

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Katedra analytické chemie

On-line prekoncentrační techniky
v kapilární elektroforéze

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor: Eva Tvarůžková

Vedoucí práce: Ing. Petr Česla, Ph.D.

2009

University of Pardubice
Faculty of Chemical Technology
Department of Analytical Chemistry

**On-line preconcentration techniques
in capillary electrophoresis**

BACHELOR WORK

Author: Eva Tvarůžková

Supervisor: Ing. Petr Česla, Ph.D.

2009

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Eva TVARŮŽKOVÁ**

Studijní program: **B2802 Chemie a technická chemie**

Studijní obor: **Chemie a technická chemie**

Název tématu: **On-line prekoncentrační techniky v kapilární elektroforéze**

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

- 1) Popište principy on-line prekoncentračních technik používaných v kapilární elektroforéze.
- 2) Vyhledejte v literatuře práce týkající se aplikací on-line prekoncentračních technik pro separace přírodních látek.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucího práce.

Vedoucí bakalářské práce:

Ing. Petr Česla, Ph.D.

Katedra analytické chemie

Konzultant bakalářské práce:

doc. Ing. Jan Fischer, CSc.

Katedra analytické chemie

Ostatní konzultanti:

Ing. Václav Staněk, Ph.D.

Katedra analytické chemie

Datum zadání bakalářské práce: **23. února 2009**

Termín odevzdání bakalářské práce: **26. června 2009**


prof. Ing. Petr Lošťák, DrSc.

děkan

L.S.


prof. Ing. Karel Vytřas, DrSc.

vedoucí katedry

V Pardubicích dne 23. února 2009

Prohlašuji:

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

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

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 26.6 2009

.....

Eva Tvarůžková

Na tomto místě bych ráda chtěla poděkovat panu Ing. Petru Česlovi, Ph.D., vedoucímu bakalářské práce za čas, ochotu a odborné rady.

Ing. Václavu Staňkovi, Ph.D., za pomoc při plnění experimentální části.

Poděkování patří především mým rodičům za to, že mi umožnili studium na vysoké škole a po celou dobu studia mě podporovali. A mému příteli za podporu a trpělivost.

Souhrn

Tato bakalářská práce se zabývá kapilární elektroforézou a technikami, kterými lze zvýšit citlivost elektroforézy, tzv. prekoncentračními technikami. Důvod, proč se prekoncentrace provádějí je nízká koncentrační citlivost, která je, mimo jiné, způsobená dávkováním malého množství vzorku do kapiláry. Při zmenšení průměru kapiláry se zvětší účinnost separace, ale sníží se schopnost detekce. Při větším průměru kapiláry nastává obrácená odezva. V práci, která je psána formou rešerše, jsou uvedeny nejběžnější techniky prekoncentrací.

V experimentální části je demonstrováno použití prekoncentrační techniky nametení. Metodou micelární elektrokinetické kapilární chromatografie byl analyzován kvercetin ve vzorku čaje.

Klíčová slova:

- Kapilární elektroforéza
- On-line prekoncentrace
- Přejídné pH rozhraní
- Zakoncentrování vzorku zesílením pole
- Zakoncentrování z velkého objemu
- Nametení
- Přejídná izotachoforéza

Summary

The principles of capillary electrophoresis and techniques, which can be used to improve sensitivity of detection in electrophoresis, so called preconcentration techniques, are reviewed in this bachelor work. Preconcentration techniques are applied due to the low concentration sensitivity of the method, due to the low volume injection into the capillary. With lower inner diameter of the capillary separation efficiency increases, but sensitivity of detection decreases and vice versa. In this work, most common preconcentration techniques in capillary electrophoresis are reviewed.

In experimental part, the sweeping preconcentration technique is demonstrated by analysis of quercetin in tea sample using micellar electrokinetic chromatography.

Key Words:

- Capillary electrophoresis
- On-line preconcentration
- Dynamic pH junction
- Field amplified sample stacking
- Large volume sample stacking
- Sweeping
- Transient isotachopheresis

1.	SEZNAM ZKRATEK	8
2.	ÚVOD	9
3.	KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZA	10
	3.1.1. <i>Doprovodné jevy – elektroosmóza a elektroforetická migrace</i>	<i>10</i>
	3.1.1.1. Elektroosmóza	10
	3.1.1.2. Elektroforetická migrace	11
3.2.	KAPILÁRNÍ ZÓNOVÁ ELEKTROFORÉZA CZE.....	12
3.3.	KAPILÁRNÍ GELOVÁ ELEKTROFORÉZA CGE	13
3.4.	KAPILÁRNÍ IZOELEKTRICKÁ FOKUSACE CIEF.....	13
3.5.	KAPILÁRNÍ IZOTACHOFORÉZA CITP.....	13
3.6.	KAPILÁRNÍ ELEKTROCHROMATOGRFIE CEC	14
3.7.	MICELÁRNÍ ELEKTROKINETICKÁ KAPILÁRNÍ CHROMATOGRFIE MEKC	15
4.	ON-LINE PREKONCENTRAČNÍ TECHNIKY V KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZE	16
4.1.	ZVÝŠENÍ CITLIVOSTI	16
	4.1.1. <i>Přechodné pH rozhraní.....</i>	<i>17</i>
	4.1.2. <i>Zakoncentrování vzorku zesílením pole FASS (field amplified sample stacking).....</i>	<i>17</i>
	4.1.3. <i>Zakoncentrování vzorku z velkého objemu LVSS (Large volume sample stacking).....</i>	<i>19</i>
	4.1.3.1. Zakoncentrování s přepínáním polarity	19
	4.1.3.2. Zakoncentrování (stacking) s využitím elektrokinetického dávkování.....	19
	4.1.4. <i>Nametení (sweeping) ionizovatelných a hydrofobních analytů</i>	<i>20</i>
	4.1.5. <i>Přechodná izotachoforéza (tITP)</i>	<i>21</i>
4.2.	APLIKACE ON-LINE PREKONCENTRACÍ VZORKU V KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZE	22
5.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	24
5.1.	CHEMIKÁLIE	24
5.2.	PŘÍSTROJE.....	25
5.3.	PODMÍNKY ANALÝZY	26
5.4.	POSTUP	26
6.	VÝSLEDKY A DISKUZE	27
7.	ZÁVĚR.....	30
8.	POUŽITÁ LITERATURA	31

1. Seznam zkratk

CE	kapilární elektroforéza
CZE	kapilární zónová elektroforéza
CGE	kapilární gelová elektroforéza
CIEF	kapilární izoelektrická fokusace
CITP	kapilární izotachoforéza
CEC	kapilární elektrochromatografie
MEKC	micelární elektrokinetická kapilární chromatografie
EOF	elektroosmotický tok
FASS	zakoncentrování vzorku zesílením pole
ITP	izotachoforéza
tITP	přechodná izotachoforéza
NSM	přirozené zakoncentrování
LVSS	zakoncentrování vzorku z velkého objemu
PS	pseudostacionární fáze
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
BGE	základní elektrolyt
LOD	detekční limit
SDS	dodecylsírán sodný

2. Úvod

Kapilární elektroforéza patří mezi důležité analytické separační techniky a má několik výhod oproti jiným technikám a to např. vysokou účinnost separace, minimální požadavky na vzorek a jeho čistotu a téměř žádná nutnost používání organických rozpouštědel. Přestože je kapilární elektroforéza populární jako laboratorní technika, není příliš přijímaná v průmyslu (s výjimkou některých specifických aplikací, jako je např. analýza DNA a proteinů). Jednou z nevýhod kapilární elektroforézy je nízká citlivost fotometrických detektorů, které jsou nejvíce používány [1].

Jednou z možností zvýšení citlivosti detekce jsou on-line prekoncentrace. Jedná se o techniky, které provedou zakoncentrování přímo v kapiláře, bez vedlejších uprav vzorků, proto jsou také nejpoužívanější [1].

