acetonitril, elektrolyt boritanový pufr o pH 8, napětí 30 kV, dávkování 50 mBar (~5,1 kPa)/5 s.....	70
Obrázek 39: Směs fenolických kyselin ve 40 % acetonitrilu, elektrolyt boritanový pufr o pH 8, napětí 30 kV, dávkování 50 mBar (~5,1 kPa)/5 s.....	71
Obrázek 40: Směs fenolických kyselin v 60 % acetonitrilu, elektrolyt boritanový pufr o pH 8, napětí 30 kV, dávkování 50 mBar (~5,1 kPa)/5 s.....	71
Obrázek 41: : Směs fenolických kyselin ve vodě (0 % acetonitrilu), elektrolyt boritanový pufr o pH 8, napětí 30 kV, dávkování 50 mBar (~5,1 kPa)/30 s.....	72
Obrázek 42: Směs fenolických kyselin v 20 % acetonitrilu, elektrolyt boritanový pufr o pH 8, napětí 30 kV, dávkování 50 mBar (~5,1 kPa)/30 s.....	72
Obrázek 43: Směs fenolických kyselin ve 40 % acetonitrilu, elektrolyt boritanový pufr o pH 8, napětí 30 kV, dávkování 50 mBar (~5,1 kPa)/30 s.....	73
Obrázek 44: Směs fenolických kyselin v 60 % acetonitrilu, elektrolyt boritanový pufr o pH 8, napětí 30 kV, dávkování 50 mBar (~5,1 kPa)/30 s.....	73
Obrázek 45: Směs fenolických kyselin, 25 mmol/l SDS v 25 mmol/l boritanovém pufru, dávkování 50 mBar (~5,1 kPa)/5 s. Jednotlivé píky se nepodařilo identifikovat.....	75
Obrázek 46: Směs fenolických kyselin, 25 mmol/l SDS v 10 mmol/l fosforečnanovém pufru, napětí -20 kV, dávkování 50 mBar (~5,1 kPa)/5 s. 1 – kys. ferulová, 2 – kys.salicylová, 3 – kys. <i>p</i> -kumarová, 4 – kys. chlorogenová, 5 – kys. kávová, 6 – neidentifikováno.....	76
Obrázek 47: Směs fenolických kyselin, 25 mmol/l SDS v 10 mmol/l fosforečnanovém pufru, napětí -20 kV, dávkování 50 mBar (~5,1 kPa)/30 s.....	77

Seznam tabulek

Tabulka 1: Přehled detekčních metod, převzato a upraveno z [19].....	28
Tabulka 2: Vybrané charakteristiky fenolických kyselin, převzato z [77,78,79].	45
Tabulka 3: Thiomočovina ve vodě, BGE: boritanový pufr o pH 8 (100 mmol/l)	49
Tabulka 4: Thiomočovina v BGE, BGE: boritanový pufr o pH 8 (100 mmol/l).....	49
Tabulka 5: Podmínky měření č. 1 – 20 mmol/l fosforečnanový pufr, koncentrace látek 50 mg/l.	87
Tabulka 6: Podmínky měření č. 2 - 20 mmol/l fosforečnanový pufr, koncentrace látek 50 mg/l.	87
Tabulka 7: Podmínky měření č. 3 - 20 mmol/l boritanový pufr, koncentrace látek 50 mg/l....	87
Tabulka 8: Migrační charakteristiky pro podmínky měření č. 3.	88
Tabulka 9: Podmínky měření č. 4 - 20 mmol/l boritanový pufr, koncentrace látek 50 mg/l....	88
Tabulka 10: Migrační charakteristiky pro podmínky měření č.4.	89
Tabulka 11: Podmínky měření č. 5 - 20 mmol/l boritanový pufr, koncentrace látek 50 mg/l..	89
Tabulka 12: Migrační charakteristiky pro podmínky měření č. 5.	90
Tabulka 13: Podmínky měření č. 6 - 20 mmol/l boritanový pufr, koncentrace látek 50 mg/l..	90
Tabulka 14: Migrační charakteristiky pro podmínky měření č. 6.	91
Tabulka 15: Podmínky měření č. 7 - 20 mmol/l boritanový pufr, koncentrace látek 50 mg/l..	91
Tabulka 16: Migrační charakteristiky pro podmínky měření č. 7.	92
Tabulka 17: Podmínky měření č. 8 - 20 mmol/l boritanový pufr a 10 mmol/l fosforečnanový pufr, koncentrace látek 50 mg/l.	92
Tabulka 18: Podmínky měření č. 9 - 20 mmol/l boritanový pufr a 10 mmol/l fosforečnanový pufr, koncentrace látek 50 mg/l.	92
Tabulka 19: Migrační charakteristiky pro podmínky měření č. 9.	93
Tabulka 20: Podmínky měření č. 10 – 20 mmol/l boritanový pufr a 10 mmol/l fosforečnanový pufr, koncentrace látek 50 mg/l u kyseliny kávové a gallové 25 mg/l.	93
Tabulka 21: Podmínky měření č. 11 – 20 mmol/l boritanový pufr a 10 mmol/l fosforečnanový pufr, koncentrace látek 50 mg/l u kyseliny kávové a gallové 25 mg/l.	93
Tabulka 22: Podmínky měření č. 12 –20 mmol/l boritanový pufr a 10 mmol/l fosforečnanový pufr, koncentrace látek 50 mg/l u kyseliny kávové a gallové 25 mg/l.	93
Tabulka 23: Podmínky měření č. 13 – 20 mmol/l boritanový pufr a 10 mmol/l fosforečnanový pufr, koncentrace látek 50 mg/l u kyseliny kávové a gallové 25 mg/l.	94

Tabulka 24: Podmínky měření č. 14 – 20 mmol/l boritanový pufr a 10 mmol/l fosforečnanový pufr, koncentrace látek 50 mg/l u kyseliny kávové a gallové 25 mg/l.	94
Tabulka 25: Podmínky měření č. 15 – 20 mmol/l boritanový pufr a 10 mmol/l fosforečnanový pufr, první vzorek poté kyselý pH, koncentrace látek 50 mg/l u kyseliny kávové a gallové 25 mg/l.	94
Tabulka 26: Podmínky měření č. 16 - 20 mmol/l boritanový pufr a 10 mmol/l fosforečnanový pufr, první vzorek poté kyselý pH, koncentrace látek 50 mg/l u kyseliny kávové a gallové 25 mg/l.	95
Tabulka 27: Podmínky měření č. 17 - 20 mmol/l boritanový pufr a 10 mmol/l fosforečnanový pufr, první vzorek poté kyselý pH, koncentrace látek 50 mg/l u kyseliny kávové a gallové 25 mg/l.	95
Tabulka 28: Podmínky měření č. 18 – 20 mmol/l boritanový pufr a 10 mmol/l fosforečnanový pufr, první kyselý pH 2 poté vzorek, koncentrace látek 50 mg/l u kyseliny kávové a gallové 25 mg/l.	95
Tabulka 29: Podmínky měření č. 19 - 20 mmol/l boritanový pufr a 10 mmol/l fosforečnanový pufr, první kyselý pH 2 poté vzorek, koncentrace látek 50 mg/l u kyseliny kávové a gallové 25 mg/l.	96
Tabulka 30: Podmínky měření č. 20 - 20 mmol/l boritanový pufr a 10 mmol/l fosforečnanový pufr, první kyselý pH 2 poté vzorek, koncentrace látek 50 mg/l u kyseliny kávové a gallové 25 mg/l.	96
Tabulka 31: Podmínky měření č. 21 - 20 mmol/l boritanový pufr a 10 mmol/l fosforečnanový pufr, první kyselý pH 2 poté vzorek, koncentrace látek 50 mg/l u kyseliny kávové a gallové 25 mg/l.	96
Tabulka 32: Podmínky měření č. 22 - 20 mmol/l boritanový pufr, koncentrace látek 50 mg/l u kyseliny kávové a gallové 25 mg/l.	97
Tabulka 33: Migrační charakteristiky pro podmínky měření č. 22.	97
Tabulka 34: Podmínky měření č. 23 – 20 mmol/l boritanový pufr, koncentrace látek 50 mg/l u kyseliny kávové a gallové 25 mg/l.	97
Tabulka 35: Migrační charakteristiky pro podmínky měření č. 23.	98
Tabulka 36: Podmínky měření č. 24 - 20 mmol/l boritanový pufr, koncentrace látek 15 mg/l.	98
Tabulka 37: Migrační charakteristiky pro podmínky měření č. 24.	99
Tabulka 38: Podmínky měření č. 25 - 20 mmol/l boritanový pufr, koncentrace látek 15 mg/l.	99

Tabulka 39: Migrační charakteristiky pro podmínky měření č. 25.	100
Tabulka 40: Podmínky měření č. 26 - 20 mmol/l boritanový pufr, koncentrace látek 15 mg/l.	100
Tabulka 41: Migrační charakteristiky pro podmínky měření č. 26.	101
Tabulka 42: Podmínky měření č. 27 - 20 mmol/l boritanový pufr, koncentrace látek 15 mg/l.	101
Tabulka 43: Migrační charakteristiky pro podmínky měření č. 27.	102
Tabulka 44: Podmínky měření č. 28 - 20 mmol/l boritanový pufr, koncentrace látek 15 mg/l.	102
Tabulka 45: Migrační charakteristiky pro podmínky měření č. 28.	103
Tabulka 46: Podmínky měření č. 29 - 20 mmol/l boritanový pufr, koncentrace látek 15 mg/l.	103
Tabulka 47: Migrační charakteristiky pro podmínky měření č. 29.	104
Tabulka 48: Podmínky měření č. 30 - 20 mmol/l boritanový pufr, koncentrace látek 15 mg/l.	104
Tabulka 49: Migrační charakteristiky pro podmínky měření č. 30.	105
Tabulka 50: Podmínky měření č. 31 - 20 mmol/l boritanový pufr, koncentrace látek 15 mg/l.	105
Tabulka 51: Migrační charakteristiky pro podmínky měření č. 31.	106
Tabulka 52: Podmínky měření č. 32 – 20 mmol/l boritanový pufr, koncentrace látek 0,05 mg/l.	106
Tabulka 53: Podmínky měření č. 33 - 20 mmol/l boritanový pufr, koncentrace látek 0,05 mg/l.	106
Tabulka 54: Podmínky měření č. 34 - 20 mmol/l boritanový pufr, koncentrace látek 0,05 mg/l.	107
Tabulka 55: Podmínky měření č. 35 - 20 mmol/l boritanový pufr, koncentrace látek 0,05 mg/l.	107
Tabulka 56: Podmínky měření č. 36 - 100 mmol/l boritanový pufr, koncentrac látek 0,05 mg/l.	107
Tabulka 57: Podmínky měření č. 37 – 100 mmol/l boritanový pufr, koncentrace látek 50 mg/l.	107
Tabulka 58: Migrační charakteristiky pro podmínky měření č. 37.	108
Tabulka 59: Podmínky měření č. 38 – 100 mmol/l boritanový pufr, koncentrace látek 0,1 mg/l.	108

Tabulka 60: Migrační charakteristiky pro podmínky měření č. 38.	108
Tabulka 61: Podmínky měření č. 39 – 100 mmol/l boritanový pufr, koncentrace látek 0,1 mg/l.	109
Tabulka 62: Podmínky měření č. 40 – 100 mmol/l boritanový pufr, koncentrace látek 0,1 mg/l.	109
Tabulka 63: Podmínky měření č. 41 – 100 mmol/l boritanový pufr, koncentrace látek 10 mg/l.	109
Tabulka 64: Migrační charakteristiky pro podmínky měření č. 41.	110
Tabulka 65: Podmínky měření č. 42 – 100 mmol/l boritanový pufr, koncentrace látek 0,1 mg/l.	110
Tabulka 66: Migrační charakteristiky pro podmínky měření č. 42.	111
Tabulka 67: Podmínky měření č. 43 – 100 mmol/l boritanový pufr, koncentrace látek 10 mg/l.	111
Tabulka 68: Migrační charakteristiky pro podmínky měření č. 43.	112
Tabulka 69: Podmínky měření č. 44 – 100 mmol/l boritanový pufr, koncentrace látek 10 mg/l.	112
Tabulka 70: Migrační charakteristiky pro podmínky měření č. 44.	113
Tabulka 71: Podmínky měření č. 45 – 100 mmol/l boritanový pufr, koncentrace látek 10 mg/l.	113
Tabulka 72: Migrační charakteristiky pro podmínky měření č. 45.	114
Tabulka 73: Podmínky měření č. 46 – 100 mmol/l boritanový pufr, koncentrace látek 0,1 mg/l – pouze směs.	114
Tabulka 74: Podmínky měření č. 47 – 100 mmol/l boritanový pufr, koncentrace látek 0,1 mg/l – pouze směs.	114
Tabulka 75: Podmínky měření č. 48 – 100 mmol/l boritanový pufr, koncentrace látek 0,1 mg/l – pouze směs.	115
Tabulka 76: Podmínky měření č. 49 – 150 mmol/l boritanový pufr, koncentrace látek 0,1 mg/l, pouze směs.	115
Tabulka 77: Podmínky měření č. 50 – 150 mmol/l boritanový pufr, koncentrace látek 0,1 mg/l – pouze směs.	115
Tabulka 78: Podmínky měření č. 51 – 150 mmol/l boritanový pufr, koncentrace látek 0,1 mg/l – pouze směs.	115
Tabulka 79: Podmínky měření č. 52 – 150 mmol/l boritanový pufr, koncentrace látek 0,1 mg/l – pouze směs.	116

Tabulka 80: Podmínky měření č. 53 – 150 mmol/l boritanový pufr, koncentrace látek 0,1 mg/l – pouze směs, rozpouštědla % směsi H ₂ O + ACN (0 - 60%).....	116
Tabulka 81: Podmínky měření č. 54 – 150 mmol/l boritanový pufr, koncentrace látek 0,1 mg/l – pouze směs, rozpouštědla % směsi H ₂ O + ACN (0 - 60%).....	116
Tabulka 82: Podmínky měření č. 55 – 25 mmol/l SDS a boritanový pufr, koncentrace látek 10 mg/l – měření s micelami.....	116
Tabulka 83: Migrační charakteristiky pro podmínky měření č. 55.	117
Tabulka 84: Podmínky měření č. 56 – 25 mmol/l SDS a boritanový pufr, koncentrace látek 0,1 mg/l – měření s micelami.....	117
Tabulka 85: Podmínky měření č. 57 – 25 mmol/l SDS a boritanový pufr, koncentrace látek 0,1 mg/l – měření s micelami.....	117
Tabulka 86: Podmínky měření č. 58 – 50 mmol/l SDS a 25 mmol/l boritanový pufr, koncentrace látek 10 mg/l – měření s micelami.	118
Tabulka 87: Podmínky měření č. 59 – 25 mmol/l SDS a 10 mmol/l fosforečnanový pufr, koncentrace látek 10 mg/l – měření s micelami.	118
Tabulka 88: Migrační charakteristiky pro podmínky měření č. 59.	118
Tabulka 89: Podmínky měření č. 60 – 25 mmol/l SDS a 10 mmol/l fosforečnanový pufr, koncentrace látek 0,1 mg/l – měření s micelami.	119

Seznam zkratek

BGE – základní elektrolyt (background electrolyte)

CE – kapilární elektroforéza

CMC – kritická micelární koncentrace (critical micelle concentration)

CZE – kapilární zónová elektroforéza

DTAB – dodecyltrimethylamoniumbromid

EOF – elektroosmotický tok (electroosmotic flow)

ESI – ionizace elektrosprejem

FASS – zakoncentrování vzorku zesílením pole (field amplified sample stacking)

HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie

LC – kapalinová chromatografie

LIF – laserem indukovaná fluorescence

LVSS – zakoncentrování vzorku z velkého objemu (large volume sample stacking)

MALDI – desorpce a ionizace vzorku laserem za účasti matrice (matrix assisted laser desorption/ionization)

MEKC – micelární elektrokinetická chromatografie

MS – hmotnostní spektrometrie

NMR – nukleární magnetická rezonance (nuclear magnetic resonance)

SDS – dodecylsírán sodný

tITP – přechodná izotachoforéza (transient isotachopheresis)

ÚVOD

Kapilární elektroforézu řadíme mezi moderní separační analytické metody. Tato analytická metoda je založena, jako jiné druhy elektroforéz, na rozdílné migrační rychlosti jednotlivých analytů v elektrickém poli. Celá analýza probíhá nejčastěji v křemenné kapiláře. Oba konce křemenné kapiláry jsou ponořeny do zásobníků se základním elektrolytem společně s elektrodami, na které je vkládáno vysoké napětí. Na jednom konci kapiláry je dávkován vzorek a na druhém konci kapiláry je umístěn detektor. Signál z detektoru je vyhodnocen počítačem s vhodným programem. Výsledkem analýzy je elektroforeogram, který vyobrazuje závislost signálu na čase [1]. Diplomová práce je zaměřená na online prekoncentrační techniky v kapilární elektroforéze. V této práci byla ověřena možnost použití prekoncentračních technik pro snížení mezí detekce analyzovaných látek. Všechny analyty byly detekovány UV detekcí.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Historie

Elektroforéza využívá k separaci rozdílné migrace nabitých částic analytu v elektrickém poli. Elektroforézu jako separační techniku představil Tiselius v roce 1937. Ve svých experimentech umístil směs proteinů mezi pufrované roztoky, kde bylo aplikováno elektrické pole. Zjistil, že komponenty vzorku migrovaly rychlostí, která byla určena velikostí a nábojem sledovaného proteinu. Za svou práci ohledně separací látek získal Tiselius Nobelovu cenu [2].

Účinnost separace ve volném roztoku, tak jak ji provedl Tiselius, byla omezená tepelnou difúzí a konvekcí. Z tohoto důvodu je elektroforéza tradičně prováděna v antikonvekčním roztoku, jako je polyakrylamid nebo agarózový gel. Gely v plošném uspořádání nebo v trubici byly používány především pro biologické makromolekuly, jako jsou nukleové kyseliny nebo proteiny. I když je to jedna z nejpoužívanějších separačních technik má své nevýhody a to dlouhou dobu trvání analýzy, nízkou účinnost, potíže s detekcí a automatizací. Alternativou k separaci v plošném uspořádání je provedení elektroforetické separace v úzkých otvorech nebo v kapilárách. Protože elektrolyty v úzkých kapilárách mají nízkou vodivost, vytvářejí jen malé množství tepla a jsou v zásadě antikonvekční. Gel lze tedy nahradit kapalným elektrolytem [2].

Počáteční práce v elektroforéze popsal Hjertén v roce 1967. V té době, jelikož byly k dispozici pouze kapiláry s průměrem o velikost 1 mm, je Hjertén otáčel podél jejich osy, aby minimalizoval účinky konvekce. Později Virtanen a poté Mikkers a Everaerts provedli elektroforézu v kapilárách o vnitřním průměru přibližně 200 μm vyrobené ze skla nebo teflonu. V roce 1980 Jorgenson and Lukacs zmodernizovali techniku použitím kapilár z taveného oxidu křemičitého o průměru 75 μm . Jorgenson objasnil teorii a vztahy mezi provozními parametry a kvalitou separace. Zároveň demonstroval potenciál využití kapilární elektroforézy jako analytické metody [3].

1.2 Kapilární elektroforéza

Jedná se o elektromigrační separační metodu, která má široké využití. Kapilární elektroforézu lze všeobecně popsat jako vysokoúčinnou separaci iontů v úzké kapiláře o vnitřním průměru 25 – 150 μm , která je obvykle naplněna pouze pufrem. Použití kapilár má řadu výhod, zejména pokud jde o negativní vliv Jouleho tepla na separaci (teplo, které se tvoří, když protéká elektrický proud vodičem, jako je kapilára naplněná pufrem) [4,5].

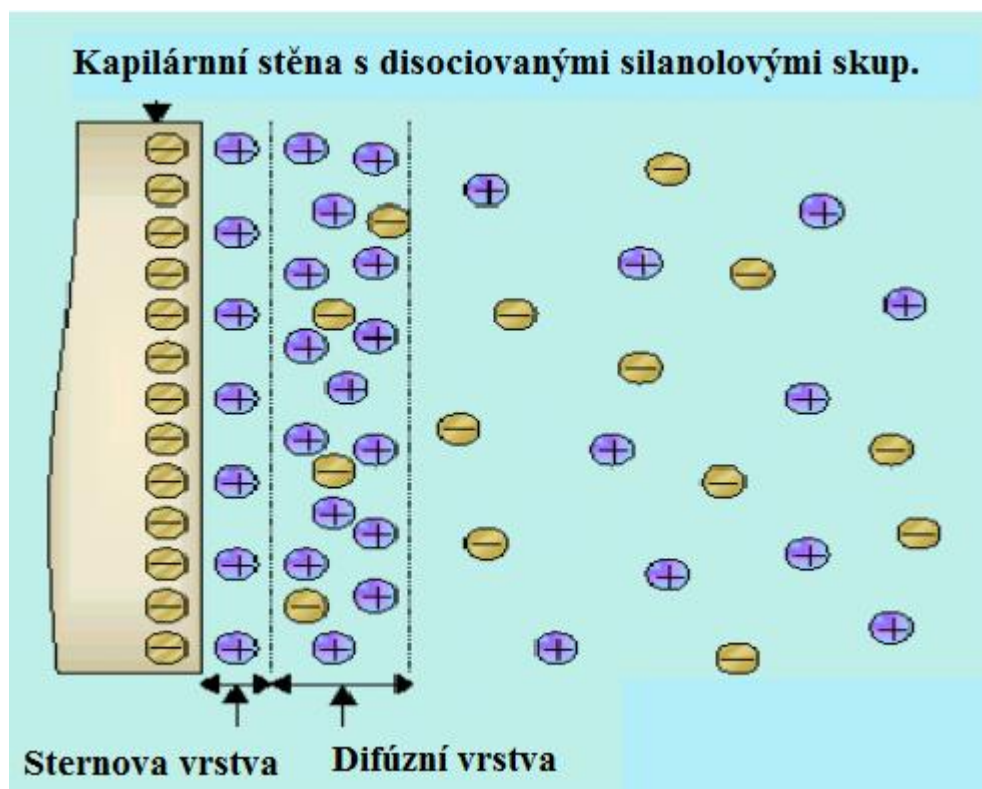
Hlavními komponenty celé separační aparatury jsou zdroj vysokého napětí a kapilára, procházející optickým středem detekčního systému. Instrumentace může být obohacena o další komponenty, např. kapalinové rozhraní mezi CE a detektorem, zmlžovač nebo jiná zařízení, která umožní detekci hmotnostní spektrometrií. Vysoký elektrický odpor kapiláry umožňuje aplikaci velmi vysokých polí (100 až 500 V/cm) s minimem vygenerovaného tepla. Navíc velký poměr povrchu k objemu kapiláry účinně rozptyluje teplo, které je vygenerováno. Díky aplikaci elektrického pole, o vysoké intenzitě probíhají analýzy v krátkém čase a účinnost analýzy je vysoká [4,5].

Jednou z největších výhod CE je její rozmanitost využití. Původně byla zvažována především pro analýzu biologických makromolekul, ale CE se ukázala být užitečná pro separaci dalších sloučenin, vitamínů, aminokyselin, pesticidů, barviv či antioxidantů apod. V posledním desetiletí se CE začala aplikovat prakticky v mnoha oblastech, jako jsou (bio)farmaceutické, forenzní, klinické, potravinářské, environmentální, chemické a biochemické analýzy. CE dále může nabídnout oproti jiným separačním metodám minimální požadavky na objem vzorku a málo organického odpadu, což jsou velmi významná pozitiva, vzhledem k dnešnímu pohledu na ekologii [6]. Trend v CE je propojení s hmotnostní spektrometrií (CE – MS), dále miniaturizace (mikrofluidní systémy na čipu), které jsou silně závislé na současných a budoucích pokrocích v analytické metodologii a instrumentaci [6].

1.2.1 Elektroosmotický tok

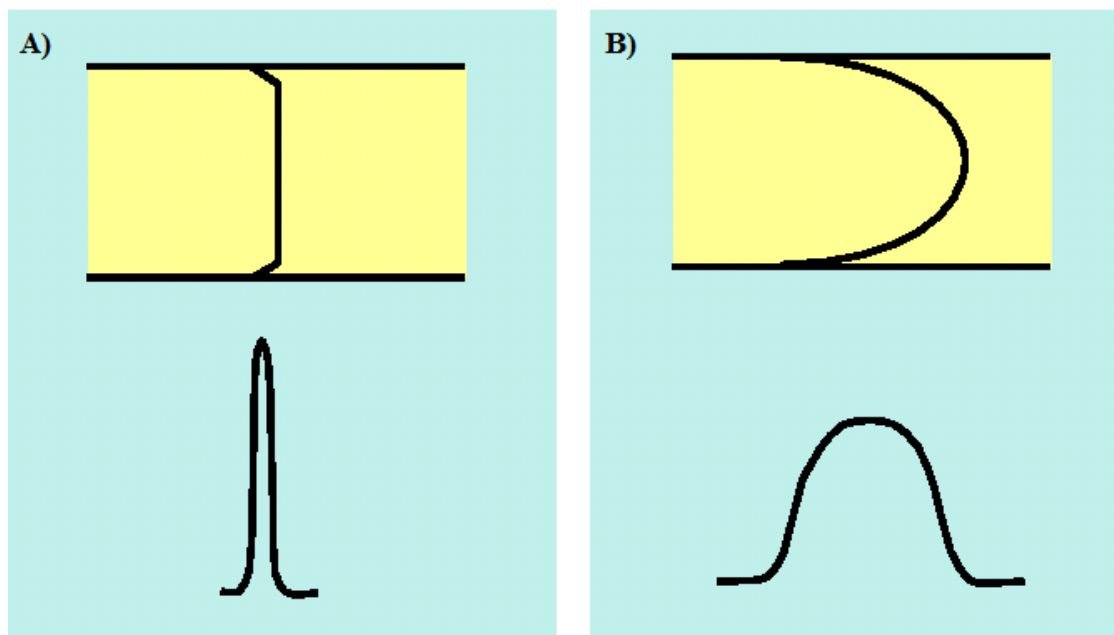
Elektroosmotický tok (EOF) je v kapilární elektroforéze velmi významný elektrokinetický jev. Tento jev spočívá v pohybu nabitě kapaliny podél opačně nabitého povrchu v elektrickém poli. Křemenné stěny kapilár jsou v závislosti na pH většinou záporně nabitě. Záporný náboj je způsoben deprotonací silanolových skupin ($\text{pK}_a \sim 5,3$) [7].

Kapalina uvnitř kapiláry je v blízkosti stěny tvořena převážně z kationtů. Tyto kationty vyvažují negativní náboj na povrchu kapiláry. Podle Sternova modelu elektrické dvojvrstvy, který je vyobrazen na obr. 1, můžeme vidět, že vrstva roztoku, která obsahuje kationty je rozdělena do dvou oblastí. První oblast se nazývá Sternova vrstva a druhá oblast je difúzní vrstva. Sternova vrstva přímo sousedí se stěnou kapiláry. Kationty, které se nachází v této vrstvě, jsou z velké části imobilizovány díky silné elektrostatické interakci se stěnou kapiláry. Difúzní vrstva, která je vzdálenější od stěny kapiláry obsahuje kationty, které jsou již mobilní. Hydratované kationty začnou po vložení vysokého napětí přecházet ke katodě společně s okolní kapalinou (vodou). Díky soudržné povaze kapaliny (vody) se začne celý objem tekutiny uvnitř kapiláry pohybovat současně [8].



Obrázek 1: Vznik elektroosmotického toku, převzato a upraveno z [9].

Elektroosmotický tok způsobuje, že pohyb kapaliny uvnitř kapiláry má pístový charakter nikoliv parabolický profil toku, viz obr. 2. Díky tomu dosahuje analýza v CE vysoké separační účinnosti.



Obrázek 2: A) pístový profil toku (CE), B) parabolický profil toku (LC), převzato a upraveno z [10].

V přítomnosti EOF není mobilita iontu dána pouze jeho vlastní mobilitou, ale je dána vektorovým součtem jeho mobility a mobility EOF. Mobility aniontů nabývají záporných hodnot a mobility kationtů nabývají kladných hodnot.

$$\mu_{ZD} = \mu_{EF} + \mu_{EOF} \quad (1)$$

Kde μ_{ZD} je zdánlivá pohyblivost, μ_{EF} je efektivní pohyblivost a μ_{EOF} je pohyblivost elektroosmotického toku.

U křemenných kapilár je možné eliminovat EOF pomocí tzv. pokrývání. Pokryté kapiláry (coated capillaries) mají na vnitřním povrchu např. kovalentně navázaný polymer, který eliminuje záporný náboj stěny a tím pádem i elektroosmotický tok. Poté je příspěvek EOF nulový a nemá vliv na výslednou mobilitu jednotlivých iontů. Nepokryté kapiláry (uncoated capillaries) nemají modifikovaný vnitřní povrch kapiláry a uplatňuje se zde efekt silanolových skupin [7].

1.2.2 Základní vztahy v kapilární elektroforéze

V následujících podkapitolách budou definovány vybrané základní vztahy, které souvisí s kapilární elektroforézou.

Elektroforetická mobilita

Elektroforetická mobilita (pohyblivost) μ_{ef} nabité částice vyjadřuje její rychlost pohybu v elektrickém poli, které má určitou intenzitu:

$$\mu_{ef} = \frac{v_{ef}}{E} \quad (2)$$

v_{ef} je rychlost pohybu částice a E je intenzita elektrického pole. Elektroforetická mobilita je tedy konstanta, jejíž velikost závisí na vlastnostech elektrolytu, částice a viskozitě prostředí.

Elektroforetickou pohyblivost lze také vyjádřit vztahem:

$$\mu_{ef} = \frac{q}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r} \quad (3)$$

q značí náboj částice, π je matematická konstanta, η je viskozita roztoku a r je poloměr částice.

Pohyblivost elektroosmotického toku

Tuto pohyblivost popisuje rovnice:

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

μ_{EOF} značí pohyblivost EOF, ε vyjadřuje permitivitu základního roztoku, η označuje viskozitu, ζ je zeta potenciál – potenciálový rozdíl difúzní vrstvy, r je poloměr kapiláry. Z tohoto vztahu vyplývá, že EOF je ovlivněn vlastnostmi základního elektrolytu (BGE), ale také poloměrem kapiláry.

Rychlost elektroosmotického toku:

$$v_{EOF} = \mu_{eo} \cdot E = \mu_{EOF} \cdot \frac{U}{l} \quad (5)$$

E značí intenzitu elektrického pole, μ_{EOF} je pohyblivost EOF, U je vkládané stejnosměrné napětí, l je délka kapiláry k detektoru.

Celková pohyblivost

Nabité částice mají v přítomnosti EOF celkovou pohyblivost μ_{EOF} , jenž vyjadřuje rychlost toku iontů:

$$\mu_{EOF} = \mu_{EF} + \mu_{EOF} \quad (6)$$

Celková rychlost pohybu částice je součtem lineární rychlosti elektroosmotického toku a elektroforetické rychlosti částice:

$$v_{ZD} = v_{EF} + v_{EOF} \quad (7)$$

Kladné ionty se pohybují rychleji v porovnání s elektroosmotickým tokem, záporné ionty pomaleji v závislosti na jejich elektroforetické pohyblivosti, částice bez náboje se pohybují rychlostí elektroosmotického toku [11].

Migrační čas

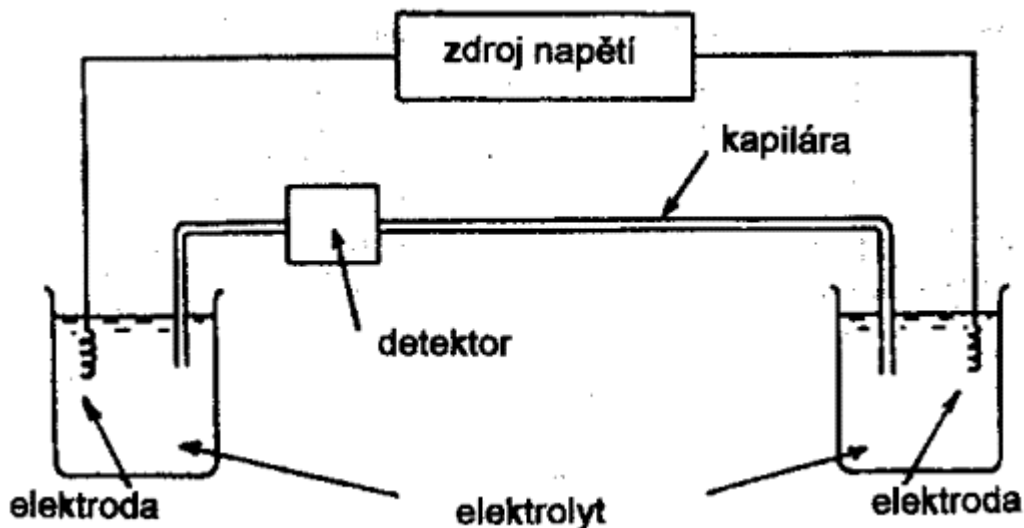
To je čas, který částice potřebuje ke své migraci k detektoru ve vzdálenosti l od začátku kapiláry:

$$t = \frac{l}{v_{EF} + v_{EOF}} \quad (8)$$

Tato veličina slouží ke zjištění elektroforetické pohyblivosti nebo elektroosmotické pohyblivosti, která nelze zjistit pomocí experimentálních pokusů [12].

