

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Využití komplexačních rovnováh při elektromigračních separacích přírodních  
látek

Ing. Jana Váňová

Disertační práce

2017

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 11. 10. 2017

Jana Váňová

## Poděkování:

Ráda bych touto cestou vyjádřila poděkování doc. Ing. Petru Česlovi, Ph.D. za neocenitelnou pomoc, odborné vedení, cenné rady a připomínky, které vedly ke vzniku této disertační práce. Mé díky patří také doc. Ing. Janu Fischerovi, CSc. a Dr. Susanne Wiedmer, Ph.D. Dále bych chtěla poděkovat své rodině, která mě podporovala po celou dobu studia.

## ANOTACE

Disertační práce shrnuje výsledky výzkumů týkajících se možností stanovení kritické micelární koncentrace tenzidů pomocí kapilární elektroforézy, možnosti využití liposomální elektrokinetické chromatografie a micelární elektrokinetické chromatografie pro stanovení rozdělovacích koeficientů studovaných přírodních antioxidantů, využití micelární elektrokinetické chromatografie a kapilární elektroforézy s UV/Vis nebo hmotnostní detekcí pro analýzu přírodních antioxidantů a oligosacharidů a možností spojení kapalinové chromatografie a micelární elektrokinetické chromatografie v dvoudimenzionálním separačním systému. Disertační práce je psána formou komentářů k publikovaným i doposud ještě nepublikovaným pracím.

## KLÍČOVÁ SLOVA

Micelární elektrokinetická chromatografie, kapilární zónová elektroforéza, liposomální elektrokinetická chromatografie, tenzidy, přírodní antioxidanty, oligosacharidy, 2D separační systém.

## TITLE

Utilization of complexation equilibria during electromigration separations of natural substances

## ANNOTATION

The aim of the doctoral thesis is to conclude the results of research focused to the possibility of the determination of critical micelle concentration of surfactants by capillary electrophoresis, utilization of liposome electrokinetic chromatography and micellar electrokinetic chromatography for the determination of distribution coefficient of the study natural antioxidants, utilization of micellar electrokinetic chromatography and capillary zone electrophoresis with UV/Vis or mass detection for the analysis of natural antioxidants and oligosaccharides and possibility of the connection of the liquid chromatography with micellar electrokinetic chromatography in two-dimensional separation system. The doctoral thesis is conceived as a comment to the published articles and articles which will be published.

## KEYWORDS

Micellar electrokinetic chromatography, capillary zone electrophoresis, liposome electrokinetic chromatography, surfactants, natural antioxidants, oligosaccharides, 2D separation system.



## Obsah

Úvod.....	10
Cíle práce a postup řešení.....	13
1 Porovnání metod využívajících kapilární elektroforézu pro stanovení kritické micelární koncentrace vybraných tenzidů .....	16
1.1 Povrchově aktivní látky.....	16
1.2 Kritická micelární koncentrace .....	18
1.2.1 Vznik micel .....	18
1.3 Stanovení kritické micelární koncentrace .....	18
1.3.1 Metoda založená na měření proudu .....	19
1.3.2 Zónové metody.....	20
1.3.3 Další možnosti stanovení <i>cmc</i> pomocí kapilární elektroforézy .....	25
1.4 Experimentální část.....	26
1.4.1 Seznam použitých chemikálií .....	26
1.4.2 Přístrojové vybavení.....	26
1.4.3 Pracovní postup.....	26
1.5 Výsledky a diskuze.....	28
1.5.1 Vyhodnocení <i>cmc</i> na základě měření proudu .....	29
1.5.2 Vyhodnocení <i>cmc</i> na základě migračních charakteristik analytů .....	30
1.5.3 Vliv experimentálních parametrů na velikost <i>cmc</i> .....	31
1.6 Shrnutí .....	39
1.7 Seznam použité literatury .....	40
2 Porovnání rozdělovacích koeficientů oktanol-voda, micely-voda, liposomy-voda pro vybrané přírodní antioxidanty.....	42
2.1 Stanovení rozdělovacího koeficientu micely-vodná fáze, liposomy-vodná fáze .....	42
2.2 Výpočet rozdělovacích koeficientů z efektivních pohyblivostí .....	46
2.3 Přírodní antioxidanty.....	47
2.4 Experimentální část.....	50

2.4.1	Seznam použitých chemikálií .....	50
2.4.2	Přístrojové vybavení.....	52
2.4.3	Pracovní postup .....	52
2.5	Výsledky a diskuze.....	55
2.5.1	Stanovení elektroforetické pohyblivosti liposomů/micel.....	55
2.5.2	Stanovení rozdělovacích koeficientů přírodních antioxidantů.....	55
2.6	Shrnutí .....	64
2.7	Seznam použité literatury .....	65
3	Aplikace MEKC, CZE a CZE/MS pro separaci přírodních antioxidantů a oligosacharidů .....	67
3.1	Stanovení přírodních antioxidantů pomocí micelární elektrokinetické chromatografie... ..	67
3.2	Analýza oligosacharidů pomocí CE.....	69
3.2.1	Kapilární elektroforéza s hmotnostně spektrometrickou detekcí.....	71
3.3	Experimentální část .....	73
3.3.1	Seznam použitých chemikálií .....	73
3.3.2	Pracovní postup .....	73
3.4	Výsledky a diskuze.....	77
3.4.1	MEKC separace přírodních antioxidantů.....	77
3.4.2	CZE, CZE/MS separace oligosacharidů .....	87
3.5	Shrnutí .....	95
3.6	Seznam použité literatury .....	97
4	Vícerozměrné separace .....	99
4.1.1	Píková kapacita .....	99
4.1.2	Rozlišení.....	100
4.1.3	Spojení separačních technik .....	101
4.1.4	Spojení kapalinové chromatografie s elektromigračními metodami .....	101

4.1.5	Spojení LC v první dimenzi a MEKC v dimenzi druhé s programovanou změnou složení pseudostacionární fáze .....	107
4.2	Experimentální část .....	110
4.2.1	Seznam použitých chemikálií .....	110
4.2.2	Přístrojové vybavení, pracovní postup .....	110
4.3	Výsledky a diskuze .....	112
4.4	Shrnutí .....	120
4.5	Seznam použité literatury .....	121
5	Příloha .....	122

## SEZNAM ZKRATEK

2-AA	2-aminobenzoová kyselina
2-AB	2-aminobenzamid
2-AP	2-aminopyridin
2D	dvourozměrný
3D	třírozměrný
4-HPAC	4-hydroxyfenyloctová kyselina
AB	alkylbenzen
ACN	acetonitril
ANDS	7-aminonaftalen-1,3-disulfonová kyselina
ANOVA	analýza rozptylu
ANTS	8-aminonaftalen-1,3,6-trisulfonová kyselina
APS	peroxosíran draselný
BGE	základní elektrolyt
CAC	kritická agregační koncentrace
CD	cyklodextrin
CE	kapilární elektroforéza
<i>cmc</i>	kritická micelární koncentrace
CZE	kapilární zónová elektroforéza
DMSO	dimethylsulfoxid
EKC	elektrokinetická chromatografie
<i>eof</i>	elektroosmotický tok
ESI	ionizace pomocí elektrospreje
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
I.D.	vnitřní průměr
IUPAC	mezinárodní unie pro čistou a užitou chemii (z anglického International Union of Pure and Applied Chemistry)

LC	kapalinová chromatografie
LEKC	liposomální elektrokinetická chromatografie
LOD	limit detekce
LOQ	limit kvantifikace
MEKC	micelární elektrokinetická chromatografie
MS	hmotnostní spektrometrie
PAL	povrchově aktivní látka
PDMA	polydimethylakrylamid
p-HBA	p-hydroxybenzoová kyselina
POPC	1-palmitoyl-2-oleyl-sn-glycero-3-fosfocholin
POPG	1-palmitoyl-2-oleyl-sn-glycero-3-fosfo-(1'-rac-glycerol)
POPS	1-palmitoyl-2-oleyl-sn-glycero-3-fosfo-L-serin
PVA	polyvinylalkohol
RPLC	kapalinová chromatografie pracující v systému s obrácenými fázemi
SD	směrodatná odchylka
SDeS	decylsíran sodný
SDS	dodecylsíran sodný
SL	přídavná kapalina (sheath liquid)
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin

# ÚVOD

Kapilární elektroforéza je široce využívaná separační metoda, jejíž nejrozšířenějšími módy jsou kapilární zónová elektroforéza a micelární elektrokinetická chromatografie. Oba tyto módy kapilární elektroforézy vynikají nízkou spotřebou chemikálií, rychlou analýzou a nízkou spotřebou vzorku. Hlavní rozdíl mezi těmito metodami spočívá v jejich využití. Kapilární zónová elektroforéza je vhodnou metodou pro separaci nabitých látek, kdežto micelární elektrokinetickou chromatografií lze s výhodou použít pro separaci látek bez náboje nebo i směsi nabitých a nenabitých látek.

První část práce je zaměřená na možnosti využití kapilární elektroforézy, resp. kapilární zónové elektroforézy a micelární elektrokinetické chromatografie pro stanovení kritické micelární koncentrace aniontových tenzidů reprezentovaných homologickou řadou alkylsíranů sodných. Hodnota kritické micelární koncentrace je unikátní pro každý tenzid a je závislá i na okolních podmínkách (složení elektrolytu, pH, teplota, přídavek organického modifikátoru). Znalost hodnoty kritické micelární koncentrace tenzidů používaných v separačních procesech je důležitá pro charakterizaci mechanismů, které probíhají během separace. Kapilární elektroforéza umožňuje využití hned několika metod pro stanovení kritické micelární koncentrace. Nejjednodušší je metoda založená na měření proudu. Tento postup je nejrychlejší z použitých metod a nejjednodušší jak na provedení, tak na vyhodnocení. Dále byly testovány metody založené na měření retenčního času, retenčního faktoru a elektroforetické pohyblivosti. Tyto metody pracují jak v módu kapilární zónové elektroforézy, tak i micelární elektrokinetické chromatografie v závislosti na koncentraci tenzidu a tedy přítomnosti micel v základním elektrolytu. V této kapitole jsou popsány principy jednotlivých stanovení, způsoby vyhodnocení a vlivy délky alkylového řetězce, způsobu přípravy vzorku a dalších aspektů na hodnotu kritické micelární koncentrace. Získané hodnoty kritických micelárních koncentrací pomocí jednotlivých metod byly mezi sebou porovnány a rozdíly mezi jednotlivými výsledky byly statisticky vyhodnoceny.

Druhá část práce je věnována studiu rozdělovacích koeficientů přírodních antioxidantů pomocí micelární elektrokinetické chromatografie a liposomální elektrokinetické chromatografie. V literatuře lze nalézt údaje o rozdělovacím koeficientu látek mezi oktanolem a vodou ( $\log P_{o/w}$ ), popř. pufrem o pH 7,40 ( $\log D_{pH7,4}$ ), který charakterizuje hydrofilní/hydrofobní vlastnosti látek. V živých organismech se však vyskytují bariéry (biomembrány) tvořené lipidovou dvojvrstvou a v případě použití rozdělovacího koeficientu oktanol-voda pro predikci chování látky v živém organismu se jedná o velmi hrubý nástin

jejich vlastností v organismu. Z tohoto hlediska je pro predikci *in vivo* chování látek vhodnější použít jinou fázi, která by lépe vystihovala vlastnosti biomembrán. Pro tyto účely bylo navrženo použití liposomální elektrokinetické chromatografie, kde se ustavuje rozdělovací rovnováha analytu mezi pseudostacionární fází tvořenou liposomy a pufrem o pH, jehož hodnota odpovídá vnitřnímu prostředí v organismu. V této práci byly pro stanovení rozdělovacích koeficientů analytů mezi liposomy a vodnou fází použity dvě směsi fosfolipidů, konkrétně směs 1-palmitoyl-2-oleyl-*sn*-glycero-3-fosfocholinu a 1-palmitoyl-2-oleyl-*sn*-glycero-3-fosfo-L-serinu a 1-palmitoyl-2-oleyl-*sn*-glycero-3-fosfocholinu a 1-palmitoyl-2-oleyl-*sn*-glycero-3-fosfo-(1'-rac-glycerolu). Dále byl stanoven rozdělovací koeficient analytů mezi micelami dodecylsírany sodného a vodnou fází pomocí micelární elektrokinetické chromatografie. Na závěr byly mezi sebou porovnány predikované hodnoty rozdělovacích koeficientů s experimentálně stanovenými hodnotami rozdělovacích koeficientů mezi liposomy-vodnou fází a micelami-vodnou fází.

Třetí část práce představuje praktické využití micelární elektrokinetické chromatografie, kapilární zónové elektroforézy s UV/Vis a s hmotnostní detekcí pro analýzu vybraných přírodních antioxidantů a oligosacharidů. Je studován vliv použitého tenzidu a přídavku různých typů  $\beta$ -cyklodextrinů a oxyethylenovaných mastných alkoholů do základního elektrolytu na separaci vybraných přírodních antioxidantů pomocí micelární elektrokinetické chromatografie. Optimalizace separačního procesu byla provedena na směsi standardů přírodních antioxidantů a podmínky vhodné pro analýzu byly poté aplikovány na reálné vzorky sušených květů černého bezu. Analyzovány byly tři série vzorků, které byly vyhodnoceny kvalitativně i kvantitativně. Samotné separaci oligosacharidů pomocí kapilární zónové elektroforézy, popř. kapilární zónové elektroforézy ve spojení s hmotnostní detekcí, předcházela derivatizace vzorků, která podporovala jak samotnou separaci, tak také ionizaci v hmotnostním spektrometru, a optimalizace separačních podmínek.

Poslední kapitola této práce je věnována analýze přírodních antioxidantů pomocí 2D systému realizovaného spojením kapalinové chromatografie v první dimenzi s micelární elektrokinetickou chromatografií v dimenzi druhé. Je-li v první dimenzi použita gradientová eluce se změnou koncentrace organické složky v mobilní fází, která je posléze dávkována do druhé dimenze, dochází během analýzy v druhé dimenzi k posunu migračních časů studovaných analytů, jelikož koncentrace micel, resp. kritická micelární koncentrace, je závislá na obsahu organické složky v roztoku. Tento fenomén je v této práci kompenzován změnou koncentrace dodecylsírany sodného, jehož micely tvoří pseudostacionární fázi v micelární elektrokinetické chromatografii, v závislosti na změně organického modifikátoru

ve frakci přicházející z první dimenze. Navržené podmínky byly posléze použity pro analýzu reálného vzorku zastoupeného výluhem sušených květů černého bezu.



## Cíle práce a postup řešení

Cílem práce bylo porovnání metod využívajících kapilární elektroforézu pro stanovení kritické micelární koncentrace tenzidů, ověření možností využití liposomální elektrokinetické chromatografie a micelární elektrokinetické chromatografie pro stanovení rozdělovacích koeficientů studovaných přírodních antioxidantů, využití micelární elektrokinetické chromatografie a kapilární elektroforézy s UV/Vis nebo hmotnostní detekcí pro analýzu přírodních antioxidantů a oligosacharidů a možností spojení kapalinové chromatografie a micelární elektrokinetické chromatografie v dvoudimenzionálním separačním systému.

Níže jsou uvedené postupy řešení jednotlivých cílů:

1. Porovnat metody využívající kapilární elektroforézu pro stanovení kritické micelární koncentrace vybraných tenzidů.
  - Stanovit hodnotu kritické micelární koncentrace tenzidů v elektrolytu pomocí metod založených na měření proudu a vodivosti.
  - Porovnání postupů pro vyhodnocení metody založené na měření proudu – vyhodnocení kritické micelární koncentrace z průsečíků přímek nebo pomocí druhé derivace.
  - Stanovit hodnotu kritické micelární koncentrace pomocí metod založených na retenčním modelu (metoda založená na měření retenčního času, retenčního faktoru a elektroforetické pohyblivosti homologické řady alkylbenzenů).
  - Z naměřených migračních časů alkylbenzenů určit pohyblivost micel.
  - Ověřit vliv vloženého napětí na kapiláru během stanovení kritické micelární koncentrace pomocí výše uvedených metod.
  - Ověřit vliv složení vzorku alkylbenzenů a dávkování na hodnotu kritické micelární koncentrace stanovené pomocí metody založené na měření retenčních časů alkylbenzenů.
  - Statisticky zhodnotit získané výsledky.
2. Porovnat rozdělovací koeficienty oktanol-voda, micely-voda a liposomy-voda pro vybrané přírodní antioxidanty.
  - Připravit liposomální pseudostacionární fázi pro LEKC (0,5 mM POPC/POPS 80:20 mol% ve fosfátovém pufru a 0,5 mM POPC/POPG 80:20 mol% ve fosfátovém pufru).
  - Připravit micelární pseudostacionární fázi pro MEKC (5,2 mM dodecylsírán sodný ve fosfátovém pufru).

- Stanovit pohyblivost pseudostacionární fáze pomocí iteračního postupu s využitím homologické řady alkylbenzoátů.
  - Proměřit efektivní elektroforetické pohyblivosti analytů v LEKC, MEKC a CZE systému.
  - Vypočítat fázový poměr v LEKC a MEKC systému.
  - Vypočítat rozdělovací koeficienty analytů mezi pseudostacionární a vodnou fází.
  - Statisticky vyhodnotit rozdíly mezi tabelovanými a stanovenými hodnotami rozdělovacích koeficientů vybraných analytů.
3. Aplikace MEKC, CZE a CZE/MS pro separaci přírodních antioxidantů a oligosacharidů.
- Zhodnotit vliv přídavku  $\beta$ -cyklodextrinu, heptakis(2,6-di-*O*-metyl)- $\beta$ -cyklodextrinu a heptakis(6-*O*-sulfo)- $\beta$ -cyklodextrinu do základního elektrolytu (25 mM boritanový pufr o pH 9,30) s 36 mM decylsíránem sodným na separaci přírodních antioxidantů.
  - Zhodnotit vliv složení směsných micel (alkylsírán sodný v kombinaci s oxyetylenovanými mastnými alkoholy – Slovasol 117 a Slovasol 247) na separaci přírodních antioxidantů.
  - Sestrojit kalibrační závislosti odezvy signálu na koncentraci antioxidantů, stanovit limity detekce a kvantifikace.
  - Provést kvalitativní a kvantitativní analýzu reálného vzorku výluhu květů černého bezu.
  - Provést derivatizaci vybraných oligosacharidů pomocí derivačních činidel 7-aminonaftalen-1,3-disulfonové kyseliny, 8-aminonaftalen-1,3,6-trisulfonové kyseliny, 2-aminobenzoové kyseliny, 2-aminobenzamidu, 2-aminopyridinu.
  - Zhodnotit vliv pokrytí vnitřní stěny křemenné kapiláry pomocí polyvinylalkoholu a polydimethylakrylamidu na separaci derivovaných oligosacharidů.
  - Zhodnotit vliv použitého elektrolytu (kyselina mravenčí, mravenčan amonný, fosforečnanový pufr) na průběh separace.
  - Optimalizovat spojení kapilární elektroforézy s hmotnostním detektorem včetně napětí na iontovém zdroji, pozice a geometrie konce separační kapiláry, složení a průtoku přídavné kapaliny, průtoku sušícího plynu, délky separační kapiláry a vloženého napětí na separační kapiláru.
  - Provést analýzu derivatizovaných oligosacharidů pomocí spojení CE/MS.

4. Optimalizace spojení kapalinové chromatografie s micelární elektrokinetickou chromatografií.
- Stanovit kritickou micelární koncentraci vybraných tenzidů v závislosti na přídávku acetonitrilu v elektrolytu.
  - Stanovit parametry  $m'$  a  $q$  rovnice:  $\log k_{MEKC} = p' + q \cdot \log c_{mic} - m' \cdot \varphi$ .
  - Optimalizovat podmínky pro separaci přírodních antioxidantů pomocí kapalinové chromatografie.
  - Provést analýzu standardů fenolických kyselin a flavonoidů pomocí kapalinové chromatografie ve spojení s micelární elektrokinetickou chromatografií s konstantním složením pseudostacionární fáze.
  - Provést analýzu standardů fenolických kyselin a flavonoidů pomocí kapalinové chromatografie ve spojení s micelární elektrokinetickou chromatografií s proměnnou koncentrací pseudostacionární fáze.
  - Provést analýzu reálného vzorku výluhu květů černého bezu pomocí kapalinové chromatografie ve spojení s micelární elektrokinetickou chromatografií s proměnnou koncentrací pseudostacionární fáze.

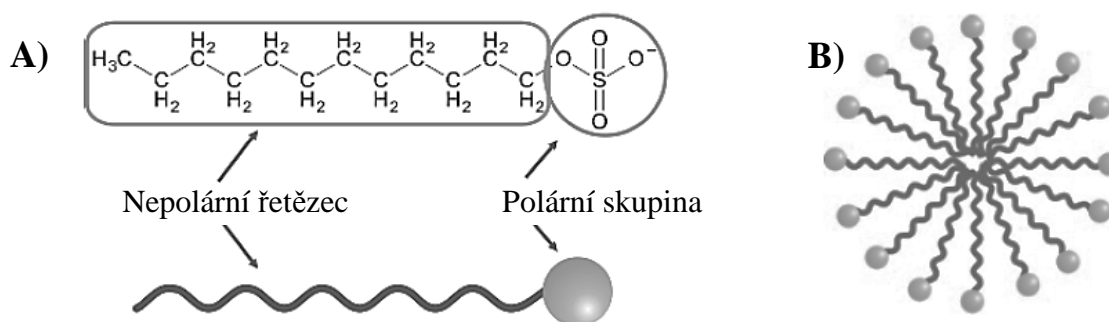
# 1 Porovnání metod využívajících kapilární elektroforézu pro stanovení kritické micelární koncentrace vybraných tenzidů

Tato kapitola je věnována možnostem využití kapilární elektroforézy pro stanovení kritické micelární koncentrace vybraných tenzidů. Studovány byly metody založené na měření proudu, retenčního času, retenčního faktoru a pohyblivosti.

## 1.1 Povrchově aktivní látky

Tenzidy (povrchově aktivní látky, surfaktanty) jsou nedílnou součástí našich životů. Setkáváme se s nimi všude kolem nás, např. v kosmetických, čisticích a pracích přípravcích. Využívají se v celé řadě procesů v potravinářství, papírenství, zemědělství, těžářství a stavebnictví.

Tenzidy jsou látky amfofilního charakteru. Jejich molekula je tvořena hydrofobním nepolárním uhlovodíkovým řetězcem (8 – 20 uhlíků) a polární hydrofilní skupinou, která může být nositelem náboje (obr. 1.1 A) [1,2]. Dle charakteru hydrofilní skupiny lze tenzidy rozdělit na aniontové, kationtové, amfoterní a neiontové (tabulka 1.1) [3]. Mezi kationtové tenzidy patří např. kvarterní amoniové nebo fosfoniové soli, aniontové tenzidy se vyskytují ve formě síranů, fosfátů nebo solí karboxylových kyselin. Amfoterní tenzidy mají ve své molekule jak kladný tak i záporný náboj a v závislosti na pH okolního prostředí se vyskytují buď ve formě aniontu, nebo kationtu. Zástupcem tenzidů s polární nenabitou skupinou je např. polyethylenglykol s navázaným dlouhým uhlovodíkovým řetězcem.

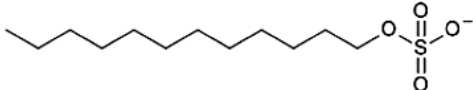
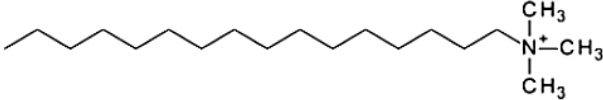
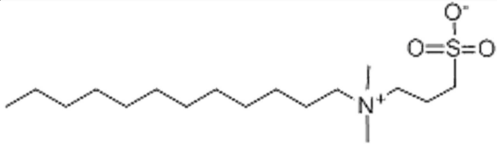
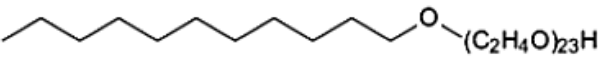


**Obrázek 1.1:** A) Struktura molekuly tenzidu (dodecylsírany sodný). B) Micela.

Při nižších koncentracích se molekuly tenzidu v roztoku vyskytují téměř zcela dispergované (rozptýlené) nebo ve formě dimerů, trimerů atd. Při dosažení kritické

koncentrace molekul tenzidu v roztoku dochází k jejich agregaci a vznikají útvary zvané micely (obr. 1.1 B). Tato koncentrace se nazývá kritická micelární koncentrace (*cmc*) a je charakteristickou veličinou pro každý tenzid. Vedle kritické micelární koncentrace jsou tenzidy charakterizovány také agregačním číslem micel a Krafftovou teplotou (tabulka 1.1). Agregační číslo udává počet molekul tenzidu v micelle a obvykle se tato hodnota pohybuje v rozmezí 60 – 100 molekul tenzidu. Krafftova teplota je charakterizována jako bod tání hydratovaného pevného tenzidu a jestliže je teplota roztoku nižší než odpovídající hodnota Krafftovy teploty daného tenzidu, nebude docházet k agregaci molekul tenzidu a ke vzniku micel.

**Tabulka 1.1:** Hodnoty kritické micelární koncentrace, agregačního čísla a Krafftovy teploty pro vybrané tenzidy. Hodnoty kritické micelární koncentrace byly stanoveny ve vodných roztocích při teplotě 25 °C [2,3].

Tenzid	<i>cmc</i> (mM)	Agregační číslo	Krafftova teplota (°C)
<b>Aniontové</b>			
			
Dodecylsíran sodný	8,1	62	9
Perfluorheptanoát draselný	30	-	25,6
<b>Kationtové</b>			
			
Cetyltrimetylamonium bromid (CTAB)	1,3	78	23
Cetylpyridinium chlorid (CPC)	0,12	95	-
<b>Amfoterní</b>			
			
N-dodecyl-N,N-dimetylammonium-3-propan-1-sulfonová kyselina (SB-12)	3	55	< 0
N,N-dimethyl-N-(karboxymethyl)oktylamoniová sůl	250	24	< 0
<b>Neiontové</b>			
			
Polyoxyetylen (23) dodekanol (Brij 35)	0,1	40	-
Polyoxyetylen (6) dodekanol	0,09	400	-

## 1.2 Kritická micelární koncentrace

Pojem kritická micelární koncentrace (*cmc*) charakterizuje takovou koncentraci tenzidu v roztoku, při které dochází ke spontánní agregaci molekul povrchově aktivní látky do micel. Pro jednotlivé povrchově aktivní látky je důležité znát hodnotu *cmc*, protože při jejich využití v separačních technikách je kladen důraz na přítomnost micel v pracovním roztoku. Obecně se v literatuře dají nalézt hodnoty kritické micelární koncentrace povrchově aktivní látky ve vodě. Hodnota kritické micelární koncentrace je však ovlivněna i složením roztoku, ve kterém se povrchově aktivní látka nachází. V případě micelární elektrokinetické chromatografie se jedná např. o složení základního elektrolytu (BGE), jeho iontovou sílu a pH, přidávek organického modifikátoru do základního elektrolytu a teplotu, při které probíhá analýza [4]. To vede k potřebě stanovit hodnotu kritické micelární koncentrace daného tenzidu v pracovním roztoku za podmínek, při kterých bude probíhat analýza.

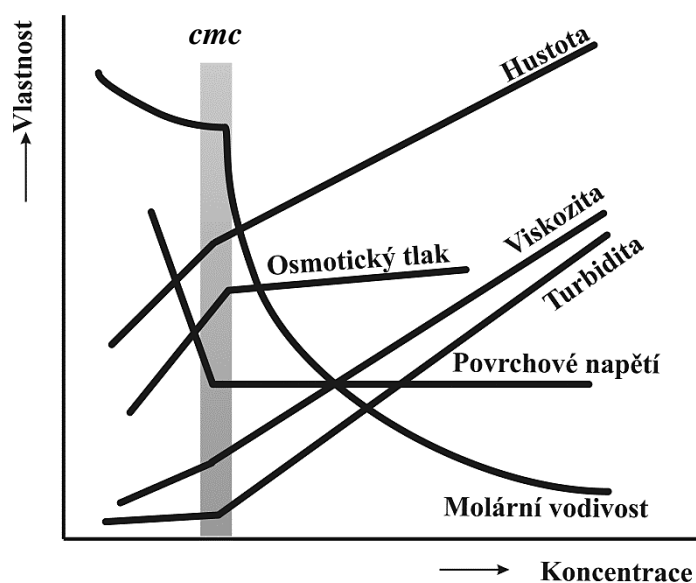
### 1.2.1 Vznik micel

Vznik micel je výsledkem působení tří základních sil. Jde o hydrofobní odpuzování mezi uhlovodíkovými řetězci a vodným prostředím, o odpuzování nabitých iontových skupin a působení van der Waalových sil mezi alkylovými řetězci micel [5]. Ve vodném prostředí vznikají micely, které mají hydrofobní alkylové řetězce orientovány dovnitř, v nepolárním prostředí vznikají tzv. reverzní (obrácené) micely, které mají uvnitř micely polární skupiny.

## 1.3 Stanovení kritické micelární koncentrace

Metody sloužící ke stanovení kritické micelární koncentrace jsou založeny na změně fyzikálně-chemických vlastností roztoku tenzidu v závislosti na změně koncentrace daného tenzidu v systému (obr. 1.2). Jedná se o měření elektrické vodivosti, dielektrické konstanty a povrchového napětí; z elektrochemických metod může být použita potenciometrie a cyklická voltametrie; spektroskopické metody využívají monitorování rozpustnosti barviv v roztocích tenzidu.

V posledním desetiletí bylo navrženo několik technik stanovení kritické micelární koncentrace pomocí instrumentace pro kapilární elektroforézu [6]. Tato práce je zaměřena právě na porovnání metod stanovení kritické micelární koncentrace využívajících kapilární elektroforézu (CE).



**Obrázek 1.2:** Fyzikálně-chemické vlastnosti roztoku v závislosti na koncentraci tenzidu.

### 1.3.1 Metoda založená na měření proudu

Metodu pro stanovení hodnoty kritické micelární koncentrace, využívající měření proudu procházejícího kapilárou naplněnou roztokem tenzidu, poprvé popsal Tickle [7]. Na jeho práci později navázal Cifuentes [8], který se zabýval vlivem složení elektrolytu na velikost proudu procházejícího kapilárou při vložení konstantního napětí. Metodu pro stanovení kritické micelární koncentrace tenzidů založenou na měření proudu ve své práci využili i Mrestani a kol. [9] a Liu a kol. [10]. Podle Ohmova zákona závisí velikost proudu  $I$  v kapiláře naplněné roztokem iontového tenzidu o koncentraci nižší než jejich  $cmc$  na hodnotě vložení napětí  $U$  podle rovnice:

$$I = \frac{\pi d_c^2 F (\mu_s + \mu_x) c_s}{4l} U \quad (1.1)$$

kde  $F$  je Faradayova konstanta,  $d_c$  je vnitřní průměr kapiláry,  $l$  je délka kapiláry,  $\mu_s$  je pohyblivost tenzidu,  $\mu_x$  je pohyblivost protiiontu a  $c_s$  je koncentrace tenzidu v roztoku.

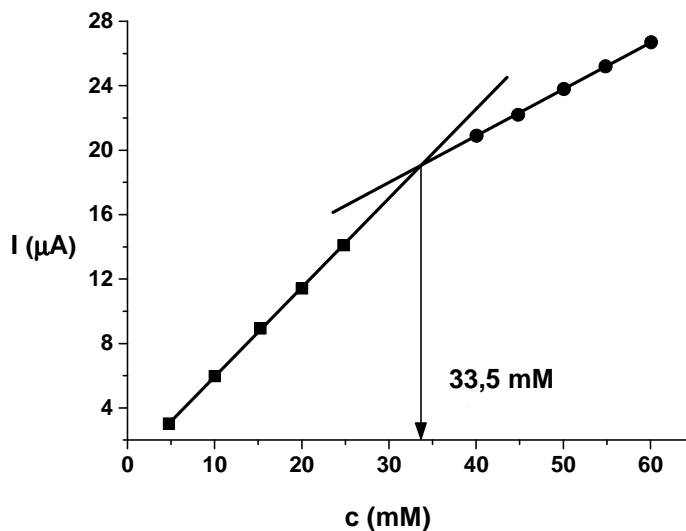
Pro roztoky, v nichž je koncentrace tenzidu vyšší než  $cmc$ , platí následující vztah:

$$I = \frac{\pi d_c^2 F (\mu_s + \mu_x) cmc + (\mu_x + \mu_{mic})(1 - \theta)(c_s - cmc)}{4l} U \quad (1.2)$$

kde  $\mu_{mic}$  je pohyblivost micel a  $\theta$  je molární zlomek protiiontu uzavřeného v micelách (obvykle v rozmezí 0,6 – 0,8) [4].

Tato metoda je použitelná pouze pro aniontové a kationtové tenzidy. Přesnost metody je závislá na rozdílu hodnot směrnic přímků v oblasti pod a nad hodnotou odpovídající

kritické micelární koncentraci. Na obr. 1.3 je znázorněna závislost proudu na koncentraci decylsíranu sodného. Hodnota kritické micelární koncentrace byla vypočtena z rovnic lineární regrese obou přímk jako  $x$ -ová souřadnice jejich průsečíku. Vypočtená hodnota kritické micelární koncentrace je 33,5 mM [11]. V literatuře bývá uváděna hodnota 33 mM [12].



**Obrázek 1.3:** Závislost proudu na koncentraci decylsíranu sodného ve vodě (podle [11]).

$U = 20$  kV, měřeno po dobu 5 min. Celková délka kapiláry byla 35 cm, efektivní délka byla 27 cm a vnitřní průměr kapiláry byl 50  $\mu\text{m}$ . Teplota 25  $^{\circ}\text{C}$ .

### 1.3.2 Zónové metody

Tyto metody byly navrženy k rozšíření použitelnosti kapilární elektroforézy pro stanovení kritické micelární koncentrace i pro neiontové tenzidy. Zónové elektroforetické metody vycházejí při stanovení kritické micelární koncentrace z principu kapilární zónové elektroforézy (CZE) a micelární elektrokinetické chromatografie (MEKC). Zatímco v CZE je separace látek založena na jejich rozdílné pohyblivosti ve stejnosměrném elektrickém poli, a je tedy závislá na velikosti náboje a poloměru iontu, micelární elektrokinetická chromatografie se využívá pro separace neutrálních látek. V MEKC se neutrální analyty dělí na základě jejich rozdílného distribučního koeficientu mezi pseudostacionární fází (tvořenou micelami tenzidu) a vodnou mobilní fází. Neutrální analyty v elektrickém poli získávají v závislosti na jejich afinitě k micelám nenulovou pohyblivost úměrnou pohyblivosti micel [13].



### 1.3.2.1 Metoda založená na měření retenčního faktoru

V micelární elektrokinetické chromatografii je retenční faktor definován jako [14]:

$$k = K_{mic} \frac{V_{mic}}{V_{aq}} = K_{mic} \frac{\nu(c_t - cmc)}{1 - \nu(c_t - cmc)} \quad (1.3)$$

kde  $K_{mic}$  je distribuční koeficient analytu mezi pseudostacionární a vodnou mobilní fází,  $V_{mic}$  je objem micel,  $V_{aq}$  je objem vodné fáze,  $\nu$  je specifický objem micely tenzidu a  $c_t$  je celková analytická koncentrace tenzidu. Hodnota výrazu  $\nu(c_t - cmc)$  je mnohem menší než 1, proto lze retenční faktor zjednodušeně vyjádřit jako:

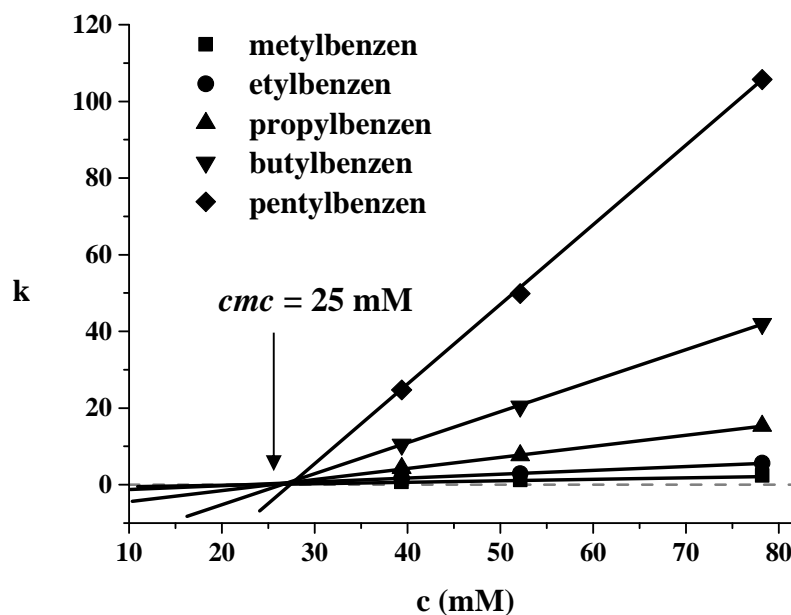
$$k = K_{mic}\nu(c_t - cmc) \quad (1.4)$$

Pro neutrální analyty lze vypočítat jejich retenční faktor ze znalosti jejich retenčního času  $t_r$ , migračního času elektroosmotického toku  $t_{eof}$  a migračního času micel podle rovnice:

$$k = \frac{t_r - t_{eof}}{t_{eof} \left(1 - \frac{t_r}{t_{mic}}\right)} \quad (1.5)$$

Pro výpočet retenčního faktoru je nezbytné znát migrační čas elektroosmotického toku a migrační čas micel. Pro zjištění  $t_{eof}$  se používají malé neutrální molekuly, které neinteragují s micelami, a jejich pohyb kapilárou závisí pouze na velikosti elektroosmotického toku. Takovými látkami jsou např. thiomočovina nebo uracil. Migrační čas micel lze určit pomocí markeru, který se vyskytuje (je distribuován) téměř výhradně v micelách, např. barvivo Sudan III (1-[(4-fenylazo)fenylazo]-2-naftol) nebo lze použít iterační postup [15]. Z rovnice (1.4) vyplývá, že retenční faktor analytu je závislý na celkové koncentraci tenzidu v základním elektrolytu. Graficky tuto závislost vystihuje přímka, která protíná  $x$ -ovou osu v hodnotě, která odpovídá kritické micelární koncentraci [16]. Na obr. 1.4 je znázorněna závislost retenčního faktoru homologické řady  $n$ -alkylbenzenů na koncentraci decylsírany sodného v 25 mM boritanovém pufru o pH 9,30. Hodnota kritické micelární koncentrace byla vypočtena jako průměr průsečíků přímk s  $x$ -ovou osou. Naměřená hodnota  $cmc$  pro decylsírany sodný v daném prostředí byla 25 mM [11].

Přesnost uvedené metody závisí na tom, s jakou přesností je možné určit migrační čas elektroosmotického toku a migrační čas micel.



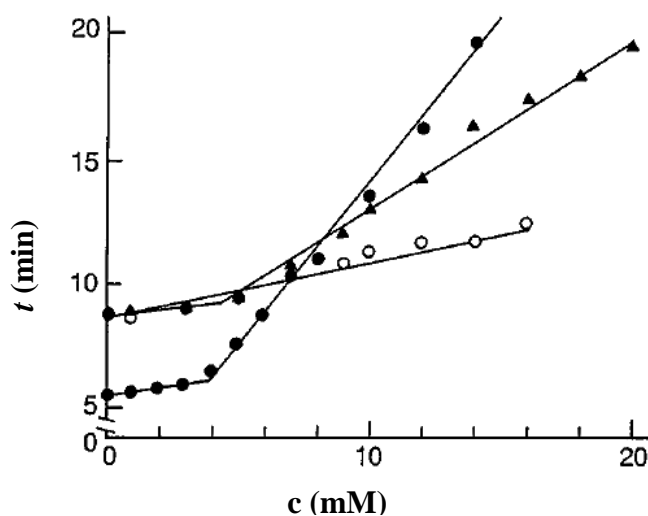
**Obrázek 1.4:** Závislost retenčního faktoru na koncentraci decylsírany sodného v 25 mM boritanovém pufru o pH 9,30.

### 1.3.2.2 Metoda založená na měření retenčního času

Nakamura a kol. [17] navrhli využít přímo retenční čas 2-naftylmetanolu v závislosti na koncentraci tenzidu v základním elektrolytu pro stanovení kritické micelární koncentrace tenzidu [17]. V porovnání s předchozí metodou založenou na výpočtu retenčního faktoru by měla být metoda založená na měření retenčního času přesnější, jelikož není potřeba znát  $t_{eof}$  a  $t_{mic}$ . Vztah retenčního času k retenčnímu faktoru popisuje rovnice:

$$t_r = \frac{t_{eof}(1 + k)}{1 + \left(\frac{t_{eof}}{t_{mic}}\right)k} \quad (1.6)$$

Probíhá-li analýza v oblasti pod  $cmc$ , neutrální analyt migruje společně s elektroosmotickým tokem. V oblasti nad  $cmc$  dochází k interakcím mezi analytem a micelami a migrační čas analytu se prodlužuje s rostoucí koncentrací tenzidu. Na obr. 1.5 je záznam závislosti migračního času toluenu, 2-naftylmetanolu a naftolu na koncentraci dodecylsírany sodného v 20 mM fosfátovém pufru o pH 7,00 [16].



**Obrázek 1.5:** Závislost migračního/retenčního času analytu na koncentraci dodecylsírany sodného v 20 mM fosfátovém pufru o pH 7,00, teplota 40 °C.

○ toluen; ● 2-naftylmetanol; ▲ naftol. Upraveno dle [6].

### 1.3.2.3 Metoda založená na měření pohyblivosti

Jacquier a Desbène [18] ve své práci detailně rozebírají stanovení kritické micelární koncentrace dodecylsírany sodného pomocí efektivní elektroforetické pohyblivosti neutrální látky. Tato metoda byla využita i v dalších pracích zabývajících se stanovením kritické micelární koncentrace tenzidů pomocí kapilární elektroforézy [19-23]. Efektivní pohyblivost analytu,  $\mu_{eff}$ , v elektrolytu s koncentrací tenzidu nižší než je jeho kritická micelární koncentrace, je dána vztahem:

$$\mu_{eff} = \frac{K_{solv}c_t}{1 + K_{solv}c_t} \mu_{solv} \quad (1.7)$$

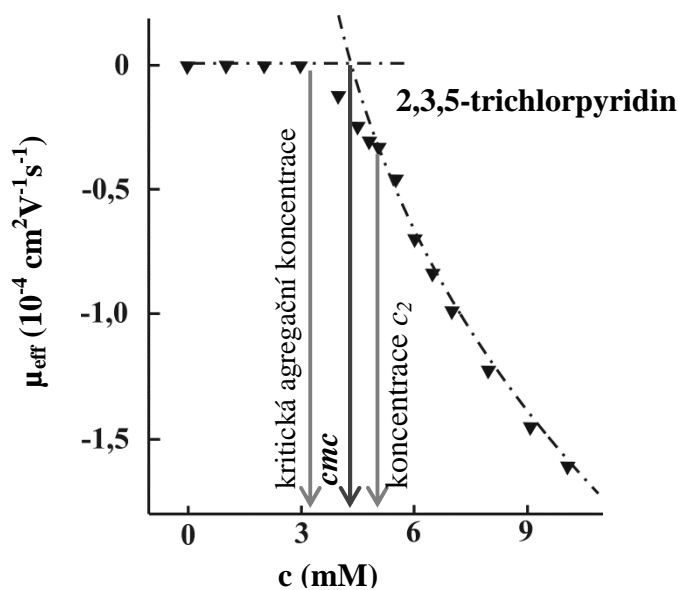
kde  $K_{solv}$  je rovnovážná konstanta popisující interakci mezi analytem a monomerem tenzidu,  $c_t$  je celková koncentrace tenzidu v systému a  $\mu_{solv}$  je pohyblivost komplexu analytu s monomerem tenzidu.

V elektrolytu s koncentrací tenzidu vyšší než je jeho  $cmc$  je možné vypočítat efektivní pohyblivost analytu:

$$\mu_{eff} = \frac{K_{solv}cmc}{1 + K_{solv}cmc + K_{mic}(c_t - cmc)/n} \mu_{solv} + \frac{K_{mic}(c_t - cmc)/n}{1 + K_{solv}cmc + K_{mic}(c_t - cmc)/n} \mu_{mic} \quad (1.8)$$

kde  $K_{mic}$  je rovnovážná konstanta popisující interakci mezi analytem a micelou,  $\mu_{mic}$  je pohyblivost micel,  $n$  je agregační číslo tenzidu.

Na obrázku 1.6 je možné pozorovat dva zlomy na křivce, která vznikla proložením bodů, odpovídajících efektivní elektroforetické pohyblivosti 2,3,5-trichlorpyridinu v závislosti na koncentraci dodecylsíranu sodného v elektrolytu. Koncentrace tenzidu, která odpovídá prvnímu zlomu, se nazývá kritická agregační koncentrace. Při této koncentraci se monomery tenzidu začínají shlukovat do micel. Se vzrůstající koncentrací tenzidu v elektrolytu dochází ke zvětšování shluků z monomerů tenzidu, dokud tyto shluky nedosáhnou stabilní formy a dobře definované struktury. K tomu dochází při koncentraci tenzidu, jenž odpovídá druhému zlomu na křivce a označuje se jako koncentrace  $c_2$ . Hodnota kritické micelární koncentrace se nachází v rozmezí daném kritickou agregační koncentrací a koncentrací  $c_2$ . Hodnotu  $cmc$  lze odečíst jako průsečík křivky vzniklé proložením bodů ležících pod hodnotou kritické agregační koncentrace a křivky proložené body ležícími nad koncentrací  $c_2$  [24].



**Obrázek 1.6:** Závislost efektivní elektroforetické pohyblivosti 2,3,5-trichlorpyridinu na koncentraci dodecylsíranu sodného v 20 mM fosfátovém pufru o pH 7,00 (podle [24]). Délka kapiláry 57 cm s vnitřním průměrem 50  $\mu\text{m}$ , napětí 30 kV, teplota 25  $^{\circ}\text{C}$ , detekce UV 200 nm.

Nagamine a Nakamura [25] ve své práci využili pro stanovení kritické micelární koncentrace kationtových tenzidů relativní mobilitu,  $(t_m - t_{eof})/t_{eof}$ , kdy byl retenční čas markeru ( $t_m$ ) interagujícího s micelami povrchově aktivní látky vztažen k migračnímu času elektroosmotického toku.

### 1.3.3 Další možnosti stanovení *cmc* pomocí kapilární elektroforézy

Mezi zónové metody pro stanovení kritické micelární koncentrace dále patří metoda založená na měření zeta potenciálu. Tento parametr je závislý na elektroforetické pohyblivosti dle modifikované Smoluchowského rovnice [6]:

$$\zeta = \frac{3\eta\mu_{eff}}{2\varepsilon f(\kappa a)} \quad (1.9)$$

kde  $\eta$  je dynamická viskozita elektrolytu,  $\varepsilon$  je dielektrická konstanta,  $\kappa$  je reverzní Debyeova délka,  $a$  je poloměr částice a  $f(\kappa a)$  je Henryho korekční funkce.

Lokajová a kol. [26] publikovali metodu pro stanovení kritické micelární koncentrace založenou na detekci mobilit systémových píků. Systémovými píky jsou nazývány píky, které nesouvisí s analyzovanou látkou, ale jsou zaznamenávány detektorem. Tyto píky jsou způsobeny rušivými jevy, které doprovázejí analýzy pomocí kapilární zónové elektroforézy a objevují se i v micelární elektrokinetické chromatografii. Počet systémových píků závisí na přítomnosti tenzidu v pracovním elektrolytu a jejich pozice je silně závislá na přítomnosti micel v elektrolytu. Hodnotu kritické micelární koncentrace lze odečíst v inflexním bodě závislosti pohyblivosti systémových píků na koncentraci tenzidu v elektrolytu.

Pro stanovení kritické micelární koncentrace tenzidů lze také využít měření relativní viskozity roztoku tenzidu pomocí kapilární elektroforézy [27,28]. Vzorek nitrometanu [27] nebo mesityloxydu [28] byl nadávkován do separační kapiláry naplněné roztokem tenzidu. Průtok vzorku kapilárou byl řízen tlakem a relativní viskozita byla vypočítána jako podíl migračního času vzorku v roztoku s tenzidem k migračnímu času vzorku v roztoku bez přídavku tenzidu.

Další možnost stanovení kritické micelární koncentrace pomocí kapilární elektroforézy představuje využití frontálních metod a kontinuálních frontálních metod [29,30,31]. Princip stanovení spočívá v nadávkování dlouhé zóny vzorku tenzidu do separační kapiláry (při použití kontinuální frontální metody je vzorek dávkován do kapiláry nepřetržitě) a po vložení napětí na konce kapiláry dochází k částečnému oddělení monomerních a agregovaných forem tenzidu aniž by došlo k narušení rovnováhy monomer-micely. Kritická micelární koncentrace je odvozena z výšky první detekovatelné migrační fronty odpovídající monomerní formě tenzidu.

## 1.4 Experimentální část

### 1.4.1 Seznam použitých chemikálií

Decylsíran sodný (> 99 %) a dodecylsíran sodný ( $\geq$  98 %) byly zakoupeny od firmy Sigma Aldrich (Steinheim, Německo). Hydroxid sodný byl od firmy Penta (Praha, Česká republika), thiomocovina od firmy Lachema (Brno, Česká republika) a kyselina boritá od firmy Fluka (Buchs, Švýcarsko). Acetonitril, 1-dodekanol, dekahydrát tetraboritanu sodného a alkylbenzeny – etylbenzen, propylbenzen a butylbenzen byly zakoupeny od firmy Sigma Aldrich (Steinheim, Německo). Toluén byl získán od firmy Lach-Ner (Neratovice, Česká republika).

### 1.4.2 Přístrojové vybavení

Stanovení kritické micelární koncentrace bylo provedeno pomocí přístrojů pro kapilární elektroforézu Agilent CE 7100 a Agilent <sup>3D</sup>CE (Agilent, Palo Alto, CA, USA). Přístroje jsou vybaveny autosamplerem, zdrojem vysokého napětí, temperovanou kazetou s kapilárou a detektorem s diodovým polem. K vodivostní detekci byl použit bezkontaktní vodivostní detektor (Agilent Technologies). K nastavování podmínek pro analýzu a k vyhodnocování získaných dat byl využit program OpenLabs pro přístroj Agilent CE 7100 a program ChemStation pro přístroj Agilent <sup>3D</sup>CE. Měření bylo provedeno v křemenných kapilárách s vnitřním průměrem 20, 50 nebo 75  $\mu\text{m}$ , celková délka kapiláry byla 37 cm (efektivní délka 28 cm).

pH základního elektrolytu bylo měřeno pomocí pH metru Metrohm 827 (Metrohm, Herisau, Švýcarsko). pH metr byl kalibrován na základní roztoky pufrů o pH 7,00 a 9,00.

### 1.4.3 Pracovní postup

Stanovení kritické micelární koncentrace probíhalo v nepokryté křemenné kapiláře. Před prvním použitím byla kapilára promyta 20 min roztokem 0,1 M NaOH, 10 min deionizovanou vodou a 10 min základním elektrolytem. Jako základní elektrolyt byl použit 25 mM boritanový pufr o pH 8,50. Pro stanovení kritické micelární koncentrace byly připraveny kalibrační řady vybraných alkylsíranů sodných ve vodě a v 25 mM boritanovém pufru o pH 8,50.

### 1.4.3.1 Měření kritické micelární koncentrace

*Metoda založená na měření proudu a vodivosti*

Program analýzy:

- promývání kapiláry základním elektrolytem po dobu 3 min tlakem 1 bar
- vložen gradient napětí 0 až 20 kV v rozmezí 0 – 0,1 min
- záznam hodnot proudu a vodivosti po dobu 5-6 min.

Kapilára byla temperována na 25 °C. Ze získaných dat byla vypočítána průměrná hodnota proudu, popř. vodivosti. Ze závislosti proudu (vodivosti) na koncentraci tenzidu byla vypočtena hodnota kritické micelární koncentrace jako průsečík přímek, které byly proloženy body ležícími pod a nad hodnotou odpovídající kritické micelární koncentraci.

*Metoda založená na retenčním modelu*

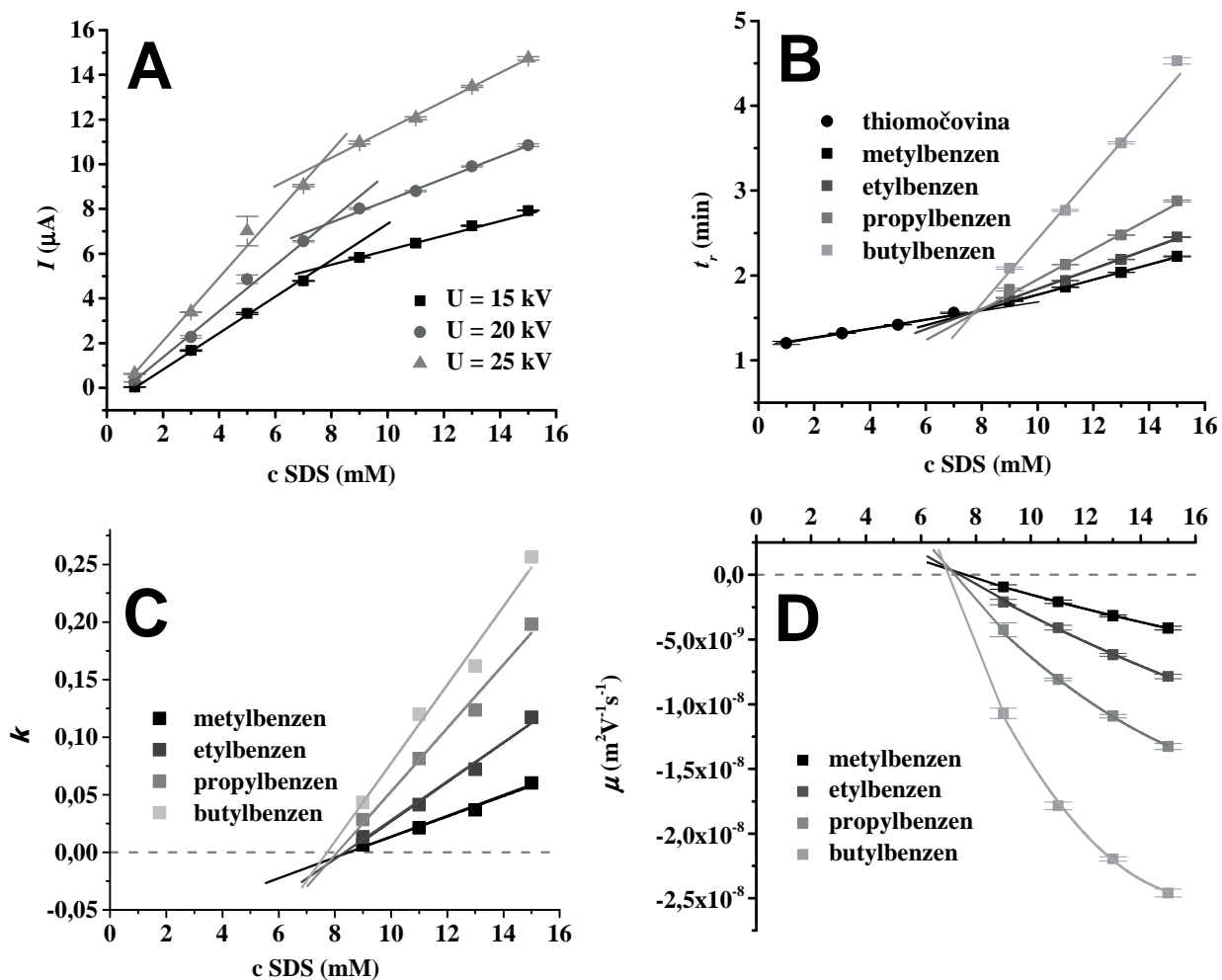
Program analýzy:

- promývání křemenné kapiláry základním elektrolytem po dobu 3 min tlakem 1 bar
- dávkování vzorku hydrodynamicky 50 mbar po dobu 5 s
- vložen gradient napětí 0 až 20 kV v rozmezí 0 – 0,1 min
- detekce při 254 nm.

Byl připraven zásobní roztok alkybenzenů o koncentraci 5 g/l, jako rozpouštědlo byl použit acetonitril. K analýze byl roztok dále naředěn na konečnou koncentraci 60 nebo 120 mg/l buď vodou, nebo základním elektrolytem bez tenzidu. Jako marker elektroosmotického toku byla použita thiomočovina. Zásobní roztok thiomočoviny měl koncentraci 50 mg/l, koncentrace použitá pro analýzu byla 0,5 mg/l. Analýzy byly prováděny při teplotě 25 °C.

## 1.5 Výsledky a diskuze

Tato práce se zabývá stanovením kritické micelární koncentrace povrchově aktivních látek pomocí kapilární elektroforézy a porovnáním dosažených výsledků. Na obr. 1.7 jsou uvedeny příklady vyhodnocení jednotlivých metod, které byly použity v této práci. Na obrázku není uvedena metoda založená na měření vodivosti, jelikož vyhodnocení se provádí stejně jako u metody založené na měření proudu (obr. 1.7A).



**Obrázek 1.7:** Ukázka vyhodnocení jednotlivých metod pro stanovení kritické micelární koncentrace dodecylsírany sodného ve vodě.

A – metoda založená na měření proudu (hodnota vloženého napětí 15; 20 a 25 kV)

B – metoda založená na měření retenčních časů homologické řady alkylbenzenů

C – metoda založená na měření retenčního faktoru homologické řady alkylbenzenů

D – metoda založená na měření pohyblivosti alkylbenzenů.

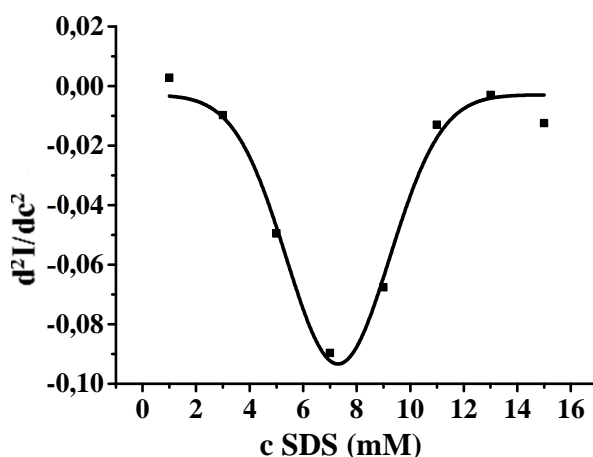
Celková délka kapiláry 37 cm (efektivní délka 28 cm), vnitřní průměr kapiláry 50  $\mu\text{m}$ . Vložené napětí (B, C, D) 20 kV, teplota 25  $^{\circ}\text{C}$ . Koncentrace vzorku alkylbenzenů 120 mg/l, vzorek dávkován hydrodynamicky 50 mbar/5 s.



### 1.5.1 Vyhodnocení *cmc* na základě měření proudu

Na obrázku 1.7A je znázorněna závislost průměrných hodnot proudu na koncentraci dodecylsíranu sodného ve vodě při třech různých hodnotách vloženého napětí. Hodnota proudu byla zaznamenávána po dobu 5-ti minut. Každý bod v tomto grafu je průměrem minimálně 600 hodnot. Pro výpočet *cmc* byl sestaven graf závislosti průměrné hodnoty proudu  $\pm$  směrodatná odchylka. Tak byly získány dvě přímky v oblasti pod hodnotou kritické micelární koncentrace a dvě nad touto hodnotou. Hodnota kritické micelární koncentrace byla vypočítána jako průsečík takto získaných přímků a je uváděna jako průměr stanovených hodnot  $\pm$  směrodatná odchylka (SD).

Další možnost, jak vyhodnotit metodu založenou na měření proudu představili ve své práci Khan a Shah [32]. Pro výpočet *cmc* byla využita druhá derivace průměrných hodnot proudu, takto získané body jsou proloženy Gaussovou křivkou a hodnota *cmc* je odečtena v jejím minimu. Na obrázku 1.8 je ukázka vyhodnocení naměřených výsledků touto metodou. Závislost  $\left(\frac{d^2I}{dc^2}\right)$  na *c* SDS je proložena Gaussovou křivkou s využitím programu OriginPro 9.



**Obrázek 1.8:** Vyhodnocení metody pro stanovení *cmc* založené na měření proudu pomocí druhé derivace.

Záznam pro SDS ve vodě, vložené napětí 20 kV.

Porovnání hodnot získaných z průsečíku přímků získaných ze závislosti proudu na koncentraci SDS proložením bodů nad a pod hodnotou *cmc* a pomocí druhé derivace hodnot proudu jsou uvedeny v tabulce 1.2. V těchto konkrétních případech jsou hodnoty *cmc* pro SDS ve vodě získané z průsečíku přímků vyšší v porovnání s hodnotami získanými z druhé derivace proudu při dané hodnotě vloženého napětí. Také byla provedena analýza rozptylu (ANOVA) pomocí programu OriginPro 9. Celkem bylo zpracováno 18 vstupních hodnot,

které byly rozděleny do šesti skupin. Pomocí analýzy rozptylu nebyly na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$  zjištěny významné odchylky mezi průměrnými hodnotami *cmc*.

