

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

**Fakulta přírodovědecká
Katedra analytické chemie**



**ANALÝZA FYZIOLOGICKY AKTIVNÍCH LÁTEK
V ROSTLINNÉM MATERIÁLU**

DISERTAČNÍ PRÁCE

2012

Kateřina Vítková

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

**Fakulta přírodovědecká
Katedra analytické chemie**

**ANALÝZA FYZIOLOGICKY AKTIVNÍCH LÁTEK
V ROSTLINNÉM MATERIÁLU**

DISERTAČNÍ PRÁCE

Autor práce:

RNDr. Kateřina Vítková

Studijní obor:

Analytická chemie

Vedoucí disertační práce:

doc. RNDr. Lubomír Čáp, CSc.

Odborný konzultant:

RNDr. Jan Petr, Ph.D.

Olomouc 2012

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou v seznamu použité literatury. Souhlasím s tím, že je práce prezenčně zpřístupněna v knihovně Katedry analytické chemie, Přírodovědecké fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne 24. dubna 2012

.....
RNDr. Kateřina Vítková

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat vedoucímu práce doc. Čápovi za jeho vedení, odborné připomínky a schovívavost při řešení některých náročných úkolů disertační práce. Dále bych chtěla poděkovat odbornému konzultantovi dr. Petrovi za trpělivost a jeho rady a pak všem členům laboratoří Katedry analytické chemie PřF UP Olomouc, zejména doc. Bartákovi, prof. Ševčíkovi, dr. Maierovi a dr. Rancovi za jejich pomoc při řešení této práce a vytvoření přátelské atmosféry na pracovišti.

Dále bych ráda poděkovala za finanční podporu při řešení této disertační práce Výzkumnému záměru MŠMT č. MSM6198959216 a grantu GA ČR č. 203/07/P233.

Abstrakt

Tato práce se dotýká analýzy fyziologicky aktivních látek, konkrétně zástupce skupiny alkaloidů a vybraných fenolických kyselin v rostlinném materiálu. První část disertační práce se zabývá analýzou yohimbinu v léčivých přípravcích na bázi extraktů rostlinného materiálu pomocí micelární elektrokinetické chromatografie. Druhá část disertační práce se zabývá analýzou vybraných fenolických kyselin ve vzorcích majoránky zahradní. Byl optimalizován postup extrakce pomocí vysokotlaké extrakce rozpouštědlem, která byla srovnávána se Soxhletovou extrakcí a výtěžnosti porovnávány pomocí GC/MS techniky. Po optimalizaci extrakce byla vyvinuta metoda analýzy těchto fenolických kyselin pomocí kapilární elektroforézy s on-line elektrokinetickou prekoncentrací. V poslední části práce pak byla on-line elektrokinetická akumulace dále inovována pomocí použití částečně nevodných prostředí v dávkovacím elektrolytu, kdy bylo dosaženo prekoncentračních faktorů v řádu několika desítek tisíc a limitů detekce v řádu nmol/l. Prezentované metody a postupy analýzy fyziologicky aktivních látek v rostlinném materiálu ukazují možnosti kapilární elektroforézy jako alternativní techniky k chromatografickým technikám.

Abstract

This work is dedicated to the analysis of physiologically active compounds, specifically a representative compound of alkaloids and some phenolic acids in plant materials. In the first part, yohimbin was analyzed in pharmaceutical formulas based on extracts of a plant material by micellar electrokinetic chromatography. In the second part of the thesis, some phenolic acids were analyzed in *Majorana hortensis* samples. An extraction process by means of pressurized solvent extraction was optimized and compared with the Soxhlet extraction. Recoveries were compared by using a GC/MS technique. Then a method for analysis of these compounds by capillary electrophoresis with on-line electrokinetic preconcentration was developed. Finally, the on-line electrokinetic preconcentration (accumulation) was improved by using partially non-aqueous injection electrolytes. It led to more than 70,000-fold preconcentration factors with limits of detection in the range on nmol/L. The developed methods of analysis of physiologically active compounds in plant materials show that the capillary electrophoresis represents an easy alternative to common chromatography techniques.

Seznam zkratek

GC	plynová chromatografie
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
NMR	nukleární magnetická rezonance
MS	hmotnostní spektrometrie
L-L extrakce	extrakce kapalina – kapalina
CE	kapilární elektroforéza
EOF	elektroosmotický tok
CTAB	cetyltrimethylammonium bromid
DDAB	didodecyldimethylammonium bromid
CZE	kapilární zónová elektroforéza
CITP	kapilární izotachoforéza
CGE	kapilární gelová elektroforéza
CIEF	kapilární izoelektrická fokusace
MEKC	micelární elektrokinetická chromatografie
LE	vedoucí elektrolyt
TE	koncový elektrolyt
ITP	izotachoforéza
ACE	afinitní kapilární elektroforéza
NACE	kapilární elektroforéza v nevodných elektrolytech
SPE	mikroextrakce tuhou fází
tITP	přechodná izotachoforéza
CCD	bezkontaktní vodivostní detektor
DAD	detektor s diodovým polem
SDS	dodecylsulfát sodný
PSE	vysokotlaká extrakce rozpouštědlem
TMS deriváty	trimethylsilyl deriváty
PEP	fosfoenolpyruvát
NADPH	nikotinamidadeninukleotid fosfát
PAL	fenylalaninamoniaklyáza
CA4H	cinamát-4-hydroxyláza

Obsah práce

1	Úvod	1
2	Teoretická část	2
2.1	Analýza přírodních látek	2
2.2	Analýza fyziologicky aktivních látek v rostlinném materiálu	4
2.3	Techniky pro analýzu fyziologicky aktivních látek v rostlinném materiálu	6
2.4	Kapilární elektroforéza	7
3	Cíle práce	19
4	Experimentální část	20
5	Výsledky a diskuse	26
5.1	Stanovení yohimbinu micelární elektrokinetickou chromatografií	26
5.2	On-line elektrokinetická prekoncentrace fenolických kyselin	32
6	Závěry	52
7	Literatura	53
8	Přílohy	57

1 Úvod

Analytická chemie je vědní odvětví, které primárně odpovídá na otázky: „Jaké sloučeniny jsou ve vzorku?“ a „Jaké množství dané sloučeniny je ve vzorku?“. Řeší tedy otázky kvalitativní analýzy případně identifikace látek a otázky kvantitativní analýzy. Z pohledu spíše populárního se s analytickou chemií setkáváme každý den například ve formě naší smyslové analýzy potravin. Řízek s bramborovým salátem hodnotíme jak kvalitativně, tj. jestli obsahuje např. mrkev, vejce nebo sůl, tak kvantitativně, tj. jestli např. soli není málo nebo naopak příliš mnoho. Na základě těchto poznatků pak rozhodneme, jestli nám řízek se salátem chutnal či nikoliv. Podobnou roli má i vlastní analytická chemie, většinou napomáhá nějakému rozhodnutí, např. o kvalitě výrobku nebo přítomnosti nemoci. Celkem zásadní je v tomto případě i další pohled. Pokud „analyzuji“ sůl svými smysly (chutí), tak je jistě rozdíl ochutnám-li sůl samostatně nebo v bramborovém salátu. Tato celkem jednoduchá věc, kterou zná i malé dítě, je základem matricových efektů. Ukazuje, že je poměrně velký rozdíl mezi analýzou látek samostatně (standardů) a látek přítomných v nějaké složité směsi nebo matici. Taková analýza je ve většině případů daleko náročnější a vyžaduje komplexnější přístup.

V této práci jsem se zaměřila na analýzu dvou skupin fyziologicky aktivních látek, alkaloidů a fenolických kyselin, z rostlinného materiálu. V prvním případě se jednalo o analýzu alkaloidu yohimbinu v připraveném farmaceutickém preparátu a v druhém případě se jednalo o vývoj metody pro separaci a stanovení vybraných fenolických kyselin v extraktu majoránky.

2 Teoretická část

2.1 Analýza přírodních látek

Analýza přírodních látek patří mezi důležité úkoly současné analytické chemie, což může být dokumentováno mnoha aplikacemi, např. přírodní látky se dnes využívají v medicíně pro léčbu různých chorob, dále se používají jako důležité potraviny, jako potravinové doplňky s různým nutričním efektem apod. [1]. Jejich sledování v přírodě, v organismech, v potravinách pak hraje nezastupitelnou roli v dalších oblastech jak výzkumu, tak aplikací. Jelikož se ve všech případech může jednat (a často se jednoznačně jedná) o složité směsi, je nasnadě, že analýza těchto látek vyžaduje komplexní přístupy.

V případě analýzy několika málo látek, např. již určených markerů kvality potravin, různých chorob apod., vyžaduje analytický přístup vysoce selektivní metodu, která bude poskytovat přesné a jednoznačné výsledky, často i ve spojení s nutností automatizace. Za tímto účelem se často využívají tzv. bioanalytické techniky, především pak imunoanalytické techniky založené na vysoce selektivní interakci protilátky a antigenu nebo techniky využívající enzymů, jejichž selektivita je dána enzymovou reakcí [2]. Druhý případ analýzy v sobě zahrnuje nutnost identifikace a následného stanovení značného množství látek, někdy až v řádu tisíců individuů (např. v případě analýzy pesticidů nebo polychlorovaných derivátů organických látek). Tento druhý případ logicky vyžaduje použití vysoce účinné separační metody, ideálně ve spojení se silným identifikačním nástrojem [3]. V současnosti se pro tyto účely studuje využití vysoce účinných dvojdimenzionálních separačních technik plynové a kapalinové chromatografie (GCxGC, 2D-HPLC) ve spojení s hmotnostní spektrometrií (MS) [4] nebo tandemu hmotnostní spektrometrie a nukleární magnetické rezonance (NMR) [5]. Takto složité systémy jsou samozřejmě poměrně ekonomicky náročné jak na vlastní provoz, tak i z pohledu vstupní investice. Navíc vyžadují i komplexní přístup v oblasti interpretace výsledků a ve většině případů i složitý matematický aparát. Nicméně tyto techniky poskytují v současnosti asi nejkompaktnější pohled na danou problematiku.

V předchozím odstavci byly naznačeny dva krajní případy, analýza jedné látky pomocí imunoanalytické techniky a analýza tisíců látek pomocí 2D-HPLC/MS/NMR. Avšak v praxi je často potřeba analyzovat vhodnou skupinu látek, např. pesticidy diquat a paraquat nebo vybrané fenolické látky ve vodách. Takto vybraná skupina látek se pak analyzuje většinou z důvodů definovaných zadavatelem analýz, resp. z hlediska jejich relevance např. v oblasti chemie potravin, životního prostředí, medicínální chemie apod. Omezení skupiny analyzovaných látek na několik chemických individuů navíc umožňuje využít jiné a mnohdy levnější přístupy analýzy, což je především z pohledu praxe vysoce žádaný postup.

Naznačené omezení počtu analyzovaných látek nicméně stále vyžaduje použití separační techniky ať již z důvodu nutnosti oddělení jednotlivých látek dané směsi, tak z důvodů oddělení této skupiny látek od složité matrice. Velmi často se pak používá dvou separačních kroků, v prvním kroku se analyzovaná skupina látek oddělí od matrice, např. v případě analyzování pesticidů v rostlinném materiálu se použije extrakce kapalina – kapalina (L – L extrakce), a v druhém kroku se již separují jednotlivé komponenty dané skupiny případně i podobné látky pocházející opět z matrice, v případě analytiky pesticidů může jít o analyzování organické fáze z L-L extrakce pomocí techniky GC/MS [6, 7].

Výběr vhodné analytické techniky pak závisí od charakteru studované skupiny látek. Přírodní látky představují velkou skupinu látek rozmanitého charakteru od méně polárních látek typu lipidů nebo terpenů po látky vysoce polární typu sacharidů nebo hydroxylovaných jednoduchých organických kyselin jako je například kyselina jablečná [1, 8]. Lze analyzovat malé ionty mající důležitou roli v metabolických drahách (např. K^+ , Mg^{2+}) [9], ale i biopolymery o relativní molekulové hmotnosti v řádu desítek tisíc (např. regulační proteiny, nukleové kyseliny) [10]. Látky přírodního charakteru mohou být rovněž bazické nebo kyselé povahy, kde mohou být příkladem nízkomolekulární organické kyseliny vyskytující se v rostlinách nebo naopak některé bazické alkaloidy (odtud rovněž historicky pochází název alkaloidy, tj. látky bazické povahy, ačkoliv některé alkaloidy nejsou bazické povahy) [1, 11]. Všechny tyto skutečnosti pak hrají roli ve výběru vhodné analytické techniky.

2.2 Analýza fyziologicky aktivních látek v rostlinném materiálu

Fyziologicky aktivní sloučeniny, které se vyskytují v rostlinách, představují rozmanitou skupinu látek opět od jednoduchých molekul typu anorganických i organických iontů po biomakromolekuly typu proteinů, peptidů, nukleových kyselin apod. Každá taková látka pak hraje významnou roli v rostlinách, jejich metabolismu, životnímu cyklu či reprodukci. Přehled některých významných skupin látek a jejich účinku v rostlinách přináší tabulka 1.

Tabulka 1: Přehled některých významných skupin látek v rostlinném materiálu

typ látky	příklady	citace
organické kyseliny	fenolické kyseliny, aminokyseliny	[12, 13]
alkoholy, aldehydy a ketony	jasmonáty, lignin, fenolické látky, polyfenoly	[14, 15]
alkaloidy	pyrrolizidinové alkaloidy, steroidní alkaloidy, berberinové alkaloidy, akonitinové alkaloidy, yohimbin	[16, 17]
kumaríny	kumaríny a jejich deriváty a glykosidy (bergaptol apod.)	[18, 19]
fenoly a jejich deriváty	flavonoidy, fenolické kyseliny, icariin, kurkumin a jeho deriváty	[20, 21]
chinony a xanthony	chinony, mangiferin, eleutherin a jeho deriváty, amarogentin	[22]
terpeny	ginsenosidy, diterpeny, triterpeny, atractylosid	[23]

V rámci tématu této disertační práce se budu soustředit především na skupinu alkaloidů a látek fenolické povahy.

Kromě výše uvedeného lze analýzu fyziologicky aktivních látek v rostlinném materiálu charakterizovat i z pohledu aplikačního. Aplikace se pak dotýkají především tří oblastí:

- (a) fytochemie a fytochemie (chemie a biochemie rostlin),
- (b) farmaceutické chemie a farmakologie (využití rostlin jako léčiv),
- (c) potravinářské chemie (využití rostlin jako potravin a potravinových doplňků).

V případě prvním jde především o studium metabolismu rostlin, účinku toxinů nebo naopak hnojiv na metabolismus rostlin, případně studium produkce specifických látek [24]. Ve všech případech se jedná o studie, které jsou zaměřené na další využití rostlin většinou v souvislosti s body (b) a (c). Například se může jednat studium vlivu genetické modifikace rýže na produkci hormonů ovlivňujících její růst apod. [25].

V druhém případě farmaceutické chemie se analýza rostlinného materiálu střetává s pohledem farmakologie jako vědy o léčivých přípravcích [26]. Již od pradávna je známo, že některé rostliny mohou napomoci hojení rány nebo jejich extrakt lze použít jakožto léčivo např. pro tlumení bolesti [27]. V této oblasti hraje analytická chemie roli především v analýze obsahových látek těchto přípravků, jejich identifikaci a stanovení ve vztahu k léčivému účinku dané rostliny (extraktu) [28]. Například v případě tradiční čínské medicíny jsou využívány mnohé extrakty rostlin, které mají léčivé účinky a mnohdy je chemická povaha těchto efektů zahalena tajemstvím [29].

Poslední zmíněný případ je případ potravinářské chemie, kde jsou rostliny využívány jako vlastní potraviny (např. špenát, majoránka) nebo jako potravinové doplňky (např. extrakty z rostlin pro zlepšení potence apod.) [1, 30]. V těchto případech je analýza fyziologicky aktivních látek spojena s účinky těchto látek na organismus (např. studium antioxidačních vlastností fenolických látek), ale zároveň i s kontrolou kvality potravin (např. studium pravosti vína, míchání medu apod.) [31, 32].

Zvláštní skupinu analýzy potravin je pak tzv. „potravinomika“ (anglicky „foodomics“), kterou definoval prof. Cifuentes ve svém přehledném článku [33]. Termín „foodomics“ vychází z podobných termínů v oblasti proteinů a genů (tj. proteomiky a genomiky [34]) a de facto znamená komplexní analýzu potravin od genetické informace přes proteomickou až po jednotlivé nízkomolekulární složky a jejich vliv na kvalitu potravin.

2.3 Techniky pro analýzu fyziologicky aktivních látek v rostlinném materiálu

Jak již bylo uvedeno, analýza fyziologicky aktivních látek v rostlinném materiálu představuje komplexní problém, kde výběr vhodné analytické techniky závisí především od typu látek, které chceme analyzovat, a pak také od typu matrice. Často je rovněž potřeba vzít do úvahy pořizovací a provozní náklady vybrané techniky, protože praktická stránka analytického procesu vždy vyžaduje kalkulaci těchto nákladů (a mnohdy je právě cena tím nejdůležitějším prvkem rozhodovacího procesu).

Dále je nutné uvažovat počty analyzovaných vzorků, protože v té chvíli se do popředí dostává i otázka časové náročnosti analýzy. Například při analýze 200 vzorků je rozhodující, jestli jedna analýza trvá 60 minut nebo 1 minutu (na 200 analýz je při 60 minutové analýze potřeba celkový čas přes 8 dnů, v případě 1 minutové analýzy jsou to pouze 3,3 hodiny). Zvláštním případem pak jsou mikrotechniky v analytické chemii, kde je předpoklad, že jedna analýza může trvat např. 10 s, tj. pak 200 analýz trvá přibližně 34 minut (což představuje 360-krát rychlejší způsob analýzy oproti 60 minutové analýze). Je samozřejmé, že některé kroky prováděného postupu mohou být spojeny (např. využitím SPE extraktoru s možností použití více kolonek), přesto tato úvaha je rozhodně důležitá.

Techniky pro analýzu fyziologicky aktivních látek v rostlinném materiálu zahrnují téměř všechny analytické techniky od spektrálních, přes elektrochemické, bioanalytické až po separační techniky [1, 35]. Protože se tato práce dotýká především použití separačních technik, z nichž hraje dominantní roli kapilární elektroforéza, budou v následující kapitole stručně popsány základy kapilární elektroforézy s přihlédnutím na téma disertační práce.

2.4 Kapilární elektroforéza

Kapilární elektroforéza (CE) je analytická separační technika založená na rozdílech v pohybu iontů v elektrickém poli [36 – 38]. Na kulový ion působí v separačním loži (kapiláře) dvě síly: síla odporová (frikční) F_f daná Stokesovým zákonem a síla elektrická F_e :

$$F_f = -6\pi\eta r v \quad (1)$$

$$F_e = Eq \quad (2)$$

kde η je dynamická viskozita prostředí, r je efektivní poloměr iontu (poloměr včetně solvatačního obalu), v je rychlost pohybu daného iontu, E je intenzita vloženého elektrického pole a q je náboj daného iontu.

V ustáleném stavu jsou obě síly v rovnováze, a proto lze pro pohyb iontu odvodit následující vztah:

$$v = \frac{q}{6\pi\eta r} E \quad (3)$$

Je patrné, že ionty s menším efektivním poloměrem se budou v elektrickém poli pohybovat rychleji než ionty s větším efektivním poloměrem. Stejně tak, ionty vícenásobně nabitě se budou pohybovat rychleji. Kromě toho je ze vztahu (3) patrný i vliv prostředí, ve kterém se ionty pohybují (např. nepřímá úměrnost rychlosti pohybu iontu a dynamické viskozity prostředí).