1.3 Instrumentace

Přístrojová technika pro CE je celkem jednoduchá. Schéma obecného systému kapilární elektroforézy je na obr. 3.



Obrázek 3: Obecné schéma elektroforézy, převzato z [13].

Konce křemenné kapiláry jsou ponořeny do dvou zásobníků s elektrolytem, totožným elektrolytem je naplněna i kapilára. V zásobnících na elektrolyt jsou také umístěny elektrody, elektrické spojení je přenášeno pomocí BGE na kapiláru. [14].

Před nadávkováním vzorku do kapiláry je zásobník s elektrolytem vyměněn za zásobník se vzorkem pomocí otočného karuselu. Vzorek je dávkován do kapiláry nejčastěji pomocí tlaku. Následně je konec kapiláry opět ponořen do zásobníku s elektrolytem a je aplikováno vysoké napětí a provádí se separace. Detekce může být provedena na opačném konci kapiláry přímo přes kapilární stěnu [14].

1.3.1 Kapiláry

V dnešní době se kapiláry vyrábějí nejčastěji z taveného křemene či teflonu. Vnitřní průměr bývá cca od 10 do 100 μm . Délky kapilár se pohybují v rozmezí 50 až 100 cm. Díky malému vnitřnímu průměru kapilár téměř nedochází k promísení separovaných částic podélnou difuzí. Další z výhod malého vnitřního průměru kapilár je, že umožňují odvádět Jouleho teplo, což dovoluje použití vysokých intenzit elektrického pole. Křemenné kapiláry vynikají v tom, že neabsorbují v UV oblasti, což umožňuje použití UV detektoru. Samotné křemenné kapiláry jsou velmi křehké, proto jsou potaženy polyimidovým obalem, který zajišťuje zlepšení mechanických vlastností kapilár (ohebnost) [15].

1.3.2 Dávkování vzorku

Připravený vzorek je dávkován do konce kapiláry, který je vzdálenější od detektoru. Běžně dávkované objemy jsou 10 až 100 nl a zóna vzorku tvoří asi 1-2 % celkové délky kapiláry. Vzorek by měl být dávkován o co nejmenším objemu, pokud není omezujícím vlivem citlivost detekce. V případě, že je kapilára přetížená, dochází k rozšíření píku nebo ke zkreslení tvaru píku. Dávkování připravených analytů lze provádět více způsoby [16,17,18].

1) Dávkování tlakem využívá se nejčastěji, konec kapiláry je ponořen do nádoby se vzorkem a je použit zvýšený tlak.

2) Dávkování rozdílem hladin (hydrodynamické) tato metoda je založena na principu spojitých nádob.

3) Elektrokinetické dávkování je používáno nejméně. Konec kapiláry je ponořen do nádoby se vzorkem, do které je přivedeno napětí [16,17,18].

1.3.3 Detekce

I když CE vyžaduje objemy vzorků v nanolitrech (nl), nejedná se o stopovou analýzu. Analyzované roztoky jsou poměrně koncentrované, a pokud nejsou, lze využít pre-koncentrační metody. Přehled nejběžnějších detekčních metod (z nichž se některé používají i pro HPLC) je uveden v tabulce 1 [19].

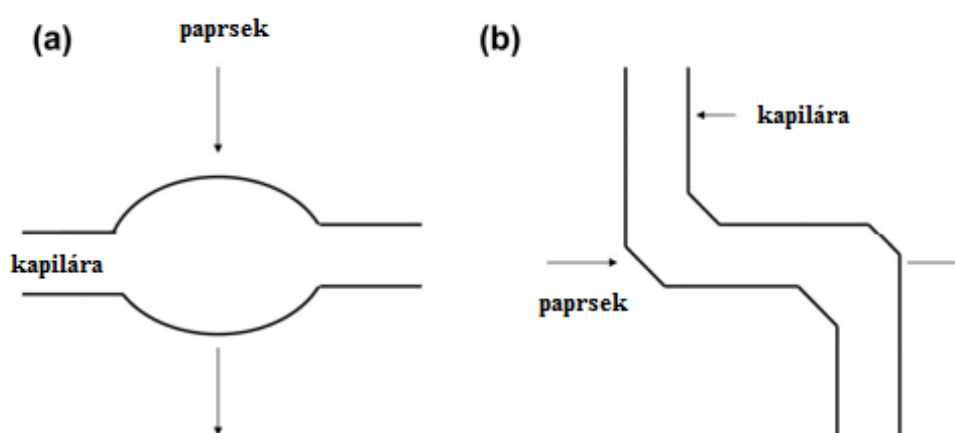
Tabulka 1: Přehled detekčních metod, převzato a upraveno z [19].

Metoda	Detekční limit [mol]	Koncentrační detekční limit [mol/l]	Výhody / Nevýhody
UV – VIS absorbance	$10^{-12} - 10^{-15}$	$10^{-5} - 10^{-7}$	Univerzální, spektrální informace
Fluorescence	$10^{-15} - 10^{-17}$	$10^{-7} - 10^{-9}$	Citlivá, obvykle vyžaduje derivatizaci vzorku.
Laserem indukovaná fluorescence	$10^{-18} - 10^{-20}$	$10^{-9} - 10^{-12}$	Extremně citlivá, obvykle vyžaduje derivatizaci, nákladná
Amperometrie	$10^{-18} - 10^{-19}$	$10^{-10} - 10^{-11}$	Citlivá, selektivní, ale užitečná pro elektroaktivní látky, nerobustní
Vodivostní	$10^{-15} - 10^{-16}$	$10^{-6} - 10^{-7}$	Univerzální
Hmotnostní spektrometrie	$10^{-16} - 10^{-17}$	$10^{-8} - 10^{-9}$	Citlivá, strukturální informace, rozhraní mezi CE a MS složitý

1.3.3.1 Detekce pomocí UV – VIS

UV – VIS detektor je nejpoužívanějším detektorem, který je komerčně dostupný díky jeho globální použitelnosti. Ve spojení s CE je hlavní nevýhodou krátká délka optické dráhy. Optický paprsek by měl být pevně zaostřen přímo do středu kapiláry, aby se dosáhlo maxima propustnosti v optické štěrbině a minimálního rozptýlení světla, které dorazí k detektoru. Tyto aspekty jsou důležité pro celkovou analýzu, určují citlivost a její detekční rozsah [20].

Zvýšení citlivosti detekce, je možno dosáhnout zvětšením optické dráhy použitím vhodné měřící cely. Může to být bublinková cela či také Z – cela (obr. 4).



Obrázek 4: Možnosti zvýšení citlivosti detekce A) bublinková cela, B) Z - cela, převzato a upraveno z [21].

Tato detekční metoda je vhodná pro CE, protože mnoho organických látek může být detekováno při 195 – 210 nm. V podstatě všechny organické molekuly mají značnou absorpci v nízké oblasti UV spektra (160 – 180 nm), nicméně přístup k této oblasti vlnových délek je obzvláště problematický díky absorpci optikou a vzduchem. Kromě toho u sloučenin, jejichž struktura nezahrnuje π vazby (ionty, uhlovodíky apod.) absorpční detekce při vlnové délce > 190 nm poskytuje relativně slabé poměry signál/šum [22].

Citlivost detekce je definována jako sklon kalibrační křivky (odezva detektoru / koncentraci vzorku). Strmější sklon znamená vyšší citlivost. U absorpčních detektorů závisí absorbance rozpuštěné látky na délce optické dráhy (**b**), koncentraci (**c**) a na molárním absorpčním koeficientu (**ε**) jak definuje Lambert – Beerův zákon [23].

$$A = b * c * \varepsilon \quad (9)$$

Ačkoliv UV-VIS spektra nejsou tak informativní jako NMR, MS nebo spektra získaná pomocí infračervené spektrometrie, mohou i tak sloužit k předběžnému potvrzení identity analytu a validaci čistoty píku. Podobnost spektrálních profilů může být využita pro označení strukturně příbuzných sloučenin (enantiomery) a jejich odlišení od sebe díky nečistotě v píku analytu [24].

1.3.3.2 Detekce pomocí laserem indukovanou fluorescencí

Laserem indukovaná fluorescence (LIF) je založená na fluorescenčním signálu vyprodukovaném molekulou po ozáření laserovým paprskem. Tato metoda je nejcitlivější, extrémně selektivní, detekuje malý objem vzorku a je vhodná pro on-line uspořádání v CE. Je to také jedna z nejoblíbenějších detekčních technik v mikrofluidní kapilární elektroforéze [25]. Citlivost a selektivita LIF detekce je dána použitím různých typů laserů, např. běžný argonový laser (458 a 488 nm), modrý diodový laser (420 nm), frekvenčně zdvojený Ar – ion laser (257 nm), frekvenční dvojnásobný Kr – ion laser (284 nm). Nevýhodou této detekce je, že vzorek musí být většinou derivatizován fluorogenními značkami [22].

1.3.3.3 Hmotnostní spektrometrie (MS)

Hmotnostní spektrometrie (MS) představuje vysoce výkonnou detekční metodu pro kapilární elektroforézu. Tato metoda je velmi citlivá, univerzální a selektivní. Problém ve spojení CE - MS představují velmi nízké průtoky (nl/min) a nutnost vytvořit uzavřený elektrický obvod pro udržení vysokého napětí přes separační kapiláru. Významný pokrok ve vývoji nastal v roce 1987, kdy byla použita ionizace elektrosprejem (ESI). Nyní se k ionizaci používá laserová desorpce za účasti matrice (MALDI) [26].

Spojení CE – ESI lze provést těmito způsoby a) s přídavným tokem kapaliny („sheath-flow“), b) bez přídavného toku kapaliny („sheathless“). Častěji je využíváno rozhraní vytvořené přídavnou kapalinou, které bylo poprvé popsáno v roce 1988. Výhodou tohoto rozhraní je jednoduchost a reprodukovatelnost. Konec kapiláry je omýván proudem kapaliny (sheath liquid), což zajišťuje stabilní a vyšší průtok kapaliny do spektrometru. Nevýhoda však spočívá ve zředění analyzovaného vzorku a ve zvýšení signálu pozadí.

Stejně jako u jakékoliv CE metody, také i u CE – MS by pokrytí vnitřní stěny kapiláry mělo být v ideálním případě takové, aby byla minimalizována adsorpce analytu. Aby nedocházelo ke ztrátě analytu a uchovala se tak vysoká účinnost.

Všechny typy pokrytí kapilár použité v CE – MS by neměly interferovat s detekčním systémem MS. Sloučeniny používané k pokrývání kapilár, které by vstoupily do hmotnostního analyzátoru, mohou způsobit velký šum pozadí, potlačení signálu analytu, či znečištění iontového zdroje a MS optiky [27,28].

1.3.3.4 Elektrochemická detekce

Elektrochemická detekce je založena na oxidaci nebo redukci analyzované látky na povrchu elektrody. Tento druh detekce se vyznačuje vysokou selektivitou a citlivostí.

Elektrochemická detekce pro CE může být rozdělena do tří hlavních kategorií: potenciometrická, konduktometrická a amperometrická [29].

Potenciometrická detekce

Potenciometrická detekce je založena na principu iontově selektivních mikroelektrod, mají schopnost detekovat extrémně malé množství anorganických a organických iontů. Signál je produkován, když je požadovaný iont přenesen z proudu vzorku skrz lipofilní membránu do detektoru. Přítomnost analytu generuje změnu v rozdílu potenciálu mezi roztokem vzorku a roztokem detektoru. Potenciálový rozdíl je měřítkem iontové aktivity dané Nernstovou rovnicí a je přímo úměrná koncentraci iontů [22].

Amperometrická detekce

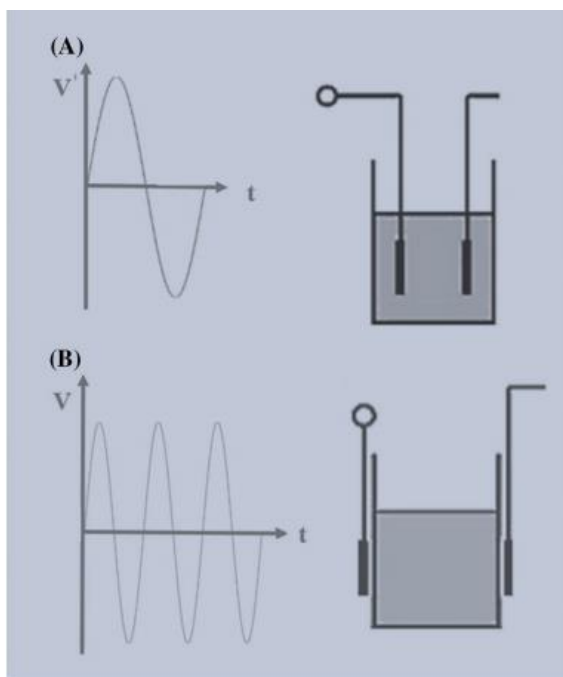
Při amperometrické detekci jsou analyty oxidovány nebo redukovány na povrchu elektrody. Na elektrodu je aplikováno stejnosměrné elektrické napětí. Díky přenosu elektronů vzniká redoxní reakce na elektrodě, která generuje proud. Vygenerovaný proud je přímo úměrný koncentraci analytu. Selektivita amperometrické detekce je řízena elektrodovým potenciálem potřebným pro vybrané analyty. Když je pro vybraný analyt požadována vysoká citlivost detekce, univerzálnost metody tím klesá [30].

Hlavní nevýhodou amperometrické detekce je silná adsorpce meziproductů na povrchu elektrody (uhlíková elektroda). Adsorpce na elektrodě vede k snižování její použitelnosti v detekci. Způsob jak omezit adsorpci meziproductů na elektrodě je její chemická modifikace. [22].

Vodivostní detekce

Vodivostní detekce je univerzální způsob detekce v CE. Tato metoda má však nevýhodu v tom, že není dostatečně selektivní.

Vodivostní detekce je založená na měření elektrické vodivosti roztoku mezi dvěma kovovými elektrodami v detekční cele. Kovové elektrody jsou umístěné na konci separační kapiláry. Toto uspořádání však v praxi nedosahuje širokého uplatnění [31,32,33]. Existuje zde dvojí uspořádání a to buď kontaktní, nebo bezkontaktní vodivostní detekce viz obr. 5.



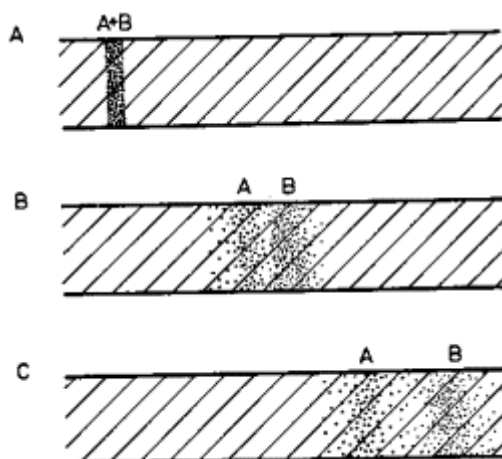
Obrázek 5: Typy vodivostní detekce A) kontaktní vodivostní detekce, B) bezkontaktní vodivostní detekce, převzato z [34].

1.4 Kapilární zónová elektroforéza (CZE)

Zónová elektroforéza se řadí mezi nejjednodušší elektromigrační techniku, při níž se jednotlivé ionty, které se liší svými elektroforetickými pohyblivostmi, oddělují v homogenním prostředí základního elektrolytu (background electrolyte – BGE). Analýza probíhá za konstantního, stejnosměrného napětí, které je vkládáno mezi elektrody, které jsou umístěny v oddělených nádobkách s elektrolytem. Po vložení napětí na elektrody, dochází k tomu, že jednotlivé látky, které jsou ve vzorku obsaženy, se začnou pohybovat různými rychlostmi v závislosti na jejich náboji a velikosti. Začne tedy docházet k jejich rozdělování do zón viz obr. 6. Jako detektor se zde nejčastěji využívá UV-VIS detektoru, v posledních letech se používá i spojení s MS detektorem. Pomocí CZE lze detekovat kladné, záporné i neutrální částice. Částice, které mají

kladný náboj (kationty) se pohybují směrem k negativně nabitě elektrodě (katodě). Částice, které mají negativní náboj (anionty) se současně pohybují opačným směrem, protože jsou přitahovány anodou, což je kladně nabitá elektroda. Neutrální částice tedy nejsou přitahované ani odpuzované ani jednou z elektrod a pohybují se kapilárou díky EOF.

Kapilární zónová elektroforéza je v analytické chemii hojně využívanou metodou pro experimenty pro svou rychlost a jednoduchost, s níž lze nastavit nebo změnit podmínky experimentu, ale také pro možnost použití v oblasti chirální separace [35,36].

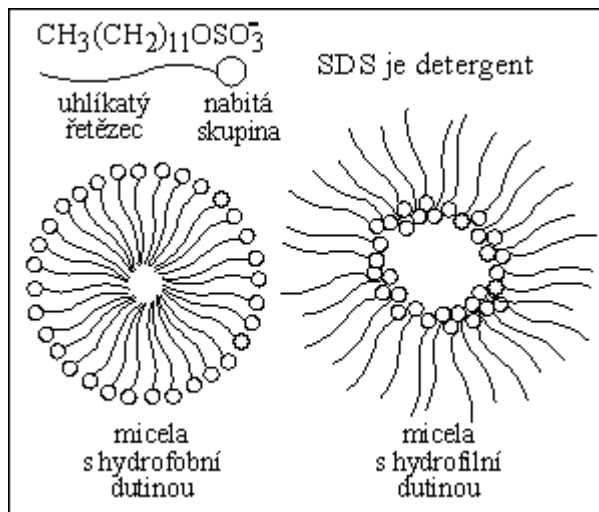


Obrázek 6: Rozdělení látek A a B do svých zón, převzato a upraveno z [37].

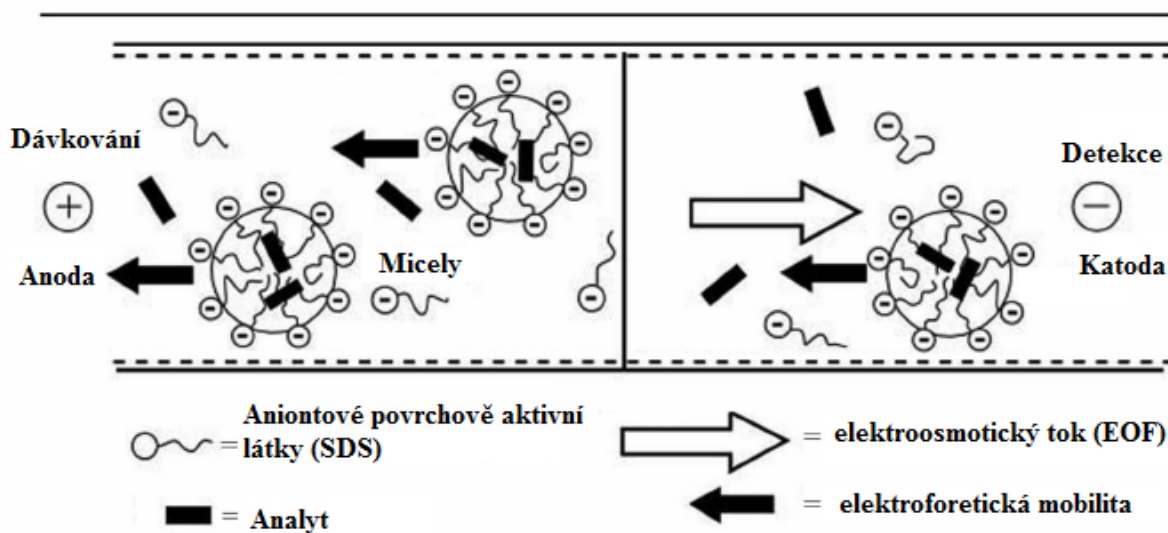
1.5 Micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC)

Micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC – micellar electrokinetic chromatography), je elektromigrační separační metoda, která je kombinací elektroforézy a chromatografie. Tato separační metoda byla vyvinuta zejména pro analýzu neutrálních molekul. Neutrální molekuly interagují s micelami a na základě jejich odlišného rozdělovacího koeficientu mezi micelami a vodnou fází dochází k jejich separaci. Micely (obr. 7) vznikají v roztoku elektrolytu po přidání vhodného tenzidu o koncentraci, která je vyšší než je jejich kritická micelární koncentrace (CMC) daného tenzidu. Tenzidy jsou povrchově aktivní látky, lze je dělit podle jejich struktury na iontové (kationtové a aniontové), neiontové, makromolekulární, chirální a další. Povrchově aktivní látka se skládá z hydrofobní (nepolární) a hydrofilní (polární) části. V MEKC se jako povrchově aktivní látka nejhojněji používá aniontový tenzid dodecylsírán sodný (SDS), jeho micely mají negativní náboj a proto putují směrem k anodě rychlostí v_{mic} . I přesto, že aniontové micely SDS migrují v kapiláře směrem k anodě, díky elektroosmotickému toku (EOF), který způsobuje pohyb veškeré kapaliny v kapiláře směrem

ke katodě, dochází za předpokladu $v_{EOF} > v_{mic}$ k výslednému pohybu micel směrem k detektoru (katodě; obr. 8). Z kationtových tenzidů lze použít např. dodecyltrimethylamoniumbromid (DTAB) [38,39,40].



Obrázek 7: Micely, převzato z [41].

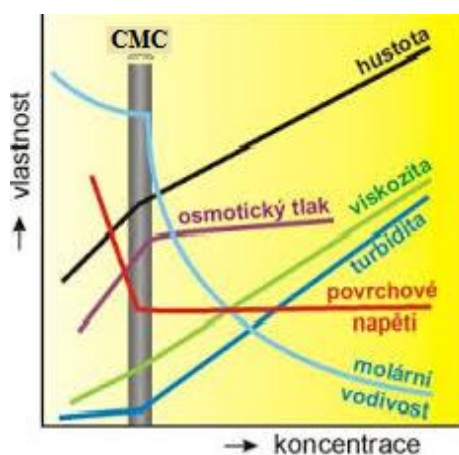


Obrázek 8: Schéma principu separace v micelární elektrokinetické chromatografii (MEKC), převzato a upraveno z [42].

1.5.1 Kritická micelární koncentrace (CMC)

Pokud jsou povrchově aktivní látky přítomné v rozpouštědle v nízké koncentraci, existují v roztoku odděleně a mají velikost částic pod hranicí koloidních soustav. Vytvářejí se tzv. pravé roztoky. Se zvyšující se koncentrací tenzidu dochází v roztoku k postupnému obsazování fázového rozhraní, zvyšuje se absorpce a snižuje se povrchové napětí. Po překročení kritické micelární koncentrace se molekuly tenzidu začnou shlukovat do micel. Při dalším zvyšování koncentrace nedochází ke snižování povrchového napětí, protože další tenzid, který se přidává je spotřebován na tvorbu micel, které povrchovou aktivitu nemají.

Hodnoty CMC jsou závislé na typu tenzidu, jeho struktuře a vlastnostech hydrofilní a hydrofobní skupiny na vlastnostech rozpouštědla a teplotě [43,44,45].



Obrázek 9: Změna fyzikálních vlastností roztoku tenzidu při dosažení CMC, převzato z [46].

Rozpuštěním tenzidu ve vodě pod hodnotou kritické micelární koncentrace se snižuje bod tuhnutí vody, tlak par a povrchové napětí. Naopak dochází ke zvýšení teploty varu. V případě, že je tenzid ionogenní zvyšuje se i vodivost roztoku.

S tvorbou micel dochází v oblasti CMC skokově ke změně fyzikálních i chemických vlastností roztoku (obr. 9). Zvyšuje se viskozita i hustota roztoku a mírně osmotický tlak. Naopak dochází ke snížení molární vodivosti a povrchového napětí. Příčina těchto změn je přechod z homogenní soustavy na soustavu heterogenní.

Velmi hojně využívanou metodou, jak stanovit kritickou micelární koncentraci, je konduktometrie, kdy se sleduje změna vodivosti roztoku v závislosti na koncentraci povrchově aktivní látky [43,44,45].

1.6 Metody používané k zakoncentrování vzorku

Kapilární elektroforéza má oproti HPLC tu nevýhodu, že má nižší koncentrační citlivost. Nižší koncentrační citlivost je způsobena dávkováním velmi malých objemů vzorků (v jednotkách nl). Je zde i krátká optická dráha paprsku z detektoru, která odpovídá vnitřnímu průměru použité kapiláry. V minulosti bylo vyvinuto mnoho technik, které vedly ke zvýšení citlivosti detekce přes složité konstrukční řešení detektorů a s tím související ekonomická náročnost, až po změnu chemického a elektrického pole přímo uvnitř kapiláry. Tyto metody vedou ke zvýšení koncentrace analytu v kapiláře ještě před vlastní detekcí.

Prekoncentrační techniky probíhají přímo uvnitř kapiláry a využívají dějů, které jsou doprovodnými jevy při elektromigraci. Prekoncentrace vzorků uvnitř kapiláry během nadávkování a separace vzorků se často označuje jako zakoncentrování – stacking. Stacking může být využíván jak při hydrodynamickém, tak i elektrokinetickém nástřiku. Během tohoto jevu velmi významně roste koncentrace vzorku a zvyšuje se poměr signálu k šumu.

Kromě metod, které se používají pro zakoncentrování vzorku přímo v kapiláře se dají využít i tzv. offline spojené systémy. Mezi tyto metody patří např. L - L extrakce (liquid – liquid extraction), membránová extrakce nebo nejčastěji používaná extrakce na pevnou fázi [47,48,49,50].

1.6.1 Online prekoncentrace ionizovatelných analytů

Kapilární elektroforéza se hojně využívá pro separace látek, které podléhají ionizačním rovnováhám (asociace, disociace, komplexace apod.). Rychlost migrace iontu lze poté ovlivnit změnou některých vlastností pracovního elektrolytu (pH, vodivost, teplota atd.). I drobná změna těchto vlastností může vést k vytvoření prekoncentračního mechanismu. K online prekoncentraci ionizovatelných látek lze využít následující principy: zakoncentrování vzorku zesílením pole – field amplified sample stacking (FASS), přechodná izotachoforéza – transient isotachopheresis (tITP), zakoncentrování pomocí organického rozpouštědla např. acetonitrilu – acetonitrilový stacking, přechodné pH rozhraní – dynamic pH junction, apod. Předchozí principy umožní nadávkování většího objemu vzorku do kapiláry a následné zakoncentrování nadávkovaného analytu do velmi úzké zóny [47].

1.6.1.1 Zakoncentrování vzorku zesílením pole

Tato metoda funguje na principu interakce elektrického pole, které je indukováno vloženým napětím na konce kapilár, a pole koncentračního, které vzniká vlivem různé vodivosti zóny BGE a vzorku. Analyzovaný vzorek musí být rozpuštěn v 10x zředěném pracovním elektrolytu

nebo ve vodě, respektive v roztoku, který má nízkou vodivost. V zóně, kde se nachází vzorek je vodivost nižší, s tím souvisí vyšší intenzita elektrického pole ve vzorku a tím i vyšší rychlost migrace v této zóně. Poté aplikujeme stejnosměrné elektrické pole, tím dojde k zakoncentrování dané zóny vzorku na základě rozdílných pohyblivostí v zóně elektrolytu a zóně vzorku. Uvnitř kapiláry dojde ke vzniku rozhraní, na kterém dochází k zakoncentrování analytů vlivem zpomalené migrace. Touto metodou zakoncentrování lze dosáhnout 10-1000x zesílení signálu analytu, který je ve sledovaném vzorku přítomen ve velmi nízké koncentraci (např. 10^{-7} mol/l). Je zde i omezení v podobě požadavku na iontovou sílu analytu, který musí být citelně nižší než iontová síla elektrolytu.

Metodu zakoncentrování vzorku pomocí zesíleného pole lze provést prostřednictvím změny pH a vodivosti vzorku a pracovního elektrolytu. Hodnota pH silně ovlivňuje mobilitu analytů. Tímto způsobem lze vytvořit podmínky pro různou rychlost migrace analytu v dané zóně vzorku a pracovního elektrolytu.

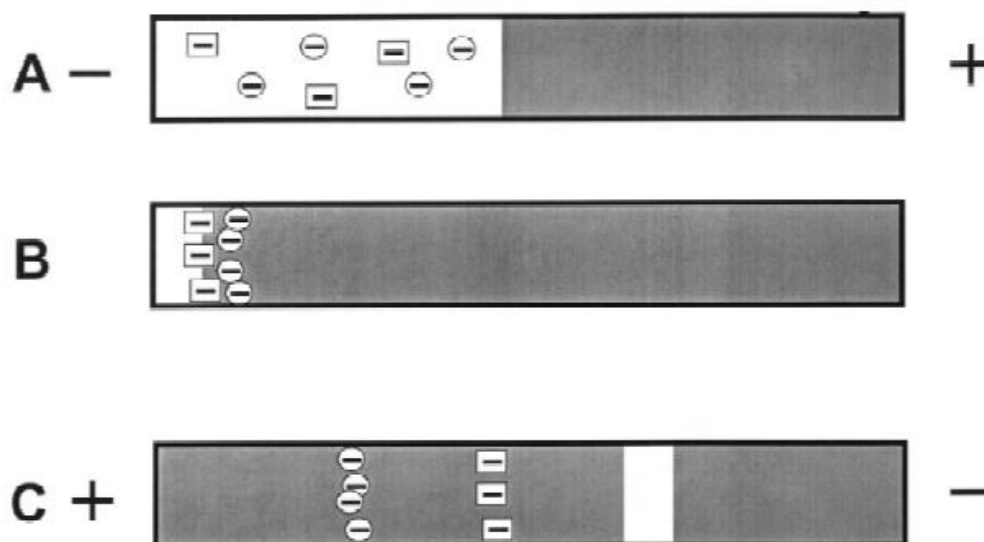
Tento způsob zakoncentrování nalézá praktické využití při analýze léčiv, návykových látek či při analýze fragmentů DNA [47,51].

1.6.2 Zakoncentrování vzorku z velkého objemu – LVSS

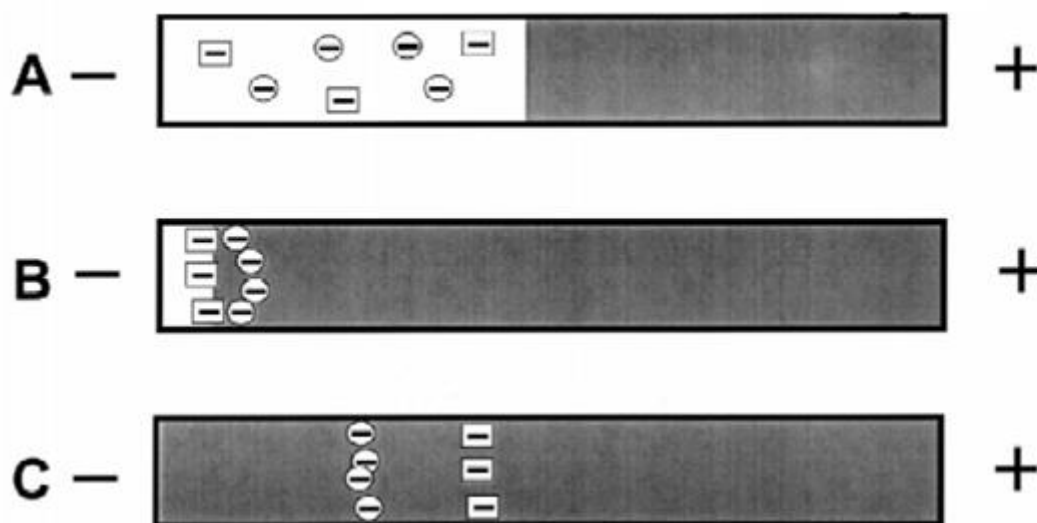
Při aplikaci LVSS (large volume sample stacking, obr. 10 a 11) dojde nejprve k hydrodynamickému nástřiku dlouhé zóny vzorku do kapiláry. Tato zóna vzorku zaujímá 30 – 50 % z celkového objemu kapiláry. Poté dojde k vložení napětí s opačnou polaritou, než jaká bude použita při měření. Toto má za následek vytlačení matrice ven z kapiláry a zakoncentrování analytu do úzké zóny na začátku kapiláry. K vytlačení matrice z konce kapiláry dochází pomocí elektroosmotického toku nebo pomocí externího tlaku, přitom stanovované analyty musí migrovat opačným směrem než je směr toku matrice a navíc musí mít větší rychlost, než má v daný okamžik EOF. Z toho vyplývá, že polarita pro odstranění matrice ze vzorku při zakoncentrování se volí podle znaménka náboje separovaných analytů. Do elektrolytu, se kterým se pracuje, je obvykle přidáváno aditivum, které obrací směr elektroosmotického toku (např. kationtový tenzid). Ve chvíli, kdy hodnota protékajícího proudu vzroste na 90 – 99 % hodnoty, která je běžná pro základní elektrolyt bez přidaného aditiva, je polarita změněna tak, aby elektroosmotický tok protékal směrem k detektoru.