**Tabulka 1.2:** Porovnání hodnot *cmc* pro SDS ve vodě získaných různými způsoby vyhodnocení metody založené na měření proudu.

napětí (kV)	<i>cmc</i> ± SD (mM) (průsečík přímek)	<i>cmc</i> ± SD (mM) (druhá derivace)
15	7,58 ± 0,06	7,30 ± 0,15
20	7,49 ± 0,17	7,08 ± 0,52
25	7,36 ± 0,45	6,74 ± 0,56

### 1.5.2 Vyhodnocení *cmc* na základě migračních charakteristik analytů

Vyhodnocení kritické micelární koncentrace ze znalosti migračního času markeru elektroosmotického toku (thiomočoviny) a retenčních časů homologické řady nenabitých látek (alkylbenzeny) je uvedeno na obr. 1.7B. Hodnota kritické micelární koncentrace byla vypočítána jako průměr hodnot získaných z průsečíku přímky získané proložením bodů patřících migračnímu času thiomočoviny a přímek získaných proložením bodů odpovídajících retenčním časům alkylbenzenů (metyl- až butylbenzen).

Závislost retenčního faktoru alkylbenzenů na koncentraci dodecylsírany sodného ve vodě je uvedena na obr. 1.7C. Retenční faktor byl spočítán dle rovnice (1.5).

Migrační čas micel byl získán pomocí iteračního postupu. Iterační postup vychází ze znalosti retenčních časů homologické řady neutrálních látek a migračního času markeru elektroosmotického toku. V prvním kroku iteračního postupu byl vypočítán retenční faktor pro členy homologické řady s výjimkou látky s nejdelším alkylovým řetězcem, jehož retenční čas byl použit místo migračního času micel pro výpočet retenčního faktoru ostatních látek. Dále byla vynesena závislost  $\log k$  na počtu uhlíků v alkylovém řetězci alkylbenzenů. Ze znalosti rovnice regrese byla vypočítána nová hodnota migračního času micel. S touto hodnotou byly opět spočítány retenční faktory všech alkylbenzenů a byla dopočítána nová hodnota migračního času micel. Tento proces byl opakován, dokud nebyl rozdíl dvou po sobě jdoucích hodnot migračního času micel zanedbatelně malý. Modifikovaný iterační postup s využitím homologické řady alkylbenzoátů je detailně uveden v kapitole 2 na obr. 2.7.

Na obrázku 1.7D je znázorněna závislost efektivní elektroforetické pohyblivosti homologické řady alkylbenzenů na koncentraci dodecylsírany sodného ve vodě. Efektivní elektroforetická pohyblivost,  $\mu_{eff}$ , byla vypočítána dle vztahu:

$$\mu_{eff} = \frac{l_t l_d}{U} \cdot \left( \frac{1}{t_r} - \frac{1}{t_0} \right) \quad (1.10)$$

kde  $l_t$  je celková délka kapiláry,  $l_d$  je délka kapiláry k detektoru a  $U$  je hodnota vloženého napětí.

Jak vyplývá z obrázku 1.7, oproti ostatním závislostem (proud, vodivost, retenční čas, retenční faktor) není závislost efektivní elektroforetické pohyblivosti na koncentraci tenzidu v roztoku lineární, což vyplývá z Onsagerova vztahu pro závislost vodivosti na koncentraci. Proto byla experimentální data proložena mocninnou funkcí.

### 1.5.3 Vliv experimentálních parametrů na velikost *cmc*

V rámci studie byl také sledován vliv velikosti vnitřního průměru kapiláry na získané hodnoty kritické micelární koncentrace a její směrodatné odchylky. Pro tyto experimenty byly použity metody založené na měření proudu a na měření vodivosti. Dílčí výsledky této studie byly publikovány v diplomové práci Ing. Martiny Vavříkové [33], na které jsem se podílela jako konzultantka. Byla stanovena hodnota *cmc* SDS ve vodě při 25 °C. Výsledky stanovení jsou uvedeny v tabulce 1.3. Hraniční hodnoty byly získány z průsečíku rovnic lineárních závislostí se započtenými směrodatnými odchylkami. Z výsledků uvedených v tab. 1.3 je dále patrné, že nejmenší rozpětí bylo získáno s použitím křemenné kapiláry s vnitřním průměrem 50 μm, proto nadále byly používány kapiláry s tímto vnitřním průměrem. Přesnost této metody je silně ovlivněna rozdílem ve velikosti směrnic závislostí pod a nad hodnotou *cmc* a nepřesnostmi naměřených hodnot v obou oblastech, které se projeví v rozptylu parametru prokládaných lineárních závislostí.

**Tabulka 1.3:** Vliv vnitřního průměru kapiláry na hodnotu kritické micelární koncentrace SDS ve vodě.

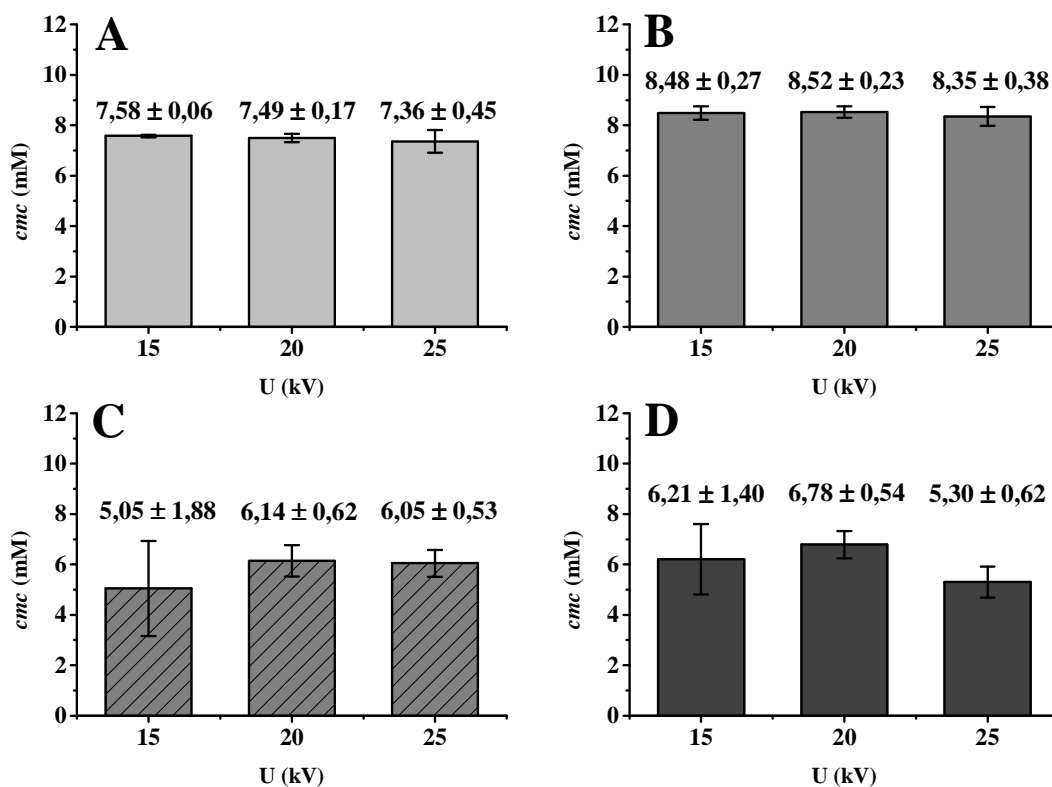
I.D. (μm)	průměr (rozpětí) <i>cmc</i> (mM)	
	Metoda založená na měření proudu	průměr (rozpětí) <i>cmc</i> (mM) Metoda založená na měření vodivosti
20	7,17 (0,12)	8,04 (0,62)
50	7,75 (0,02)	8,60 (0,26)
75	6,10 (1,96)	6,20 (2,50)

Dále byl hodnocen vliv vloženého napětí při měření kritické micelární koncentrace dodecylsíranu sodného ve vodě při 25 °C. Vložené napětí mělo hodnotu 15; 20 a 25 kV. Byly využity metody založené na měření proudu procházejícího kapilárou naplněnou roztokem

s tenzidem, retenčního času, retenčního faktoru a pohyblivosti homologické řady alkylbenzenů. Získané výsledky jsou uvedeny na obr. 1.9.

Z výsledků je patrné, že nejnižší hodnoty *cmc* pro SDS byly získány pomocí metod založených na měření retenčního faktoru a pohyblivosti homologické řady alkylbenzenů. Naopak nejvyšší hodnoty byly získány pomocí metody založené na měření retenčních časů homologické řady alkylbenzenů. V rámci metody založené na měření proudu (*cmc* byla stanovena jako průsečík přímek získaných proložení bodů nad a pod hodnotou *cmc*), s rostoucí hodnotou vloženého napětí klesá hodnota kritické micelární koncentrace a roste hodnota směrodatné odchylky.

Získané hodnoty *cmc* pro SDS uvedené na obr. 1.9 byly podrobeny analýze rozptylu pomocí programu OriginPro 9. Vycházelo se z celkového počtu 36 vstupních hodnot (N), které byly rozděleny do 12 skupin (p), hladina významnosti  $\alpha = 0,05$ .



**Obrázek 1.9:** Porovnání výsledných hodnot *cmc* dodecylsíranu sodného ve vodě získaných pomocí vybraných metod využívajících kapilární elektroforézu

**A** – metoda založená na měření proudu

**B** – metoda založená na měření retenčních časů

**C** – metoda založená na měření retenčních faktorů

**D** – metoda založená na měření pohyblivosti alkylbenzenů.

Na základě výsledků uvedených v tabulce 1.4 byla na hladině významnosti  $\alpha$  zamítnuta nulová hypotéza, která předpokládá statisticky nevýznamné rozdíly mezi výsledky, a na základě toho bylo provedeno mnohonásobné porovnání výsledků pomocí Tukeyova testu [34], aby byly nalezeny statisticky významné rozdíly mezi jednotlivými podmínkami stanovení *cmc*. Statisticky významné rozdíly mezi hodnotami *cmc* získanými jednotlivými metodami jsou rovněž uvedené v tabulce 1.4. V rámci dané metody nebyly pozorovány statisticky významné rozdíly mezi hodnotami měřeními při různé hodnotě vloženého napětí.

**Tabulka 1.4:** Analýza rozptylu - vliv použité metody pro stanovení *cmc*.

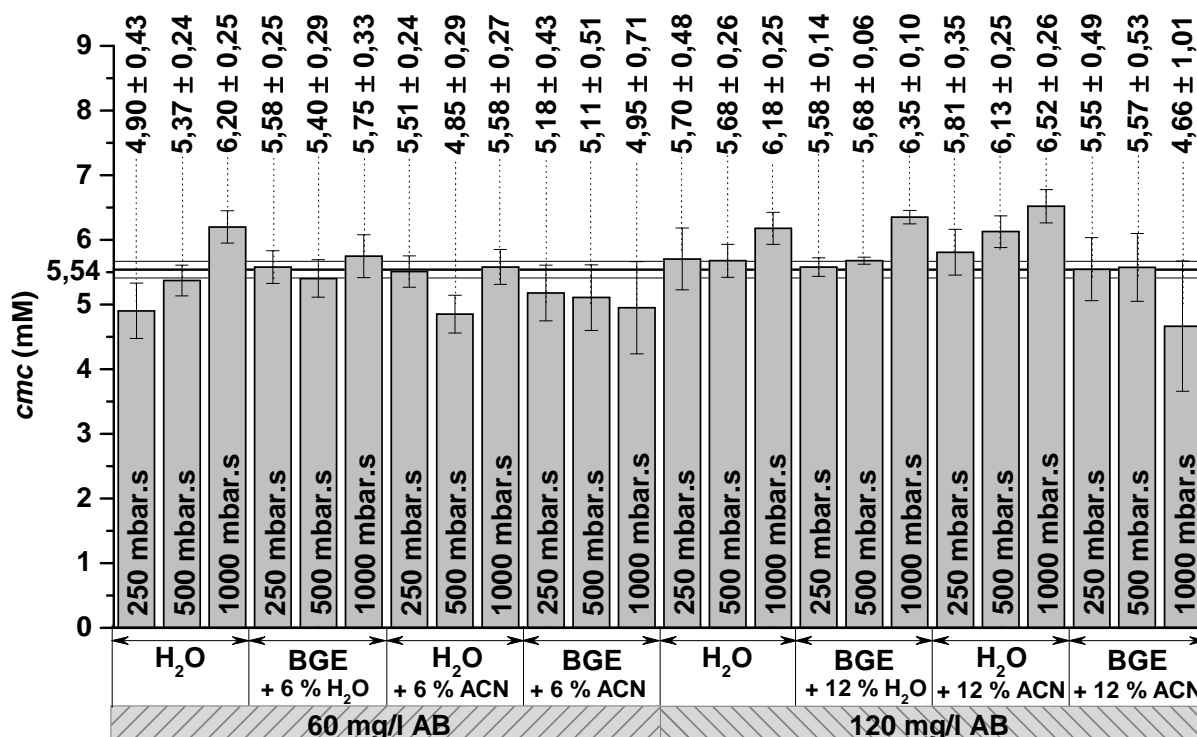
Metoda (U (kV))	<i>cmc</i> ± SD (mM)	ANOVA		Tukeyův test metoda se statisticky významně odlišným výsledkem <i>cmc</i> k dané metodě
		$\alpha$	p	
I (15 kV)	7,58 ± 0,06	0,05	3,1583.10 <sup>-5</sup> → statisticky významný rozdíl mezi hodnotami <i>cmc</i>	k (15 kV)
I (20 kV)	7,49 ± 0,17			k (15 kV)
I (25 kV)	7,36 ± 0,45			k (15 kV)
<i>t<sub>r</sub></i> (15 kV)	8,48 ± 0,27			k (15 kV), k (20 kV), k (25 kV), $\mu_{\text{eff}}$ (25 kV)
<i>t<sub>r</sub></i> (20 kV)	8,52 ± 0,23			k (15 kV), k (20 kV), k (25 kV), $\mu_{\text{eff}}$ (15 kV), $\mu_{\text{eff}}$ (25 kV)
<i>t<sub>r</sub></i> (25 kV)	8,35 ± 0,38			$\mu_{\text{eff}}$ (25 kV)
k (15 kV)	5,05 ± 1,88			<i>t<sub>r</sub></i> (15 kV), <i>t<sub>r</sub></i> (20 kV), I (15 kV), I (20 kV), I (25 kV)
k (20 kV)	6,14 ± 0,62			<i>t<sub>r</sub></i> (15 kV), <i>t<sub>r</sub></i> (20 kV)
k (25 kV)	6,05 ± 0,53			<i>t<sub>r</sub></i> (15 kV), <i>t<sub>r</sub></i> (20 kV)
$\mu_{\text{eff}}$ (15 kV)	6,21 ± 1,40			<i>t<sub>r</sub></i> (20 kV)
$\mu_{\text{eff}}$ (20 kV)	6,78 ± 0,54			
$\mu_{\text{eff}}$ (25 kV)	5,30 ± 0,62		<i>t<sub>r</sub></i> (15 kV), <i>t<sub>r</sub></i> (20 kV), <i>t<sub>r</sub></i> (25 kV)	

$\alpha$  – hladina významnosti; p - pravděpodobnost

Metoda založená na měření proudu je nejrychlejší a nejjednodušší z použitých metod, je však omezená použitím pro roztoky s nízkým obsahem organického modifikátoru (zde konkrétně acetonitrilu). Při vyšší koncentraci acetonitrilu v roztoku dochází ke zmenšení rozdílu mezi směnicemi přímek získaných proložením bodů pod a nad hodnotou kritické micelární koncentrace a tím je znemožněno vyhodnocení kritické micelární koncentrace.

Proto byla věnována větší pozornost metodě založené na měření retenčního času homologické řady alkybenzenů a to z hlediska efektu složení vzorku alkybenzenů a efektu dávkování na hodnotu kritické micelární koncentrace. Byly připraveny zásobní roztoky

alkylbenzenů ve vodě a v acetonitrilu, které byly následně ředěny vodou nebo základním elektrolytem. Výsledky této studie jsou na obrázku 1.10, kde jsou uvedeny nalezené hodnoty *cmc* pro všechny kombinace experimentálních podmínek a zároveň je naznačena velikost *cmc* SDS v základním elektrolytu o pH 8,50 zjištěná pomocí metody založené na měření proudu, která je rovna  $5,54 \pm 0,13$  mM.



složení dávkovaného vzorku alkylbenzenů

**Obrázek 1.10:** Hodnota kritické micelární koncentrace v závislosti na složení vzorku alkylbenzenů a na dávkování,  $U = 20$  kV. Pomocí metody založené na měření proudu byla naměřena hodnota *cmc* =  $5,54 \pm 0,13$  mM. BGE: 25 mM boritanový pufr o pH 8,50. Celková délka kapiláry 48 cm (efektivní délka 40 cm), vnitřní průměr 50  $\mu$ m. Teplota 25 °C.

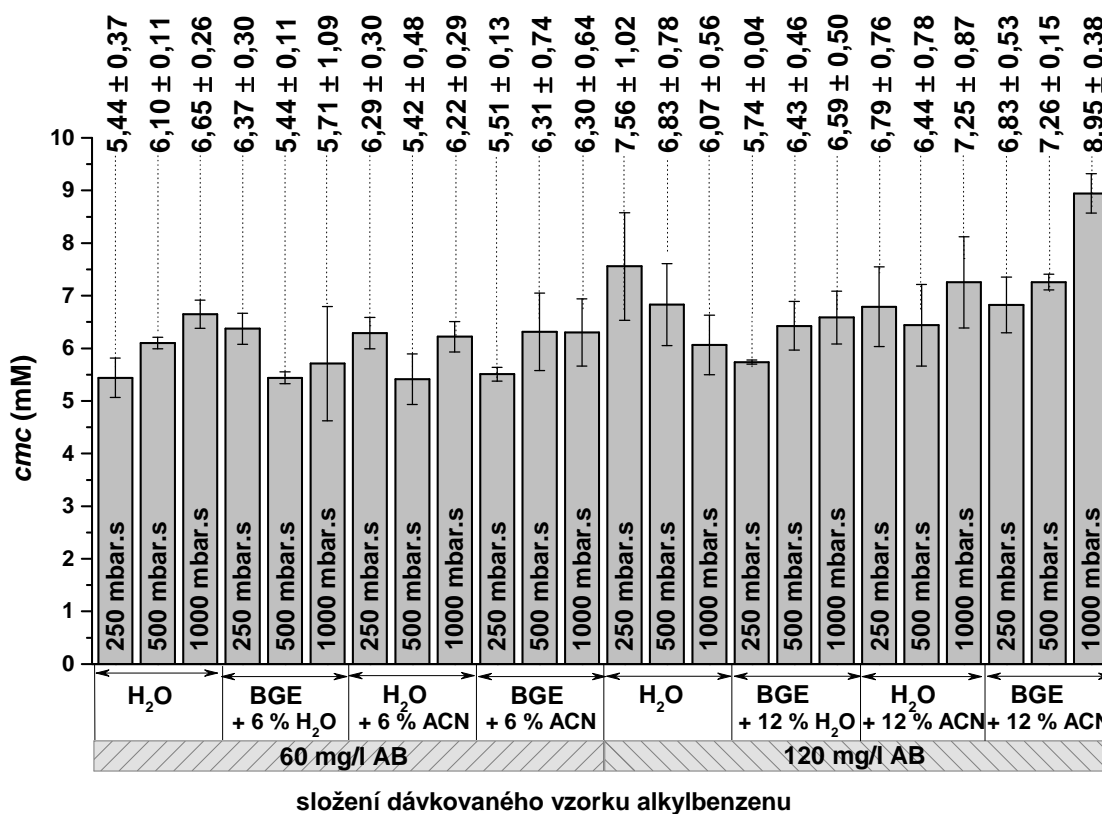
Pomocí analýzy rozptylu bylo zjištěno, že zde jsou statisticky významné rozdíly mezi jednotlivými výsledky, kdy mezi významné faktory patří jak složení vzorku alkylbenzenů, tak i doba dávkování. V tabulce 1.5 jsou uvedeny systémy (koncentrace alkylbenzenů, složení vzorku a dávkování), mezi kterými byly pozorovány statisticky významné rozdíly.

**Tabulka 1.5:** Systémy mezi kterými byly nalezeny statisticky významné rozdíly v naměřených hodnotách *cmc*. Vliv složení vzorku AB na *cmc* SDS v 25 mM boritanovém pufru o pH 8,50.

Experimentální podmínky (systém) 1			Experimentální podmínky (systém) 2		
Koncentrace AB (mg/l)	Složení vzorku AB	Dávkování (mbar.s)	Koncentrace AB (mg/l)	Složení vzorku AB	Dávkování (mbar.s)
60	H <sub>2</sub> O	1000	60	H <sub>2</sub> O	250
60	H <sub>2</sub> O + 6 % ACN	500	60	H <sub>2</sub> O	1000
120	H <sub>2</sub> O	1000	60	H <sub>2</sub> O	250
120	H <sub>2</sub> O	1000	60	H <sub>2</sub> O + 6 % ACN	500
120	BGE + 6 % H <sub>2</sub> O	1000	60	H <sub>2</sub> O	250
120	BGE + 6 % H <sub>2</sub> O	1000	60	H <sub>2</sub> O + 6 % ACN	500
120	BGE + 6 % H <sub>2</sub> O	1000	60	BGE + 6 % ACN	1000
120	H <sub>2</sub> O + 12 % ACN	500	60	H <sub>2</sub> O + 6 % ACN	500
120	H <sub>2</sub> O + 12 % ACN	1000	60	H <sub>2</sub> O	250
120	H <sub>2</sub> O + 12 % ACN	1000	60	H <sub>2</sub> O + 6 % ACN	500
120	H <sub>2</sub> O + 12 % ACN	1000	60	BGE + 6 % ACN	250
120	H <sub>2</sub> O + 12 % ACN	1000	60	BGE + 6 % ACN	500
120	H <sub>2</sub> O + 12 % ACN	1000	60	BGE + 6 % ACN	1000
120	BGE + 12 % ACN	1000	60	H <sub>2</sub> O	1000
120	BGE + 12 % ACN	1000	120	H <sub>2</sub> O	1000
120	BGE + 12 % ACN	1000	120	BGE + 12 % H <sub>2</sub> O	1000
120	BGE + 12 % ACN	1000	120	H <sub>2</sub> O + 12 % ACN	500
120	BGE + 12 % ACN	1000	120	H <sub>2</sub> O + 12 % ACN	1000

Mezi hodnotou kritické micelární koncentrace SDS v 25 mM boritanovém pufru o pH 8,50 získanou pomocí metody založené na měření proudu a hodnotami *cmc* SDS v 25 mM boritanovém pufru o pH 8,50 získanými pomocí metody založené na měření retenčního času v závislosti na složení vzorku a době dávkování vzorku nebyly nalezeny statisticky významné rozdíly.

Efekt složení vzorku alkylbenzenů a doba dávkování vzorku na hodnotu *cmc* SDS stanovené pomocí metody založené na měření retenčního času byl sledován také v 25 mM boritanovém pufru o pH 8,50 s přídatkem 10 % ACN, obr. 1.11. Dávkované vzorky měly obdobné složení jako v předchozí studii.



**Obrázek 1.11:** Hodnota kritické micelární koncentrace v závislosti na složení vzorku alkybenzenů a na dávkování. Vložené napětí 20 kV. BGE: 25 mM boritanový pufr o pH 8,50 + 10 % ACN. Celková délka kapiláry 48 cm (efektivní délka 40 cm), vnitřní průměr 50  $\mu$ m. Teplota 25  $^{\circ}$ C.

Pomocí analýzy rozptylu byly vyhodnoceny rozdíly mezi hodnotami *cmc* SDS stanovenými metodou založenou na měření retenčního faktoru v 25 mM boritanovém pufru o pH 8,50 s přídatkem 10 % acetonitrilu jako statisticky významné. Na základě této analýzy byl dále proveden Tukeyův test mnohonásobného porovnání a dvojice systémů, mezi kterými byly nalezeny statisticky významné rozdíly, jsou uvedeny v tabulce 1.6.



**Tabulka 1.6:** Systémy mezi kterými byly nalezeny statisticky významné rozdíly v naměřených hodnotách *cmc*. Vliv složení vzorku AB na *cmc* SDS v 25 mM boritanovém pufru o pH 8,50 s přídatkem 10 % acetonitrilu.

Experimentální podmínky (systém) 1			Experimentální podmínky (systém) 2		
Koncentrace AB (mg/l)	Složení vzorku AB	Dávkování (mbar.s)	Koncentrace AB (mg/l)	Složení vzorku AB	Dávkování (mbar.s)
120	H <sub>2</sub> O	250	60	H <sub>2</sub> O	250
120	H <sub>2</sub> O	250	60	BGE + 6 % H <sub>2</sub> O	500
120	H <sub>2</sub> O	250	60	H <sub>2</sub> O + 6 % ACN	500
120	H <sub>2</sub> O	250	60	BGE + 6 % ACN	250
120	BGE + 12 % H <sub>2</sub> O	250	120	H <sub>2</sub> O	250
120	H <sub>2</sub> O + 12 % ACN	1000	60	H <sub>2</sub> O	250
120	H <sub>2</sub> O + 12 % ACN	1000	60	BGE + 6 % H <sub>2</sub> O	500
120	H <sub>2</sub> O + 12 % ACN	1000	60	H <sub>2</sub> O + 6 % ACN	500
120	BGE + 12 % ACN	500	60	H <sub>2</sub> O	250
120	BGE + 12 % ACN	500	60	BGE + 6 % H <sub>2</sub> O	500
120	BGE + 12 % ACN	500	60	H <sub>2</sub> O + 6 % ACN	500
120	BGE + 12 % ACN	1000	60	H <sub>2</sub> O	250
120	BGE + 12 % ACN	1000	60	H <sub>2</sub> O	500
120	BGE + 12 % ACN	1000	60	H <sub>2</sub> O	1000
120	BGE + 12 % ACN	1000	60	BGE + 6 % H <sub>2</sub> O	250
120	BGE + 12 % ACN	1000	60	BGE + 6 % H <sub>2</sub> O	500
120	BGE + 12 % ACN	1000	60	BGE + 6 % H <sub>2</sub> O	1000
120	BGE + 12 % ACN	1000	60	H <sub>2</sub> O + 6 % ACN	250
120	BGE + 12 % ACN	1000	60	H <sub>2</sub> O + 6 % ACN	500
120	BGE + 12 % ACN	1000	60	H <sub>2</sub> O + 6 % ACN	1000
120	BGE + 12 % ACN	1000	60	BGE + 6 % ACN	250
120	BGE + 12 % ACN	1000	60	BGE + 6 % ACN	500
120	BGE + 12 % ACN	1000	60	BGE + 6 % ACN	1000
120	BGE + 12 % ACN	1000	120	H <sub>2</sub> O	500
120	BGE + 12 % ACN	1000	120	H <sub>2</sub> O	1000
120	BGE + 12 % ACN	1000	120	BGE + 12 % H <sub>2</sub> O	250
120	BGE + 12 % ACN	1000	120	BGE + 12 % H <sub>2</sub> O	500
120	BGE + 12 % ACN	1000	120	BGE + 12 % H <sub>2</sub> O	1000
120	BGE + 12 % ACN	1000	120	H <sub>2</sub> O + 12 % ACN	250
120	BGE + 12 % ACN	1000	120	H <sub>2</sub> O + 12 % ACN	500
120	BGE + 12 % ACN	1000	120	BGE + 12 % ACN	250

Dodecylsírán sodný se vyrábí sulfatací dodekanolu a jelikož od výrobce není k dispozici v 100% čistotě, byl zkoumán i vliv koncentrace přidaného (tj. „zbytkového“) dodekanolu na hodnotu kritické micelární koncentrace SDS v 25 mM boritanovém pufru o pH 8,50. K tomuto účelu byla opět využita metoda založená na měření proudu. Tímto způsobem byly zjišťovány *cmc* dodecylsíranu sodného, ke kterému bylo přidáno 1, 3 a 5 % dodekanolu (m/m, vztaženo na navážku SDS). Hodnoty kritické micelární koncentrace dodecylsíranu sodného v 25 mM boritanovém pufru o pH 8,50 bez a s přidavkem dodekanolu jsou uvedeny v tabulce 1.7.

**Tabulka 1.7:** Hodnoty *cmc* SDS v 25 mM boritanovém pufru o pH 8,50 v závislosti na přidavku dodekanolu.

Přídavek dodekanolu; % (m/m)	<i>cmc</i> ± SD (mM)
0	5,54 ± 0,13
1	5,99 ± 0,02
3	5,70 ± 0,44
5	6,59 ± 0,02

Hodnoty kritické micelární koncentrace v 25 mM boritanovém pufru s přidavkem dodekanolu jsou vyšší než v roztoku bez přidavku dodekanolu a pomocí analýzy rozptylu byly vyhodnoceny statisticky významné rozdíly mezi hodnotou *cmc* získanou pro dodecylsírán sodný bez přidavku dodekanolu a s přidavkem 5 % (m/m) a mezi hodnotami *cmc* SDS s přidavkem 3 % (m/m) a 5 % (m/m) dodekanolu na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ , avšak nebyl pozorován žádný trend mezi koncentrací dodekanolu v roztoku a hodnotou kritické micelární koncentrace dodecylsíranu sodného. Z tohoto měření vyplývá, že do přidavku 3 % (m/m) dodekanolu ke komerčně dostupnému standardu dodecylsíranu sodného nemá koncentrace dodekanolu na hodnotu kritické micelární koncentrace dodecylsíranu sodného statisticky významný vliv.

## 1.6 Shrnutí

V této části disertační práce jsou porovnány elektroforetické metody využitelné pro stanovení kritické micelární koncentrace povrchově aktivních látek. Konkrétně se jednalo o metody založené na měření proudu, vodivosti, retenčního času, retenčního faktoru a pohyblivosti. U metody založené na použití retenčního faktoru a pohyblivosti byly zjištěny větší hodnoty směrodatných odchylek ve srovnání s metodami založenými na měření proudu a retenčního času. To může být dáno tím, že při výpočtu retenčního faktoru je třeba znát pohyblivost micel, která byla dopočítávána pomocí iteračního postupu a tím mohla být vnesena další nepřesnost do výsledné hodnoty *cmc*. Lze předpokládat, že v případě výpočtu kritické micelární koncentrace z pohyblivostí neutrálních látek mohly být hodnoty směrodatných odchylek menší, pokud by v oblasti blízké kritické micelární koncentrace bylo proměřeno více roztoků s menší diferencí koncentrace SDS a tím by bylo dosaženo přesnějšího proložení mocninné funkce a tím i přesnějšího stanovení *cmc*.

Výsledky studie byly uveřejněny v:

- ❖ Váňová J., Česla P., Fischer J., Stanovení kritické micelární koncentrace tenzidů pomocí kapilární elektroforézy. *XLVIII. seminář o tenzidech a detergentech: sborník přednášek* (2015) 63-71, ISBN 978-80-7395-942-5.

## 1.7 Seznam použité literatury

- [1] Lucy Ch. A., MacDonald A. M., Gulcev M. D., *Journal of Chromatography A* 1184 (2008) 81-105.
- [2] Felhofer J. L., Chumbimuni-Torres K. Y., Mora M. F., Haby G. G. a García C. D., *Capillary Electrophoresis and Microchip Capillary Electrophoresis: Principles, Applications, and Limitations* (2013) Kapitola 1: Critical Evaluation of the Use of Surfactants in Capillary Electrophoresis, p. 1-22. ISBN 9780470572175.
- [3] Šmidrkal J., *Chemické listy* 93 (1999) 421 – 427.
- [4] Fuguet E., Ráfols C., Rosés M., Bosch E., *Analytica Chimica Acta* 548 (2005) 95 – 100.
- [5] Cline Love L. J., Habarta J. G., Dorsey J. G., *Analytical Chemistry* 56 (1984).
- [6] Le Saux T., Varenne A., Gareil P., *Electrokinetic Chromatography: Theory, Instrumentation and Applications* Edited by U. Pyell, (2006) Kapitola 2: Determination of Critical Micellar Concentrations by Capillary Electrokinetic Techniques str. 33 – 54. John Wiley & Sons, Ltd. ISBN:0-470-87102-4.
- [7] Tickle D. C., Okafo G. N., Camilleri P., Jones R. F. D., Kirby A. J., *Analytical Chemistry* 66 (1994) 4121-4126.
- [8] Cifuentes A., Bernal J. L., Diez-Masa J. C., *Analytical Chemistry* 69 (1997) 4271-4274.
- [9] Mrestani Y., Claussen S., Neubert R. H. H., *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 30 (2002) 869-873.
- [10] Liu H., Gao Yu., Hu Z., *Journal of Analytical Chemistry* 62 (2007) 176-178.
- [11] Váňová J., *Diplomová práce* (2012) Pardubice.
- [12] Fischer J., *Analýza organických látek, sborník přednášek z kurzu* (1999) 228-238.
- [13] Terabe S., *Procedia Chemistry* 2 (2012) 2-8.
- [14] Ozaki H., Ichichara A., Terabe S., *Journal of Chromatography A* 709 (1995) 3-10.
- [15] Míková M., *Diplomová práce* (2007) Pardubice.
- [16] Terabe S., Otsuka K., Ichikawa K., Tsuchiya A., Ando T., *Analytical Chemistry* 56 (1984) 111.
- [17] Nakamura H., Sano A., Matsuura K., *Analytical Science* 14 (1998) 379-382.
- [18] Jacquire J. C., Desbène P. L., *Journal of Chromatography A* 718 (1995) 167-175.
- [19] Jandera P., Fischer J., *Journal of Chromatography A* 728 (1996) 279-298.

- [20] Fischer J., Jandera P., XXXV. *Seminář o tenzidech a detergentech, sborník přednášek* (2001) ISBN 80-7149-382-7, str. 11-22.
- [21] Carretero I., Maldonado M., Laserna J., *Analytica Chimica Acta* 259 (1992) 203-210.
- [22] Aranda E. O., Esteve-Romero J., Rambla-Alegre M., Peris-Vicente J., Bose D., *Talanta* 84 (2011) 314-318.
- [23] Beltrán-Martinavarró B., Peris-Vicente J., Rambla-Alegre M., Marco-Pieró S., Esteve-Romero J., Carda-Broch S., *Journal of AOAC International* 96 (2013) 870-874.
- [24] Lin Ch.-E., Chen M.-J., Huang H.-Ch., Chen H.-W., *Journal of Chromatography A* 924 (2001) 83-91.
- [25] Nagamine N., Nakamura H., *Analytical Sciences* 14 (1998) 405-406.
- [26] Lokajová J., Hruška V., Tesařová E., Gaš B., *Electrophoresis* 29 (2008) 1189-1195.
- [27] Klepárník K., Boček P., *Journal of Chromatography* 569 (1991) 3-42.
- [28] Hwang S.-Y., Wang X., Cong W.-T., Jin L.-T., Choi J.-K., *Electrophoresis* 35 (2014) 1089-1098.
- [29] Jensen H., Ostergaard J., Hansen S. H., *Electrophoresis* 28 (2007) 2975-2980.
- [30] Le Saux T., Varenne A., Gareil P., *Journal of Chromatography A* 1038 (2004) 275-282.
- [31] Le Saux T., Varenne A., Gareil P., *Journal of Chromatography A* 1041 (2004) 219-226.
- [32] Khan A. M., Shah S. S., *Journal of Chemical Society of Pakistan* 30 (2008) 186-191.
- [33] Vavříková M., *Diplomová práce* (2016) Pardubice.
- [34] Dubjaková E., *Diplomová práce* (2009) Brno. Dostupné z [http://is.muni.cz/th/151390/prif\\_m/diplomova\\_prace\\_ed.pdf](http://is.muni.cz/th/151390/prif_m/diplomova_prace_ed.pdf) (23.2.2017)

## 2 Porovnání rozdělovacích koeficientů oktanol-voda, micely-voda, liposomy-voda pro vybrané přírodní antioxidanty

Lipofilicita a hydrofilicita látek může být vyjádřena jejich rozdělovacím koeficientem mezi polární a napolární fází [1]. Logaritmus rozdělovacího koeficientu oktanol-voda,  $\log P_{o/w}$ , poskytuje informace o fyzikálně-chemických vlastnostech látek a je nejrozšířenějším způsobem pro popis hydrofilicity, lipofilicity a vztahů mezi strukturou a účinkem biologicky, farmakologicky a ekologicky významných sloučenin [2]. Je dán vztahem:

$$\log P_{o/w} = \log \frac{c_{oktanol}}{c_{voda}} \quad (2.1)$$

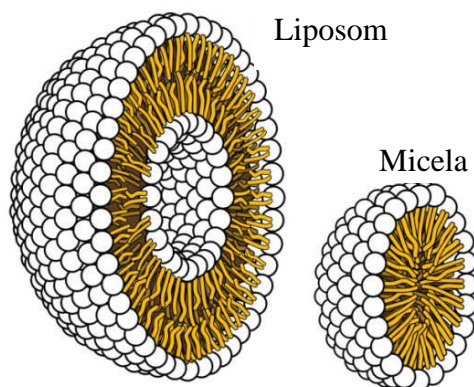
kde  $c_{oktanol}$  a  $c_{voda}$  jsou celkové koncentrace analytu v oktanolu, resp. ve vodné fázi. Rozdělovací koeficient oktanol-voda nezahrnuje náboj analytu. Ionizovatelné látky mohou být částečně nabitě v závislosti na pH prostředí. Rovnováhu analytu mezi oktanolem a pufrem o daném pH vyjádřenou rozdělovacím koeficientem,  $D$ , lze vypočítat ze znalosti  $P_{o/w}$ , pH a disociační konstanty analytu pKa [3]:

$$D = \frac{P_{o/w}}{1 + 10^{(pH-pKa)}} \quad (2.2)$$

### 2.1 Stanovení rozdělovacího koeficientu micely-vodná fáze, liposomy-vodná fáze

Ke stanovení rozdělovacího koeficientu látek v systému liposomy-vodná fáze a micely-vodná fáze lze využít kapilární elektroforézu, resp. liposomální elektrokinetickou chromatografii (LEKC) a micelární elektrokinetickou chromatografii (MEKC). LEKC i MEKC patří mezi elektrokinetické separační metody založené na kombinaci elektroforézy a interakcích analytu s pohybující se disperzní fází nazývanou také pseudostacionární fáze [4]. Tato pseudostacionární fáze je tvořena micelami nebo liposomy. Micely jsou agregáty povrchově aktivních látek, tenzidů. Micely vznikají v roztocích tenzidů o koncentraci vyšší než je jejich kritická micelární koncentrace ( $cmc$ ). Vznik micel byl diskutován již v kapitole 1 [5]. V roztoku fosfolipidů, ve kterém jejich koncentrace překročí kritickou agregační koncentraci, dochází ke vzniku liposomů. Rozdíl mezi liposomy a micelami je znázorněn na obr. 2.1. Z tohoto obrázku je patrné, že liposom je oproti micelle tvořen dvouvrstvou

povrchově aktivních látek a dochází tak k tomu, že ve vodných roztocích má liposom hydrofilní vrstvu nejen na povrchu, ale také uvnitř. Micela je tvořena pouze jednou vrstvou povrchově aktivních látek, a proto ve vodných roztocích jsou hydrofilní konce molekuly tenzidu orientovány ven a hydrofobní konce dovnitř micely. Interakce látky s liposomy lépe vystihuje interakce látek s membránami buněk v živém organismu.

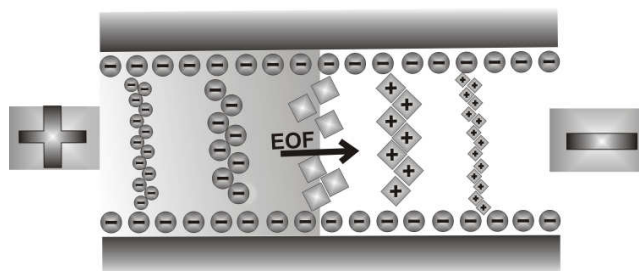


**Obrázek 2.1:** Schéma liposomu a micely [6].

Pseudostacionární fáze, tvořena nabitými molekulami nebo agregáty nabitých molekul, se pohybuje kapilárou v závislosti na jejím náboji [7]. Elektrokinetická chromatografie je založena na dvou základních jevech, elektroforéze a elektroosmóze. Elektroforézou je nazýván pohyb nabitě částice prostředím v přítomnosti elektrického pole (obr. 2.2). Elektroforetickou rychlost látek v elektrickém poli,  $v_{ep}$ , lze vyjádřit jako:

$$v_{ep} = \frac{\varepsilon \zeta E}{6\pi\eta} = \mu_{ep} E \quad (2.3)$$

kde  $\varepsilon$  je elektrická permitivita prostředí,  $\zeta$  je elektrokinetický potenciál (zeta potenciál) povrchu nabitě částice,  $E$  je intenzita elektrického pole,  $\eta$  je viskozita prostředí a  $\mu_{ep}$  je elektroforetická pohyblivost (mobilita) nabitě částice v daném prostředí.



**Obrázek 2.2:** Pohyb látek v elektrickém poli.

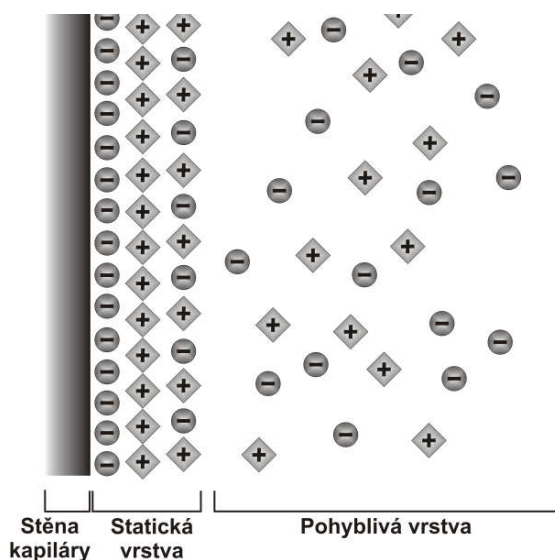
Druhý jev, elektroosmóza (způsobující elektroosmotický tok, *eof*), je dle IUPAC definován jako pohyb kapaliny skrz membránu nebo kapiláru následkem působení elektrického pole napříč membránou (resp. kapilárou) [4,8].

Rychlost *eof* je dána vztahem:

$$v_{eof} = \frac{\varepsilon\zeta E}{4\pi\eta} = \mu_{eof} E \quad (2.4)$$

kde  $v_{eof}$  je rychlost elektroosmotického toku a  $\mu_{eof}$  je pohyblivost elektroosmotického toku.

V důsledku vloženého napětí na kapiláru naplněnou základním elektrolytem vzniká na jejím vnitřním povrchu elektrická dvojvrstva a to selektivní adsorpcí iontů na disociované silanolové skupiny na vnitřním povrchu křemenné kapiláry. Elektrickou dvojvrstvu lze rozdělit na statickou a pohyblivou část (obr. 2.3), ve které směrem do roztoku zůstává přebytek volného náboje. V elektrickém poli pak dochází k pohybu nejen pohyblivé vrstvy, ale také díky vnitřnímu tření v kapalině i veškerého roztoku v kapiláře [9].

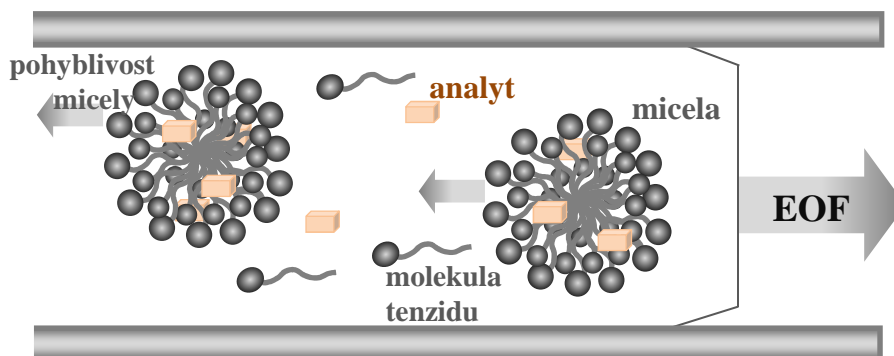


**Obrázek 2.3:** Vznik elektroosmotického toku v křemenné kapiláře. Upraveno dle [9].

K separaci látek pomocí elektrokinetické chromatografie dochází na základě jejich rozdílného distribučního koeficientu mezi pseudostacionární fází a vodnou mobilní fází (v MEKC je pseudostacionární fáze tvořena micelami, v LEKC liposomy). Jestliže mají micely nebo liposomy záporný náboj, pohybují se směrem k anodě. Pohyblivost elektroosmotického toku, pohybujícího se směrem ke katodě, bývá vyšší než pohyblivost micel, resp. liposomů, a proto je výsledný (zdánlivý) směr pohybu micel a liposomů ke



katodě. Neutrální analyt se v době interakce s micelami nebo liposomy pohybuje stejnou rychlostí jako dané agregáty. Pokud je analyt volně v roztoku, pohybuje se rychlostí elektroosmotického toku (obr. 2.4). Nabité analyty se v době, kdy neinteragují s pseudostacionární fází, pohybují rychlostí, která se rovná vektorovému součtu jejich elektroforetických rychlostí a rychlosti elektroosmotického toku.



**Obrázek 2.4:** Princip EKC (MEKC) upraveno dle [10].

Jelikož při analýze dochází k opakovanému ustavování a porušování distribuční rovnováhy, zdánlivá elektroforetická rychlost látky vyjádřená retenčním faktorem nebo její pohyblivost je přímo úměrná rozdělovacímu koeficientu [11]:

$$k = K_D \cdot \frac{V_{psp}}{V_{aq}} = K_D \cdot \Phi \quad (2.5)$$

kde  $k$  je retenční faktor,  $K_D$  je rozdělovací koeficient,  $V_{psp}$  je objem pseudostacionární fáze a  $V_{aq}$  je objem vodné fáze. Poměr  $V_{psp}/V_{aq}$  se nazývá fázový poměr,  $\Phi$ . Pro MEKC je fázový poměr dán rovnicí:

$$\Phi = \frac{V_{psp}}{V_{aq}} = \frac{v_{spec,vol} \cdot M \cdot (c_{PAL} - cmc)}{1 - (v_{spec,vol} \cdot M \cdot (c_{PAL} - cmc))} \quad (2.6)$$

kde  $v_{spec,vol}$  je parciální specifický objem micel,  $v_{spec,vol} = V_P/M$ , kde  $V_P$  je parciální molární objem micel, v této práci je použita hodnota parciálního molárního objemu micel SDS 0,246 l/mol [12],  $M$  je molární hmotnost,  $c_{PAL}$  je koncentrace povrchově aktivní látky a  $cmc$  je kritická micelární koncentrace.

Fázový poměr v LEKC lze spočítat obdobně:

$$\Phi = \frac{v_{spec,vol} \cdot M \cdot (c_{lip} - cac)}{1 - (v_{spec,vol} \cdot M \cdot (c_{lip} - cac))} \quad (2.7)$$

kde  $v_{spec,vol}$  je parciální specifický objem liposomů,  $M$  je molární hmotnost fosfolipidu,  $c_{lip}$  je aktuální koncentrace lipidů a  $cac$  je kritická agregační koncentrace. Podle Lokajové a kol. [13] lze předpokládat, že parciální specifický objem směsi liposomů, ve které je hlavní komponentou 1-palmitoyl-2-oleyl-*sn*-glycero-3-fosfocholin (POPC), se rovná parciálnímu specifickému objemu samotného POPC (0,996 ml/g, 30 °C) [14]. Molární hmotnost směsi fosfolipidů je dána součtem „parciálních“ molekulových hmotností jednotlivých fosfolipidů ( $mol\% A \cdot M(A) + mol\% B \cdot M(B)$ ).

## 2.2 Výpočet rozdělovacích koeficientů z efektivních pohyblivostí

Efektivní elektroforetickou pohyblivost analytu lze spočítat dle vztahu:

$$\mu_{eff} = \frac{l_t \cdot l_d}{U} \left( \frac{1}{t} - \frac{1}{t_0} \right) \quad (2.8)$$

kde  $l_t$  je celková délka kapiláry,  $l_d$  je efektivní délka kapiláry,  $U$  je hodnota vloženého napětí,  $t_0$  je migrační čas markeru elektroosmotického toku a  $t$  je migrační (retenční) čas analytu (v závislosti na tom, v jakém módu kapilární elektroforézy měříme).

Ze znalosti efektivní elektroforetické pohyblivosti analytu v MEKC nebo LEKC módu  $\mu_{eff}$ , efektivní elektroforetické pohyblivosti analytu v CZE módu  $\mu_0$  a elektroforetické pohyblivosti pseudostacionární fáze (micel nebo liposomů)  $\mu_{psp}$  lze vypočítat retenční faktor  $k$ :

$$k = \frac{\mu_{eff} - \mu_0}{\mu_{psp} - \mu_{eff}} \quad (2.9)$$

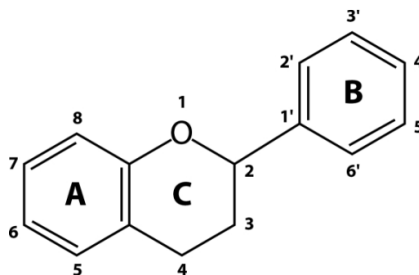
Pohyblivost micel/liposomů je možné stanovit např. pomocí iteračního postupu, který využívá homologickou řadu neutrálních molekul s rozdílnou hydrofobicitou [15,16].

## 2.3 Přírodní antioxidanty

Antioxidanty jsou sekundárními metabolity rostlin, které mohou chránit organismus před působením volných radikálů díky jejich schopnosti zhášet volné radikály a inhibovat oxidační procesy. Mohou tak zlepšit imunitní funkci organismu [18]. U antioxidantů byly pozorovány antiaterosklerotické, protizánětlivé, protinádorové, antibakteriální, antivirové a antitrombogenní účinky [20,21].

Základní rozdělení antioxidantů na základě jejich struktury je uvedeno v tabulce 2.1 [22]. Jednoduché fenoly jsou reprezentovány kumariny a fenolickými kyselinami. Fenolické kyseliny se dělí dle toho, zda se jedná o deriváty kyseliny benzoové nebo skořicové [23,24]. Předpokládá se, že u antioxidantů typu polyfenolů je antioxidační schopnost dána přítomností hydroxylové skupiny v pozici 3, dvojnou vazbou mezi uhlíky v pozici 2 a 3, karbonylovou skupinou v pozici 4 a polyhydroxylací aromatického kruhu A a B [19].

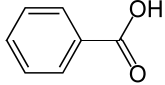
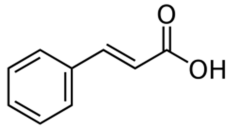
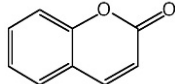
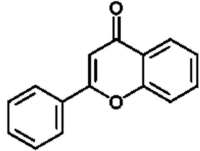
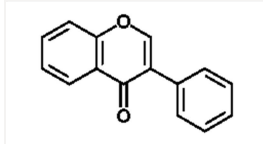
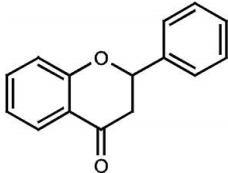
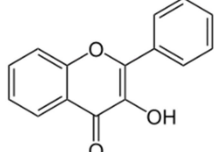
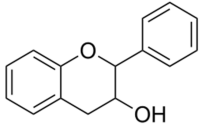
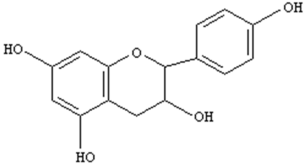
Mezi nejhojněji se vyskytující přírodní antioxidanty v naší stravě patří flavonoidy (obrázek 2.5), které se řadí mezi polyfenoly. Základní struktura flavonoidů je tvořena flavanovým jádrem obsahujícím 15 atomů uhlíku uspořádaných do tří kruhů (C6-C3-C6). Flavonoidy se dále dělí do šesti skupin - flavony, flavonoly, flavanoly, flavanony, isoflavony a antokyaniny. Flavonoidy jsou do jednotlivých skupin zařazeny na základě rozdílností ve struktuře dané různým stupněm hydroxylace, metoxylace nebo glykosylace.



**Obrázek 2.5:** Základní struktura flavonoidů.

Antioxidanty lze dále rozdělit na základě mechanismu jejich účinku na primární, sekundární a synergické. Primární antioxidanty jsou schopné ukončit oxidativní řetězovou reakci poskytnutím vodíku nebo elektronu volnému radikálu. Sekundární antioxidanty jsou schopné rozložit peroxidy lipidů na stabilní koncový produkt a předejít tak jejich oxidaci a vzniku radikálů. Synergické antioxidanty fungují jako zhášedce kyslíku a jsou schopné vázat kovové ionty, které mohou generovat reaktivní částice [25,26].

Tabulka 2.1: Rozdělení přírodních antioxidantů a jejich základní struktura.

Fenolické sloučeniny	Jednoduché fenoly	Fenolické kyseliny	Deriváty benzoové kyseliny	
		Deriváty skořicové kyseliny		
		Kumariny		
	Polyfenoly	Flavonoidy	Flavony	
			Isoflavony	
			Flavanony	
			Flavonoly	
			Flavanoly	
			Antokyaniny	
			Taniny	Hydrolyzující
Nehydrolyzující				

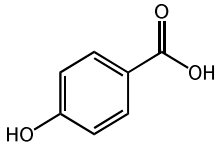
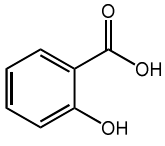
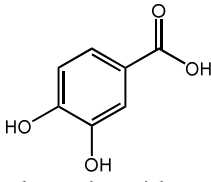
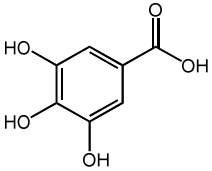
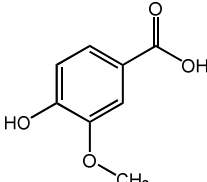
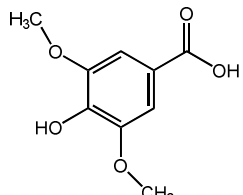
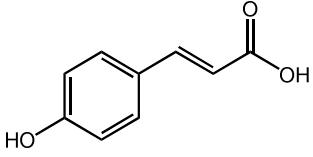
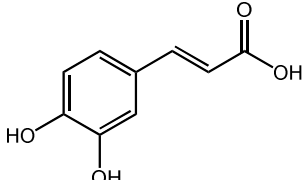
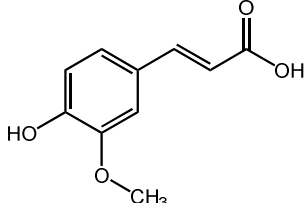
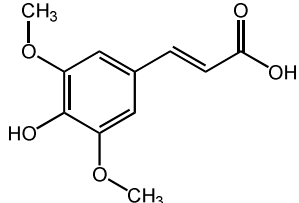
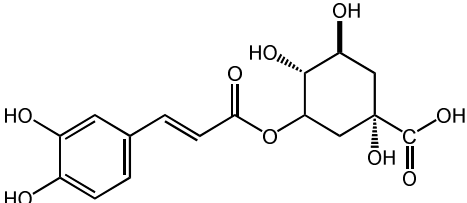
*In vivo* efekt antioxidantů je závislý na jejich lipofilicitě a hydrofilicitě, které ovlivňují jejich interakce s membránou a proteiny, a jsou zodpovědné za jejich průnik na místo působení. Jak již bylo uvedeno, hydrofobicita analytu je nejčastěji popisována rozdělovacím koeficientem oktanol-voda, pro lepší porozumění chování látek v živém organismu se s výhodou používá rozdělovací koeficient liposomy-vodná fáze, kde je zahrnut i vliv van der Waalových a donor-akceptorových interakcí mezi analyty a liposomální fází [27].

## 2.4 Experimentální část

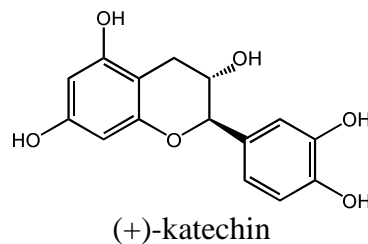
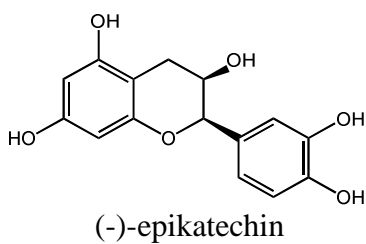
### 2.4.1 Seznam použitých chemikálií

1-Palmitoyl-2-oleyl-*sn*-glycero-3-fosfocholin (POPC), 1-palmitoyl-2-oleyl-*sn*-glycero-3-fosfo-L-serin (POPS), 1-palmitoyl-2-oleyl-*sn*-glycero-3-fosfo-(1'-rac-glycerol) (POPG) byly zakoupeny od firmy Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA). Dodecylsírán sodný (SDS) byl od firmy Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) stejně jako hydrogenfosforečnan sodný. Dihydrogenfosforečnan sodný byl od firmy Sigma-Aldrich (Steinheim, Německo). Metanol byl od firmy VWR International (Espoo, Finsko) a hydroxid sodný od firmy FF-Chemicals (Yli-li, Finsko). Alkylbenzoáty a thiomčovina byly získány od firmy Sigma-Aldrich. Deionizovaná voda byla připravena pomocí systému Millipore Milli-Q. Standardy fenolických kyselin a flavonoidů (viz tabulka 2.2) byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich.

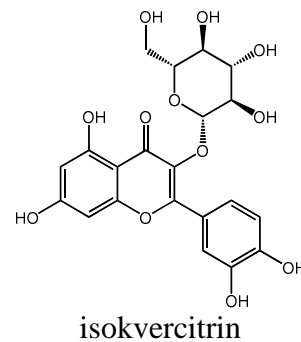
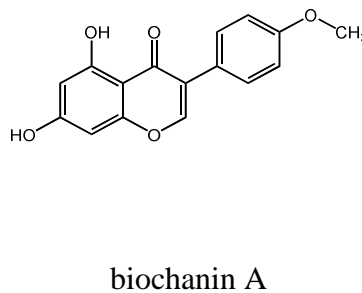
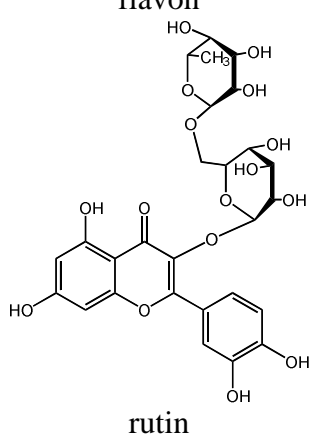
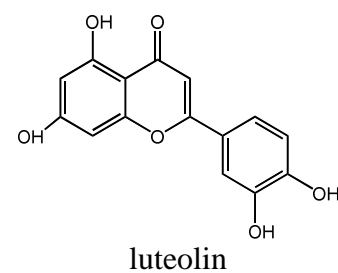
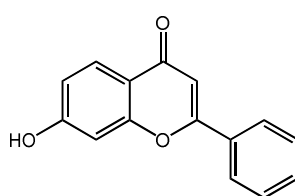
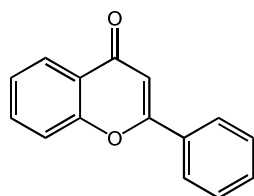
**Tabulka 2.2:** Seznam studovaných fenolických kyselin a flavonoidů.

Benzoová kyselina				
	p-hydroxybenzoová kyselina	salicylová kyselina	protokatechová kyselina	
				
	galová kyselina	vanilová kyselina	syringová kyselina	
	Skořicová kyselina			
		p-kumarová kyselina	káвовá kyselina	ferulová kyselina
				
sinapová kyselina		chlorogenová kyselina		

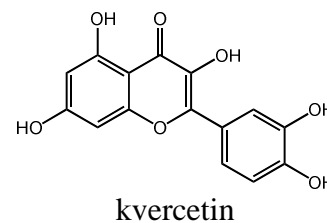
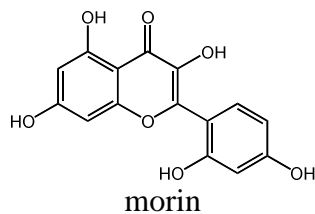
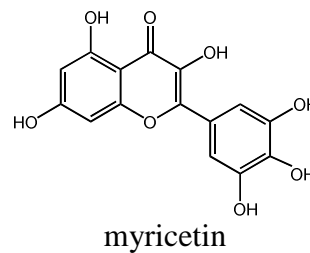
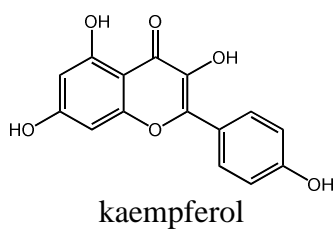
**Flavanol**



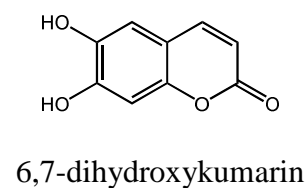
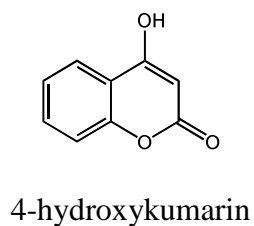
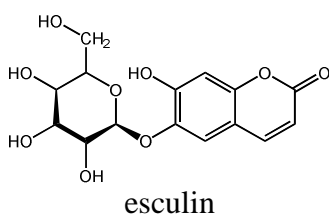
**Flavon**



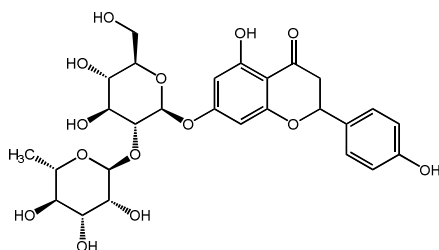
**Flavonol**



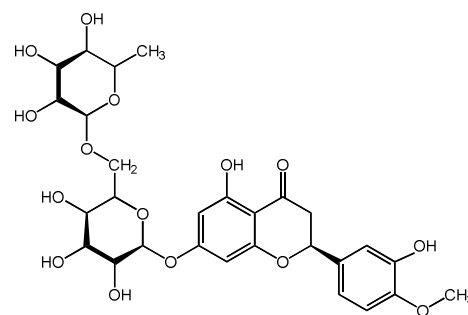
**Kumarin**



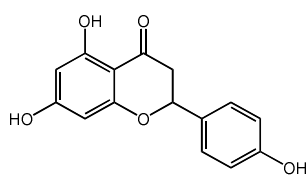
## Flavanon



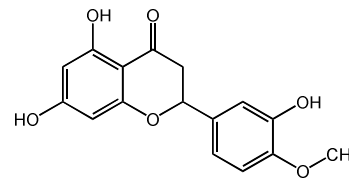
naringin



hesperidin



naringenin



hesperetin

### 2.4.2 Přístrojové vybavení

Stanovení rozdělovacích koeficientů micely-vodná fáze a liposomy-vodná fáze bylo provedeno na přístroji pro kapilární elektroforézu Agilent CE 7100 (Agilent, Palo Alto, CA, USA). Přístroj je vybaven autosamplerem, zdrojem vysokého napětí, temperovanou kazetou s kapilárou a detektorem s diodovým polem. K nastavování podmínek pro analýzu a k vyhodnocování získaných dat byl využit program ChemStation.