3. Kapilární elektroforéza

Kapilární elektroforéza patří spolu s chromatografií a hmotnostní spektroskopií k důležitým separačním procesům v analytické chemii vůbec. Mezi její hlavní výhody patří jednoduché provedení, minimální spotřeba vzorku a reagensů, možnost automatizace a široké spektrum aplikací. Nevýhodou ovšem je malá koncentrační citlivost [2]. Běžně užívaná zkratka kapilární elektroforézy je CE (z angl. capillary electrophoresis). Princip elektroforézy spočívá v migraci elektricky nabitých částic ve stejnosměrném elektrickém poli. Protože rychlost pohybu částic závisí na velikosti molekuly a náboje, různě velké a různě nabitě molekuly se budou pohybovat odlišně [3].

Kapilární elektroforézu můžeme rozdělit podle prostředí, ve kterém dochází k separaci na [4]:

- kapilární zónovou elektroforézu (CZE)
- kapilární gelovou elektroforézu (CGE)
- kapilární izoelektrickou fokusaci (CIEF)
- kapilární izotachoforézu (CITP)
- kapilární elektrochromatografii (CEC)
- micelární elektrokinetickou kapilární chromatografii (MEKC)

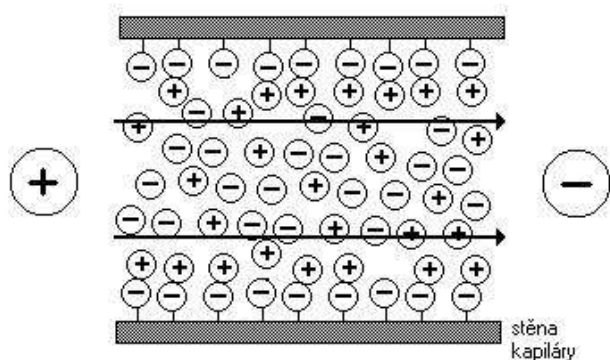
3.1.1. Doprovodné jevy – elektroosmóza a elektroforetická migrace

3.1.1.1. Elektroosmóza

Elektroosmóza neboli elektroosmotický tok (EOF Electroosmotic Flow, obr. č. 1) je jedna z hybných sil kapilární elektroforézy. Při $\text{pH} > 3$ se ionizují silanové skupiny na vnitřní straně kapiláry a tato vnitřní strana se chová, jako by měla záporný náboj. To má za následek přitahování kationtu putujících se katodě, ale vzhledem k malým rozměrům kapiláry (průměr menší než 1 mm) dochází k strhávání aniontu, které poté také putují ke katodě (tento předpoklad neplatí, pokud pohyblivost aniontu je větší, než pohyblivost elektroosmózy). Rychlost elektroosmózy je po celé délce kapiláry stejná. Díky elektroosmotickému toku, lze separovat kationty i anionty zároveň.

Elektroosmózu lze potlačit:

- pH menším než 3
- modifikací silanových skupin
- přidáním povrchové aktivních látek (tenzidů) do základního elektrolytu lze změnit směr elektroosmózy



Obr. č.1 Elektroosmotický tok kapilárou

3.1.1.2. Elektroforetická migrace

Elektroforetická migrace je druhý z transportních dějů probíhající v kapilární elektroforéze a jedná se o pohyb nabitých částic v elektrickém poli. Směr pohybu závisí na znaménku náboje a polaritě pole. Jeho rychlost závisí na velikosti náboje, intenzitě pole a odporu okolního prostředí. Pro srovnání pohyblivostí jednotlivých částic v různých systémech zavádíme tzn. elektroforetickou mobilitu (rychlost pohybu nabité látky v elektrickém poli o jednotkové intenzitě).

Velikost rychlosti daného iontu lze určit jako (vz. č. 1): [2]

$$\mathbf{v} = \mu_e \cdot \mathbf{E} = \left(\frac{q}{6\pi\eta r} \right) \cdot \mathbf{E} \quad (\text{vz. č. 1})$$

\mathbf{v} ... rychlost pohybu iontu

η ... dynamická viskozita okolního prostředí

q ... náboj iontu

\mathbf{E} ... intenzita elektrického pole

r ... poloměr iontu

μ_e ... elektroforetická mobilita

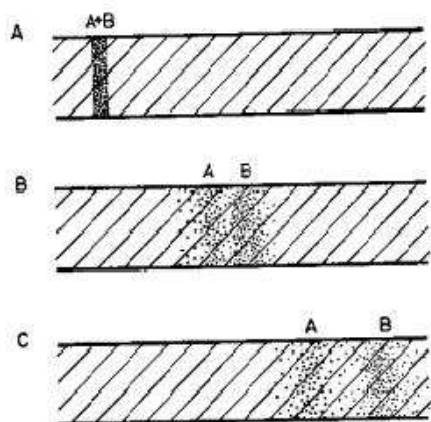
Pozorovaná rychlost separovaného vzorku je dána součtem vektorových rychlostí elektroforetické migrace a elektroosmózy.

3.2. Kapilární zónová elektroforéza CZE

Kapilární zónová elektroforéza je nejjednodušší forma kapilární elektroforézy (viz. obr. 2). Lze jí separovat pouze látky, které nesou náboj – ionty. Separace analytů je dosažena vlivem rozdílné rychlosti pohybu částic v elektrickém poli. Rychlost pohybu částic závisí na molekulové hmotnosti, tvaru a velikosti náboje [5]. Také přímo úměrně závisí na intenzitě elektrického pole a vložení potenciálu, nepřímo úměrně pak závisí na viskozitě kapaliny, kde elektroforéza probíhá. Vložené vnější elektrické pole je konstantní.

Migrace vzorku se provádí v základním elektrolytu, který vede téměř veškerý elektrický proud a jehož složení se při elektroforéze nemění, je konstantní po celé délce migrační dráhy a nemění se ani s dobou. Pro separaci je důležité, aby složky měly rozdílnou migrační rychlost. Tuto migrační rychlost můžeme ovlivnit vhodnou volbou základního elektrolytu. Před začátkem analýzy se na jeden konec kapiláry nanese vzorek a vloží se konstantní elektrické pole. Jednotlivé složky ve vzorku začnou migrovat kapilárou různými, ale konstantními rychlostmi. Čím déle elektroforéza probíhá, tím jsou separované zóny výrazněji odděleny.

Materiál kapilár je většinou křemenné sklo o vnitřním průměru 50 až 100 μm . Nejběžnějším detektorem je fotometrický (sleduje absorpci zón separovaných látek), dále používané jsou vodivostní či fluorescenční detektory [5].



obr. č. 2 Kapilární zónová elektroforéza

3.3.Kapilární gelová elektroforéza CGE

Kapilární gelová elektroforéza se liší od kapilární zónové elektroforézy tím, že je kapilára naplněná gelem a separace probíhá na základě rozdílné pohyblivosti v gelu. Pohyblivost molekuly v gelu závisí na druhu gelu, velikosti póru gelu, velikosti molekuly, náboji separované molekuly a další. Jako gely se používají například polyakrylamidové a agarosové gely aj. Gel v kapiláře brání elektroosmotickému toku, a proto (na rozdíl třeba od kapilární zónové elektroforézy) je možná pouze separace kationtů či aniontů.

Nejčastěji se kapilární gelová elektroforéza používá k separaci vysokomolekulárních biologických látek (makromolekul) jako jsou proteiny, peptidy, sacharidy nebo sestřihy RNA a DNA.

3.4.Kapilární izoelektrická fokusace CIEF

Při kapilární izoelektrické fokusaci putují složky vzorku kapilárou, ve které je vytvořen gradient pH a kde je redukován elektroosmotický tok. Díky elektrickému poli se analyty přesunují až do oblasti pH rovnému jejich isoelektrickému bodu. Zde ztrácejí náboj a tudíž i možnost pohybu. V praxi se anodický konec kapiláry zavádí do kyselého a katodický do bazického roztoku. Po rozdělení se imobilizované částice analytů vytlačí hydrodynamicky nebo po přidání chloridu sodného do jednoho z roztoků na koncích kapiláry, který naruší gradient pH, vymigrují v separovaných zónách [2].