Některé komerční přístroje neumožňují měnit polaritu, ale i přes to je možné LVSS uskutečnit bez přepínání polarity. Tento postup je však málo používaný pro nízkou opakovatelnost a obtížné technické provedení. Určité omezení má i tato technika, podmínka pro její použití je analýza buď jen kladných či záporných analytů. Dále tato metoda nenabízí možnost separace

kationtů a aniontů, které mají nízkou mobilitu. Touto metodou zakoncentrování vzorku z velkého objemu lze dosáhnout 2 – 100 násobného zesílení detekce. Tento princip měření lze aplikovat při analýze chelátů, kovů ve vlasech, léčiv apod. [47,51].



Obrázek 10: LVSS s přepnutou polaritou, A) dávkování vzorku připraveného v matrici s nízkou vodivostí a aplikace napětí s opačnou polaritou, než je použitá pro separaci zón a odstranění matrice vzorku, B) anionty jsou zaostřeny do úzké zóny a je odstraněno co nejvíce matrice vzorku, hodnota vkládaného napětí = 0 V, C) aplikace napětí s kladnou polaritou pro separaci a detekci zaostřených zón, převzato a upraveno z [52].



Obrázek 11: LVSS bez přepínání polarity, A) dávkování vzorku připraveného v matrici s nízkou vodivostí a vložení napětí se zápornou polaritou pro zaostření zón a odstranění matrice vzorku B) anionty jsou zaostřeny do úzké zóny a většina matrice je ze vzorku odstraněna, napětí je zachováno, protože rychlost EOF je vždy pomalejší než elektroforetická rychlost aniontů C) separace a následná detekce zaostřených zón, převzato a upraveno z [52].

1.6.3 Zakoncentrování přechodným pH rozhraním

Tato metoda zakoncentrování využívá skutečnosti, že mobilita slabě zásaditých a slabě kyselých analytů velmi závisí na pH základního elektrolytu. V kapiláře je možné utvořit elektrolytový systém o rozdílných hodnotách pH, který se podobá amfolytovému systému při izoelektrické fokusaci. Nejjednodušší způsob spočívá ve využití různých hodnot pH základního elektrolytu a dávkované zóny analytu. Můžeme využít elektrolytů, které mají rozdílnou hodnotu pH ale se stejné složení; pufr pro rozpuštění analytů a základní elektrolyt obsahují stejné složky – např. boritanový pufr. Dále lze využít dvou elektrolytů, které mají jak rozdílné složení, tak rozdílné pH. Pokud však nadávkujeme velký objem vzorku, může dojít k vysokému poklesu efektivity. Tato metoda zakoncentrování nachází své uplatnění v mnoha směrech např. sekvenování DNA, analýza léčiv či antioxidantů apod. Tento typ zakoncentrování nabízí až 300 x zesílení odezvy detektoru [47,51].

V experimentální části diplomové práce jsou měřeny migrační charakteristiky fenolických kyselin a tyto látky jsou použity pro studium zakoncentrování v kapiláře, proto jsou věnovány následující odstavce popisu a charakteristice vybraných fenolických kyselin.

1.7 Antioxidanty

Antioxidanty jsou obecně sloučeniny, které odstraňují nebo potlačují aktivitu kyslíkových radikálů. Kyslíkové radikály se vyskytují v lidském těle nejčastěji a jsou i nejreaktivnější. Antioxidanty mohou jednak snižovat šance vzniku kyslíkových radikálů, a také jsou schopny převádět radikály na méně reaktivní či úplně nereaktivní formy. Kromě kyslíkových radikálů mohou vznikat i dusíkové radikály. Všechny volné radikály mají vliv na biologicky významné sloučeniny, jako jsou bílkoviny, lipidy či nukleové kyseliny. Volné radikály jsou schopny měnit strukturu těchto látek a tím pádem i jejich funkci. Antioxidanty tedy chrání lidský organismus před oxidačním stresem, který je způsoben výskytem mnoha volných radikálů v organismu. Antioxidanty lze dělit dle původu na přírodní a syntetické. Přírodní antioxidanty se volně vyskytují v přírodě, např. v ovoci či zelenině, ořechách, či ve výrobcích s více než 70 % kakaa apod. Syntetické antioxidanty byly vytvořeny uměle. Vyskytují se tedy hlavně v potravinových doplňcích [53,54,55].

1.7.1 Fenolické kyseliny

Fenolické látky patří mezi látky, které mají antioxidační vlastnosti. Díky těmto vlastnostem jsou schopny chránit před mnoha onemocněními, jako jsou kardiovaskulární onemocnění, rakovina, nachlazení, snižují hladinu cholesterolu v krvi apod. Fenolické kyseliny se ve velkém množství vyskytují hlavně v rostlinách. Člověk musí fenolické kyseliny přijímat ve formě jídla, protože je není schopen syntetizovat. Fenolické kyseliny obsahují jedno nebo více benzenových jader, která jsou substituovaná hydroxylovými skupinami.

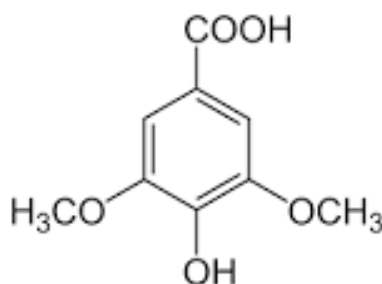
Fenolické kyseliny se dělí do dvou základních skupin. První skupina je tvořena deriváty kyseliny benzoové. Do této skupiny řadíme např. kyselinu salicylovou, gentisovou, 4 – hydroxybenzoovou, gallovou, vanilovou, syringovou a další. Druhá skupina je tvořena deriváty kyseliny skořicové. Do této skupiny řadíme např. kyselinu p-kumarovou, kávovou, ferulovou či sinapovou a další [56,57].

1.8 Charakteristika jednotlivých fenolických kyselin

V jednotlivých podkapitolách budou popsány vybrané fenolické kyseliny, které jsou používány při experimentálním měření.

Syringová kyselina

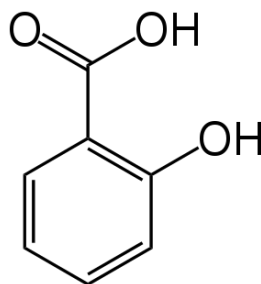
Kyselina syringová (obr. 12) je fenolická sloučenina, která se vyskytuje v ovoci a zelenině. Je syntetizovaná cestou kyseliny shikimové v rostlinách. Má širokou škálu terapeutických aplikací v prevenci diabetu, rakoviny, cerebrální ischemie funguje také jako antioxidant. Terapeutická vlastnost kyseliny syringové je přičítána přítomnosti methoxyskupiny na aromatickém kruhu v pozicích tři a pět [58].



Obrázek 12: Kyselina syringová, převzato z [59].

Salicylová kyselina

Kyselina salicylová (obr. 13) tvoří základní chemickou strukturu všech salicylátů. Název této kyseliny je odvozen z latinského slova salix, což v předkladu znamená vrba. V kůře vrby byl totiž poprvé glykosid salicylan objeven. Tato kyselina lze aplikovat lokálně na kůži pro své keratolytické (koncentrace účinné látky > 2 %), keratoplastické (koncentrace účinné látky < 2 %) a dezinfekční účinky. Perorální podávání je velice špatně snášeno, protože kyselina salicylová dráždí žaludeční sliznici a vyvolává krvácení [60].

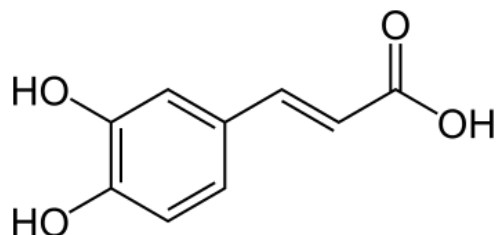


Obrázek 13: Kyselina salicylová, převzato z [61].

Kávová kyselina

Kyselina kávová (obr. 14) nebo také 3-(3,4 -dihydroxyfenyl)-2-propénová kyselina je derivát od kyseliny skořicové. Tato kyselina vzniká jako meziprodukt při biosyntéze ligninu a má antioxidantní účinky. Pohlcuje radikály hydroxylové, peroxidové, superoxidové apod. Chrání před rakovinou, slouží jako prevence před kardiovaskulárním onemocněním, má antibakteriální

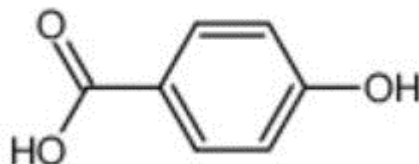
účinky a chrání DNA před poškozením. Kyselina kávová se hojně vyskytuje v rostlinách, hlavně v kávě, obilovinách, jablkách, vinné révě apod. [62].



Obrázek 14: Kyselina kávová, převzato z [63].

4 – hydroxybenzoová kyselina

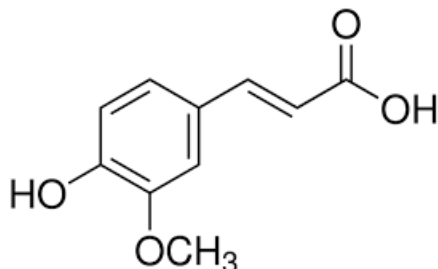
Tato kyselina se vyskytuje ve formě bílého krystalického prášku, který je rozpustný v polárních rozpouštědlech. 4 – hydroxybenzoová kyselina (obr. 15) je derivátem kyseliny benzoové. Tato substance se přirozeně vyskytuje např. ve víně, kokosech a jablkách. Zvláště používané estery této kyseliny jsou velmi známé jako parabeny. Parabeny se v dnešní době hojně využívají jako konzervační látky ve farmaceutickém, kosmetickém či potravinářském průmyslu apod. Hlavním důvodem, proč se parabeny používají je, že mají antimikrobiální vlastnosti [64].



Obrázek 15: Kyselina 4 - hydroxybenzoová, převzato z [65].

Ferulová kyselina

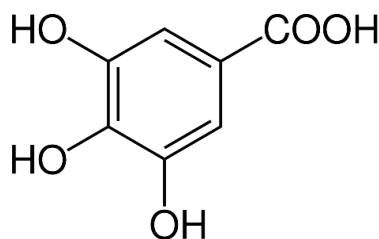
Kyselina ferulová (obr. 16) je nejvíce se vyskytující derivát hydroxykyselin v rostlinách, zejména v ananasu, cereáliích, mrkvi apod. Dále dokáže inaktivovat rostlinné viry a její toxicita je účinná v boji proti napadení hmyzem. Kyselina ferulová má silné antioxidační účinky [66].



Obrázek 16: Kyselina ferulová, převzato z [67].

Gallová kyselina

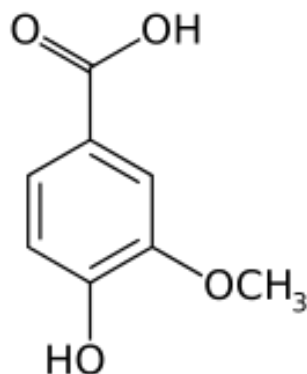
Kyselina gallová (obr. 17) je derivátem kyseliny benzoové. Tato kyselina je velmi známý přírodní antioxidant, který je v podstatě sekundární polyfenolový metabolit. Může se vyskytovat volně nebo vázaná do taninů, ze kterých se získává kyselinou hydrolyzou. Kyselina gallová je známá jako ayurvédská bylina. Kromě antioxidační úlohy se kyselina gallová dříve používala jako základ neviditelných inkoustů a své využití našla i v počátcích fotografie. Vyskytuje se většinou v červených plodech, ředkvičkách, ořechích nebo cibuli [68].



Obrázek 17: Kyselina gallová, převzato z [69].

Vanilová kyselina

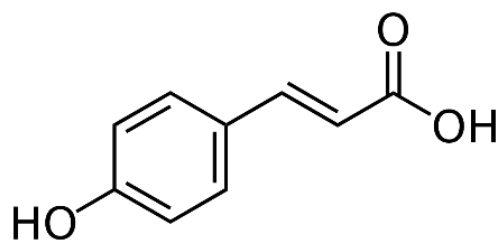
Kyselina vanilová (obr. 18) je derivát kyseliny benzoové, používaný jako ochucovací látka. Jedná se o oxidovanou formu vanilinu vyrobenou během konverze vanilinu na kyselinu ferulovou. Nejvyšší množství kyseliny vanilové v rostlinách bylo nalezeno v kořenech *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels (Ďebel čínský), která se používá v tradiční čínské medicíně. Různé studie prokázaly účinnost kyseliny vanilové při léčbě zánětlivých procesů [70].



Obrázek 18: Kyselina vanilová, převzato z [71].

***p*-kumarová kyselina**

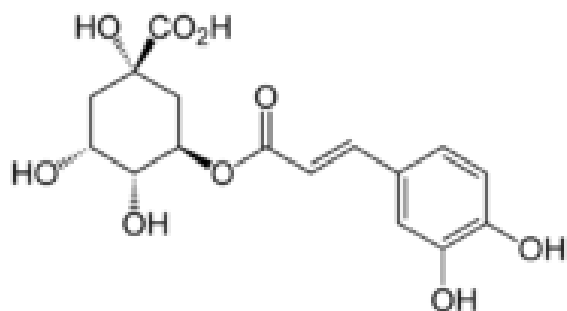
Kyselinu *p*-kumarovou (obr. 19) lze nalézt zejména v ovoci a ovocných výrobcích. Velmi hojně se vyskytuje v jablkách, a to především ve formě esterů. Nejvýznamnější vlastní této kyseliny je, její antimikrobiální účinek, a tudíž je schopná inhibovat růst patogenních bakterií [72,73].



Obrázek 19: Kyselina *p*-kumarová, převzato z [74].

Chlorogenová kyselina

Tato kyselina je nejběžnějším esterem kyseliny kávové a chinové, který slouží k syntéze ligninu. Kyselinu chlorogenovou (obr. 20) řadíme mezi deriváty kyseliny hydroxyskořicové. Tento polyfenol má mnoho vlastností podporujících zdraví, z nichž většina se týká léčby metabolického syndromu, včetně antioxidačních, protizánětlivých, antidiabetických účinků. Tato kyselina je jedním z hlavních polyfenolů v lidské stravě. Vyskytuje se v potravinách a bylinkách, jako jsou jablka, lopuch, mrkev, hrozny, broskve, brambory apod. [75].



Obrázek 20: Kyselina chlorogenová, převzato z [76].

Fyzikálně-chemické vlastnosti vybraných fenolických kyselin jsou uvedeny v tabulce 2.

Tabulka 2: Vybrané charakteristiky fenolických kyselin, převzato z [77,78,79].

Název analytu	Molekulová hmotnost [g/mol]	pK _A	Maximum vlnové délky [nm]
Kyselina syringová	198,17	4,33 ± 0,1	276
Kyselina salicylová	138,12	3,01 ± 0,1	276
Kyselina kávová	180,16	4,58 ± 0,1	324 (max), 296
Kyselina 4-hydroxybenzoová	138,12	4,57 ± 0,1	256
Kyselina ferulová	194,19	4,58 ± 0,1	324 (nm), 296
Kyselina gallová	170,12	4,33 ± 0,1	272
Kyselina vanilová	168,15	4,45 ± 0,1	260 (max), 294
Kyselina p-kumarová	164,16	4,65 ± 0,1	310
Kyselina chlorogenová	354,32	3,91 ± 0,1	326 (max), 300

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Chemikálie a pomůcky

Acetonitril	Sigma – Aldrich, Německo
Deionizovaná voda - připravená na přístroji Milli-Q® Reference Water Purification System (Merck, Billerica, MA, USA)	
Dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát p. a.	Sigma – Aldrich, Německo
Dodecylsírán sodný – SDS	Sigma – Aldrich, Německo
Fenolické kyseliny	Sigma – Aldrich, Německo
Hydrogenfosforečnan disodný dihydrát p. a.	Sigma – Aldrich, Německo
Kyselina boritá p. a.	Sigma – Aldrich, Německo
Kyselina fosforečná 85%	Sigma – Aldrich, Německo
Kyselina chlorovodíková 35%	Sigma – Aldrich, Německo
Tetraboritan sodný dekahydrát p. a.	Sigma – Aldrich, Německo
Thiomočovina	Sigma – Aldrich, Německo

2.2 Použité přístroje a vybavení

pH metr – Orion star A111, Indonésie

Kapilární elektroforetický systém Capel - 205 (Kanada)

Křemenná separační kapilára (Kanada) o vnitřním průměru 75 μm a délce 60 cm. Efektivní délka kapiláry je 53 cm.

Analytické váhy – Mettler Toledo, AB204, Švýcarsko

Pipety (o objemu do 10 μl , 100 μl a 1000 μl) – Thermo Scientific, Finsko

2.3 Příprava základních elektrolytů

Pro přípravu 20, 25, 100 a 150 mmol/l boritanového pufru byly naváženy následující látky. Pro přípravu boritanového pufru o koncentraci 20 mmol/l byla navážena kyselina boritá a rozpuštěna v deionizované vodě na roztok o dané koncentraci. Dále byl navážen tetraboritan sodný a rozpuštěn na roztok o koncentraci 20 mmol/l. Pomocí pH metru byly následně připraveny roztoky pufrů o požadovaném pH (8 a 8,5). U vyšších koncentrací bylo postupováno stejným způsobem, pouze se lišily navážky daných chemikálií.

Pro přípravu 10 mmol/l fosforečnanového pufru byly naváženy následující chemikálie. Pro přípravu fosforečnanového pufru o koncentraci 10 mmol/l byl navážen dihydrogenfosforečnan sodný a připraven roztok o dané koncentraci. Dále byl navážen hydrogenfosforečnan disodný dihydrát a rozpuštěn na roztok o koncentraci 10 mmol/l. Pomocí pH metru byly následně připraveny pufrы o požadovaném pH (6 a 6,5). Pro dosažení pH 2 musela být k těmto dvou chemikáliím přidána kyselina fosforečná.

Pro přípravu roztoku SDS o koncentraci 25 mmol/l bylo naváženo a rozpuštěno SDS. Poté byl roztok doplněn 25 mmol/l boritanovým pufrém o pH 8,5 po rysku na 100 ml, další pufr byl doplněn 10 mmol/l fosforečnanovým pufrém o pH 2 po rysku na 100 ml. Pro přípravu 50 mmol/l pufru s SDS bylo postupováno stejně, pouze s vyšší koncentrací daného analytu.

2.4 Příprava vzorků

Analyzované vzorky byly připraveny jako zásobní roztoky pro následující analýzy o koncentraci 1000 mg/l dané látky. Fenolické kyseliny byly naváženy a poté rozpuštěny v metanolu. Z takto připravených zásobních roztoků byly dále ředěné roztoky k analýzám.

2.5 Postup analýzy

Analýzy byly prováděny pomocí 20 mmol/l, 25 mmol/l, 100 mmol/l a 150 mmol/l boritanového pufru nebo v 10 mmol/l fosforečnanovém pufru. Dále byl experiment měřen v 25 mmol/l a 50 mmol/l roztoku SDS. Připravené elektrolyty byly smíchané na určité hodnoty pH a to jak kyselé (2, 6 a 6,5), tak i alkalické (8 a 8,5). Všechny analýzy probíhaly při 20 °C a dávkování tlakem 50 mBar (~5,1 kPa). Doba dávkování vzorku a elektrolytu byla různá např. (5, 10, 30 a 60 s). Vlnová délka pro detekci byla zvolena 254 nm nebo 220 nm. Měření probíhalo při napětí o hodnotě -30 kV, -20 kV či 30 kV, 20 kV. Některá měření byla prováděna s kombinací jak kladného, tak záporného vkládaného napětí. Každý den byla kapilára promyta před zahájením analýz deionizovanou vodou a před každou analýzou daným elektrolytem. Dvakrát během týdne byla kapilára promyta 0,1 M NaOH po dobu 5 minut a poté ještě deionizovanou vodou.

3 VÝSLEDKY A DISKUZE

Při zpracování experimentální části diplomové práce byly nejprve testovány možnosti separace fenolických kyselin. Během všech měření byly sledovány vlivy vloženého napětí, složení základního elektrolytu, jeho koncentrace či pH. Všechny analýzy probíhaly při 20 °C.

Jako první experimenty byly měřeny jednotlivé fenolické kyseliny v základních elektrolytech s dávkováním bez zakoncentrování, aby se zjistilo, zda je daný elektrolyt pro separaci tohoto druhu látek vhodný či nikoliv.

3.1 Migrační charakteristiky v základních elektrolytech

Jako první byly měřeny migrační charakteristiky vybraných fenolických kyselin v základních elektrolytech, konkrétně v boritanovém pufru o pH 8 a 8,5 a ve fosforečnanovém pufru o pH 6 a 6,5. Vzorky byly rozpuštěny v deionizované vodě.

Analýzy ve fosforečnanovém pufru o pH 6 a 6,5 nebyly úspěšné. Doba dávkování vzorků byla 50 mBar (~5,1 kPa) /5 s, viz podmínky měření v tabulce č. 5 a 6; příloha 1. Žádná z fenolických kyselin v nastavené době analýzy nedomigrovala k detektoru, pravděpodobně vlivem nízkého elektroosmotického toku při tomto pH. Naopak výsledky analýz fenolických kyselin v boritanovém pufru o pH 8 a 8,5 jsou velmi příznivé a při obou pH srovnatelné, takže separace v daném elektrolytu je vhodná. Doba dávkování vzorků byla 50 mBar (~5,1 kPa) /5 s, viz podmínky měření v tabulce č. 7 a 9 a migrační charakteristiky shrnuje tabulka č. 8 a 10; příloha 1. Pro tyto elektrolyty nebyl v čase analýzy 40 min zaznamenán pouze pík kyseliny kávové a gallové. Při těchto experimentech byla použita vysoká koncentrace kyselin (50 mg/l) a napětí +20 kV. Z naměřených migračních časů byly vypočteny zdánlivé pohyblivosti zón daných látek s pomocí rovnice (9):

$$\mu = l_d l_t / U \cdot t \quad [\text{m}^2/\text{V} \cdot \text{s}] \quad (9)$$

kde l_d je efektivní délka kapiláry, l_t je celková délka kapiláry, U je napětí, t je migrační čas.

U boritanového pufru o pH 8 a 8,5 bylo dále zkoušeno dávkování po dobu 10 s (50 mBar (~5,1 kPa)) v kombinaci se zvýšením napětí na 30 kV. Pro tyto podmínky bylo také dosaženo úspěšné separace, viz podmínky měření v tabulce č. 11 a 13 a migrační charakteristiky tabulka č. 12 a 14; příloha 1.

Dále byly provedeny analýzy fenolických kyselin v boritanovém pufru o pH 8, odzkoušeno bylo dávkování vzorku po dobu 5 s (50 mBar (~5,1 kPa)) a na kapiláru bylo vloženo napětí

30 kV. Zde se podařilo změřit všechny fenolické kyseliny kromě kyseliny kávové, viz podmínky měření v tabulce č. 15 a migrační charakteristiky tabulka č. 16; příloha 1.

3.2 Měření naplnění kapiláry při dávkování

Pro určení, jak velký podíl kapiláry je naplněn vzorkem při dávkování byla proměřena doba, za kterou doputuje k detekčnímu okénku zóna thiomochoviny při aplikaci tlaku na začátek kapiláry. Thiomochovina byla měřena jak ve vodě, tak i v boritanovém pufru (100 mmol/l, pH 8), při tlaku 50 mBar (~5,1 kPa) a napětí 0 kV. Analyt byl měřen při dávkování po dobu 5 s a 10 s. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 3 a 4.

Tabulka 3: Thiomochovina ve vodě, BGE: boritanový pufr o pH 8 (100 mmol/l)

Dávkování 50 mBar (~5,1 kPa)/5 s		
Čas průchodu detektorem [min]	Výška [$\cdot 10^{-3}$]	Plocha [$\cdot 10^{-3}$ s]
5,36	55,74	6081
5,41	34,66	3743
∅ 5,39	45,20	4912
Dávkování 50 mBar (~5,1 kPa)/10 s		
Čas průchodu detektorem [min]	Výška [$\cdot 10^{-3}$]	Plocha [$\cdot 10^{-3}$ s]
5,30	82,98	11110
5,31	90,70	12210
∅ 5,31	86,84	11660

Tabulka 4: Thiomochovina v BGE, BGE: boritanový pufr o pH 8 (100 mmol/l)

Dávkování 50 mBar (~5,1 kPa)/5 s		
Čas průchodu detektorem [min]	Výška [$\cdot 10^{-3}$]	Plocha [$\cdot 10^{-3}$ s]
5,33	37,37	4035
5,32	31,00	3330
∅ 5,33	34,18	3682
Dávkování 50 mBar (~5,1 kPa)/10 s		
Čas průchodu detektorem [min]	Výška [$\cdot 10^{-3}$]	Plocha [$\cdot 10^{-3}$ s]
5,28	24,00	3032
5,29	41,25	5332
∅ 5,29	36,63	4182

Z naměřených časů průchodu thiomočoviny detekčním okénkem vyplývá, že na tyto výsledky nemá vliv použitý elektrolyt. Z časů thiomočoviny byl vypočítán podíl kapiláry naplněné vzorkem dle následující rovnice:

$$\% \text{ dávkování} = 100 \cdot l_d \cdot t_{inj} / (l_t \cdot t_{TM}) \quad (10)$$

Výpočet pro dávkování 5 s, vzorek v deionizované vodě

$$\% \text{ dávkování} = 100 \cdot 0,53 \cdot (5/60) / (0,60 \cdot 5,39) = 1,37 \%$$

Výpočet pro dávkování 10 s, vzorek v deionizované vodě

$$\% \text{ dávkování} = 100 \cdot 0,53 \cdot (10/60) / (0,60 \cdot 5,31) = 2,77 \%$$

Výpočet pro dávkování 5 s, vzorek v borátovém elektrolytu

$$\% \text{ dávkování} = 100 \cdot 0,53 \cdot (5/60) / (0,60 \cdot 5,33) = 1,38 \%$$

Výpočet pro dávkování 10 s, vzorek v borátovém elektrolytu

$$\% \text{ dávkování} = 100 \cdot 0,53 \cdot (10/60) / (0,60 \cdot 5,29) = 2,78 \%$$

kde l_d je efektivní délka kapiláry, l_t je celková délka kapiláry, t_{inj} je čas dávkování zóny vzorku a t_{TM} je čas průchodu zóny thiomočoviny detekčním okénkem pomocí tlaku 50 mBar (~5,1 kPa). Z vypočtených hodnot % plnění kapilár je tedy zřejmé, že pro naplnění běžně používaného objemu kapiláry okolo 1 % je dostatečný čas 5 s při aplikaci tlaku 50 mBar (~5,1 kPa). Pro vyšší časy plnění by pak mělo docházet k zakoncentrování vzorku.

3.3 Metoda zakoncentrování přechodným pH rozhraním

Tato metoda byla testována pomocí kombinace fosforečnanového pufru o pH 2 a 6, fosforečnanový pufr o pH 2 společně s boritanovým pufrem o pH 8 a 8,5. Vzorky zde byly rozpuštěny jak ve fosforečnanovém pufru, boritanovém pufru tak i ve vodě. Byla zde zkoušena i kombinace různé doby dávkování fosforečnanového pufru o pH 2. Dále zde byl ověřován i vliv změny v pořadí dávkování vzorku a elektrolytů na zakoncentrování fenolických kyselin.

V první části měření se dávkovalo v pořadí elektrolyt, vzorek a fosforečnanový pufr o pH 2.

A) Jako rozpouštědlo vzorků byla použita deionizovaná voda, jako elektrolyt byl použit fosforečnanový pufr o pH 6 a 2, doba dávkování vzorku i fosforečnanového pufru o pH 2 byla 50 mBar (~5,1 kPa)/ 10 s. Nulová linie elektroforeogramu byla v driftu a obsahovala velmi vysoký šum. Nepovedlo se zakoncentrovat žádnou z použitých fenolických kyselin, viz podmínky měření v tabulce č. 17; příloha 1.

B) Jako rozpouštědlo vzorků byl použit fosforečnanový pufr o pH 6, jako elektrolyt byl použit fosforečnanový pufr o pH 6 a 2, doba dávkování vzorku i fosforečnanového pufru o pH 2 byla 50 mBar (~5,1 kPa) /10 s. Nulová linie elektroforeogramu byla u některých analýz značně zašuměná. Částečné zakoncentrování se povedlo pouze u kyselin ferulové a *p*-kumarové při dávkování jednotlivých standardů. Při dávkování směsi nedošlo k úplnému rozdělení. Viz podmínky měření v tabulce č. 18 a migrační charakteristiky tabulka č. 19; příloha 1.

C) Jako rozpouštědlo vzorků byl použit boritanový pufr o pH 8, jako elektrolyt byl použit boritanový pufr o pH 8 a fosforečnanový pufr o pH 2, doba dávkování vzorku i fosforečnanového pufru o pH 2 byla 50 mBar (~5,1 kPa) /10 s. Při těchto analýzách se nepovedlo zakoncentrovat žádnou z vybraných fenolických kyselin. V elektroforeogramu byl viditelný velký pík, který byl blízko elektroosmotického toku, nejednalo se však o zakoncentrovanou zónu analyzovaných kyselin. Viz podmínky měření v tabulce č. 20; příloha 1.

D) Jako rozpouštědlo vzorků byla dále použita deionizovaná voda, jako elektrolyt byl použit boritanový pufr o pH 8 a fosforečnanový pufr o pH 2, doba dávkování vzorku byla 50 mBar (~5,1 kPa) /10 s. Fosforečnanový pufr o pH 2 byl dávkován tlakem 50 mBar (~5,1 kPa) po dobu 5 nebo 15 s. Při nadávkování kratší zóny fosforečnanového pufru (50 mBar (~5,1 kPa)/ 5 s) byl na záznamu viditelný velký pík, který byl blízko elektroosmotického toku, opět se však nejednalo o zakoncentrovanou zónu analytů.

Při dávkování fosforečnanového pufru tlakem 50 mBar (~5,1 kPa) po dobu 15 s byla nulová linie elektroforeogramu velmi nestabilní. Ze získaných záznamů nebylo možné odečíst žádná data, takže ani jedna z možností dávkování nebyla úspěšná pro zakoncentrování měřených fenolických kyselin. Viz podmínky měření v tabulce č. 21 a 22; příloha 1.

E) Jako rozpouštědlo vzorků byl použit boritanový pufr o pH 8,5. Jako elektrolyt byl použit boritanový pufr o pH 8,5 a fosforečnanový pufr o pH 2, doba dávkování vzorku byla 50 mBar (~5,1 kPa) /10 s. Pro fosforečnanový pufr o pH 2 byl testován vliv dávkované zóny na výsledky analýzy, hodnoty dávkování byly 50 mBar (~5,1 kPa) /5 s a 50 mBar (~5,1 kPa)/10 s. U 50 mBar (~5,1 kPa)/ 5 s i 10 s byl viditelný velký pík, který byl blízko elektroosmotického toku. Viz podmínky měření v tabulce č. 23 a 24; příloha 1.

F) Jako rozpouštědlo vzorků byl použit fosforečnanový pufr o pH 2, jako elektrolyt byl použit boritanový pufr o pH 8 a fosforečnanový pufr o pH 2, doba dávkování vzorku byla 50 mBar (~5,1 kPa) / 10 s. U fosforečnanového pufru o pH 2 byla testována dávkování tlakem 50 mBar (~5,1 kPa) po dobu 5 s, 10 s a 15 s. U všech testovaných podmínek měření byl v každém

elektroforeogramu viditelný velký pík, který byl blízko elektroosmotického toku, nejednalo se však o zakoncentrovanou zónu. Viz podmínky měření v tabulce č. 25, 26 a 27; příloha 1.

V druhé části bylo dávkováno v pořadí elektrolyt, fosforečnanový pufr o pH 2 a vzorek.

A) Jako rozpouštědlo vzorků byl použit boritanový pufr o pH 8,5, jako elektrolyt byl použit boritanový pufr o pH 8,5 a fosforečnanový pufr o pH 2. Doba dávkování vzorku ve fosforečnanovém pufru o pH 2 byla 50 mBar (~5,1 kPa)/ 10 s. Na elektroforeogramu byl viditelný pík, který byl blízko elektroosmotického toku, nejednalo se však o signál patřící zkoumaným fenolickým kyselinám, viz podmínky měření v tabulce č. 28; příloha 1.

B) Jako rozpouštědlo vzorků byl použit fosforečnanový pufr o pH 2, jako elektrolyt byl použit boritanový pufr o pH 8 a fosforečnanový pufr o pH 2. Doba dávkování vzorku byla 50 mBar (~5,1 kPa)/ 10 s pro všechna měření v této sekci. Měnila se doba dávkování fosforečnanového pufru o pH 2, při použitím tlaku dávkování 50 mBar (~5,1 kPa) byla doba dávkování 5 s, 10 s a 15 s. U všech výše uvedených kombinací dávkování vzorku a elektrolytu, byl v každém elektroforeogramu viditelný velký pík, který byl blízko elektroosmotického toku, nejednalo se však o signál zkoumaných látek, viz podmínky měření v tabulce č. 29,30 a 31; příloha 1.