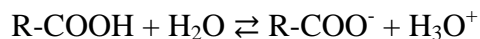
Veličinu charakterizující pohyb určitého iontu v elektrickém poli (migraci) nazýváme elektroforetická pohyblivost (mobilita) a je definována jako rychlost iontu v elektrickém poli o jednotkové intenzitě:

$$\mu_e = \frac{v}{E} \quad (4)$$

Tato veličina je konstantou pro daný ion za ideálních podmínek, tj. předpokládá, že nedochází např. k interakcím mezi ionty a okolím a vzájemně mezi ionty (pro její zjištění je mimo jiné nutná extrapolace k nulové iontové síle) a předpokládá se úplná disociace látky ($\alpha = 1$).

Jak již bylo naznačeno a logicky z pohledu nutnosti iontového charakteru analyzovaných látek vyplývá značná závislost migrace látek na jejich disociaci. V průběhu disociace jsou v dynamické rovnováze nabitě i nenabitě (případně vícenásobně nabitě) formy dané látky.

Například v případě slabé karboxylové kyseliny dochází k následujícímu ději:



Tento děj je možné popsat příslušnou disociační konstantou, např. v koncentračním tvaru:

$$K_c = \frac{[\text{R-COO}^-][\text{H}_3\text{O}^+]}{[\text{R-COOH}]} \quad (5)$$

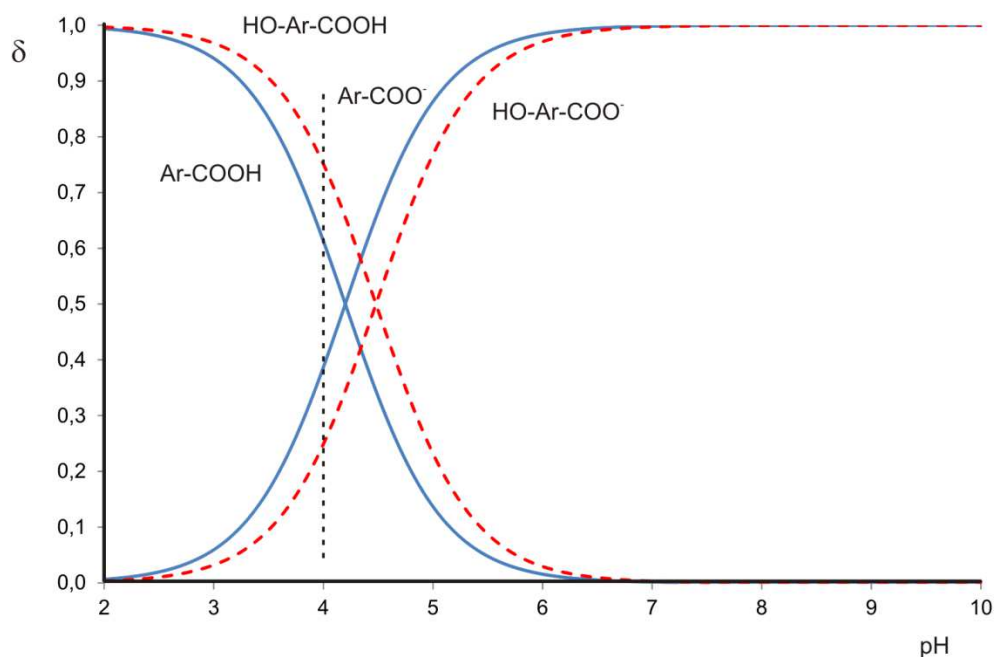
kde $[\text{R-COO}^-]$, $[\text{H}_3\text{O}^+]$, $[\text{R-COOH}]$ jsou rovnovážné koncentrace jednotlivých složek v roztoku.

Podobně je možné sestavit i distribuční diagram vyjadřující distribuci jednotlivých forem slabé kyseliny v závislosti na pH prostředí. Je nasnadě, že nenabitá forma se v elektrickém poli nebude pohybovat, zatímco nabitá forma ano. Zároveň díky rychlosti disociační rovnováhy není možné tento stav oddělit, a proto lze definovat tzv. efektivní pohyblivost (mobilitu), která vyjadřuje rychlost pohybu iontu v elektrickém poli o jednotkové intenzitě v daném prostředí:

$$\mu_{ef} = \alpha \mu_e \quad (6)$$

Je důležité si uvědomit, že zde se již nejedná o konstantu ve smyslu fyzikální chemie, ale že se jedná o veličinu, která závisí především na pH pracovního elektrolytu. Nicméně jak je známo z fyzikální chemie, proces disociace je ovlivněn také např. teplotou, iontovou silou nebo přítomností dalších látek (např. organických rozpouštědel), a proto je i efektivní pohyblivost ovlivněna i těmito dalšími parametry.

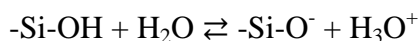
Zmíněné sestavení distribučního diagramu je zajímavé v případě nutnosti separace například dvou slabých organických kyselin, benzoové kyseliny ($\text{pK}_a = 4,20$ [39]) a 4-hydroxybenzoové kyseliny ($\text{pK}_a = 4,48$ [39]), viz obrázek 1.



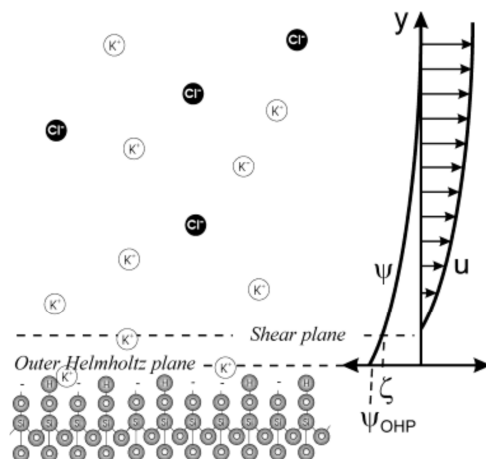
Obrázek 1: Distribuční diagram benzoové kyseliny a 4-hydroxybenzoové kyseliny

Z distribučního diagramu vyplývá zásadní věc, např. při pH 4 se benzoová kyselina vyskytuje přibližně z 60 % v protonizované formě a 40 % v disociované formě a zároveň 4-hydroxybenzoová kyselina přibližně ze 75 % v protonizované formě a z 25 % v disociované formě. Je tedy zřejmé, že se chování obou kyselin při pH 4 v elektrickém poli bude významně lišit (pouze disociovaná forma může migrovat v elektrickém poli). Je samozřejmé, že se jedná o zjednodušení situace, nicméně distribuční diagram může mnohé ukázat o elektroforetickém chování látek.

Kromě výše zmíněného se v kapilární elektroforéze uplatňuje další jev související s disociací (případně adsorpcí iontů) – elektroosmotický tok (EOF). Nejčastěji používaná křemenná kapilára má na svém povrchu silanolové skupiny, které jsou schopné disociace:



V prostředí o pH větším než 3 – 4 nesou silanolové skupiny záporný náboj (disociační konstanta této reakce byla stanovena na 5,3 [40], resp. 6,3 [41]). Tento náboj je pak vysycen pomocí proti-iontů ze základního elektrolytu, čímž vzniká elektrická dvojvrstva na povrchu kapiláry (viz obrázek 2).



Obrázek 2: Vznik elektrické dvojvrstvy na povrchu kapiláry

KCl je použitý jako elektrolyt, Ψ je lokální potenciál, u je lokální rychlost elektroosmotického toku a ζ je zeta potenciál, obrázek je převzatý z citace [42]

Elektrická dvojvrstva na obrázku 2 je charakterizována nepohyblivou částí, tzv. Sternovou vrstvou a difúzní elektrickou vrstvou, která již má schopnost pohybu. Po aplikaci elektrického pole na konce kapiláry se difúzní vrstva pohybuje ke katodě. Tímto pohybem dochází zároveň k pohybu celé kapaliny uvnitř kapiláry, což nazýváme elektroosmotický tok (EOF).

Rychlost elektroosmotického toku lze pak definovat vztahem:

$$v_{EOF} = \mu_{EOF} E \quad (7)$$

kde μ_{EOF} je elektroosmotická mobilita a E je intenzita elektrického pole.

Podobně pak lze vyjádřit elektroosmotickou pohyblivost (mobilitu) jako:

$$\mu_{EOF} = \frac{\varepsilon \zeta}{4\pi\eta} \quad (8)$$

kde ε je relativní permitivita prostředí, ζ je zeta potenciál, η je dynamická viskozita prostředí.

Rychlost pohybu iontu v kapiláře je pak dána vektorovým součtem vlastní rychlosti iontu a rychlosti elektroosmotického toku. V případě pohyblivostí pak definujeme zdánlivou pohyblivost (mobilitu) iontu μ_{ap} , jež je vektorovým součtem efektivní pohyblivosti iontu a elektroosmotické pohyblivosti:

$$\mu_{ap} = \mu_{ef} + \mu_{EOF} \quad (9)$$

Vlastní EOF může představovat jak pozitivní, tak negativní příspěvek k analýze kapilární elektroforézou a z toho vyplývá i nutnost EOF ovlivňovat. Jelikož je EOF způsobený disociací silanolových skupin vnitřní stěny kapiláry, je nasnadě jak ho ovlivnit. Například změnou iontové síly ovlivňujeme tloušťku vytvořené elektrické dvojvrstvy (čím vyšší iontová síla, tím menší zeta potenciál) nebo přidávkem organického rozpouštědla měníme jak schopnost látek disociovat, tak viskozitu a permitivitu prostředí [43]. Kromě tohoto jednoduchého způsobu lze použít přidavku kationových tenzidů (CTAB, DDAB), které se vzrůstající koncentrací snižují velikost EOF až do jeho téměř úplného potlačení. S další rostoucí koncentrací potom obrátí směr EOF [44].

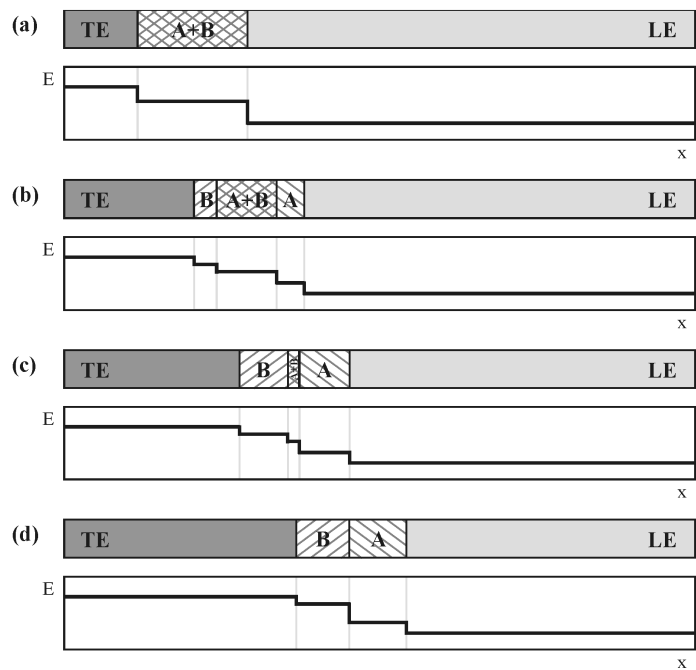
Další způsob ovlivnění EOF vychází z podobného principu – přidavku aditiv, které „maskují“ (pokryjí) negativně nabitě silanolové skupiny. Zde může jít o látky typu aminů (např. ethylendiamin, kadaverin, putrescin, spermin), polymerů (např. polybren, polyethylen oxid, polyethylen imin, polydimethylakrylamid) nebo iontových kapalin [45, 46]. Poměrně zajímavou možností je i použití pokrytí několika vrstvami, kde se nejprve pokrývají negativní silanolové skupiny pozitivně nabitým polybrenem, pak se pokrývá tato modifikovaná vrstva negativně nabitým dextranulfátem a pak opět pozitivně nabitým polybrenem atd. Takto upravené pokrytí je mnohem stabilnější a přináší opakovatelné výsledky [47]. V neposlední řadě možností ovlivnění EOF je nutné zmínit kovalentní modifikaci silanolových skupin, kdy dochází k reakci a vytvoření např. polymerní struktury na vnitřní stěně kapiláry [48].

2.4.1 Techniky kapilární elektroforézy

V rámci kapilární elektroforézy rozlišujeme několik technik, které se liší svým uspořádáním a separačním mechanismem [36 – 38]. Nejčastěji hovoříme o 5 technikách: kapilární zónové elektroforéze (CZE), kapilární izotachoforéze (CITP), kapilární gelové elektroforéze (CGE), kapilární izoelektrické fokusaci (CIEF) a micelární elektrokinetické chromatografii (MEKC).

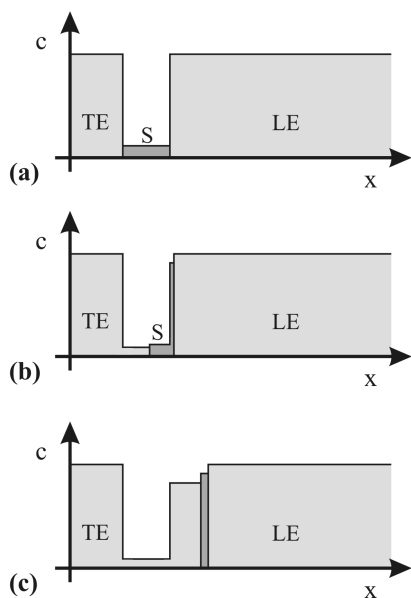
Kapilární zónová elektroforéza (CZE) je základní technikou používající jednoduchý elektrolyt a analyty jsou separovány na zóny oddělené základním elektrolytem dle jejich mobilit. Separační mechanismus může být snadno ovlivněn různými aditivami, jako jsou např. cyklodextriny, proteiny, hydroxykyseliny a další komplexující či interagující látky.

Kapilární izotachoforéza (CITP) je technika používající diskontinuální elektrolyty – vedoucí elektrolyt (LE), který má v separačním systému koion s nejvyšší mobilitou, a koncový elektrolyt (TE), který má naopak koion s mobilitou nejmenší. Vzorek je pak dávkován mezi tyto elektrolyty. Používá se hydrodynamicky uzavřený systém s eliminovaným elektroosmotickým tokem a je aplikován konstantní elektrický proud. V průběhu analýzy dochází k separaci analytů do úzkých vzájemně sousedících zón podle klesající elektroforetické pohyblivosti – pro ionty vzorku A, B platí: $\mu_{LE} > \mu_A > \mu_B > \mu_{TE}$ (viz obrázek 3). Kromě toho dochází k přizpůsobení koncentrace iontů vzorku na základně poměru koncentrace a mobility iontů vedoucího elektrolytu jak popisuje Kohlrauschova regulační funkce (viz obrázek 4) [49].



Obrázek 3: Schéma ITP techniky

(a) vzorek dvou iontů A, B je nadávkován mezi vedoucí (LE) a koncový elektrolyt (TE),
 (b, c) průběh separace obou iontů, (d) dosažení separace a ustáleného stavu; převzato z citace [50]



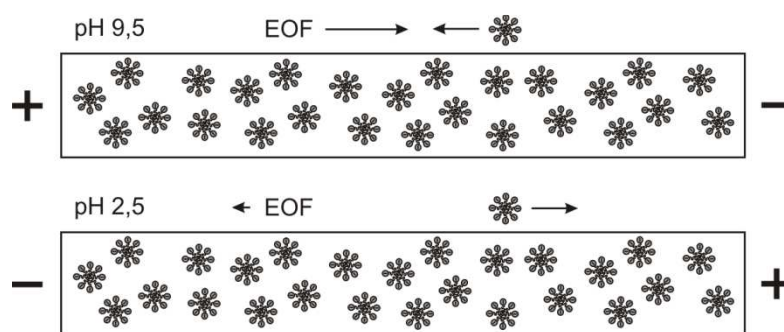
Obrázek 4: Schéma zkoncentrování vzorku v ITP

vedoucí elektrolyt (LE), koncový elektrolyt (TE); převzato z citace [50]

Kapilární gelová elektroforéza (CGE) využívá pro separace přítomnosti gelu přímo v kapiláře. Separační mechanismus je založený na migraci iontů skrz póry gelu a rozdíly v této migraci. Technika CGE je známá především z jejího využití v analýze fragmentů nukleových kyselin pro sekvenaci genomů [51].

Kapilární izoelektrická fokusace (CIEF) je založena na vytvoření gradientu pH v kapiláře díky použití směsi amfolytů jako elektrolytu. EOF bývá často potlačen, případně bývá zvýšena viskozita elektrolytu přidávkou různých aditiv (např. glycerolu). Separace látek je založena na rozdílech v jejich izoelektrickém bodě – např. analyt (pI 5,6) je nadávkován do celé kapiláry, ve které je vytvořen gradient pH 3 – 10 a je aplikováno napětí pozitivní polarita na vstupní nádobce obsahující kyselinu. V kyselém pH je analyt o pI 5,6 kladně nabitý a migruje směrem ke katodě, naopak v alkalickém pH je tento analyt negativně nabitý a pohybuje se směrem k anodě. V případě, že domigruje do oblasti pH odpovídající jeho hodnotě pI, analyt se zastaví a zkoncentruje. Po skončení vlastního fokusování se analyty mobilizují rozbitím pH gradientu např. pomocí kyseliny nebo zásady nebo iontovou silou. Technika CIEF se běžně používá k separacím proteinů, jejich komplexů i větších útvarů jako jsou např. mikroorganismy [52].

Micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC) je poslední technikou, která je někdy nazývána hybridní mezi kapalinovou chromatografií a kapilární elektroforézou. Tato technika využívá elektrolyty obsahující povrchově aktivní látky v koncentracích, při kterých tvoří micely. Separace analytů je pak kontrolována rozdělovací rovnováhou mezi micely a volný elektrolyt. Micely jsou ale ve většině případů nabitě útvary a pohybují se separačním ložem, proto netvoří klasickou stacionární fázi jako v případě kapalinové chromatografie. Někdy jsou proto micely nazývány pseudostacionární fází. Díky pohybu micel v elektrickém poli a zároveň mechanismu rozdělování je technika MEKC vhodná pro separaci nenabitých a méně polárních látek, které jsou schopné interagovat s micelami. V případě vývoje MEKC techniky se často uvažuje použití bazických elektrolytů se silným elektroosmotickým tokem, kde jsou micely i přes svoji migraci proti EOF unášeny do detektoru stejně jako analyty (viz obrázek 5a). Na druhou stranu je možné i uspořádání, ve kterém je EOF téměř potlačen (např. v prostředí o pH 2,5), a micely migrují do detektoru svojí vlastní mobilitou za použití obrácené polarita napětí (viz obrázek 5b).



Obrázek 5: Schéma metod micelární elektrokinetické chromatografie

(a) MEKC s využitím silného EOF (pH 9,5), (b) MEKC s potlačeným EOF (pH 2,5)

Kromě těchto základních technik je v literatuře popsána celá další škála technik, které jsou ale ve většině případů pouze kombinací některých přístupů, které již byly zmíněny. Asi nejčastěji se objevují techniky afinitní kapilární elektroforézy (ACE) [53] nebo pak techniky nevodné kapilární elektroforézy, resp. kapilární elektroforézy využívající nevodná prostředí (NACE) [54]. Techniky ACE využívají afinitních interakcí mezi např. proteiny a léčivy, protilátkami a antigeny jak pro separace jiných látek, tak pro fyzikálně-chemické studium těchto interakcí. Z obecného hlediska se většinou jedná o techniky CZE za použití aditiv, které umožňují tyto interakce. Kapilární elektroforéza využívající nevodná prostředí patří mezi další specifickou oblast, protože může využívat de facto všechny již zmíněné mechanismy (nejčastěji opět CZE), ale jako rozpouštědlo nepoužívá vodná prostředí.