3.5.Kapilární izotachoforéza CITP

Kapilární izotachoforéza je obdobou klasické izotachoforézy. Separují se buď jenom kationty, nebo jenom anionty. Vzorek se vnáší mezi vedoucí elektrolyt, jehož ionty mají vyšší pohyblivost, a koncový elektrolyt, jehož ionty mají nižší pohyblivost, než kterýkoliv iont v roztoku. Kromě separovaných iontů jsou vždy obsaženy i nabitě protiionty. Přítomnost těchto protiion-

tů je podmínkou pro zachování elektroneutality. Je vhodné, aby protiiony byly ve všech elektrolytech (vedoucím, separovaném a koncovém) stejné [3]. Iontové sloučeniny putují v diskrétních zónách stejnou rychlostí. Hlavní charakteristikou tohoto uskupení je tzv. samozaostřující efekt. Ten působí tak, že nedochází k disperzi, přestože sousední zóny mají společná rozhraní. Principem mechanismu je vzrůstající intenzita elektrického pole od vedoucího po koncový elektrolyt. V případě, kdy by se ion za svou zónou zpozdil, vyšší intenzita pole jej urychlí a on se vrátí zpět. Analogicky funguje případ rychlejšího iontu, který bude nižší intenzitou pole zpomalen. Izotachoforetický princip se také využívá při zakoncentrování vzorku před separací kapilární zónovou elektroforézou. Lze tak docílit až stonásobného zvýšení citlivosti [6].

3.6. Kapilární elektrochromatografie CEC

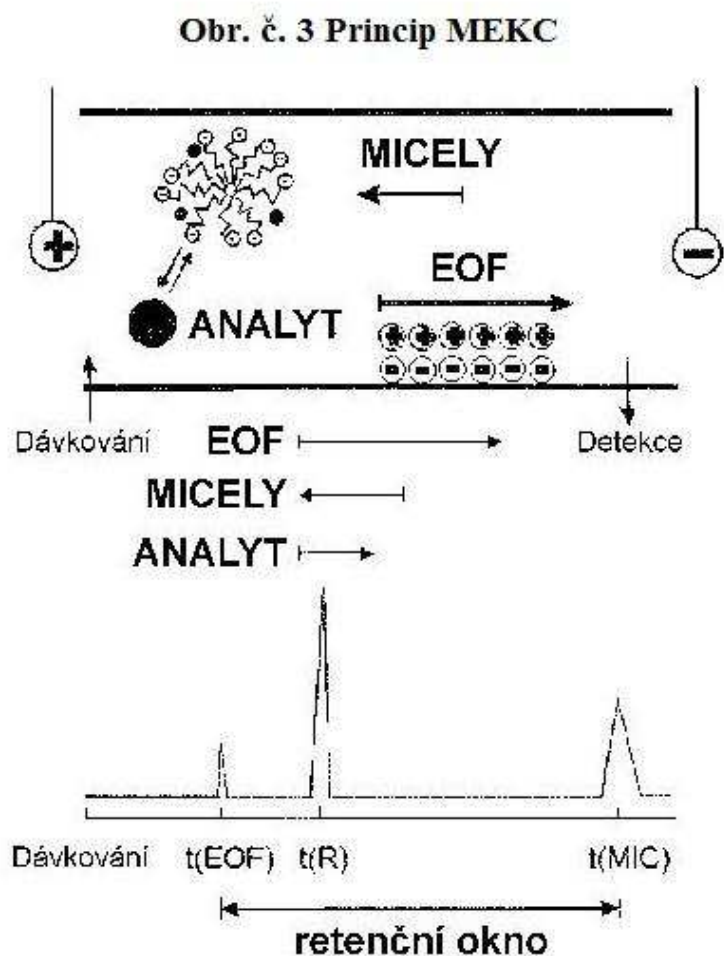
Kapilární elektrochromatografie kombinuje principy kapilární elektroforézy a vysokoúčinné kapalinové chromatografie HPLC [3]. V této technice se v kapiláře nachází stacionární fáze, která reaguje s analyty chromatografickým rozdělováním, zatímco mobilní fáze, obsahující vzorek, protéká kapilárou díky působení elektroosmózy. Elektroosmotický tok vzniká na rozhraní negativně nabitých stěn a pufru, což významně zlepšuje kinetiku rozdělovacích rovnováh a následně i separační účinnost. Tato charakteristika představuje významnou výhodu proti kapalinové chromatografii s tlakem hnanou mobilní fází [2].

Kapilární elektrochromatografie je separační technika využitelná pro neutrální, ale i nabitě látky nejrůznější chemické povahy od jednoduchých molekul po makromolekuly. Tato technika má vysokou účinnost a je použitelná i pro nepatrná množství vzorku. [3].

3.7. Micelární elektrokinetická kapilární chromatografie MEKC

Micelární elektrokinetická kapilární chromatografie (viz. obr. č.3) byla původně vyvinuta pro separaci nenabitých sloučenin, které se nedělí užitím klasické kapilární elektroforézy ve volném roztoku. Separace se provádí za použití základního elektrolytu s vysokým pH, který obsahuje relativní vysokou hladinu povrchově aktivních látek (surfaktantů). Nad určitou mezní koncentrací povrchově aktivní látky začnou spolu molekuly surfaktantů agregovat a vytvářet micely. Aktivní látky obsahují hydrofobní a hydrofilní část. Hydrofobní řetězce tvoří jádra micel, vzniká tzv. pseudostacionární fáze (PS). Tyto jádra jsou schopny rozpouštět složky vzorku.

Micely migrují k detektoru, složky vzorku se rozdělují mezi pseudostacionární a mobilní fázi. Mobilní fáze je vodný pufr. Nastává jejich retence podobně jako v HPLC. Retence se liší v důsledku rozdílných rozdělovacích koeficientů složek, což vede k jejich retenci [7,8].



4. On-line prekoncentrační techniky v kapilární elektroforéze

Důvodem, proč se on-line prekoncentrace provádějí je malá koncentrační citlivost kapilární elektroforézy. Nízká citlivost je způsobena dávkováním malého množství vzorku (jednotky až desítky nanolitů), malým vnitřním průměrem kapiláry a u spektrálních detektorů krátkou absorpční dráhou detekčního paprsku.

Způsobu, jak zvýšit citlivost detekce v kapilární elektroforéze, je poměrně mnoho. Jednou z možností je použití jiných detekčních technik (např. laserem indukovaná fluorescence, elektrochemická detekce), což je ekonomicky náročné nebo můžeme prodloužit optickou dráhu paprsku u používaných absorpčních detektorů (např. pomocí bublinkové cely). Tímto způsobem se citlivost kapilární elektroforézy zvýší 3 až 10krát. Ovšem nejpoužívanější a nejelegantnější metodou je zakoncentrování vzorku do úzkých zón prostřednictvím změn elektrického pole nebo složení základního elektrolytu přímo v kapiláře a jedná se o tzv. on-line prekoncentrace. Trendem dnešní instrumentace je provést rychlou a jednoduchou analýzu s co nejmenším počtem úprav a operací se vzorkem. On-line prekoncentrační techniky tyto požadavky splňují a díky znalostem dějů, které provázejí elektromigraci, je možno tyto techniky dále vyvíjet [9].

Mezi on-line prekoncentrační metody řadíme tyto čtyři základní techniky:

- přechodné pH rozhraní (dynamic pH junction)
- přechodná izotachoforéza (transient isotachophoresis)
- zakoncentrování (stacking)
- nametení (sweeping)

Nebo můžeme zkombinovat různé techniky prekoncentrace.

4.1. Zvýšení citlivosti

Kapilární elektroforéza je často používána pro separace analytů, které podléhají ionizačním rovnováhám (disociace, protonizace, asociace, komplexace). Rychlost migrace je pak ovlivnitelná změnou některých vlastností pracovního elektrolytu (pH, vodivost, teplota atp.). I malá změna těchto vlastností může vést ke vzniku prekoncentračního mechanismu. Neexistuje ostrá hranice mezi jednotlivými prekoncentračními mechanismy, ale zjednodušeně lze říct, že

pro on-line prekoncentraci ionizovatelných analytů lze využít mnoha principů. Tyto principy umožní dávkování většího objemu vzorku do kapiláry (omezení představuje délka kapiláry) a následné zakoncentrování nadávkovaného vzorku do velmi úzké zóny před vlastní separací [10 – 12].

V případě, že se ionizovatelné analyty obtížně separují klasickou kapilární zónovou elektroforézou nebo v případě že se jedná o látky neutrální, může být výhodné využití přídavku micelotvorných látek do základního elektrolytu (micelární elektrokinetická chromatografie MEKC), které i v případě nabitých analytů může poskytnout zajímavé ovlivnění selektivity. [13 – 18].