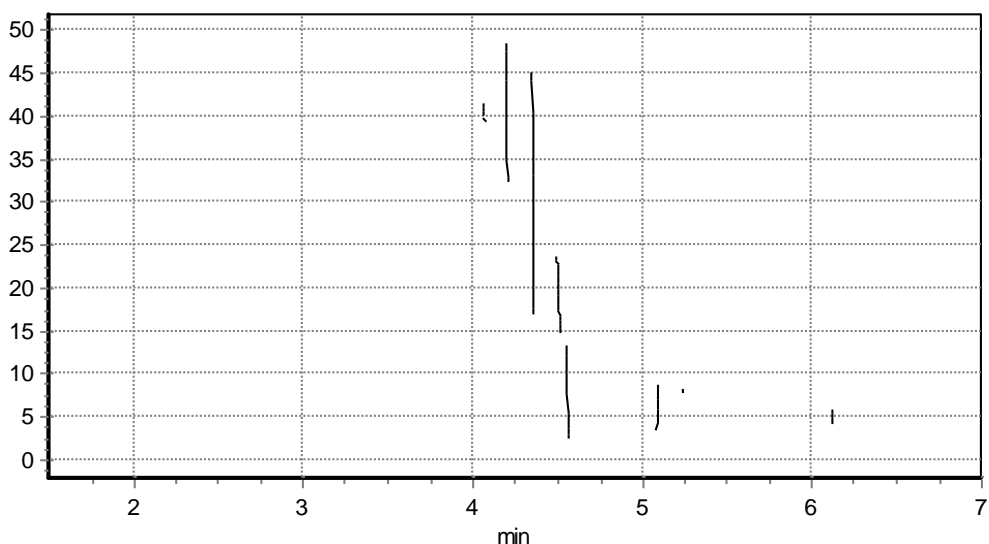
Z výše uvedených pokusů o zakoncentrování se nepovedlo prokázat, že by byla některá z metod optimální pro detekci všech, nebo alespoň většiny fenolických kyselin. U téměř všech testovaných systémů nebylo pomocí změny pH separačního elektrolytu dosaženo zaostření separovaných zón fenolických kyselin. Proto byly při dalších experimentech ověřovány další možnosti prekoncentrace před samotnou elektroforetickou separací.

3.4 Zakoncentrování vzorku z velkého objemu zesílením elektrického pole

Při testování této metody byl prvotně použit hydrodynamický nástřik dlouhé zóny vzorku do kapiláry, zóna zaujímá 30 – 50 % z celkového objemu kapiláry. Poté došlo k přepólování polaroty na opačnou, než která bude použita při měření. Prakticky má tato metodika fungovat tak, že dojde k vytlačení matrice ven z kapiláry a analyty se zakoncentrují a formují do úzké zóny na počátku kapiláry pomocí vlastní pohyblivosti. Poté je polarita opět obrácena a až do konce analýzy migrují analyty souhlasným směrem s elektroosmotickým tokem k detektoru. Také byly testovány podmínky zakoncentrování bez přepínání polaroty. Téměř všechny experimenty v této části (s přepínáním i bez přepínání polaroty) měření probíhaly s dávkováním 50 mBar (~5,1 kPa) a vzorky byly dákovány po dobu 30 s při teplotě 20 °C. Vkládané napětí mělo hodnotu buď 30 kV či -30 kV, nebo zde byla kombinace obou napětí. Byla zde použita také kombinace rozpouštědel, ve kterých byly vzorky rozpouštěny, a to v boritanovém pufru o pH 8 a 8,5 nebo v deionizované vodě.

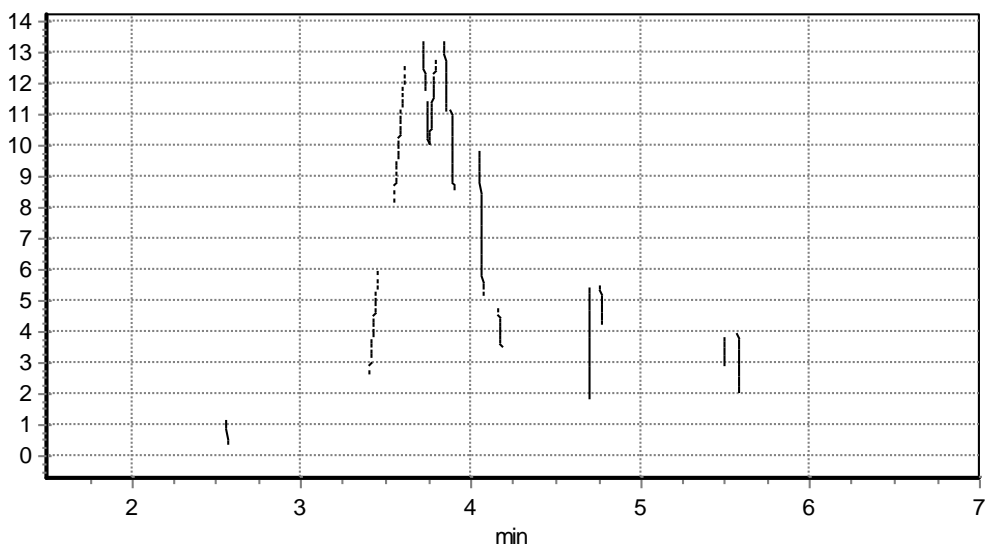
A) V první řadě byly pozorovány migrační charakteristiky vzorků a jejich směsi, které byly rozpouštěny v boritanovém pufru o pH 8,5, tento pufr byl použit i jako základní elektrolyt. Podmínky analýzy byly následující: dávkování 50 mBar (~5,1 kPa)/30 s, teplota 20 °C, napětí 30 kV, pipetovaný objem vzorku 50 µl, který byl doplněn daným rozpouštědlem na objem 1000 µl (koncentrace vzorku 50 mg/l), kromě kyseliny kávové a gallové kde bylo pipetováno 25 µl vzorku (koncentrace vzorku 25 mg/l). Za těchto podmínek došlo k detekci daných analytů, ale píky byly široké a zkosené. Směs nebyla zcela rozseparovaná, viz podmínky měření v tabulce č. 32 a migrační charakteristiky tabulka č. 33; příloha 1.

B) Následně byly sledovány migrační charakteristiky vzorků a jejich směsi za téměř identických podmínek. Rozdíl byl pouze v hodnotě vkládaného napětí. Po dobu 10 s bylo vkládáno -30 kV, následně byla polarita přepnuta na 30 kV až do konce analýzy. Za těchto podmínek opět došlo k detekci daných analytů, píky byly opět široké a zkosené, přičemž u separace směsi se nepovedlo dosáhnout úplného rozdělení (obrázek 21). Nutno však poznamenat, že analýza za daných podmínek poskytovala větší plochy a výšky píků než v předchozím případě A). Viz podmínky měření v tabulce č. 34 a migrační charakteristiky tabulka č. 35; příloha 1.



Obrázek 21: Směs fenolických kyselin, elektrolyt boritanový pufr o pH 8,5, prvních 10 s – 30 kV, poté až do konce analýzy napětí 30 kV, dávkování 50 mBar (~5,1 kPa)/30 s.

C) Vzhledem k tomu, že v předchozích analýzách byly píky široké a zkosené, tak vzorky byly dávkovány o nižší koncentraci. Nově tedy bylo pipetováno 15 μ l vzorku (koncentrace vzorku 15 mg/l), který byl doplněn daným rozpouštědlem na objem 1000 μ l. Takto připravená koncentrace vzorků 15 mg/l byla používána i u dalších měření, viz níže. Vzorky byly opět rozpuštěny v boritanovém pufru o pH 8,5, který byl použit i jako základní elektrolyt. Bylo zde aplikováno kladné napětí 30 kV. Podmínky dávkování byly následující 50 mBar (~5,1 kPa)/30 s. U píků došlo k lehkému zlepšení, nicméně stále byly relativně široké a některé stále zkosené. Směs byla rozdělena lépe oproti předchozímu měření, nicméně zde nelze zcela určitě identifikovat jednotlivé látky ve směsi (obrázek 22). Viz podmínky měření v tabulce č. 36 a migrační charakteristiky tabulka č. 37; příloha 1.



Obrázek 22: Směs fenolických kyselin, elektrolyt boritanový pufr o pH 8,5, napětí 30 kV, dávkování 50 mBar (~5,1 kPa)/30 s.

D) Podmínky měření byly stejné jako v případě C). Jediná změna byla v hodnotě vkládaného napětí. Po dobu 10 s bylo vkládáno napětí o hodnotě -30 kV, následně byla polarita přepnuta na 30 kV až do konce analýzy. Výsledky byly téměř identické jako v případě C). Viz podmínky měření v tabulce č. 38 a migrační charakteristiky tabulka č. 39; příloha 1.

E) Byly pozorovány migrační charakteristiky vzorků fenolických kyselin a jejich směsí, které byly rozpuštěny v boritanovém pufru o pH 8, tento pufr byl použit i jako základní elektrolyt. Podmínky analýzy byly následující: dávkování 50 mBar (~5,1 kPa)/30 s, teplota 20 °C, napětí 30 kV, pipetovaný objem vzorku 15 μ l, který byl doplněn daným rozpouštědlem na objem 1000 μ l a poskytl tak roztok o koncentraci 15 mg/l dané látky. Za těchto podmínek došlo k detekci daných analytů, ale většina píků byla zkosená. Směs nebyla rozseparovaná. Viz podmínky měření v tabulce č. 40 a migrační charakteristiky tabulka č. 41; příloha 1.

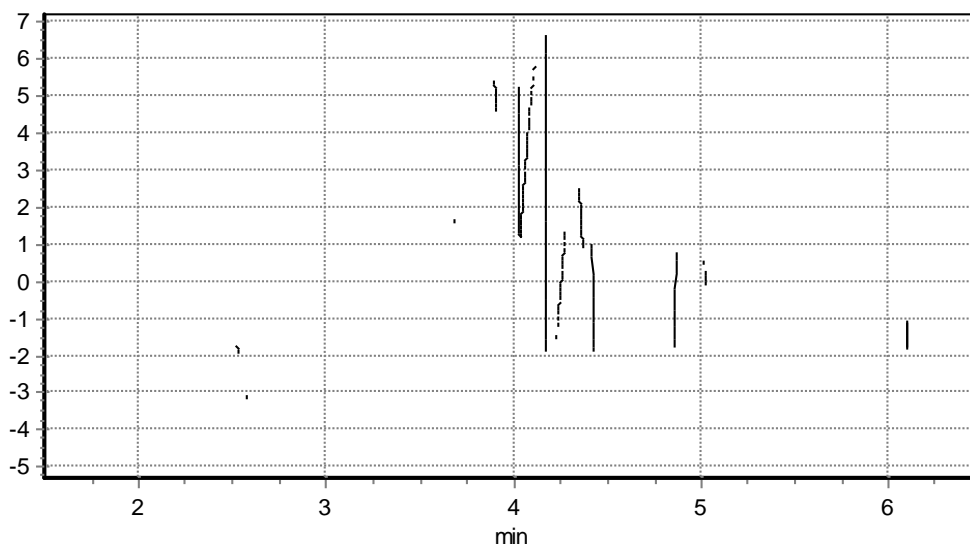
F) Podmínky měření byly stejné jako v případě E). Jediná změna proběhla ve vkládaném napětí. Po dobu 10 s bylo vkládáno -30 kV, následně byla polarita přepnuta na 30 kV až do konce analýzy. Výsledky byly téměř identické jako v případě E). Viz podmínky měření v tabulce č. 42 a migrační charakteristiky tabulka č. 43; příloha 1.

G) Byly pozorovány migrační charakteristiky vzorků a směsí, které byly rozpuštěny v deionizované vodě, jako základní elektrolyt byl použit boritanový pufr o pH 8. Podmínky

analýzy byly následující: dávkování 50 mBar (~5,1 kPa)/30 s, teplota 20 °C, napětí 30 kV, pipetovaný objem zásobního roztoku vzorku 15 µl, který byl doplněn daným rozpouštědlem na objem 1000 µl (koncentrace látek 15 mg/l). Za těchto podmínek došlo k zakoncentrování u všech fenolických kyselin kromě kyseliny kávové a gallové. U směsi se zakoncentrování s úspěšnou separací nepodařilo. Viz podmínky měření v tabulce č. 44 a migrační charakteristiky tabulka č. 45; příloha 1.

H) Podmínky měření byly stejné jako v případě G). Jediná změna proběhla ve vkládaném napětí. Po dobu 10 s bylo vkládáno napětí -30 kV, následně byla polarita přepnuta na 30 kV až do konce analýzy. Výsledky byly téměř identické jako v případě G), kromě zanedbatelného rozdílu migračních charakteristik; k zakoncentrování došlo u stejných fenolických kyselin, tedy kromě kyseliny kávové a gallové. Viz podmínky měření v tabulce č. 46 a migrační charakteristiky tabulka č. 47; příloha 1.

CH) Byly pozorovány migrační charakteristiky vzorků fenolických kyselin a jejich směsi, které byly rozpuštěny v boritanovém pufru o pH 8, tento pufr byl použit i jako základní elektrolyt. Podmínky analýzy byly následující: dávkování 50 mBar (~5,1 kPa)/20 s, teplota 20 °C, napětí 30 kV, pipetovaný objem zásobního roztoku vzorku 15 µl, který byl doplněn daným rozpouštědlem na objem 1000 µl (koncentrace látek 15 mg/l). Za těchto podmínek došlo k detekci daných analytů, ale většina píků byla široká a zkosená. U směsi došlo k částečné separaci, ale stále nebylo možné s jistotou identifikovat daný analyt. Viz obrázek 23, podmínky měření v tabulce č. 48 a migrační charakteristiky tabulka č. 49; příloha 1.



Obrázek 23: Směs fenolických kyselin, elektrolyt boritanovém pufr o pH 8, napětí 30 kV, dávkování 50 mBar (~5,1 kPa)/20 s.

I) Podmínky měření byly stejné jako v případě CH). Úprava separačních podmínek proběhla ve velikosti vkládaného napětí. Po dobu 10 s bylo vkládáno napětí -30 kV, následně byla hodnota vloženého napětí změněna na 30 kV až do konce analýzy. Za těchto podmínek došlo k detekci daných analytů, ale většina píků byla širokých a zkosených. U směsi došlo k částečné separaci, ale stále není možné s jistotou identifikovat jednotlivé analyty. Viz podmínky měření v tabulce č. 50 a migrační charakteristiky tabulka č. 51; příloha 1.

J) Byly pozorovány migrační charakteristiky vzorků fenolických kyselin a jejich směsi, které byly rozpuštěny v boritanovém pufru o pH 8, tento pufr byl použit i jako základní elektrolyt. Podmínky analýza byly následující: dávkování 50 mBar (~5,1 kPa)/30 s, teplota 20 °C, napětí 30 kV, koncentrace sledovaných látek byla 0,05 mg/l. Za těchto podmínek nedošlo k zakoncetrování ani detekci daných analytů. Viz podmínky měření v tabulce č. 52; příloha 1.

K) Byly pozorovány migrační charakteristiky jednotlivých analytů a jejich směsi, které byly rozpuštěny v deionizované vodě. Jako základní elektrolyt byl použit boritanový pufr o pH 8. V tomto experimentu byl do analýzy navíc zařazen krok dávkování základního elektrolytu za zónu vzorku. Pořadí v kapiláře tedy bylo, pufr – vzorek – pufr, který byl dávkován tlakem 50 mBar (~5,1 kPa) po dobu 30 s. Podmínky analýzy byly následující: dávkování 50 mBar (~5,1 kPa)/60 s, teplota 20 °C. Po dobu 10 s bylo vkládáno napětí -30 kV, následně byla polarita přepnuta na 30 kV až do konce analýzy. Koncentrace sledovaných látek byla 0,05 mg/l.

Za těchto podmínek nedošlo k zakoncentrování ani detekci daných analytů. Viz podmínky měření v tabulce č. 53; příloha 1.

L) Byly pozorovány migrační charakteristiky jednotlivých analytů a jejich směsi, které byly rozpuštěny v boritanovém pufru o pH 8, tento pufr byl použit i jako základní elektrolyt. V tomto experimentu byl do analýzy navíc zařazen krok dávkování základního elektrolytu. Pořadí v kapiláře tedy bylo pufr – vzorek – pufr, který byl dávkován tlakem 50 mBar (~5,1 kPa) po dobu 30 s. Podmínky analýzy byly následující: dávkování 50 mBar (~5,1 kPa)/30 s, teplota 20 °C. Po dobu 10 s bylo vkládáno napětí -30 kV, následně byla polarita přepnuta na 30 kV až do konce analýzy. Koncentrace sledovaných látek byla 0,05 mg/l. Za těchto podmínek nedošlo k zakoncentrování ani detekci daných analytů. Viz podmínky měření v tabulce č. 54; příloha 1.

M) Byly pozorovány migrační charakteristiky vybraných fenolických kyselin a jejich směsi, které byly rozpuštěny v deionizované vodě. Jako základní elektrolyt byl použit boritanový pufr o pH 8. V tomto experimentu byl do analýzy navíc zařazen krok dávkování základního elektrolytu. Pořadí v kapiláře tedy bylo pufr – vzorek – pufr, který byl dávkován při 50 mBar (~5,1 kPa)/30 s. Podmínky analýzy byly následující: dávkování 50 mBar (~5,1 kPa)/30 s, teplota 20 °C, napětí 30 kV. Koncentrace sledovaných látek byla 0,05 mg/l. Za těchto podmínek nedošlo k zakoncentrování ani detekci daných analytů. Viz podmínky měření v tabulce č. 55; příloha 1.

Z výše uvedených podmínek se jako nejlepší osvědčila metoda G) a H), kde došlo k zakoncentrování téměř všech analytů, kromě výše zmíněné kyseliny kávové a gallové. Zakoncentrovat a úspěšně rozdělit celou směs se nepovedlo v žádném z výše uvedených experimentů v této kapitole.

3.4.1 Zakoncentrování v boritanovém elektrolytu o vysoké koncentraci

Vzhledem k tomu, že v experimentech prezentovaných v předchozí kapitole nedošlo k uspokojivému zakoncentrování a separaci studovaných látek, byl následně testován jako základní elektrolyt boritanový pufr s vyšší koncentrací, aby byl zajištěn větší rozdíl ve vodivosti separačního prostředí a vzorku.

A) Byly studovány migrační charakteristiky vybraných fenolických kyselin a jejich směsi, které byly rozpuštěny v deionizované vodě. Jako základní elektrolyt byl použit boritanový pufr o pH 8 o koncentraci 100 mmol/l. V tomto experimentu byl do analýzy navíc zařazen krok dávkování základního elektrolytu za zónu vzorku. Pořadí v kapiláře tedy bylo pufr – vzorek – pufr, který

byl dávkován při 50 mBar (~5,1 kPa)/30 s. Podmínky analýzy vzorku byly následující: dávkování 50 mBar (~5,1 kPa)/30 s, teplota 20 °C, napětí 30 kV. Podmínky dávkování základního elektrolytu 50 mBar (~5,1 kPa)/30 s. Koncentrace sledovaných látek byla 0,1 mg/l. Za těchto podmínek nedošlo k výraznému zakoncentrování daných analytů. Viz podmínky měření v tabulce č. 56; příloha 1.

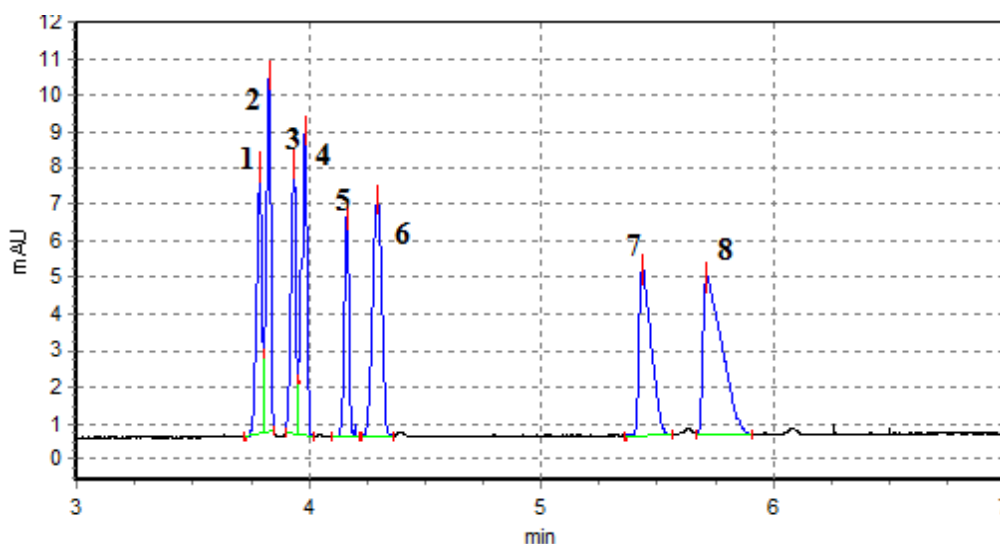
B) Byly zde pozorovány migrační charakteristiky vzorků a směsi, které byly rozpuštěny v deionizované vodě. Jako základní elektrolyt byl použit boritanový pufr o pH 8 o koncentraci 100 mmol/l. Pořadí v kapiláře bylo pufr - vzorek. Podmínky analýzy vzorku byly následující: dávkování 50 mBar (~5,1 kPa)/10 s, teplota 20 °C, napětí 30 kV. Pipetovaný objem zásobního roztoku vzorku byl 50 µl, který byl doplněn daným rozpouštědlem na objem 1000 µl a výsledná koncentrace tak činila 50 mg/l. Analyty se povedlo detekovat, nicméně tyto separační podmínky poskytly horší rozlišení látek, než při separaci fenolických kyselin v boritanovém pufru o pH 8 a koncentraci 20 mmol/l, kde za identických podmínek docházelo rovněž k vyšší odezvě. U směsi nedošlo k úplné separaci. Viz podmínky měření v tabulce č. 57 a migrační charakteristiky tabulka č. 58; příloha 1.

C) Byly pozorovány migrační charakteristiky vzorků jednotlivých fenolických kyselin a jejich směsi, které byly rozpuštěny v deionizované vodě. Jako základní elektrolyt byl použit boritanový pufr o pH 8. V tomto experimentu byl do analýz navíc zařazen krok dávkování základního elektrolytu za zónu vzorku. Pořadí v kapiláře tedy bylo pufr – vzorek – pufr. Podmínky analýzy vzorku byly následující: dávkování 50 mBar (~5,1 kPa)/30 s, teplota 20 °C. Podmínky dávkování základního elektrolytu za zónu vzorku 50 mBar (~5,1 kPa)/30 s. Po dobu 10 s bylo vkládáno napětí -30 kV, následně byla polarita přepnuta na 30 kV až do konce analýzy. Koncentrace sledovaných látek byla 0,1 mg/l. Za těchto podmínek došlo k výraznému zvýšení plochy píku pouze u kyseliny salicylové. U většiny analýz byla nestabilní nulová linie elektroforeogramu a poměrně vysoký šum. Viz podmínky měření v tabulce č. 59 a migrační charakteristiky tabulka č. 60; příloha 1.

D) Podmínky měření byly téměř stejné jako u metody C), pouze s rozdílnou dobou dávkování pro vzorek: 50 mBar (~5,1 kPa)/60 a 90 s, teplota 20 °C. Podmínky dávkování základního elektrolytu 50 mBar (~5,1 kPa)/30 s. Po dobu 10 s bylo vkládáno napětí -30 kV, následně byla polarita přepnuta na 30 kV až do konce analýzy. Koncentrace sledovaných látek byla 0,1 mg/l. Za těchto podmínek nedošlo k výraznému zakoncentrování žádné z fenolických kyselin.

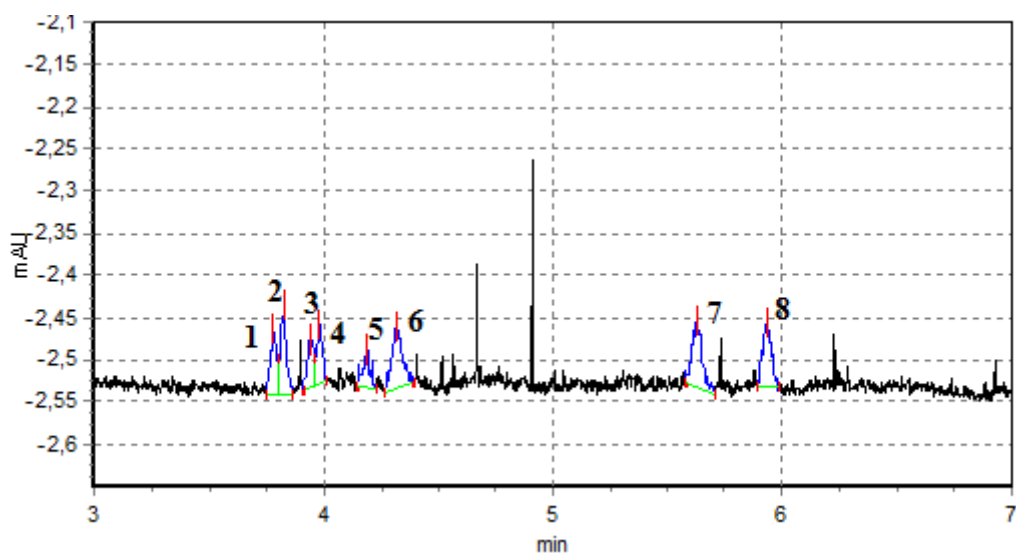
U většiny analýz byla pozorována nestabilní nulová linie elektroforeogramu a vysoký šum. Viz podmínky měření v tabulce č. 61 a 62; příloha 1.

E) U následujících analýz, viz níže, bylo opuštěno od dávkování zóny pufru po nadávkování vzorku. Byly pozorovány migrační charakteristiky vzorků vybraných fenolických kyselin a jejich směsí, které byly rozpuštěny v deionizované vodě. Jako základní elektrolyt byl použit boritanový pufr o pH 8. Podmínky analýzy vzorku byly následující: dávkování 50 mBar (~5,1 kPa)/5 s, teplota 20 °C, napětí 30 kV. Koncentrace sledovaných látek byla 10 mg/l. Za následujících podmínek došlo k zakoncentrování jak jednotlivých analytů, tak i k téměř úplné separaci směsi. Směs obsahovala devět fenolických kyselin, které se rozdělily do osmi píků, pravděpodobně došlo ke spojení píku kyseliny salicylové a chlorogenové (obrázek 24). Viz podmínky měření v tabulce č. 63 a migrační charakteristiky tabulka č. 64; příloha 1.



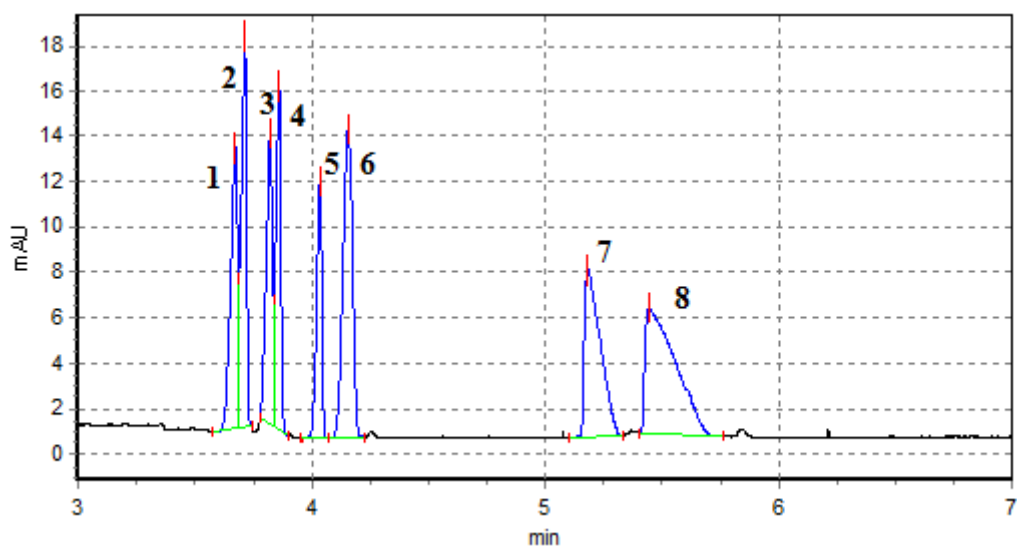
Obrázek 24: Směs fenolických kyselin, elektrolyt boritanový pufr o pH 8, napětí 30 kV, dávkování 50 mBar (~5,1 kPa)/5 s. 1 – kys. ferulová, 2 – kys. syringová, 3 – kys. *p*-kumarová, 4 – kys. vanilová, 5 – kys. 4-hydroxybenzoová, 6 – kys. salicylová a chlorogenová, 7 – kys. kávová, 8 – kys. gallová.

F) Podmínky měření byly v tomto případě stejné jako u případu E). Jediný rozdíl je v koncentraci látek, která zde je 0,1 mg/l. Za následujících podmínek došlo k zakoncentrování jak jednotlivých analytů, tak i směsi. Směs byla rozdělena podobně jako v předchozím případě. Nicméně píky v těchto koncentracích neposkytují příliš velký odstup signálu od šumu, takže se pohybují těsně nad mezí detekce (obrázek 25). Viz podmínky měření v tabulce č. 65 a migrační charakteristiky tabulka č. 66; příloha 1.



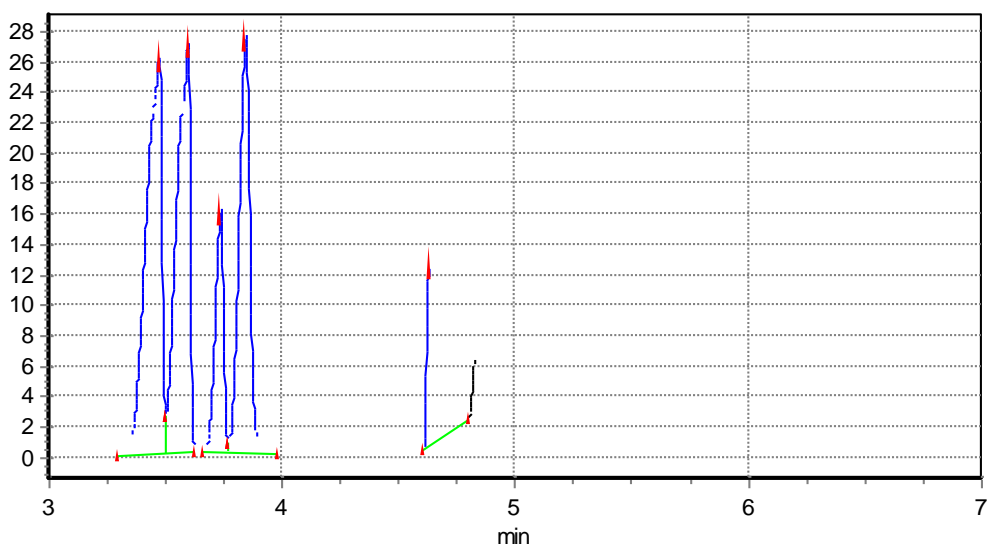
Obrázek 25: Směs fenolických kyselin, elektrolyt boritanový pufr o pH 8, napětí 30 kV, dávkování 50 mBar (~5,1 kPa)/5 s. 1 – kys. ferulová, 2 – kys. syringová, 3 – kys. *p*-kumarová, 4 – kys. vanilová, 5 – kys. 4 – hydroxybenzoová, 6 – kys. salicylová a chlorogenová, 7 – kys. kávová, 8 – kys. gallová.

G) Podmínky měření jsou identické včetně použité koncentrace jako u případu E). Je zde pouze změna v dávkování analytu a to 50 mBar (~5,1 kPa)/10 s. Za následujících podmínek došlo k zakoncentrování jak jednotlivých analytů, tak i ve směsi. Celková doba analýzy byla mírně kratší, ovšem separace je z hlediska rozlišení jednotlivých látek podobná případu E), takže podmínky byly stejně příznivé jako u této metody (obrázek 26). Viz podmínky měření v tabulce č. 67 a migrační charakteristiky tabulka č. 68; příloha 1.