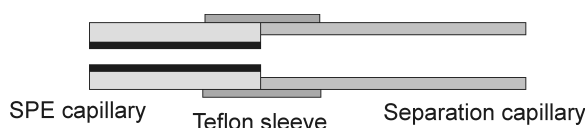
Jako skutečně hybridní techniku kapilární elektroforézy a kapalinové chromatografie pak lze označit kapilární elektrochromatografii (CEC), kde je přítomna stacionární fáze v kapiláře (nejčastěji syntetizována *in situ* v kapiláře) a tok kapaliny je zajišťován elektrickým polem (EOF) případně elektrickým polem (EOF) a tlakem. Separace látek se pak přednostně uskutečňuje díky jejich interakcím se stacionární fází jako v kapalinové chromatografii [55].

2.4.2 Prekoncentrační techniky a kapilární elektroforéza

Techniky kapilární elektroforézy mají malou citlivost detekce při použití komerčně nejdostupnější UV spektrofotometrické detekce [36 – 38]. Tato skutečnost je především díky krátké optické dráze paprsku, což se viditelně projevuje ve velikosti absorbance, viz Lambert-Beerův zákon. Pro analýzu malých až stopových množství látek je nutné použití prekoncentračních technik. Prekoncentrační techniky pak můžeme rozdělit na techniky před vlastní separací (tzv. off-line techniky), před vlastní separací, ale spojené se separační technikou (tzv. in-line techniky a techniky využívané přímo při vlastní separaci (tzv. on-line techniky) [56].

Jako off-line prekoncentrační techniky se využívají např. extrakční techniky jako extrakce tuhou fází, mikroextrakce tuhou fází, extrakce kapalina – kapalina, vysokotlaká extrakce rozpouštědlem, superkritická fluidní extrakce apod. Tyto techniky většinou vyžadují další úpravu extrahovaného vzorku před vlastním nástřikem do kapilární elektroforézy, např. úpravu nevodného prostředí po extrakci na částečně vodné prostředí vhodné pro kapilární elektroforézu apod. Na druhou stranu jsou tyto techniky poměrně dobře popsány a mohou eliminovat rušivé vlivy matrice před vlastním stanovením kapilární elektroforézou.

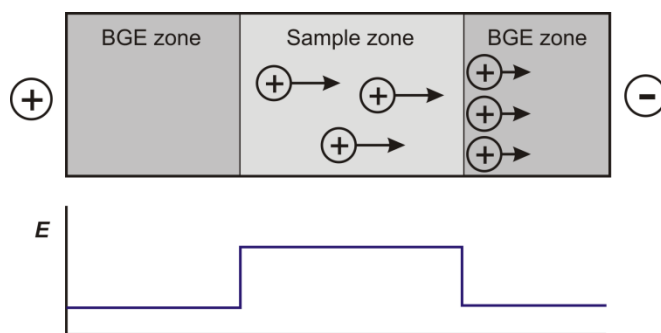
In-line prekoncentrační techniky jsou techniky využívající přímého spojení separační kapiláry a klasické off-line prekoncentrační techniky. Z tohoto pohledu vyplývá, že se jedná především o spojení mikroextrakce tuhou fází s kapilární elektroforézou, kdy je mikroextrakční kolonka přímo napojená na kapiláru, viz obrázek 6. Ač je toto spojení poměrně náročné, umožňuje přečištění a zkoncentrování analytů před vlastní separací a je proto v některých případech vhodně využíváno [57].



Obrázek 6: In-line spojení mikroextrakce tuhou fází (SPE) s kapilární elektroforézou pomocí teflonové spojky

On-line prekoncentrační techniky jsou pak techniky využívající „programování“ složení elektrolytů v kapiláře, což umožňuje zkoncentrování analytů díky elektromigračním efektům. Tyto techniky pak můžeme rozdělit dle mechanismu prekoncentrace na několik skupin: zkoncentrování elektrickým polem (stacking), přechodná izotachoforéza (transient isotachophoresis), nametání (sweeping) a prekoncentrace na pH rozhraní (dynamic pH junction) [58 – 60]. Kromě výše uvedených technik existují jejich kombinace (nametání a prekoncentrace na pH rozhraní, přechodná izotachoforéza a zkoncentrování elektrickým polem) případně další techniky jako je prekoncentrace micelárním kolapsem (micelle collapse) nebo prekoncentrace chemickým polem [58 – 60].

Technika zkoncentrování elektrickým polem (stacking) [61] je založena na dávkování analytů v zředěných elektrolytech nebo v elektrolytech majících nižší vodivost než je vodivost okolního elektrolytu. V tomto případě je totiž po aplikaci elektrického napětí v zóně analytu vyšší intenzita elektrického pole, čímž dochází k urychlení analytů a jejich následnému zpomalení na rozhraní se základním elektrolytem majícím nižší intenzitu elektrického pole (viz obrázek 7). Takto lze zkoncentrovat i poměrně velká nadávkovaná množství do úzkých zón (tzv. large volume sample stacking).

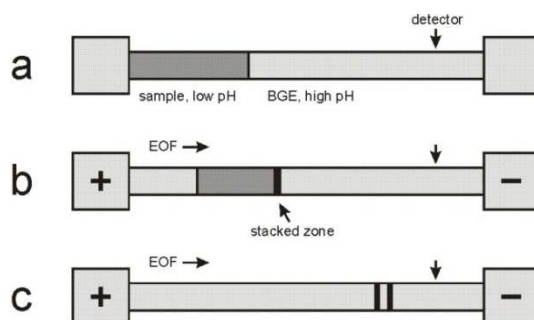


Obrázek 7: Schéma techniky zkoncentrování elektrickým polem

Další podobná technika, tzv. field-amplified sample stacking [62], vychází z elektrokinetického dávkování analytů rozpuštěných v zředěném elektrolytu do kapiláry obsahující základní elektrolyt (o vyšší koncentraci). Někdy je rovněž před elektrokinetickým dávkováním analytu nadávkována krátká zóna vody, která tuto prekoncentraci ulehčuje a chrání proti negativním vlivům (promíchání zón apod.).

V případě přechodné izotachoforézy (tITP) [63, 64] se vychází z možností kapilární izotachoforézy prekoncentrovat analyty jak popisuje Kohlrauschova regulační funkce (viz předchozí kapitola). Přechodná izotachoforéza se pak odehrává jen na určitou dobu, dokud je její průběh možný z hlediska přítomnosti dostatečného množství elektrolytů (vymigrování iontů, narušení zón apod.). Kromě toho lze použít izotachoforézu jako prekoncentrační techniku v případě spojení dvou kolon (kapilár), kdy v první předseparační koloně dochází k prekoncentraci mechanismem ITP a v druhé analytické koloně již dochází k separaci látek ať již mechanismem ITP nebo CZE (tzv. techniky ITP/ITP, ITP/CZE) [65].

Prekoncentrace na pH rozhraní (dynamic pH junction) [66, 67] je založena na rozdílné disociaci analytů (a tím i jejich rozdílné migraci) v prostředí o různém pH. Jak již napovídá tato definice, existuje několik variant této prekoncentrace, např. analyty jsou rozpuštěny v prostředí, kde je jejich efektivní pohyblivost téměř nulová (viz obrázek 8).



Obrázek 8: Schéma prekoncentrace na pH rozhraní

(a) slabě kyselé analyty jsou rozpuštěny v elektrolytu o kyselém pH; (b) analyty jsou prekoncentrovány na základě jejich změny v disociaci na rozhraní s elektrolytem majícím zásadité pH; (c) analyty jsou separovány

Nametání (sweeping) [68 – 70] je technikou, která se hojně využívá v micelární elektrokinetické chromatografii. Je založena na dávkování dlouhé zóny analytu v prostředí o podobné iontové síle, jako je iontová síla základního elektrolytu. Micely v základním elektrolytu pak migrují skrz zónu analytu a „zametají“ neutrální analyty do úzkých zón dle velikosti jejich interakce s micelami.

3 Cíle práce

Cíle této práce lze shrnout do tří bodů:

- a) Vývoj metody pro stanovení yohimbinu v léčivých přípravcích z rostlinných extraktů pomocí micelární elektrokinetické chromatografie.
- b) Vývoj účinné a rychlé metody pro analýzu vybraných fenolických kyselin z rostlinné matrice, konkrétně pro analýzu vybraných fenolických kyselin v majoránce zahradní pomocí vysokotlaké extrakce rozpouštědlem a kapilární elektroforézy s on-line elektrokinetickou prekoncentrací.
- c) Zlepšení prekoncentračních možností metody on-line elektrokinetické prekoncentrace pomocí použití částečně nevodných dávkovacích elektrolytů.

4 Experimentální část

4.1 Chemikálie

Komponenty základních elektrolytů: kyselina fosforečná, kyselina boritá, hydroxid sodný, SDS, methanol, acetonitril, standardy: yohimbin, kofein, syringová kyselina, sinapová kyselina, ferulová kyselina, vanilová kyselina, kumarínová kyselina, p-hydroxybenzoová kyselina, kávová kyselina, benzoová kyselina a skořicová kyselina byly zakoupeny od firmy Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). Všechny použité chemikálie byly čistoty p.a.

4.2 Kapilární elektroforéza

Analýzy byly prováděny na instrumentu kapilární elektroforézy HP ^{3D}CE (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) s detektorem s diodovým polem (DAD) a v případě studia mechanismu on-line prekoncentrace s bezkontaktním vodivostním detektorem navrženým skupinou Prof. Gaše [71]. Pro analýzy byly použity nepokryté křemenné kapiláry (MicroSolv Technology Corporation, NJ, USA) o vnitřním průměru 50 μm s celkovou délkou 33,0 cm a efektivní délkou 24,5 cm nebo s celkovou délkou 48,5 cm a efektivní délkou 40,0 cm. V případě použití bezkontaktního vodivostního detektoru (CCD) byla použita kapilára s celkovou délkou 48,5 cm a efektivní délkou 33,0 cm (do CCD) a 40,0 cm (do DAD). Prostor kapiláry byl termostatován na 25°C. Kapilára byla promývána každý den před prvním experimentem 10 min 0,1 M NaOH, 20 min deionizovanou vodou a 10 min příslušným elektrolytem. Mezi jednotlivými experimenty byla kapilára promývána 1 min 0,1 M NaOH, 2 min deionizovanou vodou a 2 min příslušným elektrolytem. V případě analýzy extraktů majoránky bylo promývání zvýšeno na 2 min 0,1 M NaOH, 3 min deionizovanou vodou a 5 min příslušným elektrolytem. Veškeré promývání bylo automatické tlakem 925 mbar.

Elektrolyty byly připravovány rozpuštěním vypočteného množství kyseliny v deionizované vodě (18 M Ωcm , Millipore, USA), pH bylo upraveno titrací příslušnou bází (např. 50 % (w/w) NaOH). V případě studia prekoncentračních systémů s přesně definovanou koncentrací kyseliny i báze byly tyto systémy připraveny smícháním daných koncentrací

kyseliny a báze a pH bylo změřeno u finálního roztoku. V případě použití aditiv byla aditiva přidávána k finálnímu roztoku po titraci pH. Všechna měření byla prováděna 5x není-li definováno v textu jinak.

4.3 Příprava reálných vzorků yohimbinu

Standardní roztok yohimbinu o koncentraci 10^{-2} mol/l byl připraven v příslušném základním elektrolytu neobsahujícím SDS (50 mM borát/NaOH pH 9,5 s 10 % (v/v) methanolu nebo 50 mM fosfát/NaOH pH 2,5 s 10 % (v/v) methanolu). Medikamenty pro léčbu poruch sexuální dysfunkce byly získány z lékárny FN Olomouc. Obsah kapslí byl kvantitativně převeden do zkumavky a rozpuštěn v příslušném základním elektrolytu neobsahujícím SDS (50 mM borát/NaOH pH 9,5 s 10 % (v/v) methanolu) a dále filtrován přes 0,2 μ m mikrofilm (Nalgene Brand Product, NY, USA). Kofein (standardní roztok o koncentraci 10^{-2} mol/l v příslušném pufru s 50 % (v/v) methanolu) byl použit jako interní standard.

4.4 On-line elektrokinetická prekoncentrace

On-line elektrokinetická prekoncentrace reálných a modelových vzorků byla prováděna následujícím postupem. Nejprve byla kapilára promyta základním elektrolytem (50 mM fosfát/NaOH pH 2,5). Pak probíhala akumulace s kapilárou a koncovou nádobkou obsahující základní elektrolyt a vstupní nádobkou obsahující dávkovací elektrolyt (50 mM borát/NaOH pH 9,5, případně s přidavkem organického rozpouštědla) s analyty. Akumulace probíhala nejčastěji při -10 kV, není-li napsáno jinak. Po akumulaci následovala výměna vstupní nádoby za nádobku obsahující mobilizační elektrolyt (50 mM fosfát/NaOH pH 2,5 s SDS). Koncentrace SDS byla měněna v závislosti na povaze vzorku (viz část výsledků). Mobilizace probíhala nejčastěji při stejném napětí jako akumulace. Jako interní standard byl v případě analýzy fenolických kyselin použit fenylalanin (25 ng/ml).

4.5 Validace on-line elektrokinetické prekoncentrační metody

Identifikace píků analytů byla prováděna porovnáváním UV spekter a metodou standardního přídávku („spajkování“). K validaci bylo použito vyhodnocení dle statistického programu QC.Expert 2.5 (TriloByte Statistical Software, Pardubice). Přesnost v rámci jednoho dne byla vyhodnocena z kalibračních závislostí mezi 5 ng/ml a 50 ng/ml (4 body; každý bod měřený 5x). Kalibrace byly měřeny po 4 dny s tím, že byla spočtena průměrná hodnota relativní směrodatné odchylky. Přesnost v rámci více dnů byla určena jako relativní směrodatná odchylka všech měření v těchto 4 dnech. Meze detekce (LOD) a meze kvantifikace (LOQ) byl odhadnuty v použitém softwaru jako hodnoty 3S/N a 10S/N. Výtěžnost byla spočítána z přídávku roztoku standardů fenolických kyselin o koncentraci 10 ng/ml k extraktu majoránky.

4.6 Příprava reálných vzorků majoránky

Extrakty listů *Majorana hortensis* L. (zakoupené v supermarketu Globus, Olomouc) byly připraveny pomocí vysokotlaké extrakce rozpouštědlem (PSE) dle následujícího postupu: 1,0000 g suchých homogenizovaných listů byl navážen do extrakční patrony o celkovém objemu 22 ml a extrahován acetonem při 150°C a 15 MPa dvěma statickými cykly (2 x 10 min) na automatickém extraktoru *one* PSE (Applied Separations Inc., Allentown, PA, USA). Extrakty byly sbírány do skleněných viálek, odpařeny do sucha pod proudem dusíku a rozpuštěny ve směsi voda a methanol (9:1, v/v). Pak byly extrakty přefiltrovány přes filtr Microcon YM-10 (regenerovaná celulóza, 10 000, Millipore Corporation, Bedford, MA, USA) a rozpuštěny v dávkovacím elektrolytu 50 mM borát/NaOH pH 9,5.

4.7 Micelární elektrokinetická chromatografie fenolických kyselin

Micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC) byla použita pro porovnání detekčních limitů vyvinuté on-line prekoncentrační metody s klasickými způsoby analýzy. Byl použit elektrolyt 50 mM fosfát/NaOH s 50 mM SDS a 10 % (v/v) methanolu. Analýzy byly prováděny při 10 kV.

4.8 Tvorba modelového pH rozhraní

Modelové pH rozhraní bylo vytvořeno nadávkováním zóny dávkovacího elektrolytu o určitém pH tlakem 50 mbar po dobu 120 s (přibližně 5 % délky kapiláry). Pak bylo aplikováno napětí po určitý čas s tím, že vstupní a výstupní elektrolytová nádobka obsahovaly elektrolyty o různém pH dle použitého prekoncentračního systému. Následně byly vytvořené zóny vypláchnuty tlakem 50 mbar do detekční cely bezkontaktního vodivostního detektoru a UV detektoru.

4.9 Matematické simulace

Pro simulace chování elektrolytů na pH rozhraní bylo využito dvou freeware programů Peakmaster 5.2 a Simul 5.0 vyvinuté skupinou Prof. Gaše [72 – 76]. Simulace byly provedeny s následujícím nastavením parametrů: délka kapiláry 25 mm, napětí 40,0 V/cm (napětí bylo 5x zmenšeno kvůli numerické nestabilitě systému), negativní polarita, simulace byla prováděna bez korekce na iontovou sílu. Elektroforetické mobility a disociační konstanty byly použity z databáze programu Peakmaster, která je založena na tabulkách dat publikovaných Hirokawou a spol. [77], data pro kyselinu boritou byla použita z publikace Malá a spol. [78]: kyselina fosforečná pKa 2,16; 7,21; 12,67; μ_e -34,6; -61,4; -71,5 ($\times 10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$); kyselina benzoová pKa 4,203; μ_e -33,6 ($\times 10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$); NaOH pKa 13,7; μ_e 51,9 ($\times 10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$); kyselina boritá pKa 9,23; μ_e -36,2 ($\times 10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$).

4.10 Studium výtěžnosti vysokotlaké extrakce

Extrakce byly prováděny na *one* PSE extraktoru (Applied Separations, Allentown, PA, USA). 1,000 g rozdrcené majoránky byl umístěn do 22 ml nerezové extrakční cely. Extrakce probíhala s následujícími podmínkami: tlak 15 MPa, teplota 50 – 150°C, 2 statické cykly po 10 minutách. Extrakty byly sbírány do 60 ml víalky s teflonem potáhnutým gumovým uzávěrem. Každý extrakt byl pak přenesen do 50 ml odměrné baňky a jeho objem byl doplněn odpovídajícím rozpouštědlem do 50 ml. Následně byl každý extrakt zkoncentrován pod proudem dusíku a rozpuštěn ve 100 μl pyridinu. Potom

bylo ke vzorkům přidáno 50 μ l N,O-bis(trimethylsilyl)acetamidu a reakční směs byla za stálého míchání zahřívána 4 hodiny na 70°C. Silanizované deriváty fenolických kyselin pak byly analyzovány pomocí GC-MS.

4.11 Soxhletova extrakce

1,000 g rozdrcené majoránky byl extrahován 100 ml acetonu nebo methanolu ve Soxhletově extraktoru po dobu 24 hodin. Extrakční proces byl nastaven na 6 cyklů za hodinu s efektivním objemem extrakční cely 25 ml. Po extrakci byl každý vzorek zfiltrován a zkoncentrován pod proudem dusíku. Následná silanizace pro GC-MS analýzu probíhala stejně jako v případě vysokotlaké extrakce rozpouštědlem (viz kapitola 4.10).

4.12 Analýza GC-MS

Trimethylsilylderiváty fenolických kyselin byly analyzovány na plynovém chromatografu Agilent 6890 s hmotnostním spektrometrem Agilent 5973N (Agilent, Palo Alto, USA) s MS knihovnou NIST 02. Separace plynovou chromatografií probíhala za použití RTX-5Sil MS kapilární kolony (Restek, Bellefonte, PSA, USA) o délce 30 m, vnitřním průměru 0,25 mm a tloušťce filmu 0,25 μ m. Nosným plynem bylo helium (99,998 %, SIAD, Bergamo, Itálie) s průtokem 0,9 ml/min. Byl použit následující teplotní program: 50°C – 2 min – 10°C/min – 300°C – 10°C/min. Vzorky byly dávkovány pomocí pulzního splitless módu (dávkovaný objem byl 1 μ l. Hmotnostní spektrometr využíval ionizaci elektronem (EI) s ionizační energií 70 eV. Identifikace píků proběhla na základě srovnání retenční časů a MS spekter s knihovnou spekter obsahující MS spektra TMS derivátů standardů fenolických kyselin (viz tabulka 2). Vlastní spektra jsou rovněž přílohou této práce.