4.1.1. Přechodné pH rozhraní

Jedná se o metodu založenou na rozdílu ionizace, respektive mobility, analytů ve vícesegmentovém systému elektrolytu. Obecně má matrice vzorku nastavenou nižší hodnotu pH, než je pK_a analytu. Naopak základní elektrolyt má hodnotu pH vyšší než pK_a analytu. V běžném uspořádání je kapilára naplněna základním elektrolytem, následuje nadávkování delší než obvyklé zóny vzorku. Po aplikaci napětí vstupuje matrice vzorku do oblasti základního elektrolytu, kde na hranici dochází k tvorbě přechodného pH gradientu, který zvýšením pH okolí k pK_a uděluje molekulám analytu náboj a tím zvyšuje jejich mobilitu. Během urychlení je analyt soustředěn do úzké zóny. Pomocí této metody lze prekoncentrovat slabé iontové látky. Pro neutrální nebo silně kyselé sloučeniny, jejichž mobilita nezávisí na pH pufru, však použitelná není [19].

4.1.2. Zakoncentrování vzorku zesílením pole FASS (field amplified sample stacking)

Zakoncentrování vzorku zesílením pole je jednou z velmi často používaných technik prekoncentrace. Princip zakoncentrování vzorku zesílením pole spočívá ve vzájemném působení elektrického pole, které vzniká při vkládání napětí mezi konce kapiláry a pole koncentračního. Koncentrační pole je vytvářeno díky různé vodivosti (koncentraci) pracovního elektrolytu a nadávkované zóny vzorku [20 – 23].

Jednou z možností, jak zvýšit citlivost detekce, je využít rozpuštění vzorku pro analýzu v desetkrát zředěném pracovním elektrolytu nebo ve vodě. Po vložení stejnosměrného elektrického pole dojde díky rozdílné vodivosti zón pracovního elektrolytu a zóny vzorku (zóna vzorku má nižší vodivost) k zakoncentrování dávkované zóny. V obou zónách je pak jiná hodnota intenzity elektrického pole (v zóně vzorku je vyšší). Díky tomuto je rozdílná rychlost migrace analytů v obou zónách (analyty v zóně vzorku migrují rychleji). Na rozhraní obou zón tak dojde k zakoncentrování analytů vlivem zpomalení rychlosti migrace. Separace pak probíhá klasickým mechanismem kapilární zónové elektroforézy (CZE), ale s užší počáteční zónou vzorku.

FASS můžeme také uskutečňovat pomocí současné změny pH a vodivostí zón vzorku a pracovního elektrolytu. Pokud to povaha analytů umožňuje, lze vzorek okyselit potřebným přídatkem kyselin anebo naopak zalkalizovat pomocí hydroxidu. Změna pH ovlivní ionizační rovnováhy analytů. Na hodnotě pH je silně závislá efektivní mobilita analytů, což vede k vytvoření podmínek pro odlišnou rychlost migrace analytu v nadávkované zóně vzorku a v zóně pracovního elektrolytu. Tento způsob prekoncentrace je využíván pro analýzy látek s rozdílným acidobazickým chováním. Touto technikou je dosaženo deseti až tisícinásobného zesílení signálu analytu, tzn. že metodou kapilární zónové elektroforézy můžeme vstoupit do oblasti separace a kvantifikace velmi nízkých koncentrací analytu (10^{-7} až 10^{-8} mol \cdot l $^{-1}$) za použití běžného UV-VIS detektoru [24 – 27].

Tento jednoduchý přístup umožňuje nadávkování pouze optimální nástřikové délky (tj. max. 2 % délky kapiláry), protože v opačném případě dojde ke ztrátě separační účinnosti. Tento způsob je nejjednodušší a je označován jako přirozené zakoncentrování NSM [28 – 30].

Mezi techniky, používající změny ve vodivostech zón dávkovaného vzorku patří i metoda, kdy se vzorek rozpustí ve 30% vodném roztoku acetonitrilu s přídatkem anorganické soli o vysokých koncentracích. Toto se dá dobře uplatnit při analýzách biologických vzorku, které už obsahují potřebnou koncentraci chloridu sodného [30 – 35].

4.1.3. Zakoncentrování vzorku z velkého objemu LVSS (Large volume sample stacking)

Pokud je nadávkované množství vzorku větší než je optimální nástřiková délka v NSM, je nutné, aby matrice vzorku naopak migrovala ven z kapiláry nástřikovým koncem. Tento způsob je označován jako zakoncentrování vzorku z velkého objemu (large volume sample stacking, LVSS). Pumpování matrice ven z kapiláry při dávkování může být zajištěno buď pomocí elektroosmotického toku nebo použitím externího tlaku. Směr toku matrice musí být opačný než migrace dávkovaných analytů a velikost obráceného toku musí být menší než je rychlost migrace dávkovaných analytů. Nevýhodou tohoto způsobu prekoncentrace je možnost separovat buď jenom kationty nebo jenom anionty během jedné analýzy [36].

4.1.3.1. Zakoncentrování s přepínáním polarity

Rozpustí se vzorek v základním elektrolytu nebo rozpouštědle tak, aby měl nízkou vodivost. Dávkování je hydrodynamické a mnohem delší než v případě NSM. Po nástřiku dlouhé zóny vzorku do kapiláry nastává fáze přepólování polarity zdroje na opačnou polaritu, než jaká bude použita pro vlastní separaci. Tím dochází k migraci matrice ven z kapiláry a analyty se zakoncentrují ve formě úzké zóny na počátku kapiláry. To znamená, že polarita pro odstranění matrice při zakoncentrování je volena podle znaménka náboje separovaných analytů. Do pracovního elektrolytu se přidává většinou aditivum, které obrací směr elektroosmotického toku (např. kationtový tenzid) [36].

4.1.3.2. Zakoncentrování (stacking) s využitím elektrokinetického dávkování

Vzorek je rovněž připraven tak, aby měl nízkou vodivost. Následně je proveden elektrokinetický nástřik, který zajišťuje selektivní dávkování buď jenom kationtů, nebo jenom aniontů. Pokud je elektroosmotický tok v opačném směru oproti migraci nástřikovaných iontů, je nutné, aby rychlost elektroosmotického toku byla menší než rychlost migrace dávkovaných analytů. Zakoncentrování (stacking) při elektrokinetickém dávkování poskytuje větší navýšení citlivosti detekce, než nabízí hydrodynamický nástřik. To je vysvětleno skutečností, že u hydrodynamického nástřiku je velikost nástřiku limitována délkou kapiláry. V případě elektrokinetického dávkování tomu tak není, protože analyty migrují do kapiláry nezávisle na délce kapiláry [37]

4.1.4. *Nametení (sweeping) ionizovatelných a hydrofobních analytů*

Při technice nametení (sweepingu) se používá přídavku micelotvorných látek do základního elektrolytu, který je umístěn v elektrolytové nádobce na dávkovací straně kapiláry. Samotná kapilára, druhá elektrolytová nádobka a ani vzorek neobsahují použité micelotvorné činidlo. Analyty mají silnou afinitu pro speciální typy aditiv, zahrnující iontové nebo neiontové micely, cyklodextriny apod. [38 – 41], tzn., že podle druhu přidaného aditiva do základního elektrolytu výrazně ovlivníme selektivitu separace. Nametení patří mezi způsoby, které zlepšují citlivost, ale podstata techniky vychází z interakcí analytu a micel (rozdělovací rovnováhy) podobně, jako je tomu v micelární elektrokinetické chromatografii [42].

Princip spočívá ve využití interakcí mezi analytem (ion, neutrální molekula) a tzv. pseudostacionární fází (PS), kterou bývá některý z uvedených aditiv. Pseudostacionární fáze proniká do široké zóny vzorku a na tomto rozhraní dochází k nakoncentrovávání (nametení) vzorku. Rozsah prekoncentrace je určován součtem všech interakcí mezi analytem a PS fází. Systém umožňuje efektivní odstranění matricových nečistot. Tato technika poskytuje nízký detekční limit (10^{-9} mol · l⁻¹).