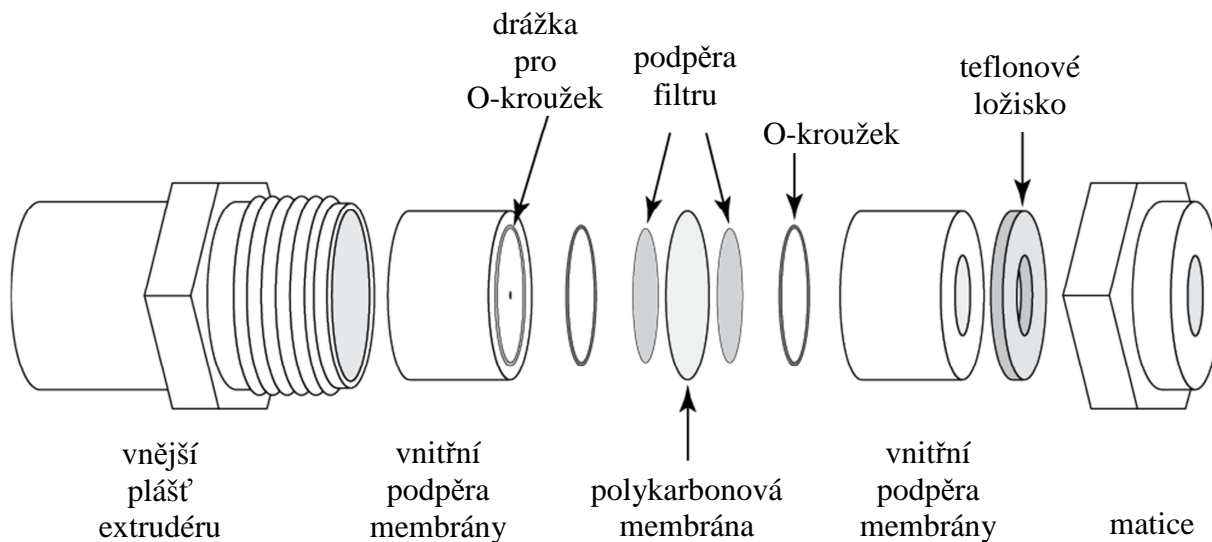
### 2.4.3 Pracovní postup

Fosfátový pufr o iontové síle  $I = 20$  mM a pH 7,40 byl připraven smísením roztoku hydrogenfosforečnanu sodného a dihydrogenfosforečnanu sodného (celková koncentrace fosfátových aniontů se rovnala 8,2 mM a sodných kationtů 14,1 mM). Fosfátový pufr byl filtrován přes 0,45  $\mu\text{m}$  filtr.

Pracovní elektrolyt pro LEKC byl připraven ze zásobních roztoků POPC (20 mM v chloroformu), POPS (12,7 mM v chloroformu), POPG (10 mM v chloroformu, skladovaných při  $-18$  °C) a fosfátového pufru. Vypočítaná množství zásobních roztoků liposomů byla smísená v mikrozkuhavce a odpařena do sucha proudem vzduchu za vzniku filmu na stěně mikrozkuhavky. Případné zbytky chloroformu byly odstraněny v exsikátoru, kde byla hodnota tlaku 8-100 mbar. Po dvaceti hodinách byl vzniklý film na stěně mikrozkuhavky hydratován fosfátovým pufrům o  $I = 20$  mM a pH 7,40. Roztok byl třepán (1000 rpm) při teplotě 60 °C po dobu 1 hod. Poté byl roztok 19x extrudován přes Nucleopore



Track-Etch membránu (Whatman) s póry o velikosti 100 nm (schéma extrudéru je znázorněno na obr. 2.6). Výsledná koncentrace zásobního roztoku POPC/POPS 80/20 (mol%) a POPC/POPG 80/20 (mol%) ve fosfátovém pufru byla 4 mM. Koncentrace lipidů v pracovním elektrolytu byla 0,5 mM.



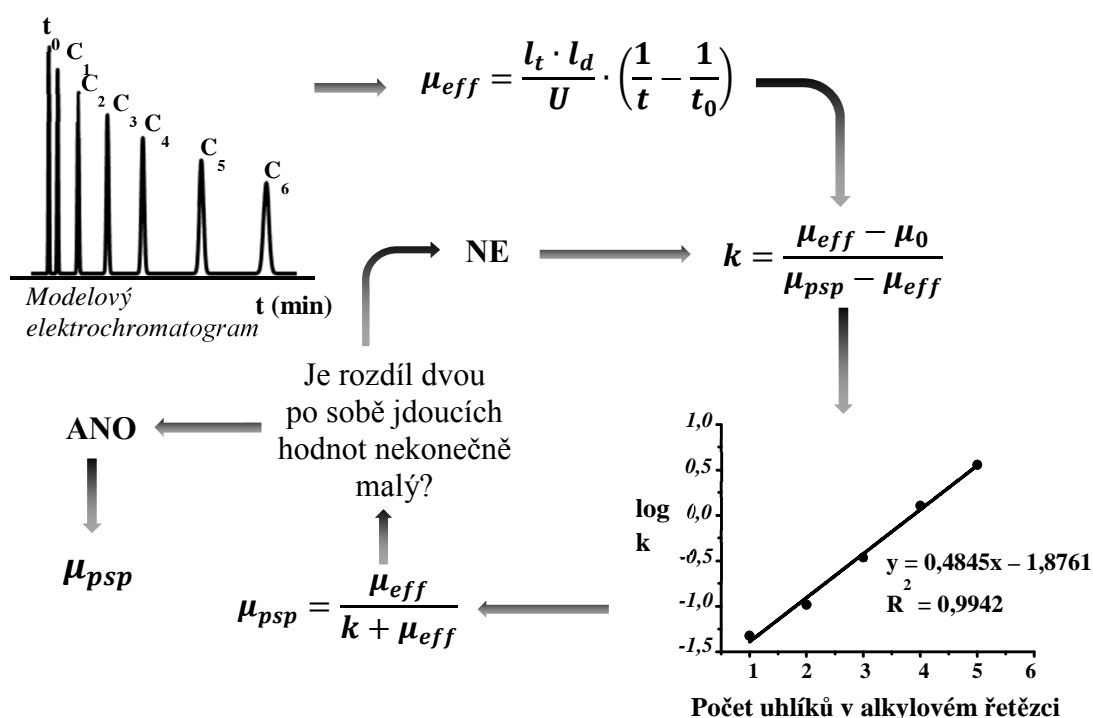
**Obrázek 2.6:** Schéma extrudéru [28].

Analýzy v MEKC probíhaly v 5,2 mM SDS ve fosfátovém pufru o pH 7,40 a iontové síle  $I = 20$  mM. Ze standardů vybraných fenolických kyselin a flavonoidů byly připraveny zásobní roztoky v metanolu o koncentraci 1 g/l. Pro analýzu byly použity analyty o koncentraci 25 mg/l s výjimkou morinu, biochaninu A, esculinu, isokvercitrinu, luteolinu, myricetinu (50 mg/l, s přidavkem 20 % metanolu v/v). Jako marker elektroosmotického toku byla použita thiomočovina (koncentrace 0,5 mM).

Experimenty probíhaly v nepokryté křemenné kapiláře (Agilent) o průměru 50  $\mu\text{m}$  a celkové délce 36,5 cm (efektivní délka 28 cm). Nová kapilára byla před první použitím promyta 15 min 0,1 M NaOH, 15 min milliQ vodou a 15 min základním elektrolytem (v případě LEKC byla kapilára promývána základním elektrolytem po dobu 5 min). Vzorek byl dávkován hydrodynamicky tlakem 50 mbar po dobu 5 s. Vložené napětí mělo hodnotu 20 kV, teplota během analýzy byla nastavena na 25 °C a použitá vlnová délka detektoru byla 214 a 254 nm.

Výsledná hodnota rozdělovacího koeficientu  $K_D$  byla vypočítána dle vztahu (2.5), kde pro výpočet fázového poměru je třeba znát hodnotu kritické micelární koncentrace, resp. kritické agregační koncentrace. Hodnota kritické micelární koncentrace SDS v I = 20 mM fosfátovém pufru o pH 7,40 byla stanovena pomocí kapilární elektroforézy a byla použita metoda založená na měření proudu (viz. Kapitola 1 – Porovnání metod využívajících kapilární elektroforézu pro stanovení kritické micelární koncentrace vybraných tenzidů). Hodnota kritické agregační koncentrace byla získána z literatury [17].

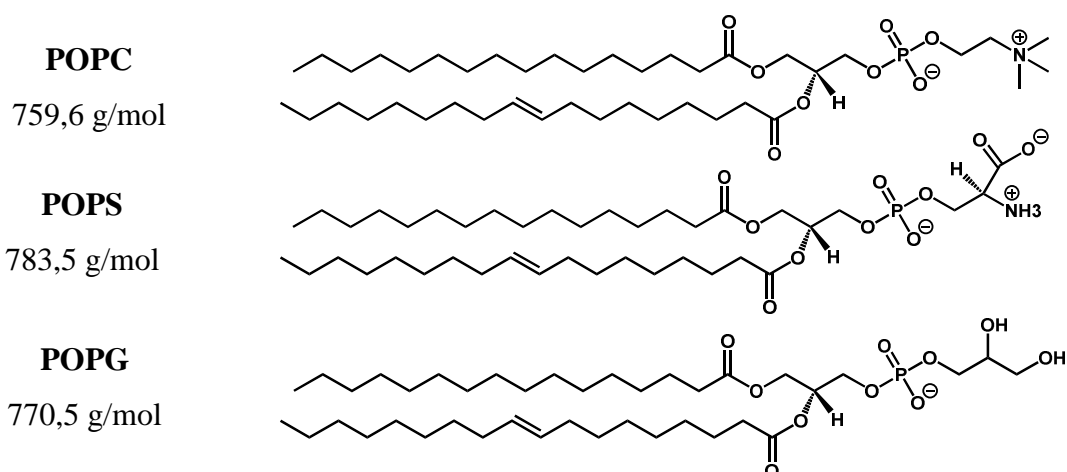
Z naměřených retenčních časů pro homologickou řadu alkylbenzoátů byla vypočítána jejich efektivní elektroforetická pohyblivost. V prvním kroku byla nahrazena pohyblivost pseudostacionární fáze efektivní elektroforetickou pohyblivostí hexylbenzoátu a byly vypočítány retenční faktory pro alkylbenzoáty s počty uhlíků v alkyly 1 - 5. Do grafu byla vynesena závislost  $\log k$  na počtu uhlíků v alkylovém řetězci a z rovnice lineární regrese byla vypočítána nová hodnota pohyblivosti pseudostacionární fáze. Dále se postupovalo iteračním postupem dle schématu na obrázku 2.7.



Obrázek 2.7: Schéma iteračního postupu.

## 2.5 Výsledky a diskuze

Ke stanovení rozdělovacích koeficientů vybraných přírodních antioxidantů byly použity liposomy POPC/POPS 80:20 mol%, POPC/POPG 80:20 mol% a micely dodecylsírany sodného. Struktury použitých fosfolipidů jsou uvedeny na obrázku 2.8. Liposomy a micely tvořily pseudostacionární fázi liposomální resp. micelární elektrokinetické chromatografie. Jako základní elektrolyt byl použit fosfátový pufr o iontové síle 20 mM a pH 7,40.



**Obrázek 2.8:** Struktury použitých fosfolipidů.

### 2.5.1 Stanovení elektroforetické pohyblivosti liposomů/micel

Nedílnou součástí procesu stanovení rozdělovacího koeficientu pomocí elektrokinetické chromatografie je stanovení elektroforetické pohyblivosti pseudostacionární fáze – liposomů a micel. Jak pro stanovení pohyblivosti liposomů POPC/POPS a POPC/POPG tak i micel SDS byl použit iterační postup s využitím homologické řady alkylbenzoátů (C1-C6) detailně popsany v experimentální části. Tímto způsobem vypočtená pohyblivost liposomů POPC/POPS (o koncentraci 0,5 mM v I = 20 mM fosfátovém pufru o pH 7,40) byla  $-4,18 \cdot 10^{-8} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . Pohyblivost POPC/POPG liposomů za stejných podmínek byla  $-4,33 \cdot 10^{-8} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$  a pohyblivost micel SDS byla  $-4,57 \cdot 10^{-8} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ .

### 2.5.2 Stanovení rozdělovacích koeficientů přírodních antioxidantů

Z naměřených dat efektivních elektroforetických pohyblivostí látek v LEKC, MEKC a CZE systému a z vypočtených hodnot fázového poměru byly vypočítány rozdělovací koeficienty vybraných antioxidantů mezi liposomy POPC/POPS 80:20 (mol%), POPC/POPG

80:20 (mol%), micelami SDS a fosfátovým pufrům o pH 7,40 a I = 20 mM. Získané hodnoty rozdělovacích koeficientů micely nebo liposomy-vodná fáze byly porovnány s hodnotami běžně používanými pro charakteristiku látek a to rozdělovacím koeficientem oktanol-voda, resp. oktanol-pufr. Pro ionizovatelné látky byly použity hodnoty  $\log D_{pH\ 7,4}$  pro pH 7,40 a pro neutrální látky byly použity hodnoty  $\log P_{o/w}$ , obojí predikované s použitím ACD/Labs Percepta Platform – PhysChem Module. Hodnoty jsou uvedeny v tabulce 2.3. Hodnoty pKa byly predikované s použitím Advanced Chemistry Development (ACD/Labs) Software V11.02 (© 1994-2015 ACD/Labs).

**Tabulka 2.3:** Predikované hodnoty pKa,  $\log P_{o/w}$  a  $\log D_{pH\ 7,4}$  pro studované sloučeniny pomocí programu ACD/Labs.

sloučenina	pKa	$\log P_{o/w}$	$\log D_{pH\ 7,4}$
4-hydroxybenzoová kyselina	4,57 ± 0,10	1,42	-1,15
salicylová kyselina	3,01 ± 0,10	2,06	-0,77
protokatechová kyselina	4,45 ± 0,10	1,16	-1,86
galová kyselina	4,33 ± 0,10	0,91	-2,30
vanilová kyselina	4,45 ± 0,10	1,33	-1,46
syringová kyselina	4,33 ± 0,10	1,13	-1,63
p-kumarová kyselina	4,65 ± 0,10	1,88	-1,32
káвовá kyselina	4,58 ± 0,10	1,42	-1,74
ferulová kyselina	4,58 ± 0,10	1,64	-1,38
sinapová kyselina	4,53 ± 0,10	1,29	-2,02
chlorogenová kyselina	3,91 ± 0,50	-0,36	-3,91
(-)-epikatechin	9,54 ± 0,10	0,49	0,56
(+)-katechin	9,54 ± 0,10	0,49	0,56
flavon	-	3,56	3,42
7-hydroxyflavon	7,02 ± 0,40	3,32	2,76
luteolin	6,50 ± 0,40	2,40	1,12
rutin	6,17 ± 0,40	1,76	-1,75
biochanin A	6,50 ± 0,20	3,14	1,97
isokvercitrin	6,17 ± 0,40	1,75	-1,19
kaempferol	6,34 ± 0,40	2,05	0,81
myricetin	6,30 ± 0,40	2,11	0,26
kvercetin	6,31 ± 0,40	2,08	0,58

morin	6,30 ± 0,40	1,61	0,34
naringin	7,17 ± 0,40	2,73	-0,05
naringenin	7,52 ± 0,40	3,19	2,22
hesperetin	7,49 ± 0,40	2,90	2,25
hesperidin	7,15 ± 0,40	1,78	-0,26
esculin	7,00 ± 0,20	-1,52	-1,92
4-hydroxykumarin	4,50 ± 1,00	1,60	-1,72
6,7-dihydroxykumarin	8,60 ± 1,00	0,98	1,30

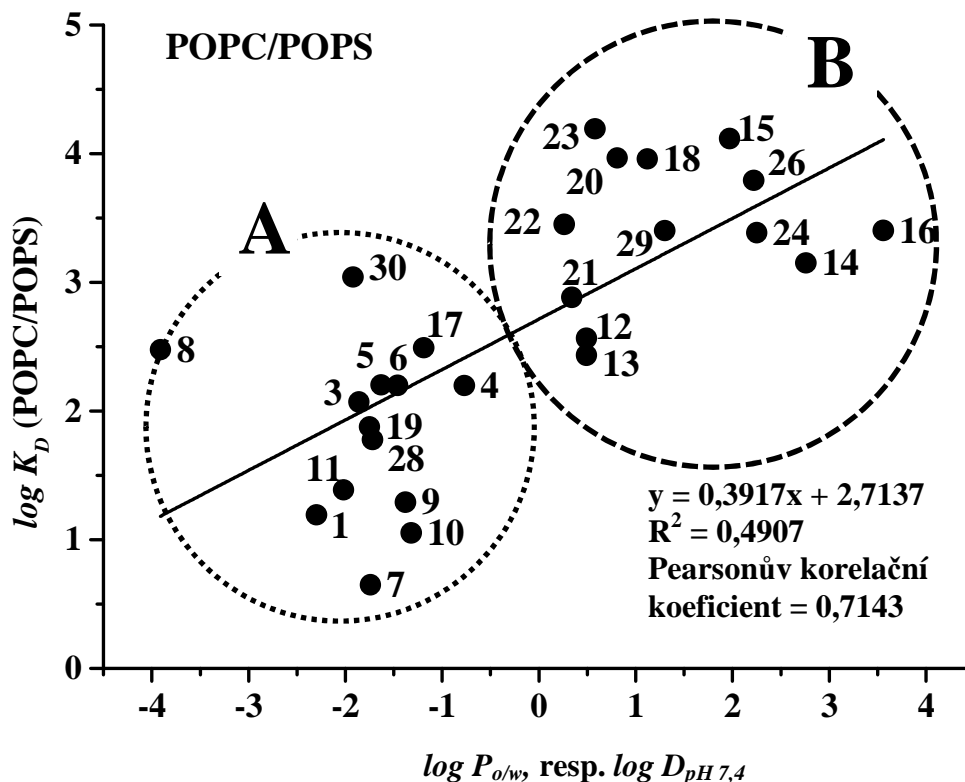
Hodnoty rozdělovacích koeficientů vypočítané podle vztahu (2.5) vybraných fenolických kyselin a flavonoidů vypočítané z experimentálních dat získaných pomocí LEKC a MEKC jsou uvedeny v tabulce 2.4.

**Tabulka 2.4:** Rozdělovací koeficienty analytů získané pomocí LEKC a MEKC.

sloučenina	log $K_D$ (POPC/POPS)	log $K_D$ (POPC/POPG)	log $K_D$ (SDS)
galová kyselina	1,19	1,37	2,30
4-hydroxybenzoová kyselina	--	2,13	2,21
protocatechová kyselina	2,07	1,14	1,97
salicylová kyselina	2,20	2,54	2,68
syringová kyselina	1,76	1,85	2,32
vanilová kyselina	2,20	1,69	2,34
káвовá kyselina	0,65	--	2,18
chlorogenová kyselina	2,48	2,49	1,98
ferulová kyselina	1,29	0,79	2,33
p-kumarová kyselina	1,05	1,74	2,22
sinapová kyselina	1,39	1,86	2,42
(+)-katechin	2,43	2,22	--
(-)-epikatechin	2,57	2,50	--
7-hydroxyflavon	3,15	3,42	3,10
biochanin A	4,12	4,62	3,25
flavon	3,40	3,47	--
isokvercitrin	2,46	2,20	2,45
luteolin	3,96	3,72	3,00

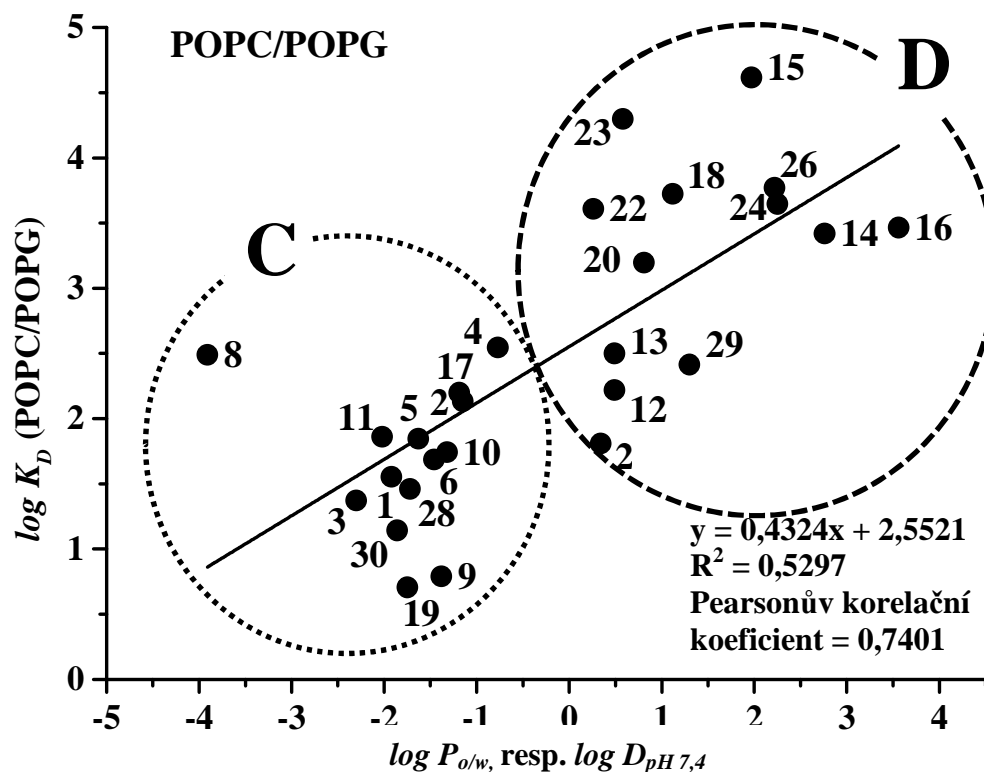
rutin	1,88	0,71	2,59
kaempferol	3,97	3,20	3,11
morin	2,88	1,81	2,41
myricetin	3,45	3,61	2,65
kvercetin	4,19	4,30	--
hesperetin	3,39	3,65	2,60
hesperidin	--	--	--
naringenin	3,79	3,77	2,60
naringin	--	--	--
4-hydroxykumarin	1,78	1,46	2,29
6,7-dihydroxykumarin	3,40	2,41	2,23
esculin	2,47	1,55	2,09

Vypočítané hodnoty  $\log K_D$  (POPC/POPS) byly porovnány s tabelovanými hodnotami  $\log D_{pH\ 7,4}$ , resp.  $\log P_{o/w}$ . Graf korelace je uveden na obrázku 2.9. Data byla vyhodnocena pomocí programů Statistica 12 a grafického programu Origin 9. Na grafu lze nalézt dvě skupiny analyzovaných sloučenin. Ve skupině A se nacházejí fenolické kyseliny, sloučeniny patřící mezi glykosidy (esculin, rutin, isokvercitrin) a 4-hydroxykumarin. Ve skupině B se vyskytují ostatní sloučeniny s výjimkou hesperidinu, naringinu a 4-hydroxybenzoové kyseliny. Hesperidin a naringin také patří mezi glykosidy a za daných podmínek nedocházelo k interakci mezi liposomy POPC/POPS a těmito sloučeninami. To může být způsobeno nízkou hydrofobicitou těchto sloučenin. Hodnota  $\log D_{pH7,4}$  pro hesperidin je -0,26 a pro naringin -0,05. Polární charakter látek v kombinaci s jejich objemnou molekulou může částečně vysvětlit absenci interakcí mezi těmito sloučeninami a liposomy POPC/POPS.



**Obrázek 2.9:** Korelace mezi  $\log K_D$  (POPC/POPS) a  $\log P_{o/w}$ , resp.  $\log K_D$  (POPC/POPS) a  $\log D_{pH\ 7,4}$ .  
 1 – galová kyselina, 3 – protokatechová kyselina, 4 – salicylová kyselina, 5 – syringová kyselina, 6 – vanilová kyselina, 7 – kávová kyselina, 8 – chlorogenová kyselina, 9 – ferulová kyselina, 10 – p-kumarová kyselina, 11 – sinapová kyselina, 12 – (+)-katechin, 13 – (-)-epikatechin, 14 – 7-hydroxyflavon, 15 – biochanin A, 16 – flavon, 17 – isokvercitrin, 18 – luteolin, 19 – rutin, 20 – kaempferol, 21 – morin, 22 – myricetin, 23 – kvercetin, 24 – hesperetin, 26 – naringenin, 28 – 4-hydroxykumarin, 29 – 6,7-dihydroxykumarin, 30 – esculin.

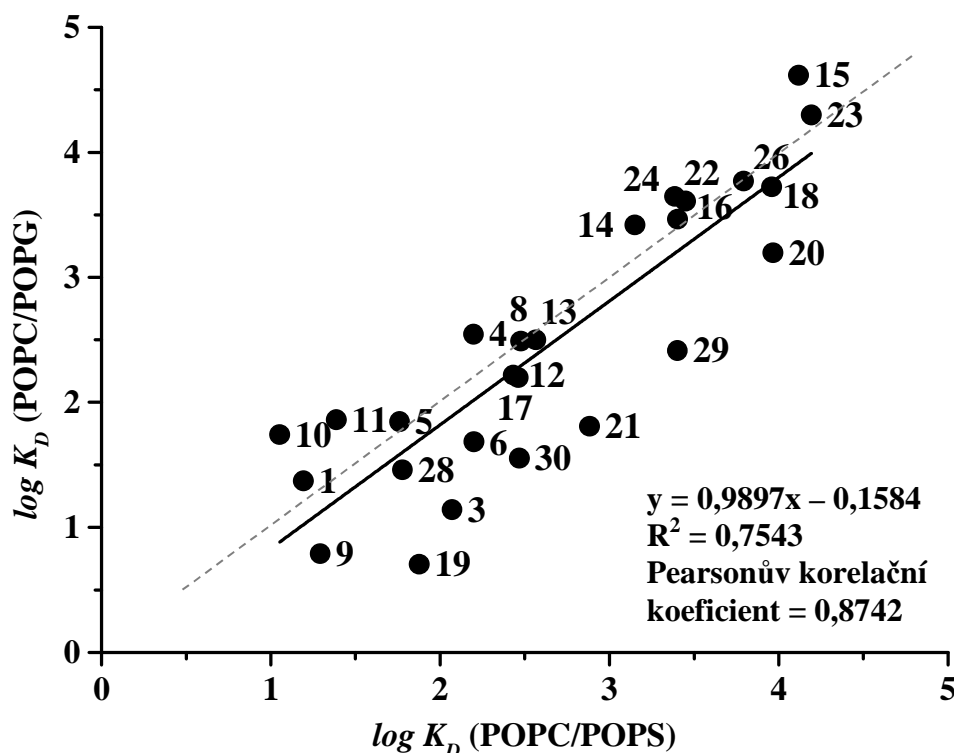
Obdobným způsobem byly studovány interakce vybraných analytů a liposomů tvořených POPC/POPG 80:20 mol% pomocí LEKC. Získané hodnoty distribučních koeficientů liposomy-vodná fáze ( $I = 20$  mM fosfátový pufr, pH 7,40, tab. 2.4) byly porovnány s tabelovanými hodnotami distribučních koeficientů oktanol-voda. Byl zkonstruován graf závislosti  $\log K_D$  (POPC/POPG) na  $\log P_{o/w}$ , resp.  $\log D_{pH\ 7,4}$ . Tento graf je znázorněn na obrázku 2.10. Podobně jako v předchozím případě je možné pozorovat rozdělení sloučenin do dvou skupin. Ve skupině C jsou fenolické kyseliny (výjimkou je kyselina kávová), glykosidované flavonoidy a 4-hydroxykumarin. Skupinu D reprezentují jednoduché flavonoidy (vyjma hesperidinu a naringinu). Za daných podmínek se kyselina kávová, hesperidin a naringenin nezadržovaly a tudíž jejich retenční faktor byl roven nule.



**Obrázek 2.10:** Korelace mezi  $\log K_D$  (POPC/POPS) a  $\log P_{o/w}$ , resp.  $\log K_D$  (POPC/POPS) a  $\log D_{pH\ 7,4}$ . 1 – galová kyselina, 2 – 4-hydroxybenzoová kyselina, 3 – protokatechová kyselina, 4 – salicylová kyselina, 5 – syringová kyselina, 6 – vanilová kyselina, 8 – chlorogenová kyselina, 9 – ferulová kyselina, 10 – p-kumarová kyselina, 11 – sinapová kyselina, 12 – (+)-katechin, 13 – (-)-epikatechin, 14 – 7-hydroxyflavon, 15 – biochanin A, 16 – flavon, 17 – isokvercitrin, 18 – luteolin, 19 – rutin, 20 – kaempferol, 21 – morin, 22 – myricetin, 23 – kvercetin, 24 – hesperetin, 26 – naringenin, 28 – 4-hydroxykumarin, 29 – 6,7-dihydroxykumarin, 30 – esculin.

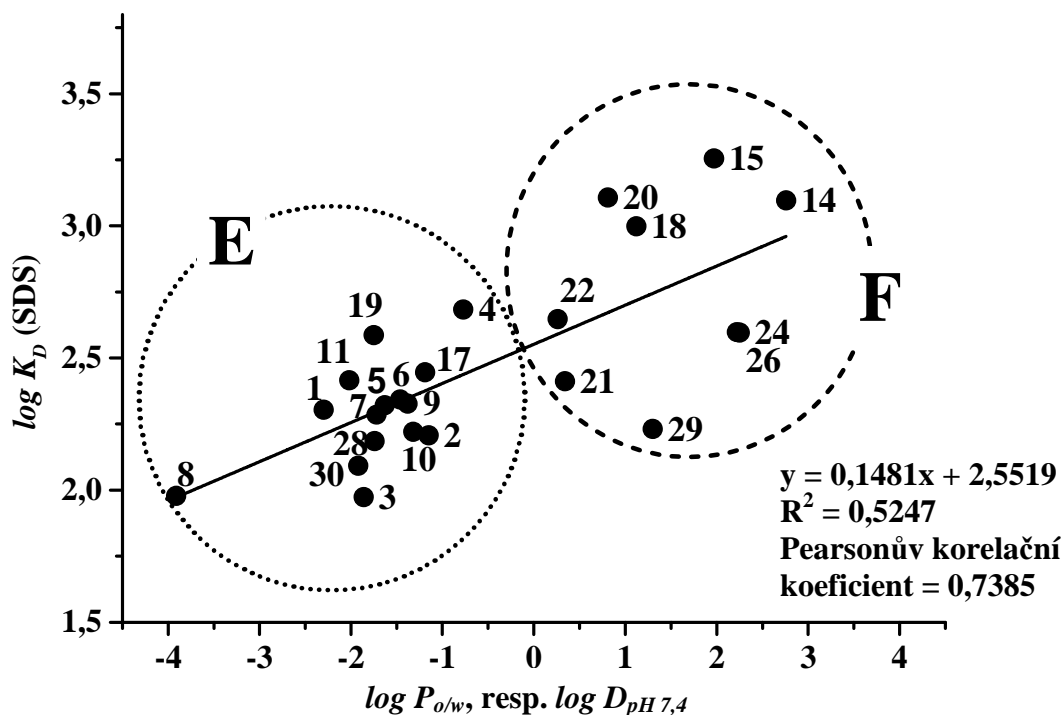
Statisticky byla závislost dat charakterizována pomocí Pearsonova korelačního koeficientu. Pro systém POPC/POPS vs.  $\log P_{o/w}$ , resp.  $\log D_{pH\ 7,4}$  má Pearsonův korelační koeficient hodnotu 0,7143 ( $R^2 = 0,4907$ ) a pro systém POPC/POPG vs.  $\log P_{o/w} / \log D_{pH\ 7,4}$  hodnotu 0,7401 ( $R^2 = 0,5297$ ). Pearsonovy korelační koeficienty spadají do intervalu 0,7 - 0,8, což indikuje silnou korelaci. Dále byly porovnány vypočítané logaritmy rozdělovacích koeficientů analyzovaných látek v obou liposomálních systémech navzájem (obr. 2.11). Studované sloučeniny, u kterých bylo sledováno stejné chování v obou LEKC systémech leží na šedě čárkované přímce ( $y = x$ ), konkrétně se jedná o kyselinu syringovou a chlorogenovou, (-)-epikatechin, flavon a naringenin. Pearsonův korelační koeficient je v tomto případě větší než 0,85, což značí, že korelace mezi hodnotami  $\log K_D$  získané pro systém s POPC/POPS a POPC/POPG je silnější než korelace mezi  $\log K_D$  a tabelovanými hodnotami  $\log P_{o/w} / \log D_{pH\ 7,4}$ .





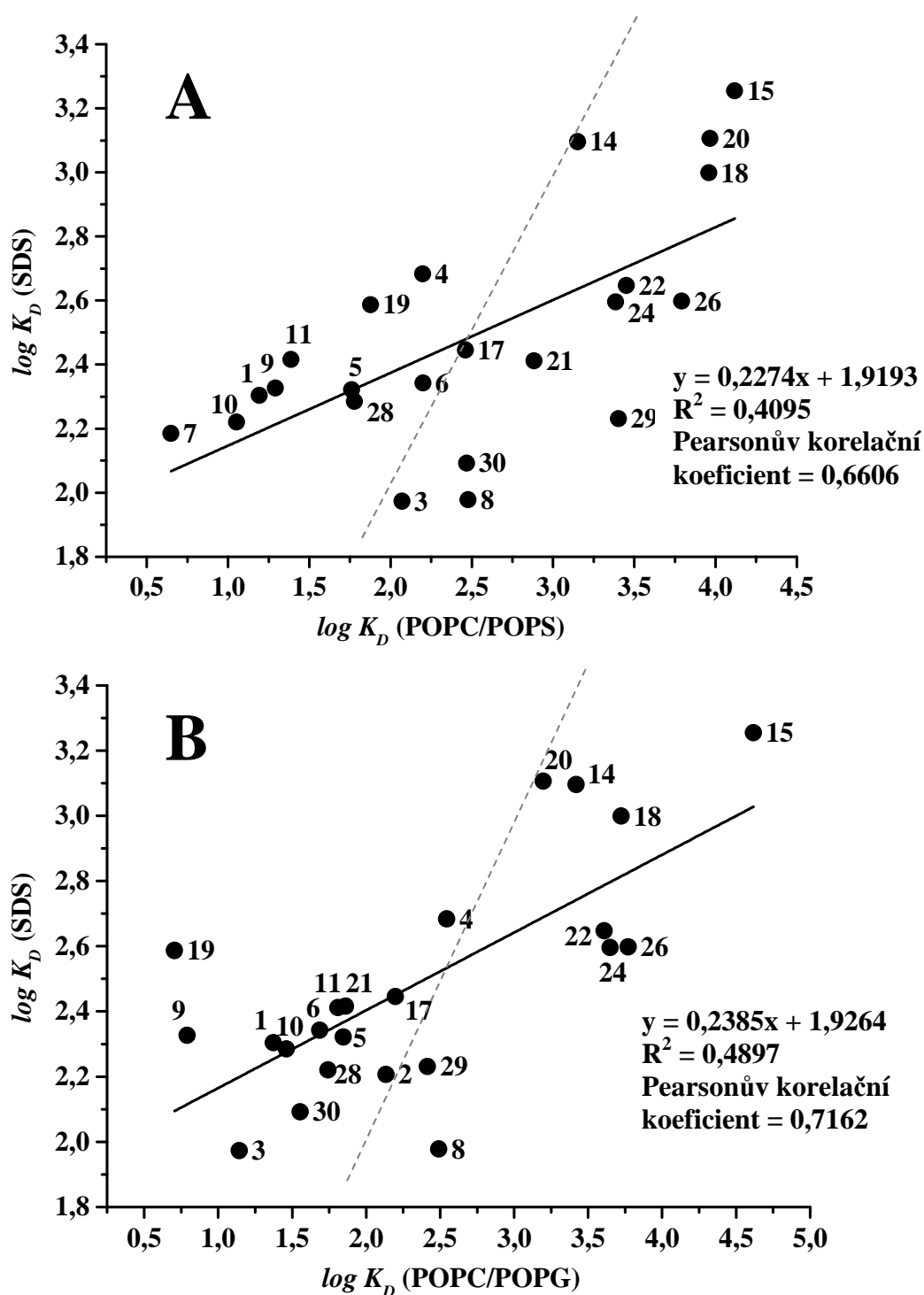
**Obrázek 2.11:** Porovnání  $\log K_D$  (POPC/POPG) s  $\log K_D$  (POPC/POPS); 1 – kyselina galová, 3 – protocatechová kyselina, 4 – salicylová kyselina, 5 – syringová kyselina, 6 – vanilová kyselina, 7 – kávová kyselina, 8 – chlorogenová kyselina, 9 – ferulová kyselina, 10 – p-kumarová kyselina, 11 – sinapová kyselina, 12 – (+)-katechin, 13 – (-)-epikatechin, 14 – 7-hydroxyflavon, 15 – biochanin A, 16 – flavon, 17 – isokvercitrin, 18 – luteolin, 19 – rutin, 20 – kaempferol, 21 – morin, 22 – myricetin, 23 – kvercetin, 24 – hesperetin, 26 – naringenin, 28 – 4-hydroxykumarin, 29 – 6,7-dihydroxykumarin, 30 – esculin.

Analogicky k předchozí studii byly zjišťovány rozdělovací koeficienty polyfenolických antioxidantů v micelárním systému. Pseudostacionární fáze v MEKC byla tvořena 5,12 mM dodecylsíránem sodným. Koncentrace SDS byla zvolena tak, aby fázový poměr SDS byl stejný jako fázový poměr pseudostacionární fáze v LEKC. (+)-katechin, (-)-epikatechin, kvercetin, hesperidin a naringin nevykazovaly žádné interakce s micelami SDS a jejich retence byla nulová. Na obrázku 2.12 je znázorněna závislost mezi naměřenými hodnotami rozdělovacího koeficientu pomocí MEKC mezi micelami SDS a vodnou mobilní fází a tabelovanými hodnotami rozdělovacího koeficientu oktanol-voda, resp., oktanol-vodná fáze o pH 7,40. Stejně jako v případě LEKC i zde můžeme pozorovat dvě skupiny sloučenin. Skupina E obsahuje fenolické kyseliny a flavonoidy isokvercitrin, rutin, 4-hydroxykumarin a esculin a skupina F obsahuje zbylé flavonoidy. Látky, které neinteragovaly s micelami SDS, nejsou v grafu uvedeny.



**Obrázek 2.12:** Porovnání  $\log K_D$  (SDS) s  $\log P_{o/w}$ , resp.  $\log K_D$  (SDS) s  $\log D_{pH\ 7,4}$ ; 1 – galová kyselina, 2 – 4-hydroxybenzoová kyselina, 3 – protokatechová kyselina, 4 – salicylová kyselina, 5 – syringová kyselina, 6 – vanilová kyselina, 7 – kávová kyselina, 8 – chlorogenová kyselina, 9 – ferulová kyselina, 10 – p-kumarová kyselina, 11 – sinapová kyselina, 14 – 7-hydroxyflavon, 15 – biochanin A, 17 – isokvercitrin, 18 – luteolin, 19 – rutin, 20 – kaempferol, 21 – morin, 22 – myricetin, 24 – hesperetin, 26 – naringenin, 28 – 4-hydroxykumarin, 29 – 6,7-dihydroxykumarin, 30 – esculin.

Na obrázku 2.13A jsou porovnány hodnoty  $\log K_D$  (SDS) a  $\log K_D$  (POPC/POPS). Obrázek 2.13B znázorňuje závislost mezi  $\log K_D$  (SDS) a  $\log K_D$  (POPC/POPG). Nižší Pearsonův koeficient a tedy nižší korelace mezi vypočtenými rozdělovacími koeficienty je dána odlišnou strukturou micel a liposomů a tím i rozdílným způsobem interakce analyzovaných látek s pseudostacionární fází.



**Obrázek 2.13:** A - Porovnání  $\log K_D$  (SDS) s  $\log K_D$  (POPC/POPS); B -  $\log K_D$  (SDS) s  $\log K_D$  (POPC/POPG); 1 – galová kyselina, 2 – 4-hydroxybenzoová kyselina, 3 – protocatechová kyselina, 4 – salicylová kyselina, 5 – syringová kyselina, 6 – vanilová kyselina, 7 – kávová kyselina, 8 – chlorogenová kyselina, 9 – ferulová kyselina, 10 – p-kumarová kyselina, 11 – sinapová kyselina, 14 – 7-hydroxyflavon, 15 – biochanin A, 17 – isokvercitrin, 18 – luteolin, 19 – rutin, 20 - kaempferol, 21 – morin, 22 – myricetin, 24 – hesperetin, 26 – naringenin, 28 – 4-hydroxykumarin, 29 – 6,7-dihydroxykumarin, 30 – esculin. Šedou čárkovanou přímkou je vyznačena závislost  $y = x$ .

## 2.6 Shrnutí

V této kapitole byla využita liposomální elektrokinetická chromatografie a micelární elektrokinetická chromatografie pro stanovení rozdělovacích koeficientů liposomy (micely)-vodná fáze. Jako pseudostacionární fáze byly v případě LEKC použity fosfolipidy 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycerofosfatidylcholin, 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-fosfatidylserin a 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-fosfatidyl-DL-glycerol. Konkrétně byly použity směsi těchto fosfolipidů – POPC/POPS 80:20 mol% a POPC/POPG 80:20 mol%. V MEKC jako pseudostacionární fáze sloužily micely SDS. Koncentrace SDS byla zvolena tak, aby fázový poměr v MEKC a LEKC byl shodný a bylo možné porovnat získané hodnoty rozdělovacích koeficientů. Byl stanoven retenční faktor vybraných fenolických kyselin a flavonoidů v LEKC i MEKC módu a z těchto hodnot byly vypočítány distribuční konstanty látek v systémech liposomy-vodná fáze a micely-vodná fáze, které byly porovnány s hodnotami distribučního koeficientu oktanol-voda nalezenými v literatuře. Z naměřených hodnot je patrné, že rozdělovací koeficient je obecně nižší pro fenolické kyseliny a glykosidované flavonoidy než pro neglykosidované flavonoidy. Z korelačních grafů se dá usuzovat, že na hodnotu rozdělovacích koeficientů mají vliv parametry nepolární fáze a to zejména přítomnost a typ hydrofilní skupiny v molekule fosfolipidů a dodecylsírany sodného.

Výsledky studie byly uveřejněny v:

- ❖ Váňová J., Liimatta L., Česla P., Wiedmer S, Determination of distribution constants of antioxidants between liposomes, alkylsulfate micelles, octanol and water using electrokinetic chromatography. *CECE 2016: 13th International Interdisciplinary Meeting on Bioanalysis*. Brno: Ústav analytické chemie AV ČR, v. v. i., 2016. s. 62-65. ISBN 978-80-904959-4-4.
- ❖ Váňová J., Liimatta L., Česla P., Wiedmer S. Determination of Distribution Constants of Antioxidants by Electrokinetic Chromatography. *Cogent Chemistry* 3 (2017). <https://doi.org/10.1080/23312009.2017.1385173> doi .

## 2.7 Seznam použité literatury

- [1] Rothwell J. A. et al., *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53 (2005) 4355.
- [2] Berthod A., Carda-Broch S., *Journal of Chromatography A* 1037 (2004) 3-14;
- [3] Kah M., Brown C. D., *Chemosphere* 72 (2008) 1401-1408.
- [4] Riekkola M.-L., Jönsson J. A., Smith R. M., *Pure and Applied Chemistry* 76 (2004) 443-451.
- [5] Cline Love, L.J., Habarta J.G., Dorsey J.G., *Analytical chemistry* 56 (1984).
- [6] <http://www.u-helmich.de/bio/cytologie/04/Membranen03.html>, staženo 16.6.2016
- [7] Terabe S., *Trends in Analytical Chemistry* 8 (1989) 129 – 134.
- [8] Pyell U. *Electrokinetic Chromatography: Theory, Instrumentation and Applications* Edited by U. Pyell, 2006 John Wiley & Sons, Ltd. ISBN: 0-470-78102-4. Kapitola 1: Theory of electrokinetic chromatography.
- [9] Kašička V., *Chemické listy* 91 (1997) 320-329.
- [10] Riekkola M.-L., *Encyclopedia of Separation Science* (2000) 1280-1286.
- [11] Terabe S., *Handbook of Capillary and Microchip Electrophoresis and Associated Microtechniques*, kapitola 3: Micellar electrokinetic chromatography, str. 109 – 130, 2008.
- [12] Hong, Weekley, Grieb, Foley, *Analytical Chemistry* 70 (1998) 1394 – 1403.
- [13] Lokajová, J., Laine J., Puukilainen E., Ritala M., Holopainen J. M., Wiedmer S. K., *Electrophoresis* 31 (2010) 1540 – 1549.
- [14] Greenwood, A. I., Tristram-Nagle, S., Nagle, J. F., *Chemistry and Physics of Lipids* 143 (2006) 1-10.
- [15] M.M. Bushey, J.W. Jorgenson, *Analytical Chemistry* 61 (1989) 491.
- [16] Wiedmer S. K., Lokajová J., Riekkola M.-L., *Journal of Separation Science* 33 (2010) 394-409.
- [17] <https://avantilipids.com/tech-support/physical-properties/cmcs/>. 12.7.2016
- [18] Jáč P., Polášek M., Pospíšilová M., *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 40 (2006) 805.
- [19] Cook N. C., Samman S., *The Journal of Nutritional Biochemistry* 7 (1996) 66-76.
- [20] Nijveldt R. J., van Nood E., van Hoorn D. E. C., Boelens P. G., van Norren K., van Leeuwen P. A. M., *The American Journal of Clinical Nutrition* 74 (2001) 418.
- [21] Özçelik B., Kartal M., Orhan I., *Pharmaceutical Biology* 49 (2011) 396.

- [22] Hurtado-Fernandéz E., Gómez-Romero M., Carrasco-Pancorbo A., Fernández-Gutiérrez A., *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 53 (2010) 1130-1160.
- [23] Dai J., Mumper R. J., *Molecules* 15 (2010) 7313-7352.
- [24] Cook N. C., Samman S., *The Journal of Nutritional Biochemistry* 7 (1996) 66-76.
- [25] Herrero M., Ibáñez E., Cifuentes A., *Journal of Separation Science* 28 (2005) 883-897.
- [26] Brevier M. S., *Comprehensive reviews in food science and food safety* 10 (2011) 221-247.
- [27] Wiedmer S. K., Kulovesi P., Riekkola M.-L., *Journal of Separation Science* 31 (2008) 2714.
- [28] <https://avantilipids.com/divisions/equipment/mini-extruder-assembly-instructions/>, staženo 28.6.2016.
- [29] <http://www.amazing-glutathione.com/what-are-antioxidants.html>, staženo 9.3.2016

### 3 Aplikace MEKC, CZE a CZE/MS pro separaci přírodních antioxidantů a oligosacharidů

Tato část práce je věnována stanovení přírodních antioxidantů a oligosacharidů pomocí micelární elektrokinetické chromatografie a kapilární zónové elektroforézy s UV/Vis nebo hmotnostním detektorem.

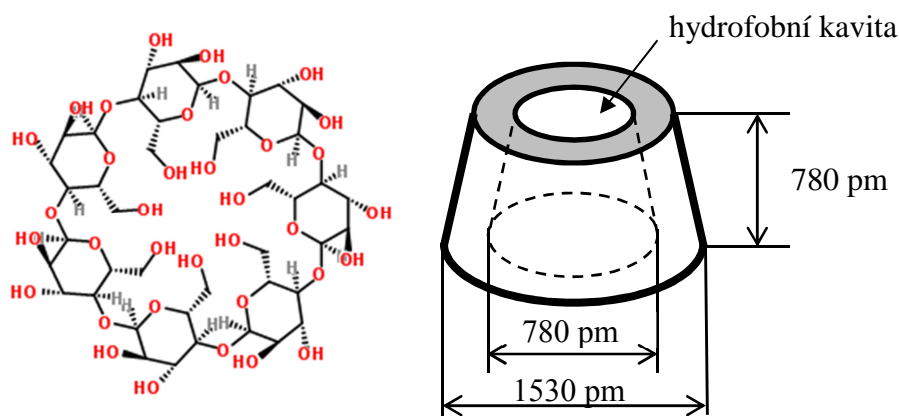
#### 3.1 Stanovení přírodních antioxidantů pomocí micelární elektrokinetické chromatografie

Bez černý (*Sambucus nigra* L.) je keř rostoucí v téměř celé Evropě a je bohatým zdrojem flavonolů, fenolických kyselin, antokyaninů, karotenoidů, vitamínů a minerálů [1]. Bioaktivní sloučeniny z bobulí a květů černého bezu mají silné antioxidační, antikarcinogenní, antimikrobiální a protizánětlivé účinky [2]. Výtažek z bobulí nebo květů černého bezu je významným prostředkem při léčbě nachlazení, horečky a zánětu dutin [3], je používán pro jeho diuretické účinky a účinky podporující pocení. Látky obsažené v květech a plodech černého bezu hrají důležitou roli v prevenci oxidace a buněčné inhibice [4].

Pro stanovení přírodních antioxidantů obsažených ve výluzích černého bezu lze s výhodou použít micelární elektrokinetickou chromatografii (MEKC). Tato metoda umožňuje separaci směsi neutrálních a nabitých látek a vyznačuje se vysokým rozlišením, nízkou spotřebou vzorku a krátkou dobou analýzy [5]. Separace látek probíhá na základě jejich rozdílného distribučního koeficientu mezi pseudostacionární a vodnou mobilní fází. Pseudostacionární fáze v MEKC je tvořena micelami povrchově aktivních látek (tenzidů) o koncentraci vyšší než je jejich kritická micelární koncentrace. MEKC lze modifikovat různými způsoby, např. použitím cyklodextrinů (CD) v základním elektrolytu nebo použitím směsných micel jako pseudostacionární fáze.

Cyklodextriny jsou cyklické oligosacharidy obsahující šest ( $\alpha$ -CD), sedm ( $\beta$ -CD), osm ( $\gamma$ -CD), devět ( $\delta$ -CD), deset ( $\epsilon$ -CD) nebo i více ( $\alpha$ -1,4) vázaných  $\alpha$ -D-glukopyranosových jednotek [6]. Jsou to produkty enzymatické degradace škrobu [7]. Cyklodextriny si lze představit jako kapsle, do kterých mohou inkludovat jiné molekuly (obrázek 3.1). Kuželovitý tvar molekuly cyklodextrinu má relativně lipofilní vnitřní kavitu a hydrofilní vnější povrch [7,8]. Komplex vzniklý interakcí cyklodextrinu s jinou molekulou je nazýván inkluzní komplex. Molekula cyklodextrinu je označovaná jako hostitelská molekula a „uzavřená“

molekula (částečně nebo úplně) je nazývána host. Mezi hostitelem a hostem nedochází ke vzniku kovalentních vazeb, ale uplatňují se van der Waalsovy síly, hydrofobní interakce a vznik vodíkové vazby.



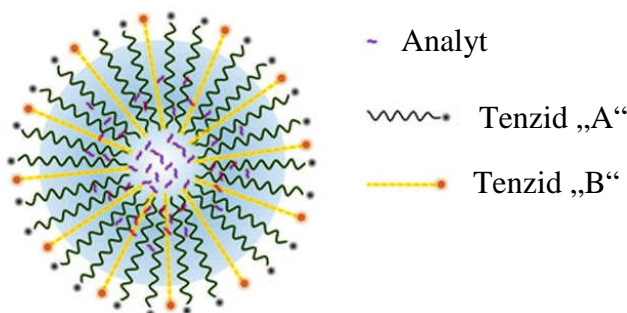
**Obrázek 3.1:** Chemická struktura a schématické znázornění  $\beta$ -CD [6].

Vzniklý komplex není stálý a v roztoku se neustále ustavuje rovnovážný proces mezi hostitelem a hostem. Inkluze molekul do kavity cyklodextrinů spočívá v substituci molekul vody v kavě méně polární molekulou – hostem. Inkluze méně polárních molekul do hydrofobních kavít cyklodextrinů je energeticky výhodnější než přítomnost molekul vody v kavě [7,9]. Schopnost cyklodextrinu tvořit inkluzní komplex s jinými molekulami ovlivňují dva základní faktory. První, sterický faktor, závisí na relativní velikosti cyklodextrinu a hostující molekuly nebo na přítomnosti některých funkčních skupin v rámci hostující molekuly. Druhým faktorem jsou termodynamické interakce mezi jednotlivými komponentami systému (cyklodextrin, hostující molekula, rozpouštědlo). Pro vznik komplexu musí být inkluze hostující molekuly do cyklodextrinu pro daný systém energeticky výhodná [10].

Cyklodextriny jsou široce používány v separačních procesech, jsou schopné zvýšit selektivitu mezi polohovými izomery, funkčními skupinami, homology a enantiomery [7]. Cyklodextriny nemohou být solubilizovány v micelách povrchově aktivních látek, které jsou používány jako pseudostacionární fáze v micelární elektrokinetické chromatografii, vzhledem k hydrofilní povaze vnější části. V MEKC s cyklodextrinem přítomným v pracovním prostředí jsou analyty distribuovány mezi tři fáze – vodnou fází, micely a cyklodextriny. Rozdíly v migraci látek a v rozlišení jsou dány vznikajícími komplexy cyklodextrinu a analytu [11]. Tvorba komplexu analytu s cyklodextrinem snižuje elektroforetickou pohyblivost tohoto analytu zřejmě díky nárůstu velikosti molekuly [12].



Jsou-li povrchově aktivní látky, tenzidy, v roztoku o nízké koncentraci (nižší než je jejich kritická micelární koncentrace), vyskytují se převážně ve formě monomerů. Při vyšší koncentraci se shlukují do sférických útvarů, které na povrchu mají polární skupiny a uhlovodíkový řetězec tvoří jádro těchto útvarů, micel. Tímto se minimalizuje energeticky nevýhodný stav systému [13,14]. Micely nemusí být tvořeny pouze jedním typem tenzidu. Micely, které jsou tvořeny minimálně dvěma druhy tenzidů, nazýváme směsnými micelami. Směsné micely můžeme rozdělit do dvou skupin v závislosti na tom, zda jsou tvořeny alifatickými tenzidy nebo komplexem aromatických tenzidů [15]. Dále můžeme směsné micely rozlišit dle toho, zda jsou tvořeny kationtovými, aniontovými, neiontovými nebo amfoterními tenzidy nebo zda se jedná o kombinaci jednotlivých skupin tenzidů [16] (schematické znázornění směsné micely je uvedeno na obrázku 3.2).



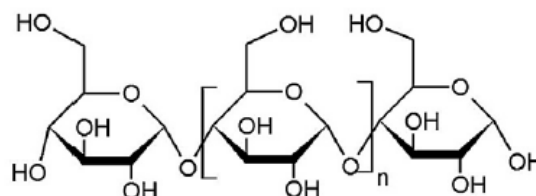
**Obrázek 3.2:** Schéma směsné micely.

### 3.2 Analýza oligosacharidů pomocí CE

Druhá část této kapitoly je zaměřena na analýzu oligosacharidů. Oligosacharidy se účastní procesu zvaného glykosylace, který probíhá v endoplazmatickém retikulu. Tam se na proteiny váží polysacharidové řetězce. Z endoplazmatického retikula se proteiny s navázanými polysacharidovými řetězci obsahujícími hlavně manózu přesunují membránovými váčky do Golgiho komplexu. V tomto komplexu probíhá druhá fáze glykosylace, kdy dochází k odštěpení několika manózových zbytků a váží se i jiné cukry (např. galaktóza) a kyselé skupiny (např. kyselina sialová) [17]. Oligosacharidy jsou vázány prostřednictvím N- a O-glykosidových vazeb [18]. Glykosylace hraje důležitou roli v živém organismu, kontroluje důležité děje, jako např. buněčnou komunikaci, rozpoznávání, rozpustnost proteinů, ochranu před enzymy, adhezi a proliferaci [19]. Rozdílnost ve struktuře

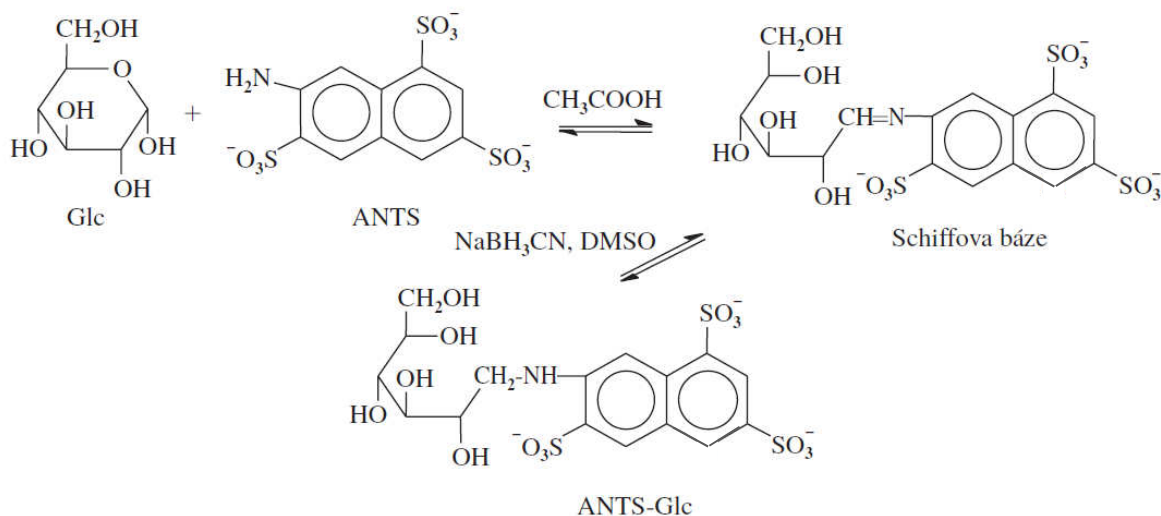
oligosacharidů je důležitá pro biologickou funkci glykoproteinů [18] a proto je charakterizace oligosacharidů nezbytná pro porozumění biologických funkcí glykoproteinů.

Při analýze oligosacharidů je nutno brát v úvahu chybějící chromofor v molekule (obr. 3.3). Tento problém lze vyřešit derivatizací. Jako derivatizační činidlo slouží látka, která po reakci s analytem vytvoří produkt detekovatelný pomocí UV/Vis nebo fluorescenčního detektoru [20].



**Obrázek 3.3:** Struktura maltooligosacharidu.

Derivatizace nemusí být výhodná jen díky možnosti využití běžně dostupných detektorů, ale vnesením ionizovatelné skupiny do molekuly oligosacharidu může dojít i ke zlepšení vlastností molekuly pro separaci pomocí kapilární zónové elektroforézy. Mezi používaná derivatizační činidla pro sacharidy patří 8-aminonaftalen-1,3,6-trisulfonová kyselina (ANTS) [21,23], 9-aminopyren-1,4,6-trisulfonát [21], 2-aminopyridin (2-AP) [22], 2-aminobenzamid (2-AB), 2-aminobenzoová kyselina (2-AA) [23]. Na obrázku 3.4 je znázorněno schéma derivatizace glukosy pomocí ANTS. Redukující konec sacharidu reaguje s primární aminoskupinou sloučeniny derivatizačního činidla (ANTS) za vzniku Schiffovy báze, která je následně redukována kyanoborohydridem sodným. Deriváty vzniklé reduktivní aminací jsou stabilní v kyselém i alkalickém prostředí [24].