Tabulka 2: Retenční časy a charakteristické fragmenty v MS spektrech

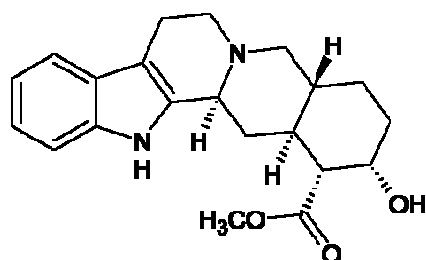
trimethylsilylderivát	t _r (min)	charakteristické m/z iontů a jejich relativní intenzity
4-hydroxybenzoové kys.	15,89	267 (100), 223 (84), 282 (26)
syringové kys.	17,42	297 (100), 267 (77), 312 (45)
vanilové kys.	18,80	327 (100), 312 (79), 297 (61)
kumarínové kys.	19,29	219 (100), 308 (88), 293 (86)
ferulové kys.	20,74	338 (100), 323 (55), 249 (49)
kávové kys.	21,11	219 (100), 396 (84), 381 (29)
sinapové kys.	22,07	368 (100), 353 (39), 338 (38)

5 Výsledky a diskuse

5.1 Stanovení yohimbinu micelární elektrokinetickou chromatografií

K. Vítková, M. Pechová, J. Petr, J. Znaležiona, V. Ranc, V. Maier, J. Ševčík, Cent. Eur. J. Chem. 8 (2010) 273.

Yohimbin (obr. 9) patří do skupiny indolových alkaloidů odvozených od aminokyseliny tryptofanu a monoterpenického prekursoru. Poprvé byl izolován z kůry bujarníku yohimbe (*Pausinystalia yohimbe*) v roce 1896 chemikem Spieglem [79]. Hlavním účinkem yohimbinu na organismus je rozšíření cév v kůži, střevním traktu, ledvinách a genitálních orgánech, pro tento účinek byl využíván jako afrodisiakum již už u domorodých obyvatel Afriky [80]. Dnes je yohimbin především ve formě chloridu součástí některých hromadně i individuálně vyráběných léčivých přípravků požívaných k léčbě impotence [81, 82].



Obrázek 9: Struktura yohimbinu

5.1.1 Vývoj metody

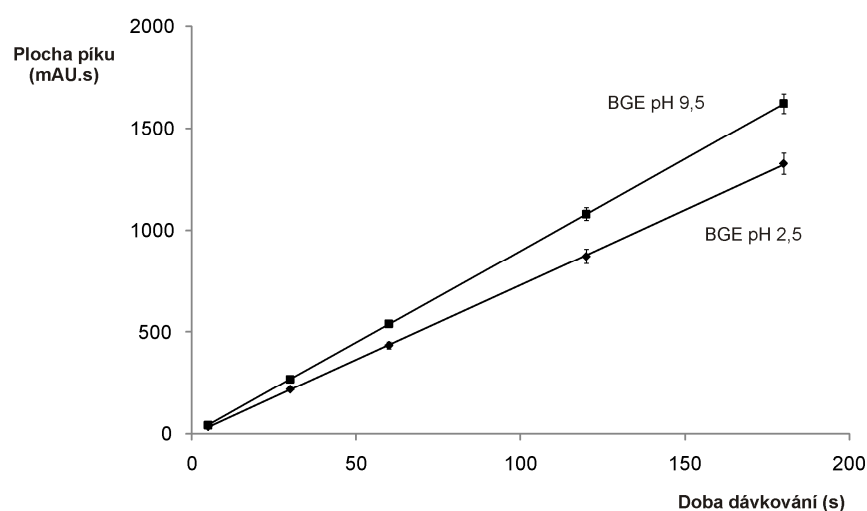
Yohimbin má poměrně komplikovanou strukturu (obr. 9), z které je patrný jeho méně polární charakter. Na základě této skutečnosti byla jako nejlepší technika pro jeho stanovení vybrána micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC). Nejprve byly testovány tři elektrolyty s pH v kyselé, neutrální a zásadité oblasti: (a) 50 mM fosfát/NaOH pH 2,5, (b) 50 mM fosfát/NaOH pH 7,0 a (c) 50 mM borát/NaOH pH 9,5. Všechny elektrolyty obsahovaly SDS v koncentraci 50 mmol/L. Migrace SDS micel v tomto prostředí pak vedla k volbě polarita, kdy v pH 2,5 byla použita záporná polarita (-20 kV), zatímco v ostatních případech byla použita kladná polarita (+20 kV). Interní standard

(kofein) byl vybrán na základě podobnosti struktury a migračního chování. Separace yohimbinu a interního standardu byla možná ve všech zmíněných elektrolytech, přesto elektrolyt o pH 7,0 poskytoval nejméně opakovatelné výsledky (především v migračních časech) a nejmenší stabilitu elektrického proudu v průběhu analýzy.

Dále byly studovány dva základní parametry – pH a koncentrace SDS – a jejich vliv na separaci a opakovatelnost výsledků. pH bylo v tomto případě sledováno v úzkém rozmezí při zachování typu elektrolytu. pH 2,2 – 3,2 bylo studováno v případě 50 mM fosfátu/NaOH a pH 8,5 – 10,0 v případě 50 mM borátu/NaOH. V případě všech použitých elektrolytů nebyly pozorovány žádné signifikantní změny v efektivních mobilitách yohimbinu, a proto bylo pro další experimenty vybráno pH 2,5 a 9,5. Druhý studovaný parametr – koncentrace SDS – má významný vliv na retenční faktory analytů, a proto výrazně ovlivňuje separaci. Kromě toho, koncentrace SDS ovlivňuje i dobu analýzy z důvodů migrace micel v opačném směru k elektroosmotickému toku. Byly studovány čtyři koncentrace SDS: 10 mmol/L, 25 mmol/L, 50 mmol/L a 100 mmol/L. Nárůst koncentrace SDS vedl k nárůstu migračního času yohimbinu v 50 mM borátu/NaOH pH 9,5 (z 2,2 min na 3,5 min). Nejlepšího rozlišení interního standardu a yohimbinu bylo dosaženo při nejvyšší testované koncentraci SDS (100 mmol/L). V případě 50 mM fosfátu/NaOH, nárůst koncentrace SDS vedl k poklesu migračních časů yohimbinu. V případě použití 100 mM SDS bylo dosaženo rovněž nejlepší separace interního standardu a yohimbinu.

Dalším studovaným parametrem byl přídavek organického rozpouštědla do základního elektrolytu. Přídavek organického rozpouštědla ovlivňuje disociační rovnováhy, rozdělování a v neposlední řadě i permitivitu a viskozitu elektrolytu [83]. Navíc, Chen a spol. [84] prezentoval, že methanol představuje dobré rozpouštědlo pro CE yohimbinu v nevodném prostředí (spolu s acetátem amonným a ledovou kyselinou octovou). Díky tomu byl studován efekt přídavku 0 – 50 % (v/v) methanolu a acetonitrilu v obou elektrolytech. Acetonitril způsoboval nestabilitu v elektrickém proudu v průběhu analýz. Naopak methanol v koncentraci 10 % (v/v) zlepšil stabilitu i opakovatelnost separace a byl použit v dalších experimentech.

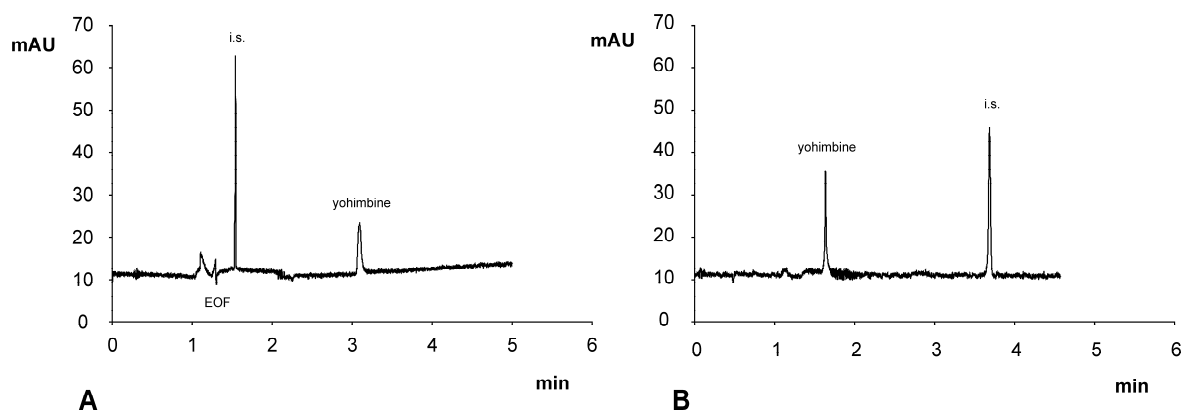
Posledním studovaným parametrem v rámci vývoje metody byla doba dávkování vzorku. Je známo, že elektrokinetické separační techniky včetně MEKC umožňují zkoncentrování dlouhých zón vzorku do úzkých zón [85]. Doba dávkování vzorku (5 s, 30 s, 60 s, 120 s, 180 s, 240 s, 360 s) byla testována za použití tlaku 50 mbar. Získaná data ukazují lineární nárůst plochy píku yohimbinu v obou elektrolytech (obr. 10). Nicméně s prodlužující se dobou dávkování se zároveň zhoršovala opakovatelnost analýz a rovněž jejich stabilita. Nejlepší výsledky poskytovalo dávkování po dobu 180 s (2,5 min).



Obrázek 10: Vliv doby dávkování na odezvu yohimbinu

BGE: 50 mM borát/NaOH pH 9,5 s 100 mM SDS a 10 % (v/v) methanol a 50 mM fosfát/NaOH pH 2,5 a 100 mM SDS a 10 % (v/v) methanol

Analýzy yohimbinu s interním standardem za nejlepších podmínek: (A) 50 mM borát/NaOH pH 9,5, 100 mM SDS, 10 % methanol, +10 kV, a (B) 50 mM fosfát/NaOH pH 2,5, 100 mM SDS, 10 % methanol, -10 kV jsou uvedeny na následujícím obrázku 11.



Obrázek 11: Analýzy standardu yohimbinu s interním standardem

BGE: (A) 50 mM borát/NaOH pH 9,5 s 100 mM SDS a 10 % (v/v) methanol, +10 kV a (B) 50 mM fosfát/NaOH pH 2,5 a 100 mM SDS a 10 % (v/v) methanol, -10 kV; interní standard (i.s.) kofein $5 \cdot 10^{-5}$ mol/l

5.1.2 Validace metody

Vyvinutá metoda pro stanovení yohimbinu byla následně částečně validována na základě doporučení ICH [86]. Charakteristiky validace jsou shrnuty v následující tabulce 3.

Tabulka 3: Parametry částečné validace vyvinuté metody

	50 mM fosfát/NaOH pH 2,5, 100 mM SDS, 10 % methanol, -10 kV	50 mM borát/NaOH pH 9,5, 100 mM SDS, 10 % methanol, 10 kV
Přesnost korigovaných migračních časů		
RSD (%), intraday ^a	1,1	0,9
RSD (%), interday ^a	5,4	4,8
Přesnost korigovaných ploch píku		
RSD (%), intraday ^a	2,7	2,6
RSD (%), interday ^a	9,1	8,5

	50 mM fosfát/NaOH pH 2,5, 100 mM SDS, 10 % methanol, -10 kV	50 mM borát/NaOH pH 9,5, 100 mM SDS, 10 % methanol, 10 kV
Výtěžnost (recovery)		
Výtěžnost pro 50 µg/mL	98 ± 1	99 ± 1
Výtěžnost pro 5 µg/mL	94 ± 3	96 ± 2
Kalibrace		
Linearita (µg/mL)	1 – 100	1 – 100
Koeficient determinace	0,987	0,991
LOD ^b (µg/mL)	0,82	0,67
LOQ ^b (µg/mL)	2,73	2,23

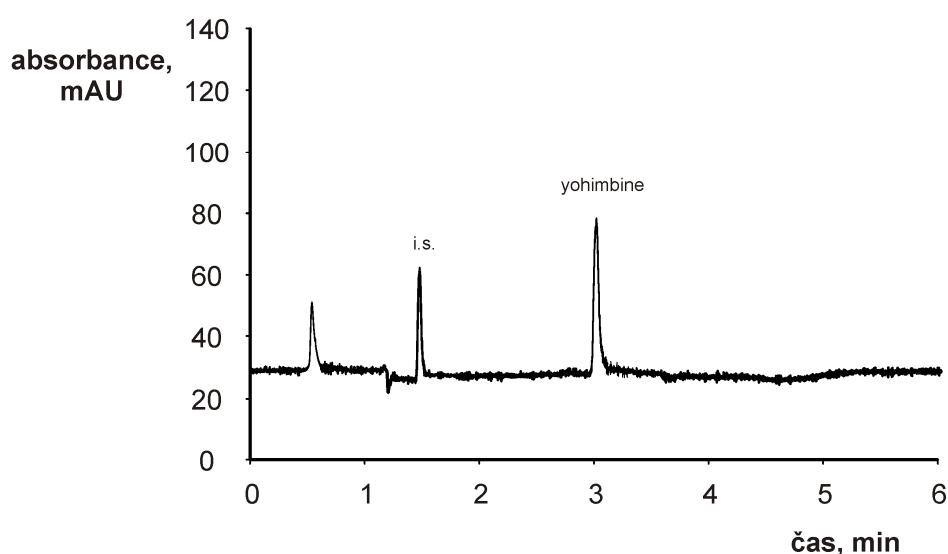
^a Přesnost byla počítána z kalibrací z poměru plochy píku a plochy píku interního standardu, přesnost „interday“ byla vypočtena jako průměr z kalibračních závislostí (kalibrace 1 µg/mL až 100 µg/mL, 5 bodů, každý bod měřen pětkrát) měřených po 4 po sobě jdoucí dny.

^b LOD a LOQ hodnoty byly vypočteny softwarem QC.Expert (Pardubice) jako hodnoty 3σ a 10σ.

Obě metody poskytly velmi dobré výsledky umožňující jejich použití pro farmaceutickou analýzu. Navíc získané hodnoty LOD a LOQ jsou nižší než v dosud publikované práci o stanovení yohimbinu za použití CE v nevodných prostředích [84]. V případě srovnání obou vyvinutých metod vychází o něco lépe metoda používající 50 mM borát/NaOH pH 9,5, 100 mM SDS s přídavkem 10 % (v/v) methanolu. Z tohoto důvodu byla tato metoda použita pro analýzu reálných vzorků farmaceutických přípravků.

5.1.3 Analýza reálných vzorků

Analýza reálných vzorků, resp. transfer vyvinuté metody na standardech do reálného světa, patří k nejdůležitějším a zároveň k nejobtížnějším úkolům. V tomto případě byly analyzovány ručně připravené farmaceutické preparáty yohimbinu získané v lékárně v Olomouci. Tyto preparáty obsahovaly 20 mg/g yohimbinu dle předpisu. 50 mM borát/NaOH pH 9,5, 100 mM SDS s přídavkem 10 % (v/v) methanolu byl použit pro analýzu celkem 10 kapslí (viz obr. 12).



Obrázek 12: Příklad analýzy obsahu kapsle přípravku s yohimbinem

BGE: 50 mM borát/NaOH pH 9,5 s 100 mM SDS a 10 % (v/v) methanol, +10 kV, interní standard (i.s.) kofein $5 \cdot 10^{-5}$ mol/l

Kvantifikace yohimbinu byla provedena metodou standardního přídavku s použitím kofeinu jako interního standardu. Ve všech analyzovaných kapslích byl zjištěn stejný obsah yohimbinu (na hladině významnosti 0,05). Průměrný obsah yohimbinu v kapslích $19,5 \pm 0,4$ mg/g byl navíc shodný s údajem deklarovaným v lékařském předpisu.

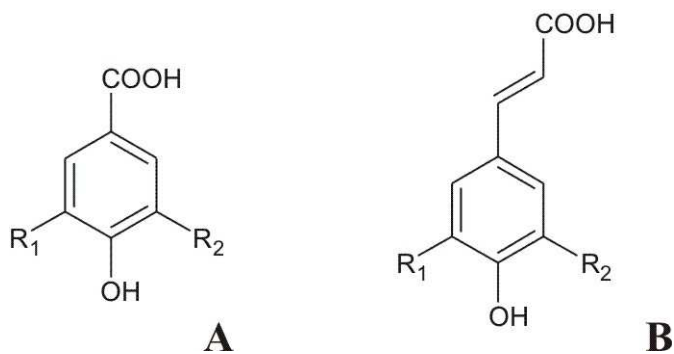
5.2 On-line elektrokinetická prekoncentrace fenolických kyselin

J. Petr, K. Vítková, V. Ranc, J. Znaleziiona, V. Maier, R. Knob, J. Ševčík, J. Agric. Food Chem. 56 (2008) 3940.

J. Petr, V. Maier, J. Znaleziiona, K. Vítková, V. Ranc, J. Ševčík, Chem. Listy 103 (2009) 661.

K. Vítková, J. Petr, V. Maier, J. Znaleziiona, J. Ševčík, Electrophoresis 31 (2010) 2771.

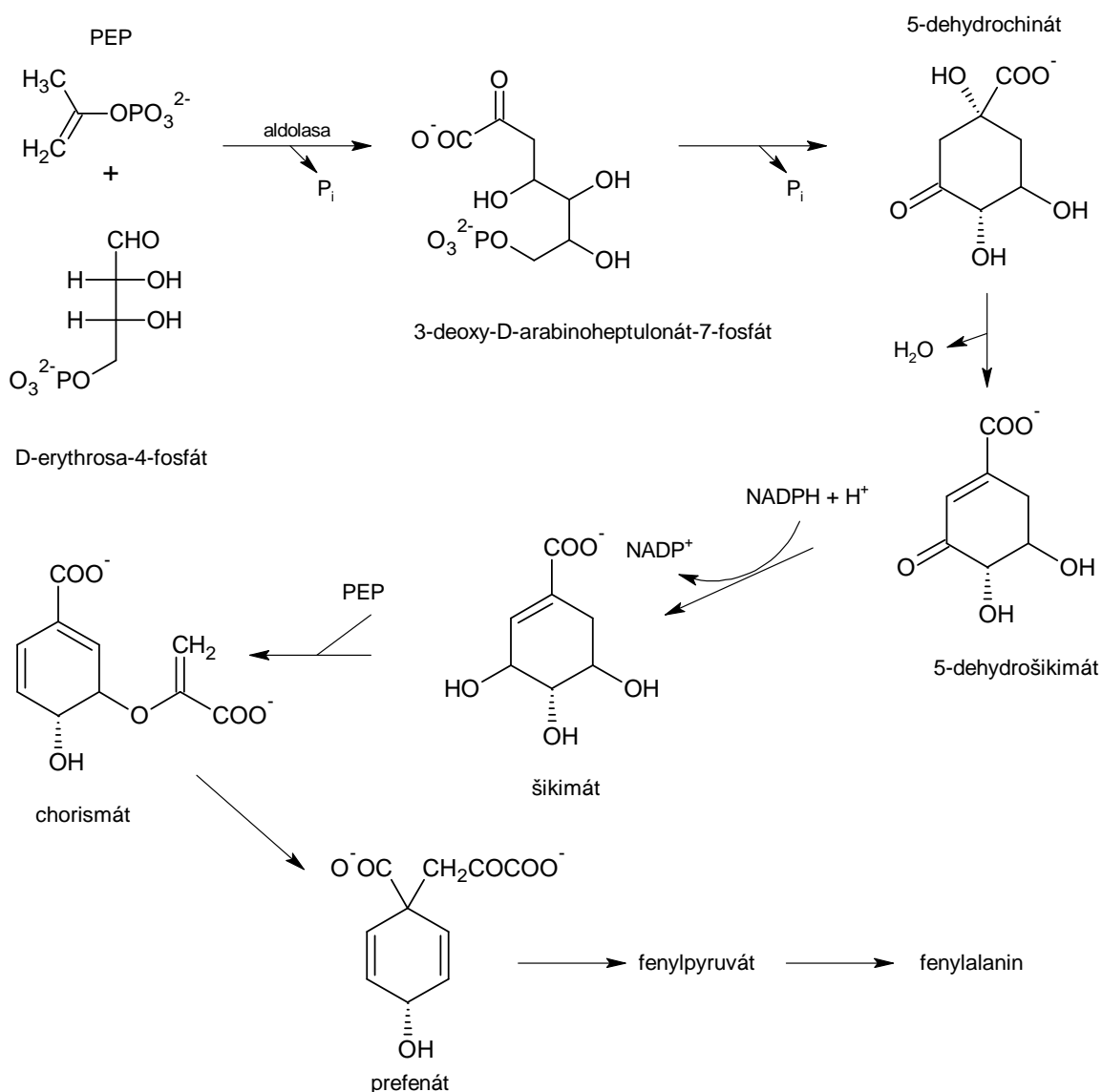
Z fenolických kyselin bylo vybráno 7 zástupců: *p*-hydroxybenzoová kyselina, syringová kyselina, vanilová kyselina, kumarínová kyselina, kávová kyselina, ferulová kyselina a sinapová kyselina (struktury viz obrázek 13), které byly separovány pomocí kapilární elektroforézy s on-line elektrokinetickou prekoncentrací. Tyto kyseliny byly vybrány z důvodu jejich četnosti v rostlinném materiálu a jejich relativní jednoduchosti.