Jednoduchá nebo složitá aditiva mohou být použita pod podmínkou, že kinetika interakce je rychlejší než kinetika elektroforetické relaxace, a výsledkem je zakoncentrování v úzkém pásu. Všeobecně se používají aniontové tenzidy (dodecylsírán sodný – SDS) k zakoncentrování neutrálních nebo kationtových analytů. Pro separaci některých aniontových analytů se za alkalických podmínek ke zlepšení nametení používají kationtové nebo neiontové tenzidy. Pouze nabitě analyty mohou být separovány pomocí neutrální PS fáze [43].

Je možné využívat i kombinace dvou prekoncentračních mechanismů. Typickým příkladem je využití dynamického rozdílu v hodnotách pH elektrolytů (dynamic pH junction – sweeping). Tato metoda je založena na využití podmínek nametení (základní elektrolyt s PS fází, vzorek bez PS fáze) a podmínky přechodného pH rozhraní (rozdílné pH vzorku a pufru) [44 – 47].

4.1.5. Přechodná izotachoforéza (tITP)

Další metodu vhodnou k prekoncentraci iontových sloučenin představuje tzv. přechodná izotachoforéza. Tato technika využívá izotachoforetický efekt, který lze odvodit z Kohlrauschovy regulační funkce. Při tomto jevu dochází k rozdělování složek vzorku umístěného mezi tzv. vedoucí elektrolyt (leading, LE), který obsahuje pomocný ion, nebo-li ko-ion, s nejvyšší mobilitou v systému, a koncový elektrolyt (terminating, TE) s ko-ionem o nejnižší mobilitě. Důležitou charakteristikou této separace zůstává samozaostřovací schopnost zón (bylo popsáno v kapitole 2.5). Protože celkový hnací proud musí být ve všech zónách stejný, dochází k přizpůsobení koncentrací v jednotlivých zónách vzhledem ke koncentraci vedoucího elektrolytu. Vhodnou kombinací dvou a více pracovních elektrolytů v jedné kapiláře docílíme přechodné izotachoforézy. Tento jev je možno využít k prekoncentraci celé řady analytů [48].

Nejčastěji jsou při tITP-CE analýze používány dva různé přístupy.

- a) Jestliže je základní elektrolyt zvolen tak, že ko-ion má vyšší efektivní mobilitu než analyty, ITP migrace je dosažena pomocí vhodného koncového elektrolytu (může být použit místo základního elektrolytu anebo ho lze dávkovat jako zónu) za zónou vzorku. Ko-ion v tomto případě přebírá úlohu vedoucího elektrolytu. Vzorek je nadávkován hydrodynamicky a po vložení elektrického pole dojde k vytvoření přechodného ITP stavu. Po zakoncentrování je koncový elektrolyt vyměněn za základní elektrolyt a nastává separace pomocí CZE.
- b) Jestliže základní elektrolyt obsahuje ko-ion s nižší efektivní mobilitou než analyt, musí samotný vzorek být obohacen o vedoucí ion (např. pro separaci kationtů je možno použít K^+ , NH_4^+ , Na^+) k dosažení tITP. Ko-ion se pak chová jako koncový ion. To může být výhodou pro biologické vzorky, které často přirozeně obsahují dostatečné množství iontů s vysokou mobilitou pro uskutečnění ITP prekoncentrace. Alternativou je přidavek takovýchto solí do samotného vzorku.

Je možno oba mechanismy kombinovat [49].

Navzdory faktu, že s touto metodou lze prekoncentrovat širokou paletu analytů, není podobně jako Dynamic pH Junction využitelná pro neutrální látky [48].

4.2. Aplikace on-line prekoncentrací vzorku v kapilární elektroforéze

Aplikace kapilární elektroforézy a použití on-line prekoncentrací má široké uplatnění a podle významu můžeme rozlišovat několik kategorií:

- Životní prostředí – např. analýza půdních vzorků a vzorky vod. Zjišťuje se například koncentrace Al v půdních vzorcích, přítomnost komplexu těžkých kovů (hlavně komplexy Cu, Co, Zn, Mn a Pb), dále kationty těchto kovů, aromatické aminy. Ve vzorcích vody arsen, selen a jejich sloučeniny a další.
- Analýza potravin – stanovení nutričních hodnot, zjišťování přítomnosti a množství nutričních složek v potravinách, analýza aminokyselin v nápojích atd.
- Farmaceutické aplikace – kontrola kvality léčiv, zjišťování množství požadované látky, ověřování nepřítomnosti kontaminantů, stanovení přítomnosti požadované bioaktivní složky v lidských nebo zvířecích vzorcích a podobně.
- Toxikologické vzorky – do jisté míry souvisí s předchozí kategorií. Hledá a určuje vyšší analytů v lidských vzorcích, dále psychotropní drogy, toxické látky a nebo jejich deriváty.
- Biologické aplikace – buď základní biologický výzkum nebo klinický výzkum aplikované technologie.

Použitím on-line prekoncentračních technik v kapilární elektroforéze lze dosáhnout výrazného snížení limitů detekce. Techniky on-line prekoncentrace se využívají nejčastěji při stanoveních stopových množství cílových analytů.

Tabulka 1 popisuje nejvýznamnější aplikace on-line prekoncentračních technik v kapilární elektroforéze vybrané z výše uvedených kategorií. Několik příkladu z každé kategorie je vždy uvedeno v tabulce.

Tabulka 1

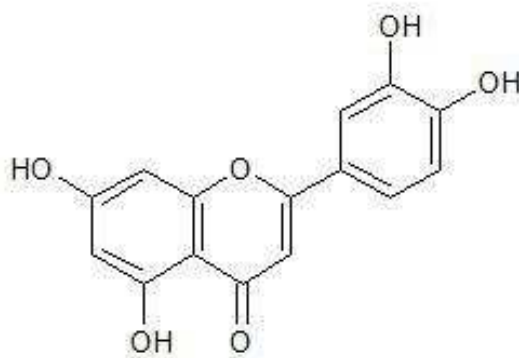
Zjišťovaná látka	Druh vzorku	Způsob separace	Limit detekce	Aplikace	Ref.
2,5-Dimethoxy-4-ethylthiofenylamin	vzorek myší moči	CZE – MEKC	4,5 až 5,0 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$	biologie	[50]
DNA	virus hepatitidy typu B	CZE – tITP	0,0021 $\text{pg} \cdot \mu\text{l}^{-1}$	biologie	[51]
Sloučeniny arsenu (3-nitro-4-hydroxyphenylarsonic acid)	zvířecí krmivo	CE – přechodné pH rozhraní	LOD snížena 100 až 800násobně	ochrana životního prostředí	[52]
Hliník (ionty Al^{3+})	vzorky půd	CE – FASS	koncentrace minimálního detekovaného hliníku může být zvýšena 12krát	ochrana životního prostředí	[53]
trifosforečnan sodný	vzorky jídla	CZE – tITP	0 až 80 $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ P_2O_5	analýza potravin	[54]
Riboflavin (vit. B2)	pivo	MEKC – stacking	20 $\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1}$	analýzy potravin	[55]
flavonoidy (hyperosid, isokvercetin, kvercetin a rutin)	methanolické extrakty (listů a květu) <i>Hypericum perforatum</i>	CZE – tITP	100 $\text{ng} \cdot \text{l}^{-1}$	farmacie	[56]
Opiáty	lidská moč	CE – FASS	> 1000násobku citlivosti příslušenství	toxikologie	[57]
Amfetaminy a jejich deriváty	vlasý	CE – FASS	< 0,06 $\mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$	toxikologie	[58]

5. Experimentální část

Metodou micelární elektrokinetické kapilární chromatografie byla zjišťována přítomnost kvercetinu ve vzorku zeleného čaje. Protože koncentrace kvercetinu v čaji je nízká, byla použita on-line prekoncentrační technika nametení (viz. v kapitole 3.1.4). Jako micelární činidlo bylo použito SDS.