**Obrázek 3.4:** Schéma derivatizace pomocí ANTS.

Pro analýzu oligosacharidů se běžně využívá vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC). V dnešní době se však kapilární elektroforéza (CE) se svými jednotlivými módy stává alternativou k HPLC díky jednoduché instrumentaci, vysoké separační účinnosti, krátké době analýz a nízké spotřebě vzorku. Kapilární zónová elektroforéza (CZE) je rozšířená separační technika, která se využívá pro separaci ionizovatelných molekul.

Separace probíhá na základě rozdílné pohyblivosti nabitých látek v elektrickém poli:

$$\mu = \frac{v}{E} = \frac{q}{6\pi r\eta} \quad (3.1)$$

kde  $\mu$  je elektroforetická pohyblivost (mobilita) analytu,  $v$  je lineární rychlost pohybu částice,  $E$  je intenzita elektrického pole,  $q$  je velikost náboje,  $r$  je hydrodynamický poloměr iontu a  $\eta$  je viskozita prostředí.

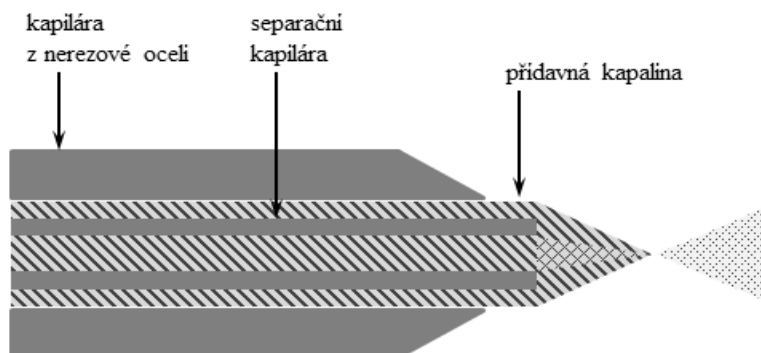
### 3.2.1 Kapilární elektroforéza s hmotnostně spektrometrickou detekcí

Spojení kapilární zónové elektroforézy s hmotnostně spektrometrickou detekcí umožňuje vysoce citlivou a selektivní kvalitativní i kvantitativní analýzu širokého spektra látek. Při spojení CE/MS muselo být vyřešeno několik základních problémů. Zatímco během analýzy pomocí kapilární elektroforézy se spektrofotometrickým nebo fluorescenčním detektorem dochází k detekci vzorku na kapiláře, přičemž oba konce kapiláry jsou ponořeny v základním elektrolytu v elektroforetických nádobkách, při spojení CE/MS dochází k tomu, že vzorek je detekován teprve potom, co opustí separační kapiláru.

On-line spojení kapilární elektroforézy s MS detekcí je realizováno pomocí různých typů rozhraní - bez přídavné kapaliny (sheathless interface), s přídavnou kapalinou (sheath-flow interface, obr. 3.5) a kapalinový spoj (liquid junction). Námí používané rozhraní s přídavnou kapalinou je sice robustním spojením, ale v důsledku zředování zón analytu méně citlivé [25]. Přestože dochází k zředování analytu, jeví se spojení s přídavnou kapalinou jako nejlepší kompromis. Při použití rozhraní bez přídavné kapaliny sice nedochází ke zředování analytu, nicméně průtoky používané v kapilární elektroforéze bývají tak malé, že nezaručují stabilní ionizaci pomocí elektrospreje (ESI), který právě bývá nejčastěji používán ve spojení s kapilární elektroforézou. Kapalinový spoj nabízí stabilnější elektrosprej oproti rozhraní bez přídavné kapaliny a menší naředění vzorku oproti rozhraní s přídavnou kapalinou, ale na druhou stranu narušení dráhy průtoku analytu vede ke ztrátě účinnosti [26]. Ionizace pomocí

elektrospreje je realizována za atmosférického tlaku, řadí se mezi měkké ionizační techniky a používá se pro ionogenní a polární molekuly [25].

Dále je třeba vyřešit otázku napětí na separační kapiláře a také v iontovém zdroji, aby byly zajištěny stabilní podmínky pro analýzu a stabilní podmínky v iontovém zdroji. Některé hmotnostní spektrometry umožňují vložení vysokého napětí na vstupní části iontové optiky. To znamená, že společná CE/ESI elektroda může být uzemněna, jelikož napětí potřebné pro elektrosprej je vloženo na vstup hmotnostního spektrometru. Toto uspořádání umožňuje nastavit napětí na CE a ESI nezávisle na sobě. Sprej jemných kapiček je v ESI produkován díky silnému elektrickému poli. Elektrický gradient poskytuje hnací sílu pro elektrochemické reakce na špičce elektrospreje a tím kapičky získávají přebytečný náboj. Po následném odpaření rozpouštědla se v určitém okamžiku v důsledku nadměrného náboje překonává povrchové napětí. Dochází ke kaskádě Coulombických explozí, což má za následek vznik řady menších kapiček. Přesný mechanismus vzniku iontů v plynné fázi není jednoznačně popsán. Jsou uváděny dva způsoby vzniku iontů, „charged residue model“ a „ion evaporation model“ [26-28].



**Obrázek 3.5:** Schéma spojení CE/MS pomocí přídavné kapaliny tzv. sheath flow interface (překresleno dle [25]).

Nedílnou součástí hmotnostního spektrometru je také hmotnostní analyzátor, kde dochází k rozdělení iontů v plynné fázi vzniklých v iontovém zdroji podle jejich poměru hmotnosti a náboje. Mezi základní typy hmotnostních analyzátorů patří např. kvadrupólový analyzátor, sférická a lineární iontová past, Orbitrap a průletový analyzátor. Používají se i kombinace jednotlivých analyzátorů, konkrétně v této práci byl použit hmotnostní detektor, který kombinuje kvadrupólový analyzátor a lineární iontovou past. V podstatě se jedná o trojitý kvadrupól, přičemž třetí kvadrupól může pracovat v režimu lineární iontové pasti [29].

### 3.3 Experimentální část

#### 3.3.1 Seznam použitých chemikálií

Standardy fenolických kyselin (kávová, chlorogenová, kryptochlorogenová, ferulová, galová, neochlorogenová, p-hydroxybenzoová, p-kumarová, 4-hydroxyfenyloctová kyselina (4-HPAC)), aglykované flavonoidy (hesperetin, kaempferol, naringenin, kvercetin) a glykosidované (hesperidin, isokvercitrin, kaempferol-3-*O*-rutinosid, rutin), standardy oligosachadů, derivatizační činidla 8-amino-1,3,6-trisulfonová kyselina (ANTS), 2-aminobenzamid (2-AB), 2-aminopyridin (2-AP), 2-aminobenzoová kyselina (2-AA), 7-aminonaftalen-1,3-disulfonová kyselina (ANDS), N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin, peroxidisíran draselný, kyanoborohydrid sodný, dimethylakrylamid, dimethylsulfoxid,  $\gamma$ -metakrylopropyltrimethoxysilan byly získány od firmy Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), stejně jako chemikálie potřebné pro přípravu základního elektrolytu, tj. kyselina boritá a tetraboritan sodný, mravenčan amonný, octan amonný, kyselina octová a amoniak. Decylsíran sodný,  $\beta$ -cyklodextrin, heptakis(6-*O*-sulfo)- $\beta$ -cyklodextrin a heptakis(2,6-di-*O*-metyl)- $\beta$ -cyklodextrin byly také od firmy Sigma Aldrich. Standardy isorhamnetin-3-*O*-glukosid a isorhamnetin-3-*O*-rutinosid byly zakoupeny u firmy Extrasynthese (Genay, Francie). Dihydrogenfosforečnan sodný byl získán od firmy J.T.Baker (Deventer, Nizozemsko), kyselina fosforečná od firmy Lachner (Brno, Česká republika) a kyselina mravenčí od firmy Penta (Chrudim, Česká republika). Deionozovaná voda (vodivost 0,055  $\mu$ S/cm) byla připravena pomocí přístroje Ultra CLEAR UV (SG, Hamburg, Německo). Hydroxid sodný a thiomocovina byly od firmy LachNer (Neratovice, Česká republika). Slovasol 117 (oxyethylenovaný mastný alkohol s průměrnou délkou uhlíkového řetězce C11 a průměrným stupněm oxyethylenace 7) a Slovasol 247 (oxyethylenovaný mastný alkohol s průměrnou délkou uhlíkového řetězce C12-C14 a průměrným stupněm oxyethylenace 7) byly od firmy SLOVECA Sasol Slovakia (Bratislava, Slovensko).

#### 3.3.2 Pracovní postup

##### *MEKC separace přírodních antioxidantů*

Pro analýzu byly použity tři série vzorků černého bezu (*Sambucus nigra* L.). V první sérii bylo připraveno pět výluhů z pěti čajových sáčků černého bezu (zakoupeno v obchodní síti). Navážky byly 1,6804 g; 1,6277 g; 1,6600 g; 1,6102 g a 1,6803 g. Druhá série vzorků

byla připravena homogenizací 20 čajových sáčků květu černého bezu. Navážky byly 1,6009 g; 1,6007 g; 1,6074 g; 1,6096 g a 1,6022 g. Třetí série výluhů byla připravena ze sušených květů nasbíraných ve Veltrubech (50° 4,3219' N, 15° 10,8356' E) v červnu 2013. Jednotlivé navážky byly 1,6076 g; 1,6072 g; 1,6176 g; 1,6218 g a 1,6024 g. Nálevy byly připraveny vyluhováním vzorku v 200 ml 95 °C horké vody po dobu 5 min a zchlazením na laboratorní teplotu. Před dávkováním byly vzorky přefiltrovány přes polytetrafluoroethylenový filtr (Bedford, MA, USA) s velikostí pórů 0,45 µm.

Měření bylo provedeno na přístroji pro kapilární elektroforézu Agilent 7100 (Agilent, Palo Alto, CA, USA). Byla použita nepokrytá křemenná kapilára o vnitřním průměru 50 µm, celkové délce 48 cm a efektivní délce 40 cm. V místě detekce byl průměr kapiláry 150 µm (Agilent). Nová kapilára byla před prvním použitím promyta 10 min 0,5 M hydroxidem sodným, 10 min deionizovanou vodou a 10 min základním elektrolytem. Jako základní elektrolyt byl použit 25 mM boritanový pufr o pH 9,30 s přídavkem 36 mM decylsíranu sodného. pH základního elektrolytu bylo měřeno pH metrem Metrohm 827 s elektrodou Unitrode (Metrohm, Herisau, Švýcarsko). pH metr byl kalibrován na pufráčnické roztoky od firmy Metrohm o pH 7,00 a 9,00. Teplota kapiláry byla 25 °C a vložené napětí mělo hodnotu +20 kV. Vzorek byl dávkován hydrodynamicky (100 mbar/10 s). Detekce byla prováděna při 214, 254 a 280 nm.

Koncentrace cyklodextrinů v pracovním elektrolytu byla v rozsahu 1 – 5 mM. Analýzy probíhaly v nepokryté křemenné kapiláře o vnitřním průměru 50 µm, efektivní délce 64 cm a celkové délce 72 cm. Kapilára byla temperována na teplotu 25 °C. Pracovní elektrolyt byl tvořen 25 mM boritanovým pufrem o pH 9,30 s 36 mM decylsíranu sodného. Tato koncentrace decylsíranu sodného odpovídá množství 10 mM micel v elektrolytu (viz. Kapitola 1 - Porovnání metod využívajících kapilární elektroforézu pro stanovení kritické micelární koncentrace vybraných tenzidů). Koncentrace zásobních roztoků standardů fenolických kyselin a glykosidovaných flavonoidů byla 1 g/l v metanolu. Před analýzou byly vzorky zředěny deionizovanou vodou na koncentraci 50 mg/l. Dávkování vzorku probíhalo tlakem 50 mbar po dobu 5 s. Směsné kalibrační roztoky byly připraveny ředěním zásobních roztoků standardů fenolických kyselin a flavonoidů. Koncentrační rozmezí kalibrační řady bylo 0,5 – 100 µg/ml. Napětí během analýzy mělo hodnotu 20 kV a detekce byla prováděna při 214, 254 a 280 nm.

Separace v MEKC módu s přídavkem heptakis(2,6-di-*O*-metyl)-β-cyklodextrinu probíhala v nepokryté křemenné kapiláře o celkové délce 48 cm (efektivní délce 40 cm) a vnitřním průměru 50 µm, vnitřní průměr kapiláry v místě detekce byl 150 µm. Základní

elektrolyt byl tvořen 25 mM boritanovým pufrům o pH 9,30, kapilára byla termostátována na teplotu 20 °C a vložené napětí v průběhu analýzy mělo hodnotu 20 kV. Vzorek byl dávkován hydrodynamicky tlakem 100 mbar po dobu 10 s. Detekce byla prováděna při vlnové délce 214, 254 a 280 nm.

#### *CZE, CZE/MS separace oligosacharidů*

Derivatizace vzorků oligosacharidů byla provedena pomocí derivatizačních činidel 2-AA, 2-AB, 2-AP, ANDS a ANTS. Do nádoby o objemu 300 µl byl předložen přibližně 1 mg každého standardu oligosacharidu. Bylo přidáno 15 µl zásobního roztoku derivatizačního činidla (koncentrace roztoku 70 mg/ml ve směsi kyseliny octové a vody v poměru 3:17 (v/v)) a 15 µl roztoku kyanoborohydridu sodného o koncentraci 0,8 M v dimetylsulfoxidu (DMSO). Reakce probíhala po dobu 2 hodin při 68 °C.

Deriváty byly separovány na přístroji pro kapilární elektroforézu Agilent 7100 s UV/Vis detektorem v nepokryté křemenné kapiláře (Agilent, Palo Alto, CA, USA) spojené s hmotnostním detektorem AB SCIEX 4500 QTrap (Framingham, MA, USA) pomocí rozhraní s přidavnou kapalinou. Kapiláry použité pro analýzy byly také od firmy Agilent. Jednalo se o nepokrytou křemennou kapiláru o vnitřním průměru 50 µm a o kapiláru pokrytou polyvinylalkoholem (PVA). V laboratoři byla připravena kapilára pokrytá polydimethylakrylamidem (PDMA) dle postupu popsaného Wanem a kol. [30]. Kapilára byla nejprve promývána 10 min acetonem, poté 30 min 1 M NaOH, následovalo promývání 10 min 0,1 M HCl, 10 min deionizovanou vodou a 30 min 10% roztokem  $\gamma$ -metakrylopropyltrimethoxysilanu. Tento roztok byl připraven smísením 100 µl  $\gamma$ -metakrylopropyltrimethoxysilanu, 450 µl kyseliny octové a 450 µl acetonu. Konce kapiláry byly uzavřeny septa a kapilára byla ponechána minimálně 20 hodin při laboratorní teplotě. Po této době byla kapilára profouknuta dusíkem, propláchnuta acetonem a naplněna 1% (v/v) roztokem dimethylakrylamidu. Ten byl připraven smísením 100 µl 10% dimethylakrylamidu (35 ml deionizované vody a 4 ml dimethylakrylamidu od vzdušněno 20 min v ultrazvuku při 45 °C pod vakuem), 865 µl deionizované vody, 35 µl isopropylalkoholu, 5 µl 10% TEMEDu (0,1 ml N,N,N',N'-tetramethylethylendiaminu a 0,9 ml deionizované vody) a 5 µl 10% APS (0,1 g peroxosíranu draselného v 1 ml deionizované vody). Konce kapiláry byly utěsněny septa a kapilára byla ponechána 3 hodiny při teplotě 50 °C. Kapilára byla poté zchlazena, profouknuta dusíkem, promyta deionizovanou vodou (10 min) a vysušena dusíkem (20 min).

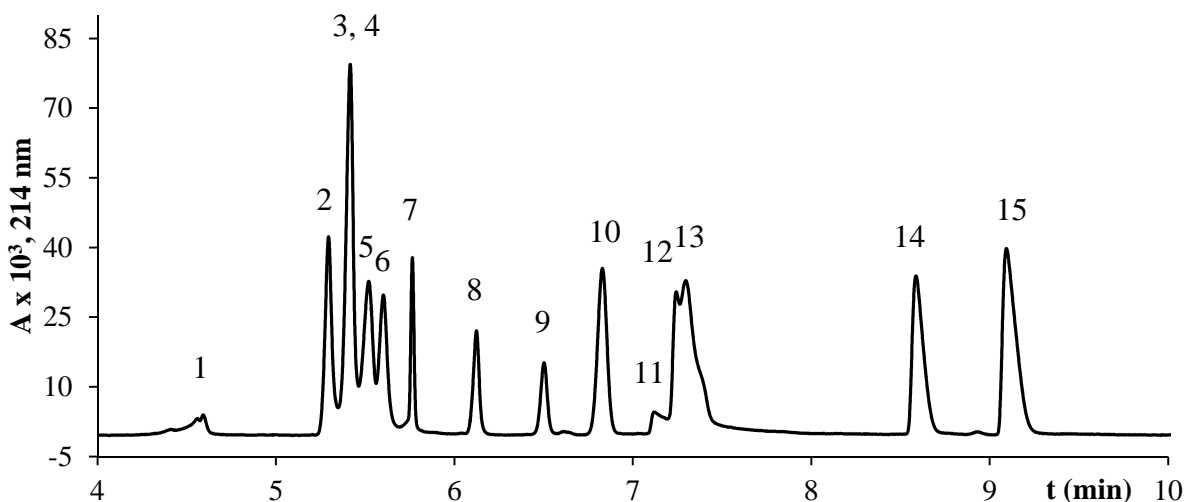
S takto připravenou kapilárou bylo nakládáno jako s ostatními kapilárami. Byla zkrácena na požadovanou délku a bylo vytvořeno detekční okénko.



### 3.4 Výsledky a diskuze

#### 3.4.1 MEKC separace přírodních antioxidantů

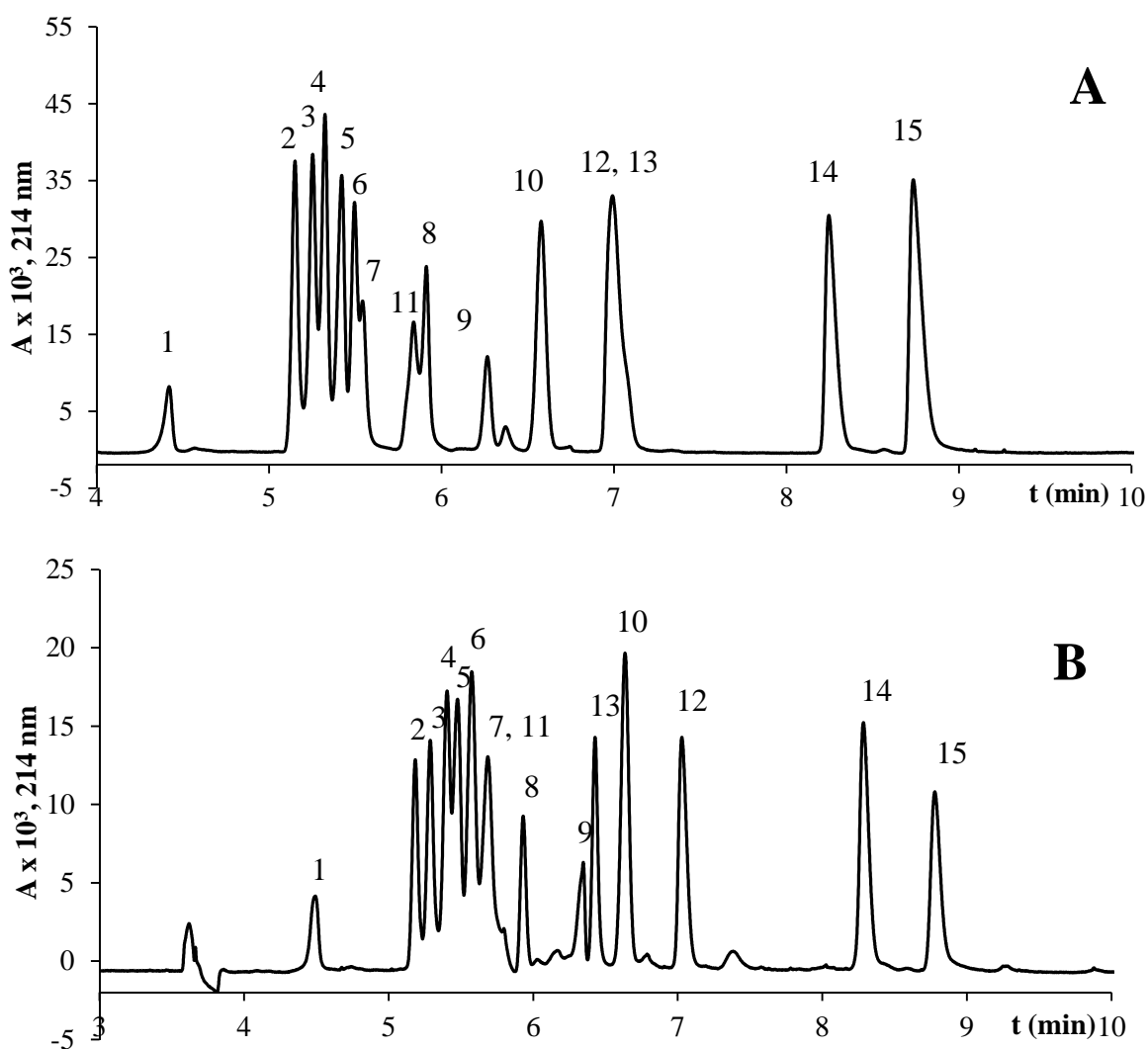
Samotné analýze reálných vzorků výluhů květů černého bezu předcházela optimalizace separačního procesu, která zahrnovala zkoumání vlivu směsných micel a  $\beta$ -cyklodextrinů na separaci přírodních antioxidantů. Z předchozí práce [31,32] vyplynulo, že vhodná pseudostacionární fáze pro separaci přírodních antioxidantů je tvořena micelami decylsírany sodného. Za účelem zvýšení rozlišení separace při použití dodecylsírany sodného jako pseudostacionární fáze byl zkoumán vliv přídavku oxyethylenovaných mastných alkoholů (Slovasol 117, 247) tvořících s dodecylsírany sodným směsné micely [33]. Na obrázku 3.6 je záznam separace standardů vybraných přírodních antioxidantů v 25 mM boritanovém pufru o pH 9,10 s 5 mM dodecylsírany sodného. Zde jsou vidět dva kritické páry sloučenin, které nebyly rozděleny, (+)-katechin s hesperetinem a p-hydroxybenzoová kyselina (p-HBA) s kvercetinem.



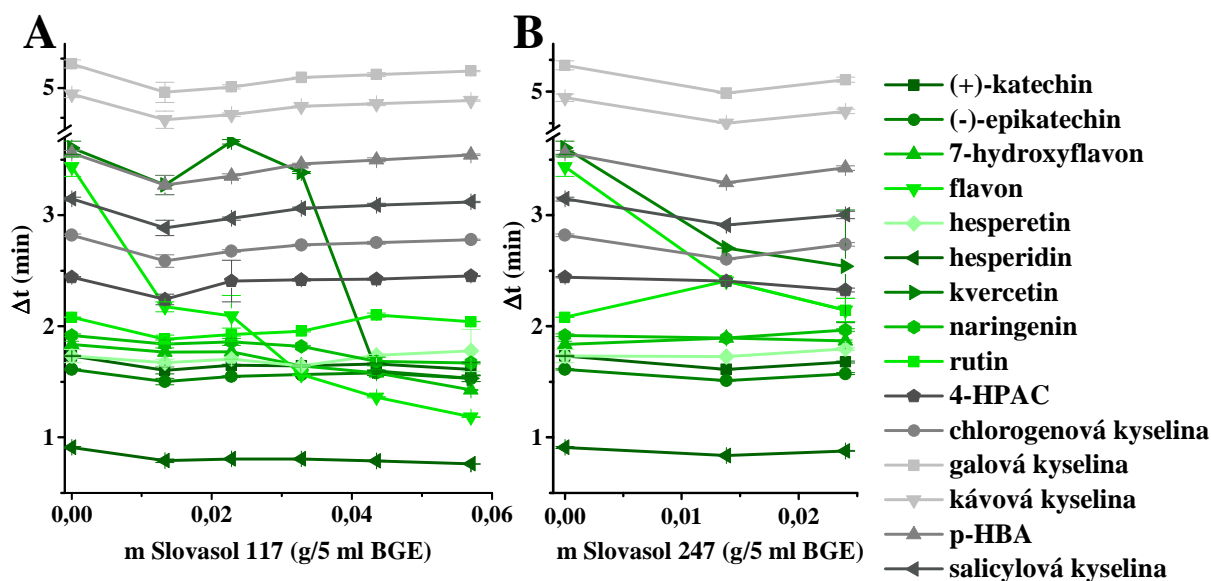
**Obrázek 3.6:** Separace standardů fenolických kyselin a flavonoidů. Koncentrace vzorku 20 mg/l; nepokrytá křemenná kapilára: průměr 50  $\mu\text{m}$ , délka 58 (50) cm, detekční cela 150  $\mu\text{m}$ ; napětí +20 kV, teplota 25  $^{\circ}\text{C}$ . Dávkování 100 mbar/10 s a detekce byla prováděna při 214 nm. Pracovní elektrolyt 25 mM boritanový pufr o pH 9,10 s 5 mM dodecylsírany sodného. 1 – hesperidin, 2 – (-)-epikatechin, 3 – (+)-katechin, 4 – hesperetin, 5 – 7-hydroxyflavon, 6 – naringenin, 7 – rutin, 8 – 4-HPAC, 9 – kyselina chlorogenová, 10 – kyselina salicylová, 11 – flavon, 12 – p-HBA, 13 – kvercetin, 14 – kyselina kávová, 15 – kyselina galová.

Na obrázku 3.7 jsou uvedeny záznamy separace přírodních antioxidantů v systému, kde pseudostacionární fáze byla tvořena roztokem navážky 0,0133 g Slovasol 117 (3.7A), resp.

0,0240 g Slovasol 247 (3.7B) v 5 ml 5 mM dodecylsírany sodného v 25 mM boritanovém pufru o pH 9,10. Z obr. 3.7A je vidět, že došlo k rozdělení (+)-katechinu a hesperetinu, na obr. 3.7B jsou rozděleny oba kritické páry, které byly pozorovány na obr. 3.6, ale v tomto případě došlo ke koeluci 7-hydroxyflavonu a flavonu. Dále je z předložených záznamů patrné, že přidavkem Slovasolu 117 i 247 dochází nejen k ovlivnění rozlišení, ale také ke změně elučního pořadí jednotlivých látek (obr. 3.8) v závislosti na množství přidaného oxyethylenovaného mastného alkoholu.

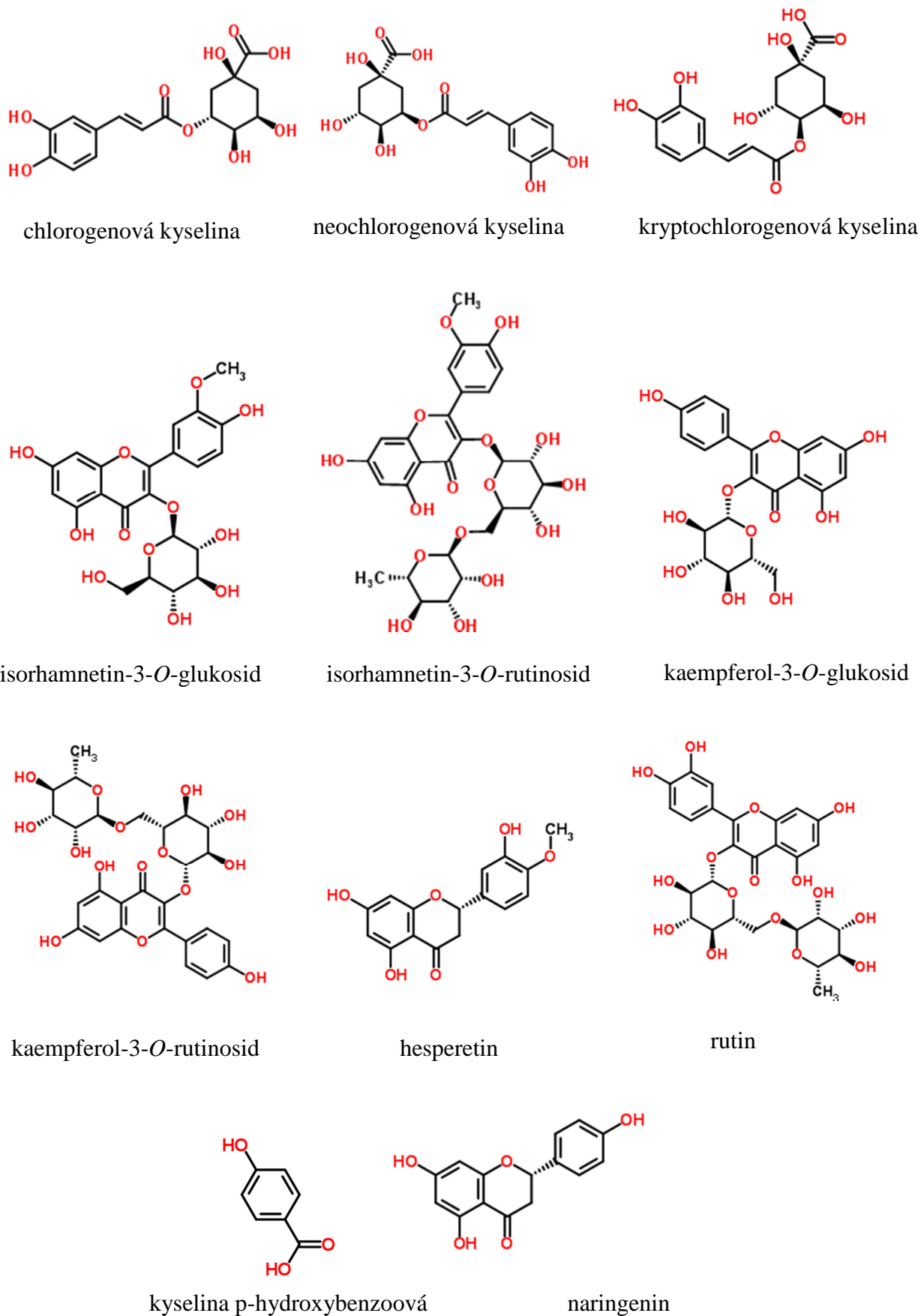


**Obrázek 3.7:** Separace standardů fenolických kyselin a flavonoidů v elektrolytech se směsnými micelami. Pracovní elektrolyt **A** - 25 mM boritanový pufr o pH 9,10; 0,0133 g Slovasol 117/5 ml 5 mM dodecylsírany sodného, **B** - 25 mM boritanový pufr o pH 9,10; 0,0240 g Slovasol 247/5 ml 5 mM dodecylsírany sodného. Další podmínky viz obr. 3.6. 1 – hesperidin, 2 – (-)-epikatechin, 3 – (+)-katechin, 4 – hesperetin, 5 – 7-hydroxyflavon, 6 – naringenin, 7 – rutin, 8 – 4-HPAC, 9 – kyselina chlorogenová, 10 – kyselina salicylová, 11 – flavon, 12 – p-HBA, 13 – kvercetin, 14 – kyselina kávová, 15 – kyselina galová.



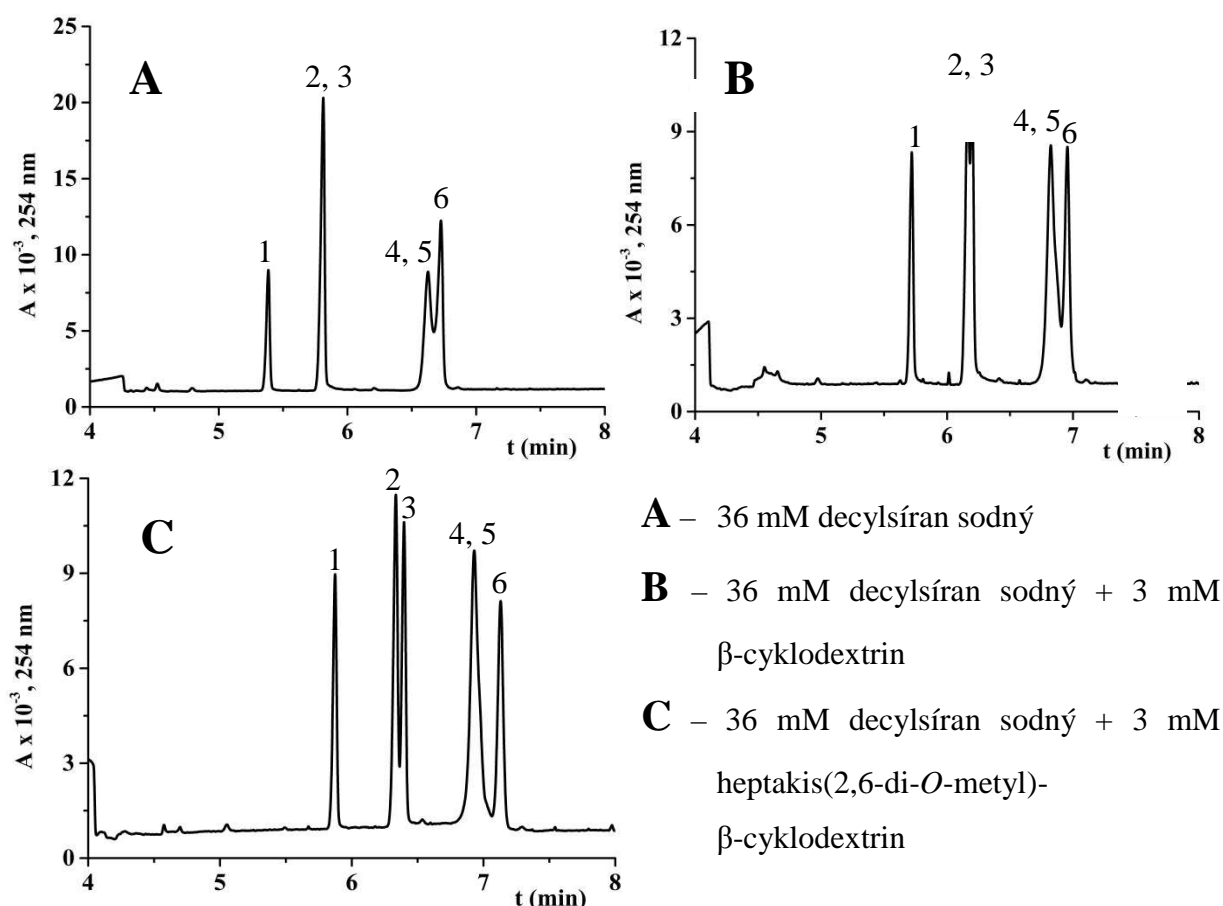
**Obrázek 3.8:** Závislost  $\Delta t$  (rozdíl retenčního času analytu a migračního času elektroosmotického toku) fenolických kyselin a flavonoidů na koncentraci tenzidu Slovasol 117 (A) a 247 (B) v 25 mM boritanovém pufru o pH 9,10 s 5 mM dodecylsírany sodného.

Další část optimalizace byla zaměřena na vliv derivatizovaných  $\beta$ -cyklodextrinů v pracovním elektrolytu na průběh analýzy [34,35]. Mezi antioxidanty vyskytujícími se v černém bezu patří i isomery fenolických kyselin a strukturně velmi podobné molekuly glykosidovaných flavonoidů. Konkrétně se jedná o kyselinu chlorogenovou, neochlorogenovou a kryptochlorogenovou, isorhamnetin-3-*O*-rutinosid, kaempferol-3-*O*-rutinosid a isorhamnetin-3-*O*-glukosid a kaempferol-3-*O*-glukosid (obrázek 3.9). Testovány byly neutrální  $\beta$ -cyklodextrin a heptakis(2,6-di-*O*-methyl)- $\beta$ -cyklodextrin a negativně nabitý heptakis(6-*O*-sulfo)- $\beta$ -cyklodextrin. Koncentrace cyklodextrinů v pracovním elektrolytu byla zvolena 1 – 5 mM. Pro širší pohled na danou tematiku byla posléze směs vybraných isomerů kyseliny chlorogenové a glykosidovaných flavonoidů doplněna o kyselinu p-hydroxybenzoovou, neglykosidované flavonoidy naringenin a hesperetin a glykosidovaný flavonoid rutin.



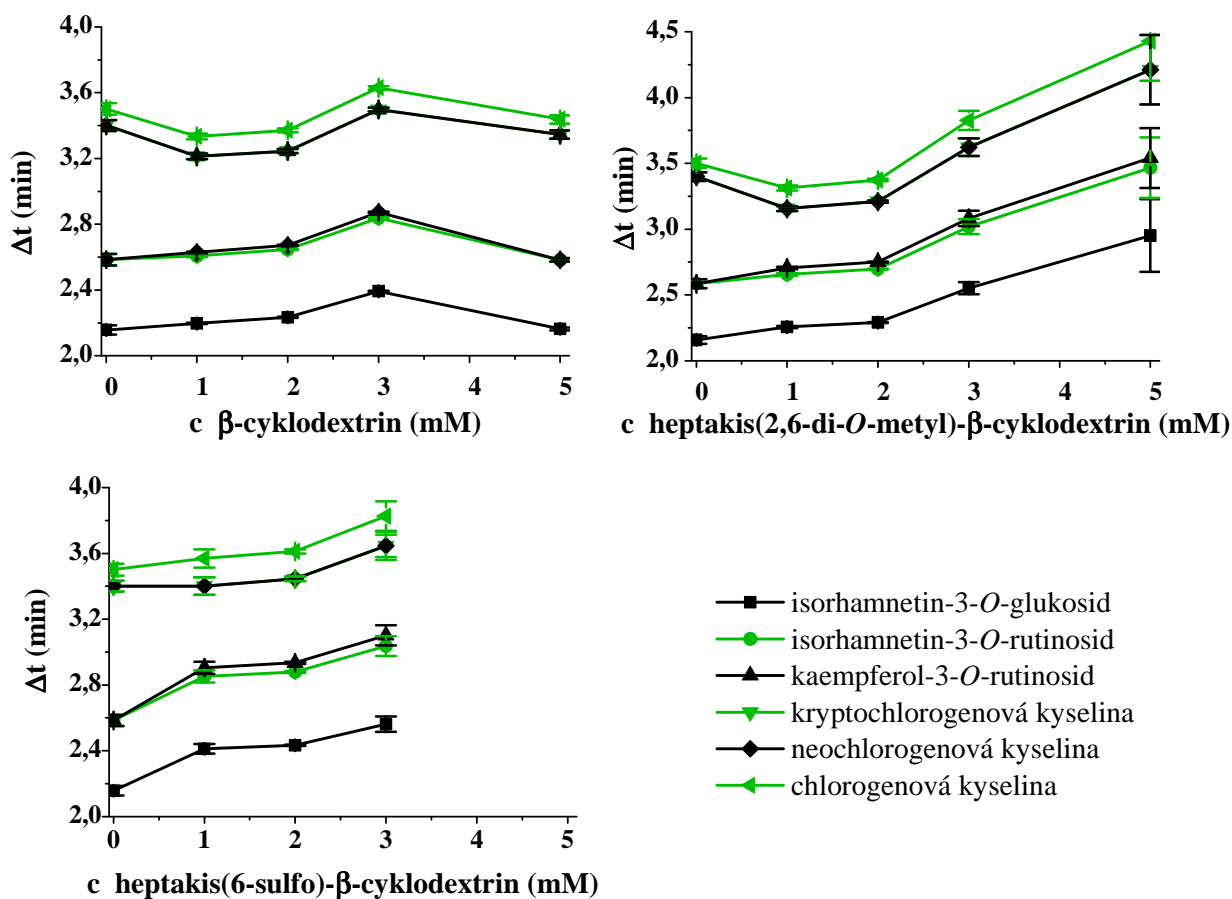
Obrázek 3.9: Struktura vybraných fenolických kyselin a flavonoidů.

Kyselina chlorogenová, neochlorogenová, kryptochlorogenová, isorhamnetin-3-*O*-glukosid, isorhamnetin-3-*O*-rutinosid a kaempferol-3-*O*-rutinosid byly separovány pomocí micelární elektrokinetické chromatografie v 25 mM boritanovém pufru o pH 9,30 s 36 mM decylsíranem sodným. Za těchto podmínek nedošlo k rozdělení kyseliny neochlorogenové a kryptochlorogenové a dále isorhamnetin-3-*O*-rutinosidu a kaempferol-3-*O*-rutinosidu. Po přidavku  $\beta$ -cyklodextrinu, heptakis(2,6-di-*O*-methyl)- $\beta$ -cyklodextrinu a heptakis(6-*O*-sulfo)- $\beta$ -cyklodextrinu došlo k lepšímu rozdělení dvojice isorhamnetin-3-*O*-rutinosid a kaempferol-3-*O*-rutinosid. Na separaci kyseliny neochlorogenové a kryptochlorogenové neměl přídavek cyklodextrinů do pracovního elektrolytu vliv (obr. 3.10). Po rozšíření směsi standardů o kyselinu p-hydroxybenzoovou, naringenin, hesperetin a rutin byly provedeny analýzy za stejných podmínek jako v předchozím případě. Ze záznamů analýz bylo patrné, že přídavek cyklodextrinů má vliv na migraci flavonoidů, ale na separaci kyselin významný vliv nemá. Rozlišení isorhamnetin-3-*O*-glukosidu a kaempferol-3-*O*-glukosidu se sice zvýšilo, ale rozlišení ostatních flavonoidů (glykosidovaných i neglykosidovaných) se snížilo.



**Obrázek 3.10:** Analýza směsi fenolických kyselin a glykosidovaných flavonoidů v 25 mM boritanovém pufru o pH 9,30. Nepokrytá křemenná kapilára 72 (64) cm, 50  $\mu$ m I.D., teplota 25  $^{\circ}$ C, napětí +20 kV, detekce při 254 nm, dávkování vzorku 50 mbar/5s. 1 – isorhamnetin-3-*O*-glukosid, 2 – isorhamnetin-3-*O*-rutinosid, 3 – kaempferol-3-*O*-rutinosid, 4 – neochlorogenová kyselina, 5 – kryptochlorogenová kyselina, 6 – chlorogenová kyselina.

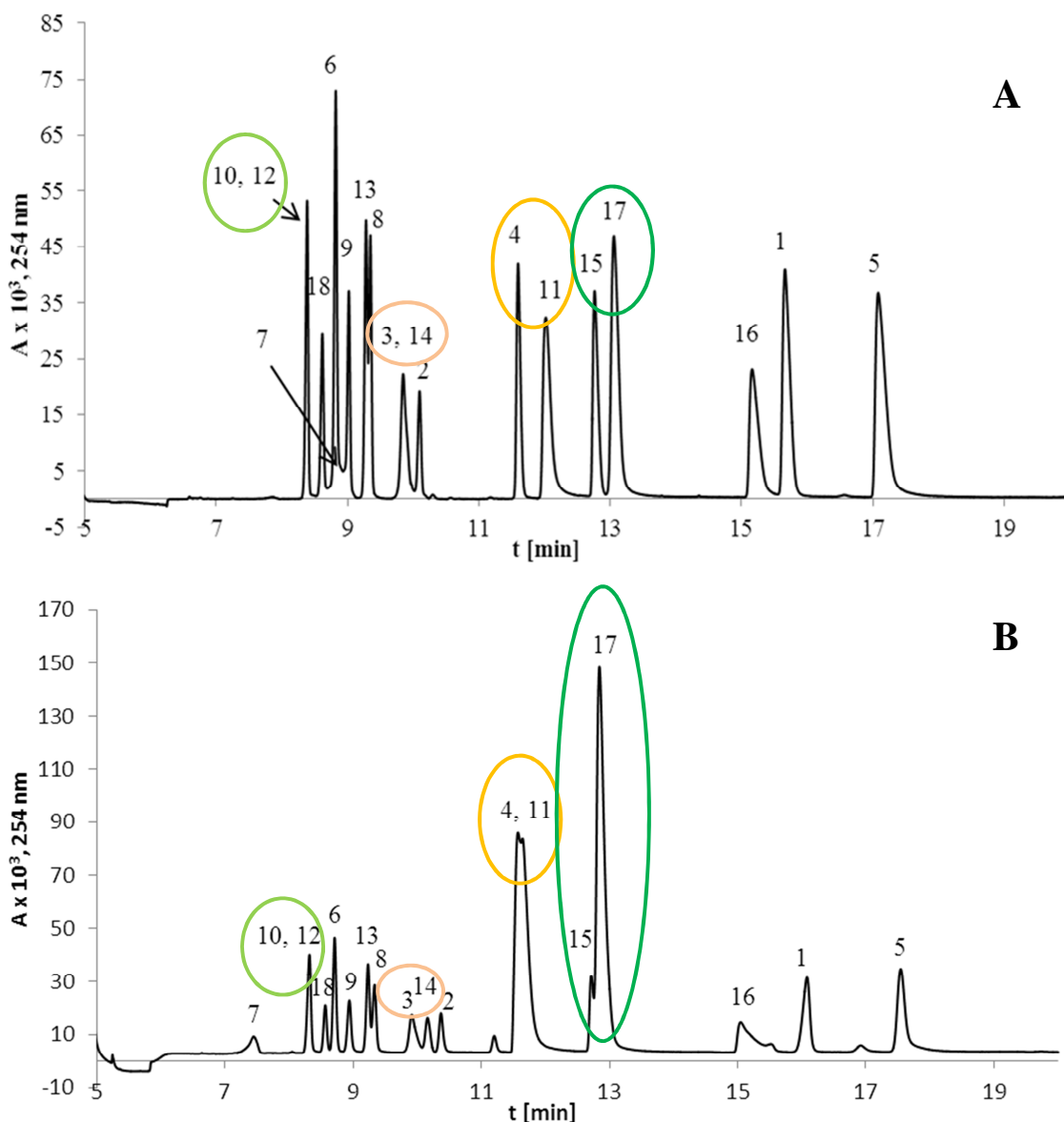
Na obrázku 3.11 jsou znázorněny závislosti rozdílů migračních časů analytů a času elektroosmotického toku  $\Delta t$  na koncentraci použitého cyklodextrinu. Z uvedených závislostí je patrné, že použití methylovaného a sulfatovaného cyklodextrinu vedlo k zvýšení selektivity separace obou rutinoidů, zatímco izomery chlorogenové kyseliny se rozdělit nepodařilo.



**Obrázek 3.11:** Závislost  $\Delta t$  na koncentraci cyklodextrinů v základním elektrolytu. Podmínky analýzy viz obr. 3.10.

Na obrázku 3.12 je porovnán průběh analýzy pomocí MEKC s pseudostacionární fází tvořenou decylsíránem sodným bez (3.12A) a s přidavkem heptakis(2,6-di-O-metyl)- $\beta$ -cyklodextrinu (3.12B). Na obr. 3.12A je vidět, že nedošlo k rozdělení isorhamnetin-3-O-rutinosidu a kaempferolu 3-O-rutinosidu a kyseliny kryptochlorogenové a neochlorogenové. Po přidavku heptakis(2,6-di-O-metyl)- $\beta$ -cyklodextrinu do základního elektrolytu došlo k rozdělení kyseliny kryptochlorogenové a neochlorogenové, naopak se nepodařilo rozdělit kyselinu ferulovou a kaempferol a dvojici látek kyseliny p-kumarové a kvercetin. Separace probíhala v nepokryté křemenné kapiláře o celkové délce 48 cm (efektivní délce 40 cm) a

vnitřním průměru 50  $\mu\text{m}$  (vnitřní průměr kapiláry v místě detekce byl 150  $\mu\text{m}$ ) za podmínek uvedených v experimentální části.



**Obrázek 3.12:** Separace standardů fenolických kyselin a flavonoidů. BGE: 25 mM boritanový pufr pH 9,30. **A** – 36 mM decylsírán sodný, **B** – 36 mM decylsírán sodný + 5 mM heptakis(2,6-di-*O*-metyl)- $\beta$ -cyklodextrin. Nepokrytá křemenná kapilára 48 (40) cm, 50  $\mu\text{m}$  I.D., vnitřní průměr detekčního okénka 150  $\mu\text{m}$ , vložené napětí +20 kV, teplota separace 20  $^{\circ}\text{C}$ , dávkování 100 mbar/10 s, detekce při 254 nm. 1 – kávová kyselina, 2 – chlorogenová kyselina, 3 – kryptochlorogenová kyselina, 4 – ferulová kyselina, 5 – galová kyselina, 6 – hesperetin, 7 – hesperidin, 8 – isokvercitrin, 9 – isorhamnetin-3-*O*-glukosid, 10 – isorhamnetin-3-*O*-rutinosid, 11 – kaempferol, 12 – kaempferol-3-*O*-rutinosid, 13 – naringenin, 14 – neochlorogenová kyselina, 15 – p-kumarová kyselina, 16 – p-hydroxybenzoová kyselina, 17 – kvercetin, 18 – rutin.

Na základě výsledků analýz standardů byl pro další experimenty použit základní elektrolyt s 36 mM decylsíránem sodným [36]. V další fázi byly připraveny kalibrační řady pro vybrané fenolické kyseliny a flavonoidy. Bylo připraveno sedm směsných kalibračních roztoků v rozsahu koncentrací 0,5 – 100 µg/ml. První, čtvrtý a sedmý roztok byl proměřen pětkrát, ostatní kalibrační roztoky byly proměřeny třikrát. Získané hodnoty byly statisticky zpracovány, byly zkonstruovány kalibrační závislosti pro jednotlivé standardy, jejichž parametry jsou uvedeny v tabulce 3.1.

**Tabulka 3.1:** Parametry kalibračních závislostí.

Analyt	Směrnice ± SD	Úsek ± SD	R <sup>2</sup>	Oblast linearity (µg/ml)	LOD/LOQ (mg/ml)
galová kyselina	34,41 ± 0,36	-0,29 ± 15,47	0,9995	0,5-100	0,21/0,70
neochlorogenová kyselina	6,18 ± 0,05	4,04 ± 2,28	0,9996	0,5-100	0,22/0,75
p-hydroxybenzoová kyselina	19,94 ± 0,38	2,32 ± 16,34	0,9982	0,5-100	0,09/0,31
chlorogenová kyselina	5,67 ± 0,07	7,77 ± 2,82 <sup>b</sup>	0,9993	0,5-100	0,14/0,47
kryptochlorogenová kyselina	6,54 ± 0,09	-4,32 ± 4,10	0,9990	0,5-100	0,24/0,81
kávoová kyselina	25,36 ± 0,21	14,17 ± 8,86	0,9997	0,5-100	0,11/0,37
p-kumarová kyselina	17,21 ± 0,32	-15,11 ± 13,85	0,9983	0,5-100	0,08/0,27
ferulová kyselina	14,77 ± 0,17	7,92 ± 7,12	0,9994	0,5-100	0,14/0,46
isokvercitrin	12,05 ± 0,10	-0,21 ± 4,75	0,9997	1,0-100	0,25/0,84
rutin	6,48 ± 0,09	16,95 ± 8,04	0,9987	0,5-100	0,12/0,39
hesperidin	6,52 ± 0,22	13,20 ± 10,35	0,9954	0,5-100	0,41/1,35
kaempferol-3- <i>O</i> -rutinosid, isorhamnetin-3- <i>O</i> -rutinosid <sup>a</sup>	7,41 ± 0,14	-10,72 ± 11,88	0,9983	1,0-100	0,13/0,44
isorhamnetin-3- <i>O</i> -glukosid	9,07 ± 0,12	7,80 ± 5,19	0,9991	0,5-100	0,08/0,26
kvercetin	16,56 ± 2,90	-28,73 ± 29,80	0,9155	0,5-20	0,30/1,06
naringenin	14,3, ± 0,16	5,36 ± 6,98	0,9994	0,5-100	0,05/0,18
hesperetin	15,94 ± 0,24	13,62 ± 10,19	0,9989	0,5-100	0,07/0,22
kaempferol	22,37 ± 0,62	-61,92 ± 26,93	0,9961	0,5-100	0,43/1,43

<sup>a</sup> Sloučeniny nebyly za daných podmínek rozděleny.

<sup>b</sup> Statisticky významný úsek ( $\alpha = 0,05$ )



Pro statistické vyhodnocení naměřených dat byl využit program Statistica 10 (StatSoft, Inc., 2011, www.statsoft.com).

Limit detekce (*LOD*) a kvantifikace (*LOQ*) vybraných fenolických kyselin a flavonoidů byl spočítán dle rovnice:

$$LOD = \frac{3h}{s} \quad (3.2)$$

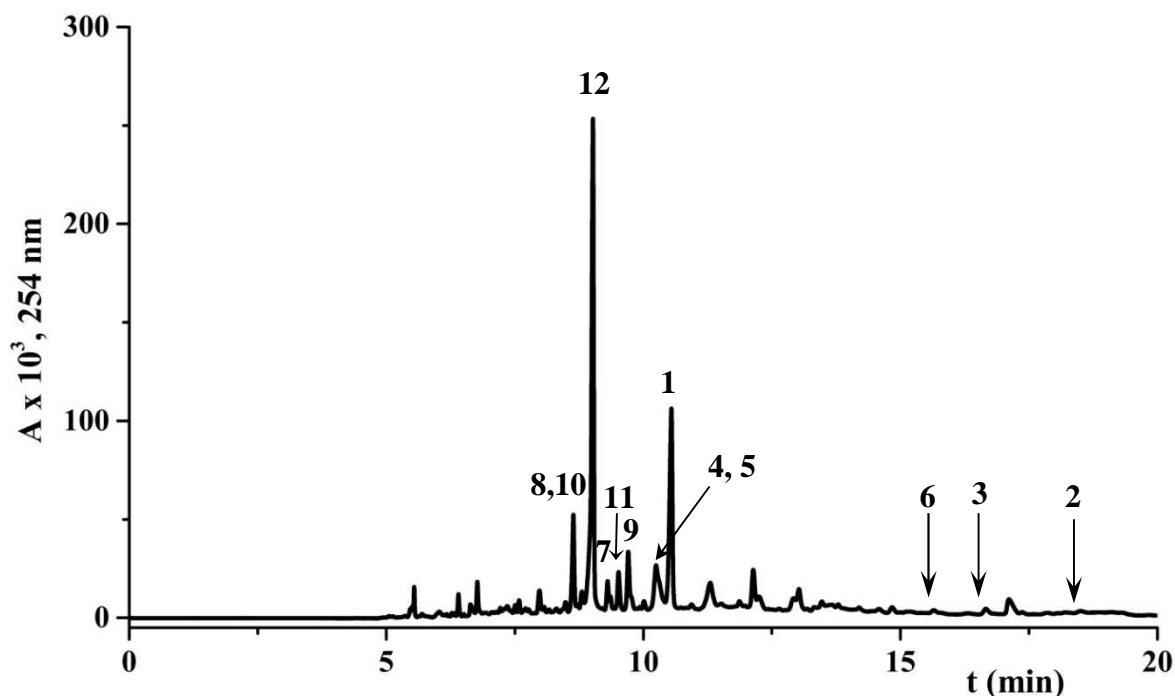
resp.:

$$LOQ = \frac{10h}{s} \quad (3.3)$$

kde *h* je směrodatná odchylka signálu šumu a *s* je směrnice kalibrační přímky sestavené ze závislosti výšky píku na koncentraci standardu.

Použití separační kapiláry s větším vnitřním průměrem v místě detekce oproti zbytku kapiláry (tzv. kapilára s bublinkovou celou) vede ke zvýšení citlivosti detekce a ke zvýšení lineárního rozsahu v porovnání s kapilárou, jejíž vnitřní průměr je v celé její délce stejný. Oblast linearity je ve většině případů v rozsahu 0,5 – 100 μg/ml.

Při analýze reálných vzorků byly připraveny tři série výluhů černého bezu. První a druhá série reprezentovaly kupovaný bylinný čaj. V prvním případě byl pro přípravu nálevu použit vždy nový čajový sáček, ve druhém případě bylo dvacet čajových sáčků otevřeno a jejich obsah byl smísen. Nálev byl připraven z navážky z této průměrné směsi čajových sáčků. Třetí série byla připravena ze sušených květů černého bezu nasbíraných a nasušených ve Veltrubech v červnu 2013. Záznam separace reálného vzorku připraveného dle postupu uvedeného v kapitole 3.3.2 je uveden na obrázku 3.13.



**Obrázek 3.13:** Separace výluhu čajového sáčku obsahujícího květ černého bezu. Základní elektrolyt 25 mM boritanový pufr, pH 9,30 s 36 mM decylsíránem sodným, kapilára o délce 48 (40) cm s vnitřním průměrem 50  $\mu\text{m}$  a v místě detekce s průměrem 150  $\mu\text{m}$ . Dávkování vzorku 100 mbar/10 s, vložené napětí 20 kV, teplota 25  $^{\circ}\text{C}$ . 1 – chlorogenová kyselina, 2 – galová kyselina, 3 – kávová kyselina, 4 – kryptochlorogenová kyselina, 5 – neochlorogenová kyselina, 6 - p-hydroxybenzoová kyselina 7 - Isorhamnetin-3-*O*-glukosid, 8 – isorhamnetin-3-*O*-rutinosid, 9 – isokvercitrin, 10 – kaempferol-3-*O*-rutinosid, 11 – naringenin, 12 – rutin.

Výsledky kvantitativní analýzy tří sérií vzorků květů černého bezu jsou uvedeny v tabulce 3.2 společně s hodnotami mezí detekce/kvantifikace. Vzhledem k tomu, že se nepodařilo rozdělit kaempferol-3-*O*-rutinosid a isorhamnetin-3-*O*-rutinosid je hodnota *LOQ* u těchto látek uvedena jako suma pro obě látky. V každé sérii bylo analyzováno pět vzorků, každý vzorek byl změřen třikrát. Pro kyselinu neochlorogenovou a kryptochlorogenovou a pro pár isorhamnetin-3-*O*-rutinosid a kaempferol-3-*O*-rutinosid je uvedena suma jejich koncentrací, jelikož za daných podmínek nedošlo k jejich rozdělení. Koncentrace kyseliny p-kumarové, hesperidinu, kvercetinu (ve všech vzorcích) a kyseliny galové (ve třetí sérii vzorků, nasbíraný a nasušený bez) nebyla stanovena, jelikož její hodnota byla nižší než mez kvantifikace. Koncentrace hesperidinu a kaempferolu není stanovena, jelikož jejich odezva byla nižší než limit detekce.

Profil zastoupení fenolických kyselin a flavonoidů ve výluzích černého bezu je podobný pro všechny série s nejvyšším zastoupením rutinu a kyseliny chlorogenové. Významné rozdíly v koncentracích mezi jednotlivými sériemi jsou zaznamenány u minoritně zastoupených sloučenin. Nejvyšší koncentrace polyfenolů byla pozorována v sérii ze

smíchaných čajových sáčků, nejnižší koncentrace polyfenolů byla v nasbíraných a nasušených květech černého bezu.