Obrázek 13: Struktury studovaných fenolických kyselin

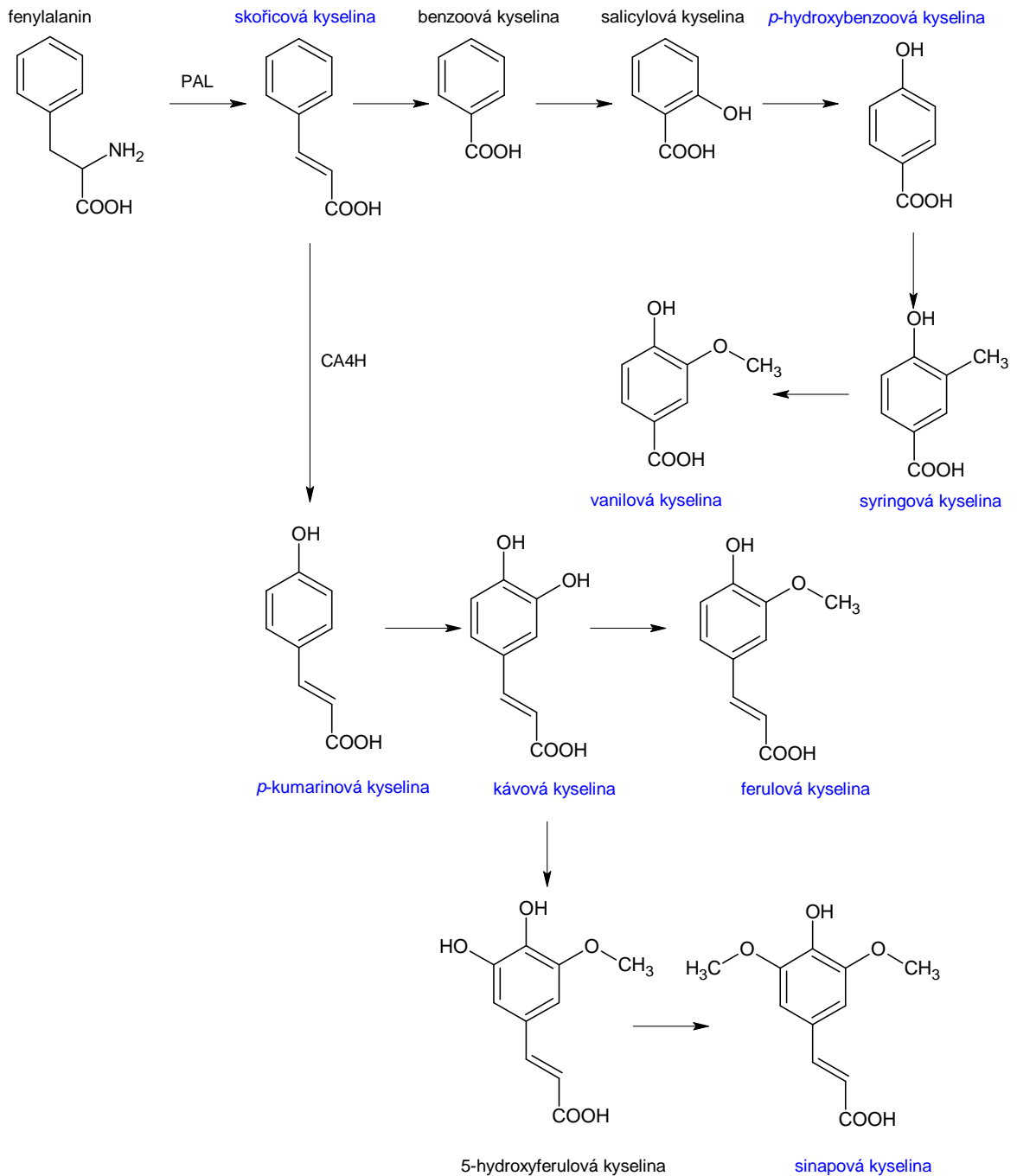
A) $R_1 = R_2 = H$, *p*-hydroxybenzoová kyselina; $R_1 = CH_3$, $R_2 = H$, syringová kyselina; $R_1 = H$, $R_2 = OCH_3$, vanilová kyselina; B) $R_1 = R_2 = H$, kumarínová kyselina; $R_1 = H$, $R_2 = OH$, kávová kyselina; $R_1 = OCH_3$, $R_2 = H$, ferulová kyselina; $R_1 = OCH_3$, $R_2 = OCH_3$, sinapová kyselina

Jejich biosyntéza probíhá skrz tzv. šikimát-chorismátovou cestu [87]. Základním krokem biosyntézy aromatických sloučenin v rostlinách je kondenzace meziprojektu glykolýzy fosfoenolpyruvátu (PEP) a meziprojektu regenerační fáze pentosového cyklu erytroza-4-fosfátu. Vznikající sedmiuhlíkový cukr za ztráty fosforylové skupiny se cyklizuje na cyklohexanový derivát 5-dehydrochinát, jehož dehydrogenací vzniká 5-dehydrošikimát, který po redukci oxoskupiny pomocí NADPH přechází na šikimát. Druhá molekula PEP pak kondenzuje s 5-fosfošikimátem za vzniku chorismátu dalšími reakcemi vzniká esenciální aminokyselina fenylalanin, viz následující obrázek 14.



Obrázek 14: Šikimát-chorismátová cesta biosyntézy fenolických kyselin

Aminokyselina fenylalanin, která vzniká šikimáto-choristámovou cestou slouží jako prekurzor pro řadu fenolických sloučenin. Syntéza skořicové kyseliny probíhá v rostlinách z aminokyseliny fenylalaninu za katalýzy fenylalaninamoniaklyasa (PAL). Skořicová kyseliny za katalýzy enzymu cinamát-4-hydroxylyasa (CA4H) přechází na *p*-kumarovou kyseliny. Další fenolické kyseliny: kávová, ferulová a sinapová kyselina vznikají z *p*-kumarové kyseliny hydroxylačními reakcemi za katalýzy mono-oxygenas a metylačními reakcemi za katalýzy enzymů O-methyltransferas. Biosyntéza derivátů benzoové kyseliny může v rostlinách probíhat různými cestami. Jednou z možností je šikimáto-choristámová cesta z chorismátu, viz obrázek 15. Dalším způsobem je degradace skořicové kyseliny a jejich produktů (flavonoidů a taninů) [88, 89].

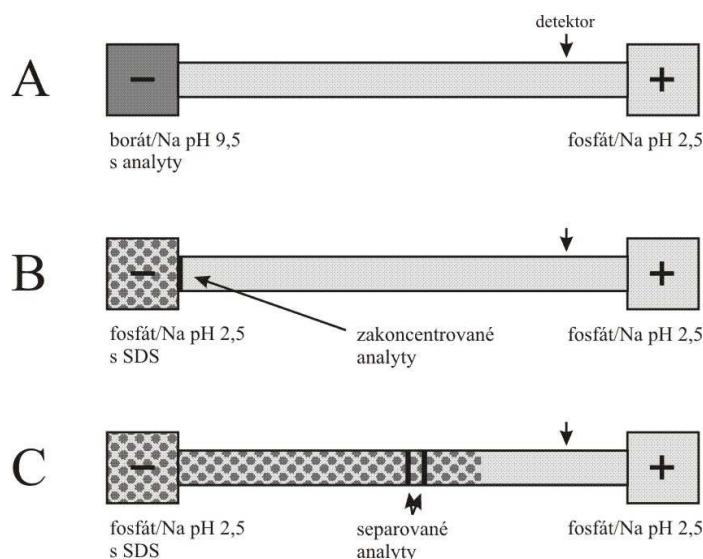


Obrázek 15: Biosyntéza derivátů skořicové a hydroxybenzoové kyseliny (studované fenolické kyseliny jsou označeny barevně)

Požité zkratky: (PAL) fenylnalaninamoniaklyasa, (CA4H) cinamát-4-hydroxylyasa

5.2.1 Elektrokinetická prekoncentrace

Fenolické kyseliny jsou slabé organické kyseliny s pK_a hodnotami v rozmezí 3 – 5, proto je možné pro jejich prekoncentraci využít metody publikované Horákovou a spol. [90]. Tato on-line elektrokinetická prekoncentrace je založena na dvou krocích (obrázek 16).



Obrázek 16: Schéma akumulární/mobilizační techniky on-line prekoncentrace

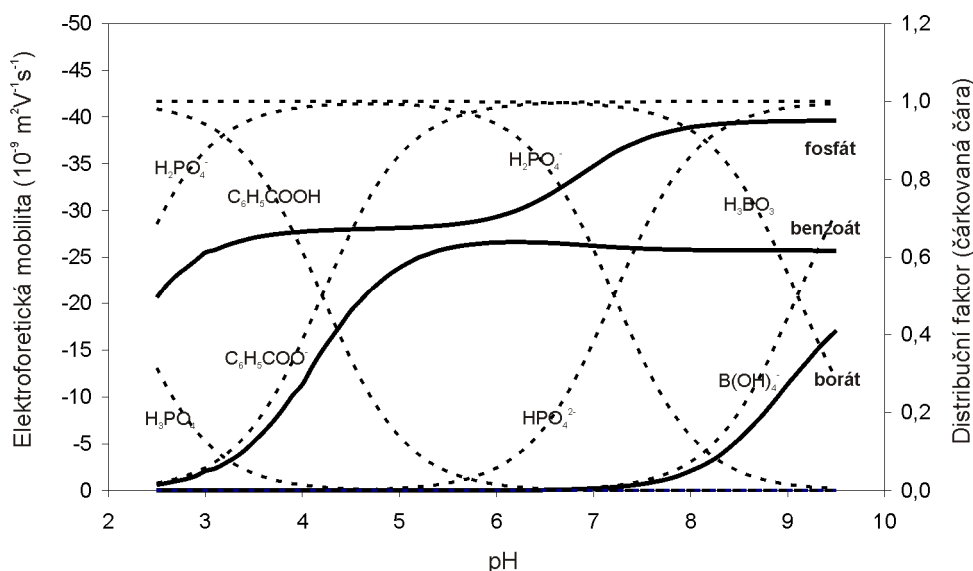
A: akumulární fáze, B a C: mobilizační fáze

V prvním dochází k elektrokinetickému dávkování slabých kyselin z prostředí o pH 9,5 do pH rozhraní tvořeném základním elektrolytem o pH 2,5. Na tomto rozhraní dochází k potlačení disociace slabých kyselin a tím k jejich zastavení a akumulaci (akumulární fáze on-line prekoncentrace). V druhé fázi, po skončení akumulace, je nutné prekoncentrované kyseliny rozseparovat. K tomu se využívá jejich schopnost interagovat s micelami SDS, kdy vstupní elektrolyt („inlet“) je nahrazen elektrolytem o pH 2,5 s SDS o koncentraci větší než je kritická micelární koncentrace. Po aplikaci napětí negativní polarity dojde k migraci SDS micel skrze prekoncentrované kyselin a díky rozdílné interakce kyselin s SDS micelami i k jejich separaci (mobilizační fáze on-line prekoncentrace).

5.2.2 Mechanismus prekoncentrace

Mechanismus metody elektrokinetické prekoncentrace byl popsán s pomocí matematického modelování v programu Simul v práci Horákové a spol. [90]. V této práci je zmiňováno vytvoření málo vodivé zóny s neutrálním pH na rozhraní obou elektrolytů, dávkovacího a základního. Vlastní prekoncentrace se odehrává pouze v této akumulární fázi, zatímco fáze mobilizační vede k rozmývání zón analytů. V práci ale není explicitně zmíněný mechanismus elektrokinetické akumulace, proto byl tento mechanismus dále studován.

Jelikož je použit jako základní elektrolyt fosfát/NaOH a jako dávkovací elektrolyt borát/NaOH, je možné předpokládat, že při analýze slabých organických kyselin dochází k tvorbě přechodného isotachoforetického stavu. Modelováním elektroforetických mobilit aniontů kyseliny borité, kyseliny fosforečné a benzoové kyseliny v programu Peakmaster (viz obrázek 17) v celém studovaném pH rozsahu 2,5 – 9,5 bylo zjištěno, že borátový anion působí v tomto systému jako ion s nejnižší mobilitou (koncový elektrolyt) a fosfátový anion jako ion s nejvyšší mobilitou (vedoucí elektrolyt).



Obrázek 17: Modelování elektroforetických mobilit složek prekoncentračního systému

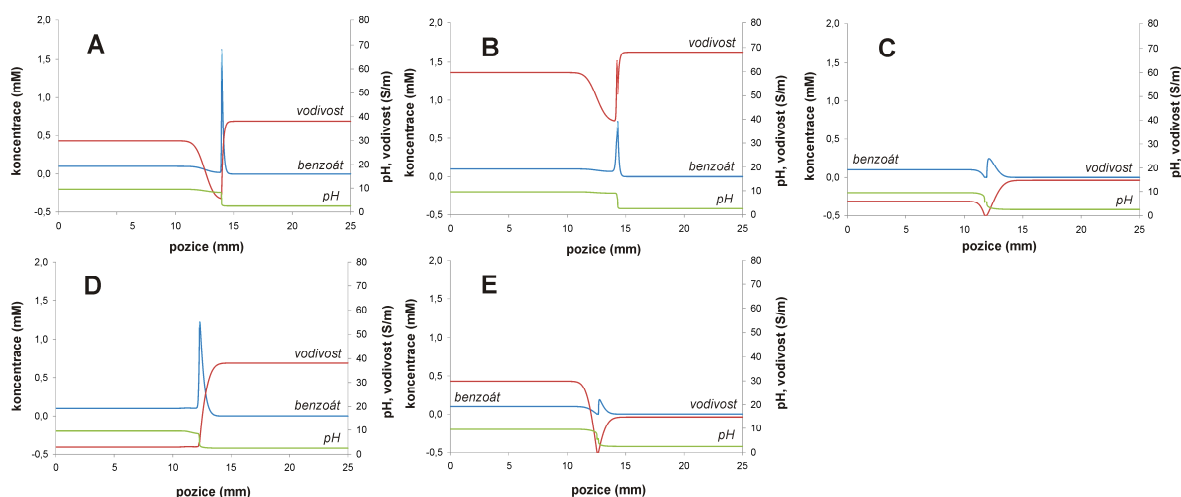
Modelováno v programu Peakmaster 5.2, použitá data jsou uvedena v Experimentální části

Druhým studovaným parametrem byla iontová síla obou elektrolytů. Bylo použito 5 modelových elektrolytů (viz tabulka 4) a provedeny příslušné matematické simulace (viz obrázek 18).

Tabulka 4: Studované prekoncentrační systémy

Systém	Složení dávkovacího elektrolytu (IE) a základního elektrolytu (BGE)	pH*	Iontová síla (mM)*	Vodivost (S/m)*
A	IE: 50 mM kyselina boritá, 35 mM NaOH	9,53	35,0	0,26
	BGE: 50 mM kyselina fosforečná, 32,5 mM NaOH	2,50	36,2	0,36
B	IE: 100 mM kyselina boritá, 70 mM NaOH	9,51	70,0	0,49
	BGE: 100 mM kyselina fosforečná, 69 mM NaOH	2,50	72,9	0,60
C	IE: 10 mM kyselina boritá, 7 mM NaOH	9,55	7,0	0,06
	BGE: 10 mM kyselina fosforečná, 4 mM NaOH	2,53	7,2	0,15
D	IE: 5 mM kyselina boritá, 3,5 mM NaOH	9,56	3,5	0,03
	BGE: 50 mM kyselina fosforečná, 32,5 mM NaOH	2,50	36,2	0,36
E	IE: 50 mM kyselina boritá, 35 mM NaOH	9,53	35,0	0,26
	BGE: 10 mM kyselina fosforečná, 4 mM NaOH	2,53	7,2	0,15

*Modelováno v programu Peakmaster 5.2, použitá data jsou uvedena v Experimentální části

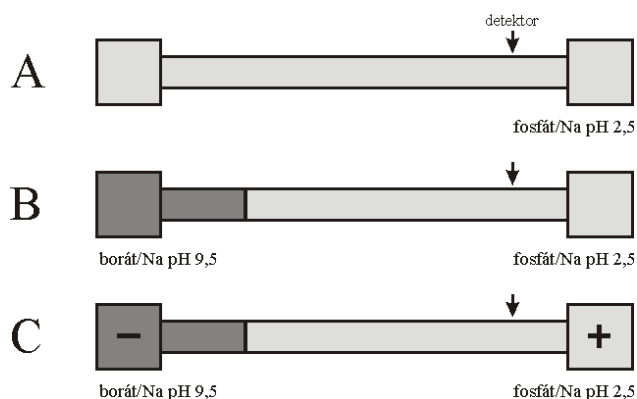


Obrázek 18: Simulace on-line prekoncentrace v různých systémech

Modelováno v programu Peakmaster 5.2, použitá data jsou uvedena v Experimentální části, simulace 200 s elektrokinetického nástřiku, pozice rozhraní na začátku simulace (v čase 0 s): 12,5 mm

Z těchto simulací vyplývá, že v případě systémů A a D, jde o stejné systémy, které mohou poskytnout stejný prekoncentrační faktor za použití stejné proudové hustoty. Vysoká iontová síla v systému B způsobuje migraci pH rozhraní. V systému C s nízkou iontovou silou obou elektrolytů nedochází k efektivní prekoncentraci z důvodu špatného přenosu náboje. A poslední systém E je systém, ve kterém dochází díky uspořádání iontové síly obou elektrolytů k rozmývání zón nikoliv prekoncentraci. Podobné výsledky byly dosaženy i v případě experimentálního studia těchto 5 systémů. Z praktického pohledu se jako nejvýhodnější jeví použití systému A nebo systému D, kde dochází k dostatečné prekoncentraci a použitá proudová hustota nepůsobí velkou generaci Jouleova tepla.

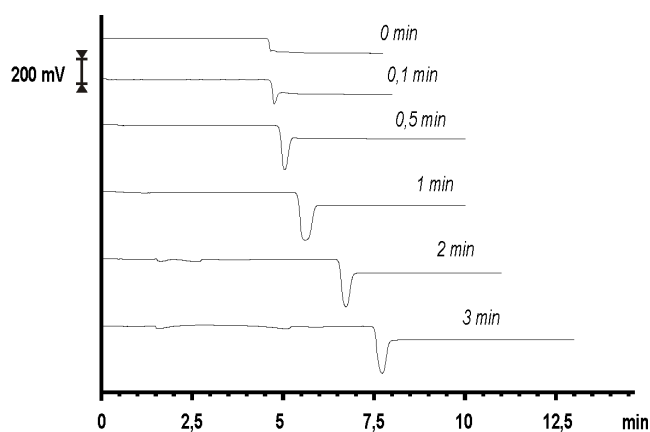
V poslední řadě bylo studováno vytvoření pH rozhraní pomocí bezkontaktní vodivostní detekce. Modelové rozhraní s základním elektrolytem 50 mM fosfát/NaOH pH 2,5 a dávkovacím elektrolytem 50 mM borát/NaOH pH 9,5 (systém A) bylo studováno v pokryté kapiláře dle schématu na obrázku 19.