5.1. Chemikálie

- $C_{15}H_{10}O_7 \cdot 2 H_2O$ (kvercetin hydrát, viz. obr. č. 4), čistota ~ 99 % (pro HPLC), Fluka, Buchs, Švýcarsko
- NaCl, obsah min. 99 %, Lachema, Brno, Česká republika
- H_3BO_3 , čistota $\geq 99,5$ %, Fluka, Buchs, Švýcarsko
- $Na_2B_4O_7 \cdot 10 H_2O$, čistota $\geq 99,5$ %, Fluka, Buchs, Švýcarsko
- $C_{12}H_{25}NaSO_4$ (dodecylsírán sodný SDS), čistota $\geq 99,5$ %, Fluka, Buchs, Švýcarsko
- NaOH, c = 1 M, Lachema, Brno, Česká republika



Obr. č. 4 Kvercetin

5.2. Přístroje

- pH metr (viz. obr. č. 5, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)
- centrifuga (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- kapilární elektroforetický přístroj CAPEL – 105M (LUMEX, St. Peterburg, Rusko)



Obr. č. 5 pH metr

Vybavení elektroforetického přístroje CAPEL – 105M (viz. obr. č. 6):

- a) zdroj vysokého napětí (záporný zdroj)
- b) autosampler pro automatickou výměnu vzorkovnic
- c) spektrofotometrický detektor
- d) dvě platinové elektrody
- e) nástřikový systém
- f) výměnná kazeta pro kapiláru
- g) kapilární termostabilní přístroj
- h) počítač s ovládacím vyhodnocovacím systémem ELFORUN



Obr. č. 6 Kapilární elektroforetický systém

5.3. Podmínky analýzy

Pufry:

Pracovala jsem v prostředí 25 mM roztoku boritanového pufru.

Kapilára:

K analýze byla použita křemenná kapilára o délce 58 cm a vnitřním průměru 75 μm , efektivní délka kapiláry byla 50 cm. Před prvním použitím bylo nutné kapiláru 10 min. promýt 1 M roztokem NaOH, 10 min. vodou a 10 min. pufrům s SDS. Před každým měřením se kapilára proplachovala 1 min. pufrům s SDS.

Analýza probíhala při teplotě 25°C a napětí 20 kV. Vzorek i standard byly dávkovány pod stejným tlakem a to 30 mBar.

5.4. Postup

Nejprve bylo připraveno 25 mM roztok boritanového pufru o pH 9,07. Tento pufr vznikl smícháním 25 mM roztoku H_3BO_3 a 25 mM roztoku $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$. Dále byl připraven 35 mM roztok SDS v boritanovém pufru a 35 mM roztok NaCl v boritanovém pufru. Jako standart byl použit kvercetin o koncentraci 50 $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$, který před samotným měřením byl naředěn 20krát.

Byl připraven vzorek zeleného čaje, který po důkladném vyluhování a vychladnutí byl přefiltrován přes 0,45 μm filtr na injekční stříkačku (Millipore, Billerica, MA, USA).

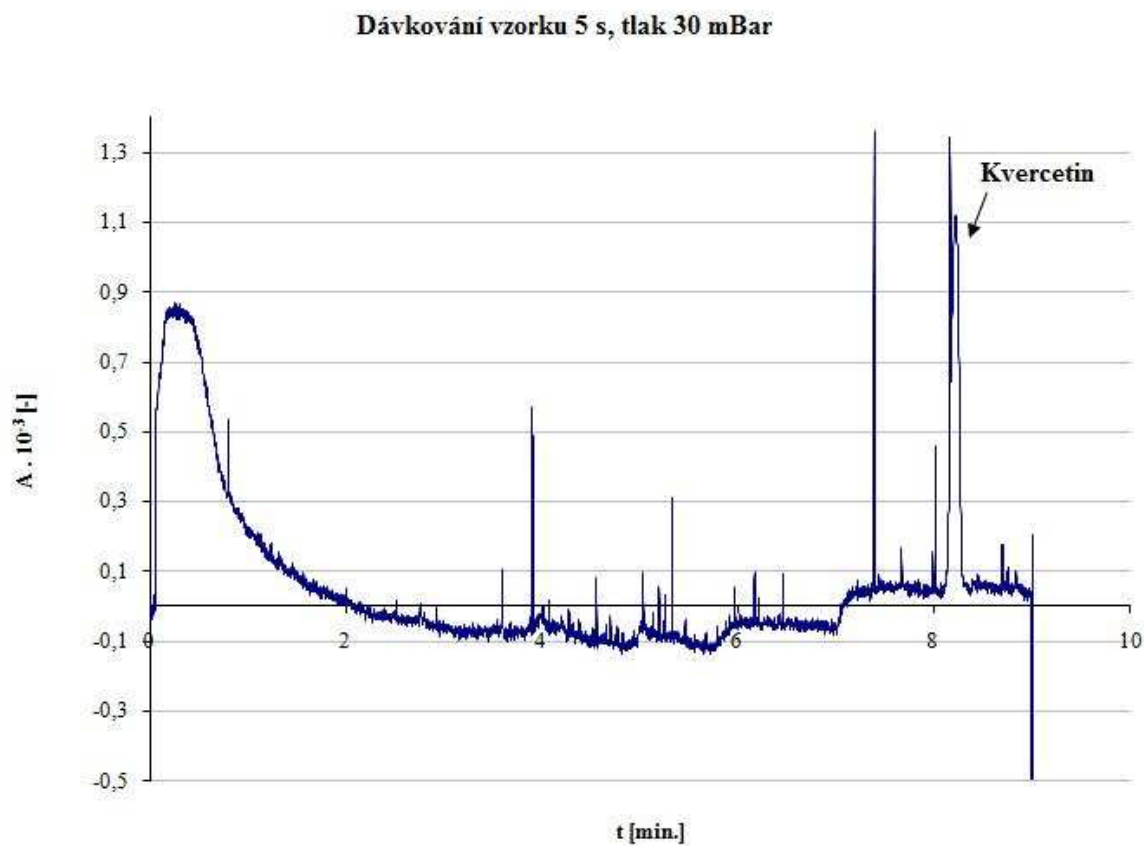
Vzorek byl analyzován stejnou metodou jako standard za předem zvolených optimálních podmínek.

6. Výsledky a diskuze

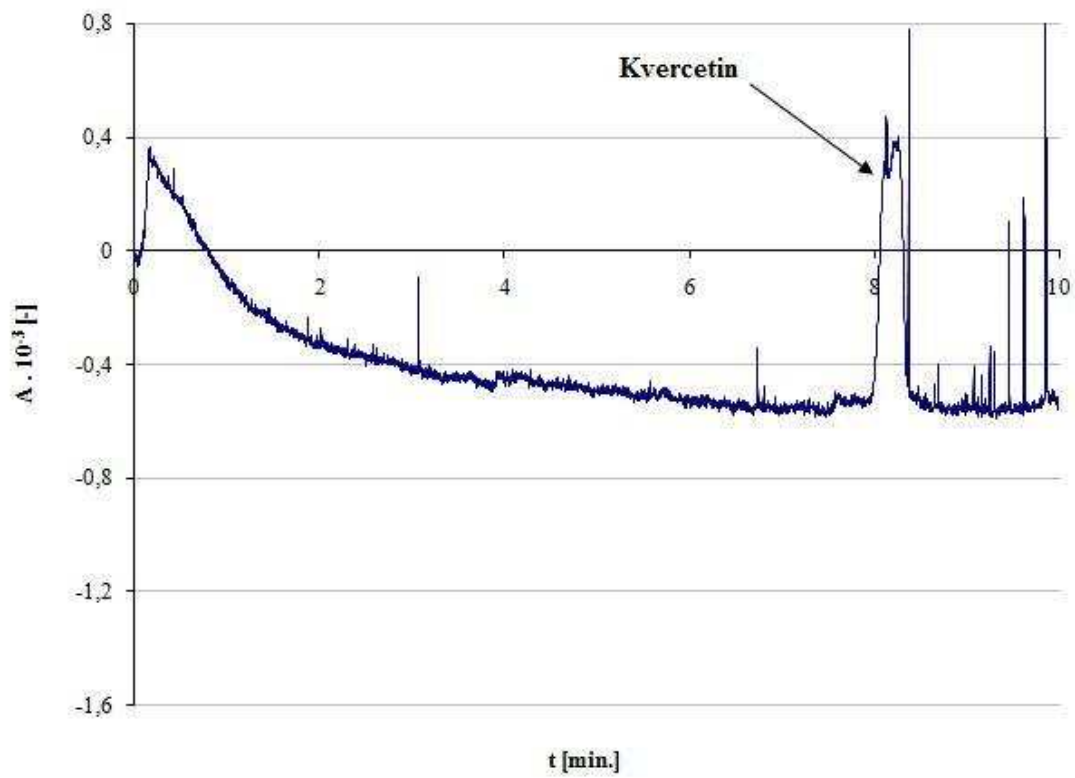
Pro demonstraci on-line prekoncentrace kapilární elektroforézou byla zvolena analýza kvercetinu ve vzorku zeleného čaje [59]. Metoda byla upravena pro podmínky techniky nametení. Vzorek kvercetinu byl naředěn do základního elektrolytu bez SDS s přidavkem NaCl pro zachování stejné iontové síly.