**Tabulka 3.2:** Výsledky kvantitativní analýzy vzorků černého bezu, limit detekce a kvantifikace.

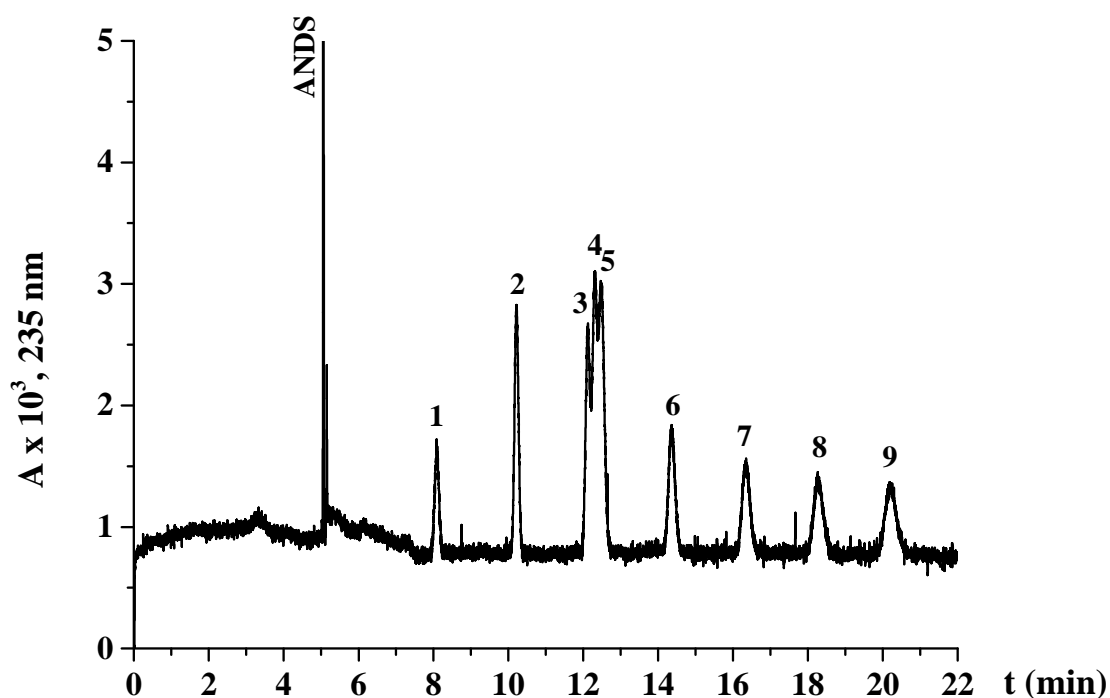
Analyt	<i>c</i> (mg/g) Čajové sáčky	<i>c</i> (mg/g) směs čajových sáčků	<i>c</i> (mg/g) Sušené květy
galová kyselina	0,19 ± 0,04	0,06 ± 0,04	c
neochlorogenová kyselina	5,15 ± 0,57	5,21 ± 0,62	4,02 ± 0,31
p-hydroxybenzoová kyselina	0,32 ± 0,05	0,46 ± 0,06	0,18 ± 0,10
chlorogenová kyselina	11,04 ± 0,05	12,44 ± 1,37	6,50 ± 0,66
kryptochlorogenová kyselina	a	a	a
kávová kyselina	0,28 ± 0,06	0,32 ± 0,04	0,20 ± 0,09
p-kumarová kyselina	c	c	c
ferulová kyselina	0,33 ± 0,05	0,43 ± 0,25	0,18 ± 0,06
isokvercitrin	1,64 ± 0,33	1,80 ± 0,30	0,66 ± 0,31
rutin	17,45 ± 1,01	21,59 ± 1,95	12,83 ± 0,74
hesperidin	c	c	c
kaempferol-3- <i>O</i> -rutinosid	3,20 ± 0,18	1,34 ± 0,29	3,27 ± 0,21
isorhamnetin-3- <i>O</i> -rutinosid	b	b	b
isorhamnetin-3- <i>O</i> -glukosid	0,89 ± 0,07	4,20 ± 0,30	0,69 ± 0,20
kvercetin	c	c	c
naringenin	0,91 ± 0,16	1,08 ± 0,09	0,61 ± 0,11
hesperetin	d	d	d
kaempferol	d	d	d
<b>a – byla stanovena suma kyseliny kryptochlorogenové a neochlorogenové</b> <b>b – byla stanovena suma isorhamnetin-3-<i>O</i>-rutinosidu a kaempferol-3-<i>O</i>-rutinosidu</b> <b>c – koncentrace látek je nižší než limit kvantifikace</b> <b>d – koncentrace látek je nižší než limit detekce</b>			

### 3.4.2 CZE, CZE/MS separace oligosacharidů

V prvním kroku analýzy vybraných sacharidů (D-(+)-rafinosa, D-(+)-melezitosa, maltotriosa, isomaltotriosa, stachyosa, maltotetrosa, maltopentosa, maltohexosa a maltoheptosa) byla provedena separace jejich jednotlivých derivátů pomocí kapilární zónové

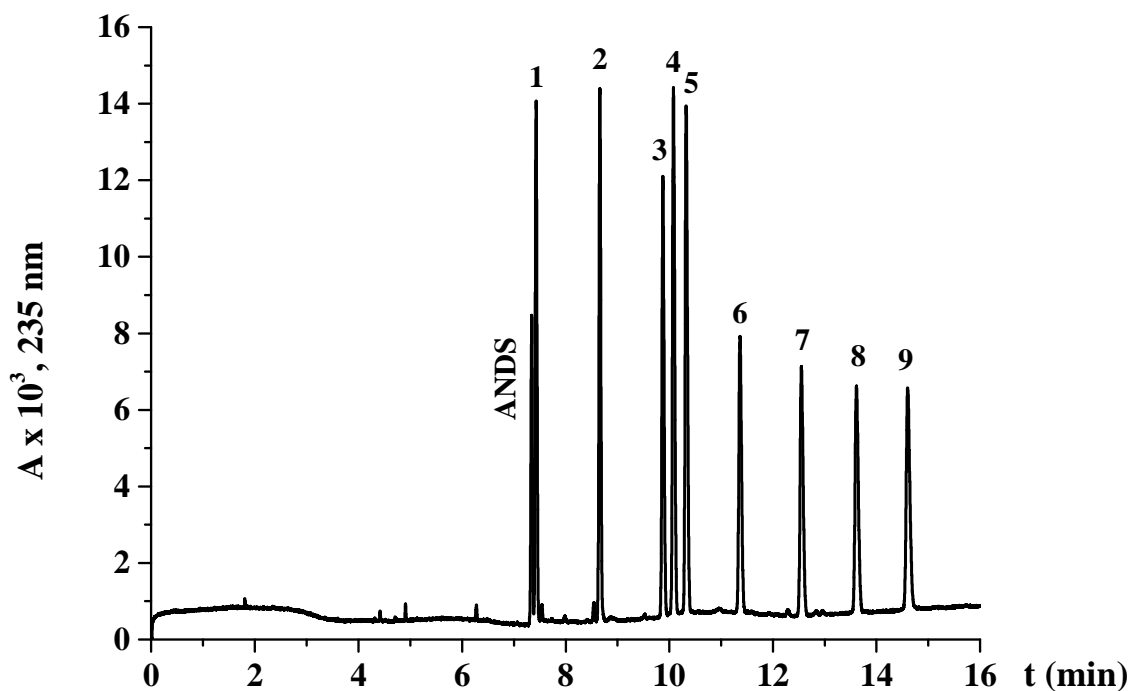
elektroforézy. Jako derivatizační činidla byla použita 7-aminonaftalen-1,3-disulfonová kyselina (ANDS), 8-aminonaftalen-1,3,6-trisulfonová kyselina (ANTS), 2-aminobenzoová kyselina (2-AA), 2-aminobezamid (2-AB) a 2-aminopyridin (2-AP).

Dále byly v rámci diplomové práce [37], na které jsem se podílela jako konzultantka, testovány kapiláry s různou úpravou vnitřní stěny. Byly použity kapiláry pokryté polyvinylalkoholem (Agilent), polydimethylakrylamidem (PDMA) a nepokrytá kapilára. Pokrytí polyvinylalkoholem (PVA) potlačuje elektroosmotický tok a absorpci látek na vnitřní stěnu kapiláry při použití neutrálních i mírně alkalických elektrolytů. Na obrázku 3.14 je záznam separace směsi ANDS derivátů oligosacharidů v 20 mM fosfátovém pufru o pH 7,00 v kapiláře pokryté polyvinylalkoholem.



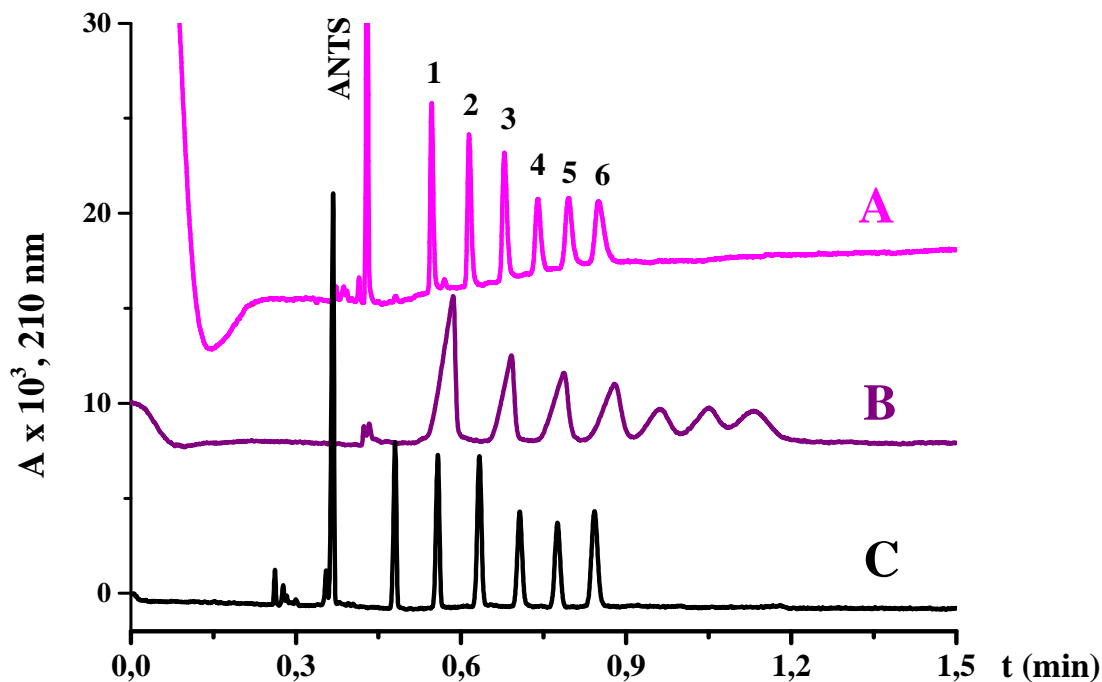
**Obrázek 3.14:** Separace směsi ANDS derivátů oligosacharidů. BGE: 20 mM fosfátový pufr, pH 7,00. Křemenná kapilára pokrytá polyvinylalkoholem 50 (42) cm, vnitřní průměr 50  $\mu\text{m}$ , napětí -30 kV, teplota 25  $^{\circ}\text{C}$ . 1- D-(+)-melezitosa, 2 – D-(+)-rafinosa, 3 – maltotriosa, 4 – stachyosa, 5 – isomaltotriosa, 6 – maltotetraosa, 7 – maltopentosa, 8 – maltohexosa, 9 – maltoheptosa.

Na obrázku 3.15 je pro porovnání uvedena analýza ANDS derivátů oligosacharidů v nepokryté kapiláře. Oproti předchozímu případu došlo k rozdělení maltotriosy, stachyosy a isomaltotriosy na základní linii. Z porovnání separací v kapilárách pokrytých PVA, PDMA a v nepokryté kapiláře vyplývá, že doba analýzy se zvyšuje v pořadí nepokrytá, PVA a PDMA kapilára. Nejvyšší účinnosti separace bylo dosaženo s nepokrytou kapilárou, poté s kapilárou pokrytou PVA a nejnižší účinnost byla pozorována u kapiláry pokryté PDMA. Na základě těchto experimentů jsme dále pokračovali s nepokrytou kapilárou.



**Obrázek 3.15:** Separace směsi ANDS derivátů oligosacharidů. BGE: 50 mM fosfátový pufr, pH 2,50. Nepokrytá křemenná kapilára 50 (42) cm, vnitřní průměr 50  $\mu\text{m}$ , vložené napětí -20 kV, teplota 25  $^{\circ}\text{C}$ . 1 – D-(+)-melezitosa, 2 – D-(+)-rafinosa, 3 – maltotriosa, 4 – stachyosa, 5 – isomaltotriosa, 6 – maltotetrosa, 7 – maltopentosa, 8 – maltohexosa, 9 – maltoheptosa.

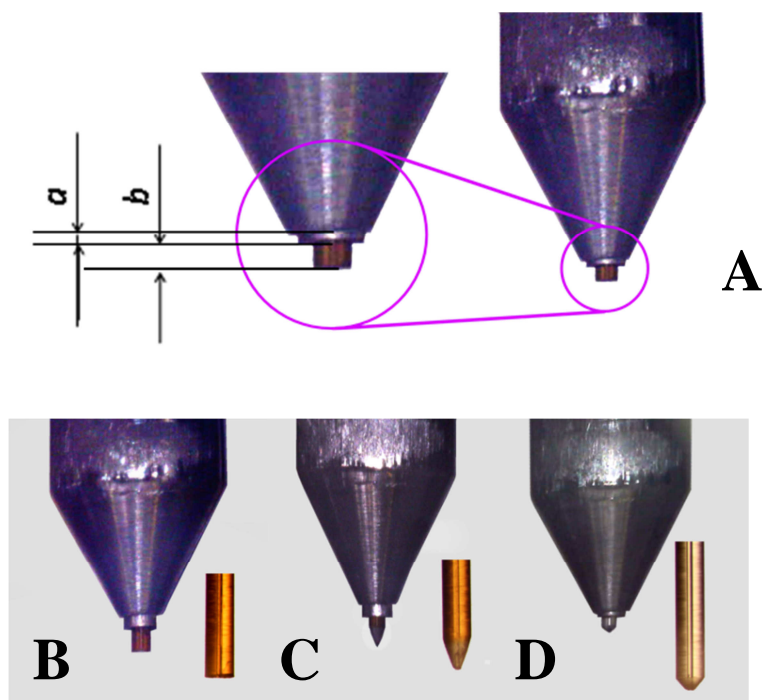
Dále byly testovány různé druhy elektrolytů za účelem získat co nejkratší dobu analýzy s co nejvyšší účinností. Byly vybrány takové elektrolyty, které jsou kompatibilní s hmotnostní spektrometrií (kyselina mravenčí, mravenčan amonný a pro porovnání také netěkavý fosforečnanový pufr). Aby bylo dosaženo co nejkratší doby analýzy, byl k separaci využit kratší konec nepokryté křemenné kapiláry (efektivní délka kapiláry byla 8 cm). Analyzovaný vzorek byl dávkován na výstup kapiláry a byla změněna polarita zdroje napětí, aby byla zajištěna migrace vzorku k detekčnímu okénku. Na obrázku 3.16 jsou porovnány separace v 50 mM mravenčanu amonném o pH 3,00 (3.16A, pH upraveno pomocí kyseliny mravenčí), 50 mM kyselině mravenčí (3.16B) a 50 mM fosforečnanovém pufru (3.16C,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 + \text{H}_3\text{PO}_4$ , pH 2,50). Napětí vložené na kapiláru bylo +25 kV, kazeta s kapilárou byla temperována na 25  $^{\circ}\text{C}$ . Při použití kyseliny mravenčí jako elektrolytu byla doba analýzy 1,2 min. V případě, že byl použit mravenčan amonný nebo dihydrogenfosforečnan sodný s kyselinou fosforečnou, byla doba potřebná k rozdělení dané směsi kratší než jedna minuta. Tento fakt, že lze ANTS deriváty maltosy až maltoheptosy rozdělit v kapiláře o délce 8 cm lze využít při spojení kapilární elektroforézy s hmotnostním spektrometrem za účelem získání kratší doby analýzy.



**Obrázek 3.16:** Porovnání rychlých separací ANTS derivátů maltosy až maltoheptosy. **A** – BGE: 50 mM HCOONH<sub>4</sub> + HCOOH, pH 3,00; **B** – BGE: 50 mM HCOOH; **C** – BGE: 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, pH 2,50. Nepokrytá křemenná kapilára o vnitřním průměru 50 μm a efektivní délce 8 cm. Vložené napětí 25 kV, teplota 25 °C. 1 – maltosa, 2 – maltotriosa, 3 – maltotetrosa, 4 – maltopentosa, 5 – maltohexosa, 6 – maltoheptosa.

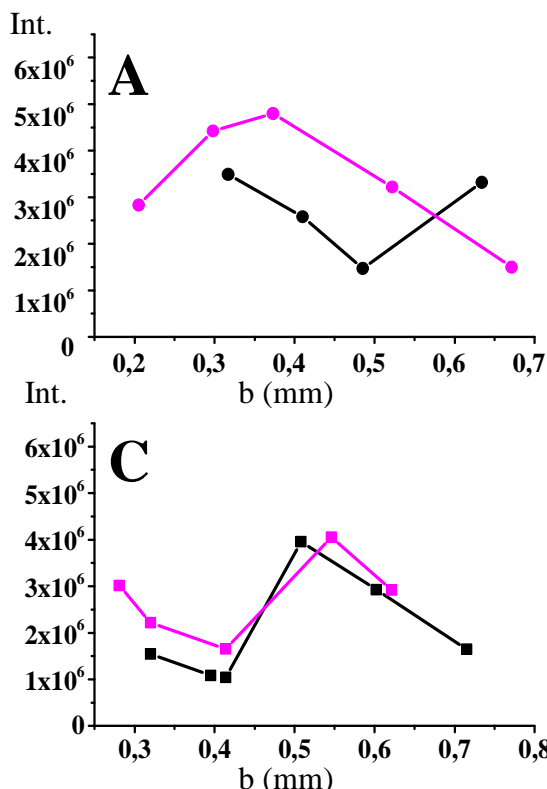
V rámci optimalizace spojení kapilární elektroforézy s hmotnostním spektrometrem realizovaného pomocí rozhraní s přídavnou kapalinou (sheath-flow) byl studován vliv vloženého napětí na iontový zdroj (ESI), pozice a geometrie konce separační kapiláry, složení a průtoky přídavné kapaliny, průtoky sušícího plynu, délky separační kapiláry a vloženého napětí na separační kapiláru.

Nepokrytá křemenná separační kapilára z CE ústila přímo do iontového zdroje hmotnostního spektrometru. Byly testovány tři profily konce separační kapiláry – rovný a dva kónické (vrcholový úhel 95° a 50°). Separační kapilára s rovným koncem byla uříznuta diamantovým nožem, kónického profilu konce kapiláry bylo dosaženo jejím přesným zbrúšením. Na obrázku 3.17 jsou ukázány fotografie pořízené přímo v iontovém zdroji hmotnostního spektrometru a detail konce separační kapiláry.



**Obrázek 3.17:** Geometrie konce separační kapiláry. A – vyznačení jednotlivých vzdáleností charakterizujících separační kapiláru v iontovém zdroji. B – detail separační kapiláry s rovným koncem, C – detail separační kapiláry sbroušené s vrcholovým úhlem  $50^\circ$ , D – detail separační kapiláry sbroušené s vrcholovým úhlem  $95^\circ$ . a – vzdálenost konce vnitřní kapiláry od těla sprejovací špičky, b – vysunutí separační CE kapiláry.

Byla sledována intenzita signálu v závislosti na typu použité kapiláry a na vzdálenosti konce kapiláry od sprejovací špičky (obr. 3.18).



Vzdálenost  $a = 0,093$  mm

Vzdálenost  $a = 0,205$  mm (viz obr. 3.17A)

A – rovný konec separační kapiláry

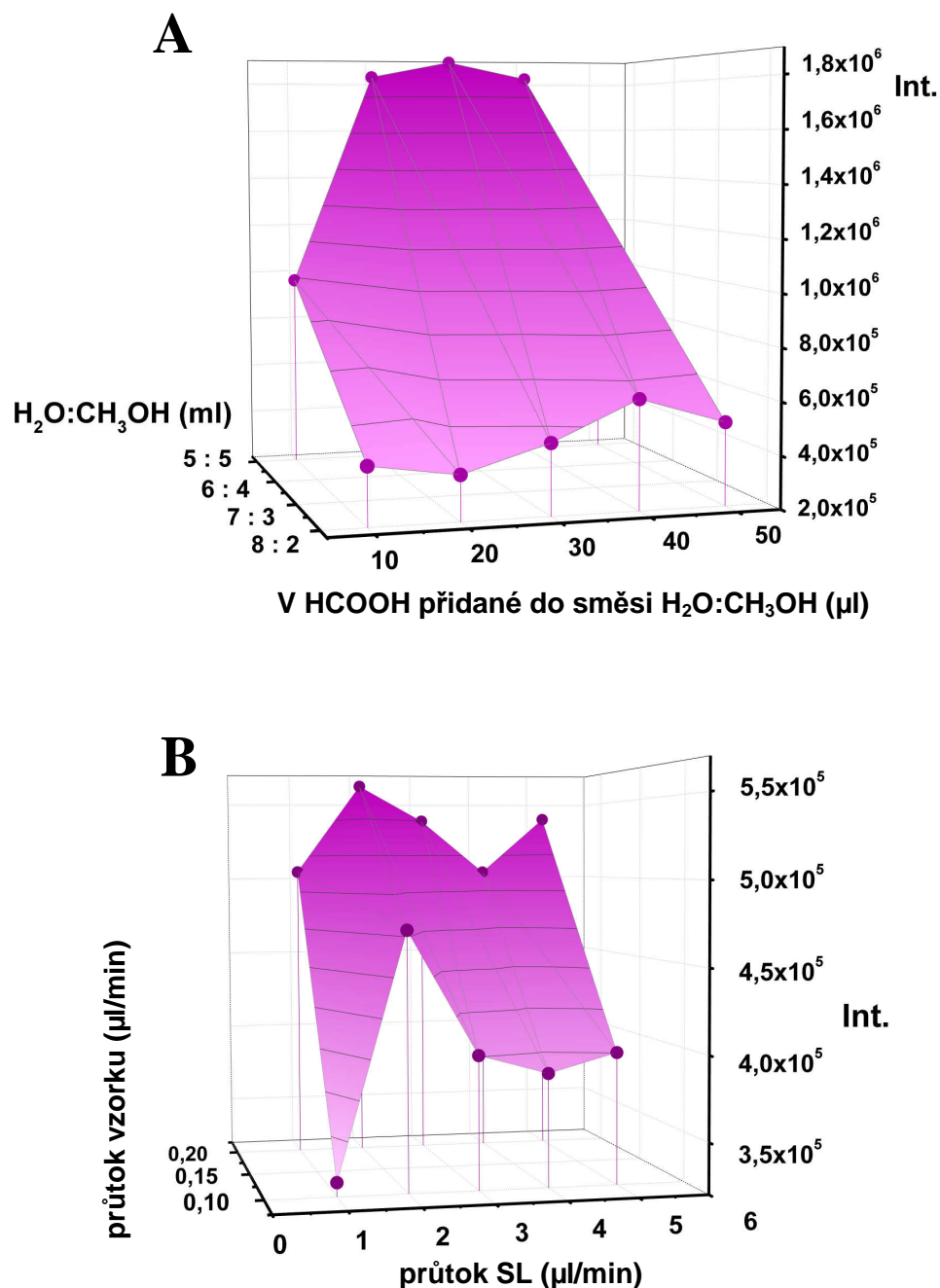
B – kónický konec separační kapiláry, 95°.

C – kónický konec separační kapiláry, 50°.

**Obrázek 3.18:** Intenzita signálu v závislosti na geometrii a pozici separační kapiláry v iontovém zdroji.

Nejlepších výsledků bylo dosaženo s použitím separační kapiláry s kónicky zbrošeným koncem, kdy vzdálenost konce kapiláry od sprejovací špičky byla menší než vnější průměr kapiláry. Použitím kónického konce separační kapiláry došlo ke zvýšení poměru signál/šum oproti použití kapiláry s rovným koncem. Následovala optimalizace složení a průtoku přídavné kapaliny. Byl sledován vliv poměru  $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{OH}/\text{HCOOH}$  na intenzitu signálu maltoheptosy (obr. 3.19A). Na základě těchto dat byla pro následující měření použita přídavná kapalina o složení  $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{OH}/\text{HCOOH}$  (5 ml : 5 ml : 30  $\mu\text{l}$ ). Na obrázku 3.19B je graf závislosti intenzity signálu maltoheptosy na průtoku vzorku separační kapilárou vytvořeném kombinací elektroosmózy a přídavného tlaku a průtoku přídavné kapaliny. Jak je patrné z tohoto grafu, nejvyšší intenzity signálu vzorku bylo dosaženo při průtoku přídavné kapaliny 2  $\mu\text{l}/\text{min}$ .





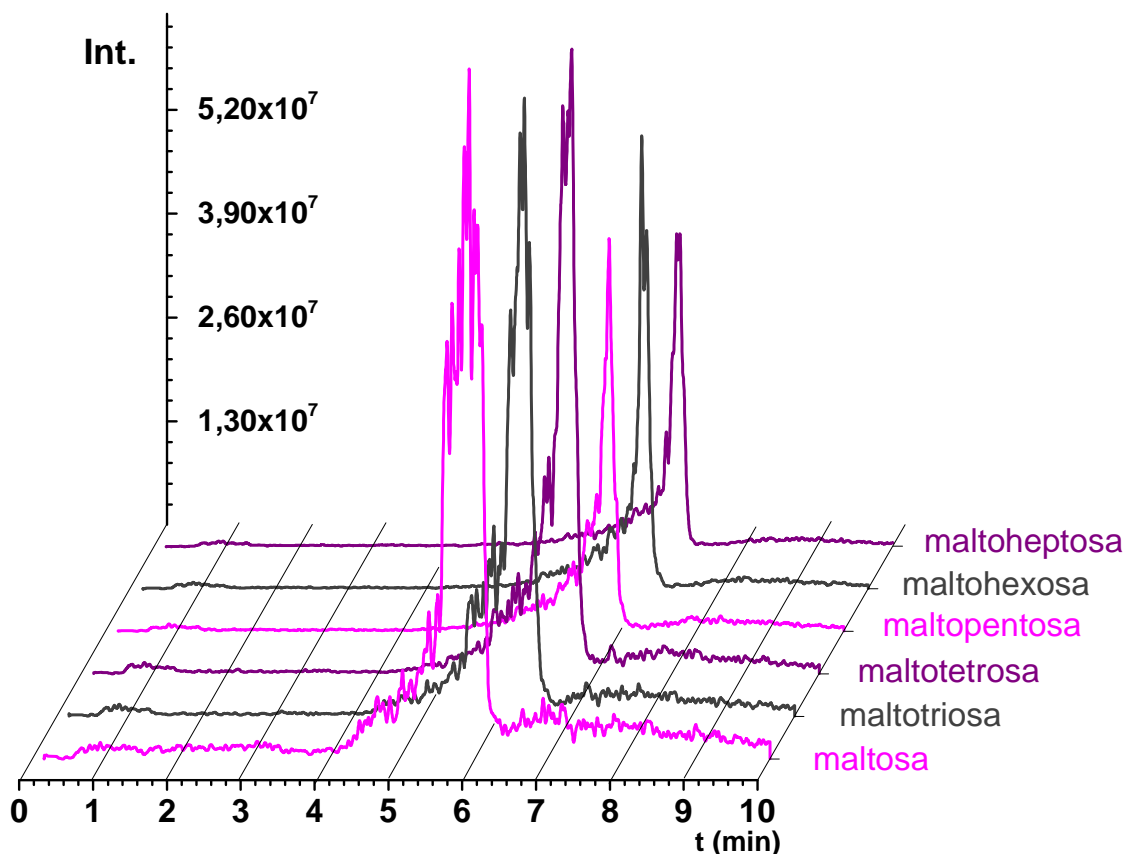
**Obrázek 3.19:** Vliv složení a průtoku přídavné kapaliny (SL) na intenzitu signálu maltoheptosy.

A- vliv poměru  $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{OH}/\text{HCOOH}$  na intenzitu signálu maltoheptosy.

B- závislosti intenzity signálu maltoheptosy na průtoku vzorku separační kapilárou a průtoku přídavné kapaliny

Výsledkem tohoto procesu bylo optimalizované spojení kapilární elektroforézy s hmotnostní detekcí pomocí přídavné kapaliny, kdy bylo dosaženo separace homologické řady maltosy až maltoheptosy během 7 minut, přičemž při počátečních optimalizačních experimentech se čas potřebný k rozdělení této směsi pohyboval okolo 21 minut. Na obrázku 3.20 je záznam separace směsi oligosacharidů. Základní elektrolyt byl tvořen 400 mM HCOOH, separační kapilára byla 80 cm dlouhá s vnitřním průměrem 50  $\mu\text{m}$  s kónicky

sbroušeným koncem v úhlu  $50^\circ$ . Konec separační kapiláry v iontovém zdroji byl umístěn 0,4 mm od sprejovací špičky (vzdálenost  $a = 0,205$  mm). Po nadávkování vzorku byl obsah kapiláry tlačem směrem k detektoru tlakem 950 mbar po dobu 1 min, poté bylo na kapiláru vloženo napětí -25 kV a tlak byl snížen na 25 mbar. Průtok přídavné kapaliny  $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{OH}/\text{HCOOH}$  (5 ml : 5 ml : 30  $\mu\text{l}$ ) byl 2  $\mu\text{l}/\text{min}$ . Vstupní potenciál byl -10 V, kolizní energie byla také -10 V, napětí na iontovém zdroji bylo -4500 V a použitý deklasterační potenciál měl hodnotu -100 V. Skenovací rychlost byla 1000 Da/s.



**Obrázek 3.20:** CE/MS separace oligosacharidů. BGE: 400 mM HCOOH, separační kapilára 80 cm s vnitřním průměrem 50  $\mu\text{m}$  s kónicky sbroušeným koncem v úhlu  $50^\circ$ . Konec separační kapiláry v iontovém zdroji byl umístěn 0,4 mm od sprejovací špičky (vzdálenost  $a = 0,205$  mm). 0 min tlak 950 mbar, 1 min napětí -25 kV a tlak 25 mbar. Průtok SL  $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{OH}/\text{HCOOH}$  (5 ml : 5 ml : 30  $\mu\text{l}$ ) byl 2  $\mu\text{l}/\text{min}$ . Vstupní potenciál -10 V, kolizní energie byla -10 V, napětí na iontovém zdroji -4500 V, deklasterační potenciál -100 V, skenovací rychlost 1000 Da/s.

### 3.5 Shrnutí

Tato kapitola byla věnována optimalizaci a následnému využití micelární elektrokinetické chromatografie a kapilární zónové elektroforézy s UV/Vis nebo hmotnostní detekcí pro analýzu přírodních antioxidantů a oligosacharidů. V první části práce byly optimalizovány podmínky pro využití micelární elektrokinetické chromatografie při stanovení fenolických kyselin, glykosidovaných a neglykosidovaných flavonoidů v černém bezu. Optimalizace zahrnovala vliv použité povrchově aktivní látky jako pseudostacionární fáze, vliv  $\beta$ -cyklodextrinu přítomného v základním elektrolytu a možnost využití směsných micel. Byly změřeny kalibrační závislosti, stanoven limit detekce a kvantifikace a byly získány hodnoty koncentrace jednotlivých antioxidantů ve vyluzích ze vzorků květů černého bezu a tyto byly dále přepočteny na obsah jednotlivých antioxidantů v původních vzorcích sušených květů. Nejvyšší obsah antioxidantů byl ve vzorcích získaných smísením dvaceti čajových sáčků běžně dostupného čaje černého bezu, nejméně antioxidantů bylo stanoveno ve vzorcích nasbíraného a sušeného černého bezu z Veltrub. Je pravděpodobné, že obsah antioxidantů silně závisí na podmínkách prostředí, ve kterém rostou (klima, typ půdy, vlhkost, srážky) a také na době sběru a způsobu sušení.

Druhá část práce se zabývala optimalizací podmínek pro separaci homologické řady oligosacharidů – maltosy až maltoheptosy pomocí kapilární zónové elektroforézy a CE/MS. S využitím kapilární zónové elektroforézy s UV/Vis detekcí bylo dosaženo sub-minutových separací ANTS a ANDS derivátů maltosy až maltoheptosy. Spojení CE/MS bylo realizováno pomocí přídatné kapaliny, tzv. sheath-flow spojení. Byly studovány vlivy složení a průtoku přídatné kapaliny a geometrie a pozice separační kapiláry v iontovém zdroji na velikost odezvy detektoru. Bylo dosaženo rozdělení a detekce analyzovaných derivátů oligosacharidů pomocí CE/MS během sedmi minut.

Práce byly uveřejněny v:

- ❖ Váňová J., Česla P., Fischer J., CZE and MEKC separation of phenolic compounds, *Chemické listy* 107 (2013) S465.
- ❖ Váňová J., Česla P., Fischer J., Využití směsných micel v MEKC separaci přírodních antioxidantů. *Sborník přednášek XLVII. Seminář o tenzidech a detergentech* (2014) 43-50. Česká společnost chemická, Pardubice, ISBN 978-80-7395-836-7.

- ❖ Váňová J., Česla P., Fischer J., Vliv cyklodextrinů na separaci vybraných přírodních antioxidantů pomocí micelární elektrokinetické chromatografie. *Sborník přednášek ze semináře Monitorování cizorodých látek v životním prostředí XVI.* (2014) 123-132. Pardubice, ISBN 978-80-7395-821-3.
- ❖ Váňová J., Česla P., Fischer J., Využití  $\beta$ -cyklodextrinů při separaci vybraných isomerů fenolických kyselin a flavonoidů pomocí MEKC. *Monitorování cizorodých látek v životním prostředí XVII: sborník příspěvků ze semináře* (2015) 129-139. Pardubice: Univerzita Pardubice. ISBN 978-80-7395-926-5.
- ❖ Česla P., Dinisová P., Váňová J., Česlová L., Fischer J., Characterization of *Sambucus nigra* L. infusions using capillary electrophoresis and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Instrumental Methods for the analysis and identification of bioactive molecules*; Jayprakash, et al.; ACS Symposium Series; American Chemical Society: Washington, DC, (2014) 165-187. ISBN 978-0-8412-2976-1.
- ❖ Váňová J., Česla P., Česlová L., Fischer J., Development of Micellar Electrokinetic Chromatographic Method for Determination of Polyphenols in Elder Infusions. *Chemické listy 108* (2014) S192-S196. ISSN: 0009-2770.

### 3.6 Seznam použité literatury

- [1] Sun-Waterhouse D., Jin D., Waterhouse G., *Food Research International* 54 (2013) 781-789.
- [2] Nile S. H., Park S W., *Nutrition* 30 (2014) 134-144.
- [3] Kite G. C., Larsson S., Veitch N. C., Porter E. A., Dig N., Simmonds M. S. J., *Journal of agricultural and food chemistry* 61 (2013) 3501-3508.
- [4] Hurtado-Fernandéz E., Gómez-Romero M., Carrasco-Pancorbo A., Fernández-Gutiérrez A., *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 53 (2010) 1130-1160.
- [5] Delgado-Zamarreno M. M., González-Maza I., Sánchez-Pérez A., Carabias Martínez R., *Food chemistry* 100 (2007) 1722-1727.
- [6] Brewster M., Loftsson T., *Advanced Drug Delivery Reviews* 59 (2007) 645-666.
- [7] Singh M., Sharma R., Banerjee U. C., *Biotechnology Advances* 20 (2002) 341-359.
- [8] Aksamija A., Polidori A., Plasson R., Dangles O., Tomao V., *Food chemistry* 208 (2016) 258-263.
- [9] Astray G., Gonzalez-Barreiro C., Mujeto J. C., Rial-Otero R., Simal-Gándara J., *Food Hydrocolloids* 23 (2009) 1631-1640.
- [10] Del Valle M. E. M., *Process Biochemistry* 39 (2004) 1033-1046.
- [11] Nishi H., Fukuyama T., Terabe S., *Journal of chromatography A* 553 (1991) 503-516.
- [12] Terabe S., *Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis* 10 (1992) 705 – 715.
- [13] Tanford Ch., *The Journal of Physical Chemistry* 78 (1974) 2469-2479.
- [14] Fischer L. R., Oakenfull D. G., *Chemical Society Reviews* 6 (1977) 25-42.
- [15] Carey M. C., Small D., *The American Journal of Medicine* 49 (1970) 590-608.
- [16] Haque M. E., Das A. R., Rakshit A. K, Moulik S. P., *Langmuir* 12 (1996) 4084-4089.
- [17] Rosypal S. a kolektiv autorů, *Nový přehled biologie*, Scientia spol. s r.o., pedagogické nakladatelství, Praha 2003. Kapitola Fyziologie buňky, str. 57 – 81.
- [18] Suzuki S., Honda S., *Trends in analytical chemistry* 14 (1995) 279-288.
- [19] Rustighu I., Campa C., Rossi M., Semeraro S., Vetere A., Gamini A., *Electrophoresis* 30 (2009) 2632-2639.
- [20] An H. J., Franz A. H., Lebrilla C. B., *Journal of Chromatography A* 1004 (2002) 121-129.
- [21] Plocek J., Novotny M. V., *Journal of Chromatography A* 757 (1997) 215-223.

- [22] An H. J., Franz A. H., Lebrilla C. B., *Journal of chromatography A* 1004 (2003) 121-129.
- [23] Česla P., Vaňková N., Křenková J., Fischer J., *Journal of Chromatography A* 1438 (2016) 179-188.
- [24] Žídková J., Chmelík J., *Chemické listy* 94 (2000) 1093-1103.
- [25] Norková R., Jaklová Dytrtová J., Kašička V., *Chemické listy* 107 (2013) 949-955.
- [26] Hommerson P., Khan A.M., de Jong G.J., Somsen G.W., *Mass Spectrometry Reviews* 30 (2011) 1096-1120.
- [27] Kebarle P., Verkerk U.H., *Mass Spektrometry Reviews* 28 (2009) 898-917.
- [28] Nguyen S., Fenn J.B., *Proceedings of the national academy of science of the United states of America* 104 (2007) 1111-1117.
- [29] <http://www.amedis.cz/laboratorni-technika/hmotnostni-spektrometrie/sciex-qtrap/>, staženo 22.2.2017
- [30] Wan H., Öhman M., Blomberg L.G., *Journal of Chromatography A* 924 (2001) 59-70.
- [31] Váňová J., Diplomová práce, Univerzita Pardubice, 2012
- [32] Váňová J., Česla P., Fischer J., *Chemické listy* 107, S465 (2013).
- [33] Váňová J., Česla P., Fischer J., *Sborník přednášek XLVII. Seminář o tenzidech a detergentech*, str. 43-50. ČESKÁ SPOLEČNOST CHEMICKÁ, Pardubice 2014, ISBN 978-80-7395-836-7.
- [34] Váňová J., Česla P., Fischer J., *Sborník přednášek ze semináře Monitorování cizorodých látek v životním prostředí XVI.*, str. 123-132. Pardubice 2014, ISBN 978-80-7395-821-3.
- [35] Váňová J., Česla P., Fischer J., *Sborník přednášek ze semináře Monitorování cizorodých látek v životním prostředí XVII.*, str. 129-139. Pardubice 2015, ISBN 978-80-7395-926-3.
- [36] Česla P., Dinisová P., Váňová J., Česlová L., Fischer J., *Instrumental Methods for the analysis and identification of bioactive molecules*; Jayprakash, et al.; ACS Symposium Series; American Chemical Society: Washington, DC, 2014.
- [37] Hlavová K., Diplomová práce, Univerzita Pardubice, 2014.

## 4 Vícerozměrné separace

Vícerozměrné separace jsou založeny na kombinaci dvou a více nezávislých separačních technik a spočívají v separaci vzorku pomocí jedné metody a následně získané frakce jsou v další dimenzi separovány on-line nebo off-line minimálně ještě jednou další metodou [1]. V této práci byla použita kapalinová chromatografie s gradientovou elucí v první dimenzi a micelární elektrokinetická chromatografie v dimenzi druhé, proto je teoretická část této práce zaměřena zejména na tyto dvě techniky a možnosti jejich spojení.

### 4.1.1 Píková kapacita

Dvourozměrné separace přinášejí v porovnání s jednorozměrnou separací vyšší rozlišení a vyšší píkovou kapacitu. V jednorozměrné analýze realizované pomocí kapalinové chromatografie s gradientovou elucí je píková kapacita,  $n_{LC,g}$ , definována jako maximální počet píků, které mohou být umístěny jeden vedle druhého (s rozlišením  $R = 1$ ) v prostoru vymezeném dobou analýzy [2] a je dána vztahem [3]:

$$n_{LC,g} = 1 + \frac{\sqrt{N}}{4} \left( \frac{t_{R,z}}{t_{R,1}} - 1 \right) \quad (4.1)$$

kde  $N$  je počet teoretických pater,  $t_{R,1}$  je retenční čas prvního píku a  $t_{R,z}$  je retenční čas posledního eluujícího píku. V případě elektrokinetické chromatografie lze píkovou kapacitu,  $n_{EKC}$ , vypočítat dle rovnice:

$$n_{EKC} = 1 + \frac{\sqrt{N}}{4} \ln \left( \frac{t_2}{t_1} \right) \quad (4.2)$$

kde  $t_1$  je retenční čas prvního píku a  $t_2$  je retenční (migrační) čas posledního píku. V tomto případě je  $t_1$  roven času markeru elektroosmotického toku ( $t_0$ ) a  $t_2$  je roven migračnímu času pseudostacionární fáze ( $t_{mc}$ ) [4].

V ideálním případě je celková píková kapacita dvourozměrného separačního systému přibližně rovna násobku píkových kapacit obou dimenzí [5]:

$$n_{2D} \cong n_z \cdot n_y \quad (4.3)$$

kde  $n_z$  a  $n_y$  jsou píkové kapacity v jednotlivých dimenzích,  $n_{2D}$  je píková kapacita dvourozměrného systému.

### 4.1.2 Rozlišení

Giddings stanovil dvě základní pravidla charakterizující ideální vícerozměrnou separaci [5,6]. První z nich říká, že principy separace technik spojených v rámci vícerozměrných separací by měly být ortogonální a tedy by analyty měly být separovány na základě rozdílných fyzikálních či chemických principů. Druhé kritérium uvádí, že by nemělo v další dimenzi separace dojít ke ztrátě rozlišení získaného v první dimenzi. Proto jsou, v případě on-line spojení, kladeny vysoké nároky na rychlost separace v druhé dimenzi v porovnání s dimenzí první. Ideálně lze využít gradientovou eluci v první dimenzi, aby šířka píků získaná v první dimenzi byla víceméně konstantní a každý pík by tak mohl být v druhé dimenzi nadávkován třikrát až čtyřikrát [7].

Giddings dále ve své práci uvádí, že výsledné rozlišení,  $R_s$ , pro daný pár látek separovaných v dvoudimenzionálním systému je roven:

$$R_s \cong (R_{sD1} + R_{sD2})^{1/2} \quad (4.4)$$

kde  $R_{sD1}$  a  $R_{sD2}$  jsou hodnoty rozlišení daného páru látek, získaných v první, resp. v druhé dimenzi.

V kapalinové chromatografii je rozlišení definováno vztahem:

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \cdot \frac{\alpha - 1}{\alpha} \cdot \frac{k_2'}{1 + k_2'} \quad (4.5)$$

kde  $N$  je počet teoretických pater,  $\alpha$  je separační faktor a  $k_2'$  je retenční faktor.

V micelární elektrokinetické chromatografii lze rozlišení neutrálních látek vypočítat pomocí obdobné rovnice [8]:

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \cdot \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha}\right) \cdot \left(\frac{\bar{k}_2}{\bar{k}_2 + 1}\right) \cdot \left(\frac{1 + t_0/t_{mc}}{1 - (t_0/t_{mc})\bar{k}_1}\right) \quad (4.6)$$

kde  $R_s$  je rozlišení,  $N$  je počet teoretických pater,  $\alpha$  je separační faktor, který je dán poměrem retenčních faktorů  $\bar{k}_2/\bar{k}_1$ ,  $t_0$  je migrační čas markeru elektroosmotického toku a  $t_{mc}$  je migrační čas micel. Retenční faktor je definován jako poměr počtu molů analytu v micelě k poměru počtu molů analytu ve vodné fázi a může být vypočítán dle vztahu:

$$\bar{k} = \frac{t_r - t_0}{t_0(1 - t_r/t_{mc})} \quad (4.7)$$

kde  $t_r$  je retenční čas analytu,  $t_0$  je migrační čas markeru elektroosmotického toku a  $t_{mc}$  je migrační čas micel.



### 4.1.3 Spojení separačních technik

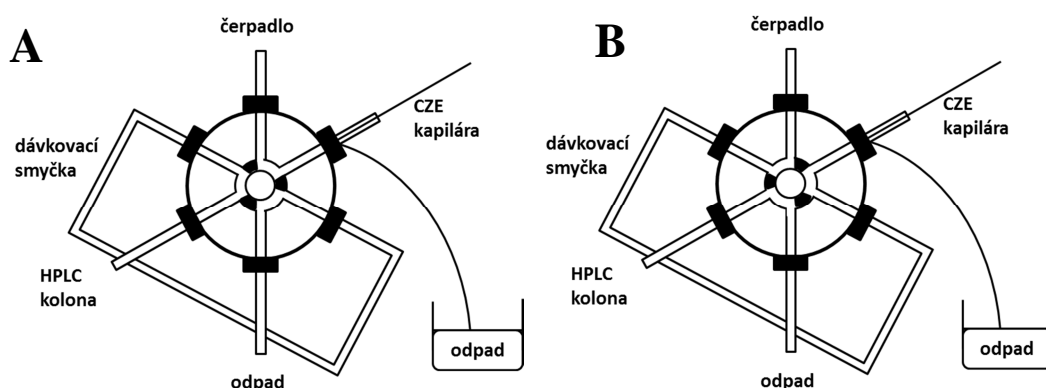
Spojení mezi jednotlivými dimenzemi může být provedeno buď off-line nebo on-line. Obě možnosti mají své výhody i nevýhody. Mezi výhody off-line spojení patří možnost vložení dalšího kroku mezi separace, kterým může být např. úprava vzorku – ředění, zakoncentrování nebo derivatizace. Off-line uspořádání lze také s výhodou použít pro spojení mezi metodami, které se liší chemickými nebo fyzikálními podmínkami (přídavek aditiv, typ rozpouštědel, objem vzorku, průtok mobilní fáze nebo základního elektrolytu, tlak na koloně nebo v kapiláře během analýzy, teplota) a je tedy možné využít komerční přístroje. Dále je možné díky tomuto typu spojení odebrat neomezený počet frakcí, které lze analyzovat i opakovaně. Nevýhodou off-line spojení je časová náročnost, kdy je potřeba věnovat pozornost sběru frakcí, přičemž každá frakce je následně samostatně dávkována a analyzována ve druhé dimenzi, což sebou mimo jiné přináší nebezpečí kontaminace vzorku. On-line spojení naproti tomu nabízí automatizovaný převod mezi dimenzemi, přičemž ale musí být brány v úvahu rozdílné podmínky, za kterých probíhají analýzy v jednotlivých dimenzích. Další výhodou on-line spojení je možnost volby mezi komprehenzivním (analýza všech frakcí z první dimenze) nebo heart-cutting módem (analýza vybraných frakcí z první dimenze). Limitujícím prvkem dvoudimenzionální separace je rychlost analýzy v druhé dimenzi a kompatibilita použitých mobilních fází, resp. mobilní fáze a základního elektrolytu a dimenzí separační kolony a kapiláry [9]. On-line spojení může být realizováno ve třech základních provedeních – v případě elektromigračních metod může docházet k 2D separaci v jedné kapiláře, dále při spojení dvou různých technik lze využít pro převod frakce z jedné dimenze do druhé rozhraní (interface) nebo vícecestný ventil [10].

### 4.1.4 Spojení kapalinové chromatografie s elektromigračními metodami

Spojení kapalinové chromatografie a elektromigračních metod je nejčastěji realizováno v uspořádání, kdy je kapalinová chromatografie v první dimenzi a elektromigrační metoda v dimenzi druhé. V kapalinové chromatografii bývá používán vyšší průtok než je tomu u elektromigračních metod a je tedy možné nasbírat větší objem frakcí v porovnání s elektromigračními metodami. Toto uspořádání je výhodnější i z pohledu doby potřebné k provedení analýzy, jelikož obecně je čas potřebný pro analýzu pomocí CE kratší než pomocí LC.

Spojení kapalinové chromatografie s kapilární elektroforézou může být provedeno několika způsoby. Zde jsou uvedeny ty nejznámější (nejpoužívanější). Podle Ranjbara a kol.

[11] byl jako první pro on-line spojení LC s CE použit šesticestný dvoupolohový dávkovací ventil. Eluát z první dimenze (LC) byl sbírán v dávkovací smyčce a smyčka byla každou minutu promyta směrem ke kapilární elektroforéze, kde byl eluát z první dimenze elektrokineticky nadávkován do kapiláry (obr. 4.1) [12].

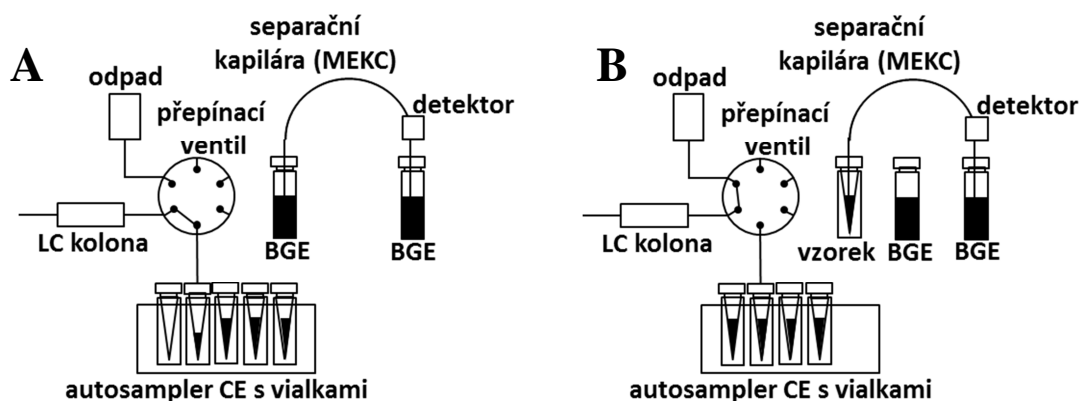


**Obrázek 4.1:** Šesticestný dávkovací ventil jako interface pro přechod eluentu z kapalinové chromatografie do kapilární zónové elektroforézy.

A – plnění smyčky

B – dávkování; upraveno dle [14].

Šesticestný ventil využil i Česla a kol. ve své práci [13] pro spojení kapalinové chromatografie v první dimenzi a micelární elektrokinetické chromatografie v dimenzi druhé. V tomto případě se jednalo o off-line spojení a ventil sloužil k automatizovanému sběru frakcí z HPLC kolony do elektroforetických nádobek (se 100  $\mu$ l skleněnými inserty) uložených v autosampleru CE. Autosampler se otočil každých 15 s a objem frakce byl 100  $\mu$ l. Návrh tohoto uspořádání je uveden na obrázku 4.2 [13].

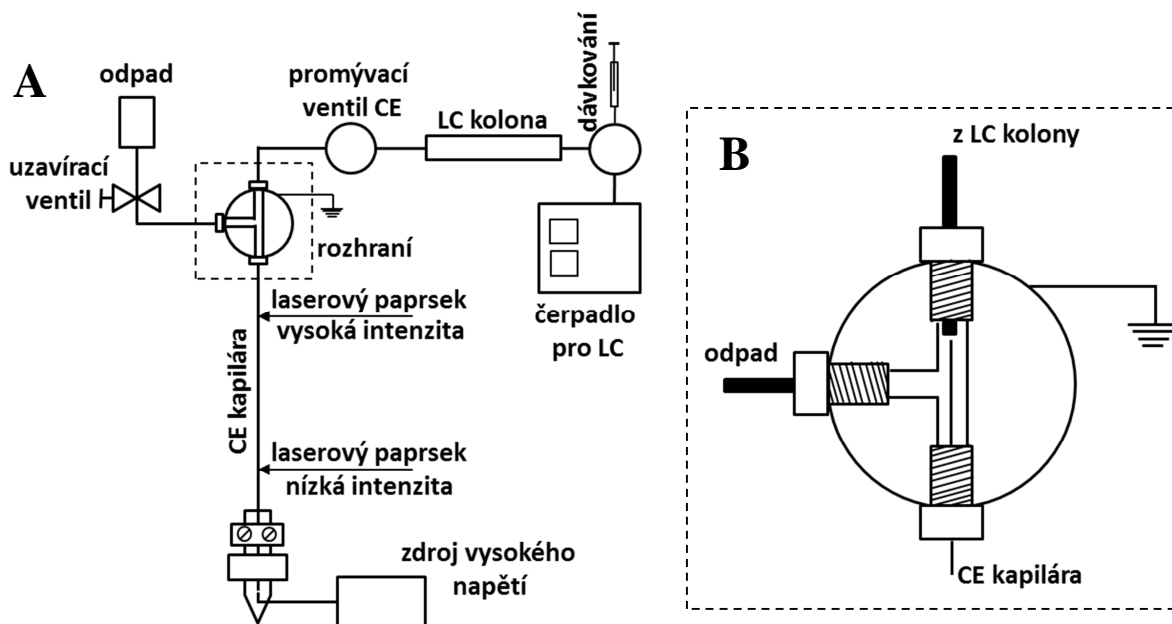


**Obrázek 4.2:** Off-line uspořádání pro automatický sběr frakcí mezi LC (první dimenze) a MEKC (druhá dimenze).

A – převod eluentu z první dimenze do elektroforetických nádobek s insertem.

B – Dávkování vzorku ve druhé dimenzi (MEKC).

Další možností pro on-line spojení kapalinové chromatografie a rychlou analýzou pomocí kapilární elektroforézy je použití T-spoje, viz obr. 4.3 [14].



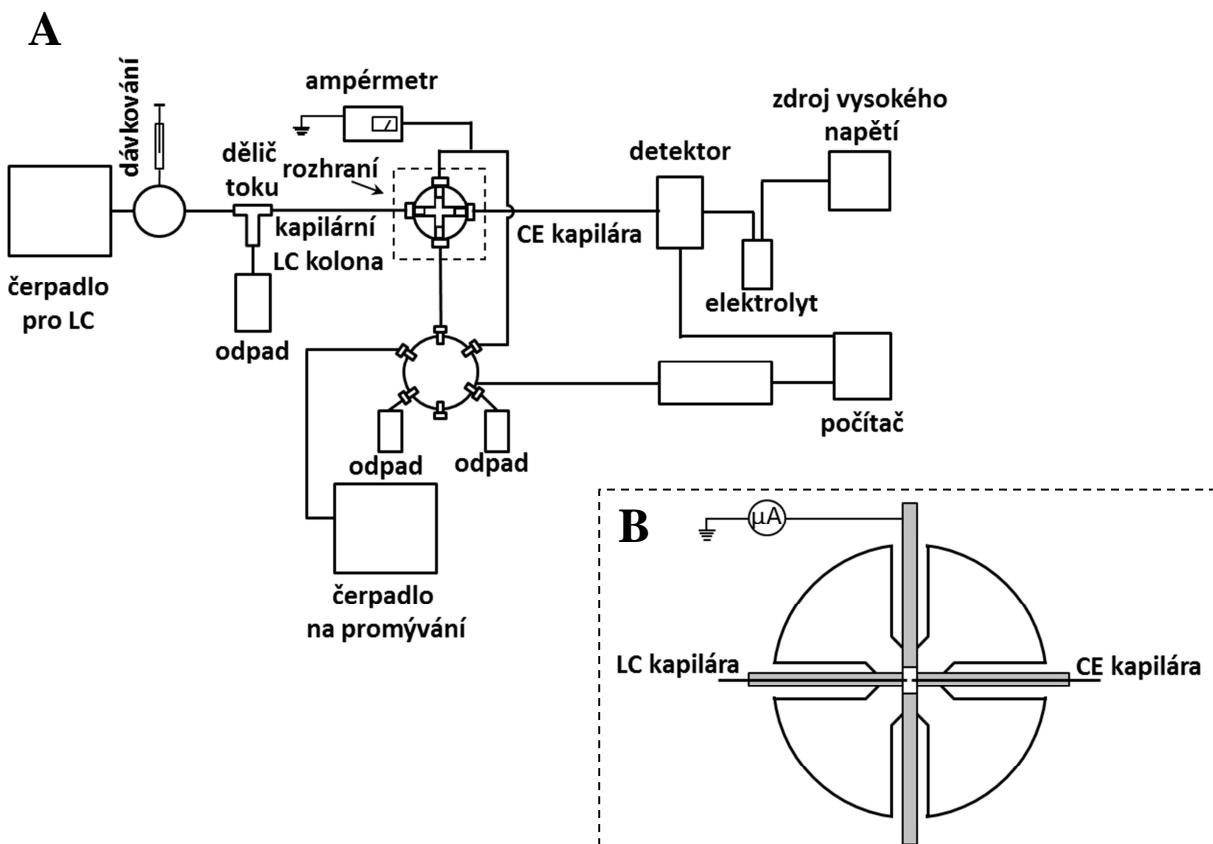
**Obrázek 4.3:** A - Diagram dvoudimenzionálního uspořádání RPLC/CZE.

B – detail T-rozhraní mezi RPLC a CZE. Upraveno dle [1].

LC kapilární kolona je spojena pomocí T-spoje s kapilárou z kapilární elektroforézy a část eluentu z první dimenze neustále proudí do kapiláry CE pomocí elektromigrace. Pro fluorescenčně značené analyty je použit pro detekci intenzivní laserový paprsek, který je soustředěn na kapiláru za T-spojem, tento paprsek fotodegraduje fluorescenčně značené látky procházející kapilárou. Vzápětí je laserový paprsek zacloněn a kapilárou projde malé množství nezměněného vzorku, který je rozdělen a detekován. Tato metoda je limitována použitím pro fluorescenčně značené látky a také vyžaduje velmi rychlou analýzu v druhé dimenzi (CE), ale nabízí nejrychlejší přechod a dávkování mezi LC a CE.

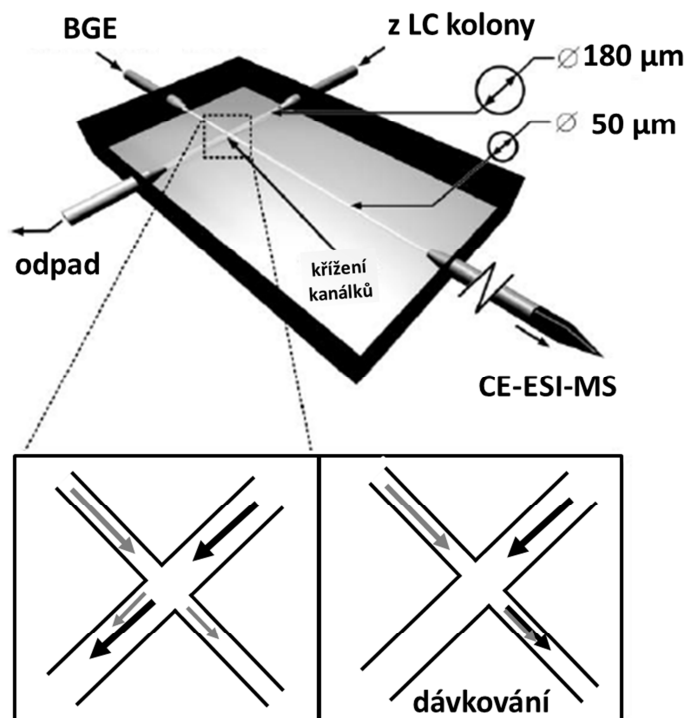
Modifikace rozhraní pomocí T-spoje je uvedena na obrázku 4.4, kde je znázorněno rozhraní využívající průtok elektrolytu v kolmém směru k LC eluentu. V tomto uspořádání je konec kapilární kolony z LC umístěn přímo proti kapiláře z CE a je oddělen úzkým kanálkem. Během analýzy je kanálek kontinuálně promýván základním elektrolytem použitým pro kapilární elektroforézu, který „odvádí“ eluent z LC do odpadu. K nadávkování eluentu z první dimenze do druhé dochází při přerušení proudění pufru a eluent je dávkován pomocí elektromigrace do kapiláry pro CE. Rychlé a opakovatelné nadávkování je umožněno

použitím přepínacího ventilu s pneumatickým ovládním, který kontroluje průtok promývacího pufru [1,15,16].



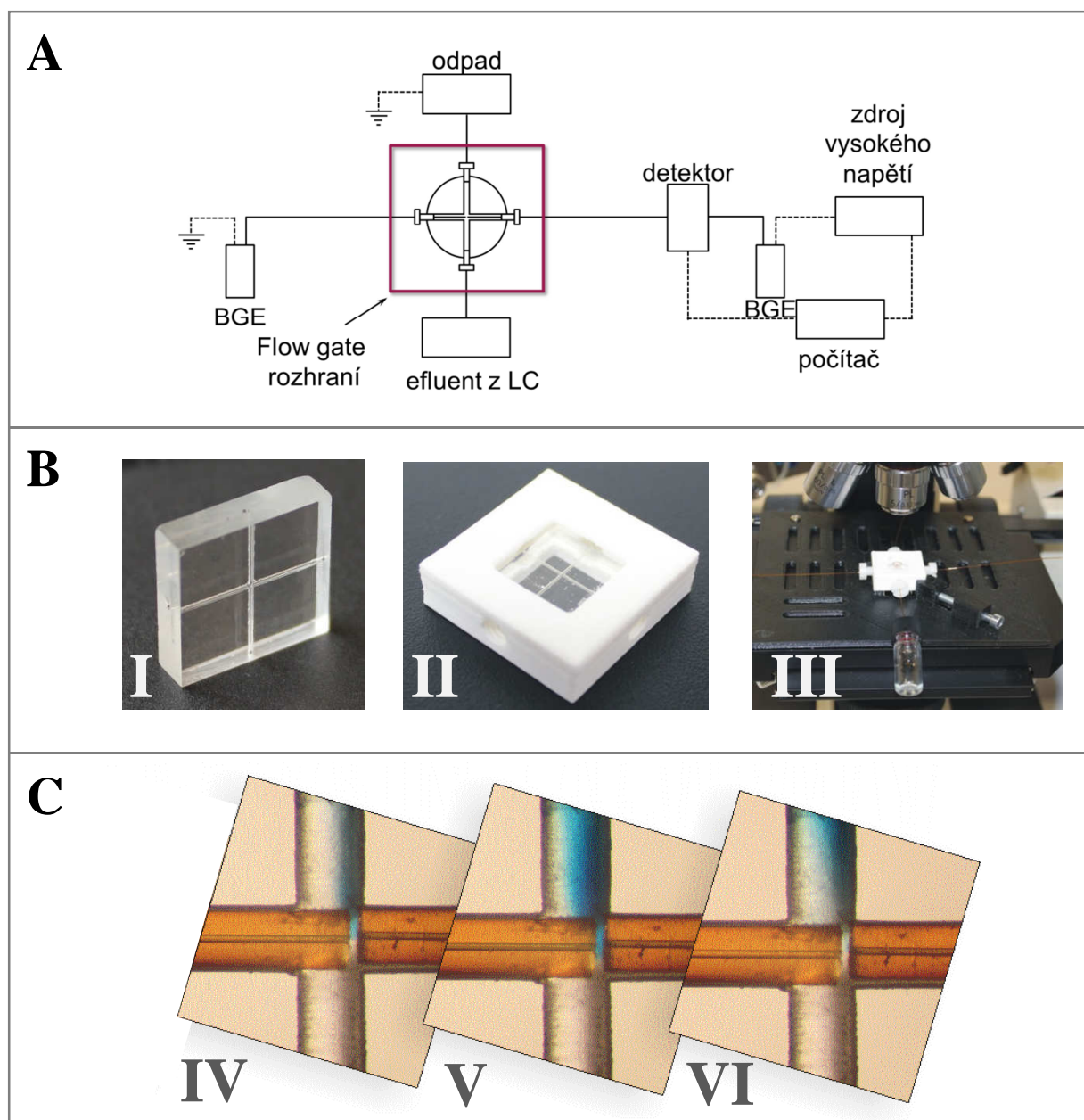
**Obrázek 4.4:** A – Uspořádání dvoudimenzionálního systému LC/CZE s „flow-gate“ rozhraním. B – Detail rozhraní. Upraveno dle [1,16].