Obrázek 19: Schéma modelového rozhraní v kapiláře

Kapilára byla promyta základním elektrolytem (A), pak byl dávkovací elektrolyt nadávkován tlakem 50 mbar po 120 s (B). Následně bylo aplikováno napětí po danou dobu (C) a pak byly všechny zóny vymyty do detektoru tlakem 50 mbar.

Na záznamu z bezkontaktní vodivostní detekce (obrázek 20) je zřetelně vidět vytvoření méně vodivé zóny borátu, která se pomalu pohybuje směrem k anodě.



Obrázek 20: Vizualizace migrace méně vodivé zóny borátu

Dávkovací elektrolyt: borát/NaOH pH 9,5 o iontové síle 35 mM, základní elektrolyt: fosfát/NaOH o iontové síle 36 mM

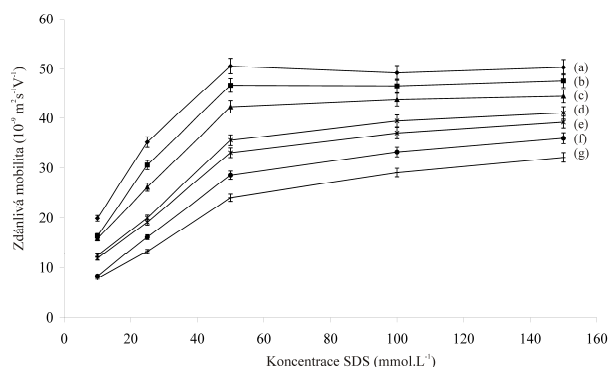
5.2.3 Vývoj metody

V rámci vývoje metody pro stanovení fenolických kyselin byl studován vliv pH obou použitých elektrolytů, vliv akumulčního i separačního napětí a vliv koncentrace SDS na separaci vybraných fenolických kyselin.

Nejprve bylo studováno pH obou elektrolytů jako jejich hlavní charakteristika odpovídající za disociaci látek. pH bylo studováno se zřetelem na kapacitu daného pufru. Kyselina fosforečná má tři disociační konstanty: pK_{a1} 2,16, pK_{a2} 7,21, pK_{a3} 12,32, kyselina boritá jednu disociační konstantu: pK_a 9,27 [39]. Z tohoto důvodu byly studovány následující hodnoty pH pro dávkovací elektrolyt 9,0, 9,5 a 10,0 a pro základní elektrolyt 2,0, 2,5 a 3,0. Základní elektrolyty s pH 2,0 a 3,0 způsobovaly nestabilitu v proudové hustotě. Zároveň opakovatelnost ploch píků fenolických kyselin v těchto elektrolytech byl daleko horší než 20 %. V případě dávkovacího elektrolytu o pH 10,0 byly plochy píků menší než v případě použití elektrolytů o pH 9,0 a 9,5. Oba elektrolyty o pH 9,0 a 9,5 vykazovaly shodné vlastnosti pro prekoncentraci kyselin, proto bylo vybráno pH 9,5, které je blíž pK_a hodnotě (a daný pufr bude mít větší pufrační kapacitu).

Dalším studovaným parametrem bylo akumulční a separační napětí. V obou případech poskytuje vyšší použité napětí vyšší proudy. Napětí bylo studováno v rozsahu od -5 kV až po -30 kV. Napětí -10 kV bylo použito jak pro akumulční fázi, tak pro mobilizační fázi, protože představuje dobrý kompromis mezi stabilitou proudů v obou fázích prekoncentrace a efektivitou prekoncentrace.

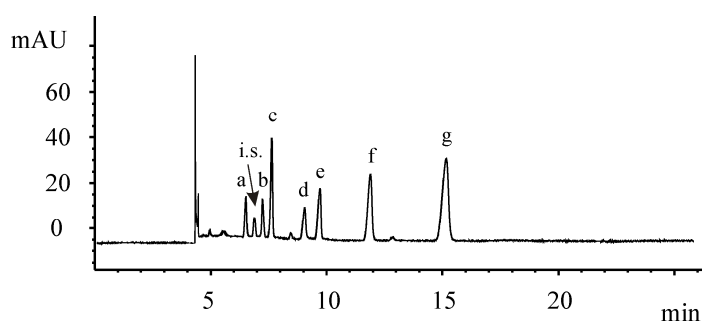
Posledním studovaným parametrem byla koncentrace SDS v mobilizačním elektrolytu. Byl studován koncentrační rozsah 10 – 150 mmol.L⁻¹. Koncentrace SDS představuje důležitý faktor, protože mechanismus vlastní separace zkoncentrovaných látek zahrnuje rozdělování mezi micely a základní elektrolyt. Nejvyšší studovaná koncentrace SDS vedla k nejrychlejší analýze a zároveň k nejvíce účinným separacím (viz obrázek 21).



Obrázek 21: Vliv koncentrace SDS na zdánlivé mobility studovaných sloučenin

(a) sinapová kys., (b) ferulová kys., (c) kumarínová kys., (d) kávová kys., (e) syringová kys., (f) vanilová kys., (g) p-hydroxybenzoová kys., podmínky: dávkovací elektrolyt 50 mM borát/NaOH pH 9,5, základní elektrolyt 50 mM fosfát/NaOH pH 2,5, mobilizační elektrolyt 50 mM fosfát/NaOH pH 2,5 s SDS, elektrokinetické dávkování -10 kV po dobu 10 min, separační napětí -10 kV, koncentrace standardů 50 ng/mL

Nicméně, v případě analýzy reálného vzorku majoránky, byla za použití 150 mM SDS dosažena nekompletní separace fenolických kyselin a matrice vzorku. Tato situace vedla k následné optimalizaci SDS koncentrace s ohledem na separaci kyselin a matrice (byla vlastně provedena „titrace“ SDS koncentrace). Výsledná koncentrace 60 mmol.L⁻¹ SDS pak vedla k úspěšné separaci fenolických kyselin a matrice, viz obr. 22.



Obrázek 22: Separace standardů fenolických kyselin

(a) sinapová kys., (b) ferulová kys., (c) kumarínová kys., (d) kávová kys., (e) syringová kys., (f) vanilová kys., (g) p-hydroxybenzoová kys., fenylalanin jako interní standard (i.s.), podmínky stejné jako na obrázku 21 s 60 mM SDS

5.2.4 Validace metody

Vyvinutá on-line prekoncentrační metoda byla částečně validována. Jednotlivé parametry validace jsou uvedeny v tabulce 5. Kalibrační závislosti byly lineární v oblasti mezi 2 ng.mL^{-1} a 100 ng.mL^{-1} (6 bodů; $n = 5$), s koeficienty determinace mezi 0,969 a 0,991.

Tabulka 5: Jednotlivé parametry validace

Kyselina	(a)	(b)	(c)	(d)	(e)	(f)	(g)
Přesnost korigovaných migračních časů*							
RSD (%) intraday	1,3	0,9	1,4	1,8	1,9	1,6	2,8
RSD (%) interday	7,6	8,9	11,0	9,7	10,3	9,6	12,1
Přesnost korigovaných ploch píků*							
RSD (%) intraday	2,5	3,2	1,9	6,5	6,3	6,6	6,9
RSD (%) interday	12,3	14,5	13,2	15,1	14,6	13,8	14,9
Výtěžnost, koeficienty determinace							
Výtěžnost (%)**	94 ± 2	94 ± 3	97 ± 2	96 ± 3	96 ± 1	98 ± 1	93 ± 3
Koef. determinace	0,984	0,993	0,986	0,993	0,981	0,985	0,976

Kyselina	(a)	(b)	(c)	(d)	(e)	(f)	(g)
Limity detekce a kvantifikace, prekoncentrační faktory							
LOD (ng/ml)	2,23	4,22	0,71	2,04	1,14	0,62	0,38
LOQ (ng/ml)	7,43	14,07	2,37	6,80	3,80	2,07	1,27
LOD MEKC metody (µg/ml)	1,61	3,29	2,87	3,32	2,89	2,35	2,14
prekoncentrační faktor [#]	723	780	4048	1627	2544	3762	5565

(a) sinapová kyselina, (b) ferulová kyselina, (c) kumarínová kyselina, (d) kávová kyselina, (e) syringová kyselina, (f) vanilová kyselina, (g) p-hydroxybenzoová kyselina

* Přesnost byla počítána z kalibrací z poměru plochy píku a plochy píku interního standardu (fenylalanin, 25 ng/ml), přesnost „interday“ byla vypočtena z kalibračních závislostí měřených po 4 po sobě jdoucí dny.

** Výtěžnost byla vypočtena z přidavku 10 ng/ml standardů fenolických kyselin do extraktu majoránky

[#] Prekoncentrační faktor byl vypočten jako poměr LOD vyvinuté metody a LOD klasické MEKC metody (BGE: 50 mM fosfát/NaOH pH 2,5 s 50 mM SDS a 10 % (v/v) MeOH)

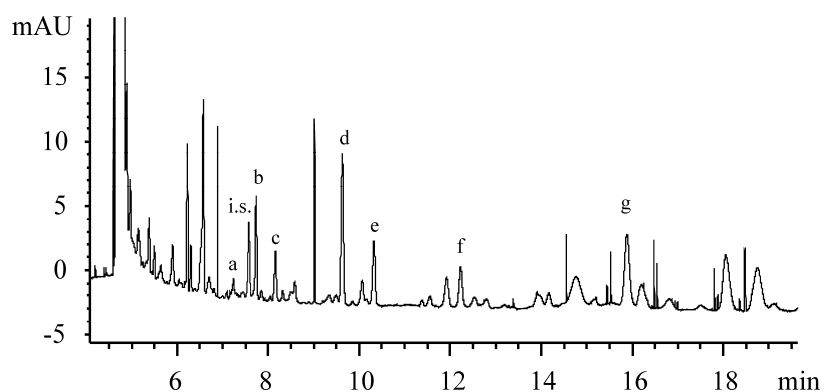
5.2.5 Analýza reálných vzorků

Pro analýzu reálných vzorků majoránky byly nejprve testovány podmínky vysokotlaké extrakce rozpouštědlem. Byly testovány extrakční teploty 50°C, 100°C, 125°C a 150°C a dvě rozpouštědla aceton a methanol při 15 MPa a dvou statických 10 min. cyklech. Pro srovnání byla provedena i 24 hodinová Soxhletova extrakce za použití obou rozpouštědel. Výtěžnosti extrakce byly stanoveny pomocí derivatizace a následné analýzy na GC-MS (viz experimentální část). Tabulka 6 reprezentuje získané hodnoty výtěžností.

Tabulka 6: Výtěžnosti extrakce fenolických kyselin z majoránky

kyselina	4-OH-benzoová	syringová	vanilová	kumarínová	kávová	ferulová	sinapová
PSE, aceton							
50°C	73 ± 1	81 ± 1	87 ± 1	89 ± 1	81 ± 4	88 ± 2	80 ± 4
100°C	99 ± 2	99 ± 2	96 ± 3	98 ± 2	99 ± 2	99 ± 2	99 ± 3
125°C	102 ± 1	98 ± 2	100 ± 1	104 ± 1	98 ± 1	103 ± 1	102 ± 3
150°C	99 ± 7	101 ± 2	104 ± 5	102 ± 1	101 ± 3	102 ± 3	102 ± 1
PSE, methanol							
50°C	88 ± 1	95 ± 3	87 ± 1	99 ± 1	106 ± 2	91 ± 1	96 ± 1
100°C	100 ± 1	101 ± 1	105 ± 2	100 ± 1	102 ± 1	100 ± 1	99 ± 2
125°C	105 ± 1	106 ± 2	109 ± 1	108 ± 1	110 ± 1	106 ± 1	104 ± 1
150°C	101 ± 1	98 ± 1	91 ± 1	97 ± 1	97 ± 1	98 ± 1	98 ± 1
Soxhletova extrakce, aceton							
24 h	96 ± 1	99 ± 2	101 ± 3	100 ± 1	103 ± 1	98 ± 2	99 ± 1
Soxhletova extrakce, methanol							
24 h	99 ± 1	100 ± 1	101 ± 1	98 ± 2	100 ± 1	100 ± 1	101 ± 1

Na základě provedených experimentů byly jako nejvýhodnější vybrány podmínky, kdy byla použita vysokotlaká extrakce acetonem při 150°C. Po extrakci byly vzorky zkoncentrovány pod proudem dusíku a rozpuštěny v dávkovacím elektrolytu 50 mM borát/NaOH pH 9,5. Takto získané vzorky majoránky byly analyzovány kapilární elektroforézou s elektrokinetickou prekoncentrací (příklad záznamu reálného vzorku je na obrázku 23).



Obrázek 23: Příklad analýzy majoránky
podmínky stejné jako na obrázku 22 s 60 mM SDS

Pomocí metody standardního přídavku a použití fenylalaninu jako interního standardu byl obsah jednotlivých kyselin kvantifikován. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 7. Je zřetelné, že obsahy jednotlivých kyselin jsou poměrně rozdílné, přesto již dříve bylo popsáno (viz teoretická část), že obsah fenolických kyselin v rostlinách závisí na regionu jejich výskytu a podmínkách (teplota, vlhkost), při kterých rostly. Vyvinutá metoda proto může být využita pro další studium analýzy fenolických kyselin v přírodních materiálech

Tabulka 7: Obsah fenolických kyselin v listech majoránky

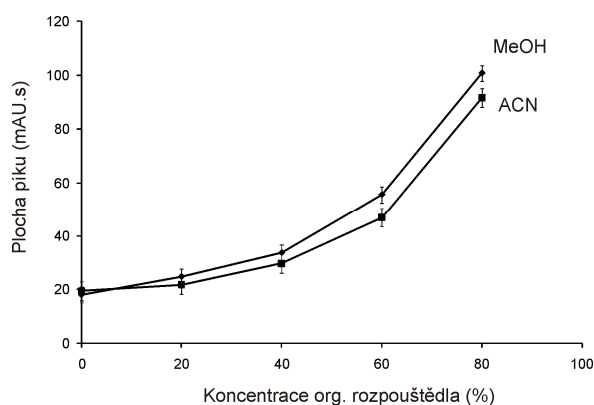
Kyselina	(a)	(b)	(c)	(d)	(e)	(f)	(g)
Koncentrace ($\mu\text{g/g}$)	11	61	7	78	16	15	29
Směrodatná odchylka ($\mu\text{g/g}$)	2	12	2	11	4	4	5

(a) sinapová kyselina, (b) ferulová kyselina, (c) kumarínová kyselina, (d) kávová kyselina, (e) syringová kyselina, (f) vanilová kyselina, (g) p-hydroxybenzoová kyselina

5.2.6 Elektrokinetické dávkování z nevodných prostředí

Organická rozpouštědla jsou obecně dobře známá jako látky ovlivňující separace v kapilární elektroforéze, například tím, že jejich přidavek do základního elektrolytu mění permitivitu, viskozitu nebo vodivost. Organická rozpouštědla lze navíc snadno použít i pro modifikaci selektivity separace (ovlivnění rozdělovacích koeficientů) nebo jako vlastní separační média v případě nevodné elektroforézy.

Z těchto důvodů byla vybrána dvě běžná organická rozpouštědla, methanol ($\epsilon = 33$, $\eta = 0,544$ mPa.s [39]) a acetonitril ($\epsilon = 36,6$, $\eta = 0,369$ mPa.s [39]), pro studium vlivu jejich přidavku do dávkovacího elektrolytu na on-line elektrokinetickou prekoncentraci. Bylo studováno koncentrační rozmezí 0 – 80 % (v/v) methanolu nebo acetonitrilu pro 10 min trvající elektrokinetické dávkování benzoové kyseliny o koncentraci 10^{-6} mol/L s dávkovacím elektrolytem 50 mM borát/NaOH pH 9,5, základním elektrolytem 50 mM fosfát/NaOH pH 2,5 a mobilizací pomocí 50 mM SDS. Nárůst koncentrace organického rozpouštědla v dávkovacím elektrolytu vedl k nelineárnímu nárůstu plochy píku odpovídající benzoové kyselině (obrázek 24).



Obrázek 24: Plocha píku benzoové kyseliny v závislosti na koncentraci organického rozpouštědla v dávkovacím elektrolytu

Dávkovací elektrolyt: 50 mM borát/NaOH pH 9,5 s organickým rozpouštědlem, základní elektrolyt: 50 mM fosfát/NaOH pH 2,5, mobilizace pomocí 50 mM SDS, dávkování benzoové kyseliny o koncentraci 10^{-6} mol/l

Avšak opakovatelnost profilu proudu při elektrokinetickém dávkování se zhoršovala se zvyšující se koncentrací organické složky v elektrolytu. Tvar křivky na obrázku 24 lze vysvětlit třemi efekty, které se zároveň odehrávají při této prekoncentraci:

1) V nevodném prostředí dochází ke změně v disociaci benzoové kyseliny a zároveň je efektivní mobilita kyseliny ovlivněna i změnami v permitivitě a viskozitě prostředí.

2) Vodivost dávkovacího elektrolytu se znatelně mění s přidavkem organické složky, což může mít za následek změnu v intenzitě elektrického pole dané zóny, a tím i může dojít i k většímu efektu prekoncentrace. Z tohoto důvodu byla pomocí kapilární elektroforézy měřena vodivost elektrolytů dle metody, kterou publikoval Francois a spol. [91], detaily viz experimentální část. Výsledky měření shrnuje následující tabulka 8.

Tabulka 8: Vodivosti použitých dávkovacích elektrolytů

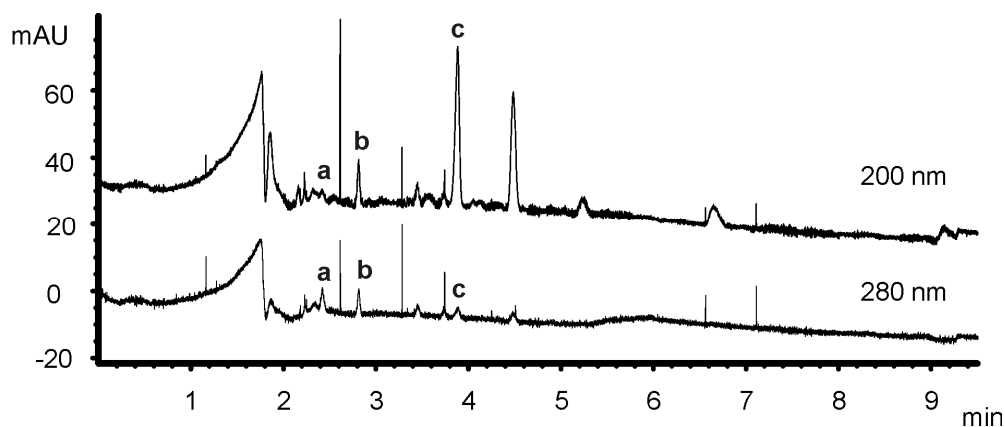
Koncentrace org. rozpouštědla	Vodivost (S/m)*	
	borát/NaOH pH 9,5 s methanolem	borát/NaOH pH 9,5 s acetonitrilem
0 %	0,720	
20 %	0,482	0,567
40 %	0,334	0,439
60 %	0,242	0,294
80 %	0,186	0,197

*aritmetický průměr z 5 hodnot, hodnoty R.S.D. nepřekročily 3 %

Je patrné, že vodivosti elektrolytů klesají s rostoucí koncentrací organické složky, přičemž v případě methanolu dochází k většímu poklesu vodivosti než v případě acetonitrilu, což odpovídá jejich permitivitám.