Vzorek zeleného čaje byl pro identifikaci porovnán se standardem kvercetinu.

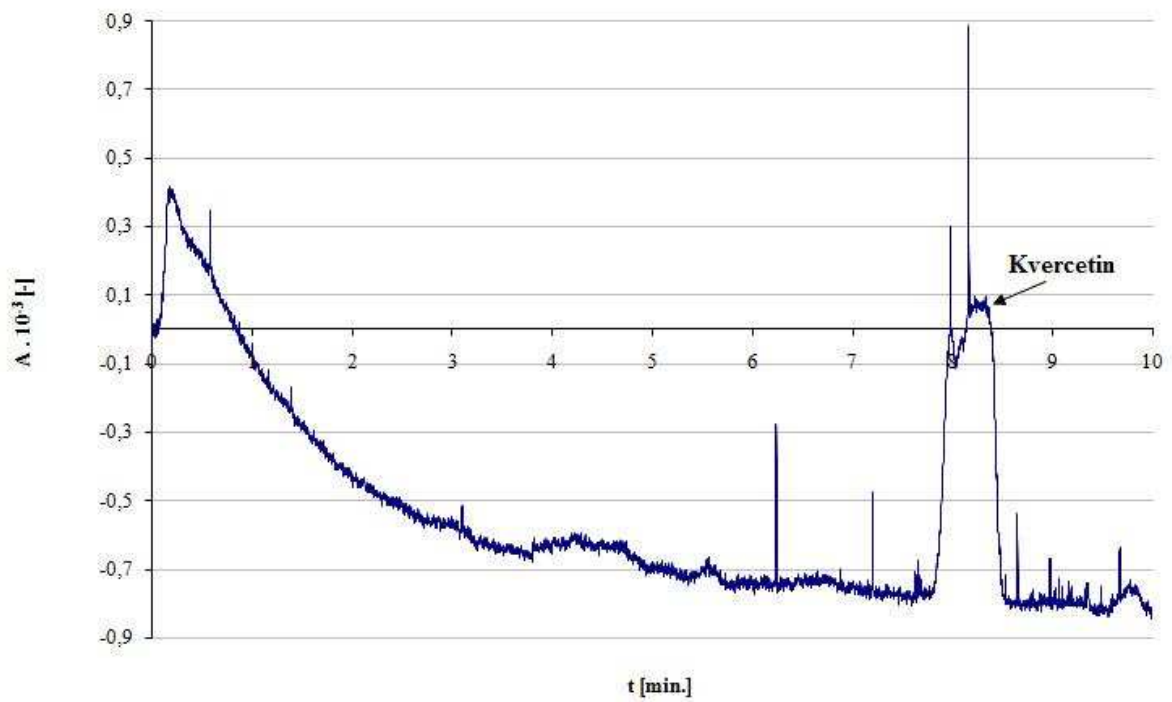
Se standardem kvercetinu byla zjišťována optimální doba dávkování. Byly proměřeny doby dávkování standartního roztoku kvercetinu pro 5, 15 a 30 s a po srovnání grafických závislostí vyplývá (viz. grafy), že optimální doba dávkování, kdy pík není ještě příliš široký, se nachází mezi 5 a 15 s, proto byla zvolena hodnota 10 s, při tlaku 30 mBar. Za těchto podmínek byl také proměřen samotný vzorek zeleného čaje.



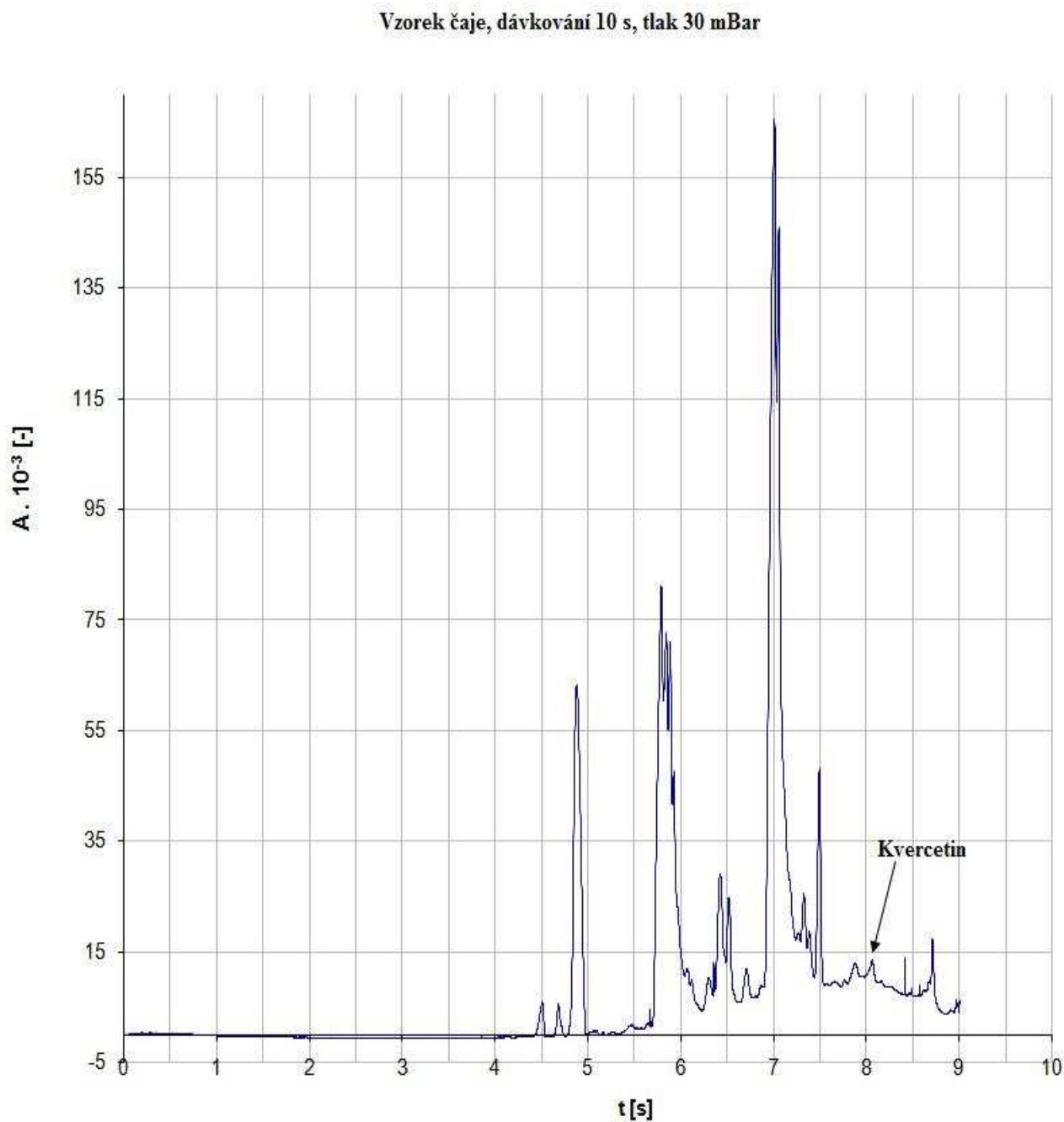
Dávkování vzorku 5 s, tlak 30 mBar



Dávkování 30 s, tlak 30 mBar



Pro proměření vzorku čaje za předem zvolených podmínek byl ve vzorku identifikován kvercetin na základě porovnání polohy píku se standardem. Pro identifikaci zbylých látek, které se v čaji nacházejí, a které se projevují vznikem píků, by bylo nutno použít jiných, např. spektrálních, metod.