Bergström a kol. [16] vyvinuli polymethylmetakrylátový interface s kanálky o velikosti 50 resp. 180  $\mu\text{m}$  (obr. 4.5). Černé šipky na obrázku reprezentují tok z LC kolony (vnitřní průměr kolony byl 0,2 mm a průtok mobilní fáze byl přibližně 1,5  $\mu\text{l}/\text{min}$ ) a šedé šipky reprezentují elektroosmotický tok a tlakem řízený tok elektrolytu. Během dávkování z LC do CE je pozastaven tlakem řízený tok elektrolytu a eluent z LC kolony je nadávkován do separační kapiláry CE.



**Obrázek 4.5:** Polymethylmetakrylátové rozhraní pro spojení LC-CE-ESI-MS. Upraveno dle [16].

Česla a kol. představili další možnost spojení kapalinové chromatografie a kapilární elektroforézy kromě již výše zmíněného přístupu. Výsledky studie byly prezentovány na zahraniční konferenci, konkrétně na konferenci 30<sup>th</sup> International Symposium on Chromatography v Salzburgu v roce 2014 (název prezentace Development on Microfluidic Interface for On-line Two dimensional Liquid Chromatography-Capillary Electrophoresis). Na obrázku 4.6A je znázorněno schéma pro 2D LC-CE spojení s využitím flow gating rozhraní. Na obr. 4.6B jsou fotografie flow gating rozhraní (I), rozhraní ukotveného v držáku umožňujícím spojení se separačním systémem (II) a použití flow gating rozhraní pro separaci (III). Na rozdíl od rozhraní znázorněného na obr. 4.5, kde jsou kanálky různě široké a kapilára a kolona jsou připevněny na jeho okraji, na obr. 4.6C je patrné, že kanálky jsou stejně široké a separační kapilára pro CE je umístěna v místě křížení kanálků.



**Obrázek 4.6:** A - Schéma 2D LC-CE separace s flow gating rozhraním.

B – I: flow gating rozhraní; II: rozhraní v držáku umožňujícím spojení se systémem; III: ukázka flow gating rozhraní v praxi

C – Schéma on-line přechodu frakce z LC do CE, IV: flow gating rozhraní; V: příčný tok elektrolytu pro CE během separace v LC; VI: separace v druhé CE dimenzi.

Eluent z kapalinové chromatografie je reprezentován roztokem methylenové modři. Fotografie poskytl doc. Ing. Petr Česla, Ph.D.

#### 4.1.5 Spojení LC v první dimenzi a MEKC v dimenzi druhé s programovanou změnou složení pseudostacionární fáze

V této práci je používán dvoudimenzionální separační systém s kapalinovou chromatografií v první dimenzi. V LC je aktuální koncentrace organického rozpouštědla dvousložkové mobilní fáze,  $\varphi$ , tvořené vodou a organickým rozpouštědlem, jehož koncentrace roste společně s časem, dána vztahem:

$$\varphi = A + B \cdot F_m \cdot t \quad (4.8)$$

kde  $A$  je počáteční koncentrace organického rozpouštědla v mobilní fázi na počátku gradientu,  $B$  je strmost gradientu (směrnice změny gradientu organického rozpouštědla od počáteční koncentrace po jeho koncentraci na konci gradientu),  $F_m$  je průtok mobilní fáze a  $t$  je aktuální čas od začátku gradientu (2D analýzy).

Eluční čas analytu v kapalinové chromatografii v systému s obrácenými fázemi může být v případě lineárního gradientu spočítán pomocí rovnice [17,18]:

$$t_R \cdot F_m = \frac{1}{m \cdot B} \log \{2,31 \cdot m \cdot B \cdot [V_m \cdot 10^{(a-m \cdot A)} - V_D] + 1\} + V_m + V_D \quad (4.9)$$

kde  $a$  a  $m$  jsou parametry lineární rovnice  $\log k = a - m\varphi$  charakterizující závislost retence látky (retenčního faktoru) na koncentraci organického rozpouštědla v mobilní fázi,  $V_m$  je mrtvý objem kolony a  $V_D$  je zpoždění gradientu.

Během off-line dvoudimenzionální separace, kombinující kapalinovou chromatografii v systému s obrácenými fázemi v první dimenzi a micelární elektrokinetickou chromatografií v druhé dimenzi, je eluent z první dimenze sbírán v malých frakcích o předem definovaném objemu,  $V_f$ , jenž je dán dobou sběru frakce,  $t_f$ , a rychlostí průtoku mobilní fáze kolonou,  $F_m$  [13]. Koncentrace organického rozpouštědla v  $n$ -té frakci z LC,  $\varphi_{f,n}$ , může být vypočítána jako průměr z počáteční a koncové koncentrace organického rozpouštědla na začátku,  $t_{f,n}$ , a na konci frakce,  $t_{f,n+1}$ :

$$\varphi_{f,n} = \frac{1}{2} \cdot [A + B \cdot F_m \cdot (t_{f,n+1} + t_{f,n})] \quad (4.10)$$

Podobně jako v RPLC může být efekt koncentrace organického rozpouštědla na retenční faktor v MEKC v základním elektrolytu složeného z micel a organické složky popsán rovnicí:

$$\log k_{MEKC} = a' - m' \cdot \varphi \quad (4.11)$$

kde  $a'$  a  $m'$  jsou konstanty závislé na povaze analytu a typu organického rozpouštědla. Retenční faktor v MEKC je také závislý na koncentraci micel v základním elektrolytu [19]:

$$\log k_{MEKC} = p + q \cdot \log c_{mic} \quad (4.12)$$

kde  $p$  a  $q$  jsou konstanty závislé na typu analytu a použitého tenzidu,  $c_{mic}$  je koncentrace micel, která je dána rozdílem aktuální koncentrace tenzidu v roztoku a kritickou micelární koncentrací daného tenzidu ( $c_{mic} = c_s - cmc$ ). Na základě těchto rovnic lze odvodit vztah pro retenci látek v MEKC se základním elektrolytem obsahujícím organickou složku:

$$\log k_{MEKC} = p' + q \cdot \log c_{mic} - m' \cdot \varphi \quad (4.13)$$

Průměrná koncentrace organického rozpouštědla ve frakcích skokově vzrůstá v průběhu gradientu v LC. Díky tomu dochází k posunu migračního času analytu v druhé dimenzi (MEKC) směrem k nižším hodnotám vzhledem ke zvyšující se hodnotě kritické micelární koncentrace tenzidu v roztoku dané rostoucím obsahem organického rozpouštědla v základním elektrolytu [20]. Tento posun, který je přímo úměrný dávkovanému objemu frakce do druhé dimenze a strmosti gradientu způsobuje deformace 2D grafů a znesnadňuje možnost identifikace a kvantifikace jednotlivých složek vzorku. V této práci byly ověřovány možnosti kompenzace negativního efektu rostoucí koncentrace organického rozpouštědla v přiváděných frakcích pomocí změny složení základního elektrolytu ve druhé MEKC dimenzi.

Se stoupající koncentrací organického rozpouštědla ve frakcích sbíraných z LC, a tedy i ve vzorcích dávkovaných do kapiláry MEKC, klesá retenční faktor analytu v pseudostacionární fázi [21] a to vede k prodloužení zakoncentrované zóny v porovnání se základním elektrolytem bez přídavku organického rozpouštědla. Vzhledem k posunu distribuční rovnováhy analytu mezi negativně nabitými micelami a vodnou mobilní fází ve prospěch vodné fáze, která se pohybuje rychlostí elektroosmotického toku, dochází ke zkracování doby analýzy během druhé dimenze (MEKC). Aby byl zachován konstantní retenční faktor analytu během analýzy v MEKC s ohledem na zvyšující se koncentraci organického rozpouštědla v dávkované frakci z LC je třeba vykompenzovat klesající retenční faktor zvýšením koncentrace micel v základním elektrolytu MEKC, aby došlo k zachování délky zakoncentrované zóny analytu. Změnu koncentrace micel v základním elektrolytu,  $\Delta c_{mic}$ , potřebnou pro kompenzaci přítomného organického rozpouštědla ve vzorku pomocí rovnice:

$$\Delta c_{mic} = \Delta c_s - \Delta cmc = 10^{\varphi \cdot m' / q} \quad (4.14)$$



Posun migračního času v druhé dimenzi (MEKC) a změna koncentrace pseudostacionární fáze potřebná pro kompenzaci je tedy exponenciálně úměrná poměru parametrů  $m'$  a  $q$ , které jsou závislé na retenci analytu v micelách.

## 4.2 Experimentální část

### 4.2.1 Seznam použitých chemikálií

Standardy fenolických kyselin a flavonoidů byly získány od firmy Fluka (Buchs, Švýcarsko) a od firmy Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Homologická řady alkylbenzenů (toluen, etyl-, propyl-, butyl- a pentylbenzen) použitá pro charakterizaci retence v MEKC byla zakoupena u firmy Sigma-Aldrich. Kyselina boritá, tetraboritan sodný, decylsulfát sodný, dodecylsulfát sodný a tetradecylsulfát sodný byly zakoupeny od firmy Fluka, acetonitril od firmy Sigma-Aldrich, metanol od firmy Merck (Darmstadt, Německo) a kyselina mravenčí od firmy Lachema (Brno, Česká republika). Deionizovaná voda (vodivost 0,055  $\mu\text{S}/\text{cm}$ ) byla připravena pomocí přístroje Ultra CLEAR UV (SG, Hamburg, Německo). Základní elektrolyt a mobilní fáze byly před použitím filtrovány přes membránový filtr s velikostí pórů 0,45  $\mu\text{m}$  (Millipore Bedford, MA, USA) a odvzdušněny v ultrazvukové lázni. pH bylo měřeno pomocí pH metru Metrohm 827 s elektrodou Unitrode (Metrohm, Herisau, Švýcarsko), ke kalibraci byly použity kalibrační roztoky o pH 7,00 a 9,00.

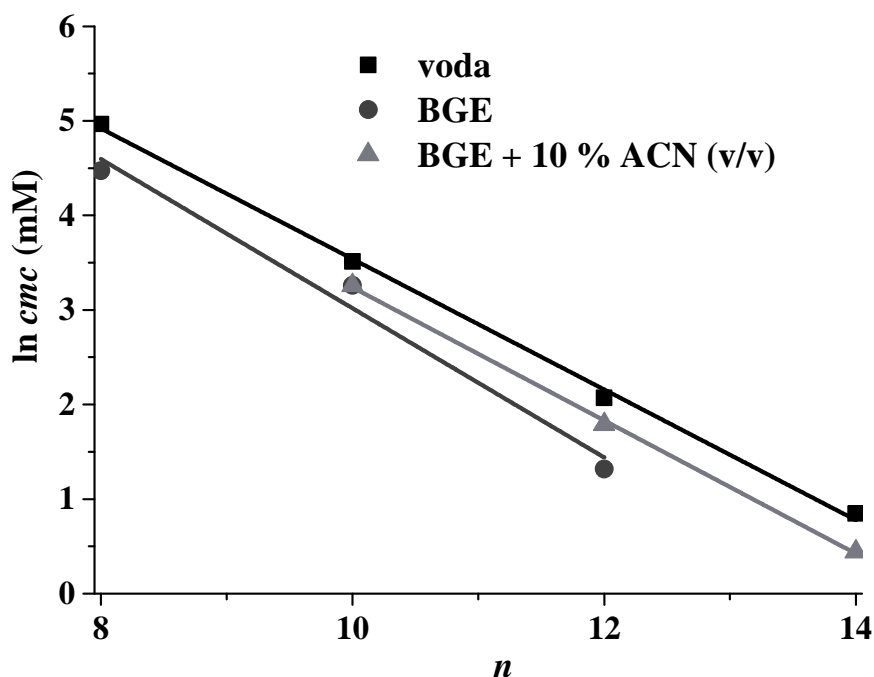
### 4.2.2 Přístrojové vybavení, pracovní postup

Experimenty v rámci kapalinové chromatografie byly provedeny na přístroji Shimadzu XR, sestaveného ze dvou LC-20ADXR čerpadel, autosampleru SIL-20ADXR (vše od firmy Shimadzu, Kyoto, Japonsko) a termostatu LCO 102 (ECOM, Praha, Česká republika) se silikagelovou kolonou s chemicky vázaným polyethylenglykolem Discovery HSPEG, 50 x 2,1 mm s 5 $\mu\text{m}$  částicemi. Průtok mobilní fáze kolonou byl 0,4 ml/min a kolona byla temperována na 40 °C. Mobilní fáze použitá v první dimenzi (LC systém) obsahovala vodu s přidavkem kyseliny mravenčí (v/v, mobilní fáze A) a acetonitrilu (mobilní fáze B). Byl použit lineární gradient: 0 min – 1% B, 15 min – 30% B. Zpoždění gradientu bylo 0,52 ml. Konec LC kolony použité v první dimenzi byl spojen přes šesti-portový prepínací ventil s autosamplérem kapilární elektroforézy Agilent <sup>3D</sup>CE (Agilent, Palo Alto, CA, USA). Autosampler byl použit pro automatický sběr frakcí z LC do MEKC separačního systému [13]. Pro separace v MEKC systému byla použita nepokrytá křemenná kapilára s vnitřním průměrem 50  $\mu\text{m}$ , celková délka byla 48 cm a délka k detektoru byla 40 cm (Agilent). Při spojení LC-MEKC byla v druhé dimenzi použita nepokrytá křemenná kapilára s vnitřním průměrem 50  $\mu\text{m}$  a průměrem v místě detekce 150  $\mu\text{m}$ , celková délka kapiláry byla 48 cm a délka k detektoru 40 cm (Agilent). Před prvním použitím byla nová kapilára promyta 10 min

0,5 M hydroxidem sodným, 10 min vodou a 10 min základním elektrolytem. Kapilára byla temperována na teplotu 25 °C a vložené napětí bylo +20 kV. Vzorek byl dávkován hydrodynamicky tlakem 50 mbar, vzorkem bylo naplněno přibližně 1% objemu kapiláry. Mezi jednotlivými analýzami byla kapilára promývána 2 min základním elektrolytem.

### 4.3 Výsledky a diskuze

Změna obsahu acetonitrilu v mobilní fázi během separace v první dimenzi (LC), z níž byly odebrané frakce dávkovány do druhé dimenze (MEKC), byla kompenzována změnou typu a koncentrace pseudostacionární fáze. Alkylsíranů sodné s délkou uhlíkového řetězce C8 – C14 byly testovány jako pseudostacionární fáze pro separaci fenolických kyselin a flavonoidů ve druhé dimenzi (viz Kapitola 3). V prvním kroku byla stanovena kritická micelární koncentrace vybraných aniontových tenzidů v závislosti na přídavku organického rozpouštědla (acetonitrilu) v roztoku (viz Kapitola 1). Pro stanovení kritické micelární koncentrace alkylsíranů sodných byla použita metoda založená na měření proudu procházejícího kapilárou v závislosti na koncentraci tenzidu v roztoku [22]. Na obrázku 4.7 je znázorněna závislost  $\ln cmc$  na počtu uhlíků v alkylovém řetězci tenzidu,  $n$ , ve třech různých rozpouštědlech – ve vodě, v základním elektrolytu (25 mM boritanový pufr o pH 9,00) a v základním elektrolytu s přídavkem 10 % acetonitrilu (v/v). Z grafu je patrné, že se vzrůstajícím počtem uhlíků v alkylovém řetězci klesá hodnota kritické micelární koncentrace. Dále z naměřených dat vyplývá, že kritická micelární koncentrace je vyšší v základním elektrolytu s přídavkem acetonitrilu než v základním elektrolytu bez přídavku organického modifikátoru.



**Obrázek 4.7:** Závislost  $\ln cmc$  na počtu uhlíků v alkylovém řetězci alkylsíranů sodných,  $n$ .

Pro další experimenty nebyl použit oktyl- a tetradecylsírán sodný. Kritická micelární koncentrace oktylsíránu sodného je poměrně vysoká (143 mM ve vodě; 88 mM v základním elektrolytu) a jeho micely nejsou stabilní v roztoku s přidávkem acetonitrilu. Kraftova teplota pro tetradecylsírán sodný je 36 °C [23] a jelikož teplota během experimentu byla nastavena na 25 °C, docházelo během analýz k vysrážení tetradecylsíránu sodného z roztoku. Pro další měření byly tedy použity pouze decyl- a dodecylsírán sodný.

Parametry  $m'$  a  $q$  rovnice (4.13) byly stanoveny pomocí homologické řady *n*-alkylbenzenů. Byly naměřeny retenční faktory pro metyl- až pentylbenzen v základním elektrolytu s 0 – 20 % (v/v) acetonitrilu a s tenzidy, jejichž koncentrace odpovídala jeden a půl až trojnásobku hodnoty kritické micelární koncentrace. Koncentrace decylsíránu sodného se tedy pohybovala v rozmezí 30 – 80 mM a dodecylsíránu sodného od 5 do 30 mM. Byly vyhodnoceny závislosti retenčního faktoru na koncentraci acetonitrilu a na logaritmu koncentrace micel v základním elektrolytu za využití rovnice (4.13). Získané parametry rovnic regrese pro jednotlivé alkylbenzeny v elektrolytu s decylsíránem sodným jsou uvedeny v tabulce 4.1, s dodecylsíránem sodným v tabulce 4.2.

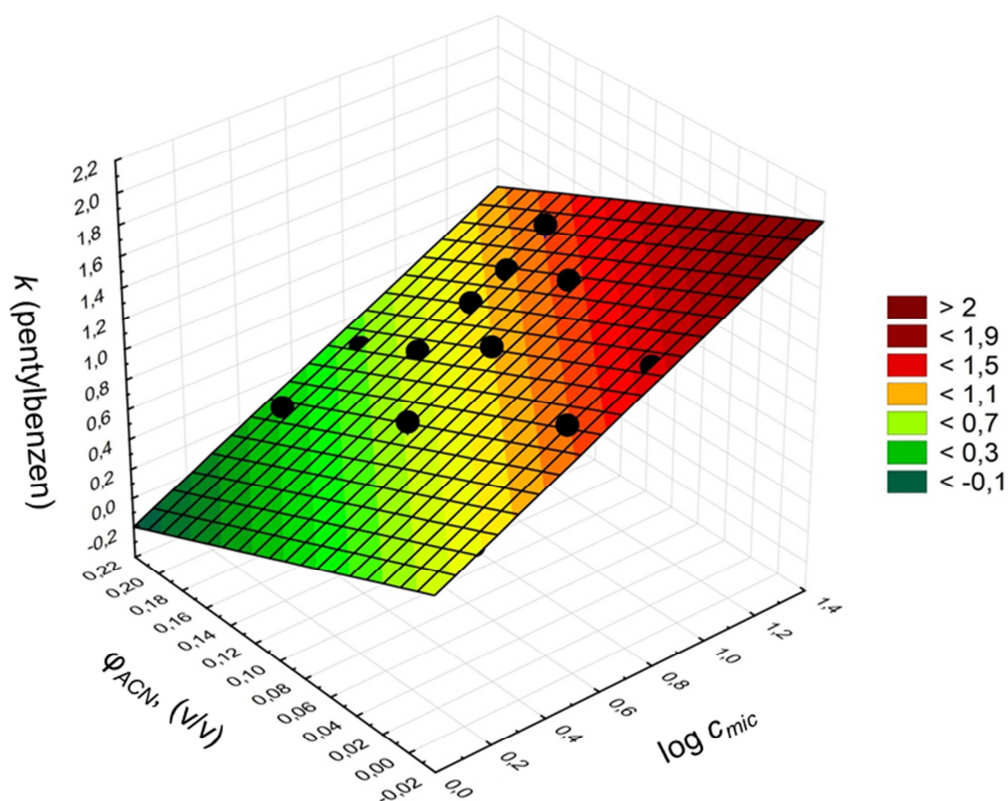
**Tabulka 4.1:** Získané parametry rovnice regrese závislosti retenčního faktoru analytu na koncentraci decylsíránu sodného a obsahu acetonitrilu v základním elektrolytu.

Sloučenina	$p' \pm s_{p'}$	$q \pm s_q$	$m' \pm s_{m'}$	$R^2$
<b>Metylbenzen</b>	$-1,512 \pm 0,122$	$1,122 \pm 0,090$	$1,688 \pm 0,352$	0,9380
<b>Etylbenzen</b>	$-0,937 \pm 0,048$	$0,987 \pm 0,037$	$2,434 \pm 0,143$	0,9886
<b>Propylbenzen</b>	$-0,576 \pm 0,053$	$1,023 \pm 0,039$	$3,277 \pm 0,154$	0,9898
<b>Butylbenzen</b>	$-0,218 \pm 0,075$	$1,068 \pm 0,055$	$3,994 \pm 0,217$	0,9839
<b>Pentylbenzen</b>	$0,250 \pm 0,095$	$1,019 \pm 0,070$	$4,769 \pm 0,275$	0,9777

**Tabulka 4.2:** Získané parametry rovnice regrese závislosti retenčního faktoru analytu na koncentraci dodecylsíránu sodného a obsahu acetonitrilu v základním elektrolytu.

Sloučenina	$p' \pm s_{p'}$	$q \pm s_q$	$m' \pm s_{m'}$	$R^2$
<b>Metylbenzen</b>	$-1,105 \pm 0,122$	$0,797 \pm 0,156$	$0,372 \pm 0,605$	0,7277
<b>Etylbenzen</b>	$-0,636 \pm 0,048$	$0,801 \pm 0,061$	$1,396 \pm 0,237$	0,9397
<b>Propylbenzen</b>	$-0,185 \pm 0,052$	$0,843 \pm 0,067$	$2,280 \pm 0,260$	0,9398
<b>Butylbenzen</b>	$0,224 \pm 0,057$	$0,855 \pm 0,072$	$2,845 \pm 0,281$	0,9393
<b>Pentylbenzen</b>	$0,672 \pm 0,065$	$0,907 \pm 0,084$	$3,932 \pm 0,325$	0,9437

Na obrázku 4.8 je uvedena závislost naměřeného retenčního faktoru pro pentylbenzen v základním elektrolytu s přidavkem dodecylsírany sodného na obsahu acetonitrilu a koncentrace micel v roztoku. Výsledky naznačují, že parametry  $p'$  a  $m'$  rovnice (4.13) silně závisí jak na délce alkylového řetězce v molekule alkylbenzenu tak na typu pseudostacionární fáze. Oba parametry rostou s rostoucí délkou alkylového řetězce a tím se zvyšující se hydrofobicitou molekuly. Parametr  $q$  závisí silněji na typu tenzidu a je téměř nezávislý na testovaném analytu. Nízká směrodatná odchylka pro všechny parametry (s výjimkou metylbenzen/SDS/acetonitril) indikuje, že rovnice (4.13) může adekvátně popsat retenci analytu v micelách decyl- a dodecylsírany sodného za přítomnosti acetonitrilu v roztoku.

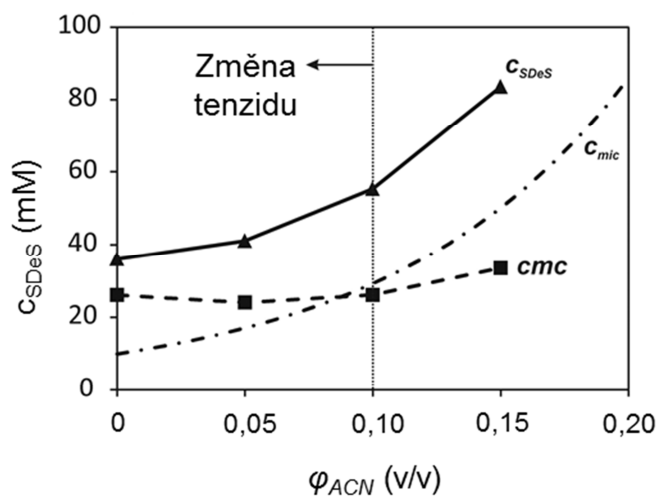


**Obrázek 4.8:** Závislost retenčního faktoru pentylbenzenu na koncentraci micel v BGE a obsahu acetonitrilu (v/v).

Pro optimalizaci gradientu pseudostacionární fáze byl vybrán nejvíce se zadržující alkylbenzen – pentylbenzen. Poměr parametru  $m'$  a  $q$  z rovnice (4.14) pro pentylbenzen byl 4,68 pro decylsírany sodný a 4,34 pro dodecylsírany sodný. Z toho vyplývá, pro kompenzaci rostoucí koncentrace acetonitrilu v po sobě jdoucích frakcích odebíraných v první dimenzi při gradientové LC separaci je potřeba menší změna koncentrace micel tenzidu s delším alkylovým řetězcem. To je také v souladu s vyšší závislostí retence pentylbenzenu v

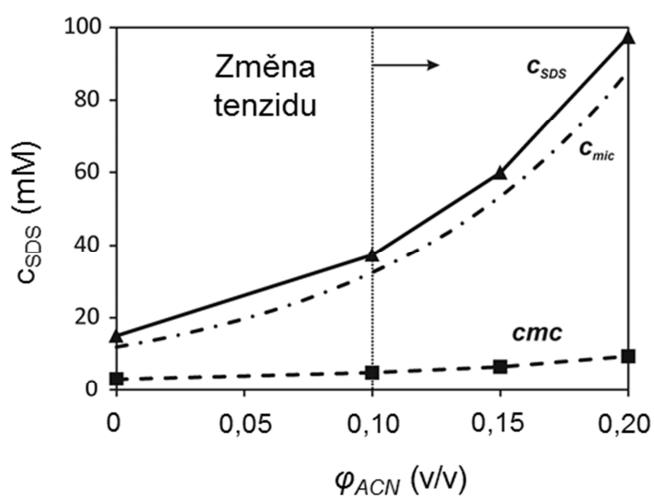
elektrolytu s SDS než v elektrolytu s SDeS ( $SDeS < SDS$ ). Získané parametry  $m'$  a  $q$  byly dále použity pro navržení gradientu pseudostacionární fáze.

V první dimenzi LC separace byla použita silikagelová kolona s chemicky vázaným polyethylenglykolem, čímž bylo dosaženo separace s rozdílnou selektivitou v porovnání s MEKC ve druhé dimenzi a nižší retence látek v porovnání s tradičně používanou kolonou s oktadecylsilikagelovou stacionární fází [13]. Během LC separace byl použit lineární gradient se vzrůstající koncentrací acetonitrilu ve vodě s přidavkem 0,2 % (v/v) kyseliny mravenčí. Počáteční koncentrace acetonitrilu ve vodě během 15 minutové analýzy byla 1 % a konečná 30 % (v/v). Všechny testované sloučeniny eluovaly do 12 min a byly odebrány frakce po 15 s, což bylo ve výsledku 48 frakcí o objemu každé z nich  $V_f = 100 \mu\text{l}$ . Koncentrace acetonitrilu ve frakcích vzrůstala přibližně o 0,5 % (v/v). Vypočítaná koncentrace acetonitrilu v poslední frakci byla přibližně 20 % (v/v), do výpočtu bylo započítáno zpoždění gradientu a mrtvý objem kolony. Změna koncentrace acetonitrilu ve sbíraných frakcích z LC byla kompenzována ve druhé dimenzi složením základního elektrolytu, kdy byla připravena série základních elektrolytů se vzrůstající koncentrací alkylsírany sodného. MEKC separace první frakce byla provedena v základním elektrolytu s koncentrací micel 10 mM, celková koncentrace decylsírany sodného v elektrolytu byla 36 mM. Změna koncentrace decylsírany sodného potřebná ke kompenzaci změny obsahu koncentrace acetonitrilu v roztoku byla vypočítána dle rovnice (4.14), získané výsledky pro decylsírany sodný jsou uvedeny na obr. 4.9. Z tohoto obrázku je patrné že v roztoku s 20 % acetonitrilu (v/v), je koncentrace decylsírany potřebná pro kompenzaci jeho vlivu na separaci 86 mM micel SDeS (skutečná koncentrace SDeS by odpovídala 120 mM).



**Obrázek 4.9:** Závislost koncentrace decylsírany sodného na obsahu ACN v BGE (% , v/v).

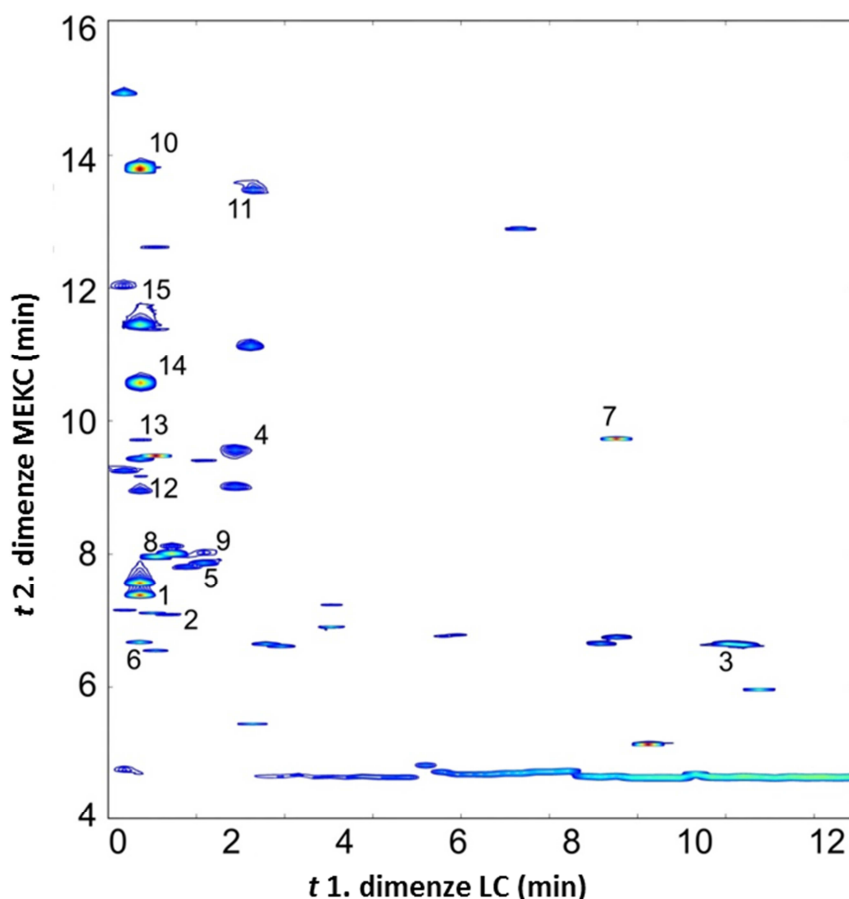
Vzrůstající koncentrace tenzidu vede ke zvyšování velikosti proudu procházejícího kapilárou, který může významně přispět k rozšíření migračních zón analytů a tím snížit separační účinnost. Proto byla využita změna tenzidu použitého v základním elektrolytu při koncentraci 10 % acetonitrilu v odebrané frakci. Do této koncentrace používaný decylsírán sodný, jehož koncentrace za těchto podmínek byla 56 mM (29 mM micel), byl nahrazen 31 mM dodecylsíránem sodným (koncentrace micel 29 mM). Závislost kritické micelární koncentrace dodecylsíránu sodného a koncentrace jeho micel na obsahu acetonitrilu v roztoku je uvedena na obrázku 4.10.



**Obrázek 4.10:** Závislost koncentrace SDS na obsahu ACN v BGE (% v/v).

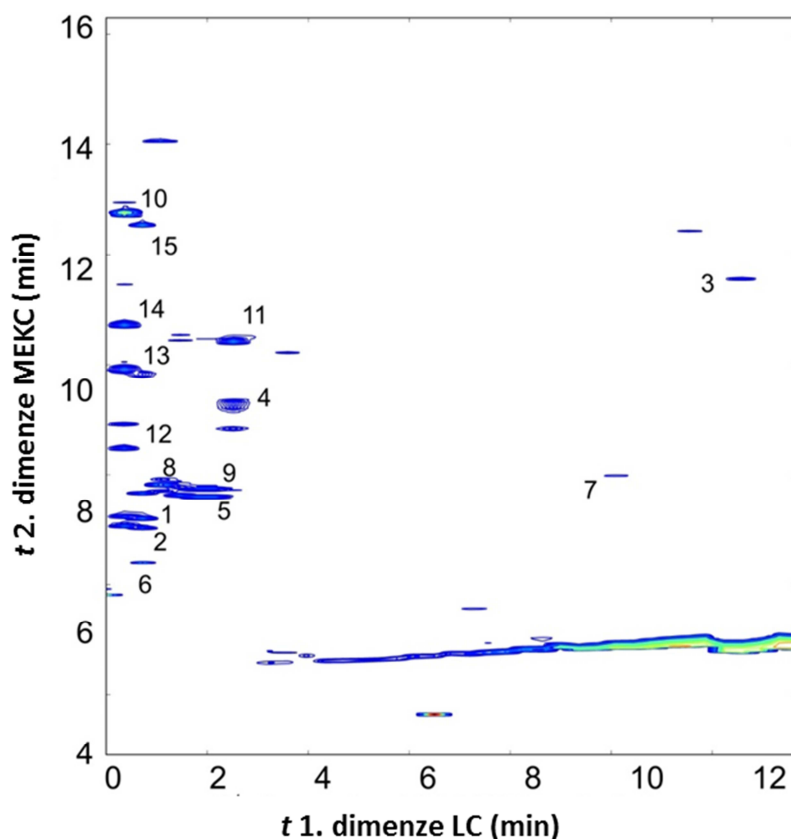
Směs standardů flavonoidů a fenolických kyselin byla analyzována jak za konstantních podmínek ve druhé dimenzi (koncentrace decylsíránu sodného v základním elektrolytu tvořeném 25 mM boritanovým pufrem o pH 9,00 byla 36 mM) tak za použití gradientu koncentrace tenzidu ve druhé dimenzi (obrázek 4.11). Z tohoto záznamu je patrné, že došlo k rozdělení všech standardů fenolických kyselin a flavonoidů ve směsi. Během separace za konstantních podmínek ve druhé dimenzi došlo k posunu migračního času pro některé sloučeniny (katechin, hesperetin, rutin a naringenin).





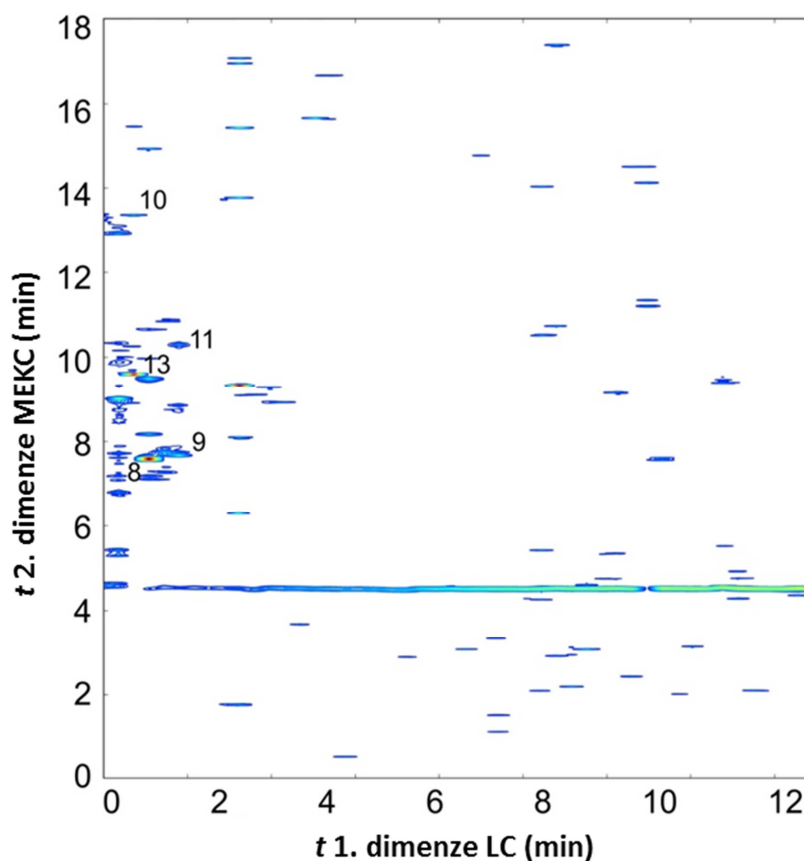
**Obrázek 4.11:** 2D LC-MEKC analýza standardů fenolických kyselin a flavonoidů s konstantním složením pseudostacionární fáze ve druhé MEKC dimenzi. BGE: 25 mM boritanový pufr o pH 9,00 s 36 mM decylsíránem sodným (10 mM micel SDeS). Nepokrytá křemenná kapilára 48 (40) cm, 50  $\mu\text{m}$  I.D., detekční okénko 150  $\mu\text{m}$  I.D. Napětí 20 kV, teplota 25 °C, detekce 214 a 254 nm. V první dimenzi byla použita silikagelová kolona s chemicky vázaným polyethylenglykolem, mobilní fáze byla tvořena vodou s přidavkem kyseliny mravenčí (0,2 % v/v, A) a acetonitrilem (B). Lineární gradient: 0 min – 1% B, 15 min – 30% B. Teplota 40 °C. Sběr frací po 15 s. 1 – (-)-epikatechin, 2 – (+)-katechin, 3 – flavon, 4 – 7-hydroxyflavon, 5 – hesperetin, 6 – hesperidin, 7 – kvercetin, 8 – rutin, 9 – naringenin, 10 – galová kyselina, 11 – kávová kyselina, 12 – 4-hydroxyfenyloctová kyselina, 13 – chlorogenová kyselina, 14 – salicylová kyselina, 15 – 4-hydroxybenzoová kyselina.

Díky použití gradientu koncentrací tenzidů v druhé dimenzi bylo dosaženo téměř stejných migračních časů pro dané sloučeniny v po sobě jdoucích frakcích. Záznam separace s použitím rostoucí koncentrace tenzidu v BGE v druhé dimenzi je uveden na obrázku 4.12. Další výhodou použití gradientu koncentrací tenzidu v MEKC módu bylo dosažení užších píků, což může být dáno zvyšující se separační účinností v základním elektrolytu se zvyšující se koncentrací pseudostacionární fáze.



**Obrázek 4.12:** 2D LC-MEKC analýza standardů fenolických kyselin a flavonoidů s konstantním složením pseudostacionární fáze ve druhé MEKC dimenzi. BGE: 25 mM boritanový pufr o pH 9,00 s koncentrací PAL volenou dle obr. 3 a 4. Nepokrytá křemenná kapilára 48 (40) cm, 50  $\mu\text{m}$  I.D., detekční okénko 150  $\mu\text{m}$  I.D. Napětí 20 kV, teplota 25  $^{\circ}\text{C}$ , detekce 214 a 254 nm. V první dimenzi byla použita silikagelová kolona s chemicky vázaným polyethylenglykolem, mobilní fáze byla tvořena vodou s přísadkou kyseliny mravenčí (0,2 % v/v, A) a acetonitrilem (B). Lineární gradient: 0 min – 1% B, 15 min – 30% B. Teplota 40  $^{\circ}\text{C}$ . Sběr frakcí po 15s. 1 – (-)-epikatechin, 2 – (+)-katechin, 3 – flavon, 4 – 7-hydroxyflavon, 5 – hesperetin, 6 – hesperidin, 7 – kvercetin, 8 – rutin, 9 – naringenin, 10 – galová kyselina, 11 – kávová kyselina, 12 – 4-hydroxyfenyloctová kyselina, 13 – chlorogenová kyselina, 14 – salicylová kyselina, 15 – 4-hydroxybenzoová kyselina.

Uvedený postup byl aplikován na analýzu vodného výluhu z květů černého bezu, který je uveden na obrázku 4.13. V tomto vzorku bylo identifikováno pět studovaných sloučenin (rutin, naringenin, galová kyselina, kávová kyselina, chlorogenová kyselina) na základě jejich migračních časů a porovnáním jejich UV spekter se spektry standardů.



**Obrázek 4.13:** 2D LC-MEKC analýza výluhu květů černého bezu s konstantním složením pseudostacionární fáze ve druhé MEKC dimenzi. BGE: 25 mM boritanový pufr o pH 9,00 s koncentrací PAL volenou dle obr. 3 a 4. Nepokrytá křemenná kapilára 48 (40) cm, 50  $\mu\text{m}$  I.D., detekční okénko 150  $\mu\text{m}$  I.D. Napětí 20 kV, teplota 25  $^{\circ}\text{C}$ , detekce 214 a 254 nm. V první dimenzi byla použita silikagelová kolona s chemicky vázaným polyethylenglykolem, mobilní fáze byla tvořena vodou s přídavkem kyseliny mravenčí (0,2 % v/v, A) a acetonitrilem (B). Lineární gradient: 0 min – 1% B, 15 min – 30% B. Teplota 40  $^{\circ}\text{C}$ . Sběr frací po 15s. 8 – rutin, 9 – naringenin, 10 – galová kyselina, 11 – kávová kyselina, 13 – chlorogenová kyselina.

#### 4.4 Shrnutí

Tato část práce je věnována off-line spojení kapalinové chromatografie pracující v módu s obrácenými fázemi v první dimenzi a micelární elektrokinetické chromatografie v dimenzi druhé. V kapalinové chromatografii byl použit lineární gradient se vzrůstající koncentrací acetonitrilu v mobilní fázi. Jednotlivé frakce odebrané z první dimenze s různou koncentrací acetonitrilu byly dávkovány do druhé dimenze a analyzovány pomocí micelární elektrokinetické chromatografie. Vzrůstající koncentrace acetonitrilu ve vzorku dávkovaném do druhé dimenze způsobovala posun migračních časů analyzovaných látek a rozšiřování píků, jelikož kritická micelární koncentrace tenzidů je závislá na obsahu organického modifikátoru v roztoku a tedy při stejné koncentraci tenzidu v roztoku a měnící se hodnotě kritické micelární koncentrace dochází ke změně koncentrace micel v roztoku a tím se mění podmínky analýzy. Aby tento efekt byl potlačen, byl vliv změny obsahu acetonitrilu ve frakcích z první dimenze eliminován změnou složení základního elektrolytu ve druhé MEKC dimenzi (koncentrace a typ tenzidu) tak, aby bylo migrační okno v MEKC téměř konstantní. Koncentrace decylsíranu sodného použitého pro kompenzaci vlivu acetonitrilu ve vzorku z první dimenze (1 - 20 %, v/v) se pohybovala v rozmezí 36 – 123 mM a koncentrace dodecylsíranu sodného byla v rozmezí hodnot 37 - 97 mM. Získané poznatky byly využity i při separaci reálného vzorku reprezentovaného vodným výluhem květů černého bezu.

#### 4.5 Seznam použité literatury

- [1] Evans Ch. R., Jorgenson J. W., *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 378 (2004) 1952-1961.
- [2] Giddings J. C., *Analytical Chemistry* 39 (1967) 1927
- [3] Jandera P., *Central European Journal of Chemistry* 10 (2012) 884-875.
- [4] Pyell U., *Electrokinetic Chromatography. Theory, Instrumentation and applications.* John Wiley & sons Ltd., 2006 ISBN-13 978-0-470-87102-7. Kapitola 1 – Theory of electrokinetic chromatography. Str. 3-31
- [5] Giddings J. C., *Journal of High Resolution Chromatography* 10 (1987) 319-323.
- [6] Giddings J. C., *Analytical Chemistry* 56 (1984) 1258A-1270A.
- [7] Dugo P., Cacciola F., Kumm T., Dugo G., Mondello L., *Journal of chromatography A* 1184 (2008) 353-368.
- [8] Terabe S., Otsuka K., Ando T., *Analytical Chemistry* 57 (1985) 834-341.
- [9] Česla P., Dinisová P., Fischer J., *Sensing in electroanalysis* 6 (2011) 357-368.
- [10] Kohl F. J., Sánchez-Hernández L., Neusüß Ch., *Electrophoresis* 36 (2015) 144-158.
- [11] Ranjbar L., Foley J. P., Breadmore M. C., *Analytical Chimica Acta* 950 (2017) 7-31.
- [12] Bushey M. M., Jorgenson J. W., *Analytical Chemistry* 62 (1990) 978-984.
- [13] Česla P., Fischer J., Jandera P., *Electrophoresis* 31 (2010) 2200-2210.
- [14] Moore A. W., Jorgenson J. W., *Analytical Chemistry* 67 (1995) 3448-3455.
- [15] Hooker, T. F., Jorgenson J. W., *Analytical Chemistry* 69 (1997) 4134-4142.
- [16] Bergström S.K., Dahlin A.P., Ramström M., Andersson M., Markides K.E., Bergquist J., *Analyst* 131 (2006) 791-798.
- [17] Jandera P., Churáček J., *Gradient elution in Column Liquid Chromatography.* Elsevier, Amsterdam, 1985.
- [18] Snyder L. R., Dolan J. W., *High-Performance Gradient Elution. The Practical Application of the Linear-Solvent-Strength Model.* Wiley-Interscience, Hoboken, 2007.
- [19] Jandera P., Fischer J., Jebavá J., Effenberger H., *Journal of Chromatography A* 914 (2001) 233-244.
- [20] Česla P., Fischer J., Jandera P., *Electrophoresis* 33 (2012) 2464-2473.
- [21] Jandera P., Fischer J., Jebavá J., Řezáč P., *Chromatographia* 56 (2002) S95-S102.
- [22] Cufientes A., Bernal J. L., Diez-Masa J. C., *Analytical Chemistry* 69 (1997) 4271-4274.
- [23] Ernst R., Gonzales C. J., Arditti J., *Environmental Pollution A* 31 (1983) 159-175.

## **5 Příloha**

**Determination of Distribution Constants of Antioxidants by Electrokinetic  
Chromatography**

**Váňová J., Liimatta L. J., Česla P., Wiedmer S. K.**

*Cogent Chemistry 3 (2017)*



Received: 28 July 2017  
Accepted: 22 September 2017

\*Corresponding author: Susanne K. Wiedmer, Department of Chemistry, University of Helsinki, A.I. Virtasen aukio 1, POB 55, Helsinki 00014, Finland  
E-mail: [susanne.wiedmer@helsinki.fi](mailto:susanne.wiedmer@helsinki.fi)

Reviewing editor:  
Juan Ignacio Melo, Universidad de Buenos Aires Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Argentina

Additional information is available at the end of the article

## ANALYTICAL CHEMISTRY | RESEARCH ARTICLE

# Determination of distribution constants of antioxidants by electrokinetic chromatography

Jana Váňová<sup>1,2</sup>, Laura J. Liimatta<sup>2</sup>, Petr Česla<sup>1</sup> and Susanne K. Wiedmer<sup>2\*</sup>

**Abstract:** Liposome electrokinetic chromatography and micellar electrokinetic chromatography were used for studying the lipophilic properties of natural antioxidants, specifically phenolic acids and flavonoids. The employed negatively charged liposomes were composed of mixtures of 1-palmitoyl-2-oleyl-*sn*-glycerophosphatidylcholine and 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-phosphatidylserine or 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylglycerol. In micellar electrokinetic chromatography, sodium dodecyl sulphate micelles were used as the pseudostationary phase. The retention factors of the studied compounds were determined at pH 7.4. The corresponding distribution constants were calculated from the experimentally determined retention factors and the phase ratios of the liposome dispersions and the micellar system. The distribution constants between the aqueous phase and the liposomes or micelles were compared with octanol/water partition or distribution constants of the studied compounds, which were predicted using the ACD/Labs Percepta Platform—PhysChem Module. Our results indicate that the correlations between the distribution constants of the two tested liposome systems were much stronger than those between the liposome/micellar systems. The correlations between the *n*-octanol phase and the liposome phases were similar to that between *n*-octanol and the micellar phase. Our data shows that electrokinetic

### ABOUT THE AUTHOR

Susanne K. Wiedmer is university lecturer at the Department of Chemistry at the University of Helsinki (Finland). Susanne Wiedmer's group has expertise in chromatographic and capillary electromigration (CE) techniques, field flow fractionation (AF4) and in biosensing methods. Much focus has been on liposomes and on liposome-analyte interactions using various modes of CE, on studying interactions between biomembrane-imitating surfaces and analytes (by CE, nanoplasmonic sensing and quartz crystal microbalance), as well as on characterising lipid vesicles and particles (by CE and AF4). Recently, emphasis has been on the determination of distribution constants of analytes using liposomes of synthetic lipids or lipids extracted from biological samples. Ionic liquids have been another research target in the group, and focus has been on the determination of the toxicity of novel synthesised ionic liquids. Liposomes, cells and zebrafish models have been used for that purpose.

### PUBLIC INTEREST STATEMENT

Lipophilicity is a property of a compound, which is related to its solubility between water and an organic (lipid) phase. Lipophilic compounds often display high volumes of distribution and are therefore distributed amongst many different tissues and organs. The most common surrogate for lipophilicity is the octanol/water partition coefficient. Here, we used micellar electrokinetic chromatography (MEKC) and liposome electrokinetic chromatography (LEKC) for studying the lipophilic properties of natural antioxidants. By measuring the interactions between the compounds and the micelles or liposomes, we were able to determine the corresponding distribution constants of the compounds. Such values are of great importance for people in the field of pharma and medical science, because compounds' lipophilicity is one of the most important properties determining the distribution of compounds in the body.



chromatography is an efficient method for determining partition coefficients of compounds, but the type of pseudostationary phase has a clear impact on the values.

**Subjects:** Analysis & Pharmaceutical Quality; Analytical Chemistry; Natural Products; Physical Chemistry

**Keywords:** antioxidants; distribution constants; electrokinetic chromatography; liposome; retention factors

### 1. Introduction

Antioxidants are secondary metabolites of plants, which can protect organisms from the effect of free radicals. Antioxidants are able to inhibit oxidative damages and to improve the immune function of organisms (1). *In vivo* effects of these compounds are dependent on their lipophilicity and hydrophilicity, which govern membrane and protein interactions. In general, the hydrophobicity or lipophilicity of compounds can be expressed by the distribution constant between a polar and a non-polar phase (2). The octanol/water partition coefficient and its logarithm,  $\log P_{o/w}$ , are commonly used for the description of the hydrophobicity or lipophilicity of compounds. These values are also good descriptors for the characterisation of the relationship between the structure and biological, pharmacological and ecological effects of the compounds (3). However, for charged (ionised) compounds, it is important to consider the distribution constant between *n*-octanol and a buffer with the target pH value (4). To get a better understanding of the distribution of compounds between lipophilic and hydrophilic phases, micelle or liposome/aqueous partition coefficients, which are dependent on van der Waals and hydrogen donor/acceptor interactions between the compounds and the lipophilic membrane, can be determined (5).

In this work, we used micellar electrokinetic chromatography (MEKC) and liposome electrokinetic chromatography (LEKC) for the separation of some antioxidants commonly present in plant material. MEKC has been widely employed for the separation of synthetic and natural drugs (6, 7), proteins and peptides (8, 9), oligonucleotides (10), carbohydrates (11, 12) and for the separation of natural antioxidants (13–16). The advances in developing fundamental aspects and applications of MEKC have been summarised, e.g. in “Silva 2011 (17)”. LEKC has been known since the mid-90s, when it was used for characterisation of interactions between lipid bilayers and peptides, or drugs (18). Later on, Roberts *et al.* (19) studied the behaviour of liposomes in capillary electrophoresis. Since then, several papers on LEKC have been published (20–22). Even though liposomes are rather crude biomimetic models of biological cell membranes, data has shown that LEKC can be used for predicting the behaviour of compounds in living systems (5, 23, 24).

The anti-atherosclerotic, anti-inflammatory, antitumor, antibacterial, antiviral and antithrombotic effects of natural antioxidants are described in the literature (25–27). Polyphenols, including flavonoids, are the most common natural antioxidants in the human diet. Flavonoids are divided into six groups—flavones, flavonoles, flavanoles, flavanones, isoflavones and anthocyanines. The differences between the groups are given by the varied degree of hydroxylation, methoxylation or glycosylation. Coumarins and phenolic acids represent the simple phenols. The phenolic acids can further be divided into two groups based on the structure of cinnamic acid or benzoic acid. *In vivo* effects of these compounds are highly dependent on their lipophilicity and hydrophilicity, and therefore, in this study, micelle/aqueous phase and liposome/aqueous phase distribution constants of antioxidants were determined by MEKC and LEKC, respectively. Both the sodium dodecyl sulphate (SDS) micelles and the employed liposomes were negatively charged. The liposomes comprised of 1-palmitoyl-2-oleyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (POPC) and 1-palmitoyl-2-oleyl-*sn*-glycero-3-phospho-L-serine (POPS) or 1-palmitoyl-2-oleyl-*sn*-glycero-3-phospho-(1'-*rac*-glycerol) (POPG). All lipids chosen have transition temperatures well below room temperature, meaning that the liposomes used were in the disordered liquid crystalline phase throughout the study. To our

knowledge, this is the first time a direct EKC comparison of LEKC and MEKC, using the same volume of the pseudostationary phase (similar phase ratio), has been done.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials and reagents

1-Palmitoyl-2-oleyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (POPC), 1-palmitoyl-2-oleyl-*sn*-glycero-3-phospho-L-serine (POPS) and 1-palmitoyl-2-oleyl-*sn*-glycero-3-phosphoglycerol (POPG) were purchased from Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA). The purity of all phospholipids were >99% according to Avanti Polar Lipids home page (<https://avantilipids.com/>). The phase transition temperatures of POPC, POPS and POPG are  $-2$ ,  $14$  and  $-2^{\circ}\text{C}$ , respectively. The structures of the phospholipids are shown in the supporting information (SI), Figure S2. SDS, the alkylbenzoates and the standards of the antioxidants (Figure S3) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Sodium hydrogen phosphate and thiourea were from Sigma (Darmstadt, Germany) and sodium dihydrogen phosphate monohydrate and HPLC-grade methanol were purchased from Mallinckrodt Baker (Deventer, The Netherlands). Methanol was purchased from VWR International (Espoo, Finland) and sodium hydroxide from FF-Chemicals (Yli-Ii, Finland). All compounds were used as received.

### 2.2. Capillary electrophoresis

An Agilent 7100 (Agilent, Palo Alto, CA, USA) capillary electrophoresis instrument equipped with a diode array detector was used for the LEKC and for the MEKC studies. Uncoated fused-silica capillaries with  $50\ \mu\text{m}$  I.D. ( $360\ \mu\text{m}$  O.D.) and a total length of  $36.5\ \text{cm}$  (effective length of  $28\ \text{cm}$ ) were used throughout the study. When a new capillary was taken into use, it was preconditioned by rinsing (pressure of  $940\ \text{mbar}$ ) for  $15\ \text{min}$  with  $\text{NaOH}$  ( $0.1\ \text{M}$ ), for  $15\ \text{min}$  with Milli-Q water and for  $15\ \text{min}$  (MEKC conditions) or  $5\ \text{min}$  (LEKC conditions) with the background electrolyte (BGE) solution before the first run. The sample was injected hydrodynamically by applying  $50\ \text{mbar}$  pressure for  $5\ \text{s}$  on the inlet sample vial. The applied voltage was  $20\ \text{kV}$ , the temperature was  $25^{\circ}\text{C}$  and the detection wavelength was set at  $214$  and  $254\ \text{nm}$ . All capillary zone electrophoresis (CZE) and MEKC experiments were repeated five times. For LEKC experiments, the total volume of the BGE was only  $225\ \mu\text{L}$  (due to the high cost of phospholipids), and therefore, the LEKC experiments were repeated only three times.

### 2.3. Preparation of buffer, liposomes, micelles and antioxidant samples

Phosphate buffer ( $\text{pH}\ 7.4$ ; ionic strength of  $20\ \text{mM}$ ) was prepared by mixing appropriate amounts of solutions of sodium hydrogen phosphate and sodium dihydrogen phosphate. The total concentration of phosphate anion formed was  $8.2\ \text{mM}$ , and the concentration of sodium cations was  $14.1\ \text{mM}$ . The phosphate buffer was filtered through a  $0.45\ \mu\text{m}$  membrane filter before use. The BGE for MEKC contained SDS ( $5.2\ \text{mM}$ ) in phosphate buffer ( $\text{pH}\ 7.4$ ; ionic strength of  $20\ \text{mM}$ ). The BGE for LEKC was prepared from stock solutions of POPC ( $20\ \text{mM}$ ), POPS ( $12.7\ \text{mM}$ ) and POPG ( $10\ \text{mM}$ ) in chloroform (stored in a freezer) and phosphate buffer ( $\text{pH}\ 7.4$ ; ionic strength of  $20\ \text{mM}$ ). Appropriate amounts of the stock solutions of the phospholipids were mixed and evaporated to dryness under a gentle stream of air. Traces of chloroform were removed by evacuation under  $8$ - $100\ \text{mbar}$  pressure for  $20\ \text{h}$ . The lipid film was hydrated with phosphate buffer and shaken at  $1,000\ \text{rpm}$  for  $60\ \text{min}$  at  $60^{\circ}\text{C}$ . The liposome dispersion was extruded  $19$  times through a Nucleopore Track-Etch membrane (Whatman, Maidstone, UK) with a pore size of  $100\ \text{nm}$ . The total concentrations of the liposome dispersions, i.e. POPC/POPS ( $80:20$ , mol%) and POPC/POPG ( $80:20$ , mol%), were  $4\ \text{mM}$ , which were further diluted to  $0.5\ \text{mM}$  with phosphate buffer for LEKC analyses.

The concentration of the stock solution of each antioxidant compound was  $1\ \text{g/L}$  in methanol. The concentration of the antioxidants injected for analyses was  $25\ \text{mg/L}$  in Milli-Q water, except for morin, biochanin A, esculin, isoquercitrin, luteolin and myricetin, which were of  $50\ \text{mg/L}$  in water/methanol  $3:1$  (v/v). Thiourea ( $0.5\ \text{mM}$  solution in phosphate buffer) was used as a marker of the electroosmotic flow (EOF).

### 2.3.1. Calculation of retention factors and determination of distribution constants

A description of the determination of the retention factors is given in the supporting information (SI). The effective mobilities of the micelles and the liposomes were determined using an iterative procedure, utilising a series of alkylbenzoate homologues (methylbenzoate to hexylbenzoate) (28, 29). The scheme of the iterative procedure is shown in the supporting information (Figure S1). The distribution constants of the compounds were calculated from the retention factors. The equations and details about the calculations are given in the supporting information.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Determination of the electrophoretic mobility of liposomes and micelles

Determination of the electrophoretic mobilities of the liposomes and micelles is necessary for calculating the retention factors of the compounds in LEKC and MEKC. The iterative procedure using a homologous series of alkylbenzoates (C1–C6) was used for the determination of the electrophoretic mobility of the liposomes comprising POPC/POPS or POPC/POPG and for the SDS micelles. The mobility of 80:20 mol% POPC/POPS liposomes with a concentration of 0.5 mM in phosphate buffer (pH 7.4, 20 mM ionic strength) was  $-4.18 \times 10^{-8} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . The electrophoretic mobility of 80:20 mol% POPC/POPG liposomes was  $-4.33 \times 10^{-8} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . These values are rather similar to the values previously obtained for liposomes and lipid emulsions, i.e. Intralipid® and ClinOleic® (24, 30–32).

The electrophoretic mobility of the SDS micelles was  $-4.57 \times 10^{-8} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , which is in good agreement with previously published values (33, 34). Both liposomes and SDS micelles have an overall negative surface charge, but the smaller size of SDS micelles in comparison with the liposomes explains the higher mobility of the SDS micelles.

### 3.2. Determination of the distribution constants of natural antioxidants

The distribution constants between the phosphate buffer (pH 7.4, ionic strength of 20 mM) and the liposomes, i.e. 80:20 mol% POPC/POPS or 80:20 mol% POPS/POPG, or the SDS micelles were determined from the effective electrophoretic mobilities of the flavonoids and phenolic acids measured under CZE, LEKC and MEKC conditions. Typical electropherograms under CE (CZE) and LEKC conditions are shown in Figure S4. The obtained values were compared with the values of octanol/aqueous distribution constants. The values of  $\log D_{\text{pH } 7.4}$  were used for ionised compounds and  $\log P_{\text{o/w}}$  values for neutral compounds (flavone, (+)-catechin).  $\log D_{\text{pH } 7.4}$  and  $\log P_{\text{o/w}}$  values were predicted using the ACD/Labs Percepta Platform—PhysChem Module and the  $\text{p}K_{\text{a}}$  values were predicted using Advanced Chemistry Development (ACD/Labs) Software V11.02 (©1994–2015 ACD/Labs). The values are listed in Table 1.