3) Elektrokinetické dávkování je obecně ovlivněno dalšími ionty přítomnými v roztoku vzorku, protože dochází k jejich nadávkování v ten samý čas, jako je dávkován analyt, a zároveň je jejich množství úměrné jejich mobilitám. Z tohoto hlediska se zvýšením koncentrace organického rozpouštědla v dávkovacím elektrolytu sníží koncentrace koiontů dávkovacího elektrolytu, což může vést rovněž k zvýšení nadávkovaného množství kyseliny benzoové.

Použití 80 % (v/v) methanolu v dávkovacím elektrolytu vedlo k nejzajímavějším výsledkům z hlediska efektivity prekoncentrace, resp. prekoncentračního faktoru. Směs kyselin benzoové, ferulové a skořicové rozpuštěných v borátu/NaOH pH 9,5 s 80 % (v/v) methanolu byla analyzována s 30 minutovým elektrokinetickým dávkováním při -10 kV. Příklad separace je uvedený na obrázku 25.



Obrázek 25: Příklad on-line elektrokinetické prekoncentrace vybraných fenolických kyselin za použití methanolem modifikovaného dávkovacího elektrolytu

(a) skořicová kyselina, (b) ferulová kyselina, (c) benzoová kyselina, dávkovací elektrolyt: 50 mM borát/NaOH pH 9,5 s 80 % (v/v) methanolu, základní elektrolyt: 50 mM fosfát/NaOH pH 2,5, mobilizace pomocí 50 mM SDS při -20 kV, elektrokinetické dávkování 30 min při -20 kV

Data z kalibračních závislostí v rozsahu 0,5 – 50 nmol/l jsou uvedena v tabulce 9 (plochy píků byly evaluovány při 200 nm pro benzoovou a ferulovou kyselinu a při 280 nm pro skořicovou kyselinu). Detekční limity dosažené touto modifikovanou metodou jsou v porovnání s detekčními limity získané klasickou micelární elektrokinetickou chromatografií více jak 70000-krát nižší. Rovněž v případě srovnání s jinými technikami on-line prekoncentrace se jeví vyvinutá metoda jako velice účinná.

Tabulka 9: Vybrané parametry kalibrace

	skořicová kys.	ferulová kys.	benzoová kys.
Přesnost migračních časů (RSD %)	2,3	1,9	2,1
Přesnost ploch píků (RSD %)	5,8	4,1	6,2
Koeficient determinace	0,983	0,976	0,977
LOD (nmol/l)	1,01	0,66	0,32
LOD (ng/ml)	0,150	0,128	0,039
LOD MEKC metody (μg/ml)	3,72	3,29	2,85
Prekoncentrační faktor [#]	24861	25671	72906

[#] Prekoncentrační faktor byl vypočten jako poměr LOD vyvinuté metody (v ng/ml) a LOD klasické MEKC metody (BGE: 50 mM fosfát/NaOH pH 2,5 s 50 mM SDS a 10 % (v/v) MeOH)

Je zřejmé, že využití této organickým rozpouštědlem modifikované elektrokinetické akumulace bude mít omezení v případě analýzy reálných vzorků, kde vzorek obsahuje i další ionty kromě analyzovaných slabých kyselin. Přesto za použití vhodné předúpravy může tato metoda směle konkurovat jiným v současnosti v praxi hojně používaným analytickým technikám (např. HPLC).

6 Závěry

V této práci jsem se snažila podat informace o možnostech analýzy fyziologicky aktivních látek v rostlinném materiálu pomocí separačních technik, především kapilární elektroforézy. V první části práce byla vyvinuta metoda pro stanovení yohimbinu v léčivech připravených z rostlinných extraktů pomocí micelární elektrokinetické chromatografie. V druhé části práce pak byla vyvinuta metoda pro extrakci vybraných fenolických kyselin z majoránky zahradní a jejich následnou analýzu pomocí kapilární elektroforézy s on-line elektrokinetickou prekoncentrací. Jako poslední bod byla tato metoda prekoncentrace dále vylepšena pomocí použití částečně nevodného dávkovacího prostředí. Lze shrnout, že kapilární elektroforéza je vhodná technika pro analýzu fyziologicky aktivních látek v rostlinném materiálu. Navíc použití nevodných prostředí pro analýzu, případně prekoncentraci, vybraných látek se jeví jako velice zajímavé a nabízí mnoho dalších možností, jak pro optimalizaci vlastního analytického procesu, tak pro vývoj naprosto nových prekoncentračních technik.

7 Literatura

- [1] J. Velíšek, J. Hajšlová: *Chemie potravin I. a II.* OSSIS 2009.
- [2] B. Králová a kol.: *Bioanalytické metody.* Vydavatelství VŠCHT Praha 2001.
- [3] D. A. Skoog, F. J. Holler, S. R. Crouch: *Principles of Instrumental Analysis.* Thomson Brooks/Cole, 2007.
- [4] R. Shellie, P. Marriott: *Flav. Fragn. J.* 18 (2003) 179.
- [5] Z. Yang: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 40 (2006) 516.
- [6] J. Cochran: *J. Chromatogr. A* 1186 (2008) 202.
- [7] Y. Picó, M. Fernandez, M. J. Ruiz, G. Font: *J. Biochem. Biophys. Met.* 70 (2007) 117.
- [8] M. Castro-Puyana, V. García-Canas, C. Simó, A. Cifuentes: *Electrophoresis* 33 (2012) 147.
- [9] A. Csikkel-Szolnoki, M. Bathori, G. Blunden: *Microchem. J.* 67 (2000) 39.
- [10] W. Eisenreich, A. Bacher: *Phytochemistry* 68 (2007) 2799.
- [11] C. Crews, F. Berthiller, R. Krska: *Anal. Bioanal. Chem.* 396 (2010) 327.
- [12] M. E. Cartea, M. Francisco, P. Soengas, P. Velasco: *Molecules* 16 (2011) 251.
- [13] N. Hounsome, B. Hounsome, D. Tomos, G. Edwards-Jones: *J. Food Sci.* 73 (2008) R48.
- [14] R. K. Devappa, H. P. S. Makkar, K. Becker: *J. Agric. Food Chem.* 58 (2010) 6543.
- [15] J. C. M. S. Moura, C. A. V. Bonine, J. D. F. Viana, M. C. Dornelas, P. Mazzafera: *J. Integrat. Plant Biol.* 52 (2010) 360.
- [16] H. Ashihara, H. Sano, A. Crozier: *Phytochemistry* 69 (2008) 841.
- [17] L. Zhang, G. Y. Kai, B. B. Lu, H. M. Zhang, K. X. Tang, J. H. Jiang, W. S. Chen: *J. Integrat. Plant Biol.* 47 (2005) 136.
- [18] F. Maggi, L. Barboni, G. Caprioli, F. Papa, M. Ricciutelli, G. Sagratini, S. Vittori: *Fitoterapia* 82 (2011) 1215.
- [19] F. Ahrabi, S. Enteshari, A. Moradshahi: *J. Med. Plant. Res.* 5 (2011) 5104.
- [20] S. Rochfort, J. Panozzo: *J. Agric. Food Chem.* 55 (2007) 7981.
- [21] E. Bursal, I. Gulcin: *Food Res. Int.* 44 (2011) 1482.
- [22] Y.-L. Li, C.-X. Ding, H.-L. Wang, Y. R. Suo, J.-M. You, G.-C. Chen: *J. Anal. Chem.* 63 (2008) 574.

- [23] E. Ormeno, A. Goldstein, U. Niinemets: *TrAC – Trends Anal. Chem.* 30 (2011) 978.
- [24] H.-W. Heldt, B. Piechulla: *Plant Biochemistry*. Academic Press 2010.
- [25] J.-S. Jeon, K.-H. Jung, H.-B. Kim, J.-P. Suh, G.-S. Khush: *J. Plant Biol.* 54 (2011) 1.
- [26] W. H. Lewis, M. P. F. Elvin-Lewis: *Medical Botany: Plants Affecting Human Health*. Wiley 2003.
- [27] W. P. He, B. K. Huang: *J. Med. Plant. Res.* 5 (2011) 3595.
- [28] X.-J. Chen, J. Zhao, Y.-T. Wang, L.-Q. Huang, S.-P. Li: *Electrophoresis* 33 (2012) 168.
- [29] G. Lin, P. Li, S.-L. Li, S.-W. Chan: *J. Chromatogr. A* 935 (2001) 321.
- [30] R. E. Wrolstad, T. E. Acree, E. A. Decker, M. H. Penner, D. S. Reid, S. J. Schwartz, C. F. Shoemaker, D. M. Smith, P. Sporns (eds.): *Handbook of Food Analytical Chemistry*. Wiley Interscience 2004.
- [31] B. Papoušková, P. Bednář, K. Hron, J. Stávek, J. Balík, R. Myjavcová, P. Barták, E. Tomanková, K. Lemr: *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 7581.
- [32] K. A. Aliferis, P. A. Tarantilis, P. S. Harizanis, E. Alissandrakis: *Food Chem.* 121 (2012) 856.
- [33] A. Cifuentes: *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 7109.
- [34] B. Casado, M. Affolter, M. Kussmann: *J. Proteom.* 73 (2009) 196.
- [35] B. Peres, N. Barlet, G. Loiseau, D. Montet: *Food Control* 18 (2007) 228.
- [36] H. H. Lauer, G. P. Rozing: *High Performance Capillary Electrophoresis: A primer*. Agilent Technologies 2009.
- [37] M. G. Khaledi (ed.): *High Performance Capillary Electrophoresis: Theory, Techniques, and Applications*. Wiley Interscience 1998.
- [38] J. P. Landers (ed.): *Handbook of Capillary and Microchip Electrophoresis and Associated Techniques*. CRC Press 2008.
- [39] D. R. Lide (ed.): *CRC Handbook of Chemistry and Physics*. CRC Press 2004.
- [40] C. Schwer, E. Kenndler: *Anal. Chem.* 63 (1991) 1801.
- [41] M. S. Bello, L. Capelli, P. G. Righetti: *J. Chromatogr. A* 684 (1994) 311.
- [42] B. J. Kirby, E. F. Hasselbrink: *Electrophoresis* 25 (2004) 187.
- [43] E. Kenndler: *Electrophoresis* 30 (2009) S101.

- [44] T. Tsuda: *J. High Res. Chromatogr.* 10 (1987) 622.
- [45] J. Znalezionna, J. Petr, R. Knob, V. Maier, J. Ševčík: *Chromatographia* 67 (2008) S5.
- [46] T. F. Jiang, Y. L. Gu, B. Liang, J. B. Li, Y. P. Shi, Q. Y. Ou: *Anal. Chim. Acta* 479 (2003) 249.
- [47] Y. Liu, J. C. Fanguy, J. M. Bledsoe, C. S. Henry: *Anal. Chem.* 72 (2000) 5939.
- [48] W. Schutzner, G. Caponecchi, S. Fanali, A. Rizzi, E. Kenndler: *Electrophoresis* 15 (1994) 769.
- [49] F. M. Everaerts, J. L. Beckers, T. P. E. M. Verheggen: *Isotachophoresis. Theory, Instrumentation and Applications.* Elsevier 1976.
- [50] J. Petr, V. Maier, J. Horáková, J. Ševčík, Z. Stránský: *J. Sep. Sci.* 29 (2006) 2705.
- [51] E. Zubritsky: *Anal. Chem.* 74 (2002) 22A.
- [52] M. Horká, F. Růžička, J. Horký, V. Holá, K. Šlais: *J. Chromatogr. B* 841 (2006) 152.
- [53] J. Ostergaard, N. H. H. Heegaard: *Electrophoresis* 27 (2006) 2590.
- [54] S. P. Porras, E. Kenndler: *J. Chromatogr. A* 1037 (2004) 455.
- [55] S. Karenga, Z. El Rassi: *Electrophoresis* 32 (2011) 90.
- [56] J. Petr, V. Maier, J. Ševčík v knize: Z. He (ed.): *Capillary Electrophoresis: Fundamentals, Techniques, and Applications*, v tisku.
- [57] M. A. Strausbauch, S. J. Xu, J. E. Ferguson, M. E. Nunez, D. Machacek, G. M. Lawson, P. J. Landers: *J. Chromatogr. A* 717 (1995) 279.
- [58] S. L. Simpson, J. P. Quirino, S. Terabe: *J. Chromatogr. A* 1184 (2008) 504.
- [59] Z. Malá, P. Gebauer, P. Boček: *Electrophoresis* 32 (2011) 116.
- [60] M. C. Breadmore, M. Dawod, J. P. Quirino: *Electrophoresis* 32 (2011) 127.
- [61] D. S. Burgi, R.-L. Chien: *Anal. Chem.* 63 (1991) 2042.
- [62] S. Locke, D. Figeys: *Anal. Chem.* 72 (2000) 2684.
- [63] F. Foret, E. Szöko, B. L. Karger: *J. Chromatogr.* 608 (1992) 3.
- [64] J. Petr, S. Gerstmann, H. Frank: *J. Sep. Sci.* 29 (2006) 2256.
- [65] J. Horáková, J. Petr, V. Maier, J. Znalezionna, A. Staňová, J. Marák, D. Kaniansky, J. Ševčík: *J. Chromatogr. A* 1155 (2007) 193.
- [66] R. Aebersold, H. D. Morrison: *J. Chromatogr.* 516 (1990) 79.
- [67] P. Britz-McKibbin, D. D. Y. Chen: *Anal. Chem.* 72 (2000) 1242.

- [68] J. P. Quirino, S. Terabe: *Science* 282 (1998) 465.
- [69] J. P. Quirino, J.-B. Kim, S. Terabe: *J. Chromatogr. A* 965 (2002) 357.
- [70] J. P. Quirino, S. Terabe: *Anal. Chem.* 72 (2000) 1023.
- [71] B. Gaš, J. Zuska, P. Coufal, T. van de Goor: *Electrophoresis* 23 (2002) 3520.
- [72] <http://www.natur.cuni.cz/gas>
- [73] M. Jaroš, V. Hruška, M. Štědrý, I. Zusková, B. Gaš: *Electrophoresis* 25 (2004) 3080.
- [74] C. Schwer, B. Gaš, F. Lottspeich, E. Kenndler: *Anal. Chem.* 65 (1993) 2108.
- [75] V. Hruška, M. Jaroš, B. Gaš: *Electrophoresis* 27 (2006) 984.
- [76] M. Štědrý, M. Jaroš, V. Hruška, B. Gaš: *Electrophoresis* 25 (2004) 3071.
- [77] T. Hirokawa, M. Nishino, N. Aoki, Y. Kiso, Y. Sawamoto, T. Yagi, J.-I. Akiyama: *J. Chromatogr.* 271 (1983) D1.
- [78] Z. Malá, P. Gebauer, P. Boček: *Electrophoresis* 30 (2009) 866.
- [79] S. W. Tam, M. Worcel, M. Wyllie: *Pharmacol. Therap.* 91 (2001) 215.
- [80] A. J. Riley: *J. Clin. Practic.* 48 (1994) 133.
- [81] K. Valentová, P. Entnerová, J. Urbaníková, V. Šimánek: *Chem. Listy* 98 (2004) 1119.
- [82] P. Le Corre, G. Dollo, F. Chevanne, R. Le Verge: *Eur. J. Pharm. Sci.* 9 (1999) 79.
- [83] M.-L. Riekkola, S. K. Wiedmer, I. E. Valko, H. Siren: *J. Chromatogr. A* 792 (1997) 13.
- [84] Q. Chen, P. Li, Z. Zhang, K. Li, J. Liu, Q. Li: *J. Sep. Sci.* 31 (2008) 2211.
- [85] M. Silva: *Electrophoresis* 30 (2009) 50.
- [86] H. Wätzig, M. Degenhardt, A. Kunkel: *Electrophoresis* 19 (1998) 2695.
- [87] E. A. Haddock, R. K. Gupta, S. M. K. Al-Shafi, K. Layden, E. Haslam, D. Magnolato: *Phytochemistry* 21 (1982) 1049.
- [88] J.-J. Macheix, A. Fleuriet, J. Billot: *Fruit Phenolics*. CRC Press 1990.
- [89] P. M. Dey, J. B. Harborne (eds.): *Plant Biochemistry*. Academic Press 1997.
- [90] J. Horáková, J. Petr, V. Maier, E. Tesařová, L. Veis, D. W. Armstrong, B. Gaš, J. Ševčík: *Electrophoresis* 28 (2007) 1540.
- [91] Y. Francois, K. Zhang, A. Varenne, P. Gareil: *Anal. Chim. Acta* 562 (2006) 164.

8 Přílohy

MS spektra silyl derivátů fenolických kyselin

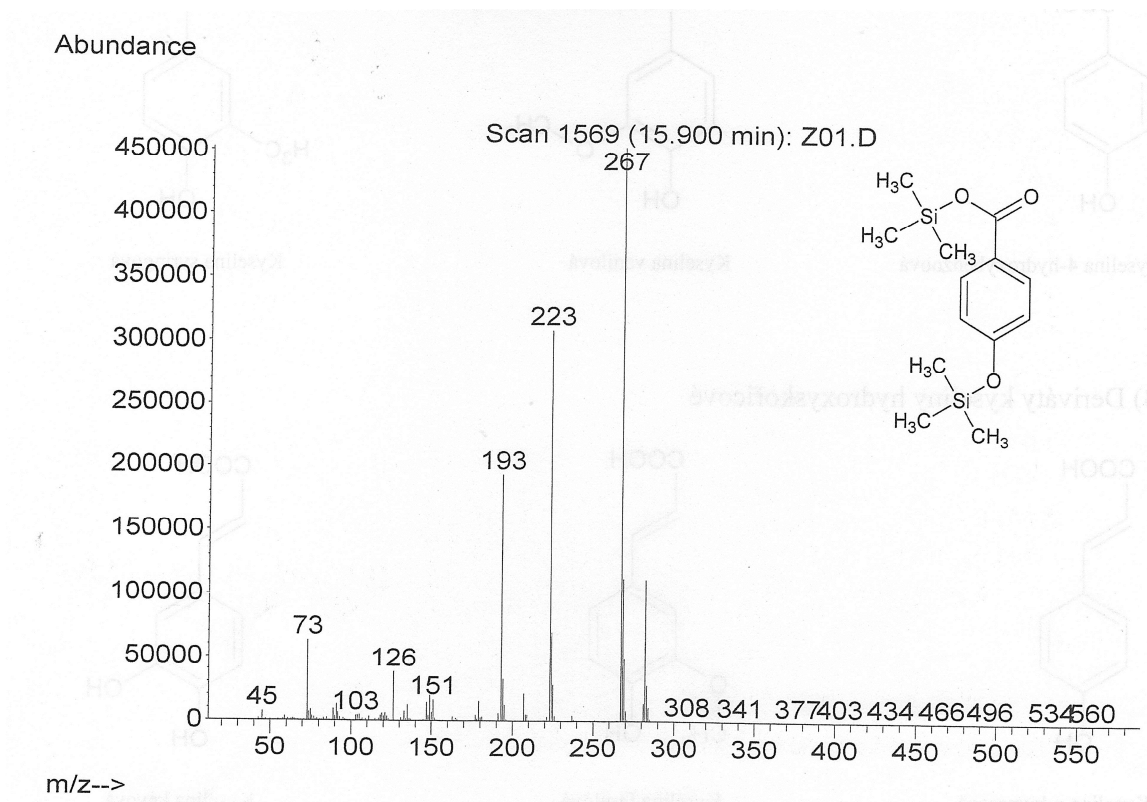
Reprinty článků:

K. Vítková, M. Pechová, J. Petr, J. Znalezona, V. Ranc, V. Maier, J. Ševčík: A fast determination of yohimbine in pharmaceuticals by micellar electrokinetic chromatography. *Cent. Eur. J. Chem.* 2010, 8, 273-277.