7. Závěr

V předložené bakalářské práci byly formou literární rešerše zpracovány nejběžnější techniky on-line prekoncentrace v kapilární elektroforéze. Jedná se o techniky, které zvyšují citlivost detekce v kapilární elektroforéze a umožňují aplikace této metody pro analýzy velmi nízkých až stopových množství stanovovaných látek. V textu jsou popsány a shrnuty základy kapilárních elektroforetických metod, dále principy nejběžněji používaných on-line prekoncentračních technik a je zde uveden také přehled nejčastějších aplikací těchto technik.

V experimentální části na základě vybrané prekoncentrační metody nametení byl analyzován vzorek čaje a identifikován kvercetin na základě srovnání polohy píku vzorku a standardu.

8. Použitá literatura

- [1] Simpson S.J., Quirino J.P., Terabe S., *J. Chromatogr. A* 1184, 504 (2008).
- [2] Řemínek R., Diplomová práce, Masarykova univerzita (2008).
- [3] Klouda P., *Moderní analytické procesy* (2003).
- [4] <http://cs.wikipedia.org/wiki/Elektroforéza>, 24.6 2009.
- [5] Opekar F., Jelínek I., Rychlovský R., Plzák Z., *Základní analytická chemie* (2005).
- [6] Tagliaro F., Manetto G., Crivellente F., Smith F.P., *Forensic Science International* 92, 75 (1998).
- [7] Terabe S., Otsuka K., Ichikawa K., Tsuchiya A., Ando T., *Anal. Chem.* – Electrokinetic separations with micellar solutions and open-tubular capillaries, 56, 111 (1984).
- [8] Terabe S., Otsuka K., Ichikawa K., Tsuchiya A., Ando T., *Anal. Chem.* – Electrokinetic separations with micellar solutions and open-tubular capillaries, 57, 843 – 841 (1985).
- [9] Li S. F. Y., *Capillary electrophoresis – principles, practice and applications*, Elsevier, (1994).
- [10] Quirino J. P., Terabe S., *J. Chromatogr., A* 902, 119 (2000).
- [11] Chien R. L., Burgi D. S., *Anal. Chem.* 64, 1046 (1992).
- [12] Shihabi Z. K.: *J. Chromatogr., A* 902, 107 (2000).
- [13] Britz-McKibbin P., Terabe S., *J. Chromatogr., A* 1000, 917 (2003).
- [14] Wienberg R., Sapp E., Moring S., *J. Chromatogr.* 516, 271 (1990).
- [15] Szucz R., Vindevogel J., Sandra P., Verhegen L. C., *Chromatographia* 36, 323 (1993).
- [16] Farran A., Ruiz S., Serra C., Aguilar M.: *J. Chromatogr., A* 737, 109 (1996).
- [17] Wu H., Guan F., Luo Y., Sepu (*Chinese J. Chromatogr.*) 13, 390 (1995).
- [18] Zhang C.-X., Thormann W., *Anal. Chem.* 70, 540 (1998).
- [19] J.B. Kim, P. Britz-McKibbin, T. Hirokawa, S. Terabe, *Analytical Chemistry* 75, 3986 (2003).
- [20] Burgi D. S., Chien R. L., *Anal. Chem.* 63, 2866 (1991).
- [21] Chien R. L., Helmer J. C., *Anal. Chem.* 63, 1354 (1991).
- [22] Galli V., Barbas C., *Anal. Chim. Acta* 482, 37 (2003).

- [23] Lohg Y. H., Hernandez M., Kaale E., Van Schepdael A., Roets E., Borrull F., Calull M., Hoogmartens J., *J. Chromatogr.*, B 784, 255 (2003).
- [24] Galli V., Barbas C., *Anal. Chim. Acta* 482, 37 (2003).
- [25] Lohg Y. H., Hernandez M., Kaale E., Van Schepdael A., Roets E., Borrull F., Calull M., Hoogmartens J., *J. Chromatogr.*, B 784, 255 (2003).
- [26] Wey B. A., Zhang C. X., Thormann W., *J. Chromatogr.*, A 853, 95 (1999).
- [27] Sentellas S., Moyano E., Puignou L., Galceran M.T., *J. Chromatogr.*, A 1032, 193 (2004).
- [28] Quirino J. P., Terabe S., *J. Chromatogr.*, A 781, 119 (1997).
- [29] Burgi D. S., Chien R. L., *J. Microcol. Sep.* 3, 199 (1991).
- [30] Chien R. L., Burgi D. S., *Anal. Chem.* 71, 995 (1999).
- [31] Shihabi Z. K., *J. Cap. Electrophor.* 2, 267 (1995).
- [32] Shihabi Z. K., *J. Chromatogr.*, A 744, 231 (1996).
- [33] Friedberg M. A., Hindshale M., Shihabi Z. K., *J. Chromatogr.*, A 781, 35 (1997).
- [34] Friedberg M. A., Hindshale M., Shihabi Z. K., *J. Chromatogr.*, A 781, 491 (1997).
- [35] Shihabi Z. K.: *J. Chromatogr.*, A 817, 25 (1998).
- [36] Albert M., Debusschere L., Demesmay C., Rocca J. L., *J. Chromatogr.*, A 757, 281 (1997).
- [37] Zhang C.-X., Thormann W., *Anal. Chem.* 68, 2523 (1996).
- [38] Quirino J. P., Terabe S., *Anal. Chem.* 71, 1638 (1999).
- [39] Palmer J., Munro N. J., Landers J. P., *Anal. Chem.* 71, 1679 (1999).
- [40] Kim J. B., Quirino J. P., Otsuka K., Terabe S., *J. Chromatogr.*, A 916, 123 (2001).
- [41] Quirino J. P., Terabe S., Otsuka K., Vincent J. B., Vigh G., *J. Chromatogr.*, A 838, 3 (1999).
- [42] Quirino J. P., Terabe S., *Science* 282, 465 (1998).
- [43] Quirino J. P., Kim J.-B., Terabe S., *J. Chromatogr.*, A 965, 357 (2002).
- [44] Britz-McKibbin P., Ichihashi T., Tsuboty K., Chen D. D. Y., Terabe S., *J. Chromatogr.*, A 1013, 65 (2003).
- [45] Britz-McKibbin P., Terabe S., *J. Chromatogr.*, A 1000, 917 (2003).
- [46] Britz-McKibbin P., Otsuka K., Terabe S., *Anal. Chem.* 74, 3736 (2002).

- [47] Britz-McKibbin P., Ichihashi T., Tsubota K., Chen D. D. Y., Terabe S., *J. Chromatogr., A* 1013, 65 (2003).
- [48] Horáková J., Maier V., Ševčík J., *Chemické Listy* 100, 163 (2006).
- [49] Foret F., Szoko E., Karger B. L., *J. Chromatogr., A* 608, 3 (1992).
- [50] Chiu Y.C., Chou S.H., Liu J.T., Lin C.H., *J. Chromatogr. B* 811, 127 (2004).
- [51] Liu D.Y., Shi M., Huang H.Q., Long Z.C., Zhou X.M., Qin J.H., Lin B.C., *J. Chromatogr. B* 844, 32 (2006).
- [52] Jaafar J., Irwan Z., Ahamad R., Terabe S., Ikegami T., Tanaka N., *J. Sep. Sci.* 30, 391 (2007).
- [53] Ham Y.S., Okazaki M., Suzuki S., Nakagawa N., *Soil Sci. Plant Nutr.* 49, 9 (2003).
- [54] Jastrzebska A., *Talanta* 69, 1018 (2006).
- [55] Su A.K., Lin C.H., *J. Chromatogr. B* 785, 39 (2003).
- [56] M. Urbánek, L. Blechtová, M. Pospíšilová, M. Polásek, *J. Chromatogr. A* 958, 261 (2002).
- [57] Wey A.B., Thormann W., *J. Chromatogr. A* 924, 507 (2001).
- [58] Meng P.J., *Chin. J. Anal. Chem.* 34, 1137 (2006).
- [59] Pářišová P., *Diplomová práce, Univerzita Pardubice* (2008).