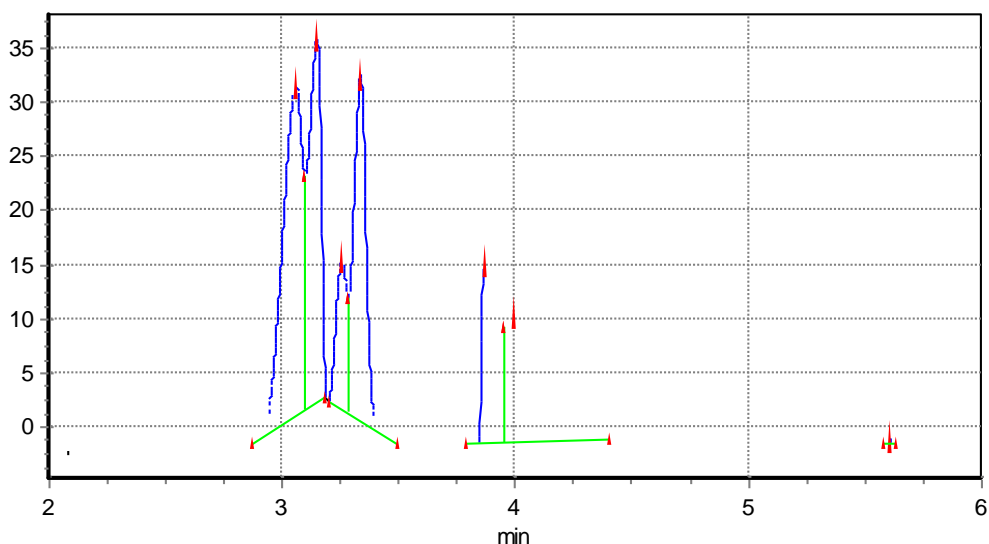
Obrázek 26: Směs fenolických kyselin, elektrolyt boritanový pufr o pH 8, napětí 30 kV, dávkování 50 mBar (~5,1 kPa)/10 s. 1 – kys. ferulová, 2 – kys. syringová, 3 – kys. *p*-kumarová, 4 – kys. vanilová, 5 – kys. 4 – hydroxybenzoová, 6 – kys. salicylová a chlorogenová, 7 – kys. kávová, 8 – kys. gallová.

H) Podmínky měření jsou identické včetně použité koncentrace jako u případu E). Je zde pouze změna v dávkování analytu a to 50 mBar (~5,1 kPa)/20 s. Za následujících podmínek došlo k zakoncentrování jak jednotlivých analytů, tak i ve směsi, ale ne všech látek. Směs se rozdělila do pěti píků a zejména první dvě dvojice látek nejsou rozdělené (obrázek 27). Příznivější podmínky byly u dávkování do 10 s při 50 mBar (~5,1 kPa), zde je zřejmě kapilára již přetížená a není zde možnost řádné identifikace složek směsi. Viz podmínky měření v tabulce č. 69 a migrační charakteristiky tabulka č. 70; příloha 1.



Obrázek 27: Směs fenolických kyselin, elektrolyt boritanový pufr o pH 8, napětí 30 kV, dávkování 50 mBar (~5,1 kPa)/20 s. Jednotlivé složky směsi se nepodařilo identifikovat

CH) Podmínky měření jsou identické včetně použité koncentrace jako u případu E). Je zde pouze změna v dávkování analytu a to 50 mBar (~5,1 kPa)/30 s. Za následujících podmínek došlo k zakoncentrování jak jednotlivých analytů, tak i ve směsi, ale ne u všech látek. Směs se rozdělila do pěti píků, analyzovaných látek bylo devět. Při porovnání směsi při dávkování 20 s a 30 s můžeme vidět, že se píky postupně k sobě přibližují a mají tendenci vytvořit jednu velkou zónu. Při aplikaci ještě delší doby dávkování daných analytů by s velkou pravděpodobností nedošlo k separaci vůbec. Více příznivé podmínky byly u dávkování do 10 s při 50 mBar (~5,1 kPa). Zde je zřejmě kapilára již přetížená a není možnost řádné separace a identifikace látek (obrázek 28). Viz podmínky měření v tabulce č. 71 a migrační charakteristiky tabulka č. 72; příloha 1.

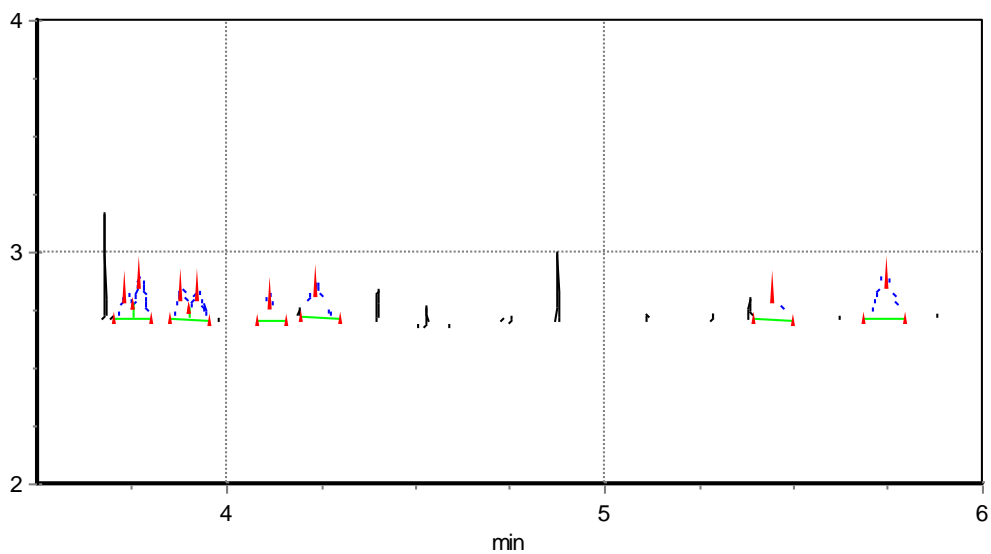


Obrázek 28: Směs fenolických kyselin, elektrolyt boritanový pufr o pH 8, napětí 30 kV, dávkování 50 mBar (~5,1 kPa)/30 s. U této směsi již nelze identifikovat, o jaký analyt se jedná. Píky mají tendenci se spojovat do jednoho velkého píku.

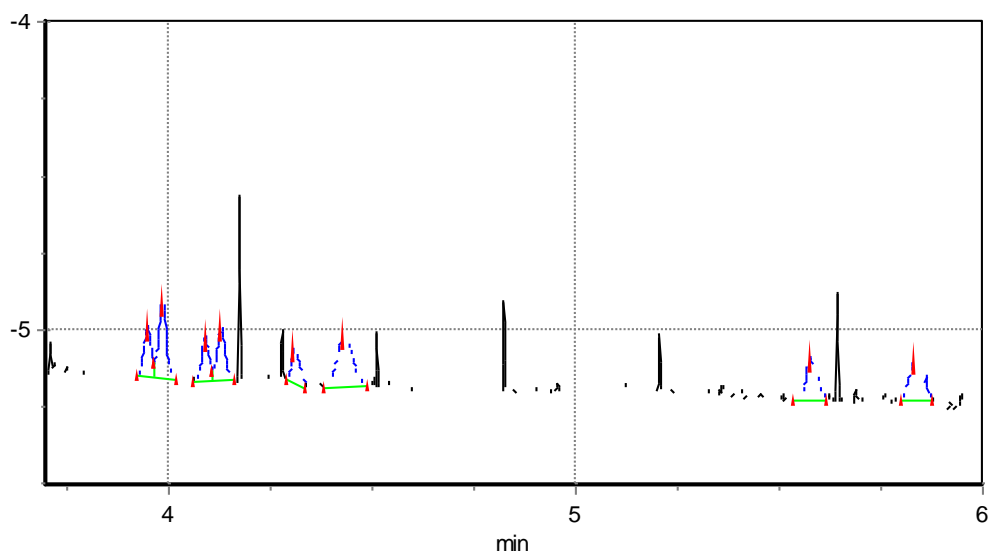
3.4.2 Vzorky rozpuštěné v deionizované vodě nebo čistém acetonitrilu

Při této metodě zakoncentrování využívající rozdílné vodivosti v zóně vzorku a elektrolytu je zakoncentrování tím účinnější, čím vyšší jsou rozdíly ve vodivostech a tedy čím vyšší je rozdíl v intenzitě elektrického pole v dané zóně. Vzhledem k experimentům s vyšší koncentrací elektrolytu v předchozí kapitole byly také testovány podmínky přípravy vzorku v rozpouštědle s nižší vodivostí, tedy v deionizované vodě a aprotickém rozpouštědle acetonitrilu s hypotézou, že tyto podmínky povedou k dostatečnému rozdílu intenzity elektrického pole.

A) Byly zde pozorovány migrační charakteristiky vzorku směsi fenolických kyselin, které byly rozpuštěny buď v deionizované vodě, nebo čistém acetonitrilu. Jako základní elektrolyt byl použit boritanový pufr o pH 8 a koncentraci 100 mmol/l. Pořadí v kapiláře bylo pufr - vzorek. Podmínky analýzy vzorku byly následující: dávkování 50 mBar (~5,1 kPa)/10 s, teplota 20 °C, napětí 30 kV. Koncentrace sledovaných látek byla 0,1 mg/l. Směs se podařilo zakoncentrovat jak ve vodě, tak v acetonitrilu. Odezvy byly téměř stejné, takže tyto metody lze považovat za srovnatelné. Opět je rozděleno pouze osm látek namísto devíti, takže zřejmě došlo ke spojení dvou migrujících zón kyselin do jediné (obrázek 29 a 30). V této sekci (A-C, měření s vodou či acetonitrilem) nebyly měřeny migrační charakteristiky jednotlivých fenolických kyselin, takže nelze určit, o jakou látku se přesně jedná. Tento experiment byl měřen, aby bylo otestováno, zda je možné separovat směs za těchto podmínek. Viz podmínky měření v tabulce č. 73; příloha 1.



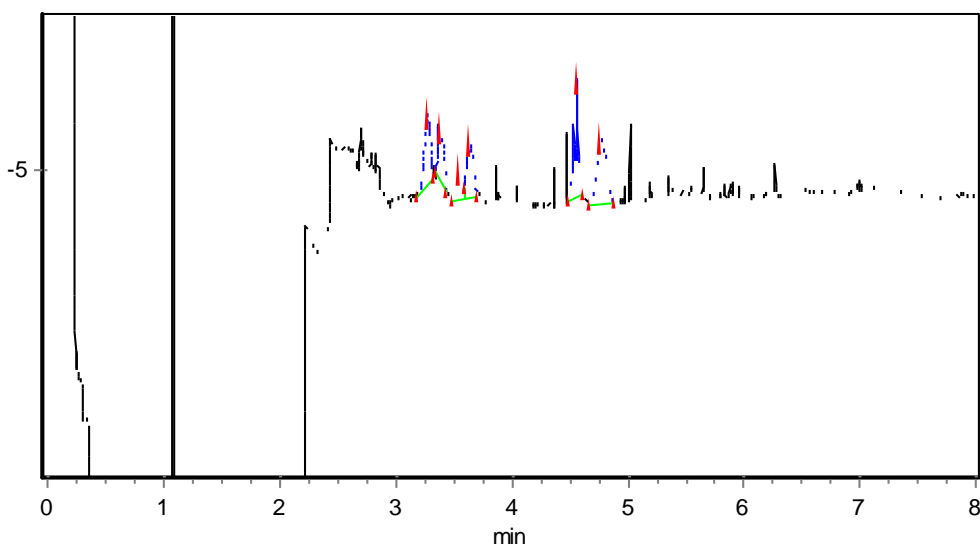
Obrázek 29: Směs fenolických kyselin ve vodě, elektrolyt boritanový pufr o pH 8, napětí 30 kV, dávkování 50 mBar (~5,1 kPa)/10 s.



Obrázek 30: Směs fenolických kyselin v acetonitrilu, elektrolyt boritanový pufr o pH 8, napětí 30 kV, dávkování 50 mBar (~5,1 kPa)/10 s.

B) Podmínky měření stejné jako v případě A). Je zde pouze změna v délce dávkované zóny 50 mBar (~5,1 kPa)/20 s. Koncentrace sledovaných látek byla 0,1 mg/l. Směs se podařilo zakonzentrovat při tomto dávkování pouze v deionizované vodě (obrázek 31). Jak můžeme vidět na elektroforeogramu, tak píků oproti předchozímu dávkování ubylo, došlo zde zřejmě ke

koeluci některých fenolických kyselin. V acetonitrilu se vzorek zakoncentrovat nepodařilo. Viz podmínky měření v tabulce č. 74; příloha 1.

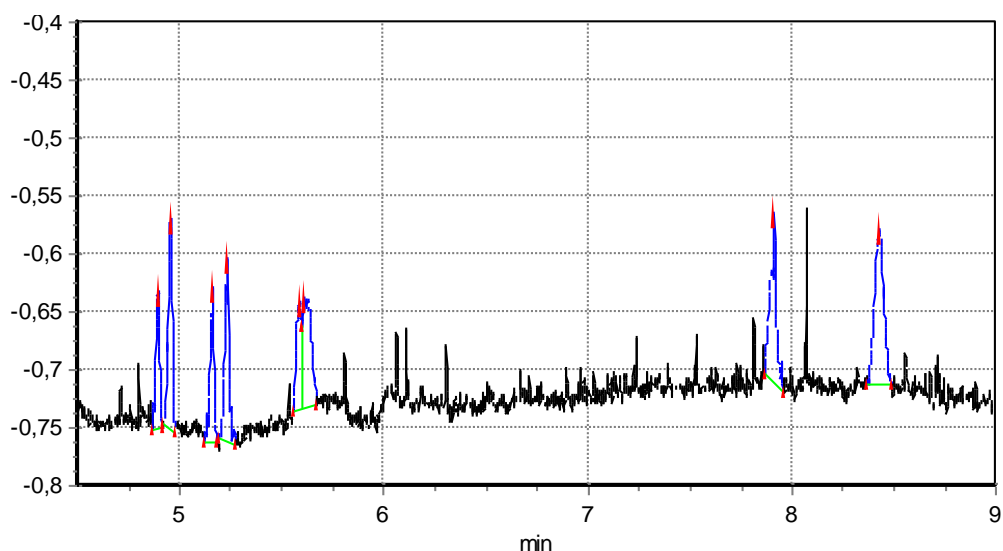


Obrázek 31: Směs fenolických kyselin ve vodě, elektrolyt boritanový pufr o pH 8, napětí 30 kV, dávkování 50 mBar (~5,1 kPa)/20 s.

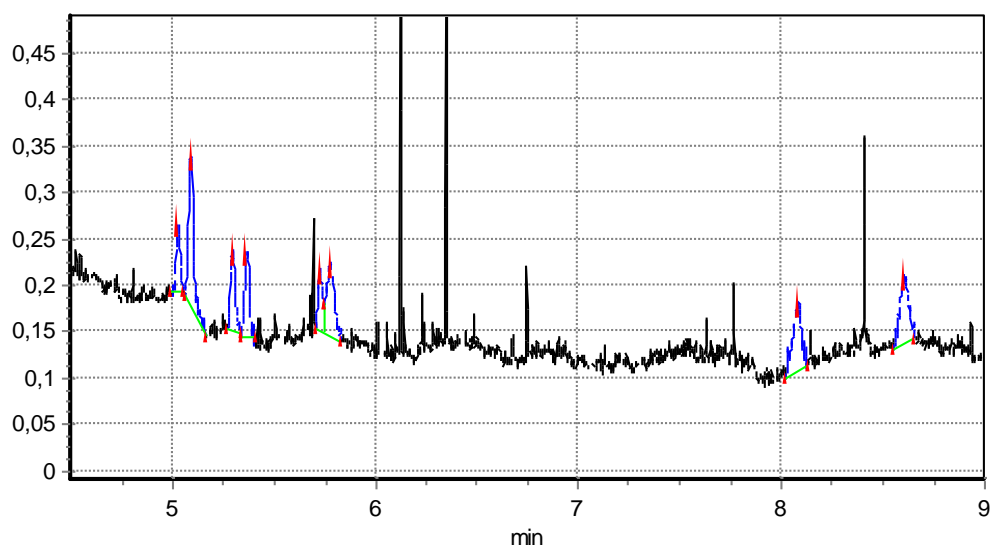
C) Podmínky měření stejné jako v případě A). Je zde pouze změna v délce dávkované zóny vzorku 50 mBar (~5,1 kPa)/30 s, koncentrace látek 0,1 mg/l. Za těchto podmínek měření se zakoncentrování nepodařilo ani v deionizované vodě ani v čistém acetonitrilu. Nulová linie elektroforeogramu zde byla výrazně nestabilní a rovněž proud u analýzy nebyl stabilní. Viz podmínky měření č. 75; příloha 1.

3.4.3 Vliv rozpouštědla vzorků na zakoncentrování a separaci

A) Byly zde pozorovány migrační charakteristiky vzorku směsí, které byly rozpuštěny buď v deionizované vodě, nebo v čistém acetonitrilu. Jako základní elektrolyt byl použit boritanový pufr o pH 8 o koncentraci 150 mmol/l. Podmínky analýzy vzorku byly následující: dávkování 50 mBar (~5,1 kPa)/5 s, teplota 20 °C, napětí 30 kV. Koncentrace analytů 0,1 mg/l. Směs se podařilo zakoncentrovat jak ve vodě, tak v acetonitrilu. Odezvy byly téměř stejné, takže tyto metody v rozdílu rozpouštědla lze považovat za srovnatelné. Opět je vyobrazeno pouze osm píků namísto devíti, takže zřejmě došlo ke smísení dvou zón do jedné (obrázek 32 a 33). Viz podmínky měření v tabulce č. 76; příloha 1.

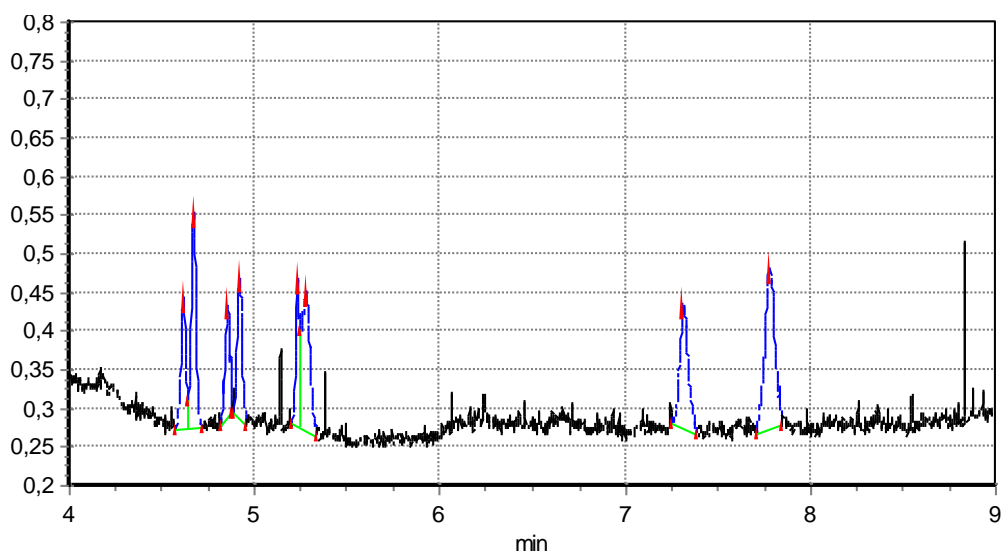


Obrázek 32: Směs fenolických kyselin ve vodě, elektrolyt boritanový pufr o pH 8, napětí 30 kV, dávkování 50 mBar (~5,1 kPa)/5 s.

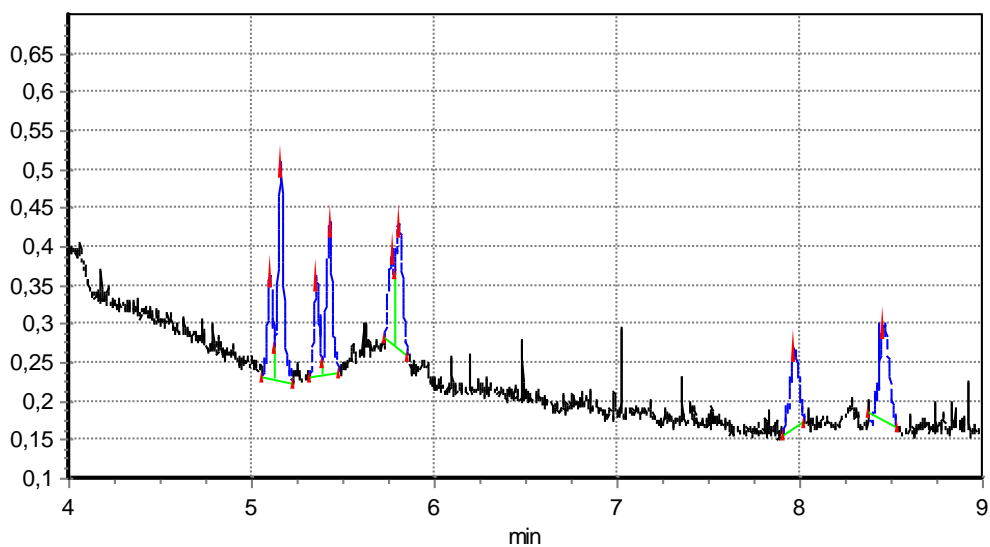


Obrázek 33: Směs fenolických kyselin v acetonitrilu, elektrolyt boritanový pufr o pH 8, napětí 30 kV, dávkování 50 mBar (~5,1 kPa)/5 s.

B) Podmínky měření stejné jako v případě A). Je zde pouze změna v délce dávkované zóny 50 mBar (~5,1 kPa)/10 s, koncentrace látek 0,1 mg/l. Směs se podařilo zakonzentrovat jak ve vodě, tak v acetonitrilu. Odezvy byly téměř stejné, takže tyto metody lze považovat za srovnatelné. Opět je na záznamu vyobrazeno pouze osm píků namísto devíti, takže zřejmě došlo ke koeluci dvou kyselin (obrázek 34 a 35). Viz podmínky měření v tabulce č. 77; příloha 1.

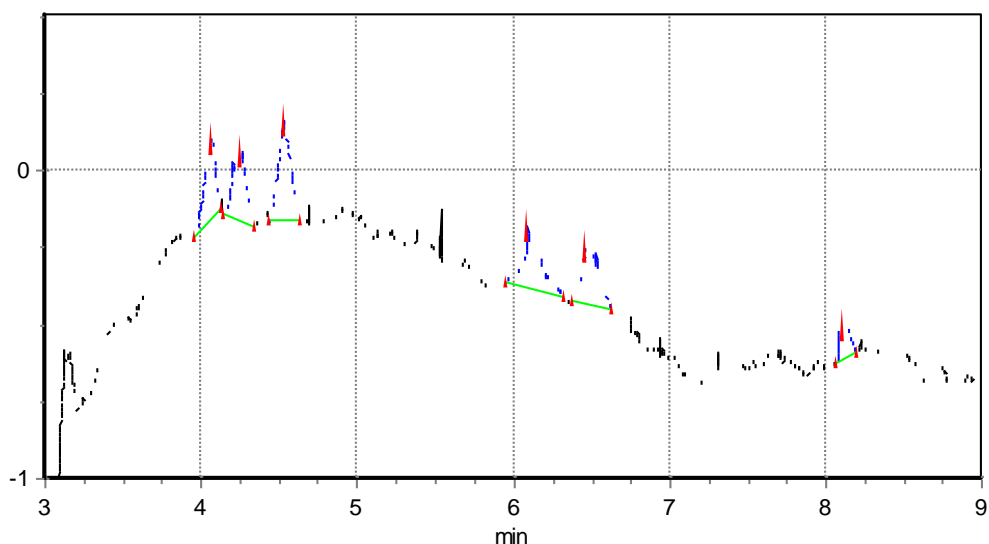


Obrázek 34: Směs fenolických kyselin ve vodě, elektrolyt boritanový pufr o pH 8, napětí 30 kV, dávkování 50 mBar (~5,1 kPa)/10 s.



Obrázek 35: Směs fenolických kyselin v acetonitrilu, elektrolyt boritanový pufr o pH 8, napětí 30 kV, dávkování 50 mBar (~5,1 kPa)/10 s.

C) Podmínky měření stejné jako v případě A). Je zde pouze změna v délce dávkované zóny 50 mBar (~5,1 kPa)/20 s, koncentrace látek 0,1 mg/l. Směs se podařilo zakoncentrovat pouze ve vodě. V porovnání s předchozími analýzami opět ubylo píků, které mají tendenci spojit se v jeden velký pík. Směs v acetonitrilu se nepodařilo rozseparovat (obrázek 36). Viz podmínky měření v tabulce č. 78; příloha 1.

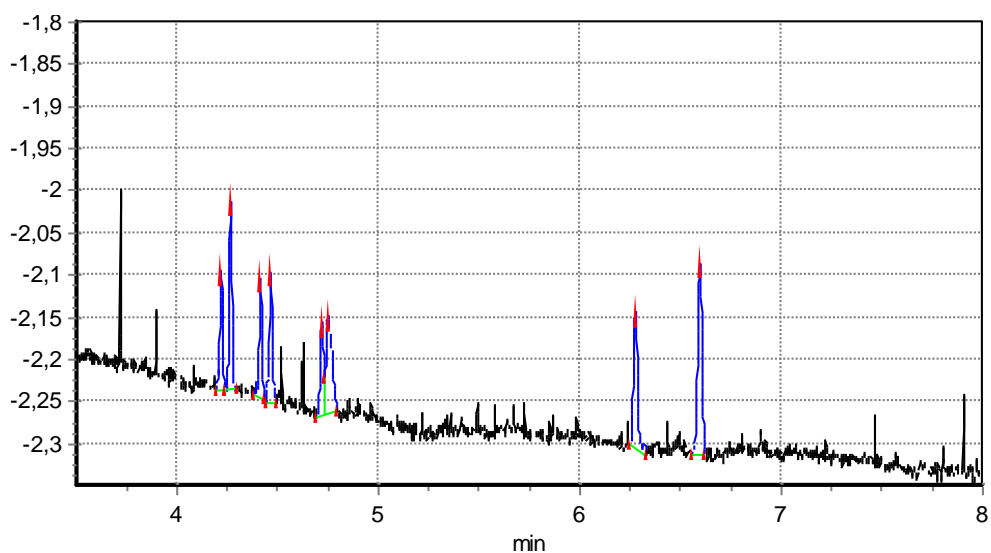


Obrázek 36: Směs fenolických kyselin ve vodě, elektrolyt boritanový pufr o pH 8, napětí 30 kV, dávkování 50 mBar (~5,1 kPa)/20 s.

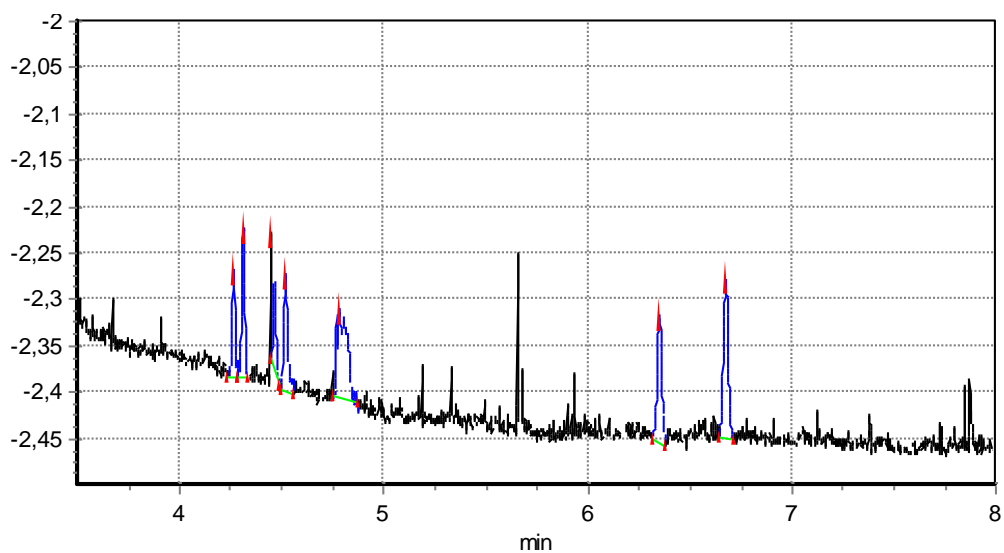
D) Podmínky měření stejné jako v případě A). Je zde pouze změna v délce dávkované zóny 50 mBar (~5,1 kPa)/30 s, koncentrace látek 0,1 mg/l. Za těchto měřicích podmínek se zakonzentrování nepodařilo ani v čisté vodě ani v čistém acetonitrilu. Nulová linie elektroforeogramu zde byla nelineární a proud u analýzy nebyl stabilní. Viz podmínky měření v tabulce č. 79; příloha 1.

3.4.4 Směs vody a acetonitrilu jako rozpouštědla vzorků

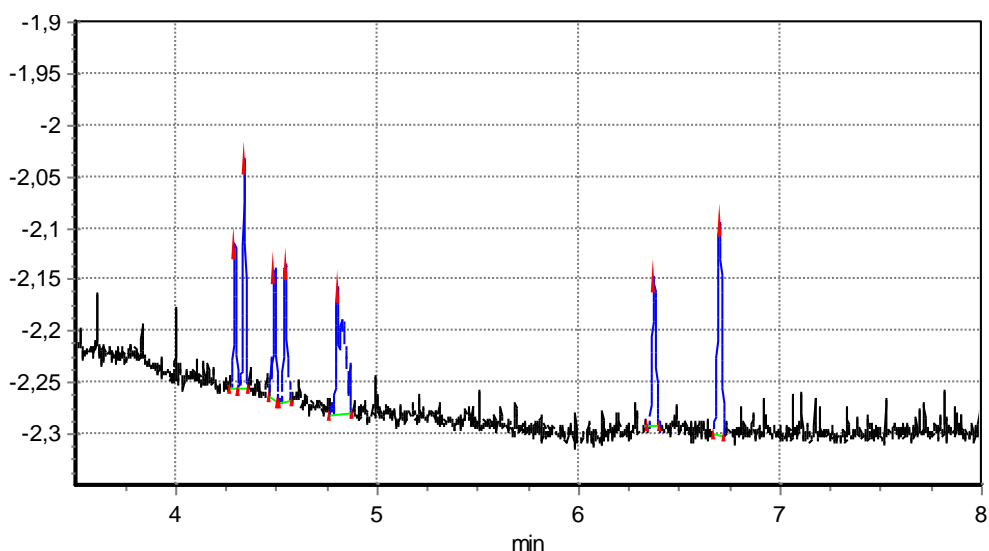
A) Byly zde pozorovány migrační charakteristiky fenolických kyselin ve směsi, která byla rozpuštěna buď v deionizované vodě, nebo ve směsi deionizované vody a acetonitrilu a to s výslednou koncentrací 20 %, 40 % či 60 %, v/v, acetonitrilu ve vodě. Jako základní elektrolyt byl použit boritanový pufr o pH 8 a koncentraci 150 mmol/l. Podmínky analýzy vzorku byly následující: dávkování 50 mBar (~5,1 kPa)/5 s, teplota 20 °C, napětí 30 kV. Směs se podařilo zakonzentrovat jak ve vodě, tak ve 20, 40 a 60 %, v/v, acetonitrilu. Odezvy byly téměř stejné, takže tyto metody lze považovat za srovnatelné. Opět je na záznamu vyobrazeno pouze osm píků namísto devíti (u 0 %, v/v, tedy čisté deionizované vody a 60 %, v/v, acetonitrilu), takže zřejmě došlo ke koeluci dvou píků do jednoho. U 20 a 40 %, v/v, acetonitrilu je vyobrazeno sedm píků (obrázek 37 až 40). Viz podmínky měření v tabulce č. 80; příloha 1.



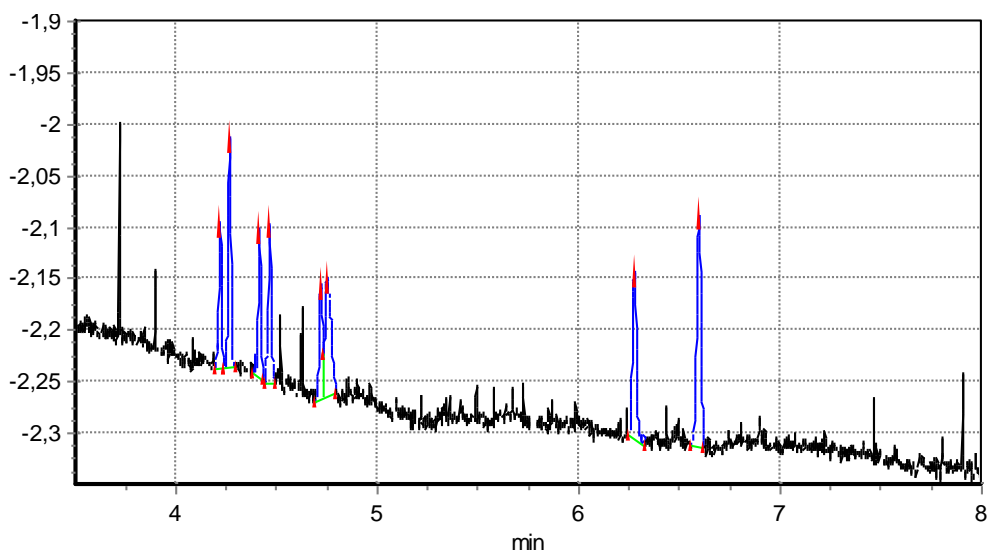
Obrázek 37: Směs fenolických kyselin ve vodě (0 % acetonitrilu), elektrolyt boritanový pufr o pH 8, napětí 30 kV, dávkování 50 mBar (~5,1 kPa)/5 s.