### 3.3. Comparison of the distribution constants with $\log D_{\text{pH } 7.4}$ or $\log P_{\text{o/w}}$ values

The degree of ion dissociation and the experimentally determined distribution constants for the phenolic acids and flavonoids using MEKC and LEKC are also listed in Table 1. The correlation between the obtained  $\log K_{\text{D}}$  (POPC/POPS) values and the predicted  $\log D_{\text{pH } 7.4} / \log P_{\text{o/w}}$  values is shown in Figure 1(A). There are two groups of studied compounds presented in the graph; group I represents the phenolic acids, the flavonoid glycosides (esculin, rutin and isoquercitrin) and 4-hydroxycoumarin; group II represents the rest of the compounds, except for hesperidin, naringin and 4-hydroxybenzoic acid. Hesperidin and naringin belong to the group of flavonoid glycosides (flavanones), and they did not interact with the POPC/POPS liposomes under the selected experimental conditions (the retention factors were equal to zero). The reason for this could be due to the very low hydrophobicity of the compounds, indicated by their  $\log D_{\text{pH } 7.4}$  values of  $-0.26$  for hesperidin and  $-0.05$  for naringin. This polar character in combination with their very bulky structures can at least partly explain the lack of interactions with the POPC/POPS liposomes.

In the following step, the interactions between the compounds and 80:20 mol% POPC/POPG liposomes were studied. The obtained  $\log K_{\text{D}}$  (POPC/POPG) values were compared with the predicted octanol/aqueous distribution constants. The correlation between the liposome (POPC/POPG)/

**Table 1. Values of  $pK_a$ ,  $\log D_{\text{pH } 7.4}$ ,  $\log P_{\text{o/w}}$  and experimentally determined distribution constants ( $\log K_D$ ) of phenolic acids and flavonoids**

Group	Compound	No.	$pK_a$	$\alpha$ (%)	$\log D_{\text{pH } 7.4}$ or $\log P_{\text{o/w}}$	$\log K_D$ (POPC/ POPS)	$\log K_D$ (POPC/ POPG)	$\log K_D$ (SDS)
Benzoic acid	Gallic acid	1	4.33 ± 0.10	99.92 ± 0.02	-2.30	1.19	1.37	2.30
	4-Hydroxybenzoic acid	2	4.57 ± 0.10	99.86 ± 0.03	-1.15	- <sup>4</sup>	2.13	2.21
	Protocatechuic acid	3	4.45 ± 0.10	99.90 ± 0.02	-1.86	2.07	1.14	1.97
	Salicylic acid	4	3.01 ± 0.10	100.0 ± 0.0	-0.77	2.20	2.54	2.68
	Syringic acid	5	4.33 ± 0.10	99.92 ± 0.02	-1.63	1.76	1.85	2.32
	Vanillic acid	6	4.45 ± 0.10	99.90 ± 0.02	-1.46	2.20	1.69	2.34
Cinnamic acid	Caffeic acid	7	4.58 ± 0.10	99.86 ± 0.03	-1.74	0.65	- <sup>4</sup>	2.18
	Chlorogenic acid	8	3.91 ± 0.50	99.95 ± 0.04	-3.91	2.48	2.49	1.98
	Ferulic acid	9	4.58 ± 0.10	99.86 ± 0.03	-1.38	1.29	0.79	2.33
	p-Coumaric acid	10	4.65 ± 0.10	99.83 ± 0.04	-1.32	1.05	1.74	2.22
	Sinapic acid	11	4.53 ± 0.10	99.87 ± 0.03	-2.02	1.39	1.86	2.42
Flavanol	(+)-Catechin	12	9.54 ± 0.10	0.8 ± 0.2	0.49 <sup>2</sup>	2.43	2.22	- <sup>4</sup>
	(-)-Epicatechin	13	9.54 ± 0.10	0.8 ± 0.2	0.56 <sup>3</sup>	2.57	2.50	- <sup>4</sup>
Flavone	7-Hydroxyflavon	14	7.02 ± 0.40	69.0 ± 17.9	2.76	3.15	3.42	3.10
	Biochanin A	15	6.50 ± 0.20	88.9 ± 4.3	1.97	4.12	4.62	3.25
	Flavone	16	- <sup>1</sup>	- <sup>1</sup>	3.56 <sup>2</sup>	3.40	3.47	- <sup>4</sup>
	Isoquercitrin	17	6.17 ± 0.40	93.0 ± 4.9	-1.19	2.46	2.20	2.45
	Luteolin	18	6.50 ± 0.40	86.6 ± 9.0	1.12	3.96	3.72	3.00
	Rutin	19	6.17 ± 0.40	93.0 ± 4.9	-1.75	1.88	0.71	2.59
Flavonol	Kaempferol	20	6.34 ± 0.40	90.2 ± 6.8	0.81	3.97	3.20	3.11
	Morin	21	6.30 ± 0.40	90.9 ± 6.3	0.34	2.88	1.81	2.41
	Myricetin	22	6.30 ± 0.40	90.9 ± 6.3	0.26	3.45	3.61	2.65
	Quercetin	23	6.31 ± 0.40	90.7 ± 6.4	0.58	4.19	4.30	- <sup>4</sup>
Flavanone	Hesperetin	24	7.49 ± 0.40	47.7 ± 21.5	2.25	3.39	3.65	2.60
	Hesperidin	25	7.15 ± 0.40	63.4 ± 19.7	-0.26	- <sup>4</sup>	- <sup>4</sup>	- <sup>4</sup>
	Naringenin	26	7.52 ± 0.40	46.3 ± 12.4	2.22	3.79	3.77	2.60
	Naringin	27	7.17 ± 0.40	62.5 ± 19.9	-0.05	- <sup>4</sup>	- <sup>4</sup>	- <sup>4</sup>
Coumarin	4-Hydroxycoumarin	28	4.50 ± 1.00	99.4 ± 0.6	-1.72	1.78	1.46	2.29
	6,7-Dihydroxycoumarin	29	8.60 ± 1.00	20.8 ± 20.1	1.30	3.40	2.41	2.23
	Esculin	30	7.00 ± 0.20	72.4 ± 8.9	-1.92	2.47	1.55	2.09

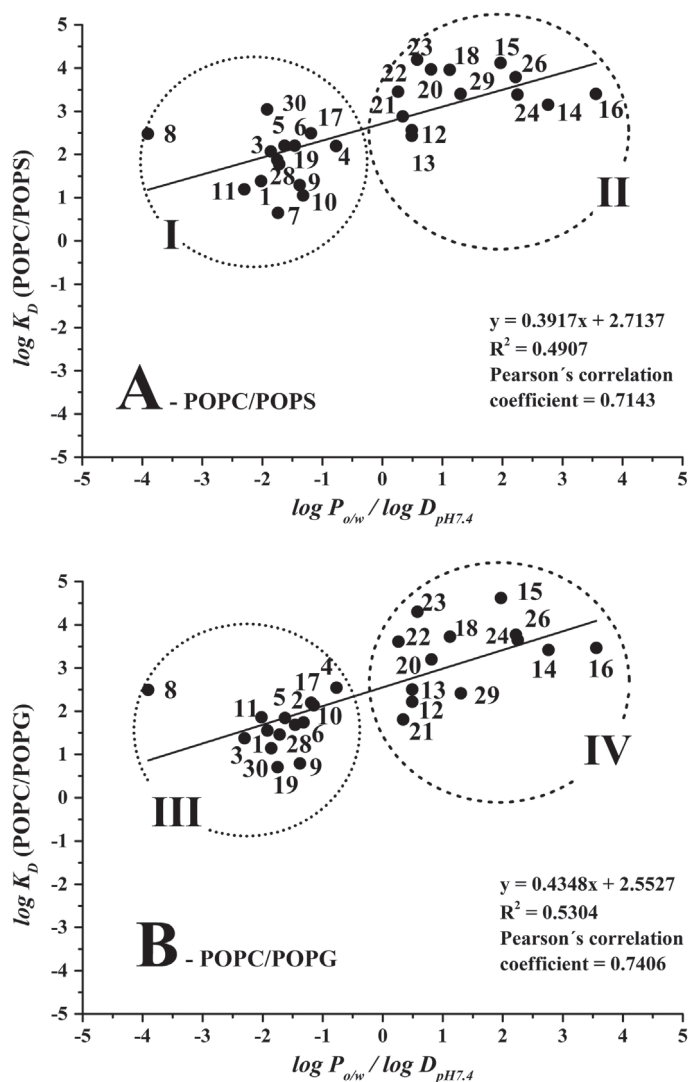
<sup>1</sup>Non-ionisable groups.

<sup>2</sup> $\log P_{\text{o/w}}$  values are shown for uncharged compounds.

<sup>3</sup>A very small charge was observed, because the compound could be separated under CZE conditions (see supplementary information).

<sup>4</sup>The compounds do not interact with the micelles or liposomes.

**Figure 1. (A) Correlation between  $\log K_D$  (POPC/POPS) values and  $\log D_{pH 7.4}/\log P_{o/w}$  and (B) correlation between  $\log K_D$  (POPC/POPG) values and  $\log D_{pH 7.4}/\log P_{o/w}$ .** Compounds: (1) gallic acid; (3) protocatechuic acid; (4) salicylic acid; (5) syringic acid; (6) vanillic acid; (7) caffeic acid; (8) chlorogenic acid; (9) ferulic acid; (10) p-coumaric acid; (11) sinapic acid; (12) (+)-catechin; (13) (-)-epicatechin; (14) 7-hydroxyflavon; (15) biochanin A; (16) flavone; (17) isoquercitrin; (18) luteolin; (19) rutin; (20) kaempferol; (21) morin; (22) myricetin; (23) quercetin; (24) hesperetin; (26) naringenin; (28) 4-hydroxycoumarin; (29) 6,7-dihydroxycoumarin; (30) esculin. Data was evaluated using program Statistica 12 and graphical program Origin 9. Running conditions: uncoated fused-silica capillary (50  $\mu$ m I.D./360  $\mu$ m O.D,  $l_{tot}$  = 36.5 cm,  $l_{det}$  = 28.0 cm); BGE: 0.5 mM 80/20 mol% POPC/POPS (A) or 0.5 mM 80/20 mol% POPC/POPG (B) in phosphate buffer at pH 7.4 (I = 20 mM); separation voltage + 20 kV; capillary cassette temperature 25°C; sample injection 50 mbar/5 s; UV detection at 214 and 254 nm; 0.5 mM thiourea was used as an EOF mobility marker.



aqueous and octanol/aqueous distribution constants is shown in Figure 1(B). Similarly, to the POPC/POPS liposomes, the compounds are divided into two groups. Phenolic acids (excepted for caffeic acid), glycosylated flavonoids and 4-hydroxycoumarin are clustered in group III, whereas the aglycones of flavonoids (except for hesperidin and naringin) are clustered in group IV. The groups III and IV generally correspond to groups I and II presented in Figure 1(A). Due to negligible interactions with the liposomes, the retention factors of caffeic acid, hesperidin and naringin were equal to zero.

The positive slope of the regression line in Figure 1 indicates that the antioxidants prefer to interact with the hydrophobic phospholipid membrane. The polar compounds (group I in Figure 1(A) and group III in Figure 1(B)) are only weakly retained in both liposome systems, with the slope of the correlation line being higher for the POPC/POPG liposomes. According to the data presented in Table 1, higher  $\log K_D$  values were observed for some phenolic acids (i.e. gallic acid, 4-hydroxybenzoic acid, p-coumaric acid and sinapic acid) when comparing POPC/POPG liposomes with POPC/POPS liposomes. This clearly indicates selective interactions between some of the compounds and the polar head groups of the lipids. Even though both phospholipids, i.e. POPG and POPS, have an overall

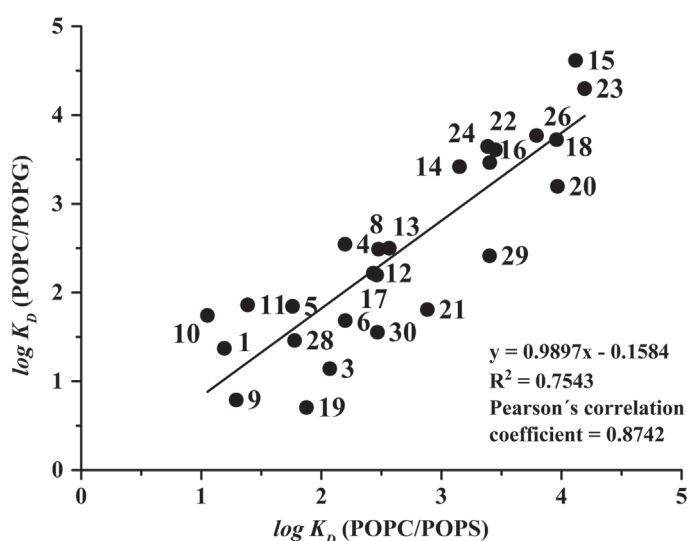
negative surface charge, the polar parts of the molecules are dissimilar. POPS has two negatively charged functional groups and one neutralising positively charged group, whereas POPG only contains one negatively charged phosphate group. The 1,2-diol presented in POPG can also specifically interact with the aforementioned compounds.

### 3.4. Correlation of experimental and predicted distribution constants

For detailed characterisation of the correlation between the  $\log K_D$  data, the Pearson's correlation coefficient,  $r$ , was used. Pearson's correlation coefficient is one of the most important and most commonly used parameters for measuring the strength of a correlation between two continuous random variables. Pearson's correlation coefficient is expected from  $N$  pairs of values—the correlation pairs of the measured  $N$  individuals randomly selected from the population. Pearson's correlation coefficient determined for the POPC/POPS liposomes vs  $\log P_{o/w}/\log D_{pH7.4}$  was 0.714 ( $R^2 = 0.491$ ) and for the POPC/POPG liposomes vs  $\log P_{o/w}/\log D_{pH7.4}$  the positive correlation was 0.740 ( $R^2 = 0.530$ ). The values of the Pearson's correlation coefficients are in the range of 0.7–0.8, which is typical for strong correlation between studied variables. The Pearson's correlation coefficient was even higher ( $r = 0.874$ ,  $N = 25$ ,  $p < 0.05$ ) for the correlation between  $\log K_D$  (POPC/POPS) and  $\log K_D$  (POPC/POPG), shown in Figure 2. This demonstrates that the positive correlation between the two liposome systems is stronger than between the  $\log K_D$  values obtained using the liposome systems and the predicted  $\log P_{o/w}/\log D_{pH7.4}$  values.

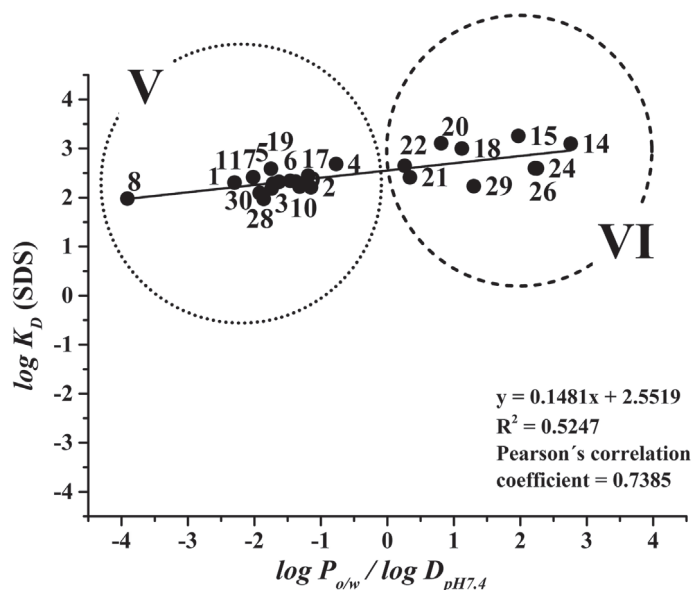
The pseudostationary phase in MEKC comprised 5.2 mM of SDS. The  $cmc$  of SDS was determined using a CE instrument for measuring the current as a function of increasing SDS concentration in a capillary filled with a BGE containing SDS (35). The  $cmc$  value of SDS in phosphate buffer (pH 7.4,  $I = 20$  mM) was  $4.1 \pm 0.2$  mM. This means that the BGE employed in this work (comprising 5.2 mM SDS), contained both SDS micelles (with the micelle concentration 1.1 mM) and free SDS unimers. The concentration of the pseudostationary phase was selected to provide the same phase ratio in the LEKC and MEKC analyses. Interactions between (+)-catechin, (–)-epicatechin, flavone, quercitrin, hesperidin or naringin and SDS micelles were not observed in the MEKC analyses. The correlation between the logarithms of micelle/aqueous phase distribution constants and the  $\log P_{o/w}/\log D_{pH7.4}$  values is shown in Figure 3. The corresponding data is presented in Table 1. Group V is formed by the

Figure 2. Correlation between  $\log K_D$  (POPC/POPG) values and  $\log K_D$  (POPC/POPS) values. The numbering of the compounds and the running conditions are the same as in Figure 1.





**Figure 3. Correlations between  $\log K_D$  (SDS) values and  $\log P_{o/w}/\log D_{pH\ 7.4}$  values. The numbering of the compounds is the same as in Figure 1. Running conditions: uncoated fused-silica capillary (50  $\mu\text{m}$  I.D./360  $\mu\text{m}$  O.D.,  $l_{\text{tot}} = 36.5$  cm,  $l_{\text{det}} = 28.0$  cm); BGE: 5.2 mM SDS in phosphate buffer at pH 7.4 ( $I = 20$  mM); separation voltage +20 kV; capillary cassette temperature 25°C; sample injection 50 mbar/5 s; UV detection at 214 and 254 nm; 0.5 mM thiourea was used as an EOF mobility marker.**

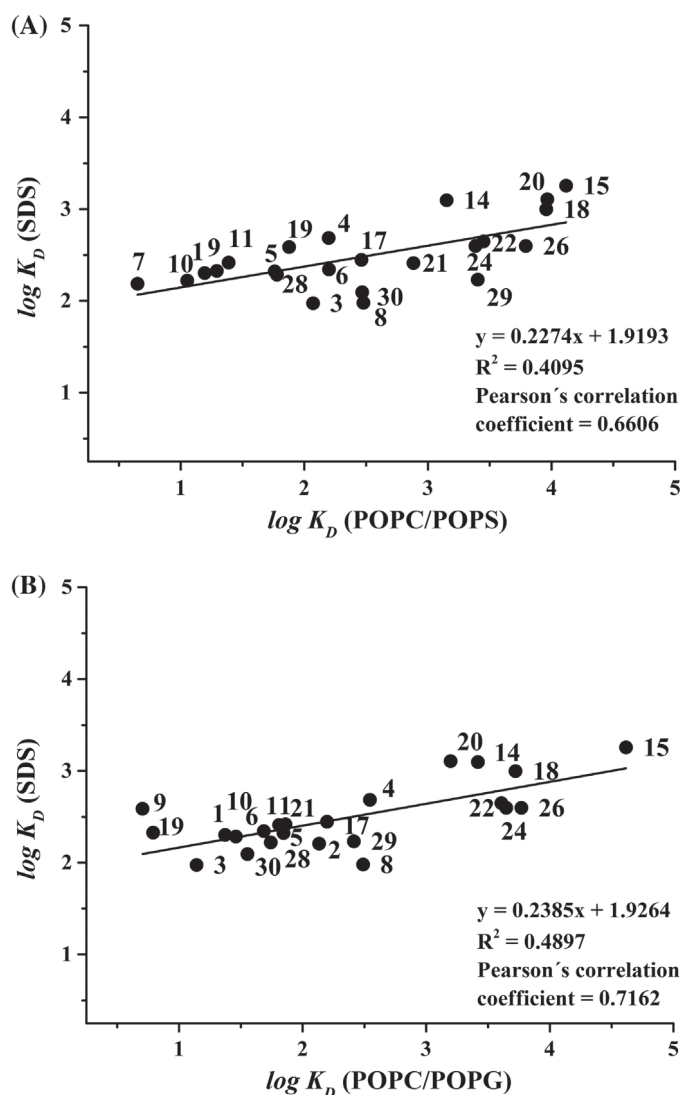


phenolic acids and flavonoid glycosides, and group VI represents the flavonoids. In comparison with the LEKC systems, the positive slope of the correlation line is lower, indicating that the less polar compounds interact more strongly with the phospholipid membrane than with the SDS micelles. The correlation between  $\log K_D$  (SDS) and  $\log P_{o/w}/\log D_{pH\ 7.4}$ , represented by Pearson's correlation coefficient ( $r = 0.739$ ,  $N = 24$ ,  $p < 0.05$ ), is however similar to the values obtained for POPC/POPS and POPC/POPG liposome dispersions.

### 3.5. Comparison of the distribution constants in LEKC and MEKC

In order to compare the LEKC and MEKC separation systems and for characterisation of the distribution equilibria, the correlations between the constants determined for the SDS micelles and for the liposomes were constructed. The correlation between  $\log K_D$  (SDS) and  $\log K_D$  (POPC/POPS) is presented in Figure 4(A), and the correlation between  $\log K_D$  (SDS) and  $\log K_D$  (POPC/POPG) is shown in Figure 4(B). Both systems provided similar positive slopes of regression lines with slightly better correlation of SDS with POPC/POPG, indicated by a slightly higher Pearson's correlation coefficient (0.716 for SDS-POPC/POPG compared to 0.661 for SDS-POPC/POPS). Micelles of SDS are negatively charged as well as the liposomes of POPC/POPG and POPC/POPS. However, at this stage, we are not able to comment on the reason why the Pearson's correlation coefficient between SDS-POPC/POPG is higher than between SDS-POPC/POPS. The primary amino group presented in POPS could make a difference. The significant correlation of distribution constants by MEKC and LEKC suggests that the partition equilibria in SDS micelles can be used as a rough model for characterising the interaction of compounds with phospholipid membranes.

**Figure 4. Correlations between (A)  $\log K_d$  (SDS) values and  $\log K_d$  (POPC/POPS); and (B)  $\log K_d$  (SDS) and  $\log K_d$  (POPC/POPG). The numbering of the compounds is the same as in Figure 1. Running conditions were as in Figures 1 and 3.**



#### 4. Conclusions

In this work, liposome/aqueous and micellar/aqueous phase distribution constants of natural antioxidants were determined using LEKC and MEKC. Liposomes comprising 80:20 mol% POPC/POPS or 80:20 mol% POPC/POPG were used as the pseudostationary phase in LEKC, and SDS micelles were used in MEKC. In order to compare the distribution constants obtained by LEKC and MEKC, pseudostationary phases of similar phase ratios were utilised. The distribution constants were calculated from the phase ratio and the retention factors, and the  $K_d$  values were compared with predicted values of octanol/aqueous phase distribution constants of the selected antioxidants. The results show that the distribution constants of phenolic acids and flavonoid glycosides are, in general, lower than the distribution constants of the flavonoids. Obviously, the type of polar head groups in the phospholipids or surfactants has a considerable effect on the distribution constants of the phenolic acids and flavonoids. The data indicated a stronger positive correlation between the two studied liposome systems than between the liposome/SDS systems.



### Supplementary material

Supplementary material for this article can be accessed here <https://doi.org/10.1080/23312009.2017.1385173>.

### Funding

This work was supported by the Academy of Finland [grant number 266342 (SW)] and from the Magnus Ehrnrooth Foundation [grant number 4703943 (SW)].

### Competing Interests

The authors declare no competing interest.

### Author details

Jana Váňová<sup>1,2</sup>

E-mail: [jana.vanova@upce.cz](mailto:jana.vanova@upce.cz)

Laura J. Liimatta<sup>2</sup>

E-mail: [laura.j.liimatta@helsinki.fi](mailto:laura.j.liimatta@helsinki.fi)

Petr Česla<sup>1</sup>

E-mail: [Petr.Cesla@upce.cz](mailto:Petr.Cesla@upce.cz)

Susanne K. Wiedmer<sup>2</sup>

E-mail: [susanne.wiedmer@helsinki.fi](mailto:susanne.wiedmer@helsinki.fi)

ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0002-3097-6165>

<sup>1</sup> Faculty of Chemical Technology, Department of Analytical Chemistry, University of Pardubice, Pardubice, Czech Republic.

<sup>2</sup> Department of Chemistry, University of Helsinki, A.I. Virtasen aukio 1, POB 55, Helsinki 00014, Finland.

### Citation information

Cite this article as: Determination of distribution constants of antioxidants by electrokinetic chromatography, Jana Váňová, Laura J. Liimatta, Petr Česla & Susanne K. Wiedmer, *Cogent Chemistry* (2017), 3: 1385173.

### References

- Jáč, P.; Poláček, M.; Pospíšilová, M. Recent Trends in the Determination of Polyphenols by Electromigration Methods. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2006**, *40*, 805–814.
- Rothwell, J.A.; Day, A.J.; Morgan, M.R.A. Experimental Determination of Octanol-Water Partition Coefficients of Quercetin and Related Flavonoids. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 4355–4360. <https://doi.org/10.1021/jf0483669>
- Berthod, A.; Carda-Broch, S. Determination of Liquid-Liquid Partition Coefficients by Separation Methods. *J. Chromatogr. A* **2004**, *1037*, 3–14. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.01.001>
- Kah, M.; Brown, C.D. LogD: Lipophilicity for Ionisable Compounds. *Chemosphere* **2008**, *72*, 1401–1408. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.04.074>
- Wiedmer, S.K.; Kulovesi, P.; Riekkola, M.-L. Liposome Electrokinetic Capillary Chromatography in the Study of Analyte-Phospholipid Membrane Interactions. Application to Pesticides and Related Compounds. *J. Sep. Sci.* **2008**, *31*, 2714–2721. <https://doi.org/10.1002/jssc.v31:14>
- Gong, F.; Yang, H.; Sun, W.; Cao, J.; Liu, W. Development and Validation of a Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography Method for the Determination of Goserelin and Related Substances. *Electrophoresis* **2016**, *37*, 623–629. <https://doi.org/10.1002/elps.201500328>
- Theurillat, R.; Sendi, P.; Thormann, W. An MEKC Assay for the Therapeutic Drug Monitoring of Cefepime. *J. Sep. Sci.* **2013**, *36*, 2915–2921. <https://doi.org/10.1002/jssc.201300402>
- Glavač, N.K.; Injac, R.; Kreft, S. Optimization and Validation of a Capillary MEKC Method for Determination of Proteins in Urine. *Chromatographia* **2009**, *70*, 1473–1478. <https://doi.org/10.1365/s10337-009-1317-3>
- Wu, Y.; Xie, J.; Wang, F.; Chen, Z. Separation of Small Molecular Peptides with Same Amino Acid Composition but Different Sequences by Capillary Electrophoresis. *J. Sep. Sci.* **2009**, *32*, 437–440. <https://doi.org/10.1002/jssc.v32:3>
- Hong, N.-S.; Shi, L.H.; Jeong, J.S.; Yang, I.; Kim, S.-K.; Park, S.-R. Rapid and Accurate Determination of Deoxyribonucleoside Monophosphates from DNA Using Micellar Electrokinetic Chromatography with a Cationic Surfactant Additive. *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, *400*, 2131–2140. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-4915-5>
- Kratschmar, D.; Wallner, S.; Florenski, M.; Schmid, D.; Kuhn, R. Analysis of Oligosaccharides by MEKC with Aminobenzoic Alkyl Esters as Derivatization Agents. *Chromatographia* **1999**, *50*, 596–600. <https://doi.org/10.1007/BF02493666>
- Tran, N.T.; Taverna, M.; Deschamps, F.S.; Morin, P.; Ferrier, D. Investigation of Micelles and Anionic Cyclodextrins as Pseudostationary Phases for the Capillary Electrophoresis Separation of Oligosaccharides Derivatized with 2-Amino-Benzamide. *Electrophoresis* **1998**, *19*, 2630–2638. [https://doi.org/10.1002/\(ISSN\)1522-2683](https://doi.org/10.1002/(ISSN)1522-2683)
- Česla, P.; Fischer, J.; Jandera, P. Improvement of the Sensitivity of 2D LC-MEKC Separation of Phenolic Acids and Flavonoids Natural Antioxidants Using the on-Line Preconcentration Step. *Electrophoresis* **2012**, *33*, 2646–2473.
- del Mar, C.L.M.; López Vilariño, J.M.; González Rodríguez, M.V.; Barral Losada, L.F. Development, Validation and Application of Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography Method for Routine Analysis of Catechins, Quercetin and Thymol in Natural Samples. *Microchem. J.* **2011**, *99*, 431–469.
- Liu, Ch-M; Chen, Ch-Y; Lin, Y.-W. Estimation of Tea Catechin Levels Using Micellar Electrokinetic Chromatography: A Quantitative Approach. *Food Chem.* **2014**, *150*, 145–150. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.10.140>
- Ye, N.; Li, J.; Wang, Y.; Ma, J. Determination of Catechins in Tea by Micellar Electrokinetic Chromatography with a Graphene Oxide-Coated Capillary. *Instrum. Sci. Technol.* **2014**, *42*, 605–617. <https://doi.org/10.1080/10739149.2014.930876>
- Silva, M. Micellar Electrokinetic Chromatography: A Practical Overview of Current Methodological and Instrumental Advances. *Electrophoresis* **2011**, *32*, 149–165. <https://doi.org/10.1002/elps.201000344>
- Zhang, Y.; Zhang, R.; Hjertén, S.; Lundahl, P. Liposome Capillary Electrophoresis for Analysis of Interactions between Lipid Bilayers and Solutes. *Electrophoresis* **1995**, *16*, 1519–1523. [https://doi.org/10.1002/\(ISSN\)1522-2683](https://doi.org/10.1002/(ISSN)1522-2683)
- Roberts, M.A.; Locascio-Brown, L.; MacCrehan, W.A.; Durst, R.A. Liposome Behavior in Capillary Electrophoresis. *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 3434–3440. <https://doi.org/10.1021/ac9603284>
- Bilek, G.; Kremser, L.; Blaas, D.; Kenndler, E. Analysis of Liposomes by Capillary Electrophoresis and Their Use as Carrier in Electrokinetic Chromatography. *J. Chromatogr. B* **2006**, *841*, 38–51. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.03.031>
- Wiedmer, S.K.; Hautala, J.; Holopainen, J.M.; Kinnunen, P.K.J.; Riekkola, M.-L. Study on Liposomes by Capillary Electrophoresis. *Electrophoresis* **2001**, *22*, 1305–1313. [https://doi.org/10.1002/\(ISSN\)1522-2683](https://doi.org/10.1002/(ISSN)1522-2683)

- (22) Wiedmer, S.K.; Shimmo, R. Liposomes in Capillary Electromigration Techniques. *Electrophoresis* **2009**, *30*, S240–S257. <https://doi.org/10.1002/elps.v30.10s>
- (23) Helle, A.; Mäkitalo, J.; Huhtanen, J.; Holopainen, J.M.; Wiedmer, S.K. Antibiotic Fusidic Acid Has Strong Interactions with Negatively Charged Lipid Membranes: An Electrokinetic Capillary Chromatographic Study. *BBA-Biomembranes* **2008**, *1778*, 2640–2647. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2008.06.019>
- (24) Muhonen, J.; Holopainen, J.M.; Wiedmer, S.K. Interactions between Local Anesthetics and Lipid Dispersion Studied with Liposome Electrokinetic Capillary Chromatography. *J. Chromatogr. A* **2009**, *1216*, 3392–3397. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.02.028>
- (25) Nijveldt, R.J.; van Nood, E.; van Hoorn, D.E.C.; Boelens, P.G.; van Norren, K.; van Leeuwen, P.A.M. Flavonoids: A Review of Probable Mechanisms of Action and Potential Applications. *Am. J. Clin. Nutr.* **2001**, *74*, 418–425.
- (26) Heim, K.E.; Tagliaferro, A.R.; Bobilya, D.J. Flavonoid Antioxidants: Chemistry, Metabolism and Structure-Activity Relationships. *J. Nutr. Biochem.* **2002**, *13*, 573–584.
- (27) Özçelik, B.; Kartal, M.; Orhan, I. Cytotoxicity, Antiviral and Antimicrobial Activities of Alkaloids, Flavonoids, and Phenolic Acids. *Pharm. Biol.* **2011**, *49*, 396–402. <https://doi.org/10.3109/13880209.2010.519390>
- (28) Bushey, M.M.; Jorgenson, J.W. Separation of Dansylated Methylamine and Dansylated Methyl-D3-Amine by Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography with Methanol-Modified Mobile Phase. *Anal. Chem.* **1989**, *61*, 491–493. <https://doi.org/10.1021/ac00180a022>
- (29) Wiedmer, S.K.; Lokajová, J.; Riekkola, M.-L. Marker Compounds for the Determination of Retention Factors in EKC. *J. Sep. Sci.* **2010**, *33*, 394–409. <https://doi.org/10.1002/jssc.v33:3>
- (30) Laine, J.; Lokajová, J.; Parshintsev, J.; Holopainen, J.M.; Wiedmer, S.K. Interaction of a Commercial Lipid Dispersion and Local Anesthetics in Human Plasma: Implications for Drug Trapping by “Lipid-Sinks”. *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, *396*, 2599–2607. <https://doi.org/10.1007/s00216-009-3435-z>
- (31) Lokajová, J.; Laine, J.; Puukilainen, E.; Ritala, M.; Holopainen, J.M.; Wiedmer, S.K. Liposomes for Entrapping Local Anesthetics: A Liposome Electrokinetic Chromatographic Study. *Electrophoresis* **2010a**, *31*, 1540–1549.
- (32) Lokajová, J.; Pukkila, J.; Holopainen, J.M.; Wiedmer, S.K. *In Vitro* Capturing of Various Lipophilic Illicit Drugs by Lipid Dispersions. an Electrokinetic Capillary Chromatography and Fluorescence Polarization Study. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2010b**, *41*, 515–522. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2010.08.006>
- (33) Chen, N.; Terabe, S.; Nakagawa, T. Effect of Organic Modifier Concentrations on Electrokinetic Migrations in Micellar Electrokinetic Chromatography. *Electrophoresis* **1995**, *16*, 1457–1462. [https://doi.org/10.1002/\(ISSN\)1522-2683](https://doi.org/10.1002/(ISSN)1522-2683)
- (34) Palmer, C.P.; Terabe, S. Micelle Polymers as Pseudostationary Phases in MEKC: Chromatographic Performance and Chemical Selectivity. *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 1852–1860. <https://doi.org/10.1021/ac960801d>
- (35) Cifuentes, A.; Bernal, J.L.; Diez-Masa, J.C. Determination of Critical Micelle Concentration Values Using Capillary Electrophoresis Instrumentation. *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 4271–4274. <https://doi.org/10.1021/ac970696n>



© 2017 The Author(s). This open access article is distributed under a Creative Commons Attribution (CC-BY) 4.0 license.

You are free to:

Share — copy and redistribute the material in any medium or format

Adapt — remix, transform, and build upon the material for any purpose, even commercially.

The licensor cannot revoke these freedoms as long as you follow the license terms.

Under the following terms:

Attribution — You must give appropriate credit, provide a link to the license, and indicate if changes were made.

You may do so in any reasonable manner, but not in any way that suggests the licensor endorses you or your use.

No additional restrictions

You may not apply legal terms or technological measures that legally restrict others from doing anything the license permits.



**Cogent Chemistry (ISSN: 2331-2009) is published by Cogent OA, part of Taylor & Francis Group.**

**Publishing with Cogent OA ensures:**

- Immediate, universal access to your article on publication
- High visibility and discoverability via the Cogent OA website as well as Taylor & Francis Online
- Download and citation statistics for your article
- Rapid online publication
- Input from, and dialog with, expert editors and editorial boards
- Retention of full copyright of your article
- Guaranteed legacy preservation of your article
- Discounts and waivers for authors in developing regions

**Submit your manuscript to a Cogent OA journal at [www.CogentOA.com](http://www.CogentOA.com)**



**CZE and MEKC separation of phenolic compounds**

**Váňová J., Česla P., Fischer J.**

*Chemické listy 107 (2013) S465-S467*

## CZE AND MEKC SEPARATION OF PHENOLIC COMPOUNDS

**JANA VÁŇOVÁ, PETR ČESLA, and JAN FISCHER**

*Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemical Technology, University of Pardubice, Pardubice, Czech Republic*

*Jana.Vanova@student.upce.cz*

### Summary

Micellar electrokinetic chromatography was used in this work for separation of selected antioxidants. The critical micellar concentration of homologous series of sodium alkyl sulfates and migration time of their micelles were determined. The effects of pH of background electrolyte, concentration of surfactants and organic modifier on the separation selectivity of flavonoids and phenolic acids were studied.

### 1. Introduction

Micellar electrokinetic capillary chromatography (MEKC) is a mode of capillary electrophoresis, which combines principles of liquid chromatography and capillary zone electrophoresis. Neutral molecules as well as charged ions can be separated by this technique, including pharmaceuticals, environmental pollutants, cell cultures, biological fluids and substances in food<sup>1–3</sup>.

For the process of MEKC, the presence of surfactant micelles in background electrolyte is essential. The micelles are formed if the concentration of surfactant in solution is higher than the critical micelle concentration<sup>4</sup>. The critical micelle concentrations (*cmc*) of the sodium alkyl sulfate surfactants were determined in water, borate buffer (25 mmol L<sup>-1</sup>, pH 9.30) and buffer with addition of acetonitrile (5–20 %; v/v). Besides of the effect of length of alkyl chain and of the surfactant concentration in background electrolyte on the separation selectivity of natural antioxidants, the effect of organic modifier acetonitrile was investigated, too. In this work, sodium decyl sulfate and sodium dodecyl sulfate were used for the separation of selected flavonoids and phenolic acids. The MEKC separation of antioxidants was compared to the CZE separation in the same buffer without surfactants.

### 2. Experimental

Sodium decyl sulfate and sodium dodecyl sulfate, selected antioxidants ((-)-epicatechin, (+)-catechin, 4-hydroxyphenylacetic acid, 7-hydroxyflavone, caffeic acid, flavone, gallic acid, hesperetin, hesperidin, chlorogenic acid, naringenin, *p*-hydroxybenzoic acid, quercetin, rutin, salicylic acid) and alkylbenzenes (methylbenzene, ethylbenzene, propylbenzene, butylbenzene, pentylbenzene) were obtained from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Sodium tetraborate and boric acid were purchased from Fluka (Buchs, Switzerland), thiourea from LachNer (Brno, Czech Republic) and methanol from J. T. BAKER (Deventer, Netherlands).

All experiments were carried out using capillary electrophoresis Agilent <sup>3D</sup>CE (Palo Alto, CA, USA) in fused-silica capillary (non-coated, 48 cm total length, 40 cm effective length, 50 μm i.d.) and voltage 20 kV was applied. Detection wavelength was set at 254 nm. Separation capillary was preconditioned by flushing with electrolyte for 2 min before the analysis. The samples were injected by applying 50 mBar pressure on the inlet sample vial for 5 s.

The stock solutions of antioxidants were prepared in methanol (0.5 g L<sup>-1</sup>) and for separation the samples were diluted by water to the final concentration of 10 mg L<sup>-1</sup>.

The critical micelle concentration was determined by the method based on the measurement of the background electrolyte current<sup>5</sup> and by the computational method using the retention model<sup>6</sup>, where the migration time of the micelles was obtained using iterative process of migration times of homologous series of alkylbenzenes<sup>7</sup>.

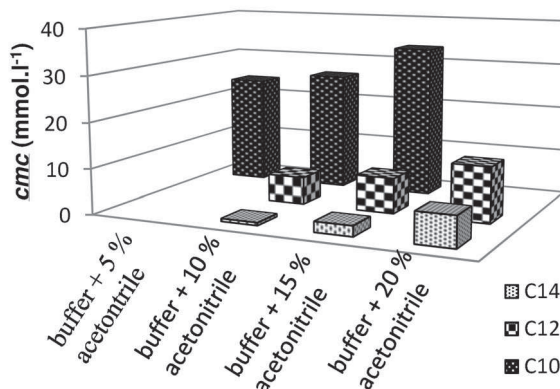


Fig. 1. The values of critical micelle concentration of sodium decyl-, dodecyl- and tetradecyl sulfate in electrolyte with concentration of acetonitrile 5–20 % (v/v)

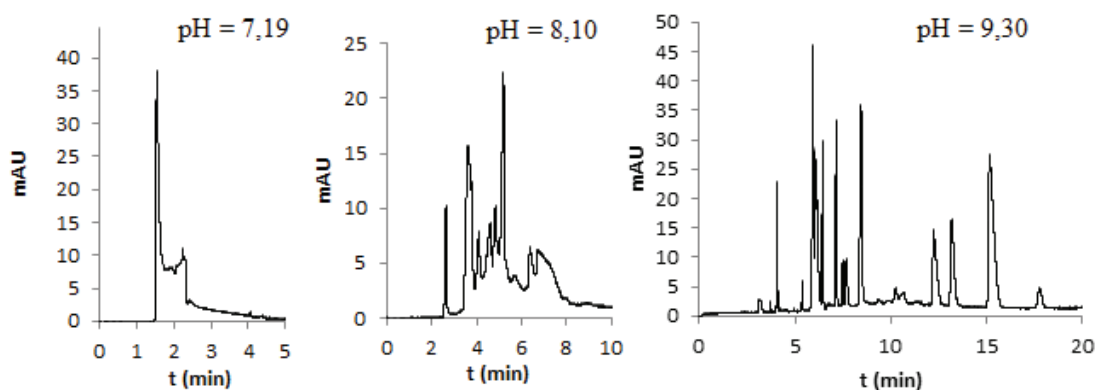


Fig. 2. Separation of the mixture of antioxidants in 25 mmol L<sup>-1</sup> borate background electrolyte pH 7.19; 8.10 and 9.30

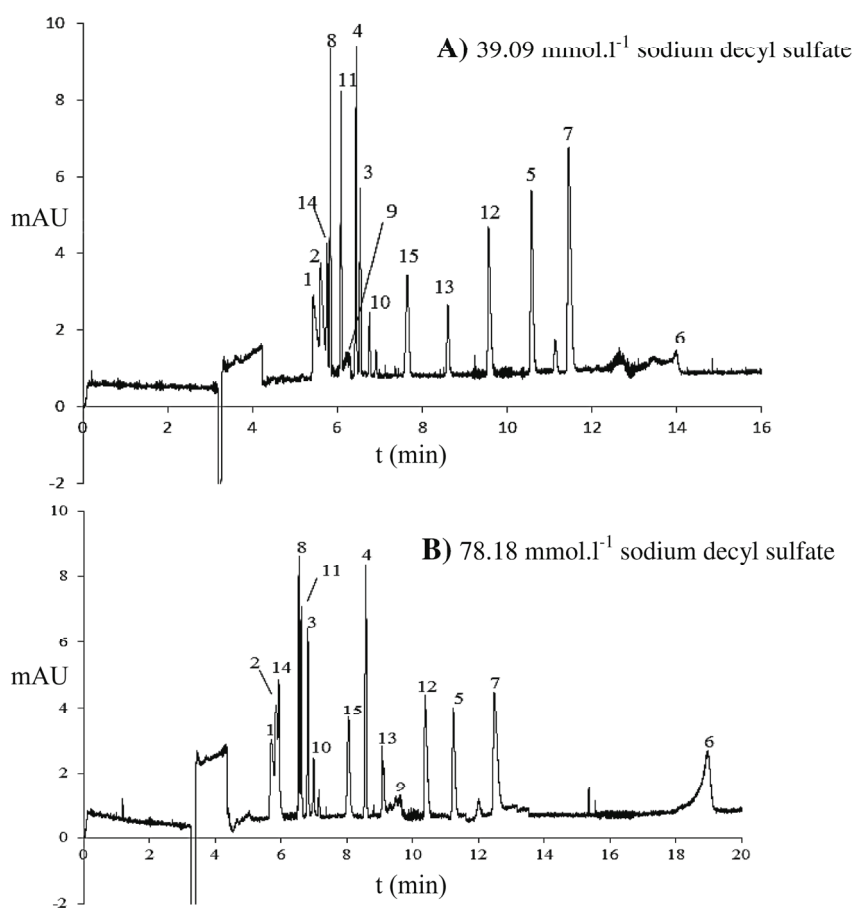


Fig. 3. Separation of mixture of antioxidants in 25 mmol L<sup>-1</sup> borate background electrolyte pH 9.30. Non-coated 48 (40) cm fused silica capillary, 50  $\mu$ m i.d., applied voltage 20 kV, temperature 25  $^{\circ}$ C. 1: (-)-epicatechin, 2: (+)-catechin, 3: rutin, 4: hesperetin, 5: naringenin, 6: 4 hydroxyphenylacetic acid, 7: chlorogenic acid, 8: 7-hydroxyflavone, 9: salicylic acid, 10: quercetin, 11: *p*-hydroxybenzoic acid, 12: caffeic acid, 13: gallic acid, 14: flavone, 15: salicylic acid

### 3. Results and discussion

The values of critical micelle concentrations of sodium alkyl sulfate surfactants were determined by the two methods. The measured values are presented in the Fig. 1. The critical micelle concentration decreases with increasing length of the alkyl chain in the surfactant molecules and increases with increasing concentration of acetonitrile in the background electrolyte.

First, the separation of selected antioxidants was carried out in background electrolyte without the surfactants. The pH of electrolyte was changed in the range of 6.89–9.30.

Separation of the selected antioxidants using different pH of BGE is presented in the Fig. 2. As can be seen from this figure, the increasing value of pH improves the separation selectivity and at pH 9.30, the best separation of flavonoids and phenolic acids was obtained.

The MEKC separation of the mixture of antioxidants in background electrolyte with addition of 0–20 % (v/v) acetonitrile is presented in Fig. 3. The separation time increases both with increasing concentration of sodium alkyl sulfate and with increased concentration of acetonitrile in background electrolyte.

### 4. Conclusions

Influence of working conditions on the separation of selected antioxidants was studied. The critical micelle concentrations of homologous series of sodium alkyl sulfates were determined by the methods (i) based on the measurement of BGE current and (ii) based on the retention model. The critical micelle concentration decreases with increasing number of carbons in the alkyl chain and increases with increasing concentration of acetonitrile in BGE.

Separations of the mixture of phenolic acids and flavonoids were carried out in BGE with pH in the range 6.89–9.30 and with different type and concentration of sodium alkyl sulfates and concentration of acetonitrile. Separation time, retention factors of analytes and width of the migration window can be manipulated by using sodium alkyl sulfates with different length of the alkyl chains in their molecules and by varying of the concentration of acetonitrile.

*The financial support by the Faculty of Chemical Technology (project No. SGFChT06/2013) is kindly acknowledged.*

### REFERENCES

1. Nishi H., Terabe S.: *J. Chromatogr., A* 735, 3 (1996).
2. Terabe S.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 10, 705 (1992).
3. Zhang J., Chakraborty U., Foley J. P.: *Electrophoresis* 30, 3971 (2009).
4. Zilin C., Jin-Ming L., Katsumi U., Toshiyuki H.: *Anal. Chim. Acta* 403, 173 (2000).
5. Cifuentes A., Bernal J. L., Diez-Masa J. C.: *Anal. Chem.* 69, 4271 (1997).
6. Terabe S., Otsuka K., Ichikawa K., Tsuchiya A., Ando T.: *Anal. Chem.* 56, 111 (1984).
7. Váňová J., Česla P., Fischer J., in: *XV. Monitorování cizorodých látek v životním prostředí* (Fischer J., Česla P., Vytřas K., ed.), University of Pardubice, 2013.

**Characterization of *Sambucus nigra* L. infusions using capillary electrophoresis and liquid chromatography-tandem mass spectrometry**

**Česla P., Dinisová P., Váňová J., Česlová L., Fischer J.**

*Instrumental Methods for the Analysis and Identification of Bioactive Molecules (2014)*

*165-187, ISBN 978-0-8412-2976-1*

## Chapter 8

# Characterization of *Sambucus nigra* L. Infusions Using Capillary Electrophoresis and Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

Petr Česla,\* Petra Dinisová, Jana Váňová, Lenka Česlová,  
and Jan Fischer

Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemical Technology,  
University of Pardubice, Pardubice, Czech Republic

\*E-mail: Petr.Cesla@upce.cz.

Herbs, herbal teas and infusions are widely used as natural medicines with important biological effects caused by the presence of plant metabolites. One of the major groups of such compounds are polyphenolic compounds including both phenolic acids and flavonoidic natural antioxidants. For separation and determination of the content of (poly)phenolic compounds in herb samples, the liquid chromatographic method (based on a reversed-phase system employing columns packed with porous shell particles coupled to the tandem mass spectrometry) and the capillary electrophoretic method have been developed. The utility of both methods for characterization and quantification of polyphenolic compounds is demonstrated on *Sambucus nigra* L. infusion samples. The quantitative parameters, i.e. the sensitivity, repeatability and linearity of calibrations, limits of detection and the correlation between the concentrations of polyphenolic compounds determined using both methods are compared in this work with the aim of providing a tool for the comprehensive characterization of the herbal infusion samples.



## Introduction

In recent years, there is increased interest in the analysis of wild plants rich in polyphenolic compounds due to their possible beneficial effects on human health. Some flowers from wild species such as *Sambucus nigra* L. have been traditionally used for medicinal applications. Due to their diaphoretic properties infusions prepared from the inflorescences of *Sambucus nigra* L. have been used to treat the symptoms of influenza, colds and sinusitis (1). Further, the infusion, poultices or ointments prepared from elderflower can be used for treatment of skin injuries, diabetic wounds or as a blood cleanser (2).

The main constituents reported for elder species are phenolic compounds, triterpenes, essential oils (3) and other compounds such as acyl spermidines (1). Phenolic compounds (also often known as polyphenols) are secondary metabolites synthesized in the plants depending on their development stages. The main classes of phenolic compounds are phenolic acids and flavonoids, which are very often present in the plant material in the glycosylated form. Due to their health benefits, the analytical techniques for the characterization and quantitation of these compounds are required in order to support the steady progress of the medicinal sciences. As the herb infusions are usually complex mixtures containing tens of compounds, the methods possessing high peak capacities are usually required for their analysis.

For the separation and quantification of phenolic compounds in complex samples such as herbal extracts and infusions, reversed-phase liquid chromatography (RP-LC) is a widely used technique (1, 3–13). The mobile phase usually consists of an aqueous solution of acetonitrile or methanol with the addition of formic or acetic acid for suppressing the dissociation of the phenolic acids in acidic *pH*. Octadecyl silica gel columns are used in almost all cases for the separation of polyphenols in herbs, however other special stationary phases were also tested, e.g. poly-(carboxylic acid)-coated silica phase, which is stable in low *pH* and can be used for the fast separation of flavonoids (4). Recently, the RP-LC method for determination of polyphenols in elderflower samples on-line coupled with the assay for determination of their antioxidant capacity have been introduced (14).

The polyphenolic profile of the *Sambucus nigra* L. strongly depends on the genotype, the place of origin (including altitudinal variations) and processing conditions (2, 5, 6). Usually, water infusions, hydromethanolic or hydroethanolic extracts of elderflower are used for quantitative analysis of phenolic compounds. The common extraction techniques like maceration and Soxhlet extraction are time consuming and, consequently, in recent years an effort has been made to develop faster extraction procedures. The comparison of different extraction techniques with the accelerated solvent extraction was performed for rutin and isoquercitrin (7) and other flavonoids glycosides and anthocyanins (5). The application of the accelerated extraction techniques improved the total extraction time more than ten times in comparison with the maceration technique. The method suitable for decreasing the extraction time of preparation of extracts from elder is pressurized liquid extraction (8).

Besides the RP-LC, spectroscopic techniques (3, 15) and various modes of capillary electrophoresis (capillary zone electrophoresis, isotachopheresis, micellar electrokinetic chromatography) can be used for the quantitative analysis of the phenolic compounds (3, 9, 16–18). Recently, the benefits of two-dimensional separation techniques have been recognized for the analysis of polyphenolic compounds of herbs. Thus the two-dimensional liquid chromatography based either on the combination of reversed-phase systems (19, 20) or on the combination of hydrophilic interaction chromatography with reversed-phase system (21, 22) is suitable for characterization of the profile of polyphenolic compounds. The application of capillary electrophoresis in a two-dimensional system with liquid chromatography (23) can further improve the overall peak capacity yielding better separation of the polyphenols.

Quantitative determination of polyphenols presented in herb extracts and infusions performed using different methods should ideally provide the same results. In this work we have therefore focused on the comparison of quantitative parameters of the two most widely applied methods, i.e. reversed-phase liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry and capillary electrophoresis. Both optimized methods were used for the characterization and determination of the 18 physiologically most important polyphenolic compounds in three *Sambucus nigra* L. infusion samples.

## Materials and Methods

### Chemicals

Standards of phenolic acids (caffeic, chlorogenic, cryptochlorogenic, ferulic, gallic, neochlorogenic, *p*-hydroxybenzoic, *p*-coumaric), flavonoid aglycones (hesperetin, kaempferol, naringenin, quercetin) and glycosides (hesperidin, isoquercitrin, kaempferol-3-*O*-rutinoside, rutin) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), as well as the chemicals for the preparation of mobile phases (methanol, LC/MS purity) and background electrolyte components (boric acid, sodium tetraborate). Standards of isorhamnetin-3-*O*-glucoside and isorhamnetin-3-*O*-rutinoside were obtained from Extrasynthese (Genay, France). Background electrolyte additives sodium decyl sulfate,  $\beta$ -cyclodextrin, heptakis(6-*O*-sulfo)- $\beta$ -cyclodextrin and heptakis(2,6-di-*O*-methyl)- $\beta$ -cyclodextrin were also from Sigma-Aldrich. Deionized ultra-pure water with conductivity of 0.055  $\mu$ S/cm was prepared by Ultra CLEAR UV apparatus (SG, Hamburg, Germany). Formic acid, sodium hydroxide and thiourea were purchased from LachNer (Neratovice, Czech Republic).

### Sample Preparation

The three series of samples of *Sambucus nigra* L. infusions were used for the analyses. At first series, the five infusions were prepared using five elderflower tea bags, obtained in a local store. The weight of each bags was 1.6804 g, 1.6277 g, 1.6600 g, 1.6102 g and 1.6803 g, respectively. The second series of infusions was

prepared by homogenization of 20 tea bags (from the same brand like in the first series) and by weighting the elderflower samples. The samples weighted 1.6009 g, 1.6007 g, 1.6074 g, 1.6096 g and 1.6022 g, respectively. The third series of infusions was prepared from the dried inflorescence of wild-growing *Sambucus nigra* L. plant, collected in Veltruby, Czech Republic (location 50° 4.3219' N, 15° 10.8356' E) on June 2013. The samples weighted 1.6076 g, 1.6072 g, 1.6176 g, 1.6218 g and 1.6024 g, respectively. The sample infusions were prepared by keeping the bags or inflorescence samples in 200 mL of 95 °C hot water for 5 min and cooling to the laboratory temperature. Before injection, the infusions were filtered using Millipore 0.45 µm polytetrafluoroethylene syringe filter (Bedford, MA, USA).

### Capillary Electrophoresis Method

Electrophoretic analyses with micellar electrokinetic chromatography were performed using an Agilent CE 7100 capillary electrophoresis instrument (Agilent, Palo Alto, CA, USA). Fused silica capillaries were used, 50 µm i.d., 48 cm total length, 40 cm to the detector with 150 µm extended light path cell (also obtained from Agilent). Before the first use, new capillaries were preconditioned by rinsing with 0.5 mol/L sodium hydroxide following by ultra-pure water for 10 min each. The analyses were carried out in background electrolyte (BGE) consisted of 25 mmol/L borate buffer *pH* 9.3 with the addition of 36 mmol/L sodium decyl sulfate. The *pH* of the BGE was adjusted using Metrohm 827 laboratory *pH* meter equipped with Unitrode electrode (Metrohm, Herisau, Switzerland), calibrated using Metrohm standard buffer solutions, *pH* 7.00 and 9.00. The temperature of the capillary was 25 °C and applied voltage was 20 kV. The samples were introduced into the separation capillary hydrodynamically by applying overpressure of 100 mBar for 10 s at the inlet sample vial. The detection wavelengths of the CE instrument were set to 214, 254 and 280 nm.

### Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Method

The elderflower infusions were analyzed using a Shimadzu modular liquid chromatograph consisting of two LC-20ADXR pumps, DGU-5 degassing unit, SIL-20ADXR autosampler, SPD-20A UV detector (all Shimadzu, Kyoto, Japan) and LCO-102 column thermostat (ECOM, Prague, Czech Republic) coupled with QTRAP 4500 mass spectrometer operated in electrospray mode (AB SCIEX, Framingham, MA, USA). The tandem mass spectrometric (MS/MS) detection in multiple reactions monitoring mode (MRM) was used for the quantitative analysis. The detection conditions i.e. the MRM transitions, declustering potential, collision energy and collision cell exit potential were optimized for all compounds using direct infusion of the standards into the mass spectrometer. The optimal parameters used for quantitative analysis are indicated in the Table I. Other settings of the ionization source common to all compounds were as follows: curtain gas 25, collision gas – medium, ion spray voltage -4500 V, temperature 400 °C, ion source gases 50/60, entrance potential -10 V.

**Table I. Conditions of Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometric Detection of Phenolic Acids and Flavonoids**

<i>Compound</i>	<i>Retention time [min]</i>	<i>MRM transitions</i>	<i>Declustering potential [V]</i>	<i>Collision energy [V]</i>	<i>Collision Cell Exit Potential [V]</i>
Gallic acid	2.12	169/125 <sup>a</sup>	-60	-22	-1
Neochlorogenic acid	3.80	353/179	-70	-26	-7
		353/191 <sup>a</sup>	-70	-30	-5
<i>p</i> -Hydroxybenzoic acid	5.76	137/93 <sup>a</sup>	-40	-18	-5
Chlorogenic acid	6.02	353/135	-60	-46	-11
		353/191 <sup>a</sup>	-60	-35	-5
Cryptochlorogenic acid	6.80	353/173 <sup>a</sup>	-50	-26	-5
		353/179	-50	-26	-9
Caffeic acid	7.23	179/89	-60	-44	-25
		179/135 <sup>a</sup>	-60	-24	-7
<i>p</i> -Coumaric acid	9.84	163/93	-40	-34	-5
		163/119 <sup>a</sup>	-40	-16	-7
Ferulic acid	10.71	193/117	-65	-20	-5
		193/134	-65	-20	-5
Isoquercitrin	13.87	463/271	-140	-60	-3
		463/301	-140	-42	-1

*Continued on next page.*

**Table 1. (Continued). Conditions of Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometric Detection of Phenolic Acids and Flavonoids**

<i>Compound</i>	<i>Retention time [min]</i>	<i>MRM transitions</i>	<i>Declustering potential [V]</i>	<i>Collision energy [V]</i>	<i>Collision Cell Exit Potential [V]</i>
Rutin	13.90	609/271	-160	-80	-7
		609/301 <sup>a</sup>	-160	-48	-9
Hesperidin	14.31	609/164	-115	-72	-7
		609/301 <sup>a</sup>	-115	-42	-9
Kaempferol-3- <i>O</i> -rutinoside	16.10	593/255	-150	-72	-9
		593/285 <sup>a</sup>	-150	-48	-11
Isorhamnetin-3- <i>O</i> -glucoside	16.26	477/243	-150	-56	-5
		477/314 <sup>a</sup>	-150	-38	-7
Isorhamnetin-3- <i>O</i> -rutinoside	16.55	623/299	-175	-62	-9
		623/315 <sup>a</sup>	-175	-40	-5
Quercetin	18.90	301/151 <sup>a</sup>	-100	-30	-7
		301/179	-100	-26	-15
Naringenin	19.20	271/119	-85	-34	-9
		271/151 <sup>a</sup>	-85	-24	-9
Hesperetin	20.28	301/151	-75	-34	-5
		301/164 <sup>a</sup>	-75	-34	-5

<i>Compound</i>	<i>Retention time [min]</i>	<i>MRM transitions</i>	<i>Declustering potential [V]</i>	<i>Collision energy [V]</i>	<i>Collision Cell Exit Potential [V]</i>
Kaempferol	21.89	285/117	-135	-58	-11
		285/185 <sup>a</sup>	-135	-36	-7

<sup>a</sup> Multiple Reaction Monitoring (MRM) transition used for quantitative analysis.

In Instrumental Methods for the Analysis and Identification of Bioactive Molecules; Jayprakash, et al.; ACS Symposium Series; American Chemical Society: Washington, DC, 2014.