Obrázek 38: Směs fenolických kyselin ve 20 % acetonitril, elektrolyt boritanový pufr o pH 8, napětí 30 kV, dávkování 50 mBar (~5,1 kPa)/5 s.

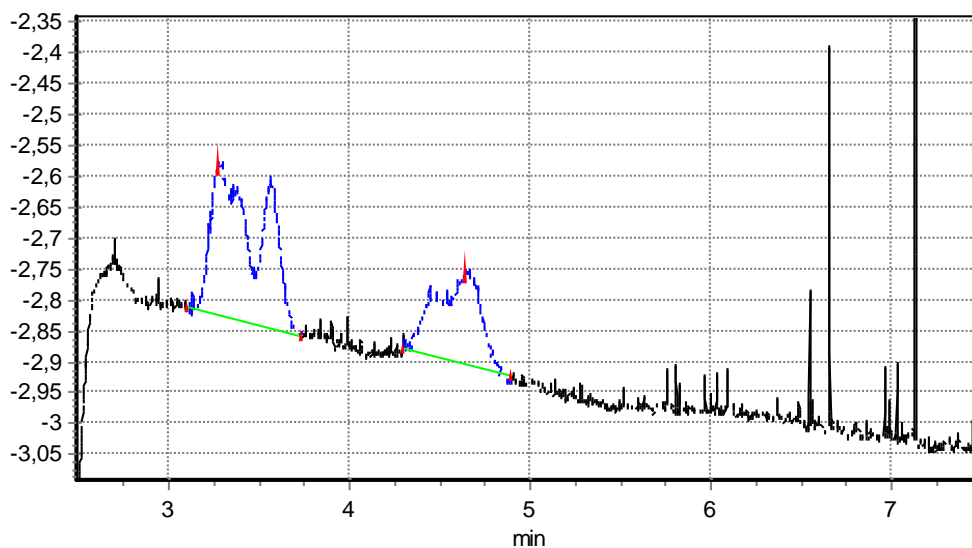


Obrázek 39: Směs fenolických kyselin ve 40 % acetonitrilu, elektrolyt boritanový pufr o pH 8, napětí 30 kV, dávkování 50 mBar (~5,1 kPa)/5 s.

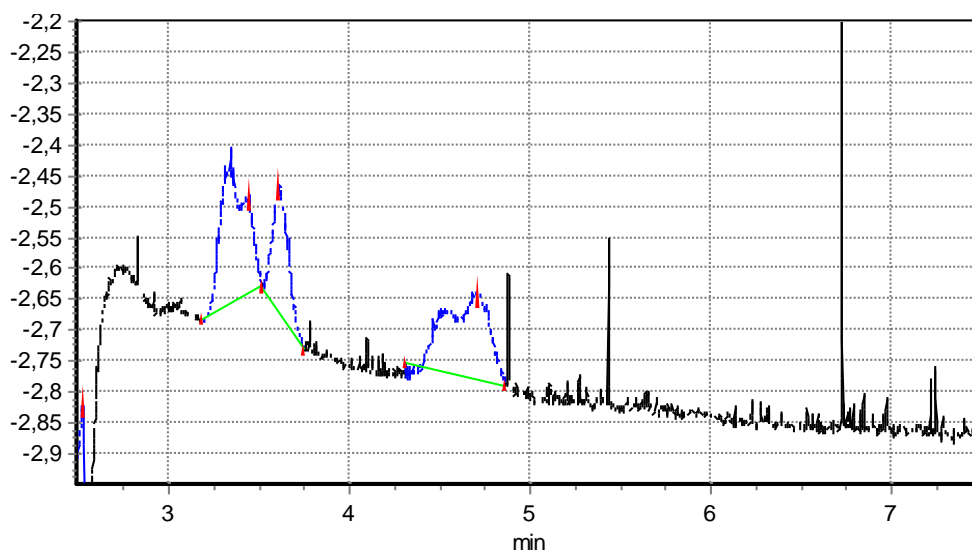


Obrázek 40: Směs fenolických kyselin v 60 % acetonitrilu, elektrolyt boritanový pufr o pH 8, napětí 30 kV, dávkování 50 mBar (~5,1 kPa)/5 s.

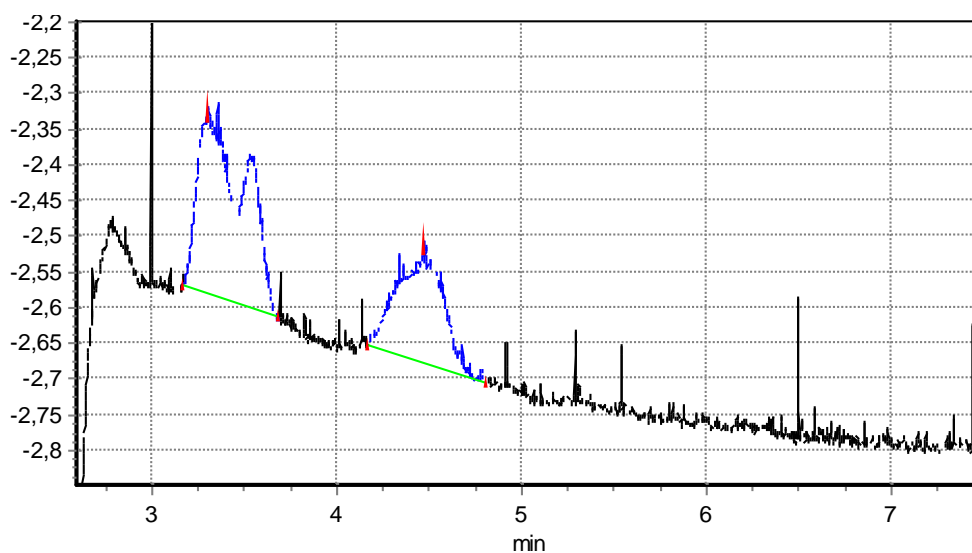
B) Podmínky měření stejné jako v případě A). Je zde pouze změna v délce dávkované zóny 50 mBar (~5,1 kPa)/30 s, koncentrace látek 0,1 mg/l. Předchozí metoda se osvědčila více. Zde nedochází k separaci jednotlivých látek, látky mají tendenci spojovat se do jednoho píku (obrázek 41 až 44). Z těchto experimentů tedy vyplývá, že pro úspěšnou separaci směsí kyselin je nutné plnit menší podíl kapiláry vzorkem. Viz podmínky měření v tabulce č. 81; příloha 1.



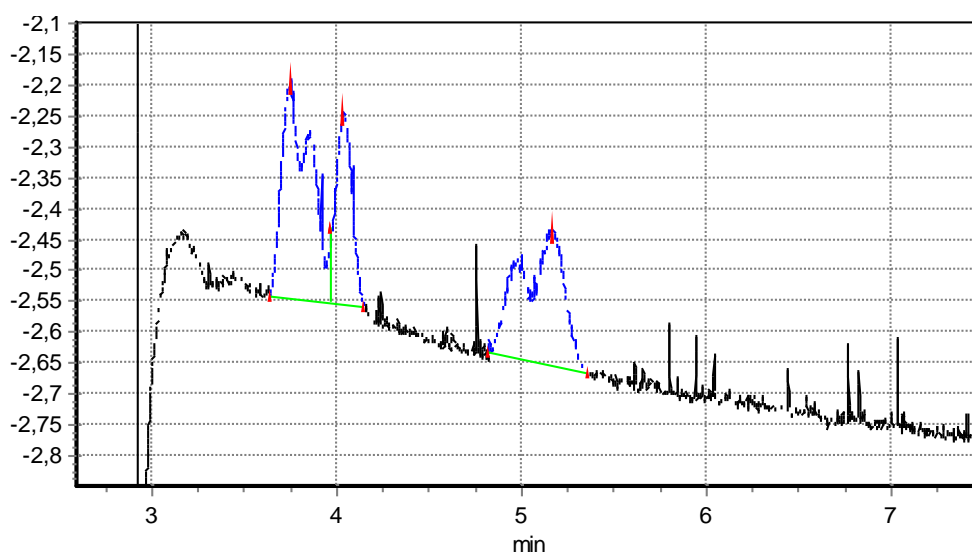
Obrázek 41: : Směs fenolických kyselin ve vodě (0 % acetonitrilu), elektrolyt boritanový pufr o pH 8, napětí 30 kV, dávkování 50 mBar (~5,1 kPa)/30 s.



Obrázek 42: Směs fenolických kyselin v 20 % acetonitrilu, elektrolyt boritanový pufr o pH 8, napětí 30 kV, dávkování 50 mBar (~5,1 kPa)/30 s.



Obrázek 43: Směs fenolických kyselin ve 40 % acetonitrilu, elektrolyt boritanový pufr o pH 8, napětí 30 kV, dávkování 50 mBar (~5,1 kPa)/30 s.



Obrázek 44: Směs fenolických kyselin v 60 % acetonitrilu, elektrolyt boritanový pufr o pH 8, napětí 30 kV, dávkování 50 mBar (~5,1 kPa)/30 s.

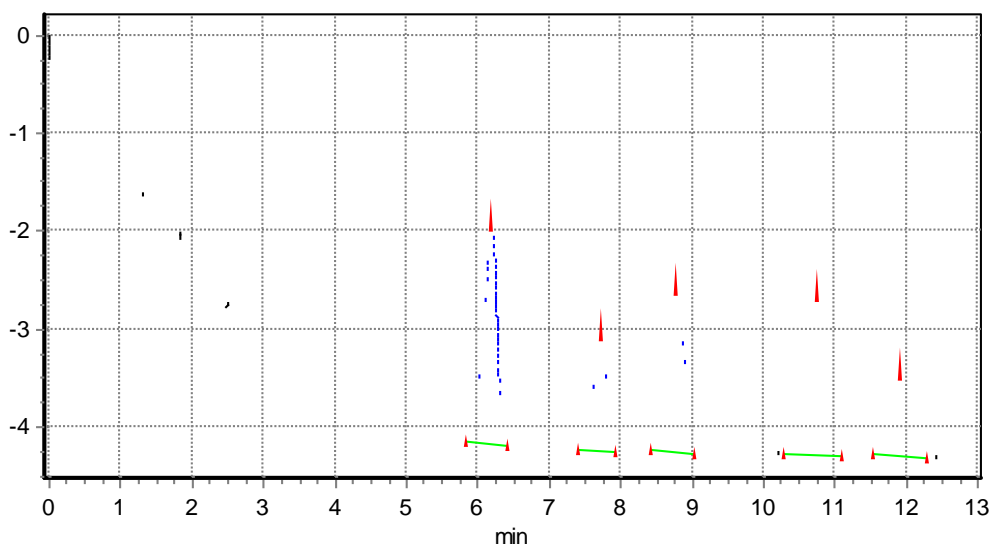
3.5 Metoda zakoncentrování pomocí micel

Tato metoda byla měřena v 25 mmol/l a 50 mmol/l roztoku SDS s rozdílnou hodnotou pH. Roztok o koncentraci 25 mmol/l a 50 mmol/l byl doplněn 25 mmol/l boritanovým pufrům o pH 8,5. Tyto analýzy probíhaly při 30 kV a 20 °C, dávkování tlakem 50 mBar (~5,1 kPa).

Dále byl připraven 25 mmol/l roztok SDS, který byl doplněn 10 mmol/l fosforečnanovým pufrům o pH 2. Tyto analýzy probíhaly při -20 kV a 20 °C, dávkování tlakem 50 mBar (~5,1 kPa). Původní vkládané napětí bylo 30 kV, ale analýzy byly vždy automaticky přerušeny, protože díky vysoké hodnotě proudu procházející kapilárou nezvládl elektroforetický systém uchládit kapiláru v průběhu analýzy na požadovaných 20 °C, nárůst teploty byl velmi strmý.

A) Experimenty probíhaly v 25 mmol/l SDS, který byl doplněn boritanovým pufrům o pH 8,5 o koncentraci 25 mmol/l. Vzorby byly rozpuštěny v 0,01 M HCl (o koncentraci 10 mg/l), aby nedocházelo k disociaci fenolických kyselin. Vzorok byl dávkován tlakem 50 mBar (~5,1 kPa) po dobu 5 s. Viz podmínky měření v tabulce č.82 a migrační charakteristiky tabulka č.83; příloha 1.

Měření za těchto podmínek bylo úspěšné, došlo k zakoncentrování u téměř vše měřených vzorků kromě kyseliny *p*-kumarové a chlorogenové. U směsi došlo také k zakoncentrování, ale na elektroforeogramu je viditelných pouze pět píků, ale analyzovaných látek bylo devět. Zřejmě došlo k tomu, že některé kyseliny migrovaly stejnou rychlostí, nebo analyt nestihl dojít k detekčnímu okénku v nastaveném čase analýz (obrázek 45). Při porovnání těchto separací se separacemi pomocí zónové elektroforézy (bez přítomnosti SDS) je také patrná výrazně nižší separační účinnost, která vede k širším píkům.



Obrázek 45: Směs fenolických kyselin, 25 mmol/l SDS v 25 mmol/l boritanovém pufru, dávkování 50 mBar (~5,1 kPa)/5 s. Jednotlivé píky se nepodařilo identifikovat.

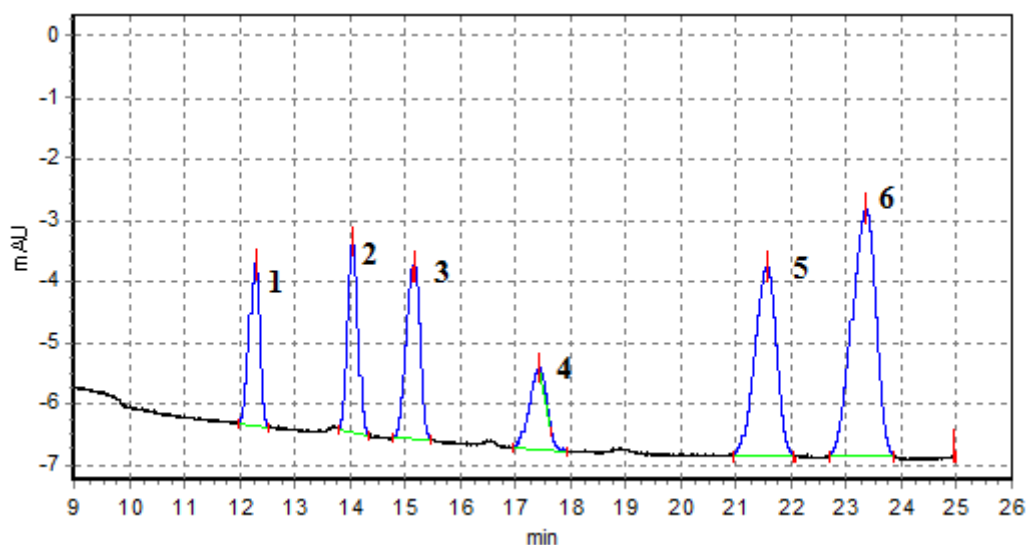
B) a C) Dávkování vzorků o koncentraci 0,1 mg/l bylo 50 mBar (~5,1 kPa)/30 s a 50 mBar (~5,1 kPa)/60 s. Analýzy probíhaly ve stejném pufru jako v první části tohoto experimentu pomocí SDS. Vzorky byly rozpuštěny v 0,01 M HCl. Měření za těchto podmínek nebylo úspěšné, nedošlo k zakoncentrování sledovaných analytů a to ani jako jednotlivých látek ani jako ve směsi. Pravděpodobně došlo k přetížení kapiláry dávkovaným vzorkem, který byl dávkován v zóně 30 s a 60 s. Viz podmínky měření v tabulce č. 84 a 85; příloha 1.

D) Měření probíhalo v 50 mmol/l SDS, který byl doplněn 25 mmol/l boritanovým pufrům o pH 8,5. Vzorky byly rozpuštěny v 0,01 M HCl, aby nedocházelo k disociaci fenolických kyselin. Vzorky o koncentraci 10 mg/l byly dávkovány tlakem 50 mBar (~5,1 kPa) po dobu 5 s. Za těchto podmínek nedošlo k zakoncentrování žádné z analyzovaných látek. Viz podmínky měření v tabulce č. 86; příloha 1.

E) Měření zde probíhalo v 25 mmol/l SDS, který byl doplněn 10 mmol/l fosforečnanovým pufrům o pH 2. Vzorky byly rozpuštěny ve fosforečnanovém pufru o pH 2, bez přídavku SDS, aby nedocházelo k disociaci fenolických kyselin. Vzorky o koncentraci 10 mg/l byly dávkovány tlakem 50 mBar (~5,1 kPa) po dobu 5 s. Viz podmínky měření v tabulce č. 87 a migrační charakteristiky tabulka č. 88; příloha 1.

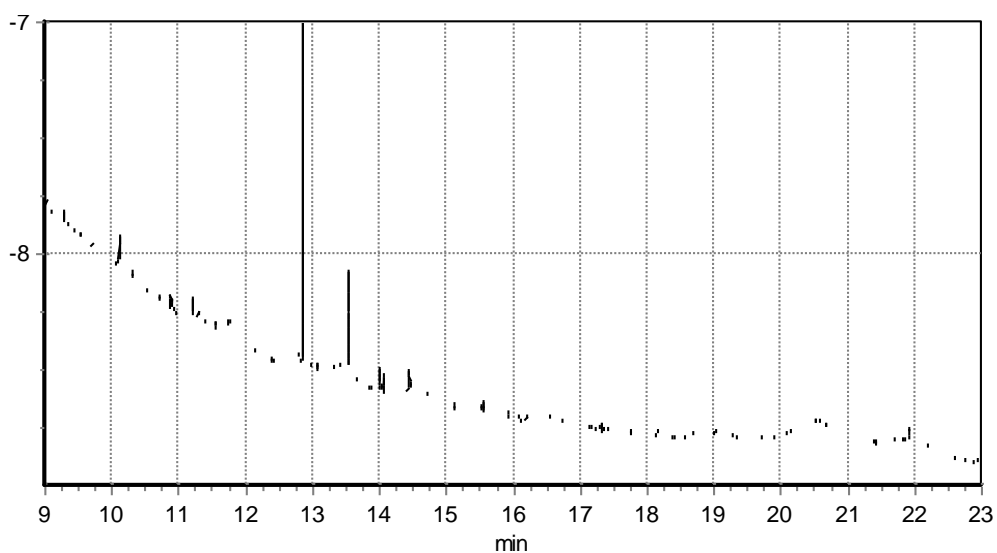
Měření za těchto podmínek bylo úspěšné, došlo k zakoncentrování u většiny měřených vzorků kromě kyseliny syringové, 4-hydroxybenzoové, gallové a vanilové. U směsi došlo také k zakoncentrování, ale na elektroforeogramu je viditelných pouze šest píků a analyzovaných látek bylo devět. Zřejmě došlo k tomu, že se více látek nachází v jednom píku, nebo analyt

nestihl dojít k detekčnímu okénku. V porovnání s následující metodou kde byla použita koncentrace vzorků 0,1 mg/l a dávkování 50 mBar (~5,1 kPa)/30 s je tato metoda účinnější (obrázek 46). V porovnání se separacemi zónovou elektroforézou (obrázky 37-40) je analýza výrazně delší.



Obrázek 46: Směs fenolických kyselin, 25 mmol/l SDS v 10 mmol/l fosforečnanovém pufru, napětí -20 kV, dávkování 50 mBar (~5,1 kPa)/5 s. 1 – kys. ferulová, 2 – kys.salicylová, 3 – kys. *p*-kumarová, 4 – kys. chlorogenová, 5 – kys. kávová, 6 – neidentifikováno.

F) Dále bylo testováno dávkování pro vzorky o koncentraci 0,1 mg/l, 50 mBar (~5,1 kPa)/30 s. Zde došlo k částečnému zakoncentrování směsi, ale píky jsou široké a v šumu, takže s velkou jistotou nelze identifikovat dané analyty (obrázek 47). Viz podmínky měření v tabulce č. 89; příloha 1.



Obrázek 47: Směs fenolických kyselin, 25 mmol/l SDS v 10 mmol/l fosforečnanovém pufru, napětí -20 kV, dávkování 50 mBar (~5,1 kPa)/30 s.

V zakoncentrování pomocí micel nejlépe vyšla metoda, kde bylo použito 25 mmol/l SDS v 25 mmol/l boritanovém pufru o pH 8,5. Zde se povedlo zakoncentrovat a rozdělit sedm analytů z devíti. Dále relativně úspěšná metoda byla s použitím 25 mmol/l SDS v 10 mmol/l fosforečnanovém pufru o pH 2, zde se podařilo zakoncentrovat pět analytů z celkových devíti.

4 ZÁVĚR

Cílem diplomové práce bylo ověření možností použití online prekoncentračních technik v kapilární elektroforéze pro zakoncentrování z velkého objemu vzorku. V diplomové práci byly teoreticky popsány různé prekoncentrační techniky používané v kapilární zónové elektroforéze, detekce používaná v kapilární elektroforéze a charakteristika fenolických kyselin.

V experimentální části diplomové práce byly analyzované fenolické kyseliny, které se řadí mezi antioxidanty. Analýzy probíhaly nejčastěji v boritanovém pufru o různé koncentraci a pH, dále byl použit i fosforečnanový pufr, který měl vždy koncentraci 10 mmol/l a různé pH. Dále bylo pracováno i s micelami a to konkrétně s SDS. Všechny analýzy probíhaly při 20 °C, vzorek byl dávkován tlakem 50 mBar (~5,1 kPa) a vkládané napětí bylo buď 20 kV, -20 kV, 30 kV, -30 kV, či kombinace kladného a záporného napětí.

V metodě zakoncentrování pomocí přechodného pH bylo nejlepších výsledků dosaženo v podmínkách, ve kterých byl jako rozpouštědlo vzorků použit fosforečnanový pufr o pH 6, jako elektrolyt byl použit fosforečnanový pufr o pH 6 a 2, doba dávkování vzorku i fosforečnanového pufru o pH 2 byla 10 s. Částečné zakoncentrování se povedlo pouze u kyselin ferulové, *p*-kumarové a směsi. Při LVSS a zesílením elektrického pole bylo dosaženo nejlepších výsledků pro separaci směsi za podmínek, kde vzorky byly rozpuštěny v deionizované vodě a jako elektrolyt byl použit boritanový pufr o pH 8 (doba dávkování 30 s, napětí 30 kV). Podařilo se zakoncentrovat všechny fenolické kyseliny kromě kyseliny kávové a gallové. Téměř identické výsledky byly dosaženy při přepínání polarity napětí na nástřiku pro prvních 10 s na hodnotu -30 kV. Zakoncentrování bylo testováno i s boritanovým pufrem o koncentraci 100 mmol/l, kde nejlépe vyšla metoda, kde bylo dávkování analytů v deionizované vodě po dobu 5 s a napětí 30 kV. Za následujících podmínek došlo k zakoncentrování jak jednotlivých analytů, tak i ve směsi. Ve směsi bylo rozděleno osm látek, pravděpodobně došlo ke spojení píku kyseliny salicylové a chlorogenové. Srovnatelných výsledků bylo dosaženo pro koncentrace 10 mg/l a 0,1 mg/l. V boritanovém pufru o koncentraci 100 a 150 mmol/l byly testovány vlivy přítomnosti acetonitrilu ve vzorku na účinnost zakoncentrování a následnou separaci. Přítomnost acetonitrilu nevedla k výraznému zvýšení citlivosti použité metody.

V poslední části experimentu bylo zkoušeno zakoncentrování pomocí micel. Jako nejlepší postup se ukázal, kde byl použit 25 mmol/l SDS, který byl doplněn boritanovým pufrem o pH 8,5 (25 mmol/l). Vzorky byly rozpuštěny v 0,01 M HCl. Doba dávkování pro koncentraci

vzorků 10 mg/l byla 5 s. Došlo k zakoncentrování u téměř vše měřených kyselin kromě kyseliny *p*-kumarové a chlorogenové. U směsi došlo také k zakoncentrování, ale v elektroforeogramu je pouze pět píku a analyzovaných látek bylo devět.

5 POUŽITÁ LITERATURA

1. BARTŮŇKOVÁ, Jiřina a Milan PAULÍK. Vyšetřovací metody v imunologii. 2., přeprac. a dopl. vyd. Praha: Grada, 2011. ISBN 978-80-247-3533-7. str.42.
2. BAKER, Dale R. Capillary electrophoresis. New York: Wiley, c1995. ISBN 978-0-471-11763-6.
3. ŠTULÍK, Karel. Analytické separační metody. Praha: Karolinum, 2004. ISBN 80-246-0852-9.
4. LAUER, H. H.; ROZING, G. P. High Performance Capillary Electrophoresis. Germany : Agilent Technologies, 2010. 174 s. 5990-3777EN.
5. Altria, K. D., Capillary Electrophoresis Guidebook: Principles, Operation, and Applications Series:Methods in Molecular Biology 52, Humana Press, Totowa, New Jersey, USA (1996)
6. Ghosal, S.: Fluid mechanics of electroosmotic flow and its effect on band broadening in capillary electrophoresis. Electrophoresis 25, 214-228 (2004).
7. SCHWER, Christine. a Ernst. KENNDLER. Electrophoresis in fused-silica capillaries: the influence of organic solvents on the electroosmotic velocity and the zeta potential. Analytical Chemistry. 2012, 63(17), 1801-1807. DOI: 10.1021/ac00017a026. ISSN 0003-2700. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac00017a026>
8. Wilson, I. D.; Cooke, M.; Poole, C. F., Encyclopedia of separation science, Academic Press, San Diego (2000)
9. https://is.muni.cz/el/1431/jaro2010/C6200/um/11509627/Elektromigracni_metody.pdf
10. <https://docplayer.cz/docs-images/60/44113557/images/42-0.png>
11. DOLNÍK, V.: Úvod do kapilární elektroforézy. 1. vydání Brno: Ústav analytické chemie Akademie věd České republiky, Chromspec, 1994
12. HONEGR, J.: Využití elektroforetických metod v analýze látek přírodního původu. Diplomová práce. Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy. Katedra analytické chemie. Hradec Králové 2007, 68 s.
13. http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/cd/hypertext/MZACN_soubory/image002.gif
14. FELHOFER, Jessica L., Lucas BLANES a Carlos D. GARCIA. Recent developments in instrumentation for capillary electrophoresis and microchip-capillary electrophoresis. ELECTROPHORESIS. 2010, 31(15), 2469-2486. DOI: 10.1002/elps.201000203. ISSN 01730835. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/elps.201000203>

15. Kašička, Václav. Teoretické základy a separační principy kapilárních elektromigračních metod. *Chemické listy* [online]. 1997, (91): 320-329 [cit. 27.1.2019]
16. Heiger, David. High performance capillary electrophoresis. Agilent Technologies. [online]. 2000 [cit.27.1.2019]. Dostupné z: <http://hpst.cz/analyticka-chemie/kapilarni-elektroforeza/agilent-7100-capillary-electrophoresis-system>
17. Pavel Klouda, Nakladatelství Pavko: Odborné učební texty [online]. [cit. 11.2.2019] Dostupné z: http://knihy.pavko.cz/userFiles/mam_soubory/elektomigr.pdf
18. García, D. Carlos., Chumbimuni-Torres, Karin., Carilho, Emanuel. *Capillary Electrophoresis and Microchip Capillary Electrophoresis. Principles, Applications, and Limitations*. The University of Texas at San Antonio, TX, USA, 2013. ISBN 9780470572177.
19. Ewing, A. G.; Wallingford, R. A.; Olefirowicz, T. M. *Capillary electrophoresis. Analytical Chemistry*. 1989, 61 (4), s. 292A-303A.
20. Zacharis, C. K., Tempels, F. A., Theodoridis, G. A., Voulgaropoulos, A. N., Underberg, W. J., Somsen, G. W., & de Jong, G. J. (2006). Coupling of sequential injection analysis and capillary electrophoresis–Laser-induced fluorescence via a valve interface for on-line derivatization and analysis of amino acids and peptides. *Journal of Chromatography A*, 1132, 297–303.
21. [http://zeus.qui.ufmg.br/~valmir/livros/analitica/Principles%20of%20Instrumental%20Analysis%20\(6ed\)%20-%20Skoog,%20Holler%20&%20Crouch.pdf](http://zeus.qui.ufmg.br/~valmir/livros/analitica/Principles%20of%20Instrumental%20Analysis%20(6ed)%20-%20Skoog,%20Holler%20&%20Crouch.pdf)
22. SWINNEY, Kelly a Darryl J. BORNHOP. *Detection in capillary electrophoresis. Electrophoresis*. 2000, (20), 1239-1250. 10826668.
23. W. Th. Kok, “Capillary electrophoresis: instrumentation and operation”, *Chromatographia*, Volume 51, 31–49, 2000, ISBN: 9783322831330.
24. STRAŠÍK, Stanislav, Mariana DANKOVÁ, Markéta MOLNÁROVÁ, Eva ÖLVECKÁ a Dušan KANIANSKY. *Capillary zone electrophoresis in wide bore capillary tubes with fiber-coupled diode array detection. J Chromatogr A*. 2003, (21), 23-33. DOI: 12685580.
25. LANDERS, James P. *Handbook of capillary electrophoresis*. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press, c199, str.389, ISBN 9780849324987.

26. On-line mass spectrometric detection for capillary zone electrophoresis, Jose A. Olivares, Nhung T. Nguyen, Clement R. Yonker, and Richard D. Smith, *Analytical Chemistry* 1987 59 (8), 1230-1232, DOI: 10.1021/ac00135a034.
27. Improved electrospray ionization interface for capillary zone electrophoresis-mass spektrometry, Richard D. Smith, Charles J. Barinaga, and Harold R. Udseth, *Analytical Chemistry* 1988 60 (18), 1948-1952, DOI: 10.1021/ac00169a022.
28. FIGEYS, Daniel a Ruedi AEBERSOLD. High sensitivity identification of proteins by electrospray ionization tandem mass spectrometry: Initial comparison between an ion trap mass spectrometer and a triple quadrupole mass spectrometer. *Electrophoresis*. 1997, 18(3-4), 360-368. DOI: 10.1002/elps.1150180310. ISSN 0173-0835. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/elps.1150180310>.
29. TŮMA, Petr a Eva SAMCOVÁ. Stanovení volných aminokyselin v biologických tekutinách kapilární elektroforézou. *Chemické listy*. 2007, 101, 200-207.
30. Sima, Najafi. Gamat., L. Fotouhil., Z. Talebpour. The application of electrochemical detection in capillary electrophoresis. *Iranian Chemical Society* [online]. 2017, (14): 717-725.
31. Opekar F., Štulík K., Elektrochemická detekce s elektrodami mimo roztok - znovuzrození bezkontaktních impedančních metod, *Chemické Listy* 104 (2010), 1148-1154.
32. HUANG, Zhiyao, Jun LONG, Wenbo XU, Haifeng JI, Baoliang WANG a Haiqing LI. Design of capacitively coupled contactless conductivity detection sensor. *Flow Measurement and Instrumentation*. 2012, 27, 67-70. DOI: 10.1016/j.flowmeasinst.2012.04.003. ISSN 09555986.
33. KUBÁŇ, Pavel a Petr BOČEK. Capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection: A universal tool for the determination of supported liquid membrane selectivity in electromembrane extraction of complex samples. *Journal of Chromatography A*. 2012, 1267, 96-101. DOI: 10.1016/j.chroma.2012.07.010. ISSN 00219673.
34. https://media.springernature.com/original/springer-static/image/art:10.1007/s13738-016-1023-7/MediaObjects/13738_2016_1023_Fig3_HTML.gif
35. ČAKRT, Miroslav, SÁDECKÁ, Jana. Elektromigračné metody. In HELÁN, Václav. *Elektroanalytické metody : Sborník přednášek z kurzu*. 1. vyd. Český Těšín : 2 Theta, 2001. s. 214-230. ISBN 80-86380-07-6

36. CHARLIONET, Roland, Aline BRINGARD, Christian DAVRINCHE a Marc FONTAINE. Isotachophoretic focusing on thin gel slab: A new and powerful electrophoretic method of protein analysis. *Electrophoresis*. 1986, 7(12), 558-566. DOI: 10.1002/elps.1150071205. ISSN 0173-0835. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/elps.1150071205>
37. http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/cd/hypertext/AJAZH_soubory/image002.gif
38. TERABE, S., OTSUKA, K., ICHIKAWA, K., TSUCHIYA, A., ANDO, T. Electrokinetic separations with micellar solutions and open-tubular capillaries. *Analytical chemistry*. 1984, 56, 111-113 s.
39. ŠTULÍK, Karel, *Analytické separační metody*. Praha: Karolinum, 2004. ISBN 80-246-0852-9.
40. HANCU, G., SIMON B., RUSU A., MIRCIÁ E., GYÉRESI Á. Principles of Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography Applied in Pharmaceutical Analysis. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*. 2013;3,1-8 s. doi:10.5681/apb.2013.001.
41. <https://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/images/obr57.gif>
42. https://www.researchgate.net/profile/Gabriel_Hancu/publication/236028464/figure/fig_4/AS:299543305441280@1448428097017/Schematic-of-the-separation-princ
43. POUCHLÝ, J. *Fyzikální chemie makromolekulárních a koloidních soustav*. Vyd. 2. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2001. ISBN 80-708-0422-x.
44. ŠČUKIN, E. D., A. V. PERCOV a E. A. AMELINOVÁ. *Koloidní chemie*. Praha: Academia, 1990. ISBN 80-200-02596.
45. I. Benito, M.A. García, C. Monge, J.M. Saz, M.L. Marina. Spectrophotometric and conductimetric determination of the critical micellar concentration of sodium dodecyl sulfate and cetyltrimethylammonium bromide micellar systems modified by alcohols and salts. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 1997, (125), 221-224. ISSN 0927-7757.
46. http://147.33.74.135/knihy/uid_es-001/figures/kriticka_micelarni_koncentrace.jpg
47. HORÁKOVÁ, J.- MAIER, V.- ŠEVČÍK, J.: On-line prekoncentrační techniky v kapilární elektroforéze. *Chem. Listy* 100, 2006, 163-168.
48. REINHOUD, N.J.- TJADEN, U.R.-van der GREEF, J.: Correlation between zone velocity and current in automated single capillary isotachopheresis-zone electrophoresis. *J. Chromatogr. A*. 673, 1994, 239- 254.

49. REINHOUD, N.J.- TJADEN, U.R.-van der GREEF, J.: Automated isotachophoretic analyte focusing for capillary zone electrophoresis in a single capillary using hydrodynamic back- pressure programming. *J. Chromatogr.* 641, 1993, 155-162.
50. BECKERS, J.L.- BOČEK, P.: Sample stacking in capillary zone electrophoresis: Principles, advantages and limitations. *Electrophoresis* 21, 2000, 2747-2767.
51. OSBOURN, D.M.-WEISS, D.J.-LUNTE, C.E.: On-line capillary preconcentration methods for capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 21, 2000, 2768-2779.
52. QUIRINO, Joselito P a Shigeru TERABE. Sample stacking of cationic and anionic analytes in capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A.* 2000, 902(1), 119-135. DOI: 10.1016/S0021-9673(00)00812-8. ISSN 00219673
53. CHRPOVÁ, Diana. S výživou zdravě po celý rok. Praha: Grada, 2010. Zdraví & životní styl. ISBN 978-80-247-2512-3.
54. PAULOVÁ, Hana, Hana BOCHOŘÁKOVÁ a Eva TÁBORSKÁ. METODY STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY PŘÍRODNÍCH LÁTEK IN VITRO. *Chemické listy.* 2004, (98), 174-179.
55. HALLIWELL, Barry. Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life. *Plant Physiology.* 2006, (141), 312-322.
56. SLANINA, Jiří a Eva TÁBORSKÁ. Příjem, biologická dostupnost a metabolismus rostlinných polyfenolů u člověka. *Chemické listy.* 2004, č. 98.
57. MUSSATO, DRAGONE a ROBERTO. Ferulic and p – coumaric acids extraction by alkaline hydrolysis of brewer´s spent grain. *Science direct.* 2007, č. 1.
58. SRINIVASULU, Cheemanapalli, Mopuri RAMGOPAL, Golla RAMANJANEYULU, C.M. ANURADHA a Chitta SURESH KUMAR. Syringic acid (SA) – A Review of Its Occurrence, Biosynthesis, Pharmacological and Industrial Importance. Elsevier. 2018, 108(108), 547-557. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.09.069. ISSN 07533322. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0753332218347589>
59. http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/4/4c/Syringic_acid.svg/240px-Syringic_acid.svg.png
60. Martínková J.; Chládek J.; Mičulda S.; Chládková J.: Farmakologie pro studenty zdravotnických oborů, Praha, GRADA Publishing 2007, s. 161-174.
61. http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/4/4c/Syringic_acid.svg/240px-Syringic_acid.svg.png
62. ZITKA, Ondrej, Jiri SOCHOR, Otakar ROP, et al. Comparison of Various Easy-to-Use Procedures for Extraction of Phenols from Apricot Fruits. *Molecules.* 2011, 16(4),

- 2914-2936. DOI: 10.3390/molecules16042914. ISSN 1420-3049. Dostupné také z: <http://www.mdpi.com/1420-3049/16/4/2914>.
63. <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/c/c3/Kaffees%C3%A4ure.svg/360px-Kaffees%C3%A4ure.svg.png>
64. ROSSI De Antonella, DESIDERIO Claudia: Fast Capillary Electrochromatographic analysis of parabens and 4-hydroxybenzoic acid in drugs and cosmetics, *Elektrophoresis* 2002, Volume 23, Issue 19, ISSN 1522-2683.
65. <http://m.cz.customproduct.net/Content/upload/2018312939/201804171028586019311.png>
66. Mathew Sindhu, Abraham Emilia, T.: Ferulic Acid: An antioxidant Found Naturally in Plant Cell Walls and Feruloyl Esterases Involved in its Release and Their Applications, *Critical Reviews in Biotechnology*, 2004, Vol.24, Issue 2-3, ISSN 0738-8551.
67. https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/b/b1/Ferulic_acid2.png
68. ZANWAR, Anand A., Sachin L. BADOLE, Pankaj S. SHENDE, Mahabaleshwar V. HEGDE a Subhash L. BODHANKAR. Role of Gallic Acid in Cardiovascular Disorders. *Polyphenols in Human Health and Disease*. Elsevier, 2014, 2014, , 1045-1047. DOI: 10.1016/B978-0-12-398456-2.00080-3. ISBN 9780123984562.
69. https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/3/3b/Kyselina_gallov%C3%A1.svg/1280px-Kyselina_gallov%C3%A1.svg.png
70. Kim, Su- Jin et al: the beneficial effect of vanillic acid on ulcerative colitis, *Molecules* 2010, Volume 15, Issue 10, ISSN 1420-3049
71. https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/3/37/Kwas_wanilinowy.svg/130px-Kwas_wanilinowy.svg.png
72. MARKOWSKI, Jaroslaw et al.: Phenolic in Apples and Processed Apple Products, *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 2007, Volume 57, Issue 4, ISSN 1230-0322.
73. LOU, Zaixiang et al.: P-Coumaric Acid Kills Bacteria Through Dual Damage Mechanisms, *Food Control*, 2012, Volume 25, Issue 2, ISSN 0956-7135.
74. https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/a/a2/Coumaric_acid_acsv.svg/1200px-Coumaric_acid_acsv.svg.png
75. SANTANA-GÁLVEZ, Jesús, Luis CISNEROS-ZEVALLOS a Daniel JACOBO-VELÁZQUEZ. Chlorogenic Acid: Recent Advances on Its Dual Role as a Food Additive and a Nutraceutical against Metabolic Syndrome. *Molecules*. 2017, 22(3).

- DOI: 10.3390/molecules22030358. ISSN 1420-3049. Dostupné také z:
<http://www.mdpi.com/1420-3049/22/3/358>
76. <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/1/1b/Chlorogenic-acid-from-CAS-2D-skeletal.png/200px-Chlorogenic-acid-from-CAS-2D-skeletal.png>
77. VÁŇOVÁ Jana, Laura J. LIIMATTA, Petr ČESLA, Susanne K. WIEDMER a Juan IGNACIO MELO. Determination of distribution constants of antioxidants by electrokinetic chromatography. *Cogent Chemistry* [online]. 2017, 3(1) [cit. 2019-03-14]. DOI: 10.1080/23312009.2017.1385173. ISSN 2331-2009. Dostupné z: <https://www.cogentoa.com/article/10.1080/23312009.2017.1385173>
78. <https://www.sigmaaldrich.com/czech-republic.html>
79. SUN, Jianping, Feng LIANG, Yan BIN, Ping LI a Changqing DUAN. Screening Non-colored Phenolics in Red Wines using Liquid Chromatography/Ultraviolet and Mass Spectrometry/Mass Spectrometry Libraries. *Molecules* [online]. 2007, 12(3), 679-693 [cit. 2019-03-21]. DOI: 10.3390/12030679. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1420-3049/12/3/679>

6 PŘÍLOHA . 1

Tabulka 5: Podmínky měření č. 1 – 20 mmol/l fosforečnanový pufr, koncentrace látek 50 mg/l.

Teplota [°C], napětí [kV]	20, 20
Vlnová délka [nm]	254
Doba dávkování [s]	5
Tlak [mBar]	50 (~5,1 kPa)
Elektrolyt	fosforečnanový pufr pH 6
Rozpouštědlo pro vzorek	voda

Tabulka 6: Podmínky měření č. 2 - 20 mmol/l fosforečnanový pufr, koncentrace látek 50 mg/l.

Teplota [°C], napětí [kV]	20, 20
Vlnová délka [nm]	254
Doba dávkování [s]	5
Tlak [mBar]	50 (~5,1 kPa)
Elektrolyt	fosforečnanový pufr pH 6,5
Rozpouštědlo pro vzorek	voda

Tabulka 7: Podmínky měření č. 3 - 20 mmol/l boritanový pufr, koncentrace látek 50 mg/l.

Teplota [°C], napětí [kV]	20, 20
Vlnová délka [nm]	254
Doba dávkování [s]	5
Tlak [mBar]	50 (~5,1 kPa)
Elektrolyt	boritanový pufr pH 8
Rozpouštědlo pro vzorek	voda

Tabulka 8: Migrační charakteristiky pro podmínky měření č. 3.

Vzorek	Čas [min]	Průměr [min]	Výška [$\cdot 10^{-3}$]	Plocha [$\cdot 10^{-3}$ s]	Zd. pohyblivost [$\text{m}^2/\text{V}\cdot\text{s}$]
Kyselina syringová	13,69	14,01	3,55	960,3	1,891E-08
	14,33		3,42	930,8	
Kyselina salicylová	21,89	21,80	1,30	537,4	1,215E-08
	21,72		1,31	513,9	
Kyselina kávová	x	x	x	x	x
Kys. 4-hydroxybenzoová	18,36	18,51	5,92	2403	1,431E-08
	18,67		5,83	2460	
Kyselina ferulová	14,62	14,49	3,63	1225	1,828E-08
	14,37		3,72	1216	
Kyselina gallová	x	x	x	x	x
Kyselina vanilová	18,46	18,26	3,54	1600	1,451E-08
	18,06		3,64	1568	
Kyselina p-kumarová	18,35	18,20	3,25	1584	1,456E-08
	18,05		3,29	1545	
Kyselina chlorogenová	29,31	28,95	2,35	1340	9,154E-09
	28,59		2,40	1300	

Tabulka 9: Podmínky měření č. 4 - 20 mmol/l boritanový pufr, koncentrace látek 50 mg/l.

Teplota [$^{\circ}\text{C}$], napětí [kV]	20, 20
Vlnová délka [nm]	254
Doba dávkování [s]	5
Tlak [mBar]	50 (~5,1 kPa)
Elektrolyt	boritanový pufr pH 8,5
Rozpouštědlo pro vzorek	voda

Tabulka 10: Migrační charakteristiky pro podmínky měření č.4.

Vzorek	Čas [min]	Průměr [min]	Výška [$\cdot 10^{-3}$]	Plocha [$\cdot 10^{-3}$ s]	Zd. pohyblivost [$m^2/V*s$]
Kyselina syringová	15,49	15,78	9,69	2489	1,680E-08
	16,06		9,45	2429	
Kyselina salicylová	22,55	22,70	3,19	1310	1,167E-08
	22,86		3,07	1166	
Kyselina kávová	x	x	x	x	x
Kys. 4-hydroxybenzoová	19,26	19,36	21,12	5878	1,369E-08
	19,46		20,31	5526	
Kyselina ferulová	14,62	14,60	9,76	2471	1,816E-08
	14,58		9,90	2471	
Kyselina gallová	x	x	x	x	x
Kyselina vanilová	16,58	16,60	9,43	2479	1,596E-08
	16,63		9,51	2485	
Kyselina p-kumarová	15,90	15,92	8,70	2495	1,665E-08
	15,94		8,80	2473	
Kyselina chlorogenová	21,17	21,15	5,07	1929	1,253E-08
	21,14		5,03	1891	

Tabulka 11: Podmínky měření č. 5 - 20 mmol/l boritanový pufr, koncentrace látek 50 mg/l.

Teplota [°C], napětí [kV]	20, 30
Vlnová délka [nm]	254
Doba dávkování [s]	10
Tlak [mBar]	50 (~5,1 kPa)
Elektrolyt	boritanový pufr pH 8
Rozpouštědlo pro vzorek	voda

Tabulka 12: Migrační charakteristiky pro podmínky měření č. 5.

Vzorek	Čas [min]	Průměr [min]	Výška [$\cdot 10^{-3}$]	Plocha [$\cdot 10^{-3}$ s]	Zd. pohyblivost [$m^2/V*s$]
Kyselina syringová	6,94	6,97	7,28	1347	2,534E-08
	7,01		7,15	1379	
Kyselina salicylová	9,31	9,34	2,69	575,6	1,891E-08
	9,38		2,71	587,1	
Kyselina kávová	x	x	x	x	x
Kys. 4-hydroxybenzoová	8,12	8,14	12,09	2494	2,170E-08
	8,16		12,11	2523	
Kyselina ferulová	6,82	6,83	7,08	1274	2,588E-08
	6,83		7,24	1294	
Kyselina gallová	x	x	x	x	x
Kyselina vanilová	7,36	7,36	7,14	1251	2,400E-08
	7,36		7,17	1265	
Kyselina p-kumarová	7,27	7,26	6,93	1296	2,432E-08
	7,26		6,98	1316	
Kyselina chlorogenová	8,58	8,58	5,61	805,2	2,058E-08
	8,59		5,58	793,4	

Tabulka 13: Podmínky měření č. 6 - 20 mmol/l boritanový pufr, koncentrace látek 50 mg/l.

Teplota [°C], napětí [kV]	20, 30
Vlnová délka [nm]	254
Doba dávkování [s]	10
Tlak [mBar]	50 (~5,1 kPa)
Elektrolyt	boritanový pufr pH 8,5
Rozpouštědlo pro vzorek	boritanový pufr pH 8,5

Tabulka 14: Migrační charakteristiky pro podmínky měření č. 6.

Vzorek	Čas [min]	Průměr [min]	Výška [$\cdot 10^{-3}$]	Plocha [$\cdot 10^{-3}$ s]	Zd. pohyblivost [$\text{m}^2/\text{V}\cdot\text{s}$]
Kyselina syringová	8,08	8,19	10,19	1206,0	2,156E-08
	8,31		9,45	1220,0	
Kyselina salicylová	10,38	10,45	3,17	541,8	1,690E-08
	10,53		3,07	538,5	
Kyselina kávová	x	x	x	x	x
Kys. 4-hydroxybenzoová	9,35	9,38	18,99	2395,0	1,884E-08
	9,41		18,49	2415,0	
Kyselina ferulová	7,61	7,63	12,05	1244,0	2,317E-08
	7,64		12,00	1242,0	
Kyselina gallová	x	x	x	x	x
Kyselina vanilová	8,31	8,32	12,43	1317,0	2,123E-08
	8,33		12,46	1334,0	
Kyselina p-kumarová	8,07	8,08	11,24	1186,0	2,187E-08
	8,09		11,31	1196,0	
Kyselina chlorogenová	9,53	9,53	5,23	813,6	1,853E-08
	9,54		5,28	822,0	

Tabulka 15: Podmínky měření č. 7 - 20 mmol/l boritanový pufr, koncentrace látek 50 mg/l.

Teplota [°C], napětí [kV]	20, 30
Vlnová délka [nm]	254
Doba dávkování [s]	5
Tlak [mBar]	50 (~5,1 kPa)
Elektrolyt	boritanový pufr pH 8
Rozpouštědlo pro vzorek	voda

Tabulka 16: Migrační charakteristiky pro podmínky měření č. 7.

Vzorek	Čas [min]	Průměr [min]	Výška [$\cdot 10^{-3}$]	Plocha [$\cdot 10^{-3}$ s]	Zd. pohyblivost [$m^2/V \cdot s$]
Kyselina syringová	7,02	6,92	4,31	499,6	2,553E-08
	6,83		4,34	474,5	
Kyselina salicylová	9,70	9,65	1,43	206,5	1,832E-08
	9,60		1,43	204,7	
Kyselina kávová	x	x	x	x	x
Kys. 4-hydroxybenzoová	8,68	8,67	7,01	931,7	2,038E-08
	8,66		7,09	954,2	
Kyselina ferulová	7,24	7,23	4,10	498,2	2,444E-08
	7,22		4,19	503,2	
Kyselina gallová	19,24	19,66	0,26	132,8	8,988E-09
	20,08		0,36	272	
Kyselina vanilová	7,88	7,89	3,95	476	2,239E-08
	7,90		4,07	500,1	
Kyselina p-kumarová	9,40	8,55	1,38	210,4	2,065E-08
	7,71		3,67	470,2	
Kyselina chlorogenová	9,38	9,39	0,94	145,9	1,881E-08
	9,40		1,38	210,4	

Tabulka 17: Podmínky měření č. 8 - 20 mmol/l boritanový pufr a 10 mmol/l fosforečnanový pufr, koncentrace látek 50 mg/l.

Teplota [°C], napětí [kV]	20, 30
Vlnová délka [nm]	254
Doba dávkování [s]	10
Tlak [mBar]	50 (~5,1 kPa)
Elektrolyt	fosforečnanový pufr pH 6 a 2
Rozpouštědlo pro vzorek	voda
Doba dávkování kyselého pufru [s]	10

Tabulka 18: Podmínky měření č. 9 - 20 mmol/l boritanový pufr a 10 mmol/l fosforečnanový pufr, koncentrace látek 50 mg/l.

Teplota [°C], napětí [kV]	20, 30
Vlnová délka [nm]	254
Doba dávkování [s]	10
Tlak [mBar]	50 (~5,1 kPa)
Elektrolyt	fosforečnanový pufr pH 6 a 2
Rozpouštědlo pro vzorek	fosforečnanový pufr pH 6
Doba dávkování kyselého pufru [s]	10

Tabulka 19: Migrační charakteristiky pro podmínky měření č. 9.

Vzorek	Čas [min]	Průměr [min]	Výška [$\cdot 10^{-3}$]	Plocha [$\cdot 10^{-3}$ s]	Zd. pohyblivost [$\text{m}^2/\text{V}\cdot\text{s}$]
Kyselina ferulová	30,67	30,21	15,84	4921	5,847E-09
	29,75		13,91	4869	
Kyselina p-kumarová	35,45	35,16	12,80	4071	5,024E-09
	34,88		11,93	4077	

Tabulka 20: Podmínky měření č. 10 – 20 mmol/l boritanový pufr a 10 mmol/l fosforečnanový pufr, koncentrace látek 50 mg/l u kyseliny kávové a gallové 25 mg/l.

Teplota [°C], napětí [kV]	20, 30
Vlnová délka [nm]	254
Doba dávkování [s]	10
Tlak [mBar]	50 (~5,1 kPa)
Elektrolyt	bor. pufr pH 8 a fosf. pufr pH 2
Rozpouštědlo pro vzorek	boritanový pufr pH 8
Doba dávkování kyselého pufru [s]	10

Tabulka 21: Podmínky měření č. 11 – 20 mmol/l boritanový pufr a 10 mmol/l fosforečnanový pufr, koncentrace látek 50 mg/l u kyseliny kávové a gallové 25 mg/l.

Teplota [°C], napětí [kV]	20, 30
Vlnová délka [nm]	254
Doba dávkování [s]	10
Tlak [mBar]	50 (~5,1 kPa)
Elektrolyt	bor. pufr pH 8 a fosf. pufr pH 2
Rozpouštědlo pro vzorek	voda
Doba dávkování kyselého pufru [s]	5

Tabulka 22: Podmínky měření č. 12 – 20 mmol/l boritanový pufr a 10 mmol/l fosforečnanový pufr, koncentrace látek 50 mg/l u kyseliny kávové a gallové 25 mg/l.

Teplota [°C], napětí [kV]	20, 30
Vlnová délka [nm]	254
Doba dávkování [s]	10
Tlak [mBar]	50 (~5,1 kPa)
Elektrolyt	bor. pufr pH 8 a fosf. pufr pH 2
Rozpouštědlo pro vzorek	voda
Doba dávkování kyselého pufru [s]	15

Tabulka 23: Podmínky měření č. 13 – 20 mmol/l boritanový pufr a 10 mmol/l fosforečnanový pufr, koncentrace látek 50 mg/l u kyseliny kávové a gallové 25 mg/l.

Teplota [°C], napětí [kV]	20, 30
Vlnová délka [nm]	254
Doba dávkování [s]	10
Tlak [mBar]	50 (~5,1 kPa)
Elektrolyt	bor. pufr pH 8,5 a fosf. pufr pH 2
Rozpouštědlo pro vzorek	voda
Doba dávkování kyselého pufru [s]	5

Tabulka 24: Podmínky měření č. 14 – 20 mmol/l boritanový pufr a 10 mmol/l fosforečnanový pufr, koncentrace látek 50 mg/l u kyseliny kávové a gallové 25 mg/l.

Teplota [°C], napětí [kV]	20, 30
Vlnová délka [nm]	254
Doba dávkování [s]	10
Tlak [mBar]	50 (~5,1 kPa)
Elektrolyt	bor. pufr pH 8,5 a fosf. pufr pH 2
Rozpouštědlo pro vzorek	voda
Doba dávkování kyselého pufru [s]	10

Tabulka 25: Podmínky měření č. 15 – 20 mmol/l boritanový pufr a 10 mmol/l fosforečnanový pufr, první vzorek poté kyselý pH, koncentrace látek 50 mg/l u kyseliny kávové a gallové 25 mg/l.

Teplota [°C], napětí [kV]	20, 30
Vlnová délka [nm]	254
Doba dávkování [s]	10
Tlak [mBar]	50 (~5,1 kPa)
Elektrolyt	bor. pufr pH 8 a fosf. pufr pH 2
Rozpouštědlo pro vzorek	fosforečnanový pufr pH 2
Doba dávkování kyselého pufru [s]	10

Tabulka 26: Podmínky měření č. 16 - 20 mmol/l boritanový pufr a 10 mmol/l fosforečnanový pufr, první vzorek poté kyselé pH, koncentrace látek 50 mg/l u kyseliny kávové a gallové 25 mg/l.

Teplota [°C], napětí [kV]	20, 30
Vlnová délka [nm]	254
Doba dávkování [s]	10
Tlak [mBar]	50 (~5,1 kPa)
Elektrolyt	bor. pufr pH 8 a fosf. pufr pH 2
Rozpouštědlo pro vzorek	fosforečnanový pufr pH 2
Doba dávkování kyselého pufru [s]	5

Tabulka 27: Podmínky měření č. 17 - 20 mmol/l boritanový pufr a 10 mmol/l fosforečnanový pufr, první vzorek poté kyselé pH, koncentrace látek 50 mg/l u kyseliny kávové a gallové 25 mg/l.

Teplota [°C], napětí [kV]	20, 30
Vlnová délka [nm]	254
Doba dávkování [s]	10
Tlak [mBar]	50 (~5,1 kPa)
Elektrolyt	bor. pufr pH 8 a fosf. pufr pH 2
Rozpouštědlo pro vzorek	fosforečnanový pufr pH 2
Doba dávkování kyselého pufru [s]	15

Tabulka 28: Podmínky měření č. 18 – 20 mmol/l boritanový pufr a 10 mmol/l fosforečnanový pufr, první kyselé pH 2 poté vzorek, koncentrace látek 50 mg/l u kyseliny kávové a gallové 25 mg/l.

Teplota [°C], napětí [kV]	20, 30
Vlnová délka [nm]	254
Doba dávkování [s]	10
Tlak [mBar]	50 (~5,1 kPa)
Elektrolyt	bor. pufr pH 8,5 a fosf. pufr pH 2
Rozpouštědlo pro vzorek	boritanový pufr pH 8,5
Doba dávkování kyselého pufru [s]	10

Tabulka 29: Podmínky měření č. 19 - 20 mmol/l boritanový pufr a 10 mmol/l fosforečnanový pufr, první kyselý pH 2 poté vzorek, koncentrace látek 50 mg/l u kyseliny kávové a gallové 25 mg/l.

Teplota [°C], napětí [kV]	20, 30
Vlnová délka [nm]	254
Doba dávkování [s]	10
Tlak [mBar]	50 (~5,1 kPa)
Elektrolyt	bor. pufr pH 8 a fosf. pufr pH 2
Rozpouštědlo pro vzorek	fosforečnanový pufr pH 2
Doba dávkování kyselého pufru [s]	5

Tabulka 30: Podmínky měření č. 20 - 20 mmol/l boritanový pufr a 10 mmol/l fosforečnanový pufr, první kyselý pH 2 poté vzorek, koncentrace látek 50 mg/l u kyseliny kávové a gallové 25 mg/l.

Teplota [°C], napětí [kV]	20, 30
Vlnová délka [nm]	254
Doba dávkování [s]	10
Tlak [mBar]	50 (~5,1 kPa)
Elektrolyt	bor. pufr pH 8 a fosf. pufr pH 2
Rozpouštědlo pro vzorek	fosforečnanový pufr pH 2
Doba dávkování kyselého pufru [s]	10

Tabulka 31: Podmínky měření č. 21 - 20 mmol/l boritanový pufr a 10 mmol/l fosforečnanový pufr, první kyselý pH 2 poté vzorek, koncentrace látek 50 mg/l u kyseliny kávové a gallové 25 mg/l.

Teplota [°C], napětí [kV]	20, 30
Vlnová délka [nm]	254
Doba dávkování [s]	10
Tlak [mBar]	50 (~5,1 kPa)
Elektrolyt	bor. pufr pH 8 a fosf. pufr pH 2
Rozpouštědlo pro vzorek	fosforečnanový pufr pH 2
Doba dávkování kyselého pufru [s]	15

Tabulka 32: Podmínky měření č. 22 - 20 mmol/l boritanový pufr, koncentrace látek 50 mg/l u kyseliny kávové a gallové 25 mg/l.

Teplota [°C], napětí [kV]	20, 30
Vlnová délka [nm]	254
Doba dávkování [s]	30
Tlak [mBar]	50 (~5,1 kPa)
Elektrolyt	bor. pufr pH 8,5
Rozpouštědlo pro vzorek	boritanový pufr pH 8,5

Tabulka 33: Migrační charakteristiky pro podmínky měření č. 22.

Vzorek	Čas [min]	Průměr [min]	Výška [$\cdot 10^{-3}$]	Plocha [$\cdot 10^{-3}$ s]	Zd. pohyblivost [$m^2/V \cdot s$]
Kyselina syringová	3,85	3,88	7,83	1694	4,550E-08
	3,92		8,02	1572	
Kyselina salicylová	4,32	4,33	2,84	695,3	4,081E-08
	4,34		2,92	709,7	
Kyselina kávová	5,35	5,34	4,64	1425	3,310E-08
	5,33		4,07	1357	
Kys. 4-hydroxybenzoová	4,17	4,14	12,62	3132	4,266E-08
	4,11		12,56	3050	
Kyselina ferulová	3,78	3,80	8,30	1892	4,646E-08
	3,83		8,38	1889	
Kyselina gallová	5,80	5,78	2,62	902,4	3,057E-08
	5,76		2,40	835,9	
Kyselina vanilová	3,91	3,92	6,98	1703	4,504E-08
	3,94		7,04	1429	
Kyselina p-kumarová	3,88	3,89	6,51	1654	4,542E-08
	3,90		6,60	1655	
Kyselina chlorogenová	4,33	4,31	3,92	1155	4,097E-08
	4,30		4,00	1154	

Tabulka 34: Podmínky měření č. 23 – 20 mmol/l boritanový pufr, koncentrace látek 50 mg/l u kyseliny kávové a gallové 25 mg/l.

Teplota [°C], napětí [kV]	20, -30(10 s), +30
Vlnová délka [nm]	254
Doba dávkování [s]	30
Tlak [mBar]	50 (~5,1 kPa)
Elektrolyt	bor. pufr pH 8,5
Rozpouštědlo pro vzorek	boritanový pufr pH 8,5

Tabulka 35: Migrační charakteristiky pro podmínky měření č. 23.

Vzorek	Čas [min]	Průměr [min]	Výška [$\cdot 10^{-3}$]	Plocha [$\cdot 10^{-3}$ s]	Zd. pohyblivost [$m^2/V \cdot s$]
Kyselina syringová	3,87	3,91	7,81	1791	4,524E-08
	3,94		7,93	1720	
Kyselina salicylová	4,38	4,38	2,94	772,3	4,037E-08
	4,38		3,02	810,2	
Kyselina kávová	5,25	5,26	5,28	1847	3,361E-08
	5,26		5,33	1835	
Kys. 4-hydroxybenzoová	4,10	4,15	13,40	3481	4,261E-08
	4,19		13,44	3469	
Kyselina ferulová	3,75	3,74	8,88	2055	4,729E-08
	3,73		8,96	2058	
Kyselina gallová	5,49	5,54	2,11	760,1	3,191E-08
	5,58		2,19	754,5	
Kyselina vanilová	4,02	3,99	8,00	1874	4,433E-08
	3,95		8,06	1879	
Kyselina p-kumarová	3,88	3,90	7,37	1756	4,530E-08
	3,92		7,42	1749	
Kyselina chlorogenová	4,31	4,26	4,66	1254	4,145E-08
	4,22		4,56	1237	

Tabulka 36: Podmínky měření č. 24 - 20 mmol/l boritanový pufr, koncentrace látek 15 mg/l.

Teplota [°C], napětí [kV]	20, 30
Vlnová délka [nm]	254
Doba dávkování [s]	30
Tlak [mBar]	50 (~5,1 kPa)
Elektrolyt	bor. pufr pH 8,5
Rozpouštědlo pro vzorek	boritanový pufr pH 8,5

Tabulka 37: Migrační charakteristiky pro podmínky měření č. 24.

Vzorek	Čas [min]	Průměr [min]	Výška [$\cdot 10^{-3}$]	Plocha [$\cdot 10^{-3}$ s]	Zd. pohyblivost [$\text{m}^2/\text{V}\cdot\text{s}$]
Kyselina syringová	3,57	3,60	2,05	423,9	4,914E-08
	3,62		2,07	432,1	
Kyselina salicylová	4,15	4,11	0,86	185,4	4,303E-08
	4,06		0,78	185,2	
Kyselina kávová	4,98	4,97	3,04	895	3,554E-08
	4,96		2,99	884,4	
Kys. 4-hydroxybenzoová	3,87	3,89	3,58	812,9	4,544E-08
	3,91		3,64	818,9	
Kyselina ferulová	3,49	3,54	2,63	535	4,991E-08
	3,59		2,60	530	
Kyselina gallová	5,25	5,26	1,50	469,5	3,359E-08
	5,28		1,48	473,3	
Kyselina vanilová	3,72	3,68	2,45	537,8	4,797E-08
	3,64		2,46	537,9	
Kyselina p-kumarová	3,67	3,69	2,55	556,9	4,784E-08
	3,72		2,56	558,3	
Kyselina chlorogenová	3,99	3,98	1,40	333,9	4,439E-08
	3,98		1,37	331,5	

Tabulka 38: Podmínky měření č. 25 - 20 mmol/l boritanový pufr, koncentrace látek 15 mg/l.

Teplota [°C], napětí [kV]	20, -30(10 s), +30
Vlnová délka [nm]	254
Doba dávkování [s]	30
Tlak [mBar]	50 (~5,1 kPa)
Elektrolyt	bor. pufr pH 8,5
Rozpouštědlo pro vzorek	boritanový pufr pH 8,5

Tabulka 39: Migrační charakteristiky pro podmínky měření č. 25.

Vzorek	Čas [min]	Průměr [min]	Výška [$\cdot 10^{-3}$]	Plocha [$\cdot 10^{-3}$ s]	Zd. pohyblivost [$\text{m}^2/\text{V}\cdot\text{s}$]
Kyselina syringová	3,48	3,48	1,90	355,4	5,079E-08
	3,48		1,91	349	
Kyselina salicylová	3,97	3,97	0,73	163,9	4,453E-08
	3,97		0,71	156,7	
Kyselina kávová	4,98	4,99	2,87	628,7	3,538E-08
	5,01		2,90	767,1	
Kys. 4-hydroxybenzoová	3,86	3,87	3,32	693	4,571E-08
	3,87		3,31	683,2	
Kyselina ferulová	3,51	3,49	2,40	435,5	5,068E-08
	3,47		2,35	434,7	
Kyselina gallová	5,28	5,26	1,59	376,9	3,357E-08
	5,25		1,60	378,7	
Kyselina vanilová	3,67	3,67	2,22	436,1	4,816E-08
	3,67		2,32	463,8	
Kyselina p-kumarová	3,64	3,65	2,38	457,6	4,835E-08
	3,67		2,41	464,7	
Kyselina chlorogenová	3,96	3,96	1,21	275,8	4,465E-08
	3,95		1,25	278,3	

Tabulka 40: Podmínky měření č. 26 - 20 mmol/l boritanový pufr, koncentrace látek 15 mg/l.