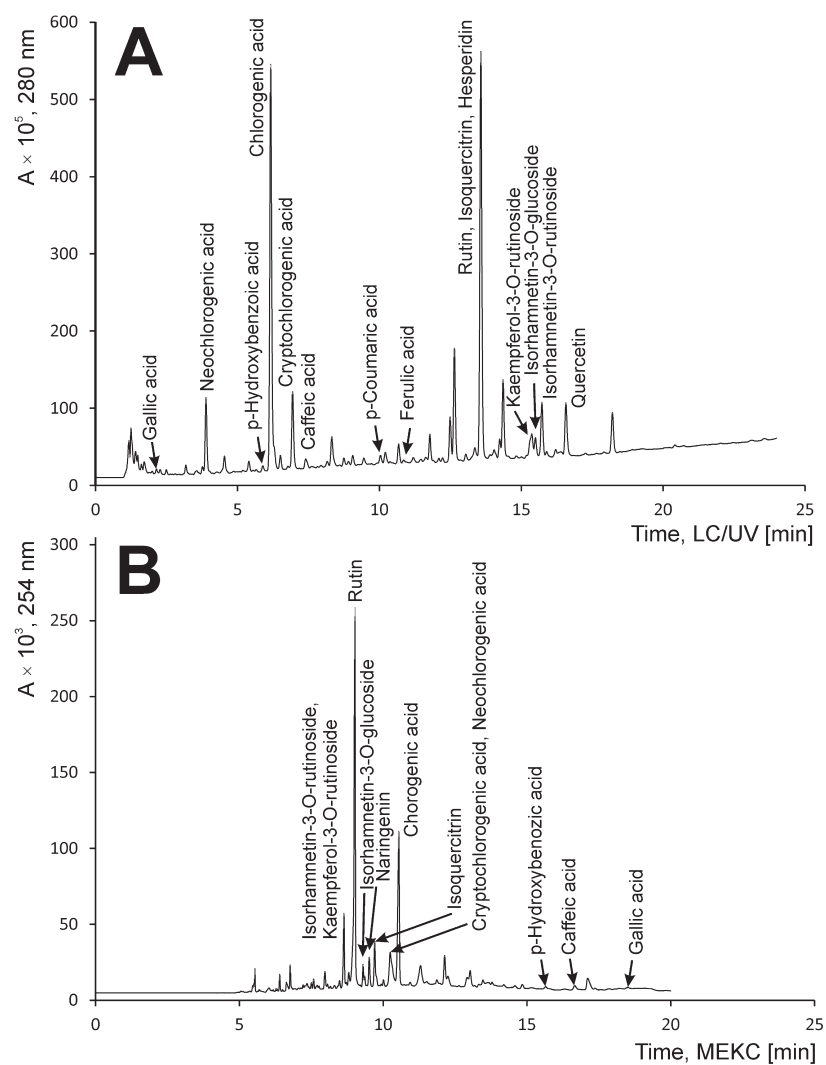


Figure 1. Separation of the elderflower infusion. Liquid chromatography (A) Ascentis Express C18 column (150 x 3.0 mm, 2.7  $\mu$ m porous shell particles); gradient elution of methanol/water with 0.1 % (v/v) formic acid, 0.5 mL/min, 30  $^{\circ}$ C. Capillary electrophoresis (B) capillary 48(40) cm x 50  $\mu$ m i.d. with 150  $\mu$ m light path cell, 25 mmol/L borate buffer pH 9.3 with 36 mmol/L sodium decyl sulfate, 20 kV, 25  $^{\circ}$ C. For other experimental conditions, see Materials and Methods.

In this work, several columns were tested for the separation of (poly)phenolic compounds. Thus Zorbax Eclipse XDB-C18, Luna PFP (both 250x4.6 mm, 5  $\mu$ m) and ACE3 C18-PFP (150x3.0 mm, 3  $\mu$ m) columns packed with the fully porous particles were compared with the porous shell columns Ascentis Express C8, C18

and phenyl-hexyl (all 150x3.0 mm, 2.7  $\mu\text{m}$  particle size, 1.7  $\mu\text{m}$  core size). The quantitative analysis was performed using Ascentis Express C18 column. The mobile phase A consisted of ultra pure water, mobile phase B was methanol. Formic acid (0.1 %, v/v) was added to both mobile phases. Flow rate of the mobile phase was 0.5 mL/min, temperature of the column 30 °C, injection volume 1  $\mu\text{L}$ . The optimized gradient profile was 0 min – 15 % B, 8 min – 35 % B, 22 min – 59 % B, 24 min – 80 % B. The MS/MS data were acquired with the cycle time 0.6 s at scheduled MRM mode with MRM detection window of 160 s. The UV signal was recorded at 280 nm.

### Statistical Evaluation of the Data

The results of the quantitative analysis were evaluated using Statistica 10 software (StatSoft, Inc., 2011, www.statsoft.com). The calibrations for both LC/MS/MS and MEKC methods were measured at least at seven concentration levels with three replicates ( $n = 3$ ). The first, fourth and seventh calibration standards were replicated five times ( $n = 5$ ). The calibration data were fitted using the least square linear regression at a significance level of 95 % ( $\alpha = 0.05$ ). The significance of the regression parameters was tested using Student's  $t$ -test and the linearity was checked by inspecting the residuals. Each elderflower infusion was analyzed three times ( $n = 3$ ) and the concentrations of phenolic compounds were calculated together with the standard deviations. Analysis of variance (ANOVA) was used for the determination of the significance of differences between the analyses, the infusions and the methods used.

## Results and Discussion

### Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Method

For the chromatographic analysis of the polyphenolic compounds presented in *Sambucus nigra* L. infusions, the various reversed-phase columns were tested including octadecyl-, octyl-, phenylhexyl- and pentafluorophenyl silica gel columns. The columns used in the study were packed with both, fully porous and superficially porous (porous shell) particles. Porous shell material reduces the band broadening and allows the attainment of high efficiencies for fast separation similar to sub-2  $\mu\text{m}$  fully porous particles. The advantage of such columns lies predominantly in reduction of longitudinal and eddy diffusion ( $B$  and  $A$  term of van Deemter plot) (24). The retention and the selectivity of separation for glycosylated flavonoids was higher using the medium-polarity and polar stationary phases (pentafluorophenyl silica gel column). The phenolic acids and flavonoid aglycones were better separated using octadecyl silica gel column. The separation of the elderflower infusion under optimized gradient conditions is presented on Figure 1A.



Polyphenols presented in the elder infusions were identified by comparing the retention times with the standards and by using tandem mass spectrometric detection. Thus two MRM transitions were used for the detection of the compounds, where one transition with higher intensity was used for quantification and the second one for the confirmation of the target compound.

The MRM transitions were optimized using direct infusion of the standards of polyphenols into the mass spectrometer and are shown in Table I. The most intense fragment ions of phenolic acids correspond to the decarboxylation. For the caffeoylquinic acids, either the deprotonated quinic acid (neochlorogenic and chlorogenic acids; Figure 2A) or the loss of caffeic acid from the deprotonated molecule was observed in the tandem mass spectra (cryptochlorogenic acid). The loss of sugar moiety was observed for flavonoid glycosides as the most intense fragments and for the aglycons, both bonds between carbon and oxygen in the central ring (1-2 and 3-4 bonds in C ring) are cleaved yielding characteristic fragment ions  $m/z$  151 (Figure 2B). In case of hesperetin, the central ring can be cleaved in different position (1-2 and 2-3 bonds in C ring). The tandem mass spectra of kaempferol strongly depend on the experimental conditions and many fragment ions are observed. For the conditions used, the transition  $m/z$  285/185 was the most intense, which corresponds to the double decarbonylation and one decarboxylation of the molecular ion and is in agreement with the literature (25).

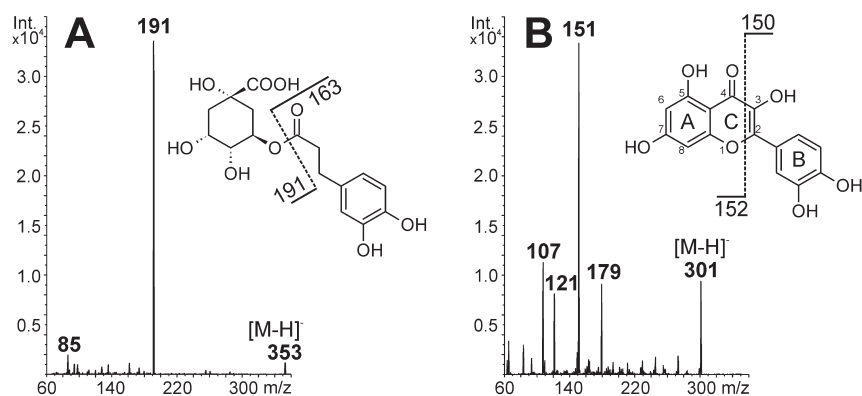


Figure 2. Tandem mass spectra and fragmentation of (A) chlorogenic acid and (B) quercetin. Electrospray ionization in the negative ion mode. For experimental conditions, see Materials and Methods.

## Capillary Electrophoresis Method

In contrast to the RP-LC separation of polyphenols, the ionization of the compounds is beneficial for the separation using capillary electrophoresis. The dissociation constants ( $pK_a$  values) range from 3.91 to 4.65 for the studied set of phenolic acids (calculated using ACD/Labs Software V11.02; data obtained from SciFinder database). The values of  $pK_a$  of flavonoid glycosides and aglycones are even higher (6.17 – 7.52). Therefore, we have selected the borate background electrolyte with alkaline  $pH$  9.3 for the separation of polyphenolic compounds using capillary electrophoresis. To improve the separation of the polyphenols from other compounds presented in *Sambucus nigra* L. infusions, the sodium decyl sulfate surfactant in concentration 36 mmol/L was added to the background electrolyte forming negatively charged micellar pseudostationary phase. The critical micelle concentration for the sodium decyl sulfate under the applied conditions is  $25.4 \pm 0.9$  mmol/L (26, 27), and, thus, the concentration of micelles is approx. 10 mmol/L. In addition to electrophoretic migration, the analyzed compounds are separated also by partitioning between the micellar phase and bulk electrolyte. The separation of the elderflower infusion with the identified polyphenols is shown in Figure 1B. In comparison to the RP-LC analysis (Figure 1A), the separation order is reversed due to the ionization of the compounds as the effective electrophoretic mobilities are directed towards the anodic end of the capillary, which is on the injection side. Some pairs of structurally similar phenolic compounds were not resolved under these conditions (glycosides isorhamnetin- and kaempferol-3-*O*-rutinodise and neo- and cryptochlorogenic acids). To improve the separation of the critical pairs, neutral  $\beta$ -cyclodextrin, heptakis(2,6-di-*O*-methyl)- $\beta$ -cyclodextrin and negatively charged heptakis(6-*O*-sulfo)- $\beta$ -cyclodextrin were tested as the additives to the BGE. The application of neutral cyclodextrins led to the slightly improved resolution of the isomers of chlorogenic acids, however, the resolution of other compounds (*p*-coumaric acid / quercetin, isorhamnetin-3-*O*-rutinoside / isorhamnetin-3-*O*-glucoside) decreased. Negatively charged cyclodextrin also has not improved the overall separation of polyphenols in the samples of elderflower infusions. Therefore, we have used the BGE without cyclodextrins for the determination of polyphenols and the comigrating compounds were quantified as the sums.

## Comparison of Quantitative Results

The quantitative analysis of *Sambucus nigra* L. infusions was performed using both developed methods, i.e. liquid chromatography-tandem mass spectrometry and capillary electrophoresis. The calibration solutions were prepared in the range of 0.5 ng/mL – 10  $\mu$ g/mL for chromatographic method and in the range of 0.5 – 200  $\mu$ g/mL for electrophoretic method, respectively. The evaluated parameters of the quantitative analyses are presented in Table II for liquid chromatography and in Table III for capillary electrophoresis.

**Table II. Parameters of the Calibration Curves for Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Method**

<i>Compound</i>	<i>Slope</i> ± <i>SD</i>	<i>Intercept</i> ± <i>SD</i>	<i>p-Value</i> ( <i>intercept</i> )	<i>R</i> <sup>2</sup>	<i>LOD</i> (ng/mL)	<i>Linearity</i> (ng/mL)
Gallic acid	8.04 · 10 <sup>5</sup> ± 6.10 · 10 <sup>3</sup>	1.41 · 10 <sup>4</sup> ± 2.59 · 10 <sup>4</sup>	0.608	0.9997	4.55	5 · 1 · 10 <sup>4</sup>
Neochlorogenic acid	2.64 · 10 <sup>5</sup> ± 5.03 · 10 <sup>3</sup>	2.85 · 10 <sup>3</sup> ± 2.14 · 10 <sup>4</sup>	0.899	0.9982	2.38	5 · 1 · 10 <sup>4</sup>
<i>p</i> -Hydroxybenzoic acid	8.11 · 10 <sup>5</sup> ± 3.11 · 10 <sup>4</sup>	2.11 · 10 <sup>5</sup> ± 1.56 · 10 <sup>5</sup>	0.270	0.9956	49.77	1 · 10 <sup>2</sup> · 1 · 10 <sup>4</sup>
Chlorogenic acid	5.39 · 10 <sup>5</sup> ± 5.69 · 10 <sup>3</sup>	7.72 · 10 <sup>3</sup> ± 2.42 · 10 <sup>4</sup>	0.976	0.9994	1.32	5 · 1 · 10 <sup>4</sup>
Cryptochlorogenic acid	4.16 · 10 <sup>5</sup> ± 1.03 · 10 <sup>4</sup>	4.28 · 10 <sup>4</sup> ± 4.10 · 10 <sup>4</sup>	0.337	0.9963	0.76	5 · 1 · 10 <sup>4</sup>
Caffeic acid	1.39 · 10 <sup>6</sup> ± 3.58 · 10 <sup>4</sup>	2.86 · 10 <sup>4</sup> ± 1.52 · 10 <sup>4</sup>	0.119	0.9999	5.99	5 · 1 · 10 <sup>4</sup>
<i>p</i> -Coumaric acid	1.51 · 10 <sup>6</sup> ± 3.50 · 10 <sup>4</sup>	1.75 · 10 <sup>5</sup> ± 1.31 · 10 <sup>5</sup>	0.224	0.9962	0.55	1 · 1 · 10 <sup>4</sup>
Ferulic acid	4.43 · 10 <sup>4</sup> ± 1.78 · 10 <sup>3</sup>	1.53 · 10 <sup>3</sup> ± 3.45 · 10 <sup>3</sup>	0.676	0.9920	1.50	0.5 · 1 · 10 <sup>3</sup>
Isoquercitrin	3.44 · 10 <sup>5</sup> ± 2.20 · 10 <sup>3</sup>	9.56 · 10 <sup>3</sup> ± 9.33 · 10 <sup>3</sup>	0.353	0.9998	0.08	5 · 1 · 10 <sup>4</sup>
Rutin	4.78 · 10 <sup>5</sup> ± 4.91 · 10 <sup>3</sup>	6.57 · 10 <sup>3</sup> ± 1.84 · 10 <sup>4</sup>	0.732	0.9993	0.05	0.5 · 1 · 10 <sup>4</sup>
Hesperidin	6.39 · 10 <sup>5</sup> ± 6.14 · 10 <sup>3</sup>	1.29 · 10 <sup>5</sup> ± 2.18 · 10 <sup>4</sup>	0.001	0.9993	0.22	0.5 · 1 · 10 <sup>4</sup>
Kaempferol-3- <i>O</i> -rutinoside	6.55 · 10 <sup>5</sup> ± 1.16 · 10 <sup>4</sup>	6.91 · 10 <sup>4</sup> ± 4.34 · 10 <sup>4</sup>	0.155	0.9978	0.04	1 · 1 · 10 <sup>4</sup>
Isorhamnetin-3- <i>O</i> -glucoside	3.95 · 10 <sup>5</sup> ± 5.14 · 10 <sup>3</sup>	-9.68 · 10 <sup>2</sup> ± 2.04 · 10 <sup>4</sup>	0.964	0.9990	0.07	1 · 1 · 10 <sup>4</sup>
Isorhamnetin-3- <i>O</i> -rutinoside	6.41 · 10 <sup>5</sup> ± 9.26 · 10 <sup>3</sup>	4.80 · 10 <sup>4</sup> ± 3.47 · 10 <sup>4</sup>	0.209	0.9985	0.07	1 · 1 · 10 <sup>4</sup>
Quercetin	1.51 · 10 <sup>6</sup> ± 3.33 · 10 <sup>4</sup>	-8.50 · 10 <sup>3</sup> ± 1.32 · 10 <sup>4</sup>	0.544	0.9971	0.19	0.5 · 1 · 10 <sup>3</sup>
Naringenin	2.09 · 10 <sup>6</sup> ± 6.80 · 10 <sup>4</sup>	2.48 · 10 <sup>5</sup> ± 1.23 · 10 <sup>5</sup>	0.091	0.9937	0.09	0.5 · 1 · 10 <sup>4</sup>

In Instrumental Methods for the Analysis and Identification of Bioactive Molecules; Jayprakash, et al.; ACS Symposium Series; American Chemical Society: Washington, DC, 2014.

<i>Compound</i>	<i>Slope ± SD</i>	<i>Intercept ± SD</i>	<i>p-Value (intercept)</i>	<i>R<sup>2</sup></i>	<i>LOD (ng/mL)</i>	<i>Linearity (ng/mL)</i>
Hesperetin	1.77 · 10 <sup>6</sup> ± 1.62 · 10 <sup>4</sup>	2.22 · 10 <sup>4</sup> ± 6.86 · 10 <sup>3</sup>	0.023	0.9996	0.04	0.5-1 · 10 <sup>3</sup>
Kaempferol	2.91 · 10 <sup>5</sup> ± 7.19 · 10 <sup>3</sup>	8.16 · 10 <sup>3</sup> ± 2.86 · 10 <sup>3</sup>	0.029	0.9963	0.07	0.5-1 · 10 <sup>3</sup>

**Table III. Parameters of the Calibration Curves for Capillary Electrophoretic Method**

Compound	Slope $\pm$ SD	Intercept $\pm$ SD	p-Value (intercept)	R <sup>2</sup>	LOD (ng/mL)	Linearity ( $\mu$ g/mL)
Gallic acid	34.41 $\pm$ 0.36	-0.29 $\pm$ 15.47	0.986	0.9995	211.3	0.5-1 $\cdot$ 10 <sup>2</sup>
Neochlorogenic acid <sup>a</sup>	6.18 $\pm$ 0.05	4.04 $\pm$ 2.28	0.137	0.9996	223.9	0.5-1 $\cdot$ 10 <sup>2</sup>
p-Hydroxybenzoic acid	19.94 $\pm$ 0.38	2.32 $\pm$ 16.34	0.893	0.9982	92.6	0.5-1 $\cdot$ 10 <sup>2</sup>
Chlorogenic acid	5.67 $\pm$ 0.07	7.77 $\pm$ 2.85	0.042	0.9993	141.5	0.5-1 $\cdot$ 10 <sup>2</sup>
Cryptochlorogenic acid <sup>a</sup>	6.54 $\pm$ 0.09	-4.32 $\pm$ 4.10	0.340	0.9990	241.9	0.5-1 $\cdot$ 10 <sup>2</sup>
Caffeic acid	25.36 $\pm$ 0.21	14.17 $\pm$ 8.86	0.171	0.9997	111.9	0.5-1 $\cdot$ 10 <sup>2</sup>
p-Coumaric acid	17.21 $\pm$ 0.32	-15.11 $\pm$ 13.85	0.325	0.9983	80.6	0.5-1 $\cdot$ 10 <sup>2</sup>
Ferulic acid	14.77 $\pm$ 0.17	7.92 $\pm$ 7.12	0.317	0.9994	138.9	0.5-1 $\cdot$ 10 <sup>2</sup>
Isoquercitrin	12.05 $\pm$ 0.10	-0.21 $\pm$ 4.75	0.967	0.9997	252.1	1-1 $\cdot$ 10 <sup>2</sup>
Rutin	6.48 $\pm$ 0.09	16.95 $\pm$ 8.04	0.073	0.9987	118.1	0.5-2 $\cdot$ 10 <sup>2</sup>
Hesperidin	6.52 $\pm$ 0.22	13.20 $\pm$ 10.35	0.271	0.9954	405.4	0.5-1 $\cdot$ 10 <sup>2</sup>
Kaempferol-3-O-rutinoside, isorhamnetin-3-O-rutinoside <sup>a</sup>	7.41 $\pm$ 0.14	-10.72 $\pm$ 11.88	0.408	0.9983	133.3	1-1 $\cdot$ 10 <sup>2</sup>
Isorhamnetin-3-O-glucoside	9.07 $\pm$ 0.12	7.80 $\pm$ 5.19	0.193	0.9991	76.9	0.5-1 $\cdot$ 10 <sup>2</sup>
Quercetin	16.56 $\pm$ 2.90	-28.73 $\pm$ 29.80	0.406	0.9155	319.1	0.5-20
Naringenin	14.30 $\pm$ 0.16	5.36 $\pm$ 6.98	0.477	0.9994	53.8	0.5-1 $\cdot$ 10 <sup>2</sup>

In Instrumental Methods for the Analysis and Identification of Bioactive Molecules; Jayprakash, et al.; ACS Symposium Series; American Chemical Society: Washington, DC, 2014.

<i>Compound</i>	<i>Slope ± SD</i>	<i>Intercept ± SD</i>	<i>p-Value (intercept)</i>	<i>R<sup>2</sup></i>	<i>LOD (ng/mL)</i>	<i>Linearity (µg/mL)</i>
Hesperetin	15.94 ± 0.24	13.62 ± 10.19	0.239	0.9989	66.1	0.5-1 · 10 <sup>2</sup>
Kaempferol	22.37 ± 0.62	-61.92 ± 26.93	0.070	0.9961	428.6	0.5-1 · 10 <sup>2</sup>

<sup>a</sup> The compounds are not resolved under applied conditions.

**Table IV. Results of the Quantitative Analysis of Sambucus nigra L. Infusions**

Compound	Sample series	Average concentration, (mg/g)			Repeatability of analysis (n = 3) and infusions (n = 5), SD (mg/g)		
		LC/MS	CE	LC/MS	Analysis, CE	LC/MS	Infusion, CE
Gallic acid	1.	0.10	0.19	0.01	0.08	0.01	0.04
	2.	0.09	0.06	0.01	0.06	0.02	0.04
	3.	0.07	- a	0.01	- a	0.01	- a
Neochlorogenic acid	1.	4.73	5.15 <sup>b</sup>	0.47	0.10 <sup>b</sup>	0.47	0.33 <sup>b</sup>
	2.	3.97	5.21 <sup>b</sup>	0.33	0.14 <sup>b</sup>	0.80	0.62 <sup>b</sup>
	3.	5.05	4.02 <sup>b</sup>	0.44	0.19 <sup>b</sup>	0.51	0.31 <sup>b</sup>
<i>p</i> -Hydroxybenzoic acid	1.	0.19	0.32	0.03	0.07	0.02	0.05
	2.	0.28	0.46	0.03	0.14	0.05	0.06
	3.	0.07	0.18	0.01	0.02	0.01	0.10
Chlorogenic acid	1.	26.91	11.04	1.87	0.18	3.35	0.58
	2.	25.50	12.42	1.61	0.19	4.57	1.37
	3.	14.32	6.50	1.10	0.07	1.17	0.66
Cryptochlorogenic acid	1.	2.96	- b	0.36	- b	0.17	- a
	2.	2.53	- b	0.29	- b	0.52	- a
	3.	1.81	- b	0.23	- b	0.31	- a

In Instrumental Methods for the Analysis and Identification of Bioactive Molecules; Jayprakash, et al.; ACS Symposium Series; American Chemical Society: Washington, DC, 2014.

Compound	Sample series	Repeatability of analysis (n = 3) and infusions (n = 5), SD (mg/g)					
		LC/MS	CE	LC/MS	Analysis, CE	Infusion, LC/MS	Infusion, CE
Caffeic acid	1.	0.23	0.28	0.02	0.04	0.02	0.06
	2.	0.39	0.32	0.03	0.08	0.08	0.04
	3.	0.15	0.20	0.01	0.01	0.02	0.10
p-Coumaric acid	1.	0.11	- a	0.02	- a	0.02	- a
	2.	0.15	- a	0.01	- a	0.03	- a
	3.	0.04	- a	0.01	- a	0.01	- a
Ferulic acid	1.	0.19	0.33	0.02	0.04	0.02	0.05
	2.	0.22	0.43	0.03	0.04	0.04	0.25
	3.	0.08	0.18	0.02	0.05	0.01	0.07
Isoquercitrin	1.	1.14	1.64	0.03	0.03	0.19	0.16
	2.	1.15	1.80	0.05	0.25	0.22	0.30
	3.	0.41	0.66	0.01	0.03	0.29	0.31
Rutin	1.	26.38	17.46	0.65	0.65	3.24	1.01
	2.	25.65	21.59	0.42	0.27	4.84	1.95
	3.	16.56	12.83	0.72	0.27	1.47	0.74

Continued on next page.



**Table IV. (Continued). Results of the Quantitative Analysis of Sambucus nigra L. Infusions**

Compound	Sample series	Average concentration, (mg/g)			Repeatability of analysis (n = 3) and infusions (n = 5), SD (mg/g)		
		LC/MS	CE	LC/MS	Analysis, CE	Infusion, LC/MS	Infusion, CE
Hesperidin	1.	10.15	- a	0.53	- a	1.55	- a
	2.	10.24	- a	0.56	- a	1.85	- a
	3.	6.56	- a	0.54	- a	0.59	- a
Kaempferol-3-O-rutinoside	1.	0.78	3.21 c	0.04	0.04 c	0.13	0.18 c
	2.	0.83	4.20 c	0.04	0.07 c	0.17	0.30 c
	3.	0.36	3.28 c	0.03	0.04 c	0.04	0.21 c
Isorhamnetin-3-O-glucoside	1.	1.03	0.89	0.01	0.02	0.19	0.09
	2.	1.15	1.34	0.03	0.07	0.23	0.29
	3.	0.59	0.69	0.02	0.07	0.12	0.20
Isorhamnetin-3-O-rutinoside	1.	2.52	- c	0.06	- c	0.40	- c
	2.	2.95	- c	0.05	- c	0.61	- c
	3.	2.71	- c	0.15	- c	0.38	- c
Naringenin	1.	0.83	0.92	0.05	0.04	0.17	0.07
	2.	1.00	1.08	0.05	0.06	0.20	0.09
	3.	0.50	0.61	0.03	0.04	0.08	0.11

<sup>a</sup> The concentration of the compound is below the detection limit of the method. <sup>b</sup> The sum of the crypto- and neochlorogenic acid was determined. <sup>c</sup> The sum of the kaempferol-3-O-rutinoside and isorhamnetin-3-O-rutinoside was determined.

In Instrumental Methods for the Analysis and Identification of Bioactive Molecules; Jayprakash, et al.; ACS Symposium Series; American Chemical Society: Washington, DC, 2014.

For the liquid chromatography-tandem mass spectrometry method, the calibration data can be considered linear for most of the compounds, at least in the range of three orders of concentration. The coefficients of determination of the linear regression of the data are higher than 0.99 for all compounds. The hypothesis that the intercepts of the calibration curves are statistically insignificant was tested using Student's *t*-test. The calibration curves can be reasonably assumed to pass through zero for almost all tested compounds as the statistical *p*-values of the intercepts at the 95 % significance level is higher than 0.05. The intercepts are statistically significant only for hesperidin, hesperetin and kaempferol. The limits of detection calculated as the concentration yielding signal-to-noise ratio equal to three are between 0.04 and 50 ng/mL. The sensitivity of the method, i.e. the slope of the calibration equations is slightly higher for the phenolic acids and flavonoid aglycones than for flavonoid glycosides. It can be probably attributed to the facile ionization of the carboxylic groups of the acids and hydroxyl-groups presented on the flavonoid skeleton, rather than the hydroxyls in the sugar moieties.

The developed capillary electrophoretic method uses the UV detection, which has narrower linearity range in comparison to the mass spectrometric detection. The utilization of the separation capillary with extended light path detection cell, however, improves the detection sensitivity and increases the linear dynamic range in comparison to the ordinary fused silica capillaries. The electrophoretic calibration data can be considered linear in the range of two-orders of the concentrations (generally in the range of 0.5 – 100 µg/mL) and the limits of detection are in the range of tenths of µg/mL (Table III). The limits of detection for the developed method are slightly lower and the sensitivity (i.e. the slope of the calibration curves) is approximately four times higher in comparison to the values presented for our recently published electrophoretic method employing 25 µm i.d. capillary with detection cell extended to 125 µm (28). The lower limits of detection and higher sensitivity of current method can be probably attributed to the higher injected sample volume and also to the increased internal diameter of the separation capillary including detection cell diameter in current method (50 µm i.d. extended to 150 µm in the cell compared to 25 µm i.d. extended to 125 µm). The coefficients of determination were higher than 0.995 for most of the compounds. Among the tested compounds, the intercept of the linear calibration equation was statistically significant only for chlorogenic acid, which was indicated with the *p*-value of 0.042 lower than critical value 0.05.

The three series of the *Sambucus nigra* L. infusions were quantitatively analyzed using developed methods. Using these results, we have studied the effects of the preparation of infusion and sample type on the content of polyphenolic compounds. Moreover, we have compared both methods developed for quantitative analysis of polyphenolic compounds in terms of the determined concentrations and repeatability of the analyses. Thus three series of the elderflower infusions were prepared. The first and the second series of infusions were prepared from the same batch of herbal tea. In the first series, the infusions were prepared from the adjusted tea bags, while in the second series twenty tea bags were opened and mixed together and the appropriate amount of the elderflower was taken for the preparation of infusion. The third series of

infusions was prepared from air-dried wild growing elderflower. The results of the quantitative analysis are presented in Table IV. The determined concentrations of the polyphenolic compounds were related to the 1 g of the dry elderflower.

The polyphenolic profile of the *Sambucus nigra* L. infusions determined by both methods is consistent with the literature (2, 18). In particular, the highest content of chlorogenic acid and rutin were observed followed with the other polyphenolic compounds, but the exact concentrations are strongly dependent on the extraneous influences (e.g. cultivar, place of origin, treatment of the sample) (6). For example, the concentrations of flavonoids and their glycosides determined in inflorescence samples of *Sambucus nigra* L. presented by Barros et al. are in agreement with our presented results, however, the concentration levels of phenolic acids (especially isomers of chlorogenic acid) determined in our work are significantly higher (2). For both methods, the repeatability of the analyses represented by the relative standard deviations of concentrations is lower than 5 % for the most of the compounds. The deviations between the infusions are significantly higher, ranging from 5 % to 25 % for liquid chromatographic method and up to 50 % for electrophoretic method. To reveal the significant differences between the analyses of infusions and the method used, a two-way ANOVA was performed for each analyte. The results of the analysis of variance showed that in most cases the differences between the consecutive analyses of each infusion are not statistically significant. Also the differences between the infusions within the series of elderflower samples were not significant for the most of the compounds, however, the standard deviations are higher, than for the consecutive analyses of each infusion. The most important differences were however discovered between the applied methods, especially for the compounds with higher abundance in the samples (chlorogenic acid, rutin).

To further compare the results obtained using both liquid chromatographic and capillary electrophoretic methods, the correlation plots of the determined concentrations were constructed. The plots are shown in Figure 3. As can be seen from the higher part of the figure, the coefficient of determination 0.89 indicated, that the concentrations determined using both methods are correlated. The slope of the regression line is however significantly lower than one, which would be expected if both methods provided the same results. The bottom part of Figure 3 represents the regression line fitted to the concentration data of less abundant polyphenolic compounds. The slope of the regression line for less abundant compounds is not significantly different from one and the correlation coefficient is higher than in the previous case. One of the possible sources of the differences between the concentrations of the most abundant polyphenols (rutin, chlorogenic acid) presented in elderflower samples determined using liquid chromatography and capillary electrophoresis can be attributed to ionization suppression in the mass spectrometric detection (29, 30). These matrix effects can play a significant role, especially when the compounds of interest coelute with other compounds, which is the case for rutin, isoquercitrin and hesperidin. To confirm the accuracy of the presented methods, analysis of certified reference material is required, which is not readily available for the herb matrices.

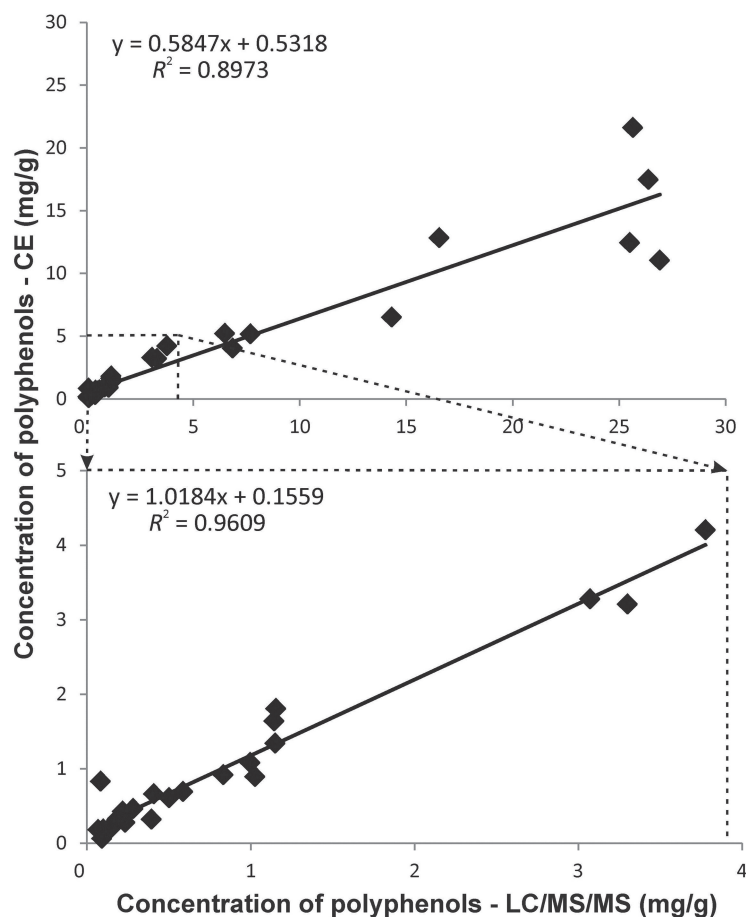


Figure 3. Correlation of the concentrations of polyphenolic compounds in *Sambucus nigra* L. infusions determined by liquid chromatography-tandem mass spectrometry method and capillary electrophoretic method.

## Conclusions

In the present work, two methods for the characterization of *Sambucus nigra* L. infusions have been developed. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry and capillary electrophoresis with UV detection have been used for the separation and quantification of 18 polyphenolic compounds including phenolic acids, flavonoid aglycones and glycosides. The quantitative results of both methods were compared and the effects of the samples' nature and sample preparation were evaluated. Statistically significant differences were found between the concentrations of the most abundant polyphenolic compounds

determined using both methods, however, a high correlation between the results was obtained for the compounds presented in elderflower infusions at lower concentration levels.

## References

1. Kite, G. C.; Larsson, S.; Veitch, N. C.; Porter, E. A.; Ding, N.; Simmonds, M. S. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61*, 3501–3508.
2. Barros, L.; Duenas, M.; Carvalho, A. M.; Ferreira, I. C. F. R.; Santos-Buelga, C. *Food Chem. Toxicol.* **2012**, *50*, 1576–1582.
3. Scopel, M.; Mentz, L. A.; Henriques, A. T. *Planta Med.* **2010**, *76*, 1026–1031.
4. Huck, C. W.; Buchmeiser, M. R.; Bonn, G. K. *J. Chromatogr. A* **2001**, *943*, 33–38.
5. Rieger, G.; Müller, M.; Guttenberger, H.; Bucar, F. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 9080–9086.
6. Christensen, L. P.; Kaack, K.; Fretté, X. C. *Eur. Food Res. Technol.* **2008**, *227*, 293–305.
7. Dawidowicz, A. L.; Wianowska, D.; Gawdzik, J.; Smolarz, D. H. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2003**, *26*, 2381–2397.
8. Dawidowicz, A. L.; Wianowska, D.; Baraniak, B. *LWT* **2006**, *39*, 308–315.
9. Pietta, P.; Bruno, A.; Mauri, P.; Rava, A. *J. Chromatogr.* **1992**, *593*, 165–170.
10. Gouveia, S. C.; Castilho, P. C. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2010**, *24*, 1851–1868.
11. Gouveia, S. C.; Goncalves, J.; Castilho, P. C. *Ind. Crop. Prod.* **2013**, *42*, 573–582.
12. Chrubasik, C.; Maier, T.; Dawid, C.; Torda, T.; Schieber, A.; Hofmann, T.; Chrubasik, S. *Phytother. Res.* **2008**, *22*, 913–918.
13. Lin, L. Z.; Harnly, J. M. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 1084–1096.
14. Celik, S. E.; Özyürek, M.; Güclü, K.; Capanoglu, E.; Apak, R. *Phytochem. Anal.* **2014**, *25*, 147–154.
15. Barros, L.; Cabrita, L.; Vilas Boas, M.; Carvalho, A. M.; Ferreira, I. C. F. R. *Food Chem.* **2011**, *127*, 1600–1608.
16. Seitz, U.; Bonn, G.; Oefner, P.; Popp, M. *J. Chromatogr.* **1991**, *559*, 499–504.
17. Seitz, U.; Oefner, P. J.; Nathakarnkitkool, S.; Popp, M.; Bonn, G. K. *Electrophoresis* **1992**, *13*, 35–38.
18. Urbánek, M.; Pospíšilová, M.; Poláček, M. *Electrophoresis* **2002**, *23*, 1045–1052.
19. Česla, P.; Hájek, T.; Jandera, P. *J. Chromatogr. A* **2009**, *1216*, 3443–3457.
20. Tranchida, P. Q.; Donato, P.; Cacciola, F.; Beccaria, M.; Dugo, P.; Mondello, L. *TRAC-Trends Anal. Chem.* **2013**, *52*, 186–205.
21. Jandera, P.; Hájek, T.; Staňková, M.; Vyňuchalová, K.; Česla, P. *J. Chromatogr. A* **2012**, *1268*, 91–101.
22. Willemse, C. M.; Stander, M. A.; de Villiers, A. *J. Chromatogr. A* **2013**, *1319*, 127–140.
23. Česla, P.; Fischer, J.; Jandera, P. *Electrophoresis* **2010**, *31*, 2200–2210.

24. Guiochon, G.; Gritti, F. *J. Chromatogr. A* **2011**, *1218*, 1915–1938.
25. March, R. E.; Miao, X. S. *Int. J. Mass Spectrom.* **2004**, *231*, 157–167.
26. Váňová, J. M.S. Thesis, University of Pardubice, Pardubice, Czech Republic, 2012.
27. Váňová, J.; Česla, P.; Fischer, J.; Jandera, P. In *CECE 2012 9<sup>th</sup> International Interdisciplinary Meeting on Bioanalysis*; Foret, F., Křenková, J., Guttman, A., Klepárník, K., Boček, P., Eds.; Publisher: Brno, Czech Republic, 2012; pp 193–199.
28. Česla, P.; Fischer, J.; Jandera, P. *Electrophoresis* **2012**, *33*, 2464–2473.
29. Taylor, P. J. *Clin. Biochem.* **2005**, *38*, 328–334.
30. Gosetti, F.; Mazzucco, E.; Zampieri, D.; Gennaro, M. C. *J. Chromatogr. A* **2010**, *1217*, 3929–3937.

**Development of Micellar Electrokinetic Chromatographic Method for  
Determination of Polyphenols in Elder Infusions**

**Váňová J., Česla P., Česlová L., Fischer J.**

*Chemické listy 108 (2014) S192-S196*

## DEVELOPMENT OF MICELLAR ELECTROKINETIC CHROMATOGRAPHIC METHOD FOR DETERMINATION OF POLYPHENOLS IN ELDER INFUSIONS

JANA VÁŇOVÁ, PETR ČESLA, LENKA ČESLOVÁ, and JAN FISCHER

University of Pardubice, Faculty of Chemical Technology,  
Department of Analytical Chemistry, Studentská 573, 532  
10 Pardubice, Czech Republic  
jana.vanova@student.upce.cz

Keywords: micellar electrokinetic chromatography,  
phenolic acids, flavonoids, elderflower

### Abstract

A method for determination of 18 flavonoid aglycones, glycosides and phenolic acids using micellar electrokinetic chromatography has been developed. Sodium decyl sulphate was used as pseudostationary phase at the concentration of 36 mmol L<sup>-1</sup> and addition of cyclodextrins up to the 5 mmol L<sup>-1</sup> was tested for improvement of the separation of isomeric compounds. In the electrolyte containing heptakis(2,6-di-*O*-methyl)- $\beta$ -cyclodextrin, three isomers of chlorogenic acid (chlorogenic, neo- and cryptochlorogenic acid) were successfully baseline separated. The quantitative parameters of the method were determined including limits of quantification, which were in the range of 0.15–1.4  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , together with the linearity of calibration curves. The method was successfully applied for the analyses of water infusions of elderflower samples and the statistically significant differences were found between the concentrations of polyphenols depending on the sample harvest location.

### Introduction

Micellar electrokinetic chromatography is a powerful tool for separation of mixtures of charged and neutral molecules. Separation of neutral molecules is possible due to their different distribution coefficients between micelles and a running buffer<sup>1</sup>. Micelles of a surfactant (at higher concentration than the critical micelle concentration) used in micellar electrokinetic chromatography form pseudostationary phase. Micellar electrokinetic chromatography is usually carried out in non-coated fused silica capillaries with sodium decyl-, dodecyl- and tetradecyl sulphate as a micellar agent. In this work, micellar electrokinetic chromatography with sodium decyl sulphate was used for the quantification of antioxidants in elderflower infusions.

Elder (*Sambucus nigra* L.) is a shrub growing in almost all Europe. Elder is rich source of flavonols, phenolic acids, anthocyanins, carotenoids, vitamins and minerals<sup>2</sup>. Bioactive compounds from berries and flowers of elder have potent antioxidant, anticancer, antimicrobial and anti-inflammatory properties<sup>3</sup>. Flowers and fruits of elderberry are used in many ways such as food and as a medicine. Extracts of elderflowers are used for treatment of cold, fever and sinusitis<sup>4</sup>. They are used for their diuretic and perspiratory properties. Compounds in elderflowers and berries can play an important role in the prevention of oxidation and cellular inhibition or delaying the oxidative processes<sup>5</sup>. Polyphenols are secondary products of plant metabolism and contain multiple phenol structural units<sup>6</sup>. The group of 18 polyphenols including aglycones and glycosides flavonoids and phenolic acids was used as the standards and the method for their determination in elderflower infusions has been developed in the present work.

### Experimental

#### Chemicals

Standards of flavonoids aglycones (hesperetin, kaempferol, naringenin, quercetin), flavonoids glycosides (hesperidin, isoquercitrin, kaempferol-3-*O*-rutinoside, rutin), phenolic acids (caffeic acid, chlorogenic acid, cryptochlorogenic acid, ferulic acid, gallic acid, neochlorogenic acid, *p*-hydroxybenzoic acid, *p*-coumaric acid), electrolyte components (boric acid, sodium tetraborate, sodium decyl sulphate, sodium dodecyl sulphate,  $\beta$ -cyclodextrin, heptakis(6-*O*-sulfo)- $\beta$ -cyclodextrin and heptakis(2,6-di-*O*-methyl)- $\beta$ -cyclodextrin) were purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). Standards of isorhamnetin-3-*O*-rutinoside and isorhamnetin-3-*O*-glucoside were obtained from Extrasynthese (Genay, France). Sodium hydroxide and thiourea were purchased from LachNer (Neratovice, Czech Republic). Deionized ultra-pure water was prepared by Ultra CLEAR UV apparatus (SG, Hamburg, Germany).

#### Micellar electrokinetic chromatography

Micellar electrokinetic chromatography was carried out using Agilent CE 7100 capillary electrophoresis instrument (Agilent, Palo Alto, CA, USA) in bare fused silica capillary (50  $\mu\text{m}$  i.d., 48 cm total length, 40 cm length to the detector, 150  $\mu\text{m}$  extended light path cell, Agilent). The new capillary was rinsed with 0.5 mol L<sup>-1</sup> sodium hydroxide and with ultra-pure water (both for 15 minutes) before the first use. Background electrolyte



contained 25 mmol L<sup>-1</sup> borate buffer (pH 9.30) with addition of 36 mmol L<sup>-1</sup> sodium decyl sulphate. The value of pH was measured using Metrohm 827 laboratory pH meter equipped with Unitrode electrode (Metrohm, Herisau, Switzerland). pH meter was calibrated by standard buffer solutions with pH 7.00 and 9.00. Separation was carried out at applied voltage 20 kV and the temperature 20 °C. The samples were injected hydrodynamically by applying pressure of 100 mbar for 10 s at the vial with the sample. The detection wavelengths were set to 214, 254 and 280 nm.

### Calibration

Seven calibration solutions used for the quantitative analysis were prepared in the concentration range of 0.5–200 µg mL<sup>-1</sup> for each compound. All calibration solutions were analyzed in triplicate. The calibration solutions with concentrations of standards 0.5, 10 and 100 mg mL<sup>-1</sup> were measured five times. The calibration curves were evaluated by Statistica 10 software (StatSoft, Inc., 2011). The limit of quantification was calculated using the equation:

$$LOQ = \frac{10 * h}{s} \quad (1)$$

where  $h$  is standard deviation of noise signal and  $s$  is slope of the calibration curves of the dependencies of zone height on the concentration of the standards.

### Elderflower infusions analysis

Three series of elderflower infusions were analyzed. At first series of samples, five infusions were prepared from five elderflower tea bags from MEGAFYT Pharma. The second series was prepared by homogenization of twenty tea bags from MEGAFYT Pharma, too. The third series was prepared from air-dried wild growing elder collected in Veltruby, Czech Republic (location 50° 4.3219' N, 15° 10.8356' E) on June 2013.

The infusions were prepared by keeping the bags or dried elderflowers in 200 mL of 90 °C hot water for 15 minutes and cooling to the laboratory temperature. Before injection the infusions were filtered using syringe 0.45 µm polytetrafluoroethylene filter (Millipore, Bedford, MA, USA).

### Results and discussion

First, the conditions of analysis of phenolic acids and flavonoids using micellar electrokinetic chromatography were optimized. Based on our previous results, application of sodium decyl sulphate in MEKC yielded better resolution than sodium dodecyl sulphate for the analysis of polyphenols<sup>7</sup>. The value of critical micelle concentration of sodium decyl sulphate in borate buffer (pH 9.30) is 25.4 ± 0.9 mmol L<sup>-1</sup> (ref.<sup>8,9</sup>). For the separation of selected antioxidants, the concentration of 36 mmol L<sup>-1</sup> was selected, which represents concentration of micelles approximately 10 mmol L<sup>-1</sup>. Some pairs of compounds (isorhamnetin-3-*O*-rutinoside and kaempferol-3-*O*-rutino-

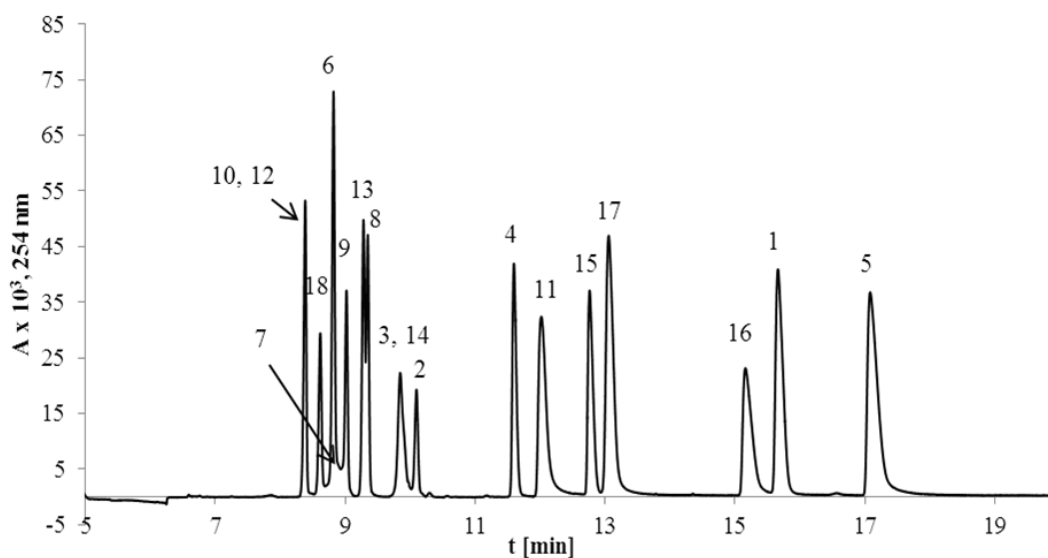


Fig. 1. MEKC separation of polyphenols standards; BGE: 36 mmol L<sup>-1</sup> sodium decyl sulphate, 25 mmol L<sup>-1</sup> borate buffer pH 9.30, for other experimental conditions see Experimental. Compounds: 1 – caffeic acid, 2 – chlorogenic acid, 3 – cryptochlorogenic acid, 4 – ferulic acid, 5 – gallic acid, 6 – hesperetin, 7 – hesperidin, 8 – isoquercitrin, 9 – isorhamnetin-3-*O*-glucoside, 10 – isorhamnetin-3-*O*-rutinoside, 11 – kaempferol, 12 – kaempferol-3-*O*-rutinoside, 13 – naringenin, 14 – neochlorogenic acid, 15 – *p*-coumaric acid, 16 – *p*-hydroxybenzoic acid, 17 – quercetin, 18 – rutin

side, neochlorogenic acid and cryptochlorogenic acid) were not resolved and pair of compounds isoquercitrin/naringenin was partially separated under these conditions (Fig. 1).

To improve the separation selectivity, addition of cyclodextrins to the background electrolyte was tested. Cyclodextrins can selectively form inclusion complexes with hydrophobic part of analyte molecules, while the

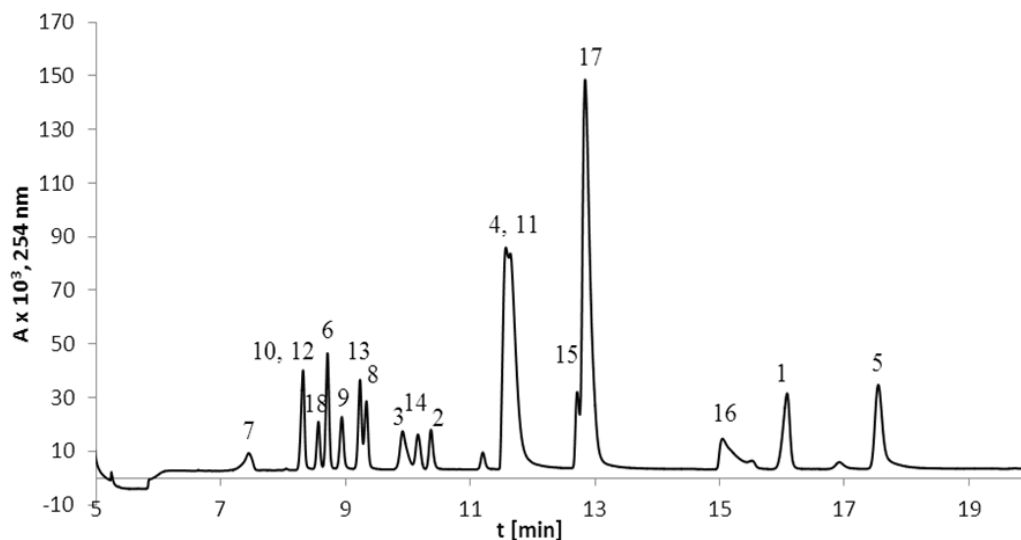


Fig. 2. MEKC separation of polyphenols standards in electrolyte with heptakis(2,6-di-*O*-methyl)- $\beta$ -cyclodextrine; BGE: 36 mmol L<sup>-1</sup> sodium decyl sulphate, 25 mmol L<sup>-1</sup> borate buffer pH 9.30, 5 mmol L<sup>-1</sup> heptakis(2,6-di-*O*-methyl)- $\beta$ -cyclodextrine, for other experimental conditions see Experimental. Compounds: 1 – caffeic acid, 2 – chlorogenic acid, 3 – cryptochlorogenic acid, 4 – ferulic acid, 5 – gallic acid, 6 – hesperetin, 7 – hesperidin, 8 – isoquercitrin, 9 – isorhamnetin-3-*O*-glucoside, 10 – isorhamnetin-3-*O*-rutinoside, 11 – kaempferol, 12 – kaempferol-3-*O*-rutinoside, 13 – naringenin, 14 – neochlorogenic acid, 15 – *p*-coumaric acid, 16 – *p*-hydroxybenzoic acid, 17 – quercetin, 18 – rutin

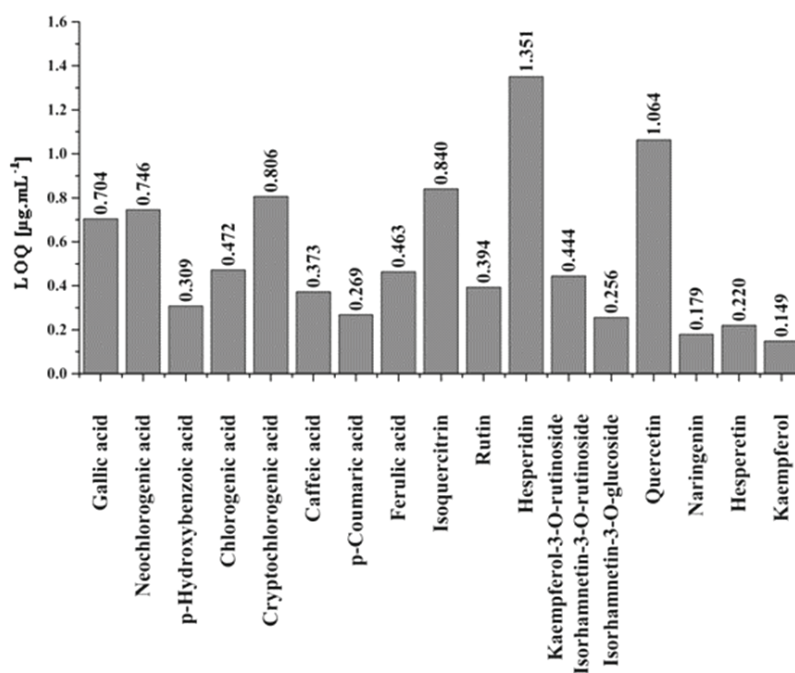


Fig. 3. The values of the limits of quantification

inclusion equilibrium competes with partitioning in micellar phase. Thus  $\beta$ -cyclodextrin, heptakis(2,6-di-*O*-methyl)- $\beta$ -cyclodextrin and heptakis(6-*O*-sulfo)- $\beta$ -cyclodextrin were tested as the additives to the background electrolyte. In background electrolyte with addition of heptakis(2,6-di-*O*-methyl)- $\beta$ -cyclodextrin, the resolution of

cryptochlorogenic and neochlorogenic acids significantly improved, however the resolution of ferulic acid and kaempferol, *p*-coumaric acid and quercetin decreased (Fig. 2). The similar results were observed for other tested cyclodextrins. According to the obtained results, the electrolyte containing 5 mmol L<sup>-1</sup> heptakis(2,6-di-*O*-

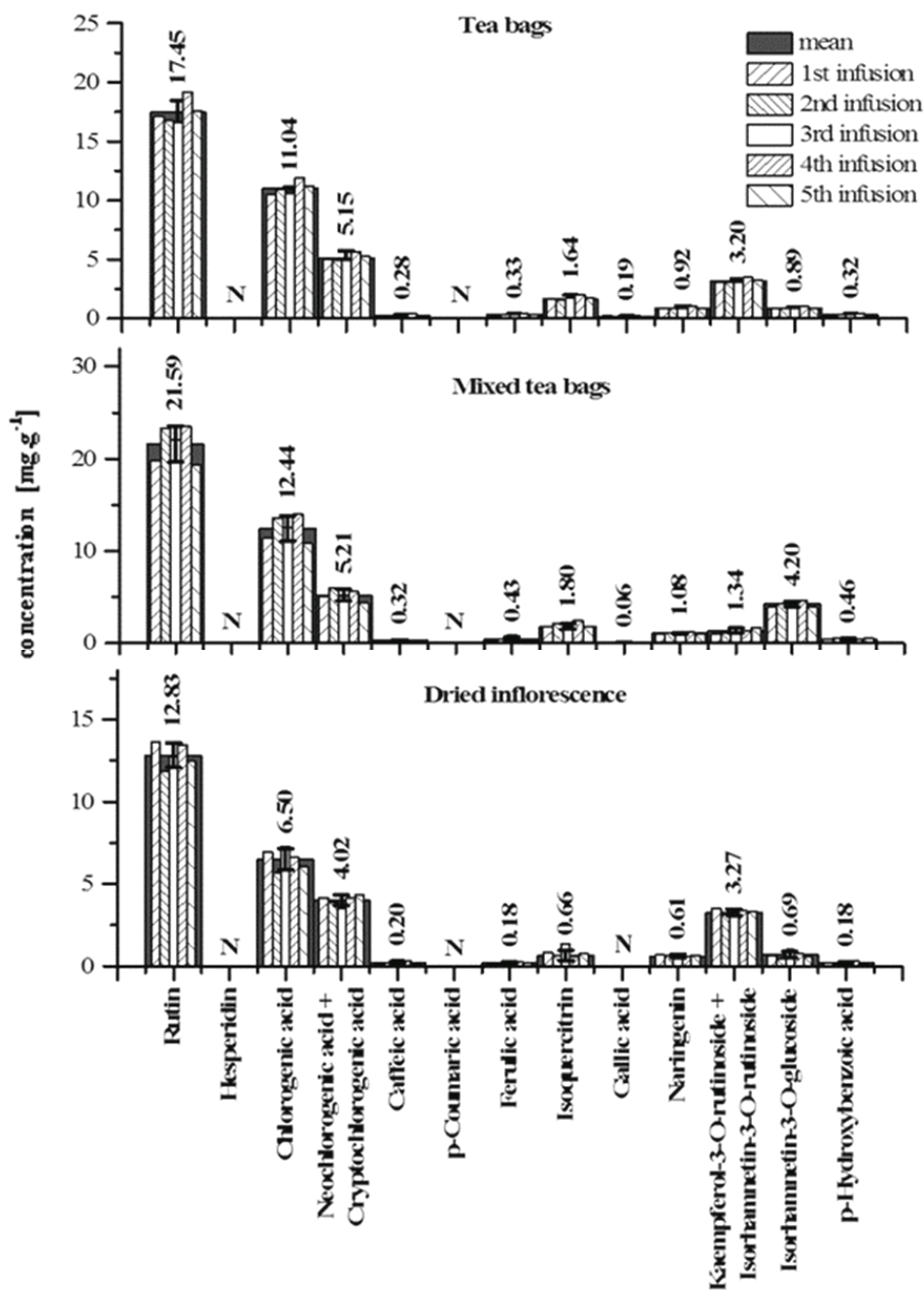


Fig. 4. Results of the quantitative analysis of elderflower infusions; N – the concentration of compounds is below the limit of quantification

methyl)- $\beta$ -cyclodextrin is suitable for analyses of isomers of chlorogenic acid, but for the complex quantitative analyses of polyphenols in elderflower infusions, the electrolyte without cyclodextrins was used.

For the quantitative analyses of polyphenols, the calibration curves were constructed. The coefficients of determination, slopes, intercepts and limits of quantification (Fig. 3) were evaluated from the calibration curves. The coefficients of determination were higher than 0.995 for all analyzed compounds except quercetin. The coefficient of determination for quercetin was 0.9155. The developed method is suitable for quantification of polyphenolic compounds ranging from 0.15  $\mu\text{g mL}^{-1}$  to 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

Results of quantitative analysis of three series of elderflower infusions are presented in the Fig. 4. Five infusions from each series of samples were analyzed, each infusion was measured three times. The values of concentration of some substances are not show because the concentration of hesperidin, *p*-coumaric acid in the samples and gallic acid in the third series of samples represented by air-dried wild-growing *Sambucus nigra* L. is below the limits of quantification. The sum of the concentration of neochlorogenic acid and cryptochlorogenic acid was determined and the sum of the concentration of isorhamnetin-3-*O*-rutinoside and kaempferol-3-*O*-rutinoside was determined.

The polyphenolic profile of all samples of elderflower infusions is similar with the highest concentration of rutin and chlorogenic acid isomers presented in the samples. There are significant differences in the concentrations of lower abundant compounds between the samples. The highest content of polyphenols was observed in mixed tea bags of commercial sample of elder tea, wild-growing elder possess the lowest concentration of polyphenols.

## Conclusion

In the present work, the method for determination of 18 polyphenols including aglycones and glycosides of flavonoids and phenolic acids in elderflower infusions using micellar electrokinetic chromatography with UV detection was developed. The conditions of separation were optimized and the limits of quantification were calculated. The highest concentrations of polyphenols were found in the mixed tea bags, the lowest concentrations of polyphenols were determined in the air-dried wild-growing elderflower infusion. The content of polyphenols strongly depends on the conditions of growing such as climate, soil type, and moisture.

## REFERENCES

1. Salwiński A., Delépée R.: *Talanta* 122, 180 (2014).
2. Sun-Waterhouse D., Jin D., Waterhouse G.: *Food Res. Int.* 54, 781 (2013).
3. Nile S. H., Park S. W.: *Nutrition* 30, 134 (2014).
4. Kite G. C., Larsson S., Veitch N. C., Porter E. A., Ding N., Simmonds M. S. J.: *Agric. Food Chem.* 61, 3501 (2013).
5. Hurtado-Fernández E., Gómez-Romero M., Carrasco-Pancorbo A., Fernández-Gutiérrez A.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 53, 1130 (2010).
6. Yang Z.-F., Bai L.-P., Huang W.-b., Li X.-Z., Zhao S.-S., Zhong N.-S., Jiang Z.-H.: *Fitoterapia* 93, 47 (2014).
7. Váňová J., Česla P., Fischer J., *Chem. Listy* 107, S465 (2013).
8. Váňová J., Česla P., Fischer J., Jandera P.: *CECE 2012 9<sup>th</sup> International Interdisciplinary Meeting on Bioanalysis*; (Foret F., Křenková J., Guttman A., Klepárník K., Boček P., Eds.); Publisher: Brno, Czech Republic, 193-199 (2012).
9. Váňová J.: *M.S. Thesis*, University of Pardubice, Pardubice, Czech Republic (2012).