Teplota [°C], napětí [kV]	20, 30
Vlnová délka [nm]	254
Doba dávkování [s]	30
Tlak [mBar]	50 (~5,1 kPa)
Elektrolyt	bor. pufr pH 8
Rozpouštědlo pro vzorek	boritanový pufr pH 8

Tabulka 41: Migrační charakteristiky pro podmínky měření č. 26.

Vzorek	Čas [min]	Průměr [min]	Výška [$\cdot 10^{-3}$]	Plocha [$\cdot 10^{-3}$ s]	Zd. pohyblivost [$m^2/V \cdot s$]
Kyselina syringová	2,82	2,82	2,24	364,7	6,265E-08
	2,82		2,32	362,8	
Kyselina salicylová	3,14	3,15	0,82	152,4	5,611E-08
	3,16		0,81	150,5	
Kyselina kávová	3,51	3,51	2,87	663,6	5,037E-08
	3,51		2,84	663,5	
Kys. 4-hydroxybenzoová	2,98	2,98	4,02	691,9	5,921E-08
	2,99		4,03	685,8	
Kyselina ferulová	2,77	2,87	2,49	395,6	6,153E-08
	2,98		4,02	691,9	
Kyselina gallová	3,72	3,70	1,29	385,1	4,779E-08
	3,67		1,09	247,1	
Kyselina vanilová	2,87	2,87	2,79	457,3	6,158E-08
	2,87		2,82	465,7	
Kyselina p-kumarová	2,83	2,84	2,82	464,5	6,218E-08
	2,85		2,89	469,7	
Kyselina chlorogenová	3,04	3,08	1,63	264,2	5,737E-08
	3,12		1,62	266,1	

Tabulka 42: Podmínky měření č. 27 - 20 mmol/l boritanový pufr, koncentrace látek 15 mg/l.

Teplota [°C], napětí [kV]	20, -30(10 s), +30
Vlnová délka [nm]	254
Doba dávkování [s]	30
Tlak [mBar]	50 (~5,1 kPa)
Elektrolyt	bor. pufr pH 8
Rozpouštědlo pro vzorek	boritanový pufr pH 8

Tabulka 43: Migrační charakteristiky pro podmínky měření č. 27.

Vzorek	Čas [min]	Průměr [min]	Výška [$\cdot 10^{-3}$]	Plocha [$\cdot 10^{-3}$ s]	Zd. pohyblivost [$m^2/V \cdot s$]
Kyselina syringová	5,26	5,31	2,11	593,6	3,326E-08
	5,37		2,19	621,8	
Kyselina salicylová	6,58	6,59	0,73	278,7	2,679E-08
	6,61		0,70	271,8	
Kyselina kávová	x	x	x	x	x
Kys. 4-hydroxybenzoová	5,577	336,27	3,902	1139	3,152E-08
	5,632		3,914	1186	
Kyselina ferulová	4,863	290,64	2,59	654,4	3,647E-08
	4,825		2,62	642	
Kyselina gallová	x	x	x	x	x
Kyselina vanilová	4,992	300,96	2,69	680,8	3,522E-08
	5,04		2,709	694,1	
Kyselina p-kumarová	4,923	294,09	2,957	725,9	3,604E-08
	4,88		2,918	750	
Kyselina chlorogenová	5,613	336,03	1,716	448,7	3,154E-08
	5,588		1,693	453,3	

Tabulka 44: Podmínky měření č. 28 - 20 mmol/l boritanový pufr, koncentrace látek 15 mg/l.

Teplota [$^{\circ}C$], napětí [kV]	20, 30
Vlnová délka [nm]	254
Doba dávkování [s]	30
Tlak [mBar]	50 (~5,1 kPa)
Elektrolyt	bor. pufr pH 8
Rozpouštědlo pro vzorek	voda

Tabulka 45: Migrační charakteristiky pro podmínky měření č. 28.

Vzorek	Čas [min]	Průměr [min]	Výška [$\cdot 10^{-3}$]	Plocha [$\cdot 10^{-3}$ s]	Zd. pohyblivost [$m^2/V \cdot s$]
Kyselina syringová	3,75	3,82	6,55	671,8	4,625E-08
	3,89		6,25	591	
Kyselina salicylová	4,41	4,37	2,29	282,9	4,043E-08
	4,33		2,29	290,6	
Kyselina kávová	x	x	x	x	x
Kys. 4-hydroxybenzoová	3,98	4,02	10,96	1254	4,395E-08
	4,06		10,80	1265	
Kyselina ferulová	3,58	3,60	7,32	684,8	4,911E-08
	3,61		7,28	697,4	
Kyselina gallová	x	x	x	x	x
Kyselina vanilová	3,79	3,76	7,41	707,2	4,702E-08
	3,73		7,15	773,9	
Kyselina p-kumarová	3,77	3,77	7,95	825	4,688E-08
	3,77		7,97	836,6	
Kyselina chlorogenová	3,97	3,98	6,69	479,6	4,438E-08
	3,99		6,51	484,2	

Tabulka 46: Podmínky měření č. 29 - 20 mmol/l boritanový pufr, koncentrace látek 15 mg/l.

Teplota [°C], napětí [kV]	20, -30(10 s), +30
Vlnová délka [nm]	254
Doba dávkování [s]	30
Tlak [mBar]	50 (~5,1 kPa)
Elektrolyt	bor. pufr pH 8
Rozpouštědlo pro vzorek	voda

Tabulka 47: Migrační charakteristiky pro podmínky měření č. 29.

Vzorek	Čas [min]	Průměr [min]	Výška [$\cdot 10^{-3}$]	Plocha [$\cdot 10^{-3}$ s]	Zd. pohyblivost [$m^2/V \cdot s$]
Kyselina syringová	3,80	3,80	6,88	676,9	4,649E-08
	3,80		6,69	674,8	
Kyselina salicylová	4,31	4,30	2,57	297	4,109E-08
	4,29		2,51	263,4	
Kyselina kávová	x	x	x	x	x
Kys. 4-hydroxybenzoová	4,05	4,05	11,32	1237	4,363E-08
	4,05		11,31	1234	
Kyselina ferulová	3,65	3,65	7,44	689,9	4,841E-08
	3,65		7,39	698,3	
Kyselina gallová	x	x	x	x	x
Kyselina vanilová	3,81	3,81	7,49	659,7	4,632E-08
	3,82		7,46	672,2	
Kyselina p-kumarová	3,76	3,77	8,01	775	4,691E-08
	3,78		7,98	761,9	
Kyselina chlorogenová	3,95	3,93	9,14	437,9	4,491E-08
	3,92		9,19	435	

Tabulka 48: Podmínky měření č. 30 - 20 mmol/l boritanový pufr, koncentrace látek 15 mg/l.

Teplota [$^{\circ}C$], napětí [kV]	20, 30
Vlnová délka [nm]	254
Doba dávkování [s]	20
Tlak [mBar]	50 (~5,1 kPa)
Elektrolyt	bor. pufr pH 8
Rozpouštědlo pro vzorek	bor. pufr pH 8

Tabulka 49: Migrační charakteristiky pro podmínky měření č. 30.

Vzorek	Čas [min]	Průměr [min]	Výška [$\cdot 10^{-3}$]	Plocha [$\cdot 10^{-3}$ s]	Zd. pohyblivost [$m^2/V \cdot s$]
Kyselina syringová	3,82	3,81	2,34	336,1	4,637E-08
	3,81				
Kyselina salicylová	4,31	4,33	0,78	130,5	4,084E-08
	4,34				
Kyselina kávová	5,27	5,25	2,59	660,2	3,362E-08
	5,24				
Kys. 4-hydroxybenzoová	4,05	4,04	3,63	573,8	4,372E-08
	4,03				
Kyselina ferulová	3,69	3,67	2,47	357	4,811E-08
	3,66				
Kyselina gallová	5,67	5,66	1,19	385	3,119E-08
	5,66				
Kyselina vanilová	3,84	3,83	2,45	371,4	4,618E-08
	3,81				
Kyselina p-kumarová	3,83	3,82	2,67	402,4	4,622E-08
	3,81				
Kyselina chlorogenová	4,22	4,23	1,31	229,1	4,175E-08
	4,25				

Tabulka 50: Podmínky měření č. 31 - 20 mmol/l boritanový pufr, koncentrace látek 15 mg/l.

Teplota [°C], napětí [kV]	20, -30(10 s), +30
Vlnová délka [nm]	254
Doba dávkování [s]	20
Tlak [mBar]	50 (~5,1 kPa)
Elektrolyt	bor. pufr pH 8
Rozpouštědlo pro vzorek	bor. pufr pH 8

Tabulka 51: Migrační charakteristiky pro podmínky měření č. 31.

Vzorek	Čas [min]	Průměr [min]	Výška [$\cdot 10^{-3}$]	Plocha [$\cdot 10^{-3}$ s]	Zd. pohyblivost [$m^2/V \cdot s$]
Kyselina syringová	3,73	3,72	2,19	226	4,746E-08
	3,72		2,20	249,6	
Kyselina salicylová	4,28	4,29	0,73	107,5	4,115E-08
	4,30		0,74	101,8	
Kyselina kávová	5,16	5,16	1,87	585,4	3,426E-08
	5,15		1,86	569,6	
Kys. 4-hydroxybenzoová	4,09	4,05	3,40	445,8	4,361E-08
	4,01		3,41	444,1	
Kyselina ferulová	3,67	3,66	2,27	277,1	4,831E-08
	3,64		2,33	267	
Kyselina gallová	5,54	5,54	0,99	311	3,190E-08
	5,54		0,98	314,7	
Kyselina vanilová	3,76	3,79	2,05	294,6	4,667E-08
	3,81		2,30	295,5	
Kyselina p-kumarová	3,81	3,80	2,48	321	4,655E-08
	3,78		2,47	326,6	
Kyselina chlorogenová	4,21	4,24	1,20	184,1	4,167E-08
	4,27		1,27	191,6	

Tabulka 52: Podmínky měření č. 32 – 20 mmol/l boritanový pufr, koncentrace látek 0,05 mg/l.

Teplota [°C], napětí [kV]	20, 30
Vlnová délka [nm]	254
Doba dávkování [s]	30
Tlak [mBar]	50 (~5,1 kPa)
Elektrolyt	bor. pufr pH 8
Rozpouštědlo pro vzorek	bor. pufr pH 8

Tabulka 53: Podmínky měření č. 33 - 20 mmol/l boritanový pufr, koncentrace látek 0,05 mg/l.

Teplota [°C], napětí [kV]	20, -30(10 s), +30
Vlnová délka [nm]	254
Doba dávkování [s]	60
Tlak [mBar]	50 (~5,1 kPa)
Elektrolyt	bor. pufr pH 8
Rozpouštědlo pro vzorek	voda
Doba dávkování zásaditého pufru [s]	30

Tabulka 54: Podmínky měření č. 34 - 20 mmol/l boritanový pufr, koncentrace látek 0,05 mg/l.

Teplota [°C], napětí [kV]	20, -30(10 s), +30
Vlnová délka [nm]	254
Doba dávkování [s]	30
Tlak [mBar (~5,1 kPa)]	50 (~5,1 kPa)
Elektrolyt	bor. pufr pH 8
Rozpouštědlo pro vzorek	bor. pufr pH 8
Doba dávkování zásaditého pufru [s]	30

Tabulka 55: Podmínky měření č. 35 - 20 mmol/l boritanový pufr, koncentrace látek 0,05 mg/l.

Teplota [°C], napětí [kV]	20, 30
Vlnová délka [nm]	220
Doba dávkování [s]	30
Tlak [mBar]	50 (~5,1 kPa)
Elektrolyt	bor. pufr pH 8
Rozpouštědlo pro vzorek	voda
Doba dávkování zásaditého pufru [s]	30

Tabulka 56: Podmínky měření č. 36 - 100 mmol/l boritanový pufr, koncentrac látek 0,05 mg/l.

Teplota [°C], napětí [kV]	20, 30
Vlnová délka [nm]	220
Doba dávkování [s]	30
Tlak [mBar]	50 (~5,1 kPa)
Elektrolyt	bor. pufr pH 8
Rozpouštědlo pro vzorek	voda
Doba dávkování zásaditého pufru [s]	30

Tabulka 57: Podmínky měření č. 37 – 100 mmol/l boritanový pufr, koncentrace látek 50 mg/l.

Teplota [°C], napětí [kV]	20, 30
Vlnová délka [nm]	254
Doba dávkování [s]	10
Tlak [mBar]	50 (~5,1 kPa)
Elektrolyt	bor. pufr pH 8
Rozpouštědlo pro vzorek	voda

Tabulka 58: Migrační charakteristiky pro podmínky měření č. 37.

Vzorek	Čas [min]	Průměr [min]	Výška [$\cdot 10^{-3}$]	Plocha [$\cdot 10^{-3}$ s]	Zd. pohyblivost [$\text{m}^2/\text{V}\cdot\text{s}$]
Kyselina syringová	3,77	3,77	17,18	549,3	4,685E-08
	3,77		17,16	538,6	
Kyselina salicylová	4,19	4,19	7,76	237,6	4,213E-08
	4,20		7,76	238	
Kyselina kávová	5,11	5,11	11,51	1049	3,454E-08
	5,12		11,79	1068	
Kys. 4-hydroxybenzoová	4,08	4,08	33,12	994,3	4,333E-08
	4,08		33,80	993,2	
Kyselina ferulová	3,71	3,71	16,66	612,3	4,757E-08
	3,72		17,10	613,8	
Kyselina gallová	5,32	5,33	3,95	557,2	3,318E-08
	5,33		4,07	573,6	
Kyselina vanilová	3,88	3,88	15,08	614	4,553E-08
	3,88		16,29	618,3	
Kyselina p-kumarová	3,83	3,84	13,17	656,8	4,604E-08
	3,84		13,93	639	
Kyselina chlorogenová	4,22	4,22	5,47	378,8	4,191E-08
	4,22		6,00	395,2	

Tabulka 59: Podmínky měření č. 38 – 100 mmol/l boritanový pufr, koncentrace látek 0,1 mg/l.

Teplota [°C], napětí [kV]	20, -30(10 s), +30
Vlnová délka [nm]	220
Doba dávkování [s]	30
Tlak [mBar]	50(~5,1 kPa)
Elektrolyt	bor. pufr pH 8
Rozpouštědlo pro vzorek	voda
Doba dávkování zásaditého pufru [s]	30

Tabulka 60: Migrační charakteristiky pro podmínky měření č. 38.

Vzorek	Čas [min]	Průměr [min]	Výška [$\cdot 10^{-3}$]	Plocha [$\cdot 10^{-3}$ s]	Zd. pohyblivost [$\text{m}^2/\text{V}\cdot\text{s}$]
Kyselina salicylová	2,06	2,06	5,67	263,1	8,555E-08
	x	x	x	x	x

Tabulka 61: Podmínky měření č. 39 – 100 mmol/l boritanový pufr, koncentrace látek 0,1 mg/l.

Teplota [°C], napětí [kV]	20, -30(10 s), +30
Vlnová délka [nm]	220
Doba dávkování [s]	60
Tlak [mBar]	50 (~5,1 kPa)
Elektrolyt	bor. pufr pH 8
Rozpouštědlo pro vzorek	voda
Doba dávkování zásaditého pufru [s]	30

Tabulka 62: Podmínky měření č. 40 – 100 mmol/l boritanový pufr, koncentrace látek 0,1 mg/l.

Teplota [°C], napětí [kV]	20, -30(10 s), +30
Vlnová délka [nm]	220
Doba dávkování [s]	90
Tlak [mBar]	50 (~5,1 kPa)
Elektrolyt	bor. pufr pH 8
Rozpouštědlo pro vzorek	voda
Doba dávkování zásaditého pufru [s]	30

Tabulka 63: Podmínky měření č. 41 – 100 mmol/l boritanový pufr, koncentrace látek 10 mg/l.

Teplota [°C], napětí [kV]	20, 30
Vlnová délka [nm]	220
Doba dávkování [s]	5
Tlak [mBar]	50 (~5,1 kPa)
Elektrolyt	bor. pufr pH 8
Rozpouštědlo pro vzorek	voda

Tabulka 64: Migrační charakteristiky pro podmínky měření č. 41.

Vzorek	Čas [min]	Průměr [min]	Výška [$\cdot 10^{-3}$]	Plocha [$\cdot 10^{-3}$ s]	Zd. pohyblivost [$m^2/V \cdot s$]
Kyselina syringová	3,84	3,84	9,83	145,0	4,598E-08
	3,85		9,69	141,9	
Kyselina salicylová	4,31	4,31	5,67	131,5	4,099E-08
	4,31		5,67	130,2	
Kyselina kávová	5,53	5,53	4,88	191,7	3,195E-08
	5,53		4,91	192,4	
Kys. 4-hydroxybenzoová	4,19	4,19	6,27	91,5	4,219E-08
	4,19		6,36	91,8	
Kyselina ferulová	3,79	3,79	6,08	82,4	4,661E-08
	3,79		6,14	82,4	
Kyselina gallová	5,81	5,81	4,17	246,3	3,041E-08
	5,81		4,23	246,5	
Kyselina vanilová	3,99	3,99	6,79	105,0	4,433E-08
	3,99		6,95	105,3	
Kyselina p-kumarová	3,94	3,95	6,12	97,8	4,478E-08
	3,95		6,25	98,6	
Kyselina chlorogenová	4,35	4,35	2,46	56,4	4,063E-08
	4,34		2,51	56,2	

Tabulka 65: Podmínky měření č. 42 – 100 mmol/l boritanový pufr, koncentrace látek 0,1 mg/l.

Teplota [°C], napětí [kV]	20, 30
Vlnová délka [nm]	220
Doba dávkování [s]	5
Tlak [mBar]	50 (~5,1 kPa)
Elektrolyt	bor. pufr pH 8
Rozpouštědlo pro vzorek	voda

Tabulka 66: Migrační charakteristiky pro podmínky měření č. 42.

Vzorek	Čas [min]	Průměr [min]	Výška [$\cdot 10^{-3}$]	Plocha [$\cdot 10^{-3}$ s]	Zd. pohyblivost [$m^2/V \cdot s$]
Kyselina syringová	3,82	3,82	0,09	1,43	4,631E-08
	3,81		0,07	1,16	
Kyselina salicylová	4,28	4,29	0,07	1,42	4,116E-08
	4,30		0,06	1,20	
Kyselina kávová	5,57	5,57	0,08	2,14	3,172E-08
	5,57		0,07	1,71	
Kys. 4-hydroxybenzoová	4,16	4,16	0,06	1,09	4,251E-08
	4,15		0,07	1,16	
Kyselina ferulová	3,77	3,76	0,07	1,31	4,697E-08
	3,76		0,07	1,14	
Kyselina gallová	5,89	5,90	0,10	2,78	2,997E-08
	5,90		0,11	2,78	
Kyselina vanilová	3,97	3,97	0,08	1,34	4,456E-08
	x	x	x	x	
Kyselina p-kumarová	3,93	3,93	0,07	1,21	4,498E-08
	3,92		0,08	1,37	
Kyselina chlorogenová	4,22	4,22	0,10	0,38	4,183E-08
	x	x	x	x	

Tabulka 67: Podmínky měření č. 43 – 100 mmol/l boritanový pufr, koncentrace látek 10 mg/l.

Teplota [°C], napětí [kV]	20, 30
Vlnová délka [nm]	220
Doba dávkování [s]	10
Tlak [mBar]	50 (~5,1 kPa)
Elektrolyt	bor. pufr pH 8
Rozpouštědlo pro vzorek	voda

Tabulka 68: Migrační charakteristiky pro podmínky měření č. 43.

Vzorek	Čas [min]	Průměr [min]	Výška [$\cdot 10^{-3}$]	Plocha [$\cdot 10^{-3}$ s]	Zd. pohyblivost [$\text{m}^2/\text{V}\cdot\text{s}$]
Kyselina syringová	3,66	3,66	14,95	269,4	4,824E-08
	3,66		14,90	268,8	
Kyselina salicylová	4,09	4,10	11,14	271,1	4,308E-08
	4,11		11,36	291,6	
Kyselina kávová	5,11	5,11	7,77	390,2	3,461E-08
	5,10		7,85	392,1	
Kys. 4-hydroxybenzoová	3,98	3,98	11,22	190,4	4,444E-08
	3,97		11,14	189,8	
Kyselina ferulová	3,63	3,63	13,15	256,5	4,867E-08
	3,63		13,10	255,2	
Kyselina gallová	5,39	5,39	6,14	483,6	3,279E-08
	5,39		6,16	484,3	
Kyselina vanilová	3,82	3,82	14,20	246,9	4,628E-08
	3,82		14,18	245,9	
Kyselina p-kumarová	3,79	3,79	11,79	196,8	4,664E-08
	3,79		11,71	195,9	
Kyselina chlorogenová	4,14	4,14	5,58	117,7	4,264E-08
	4,14		5,60	118,0	

Tabulka 69: Podmínky měření č. 44 –100 mmol/l boritanový pufr, koncentrace látek 10 mg/l.

Teplota [$^{\circ}\text{C}$], napětí [kV]	20, 30
Vlnová délka [nm]	220
Doba dávkování [s]	20
Tlak [mBar]	50 (~5,1 kPa)
Elektrolyt	bor. pufr pH 8
Rozpouštědlo pro vzorek	voda

Tabulka 70: Migrační charakteristiky pro podmínky měření č. 44.

Vzorek	Čas [min]	Průměr [min]	Výška [$\cdot 10^{-3}$]	Plocha [$\cdot 10^{-3}$ s]	Zd. pohyblivost [$m^2/V*s$]
Kyselina syringová	3,51	3,52	16,28	569,5	5,021E-08
	3,53		16,05	562,2	
Kyselina salicylová	3,80	3,85	15,46	630,9	4,586E-08
	3,90		15,53	582,8	
Kyselina kávová	4,63	4,63	11,79	892,8	3,815E-08
	4,63		11,65	917,9	
Kys. 4-hydroxybenzoová	3,68	3,68	11,87	420,6	4,803E-08
	3,68		11,64	418,3	
Kyselina ferulová	3,37	3,37	14,87	546,6	5,241E-08
	3,37		14,88	553	
Kyselina gallová	4,79	4,79	9,20	1092	3,688E-08
	4,79		9,18	1078	
Kyselina vanilová	3,51	3,51	16,30	532,6	5,039E-08
	3,51		16,03	532	
Kyselina p-kumarová	3,47	3,47	13,74	496,7	5,088E-08
	3,47		13,58	490,9	
Kyselina chlorogenová	3,75	3,75	5,80	268,9	4,713E-08
	3,75		5,68	262,9	

Tabulka 71: Podmínky měření č. 45 – 100 mmol/l boritanový pufr, koncentrace látek 10 mg/l.

Teplota [°C], napětí [kV]	20, 30
Vlnová délka [nm]	220
Doba dávkování [s]	30
Tlak [mBar]	50 (~5,1 kPa)
Elektrolyt	bor. pufr pH 8
Rozpouštědlo pro vzorek	voda

Tabulka 72: Migrační charakteristiky pro podmínky měření č. 45.

Vzorek	Čas [min]	Průměr [min]	Výška [$\cdot 10^{-3}$]	Plocha [$\cdot 10^{-3}$ s]	Zd. pohyblivost [$\text{m}^2/\text{V}\cdot\text{s}$]
Kyselina syringová	2,90	2,91	14,58	869,2	6,081E-08
	2,91		14,60	866,3	
Kyselina salicylová	3,16	3,16	15,63	959,3	5,598E-08
	3,16		15,22	938,7	
Kyselina kávová	3,72	3,72	12,83	1309	4,754E-08
	3,72		12,82	1305	
Kys. 4-hydroxybenzoová	3,09	3,09	10,80	622,6	5,725E-08
	3,08		10,70	625,4	
Kyselina ferulová	2,89	2,88	14,30	807,7	6,129E-08
	2,88		14,20	807,9	
Kyselina gallová	3,87	3,87	11,50	1544	4,565E-08
	3,87		11,54	1561	
Kyselina vanilová	2,99	2,99	14,47	790,4	5,908E-08
	2,99		14,36	790,8	
Kyselina p-kumarová	3,00	2,99	13,34	738,6	5,902E-08
	2,99		13,24	737,5	
Kyselina chlorogenová	3,19	3,18	5,27	390,6	5,549E-08
	3,18		5,25	391,2	

Tabulka 73: Podmínky měření č. 46 – 100 mmol/l boritanový pufr, koncentrace látek 0,1 mg/l – pouze směs.

Teplota [°C], napětí [kV]	20, 30
Vlnová délka [nm]	220
Doba dávkování [s]	10
Tlak [mBar]	50 (~5,1 kPa)
Elektrolyt	bor. pufr pH 8
Rozpouštědlo pro vzorek	voda či acetonitril

Tabulka 74: Podmínky měření č. 47 – 100 mmol/l boritanový pufr, koncentrace látek 0,1 mg/l – pouze směs.

Teplota [°C], napětí [kV]	20, 30
Vlnová délka [nm]	220
Doba dávkování [s]	20
Tlak [mBar]	50 (~5,1 kPa)
Elektrolyt	bor. pufr pH 8
Rozpouštědlo pro vzorek	voda či acetonitril

Tabulka 75: Podmínky měření č. 48 – 100 mmol/l boritanový pufr, koncentrace látek 0,1 mg/l – pouze směs.

Teplota [°C], napětí [kV]	20, 30
Vlnová délka [nm]	220
Doba dávkování [s]	30
Tlak [mBar]	50 (~5,1 kPa)
Elektrolyt	bor. pufr pH 8
Rozpouštědlo pro vzorek	voda či acetonitril

Tabulka 76: Podmínky měření č. 49 – 150 mmol/l boritanový pufr, koncentrace látek 0,1 mg/l, pouze směs.

Teplota [°C], napětí [kV]	20, 30
Vlnová délka [nm]	220
Doba dávkování [s]	5
Tlak [mBar]	50 (~5,1 kPa)
Elektrolyt	bor. pufr pH 8
Rozpouštědlo pro vzorek	voda či acetonitril

Tabulka 77: Podmínky měření č. 50 – 150 mmol/l boritanový pufr, koncentrace látek 0,1 mg/l – pouze směs.

Teplota [°C], napětí [kV]	20, 30
Vlnová délka [nm]	220
Doba dávkování [s]	10
Tlak [mBar]	50 (~5,1 kPa)
Elektrolyt	bor. pufr pH 8
Rozpouštědlo pro vzorek	voda či acetonitril

Tabulka 78: Podmínky měření č. 51 – 150 mmol/l boritanový pufr, koncentrace látek 0,1 mg/l – pouze směs.

Teplota [°C], napětí [kV]	20, 30
Vlnová délka [nm]	220
Doba dávkování [s]	20
Tlak [mBar]	50 (~5,1 kPa)
Elektrolyt	bor. pufr pH 8
Rozpouštědlo pro vzorek	voda či acetonitril

Tabulka 79: Podmínky měření č. 52 – 150 mmol/l boritanový pufr, koncentrace látek 0,1 mg/l – pouze směs.

Teplota [°C], napětí [kV]	20, 30
Vlnová délka [nm]	220
Doba dávkování [s]	30
Tlak [mBar]	50 (~5,1 kPa)
Elektrolyt	bor. pufr pH 8
Rozpouštědlo pro vzorek	voda či acetonitril

Tabulka 80: Podmínky měření č. 53 – 150 mmol/l boritanový pufr, koncentrace látek 0,1 mg/l – pouze směs, rozpouštědla % směsi H₂O + ACN (0 - 60%).

Teplota [°C], napětí [kV]	20, 30
Vlnová délka [nm]	220
Doba dávkování [s]	5
Tlak [mBar]	50 (~5,1 kPa)
Elektrolyt	bor. pufr pH 8
Rozpouštědlo pro vzorek	voda + acetonitril

Tabulka 81: Podmínky měření č. 54 – 150 mmol/l boritanový pufr, koncentrace látek 0,1 mg/l – pouze směs, rozpouštědla % směsi H₂O + ACN (0 - 60%).

Teplota [°C], napětí [kV]	20, 30
Vlnová délka [nm]	220
Doba dávkování [s]	30
Tlak [mBar]	50 (~5,1 kPa)
Elektrolyt	bor. pufr pH 8
Rozpouštědlo pro vzorek	voda + acetonitril

Tabulka 82: Podmínky měření č. 55 – 25 mmol/l SDS a boritanový pufr, koncentrace látek 10 mg/l – měření s micelami.

Teplota [°C], napětí [kV]	20, 30
Vlnová délka [nm]	220
Doba dávkování [s]	5
Tlak [mBar]	50 (~5,1 kPa)
Elektrolyt	bor. pufr pH 8,5 + SDS
Rozpouštědlo pro vzorek	0,01 M HCl

Tabulka 83: Migrační charakteristiky pro podmínky měření č. 55.

Vzorek	Čas [min]	Průměr [min]	Výška [$\cdot 10^{-3}$]	Plocha [$\cdot 10^{-3}$ s]	Zd. pohyblivost [$m^2/V \cdot s$]
Kyselina syringová	3,68	3,79	6,29	107,2	4,660E-08
	3,91		7,16	127,2	
Kyselina salicylová	4,07	4,06	3,90	105	4,357E-08
	4,05		3,87	101,6	
Kyselina kávová	4,39	4,33	2,15	159,4	4,078E-08
	4,27		2,19	157,8	
Kys. 4-hydroxybenzoová	4,42	4,27	2,60	110,2	4,140E-08
	4,12		3,26	90,58	
Kyselina ferulová	9,93	8,07	1,32	210,9	2,189E-08
	6,21		1,25	176	
Kyselina gallová	4,97	4,84	2,69	210	3,648E-08
	4,72		2,76	201,9	
Kyselina vanilová	7,39	7,14	2,13	240,6	2,474E-08
	6,89		2,28	235,1	
Kyselina p-kumarová	x	x	x	x	x
Kyselina chlorogenová	x	x	x	x	x

Tabulka 84: Podmínky měření č. 56 – 25 mmol/l SDS a boritanový pufr, koncentrace látek 0,1 mg/l – měření s micelami.

Teplota [°C], napětí [kV]	20, 30
Vlnová délka [nm]	220
Doba dávkování [s]	30
Tlak [mBar]	50 (~5,1 kPa)
Elektrolyt	bor. pufr pH 8,5 + SDS
Rozpouštědlo pro vzorek	0,01 M HCl

Tabulka 85: Podmínky měření č. 57 – 25 mmol/l SDS a boritanový pufr, koncentrace látek 0,1 mg/l – měření s micelami.

Teplota [°C], napětí [kV]	20, 30
Vlnová délka [nm]	220
Doba dávkování [s]	60
Tlak [mBar]	50 (~5,1 kPa)
Elektrolyt	bor. pufr pH 8,5 + SDS
Rozpouštědlo pro vzorek	0,01 M HCl

Tabulka 86: Podmínky měření č. 58 – 50 mmol/l SDS a 25 mmol/l boritanový pufr, koncentrace látek 10 mg/l – měření s micelami.

Teplota [°C], napětí [kV]	20, 30
Vlnová délka [nm]	220
Doba dávkování [s]	5
Tlak [mBar]	50 (~5,1 kPa)
Elektrolyt	bor. pufr pH 8,5 + SDS
Rozpouštědlo pro vzorek	0,01 M HCl

Tabulka 87: Podmínky měření č. 59 – 25 mmol/l SDS a 10 mmol/l fosforečnanový pufr, koncentrace látek 10 mg/l – měření s micelami.

Teplota [°C], napětí [kV]	20, -20
Vlnová délka [nm]	220
Doba dávkování [s]	5
Tlak [mBar]	50 (~5,1 kPa)
Elektrolyt	fosf. pufr pH 2 + SDS
Rozpouštědlo pro vzorek	fosforečnanový pufr pH 2

Tabulka 88: Migrační charakteristiky pro podmínky měření č. 59.

Vzorek	Čas [min]	Průměr [min]	Výška [$\cdot 10^{-3}$]	Plocha [$\cdot 10^{-3}$ s]	Zd. pohyblivost [$m^2/V \cdot s$]
Kyselina salicylová	14,68	14,73	3,52	501	-1,799E-08
	14,78		3,46	494,6	
Kyselina kávová	22,34	22,42	2,88	763,5	-1,182E-08
	22,50		2,90	820	
Kyselina ferulová	12,49	12,51	3,13	376,2	-2,118E-08
	12,53		3,01	375,1	
Kyselina p-kumarová	15,18	15,20	2,96	457,9	-1,744E-08
	15,22		2,95	454,3	
Kyselina chlorogenová	17,34	17,36	1,44	298,6	-1,527E-08
	17,37		1,37	272,7	

Tabulka 89: Podmínky měření č. 60 – 25 mmol/l SDS a 10 mmol/l fosforečnanový pufr, koncentrace látek 0,1 mg/l – měření s micelami.

Teplota [°C], napětí [kV]	20, -20
Vlnová délka [nm]	220
Doba dávkování [s]	30
Tlak [mBar]	50 (~5,1 kPa)
Elektrolyt	fosf. pufr pH 2 + SDS
Rozpouštědlo pro vzorek	fosforečnanový pufr pH 2