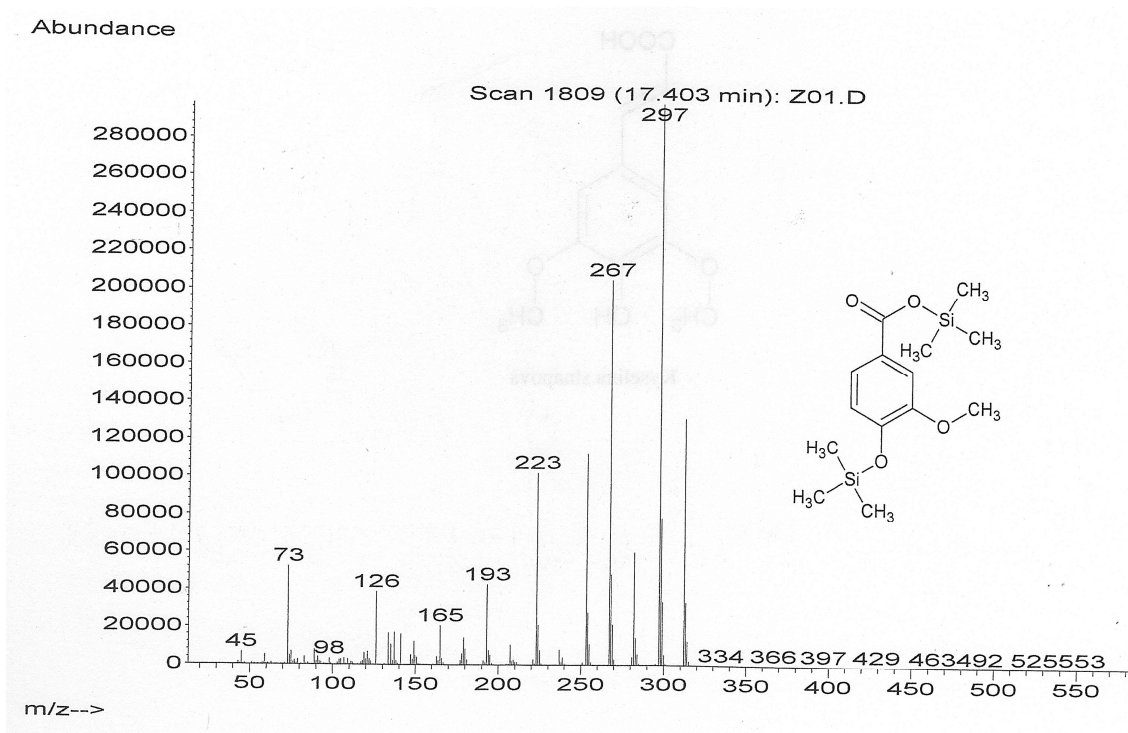
J. Petr, K. Vítková, V. Ranc, J. Znalezona, V. Maier, R. Knob, J. Ševčík: Determination of some phenolic acids in *Majorana hortensis* by capillary electrophoresis with online electrokinetic preconcentration. *J. Agric. Food Chem.* 2008, 56, 3940-3944.

K. Vítková, J. Petr, V. Maier, J. Znalezona, J. Ševčík: Study of electromigration effects on a pH boundary during the on-line electrokinetic preconcentration by capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 2010, 31, 2771-2777.

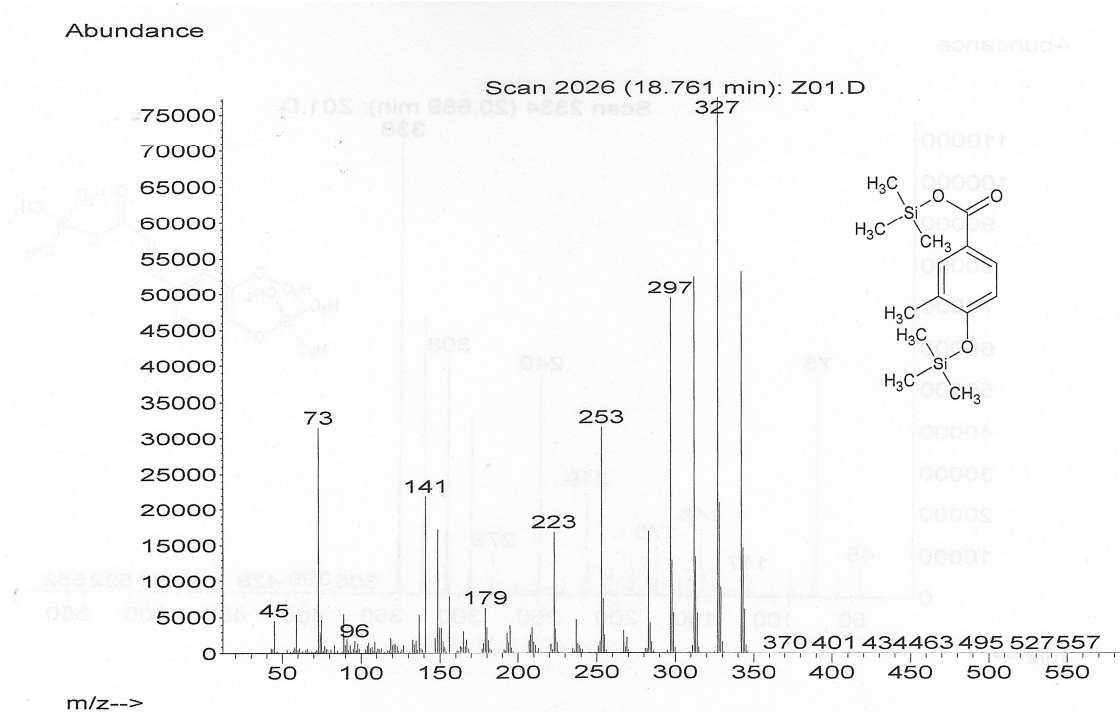
Příloha: MS spektra silyl derivátů analyzovaných fenolických kyselin



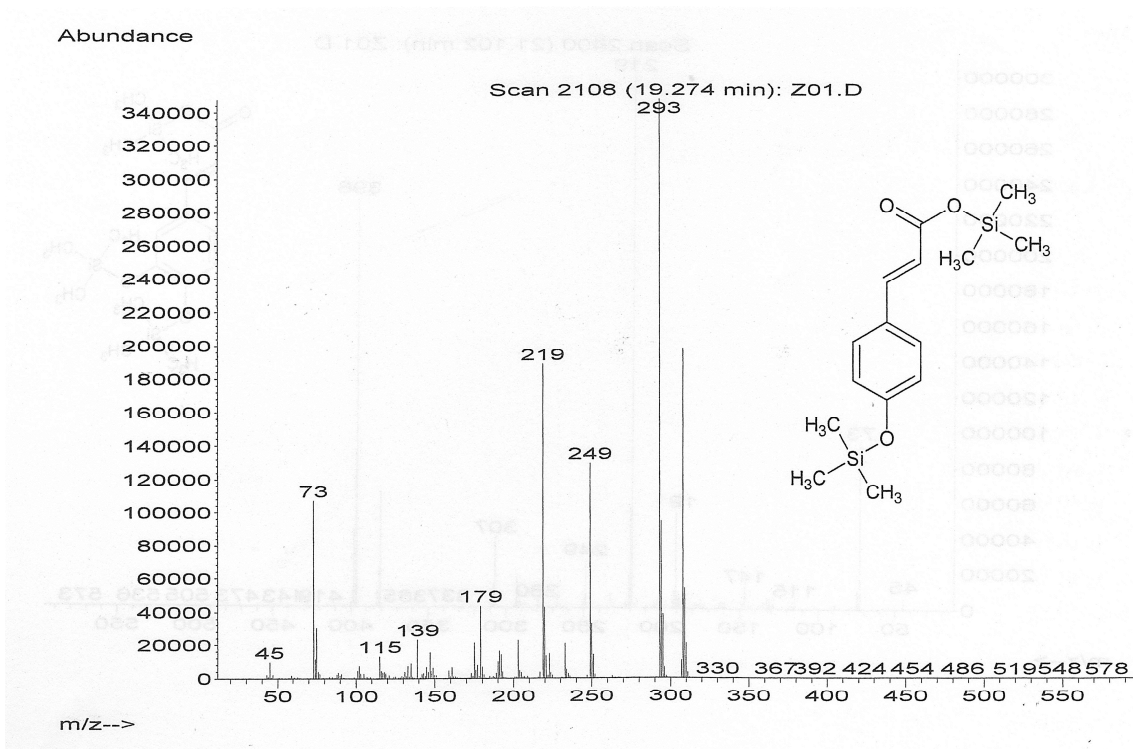
Obrázek S1: Derivát p-hydroxybenzoové kyseliny



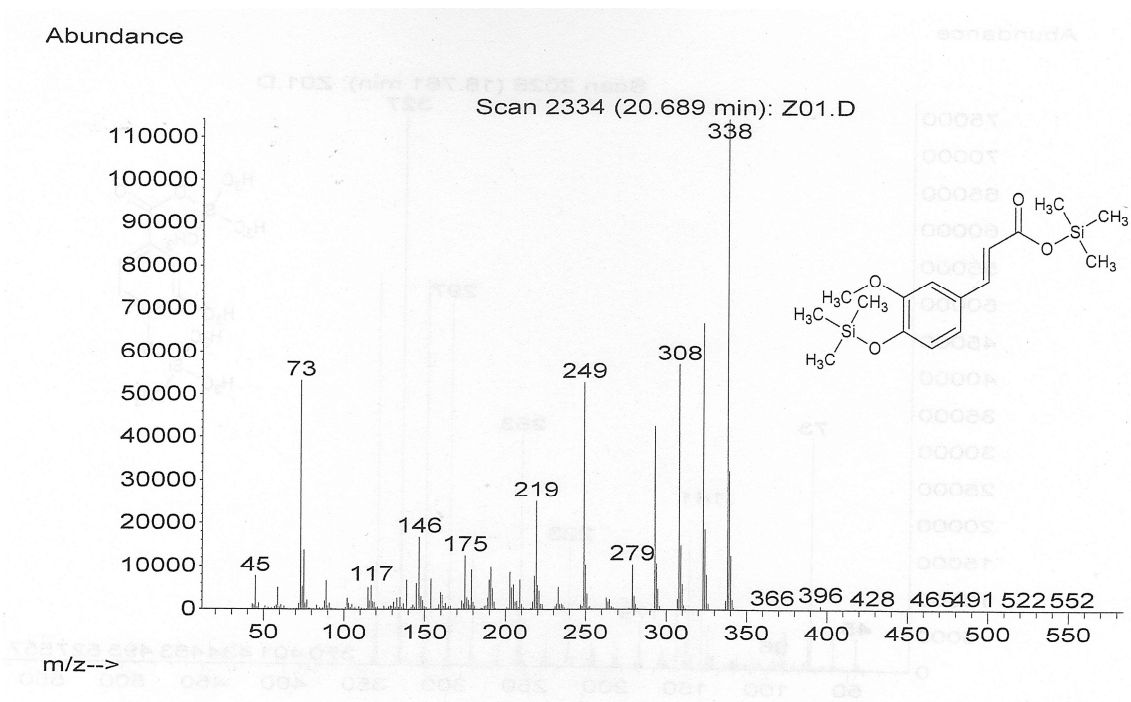
Obrázek S2: Derivát vanilové kyseliny



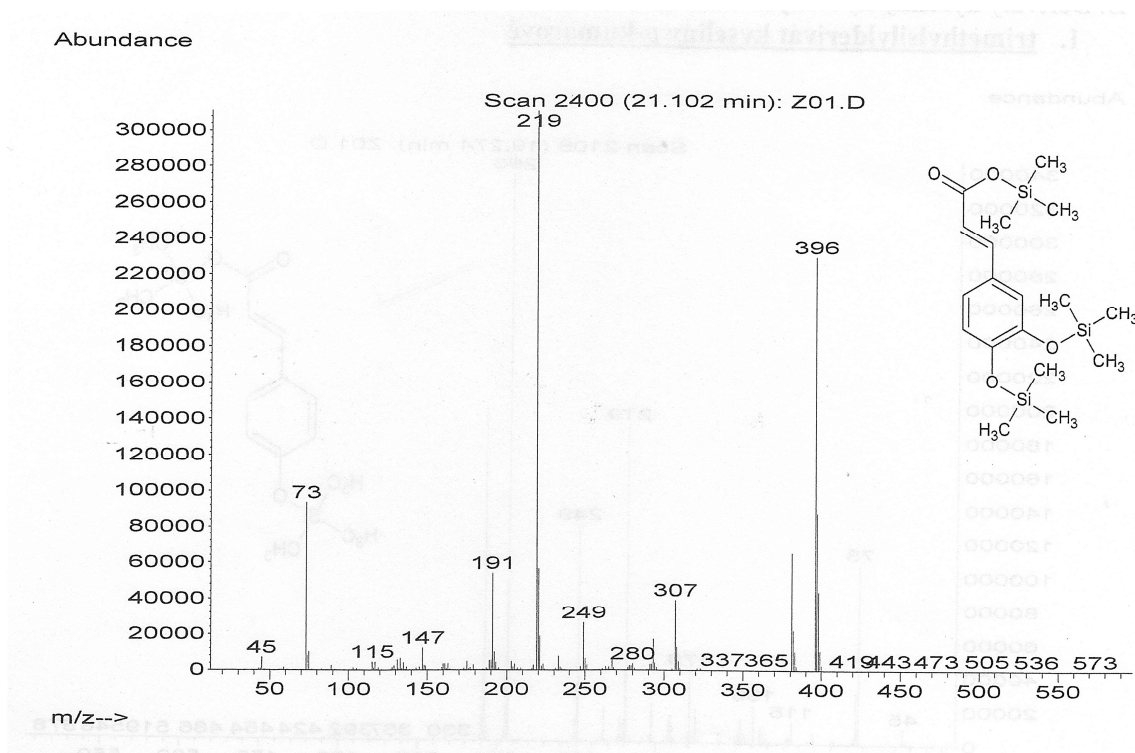
Obrázek S3: Derivát syringové kyseliny



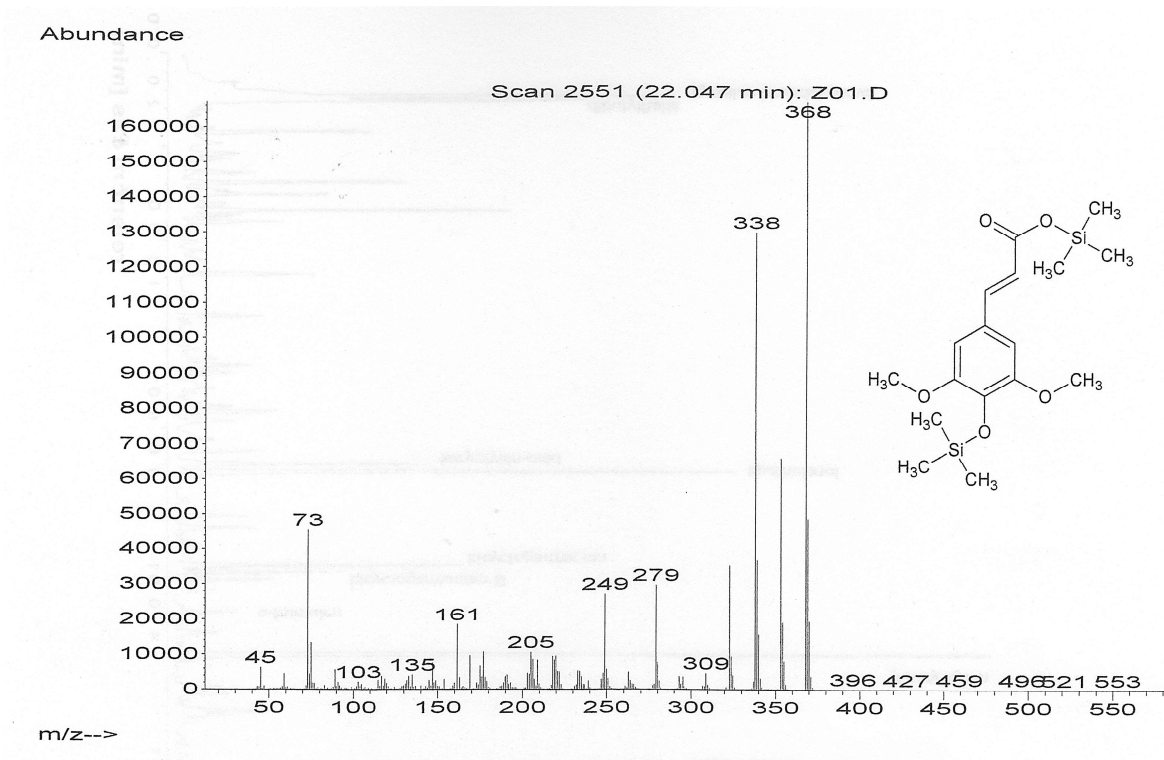
Obrázek S4: Derivát p-kumarínové kyseliny



Obrázek S5: Derivát ferulové kyseliny



Obrázek S6: Derivát kávové kyseliny



Obrázek S7: Derivát sinapové kyseliny

A fast determination of yohimbine in pharmaceuticals by micellar electrokinetic chromatography

Short Communication

Kateřina Vítková¹, Markéta Pechová², Jan Petr^{3*}, Joanna Znaleziona¹,
Václav Ranc¹, Vítězslav Maier¹, Juraj Ševčík¹

¹ Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science,
Palacký University in Olomouc, CZ-77146 Olomouc, Czech Republic

² Department of Clinical Biochemistry, University Hospital Olomouc,
CZ-77520 Olomouc, Czech Republic

³ Laboratory of Physicochemistry of Electrolytes,
Colloids and Analytical Sciences, UMR CNRS 7195;
Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Paris, Chimie ParisTech,
F-75231 Paris Cedex 05, France

Received 28 September 2009; Accepted 21 November 2009

Abstract: A method for the fast determination of yohimbine, a potent adrenoreceptor antagonist used for the treatment of sexual dysfunctions, is proposed in this article. MEKC under basic and acidic conditions (sodium borate, pH 9.5 and sodium phosphate, pH 2.5) with SDS was developed. The effect of the experimental parameters, e.g. pH, SDS concentration and injection time, on yohimbine migration was also studied. Both methods were validated in terms of linearity, limits of detection and quantification, accuracy, and precision using caffeine as an internal standard. The application for the determination of yohimbine in hand-made medicaments is also investigated in this study.

Keywords: Micellar electrokinetic chromatography • Yohimbine • Pharmaceuticals

© Versita Sp. z o.o.

1. Introduction

Yohimbine, 17 α -hydroxy-yohimban-16 α -carboxylic acid methylester (Fig. 1), is an indole alkaloid found in a variety of botanical sources, e.g. *Pausinystalia yohimbe* tree [1]. It has also been called aphrodine, and because yohimbine is a potent selective α 2-adrenoreceptor antagonist and it is predominantly used for the treatment of sexual dysfunctions [2,3]. The mechanism by which yohimbine enhances sexual function is not fully understood, but the role is connected with the inhibition of the α 2-adrenoreceptor and this results in increasing sympathetic tone and blood pressure [4]. Yohimbine levels have usually been determined using high performance liquid chromatography (HPLC) [5-7].

Capillary electrophoresis (CE) represents an interesting alternative to HPLC for the determination of pharmaceuticals [8-11]. CE has a high-throughput, easily operable, cost-effective and an environmental friendly technique where the separation is based on differences in migration in an electric field. The use of micellar additives broadened the possibilities for CE to neutral compounds where the separation is also affected by the partitioning of compounds between a micellar phase (pseudostationary phase) and a free electrolyte phase (mobile phase) [12-15]. The use of CE for the determination of yohimbine was described in detail by Chen *et al.* [16] a non-aqueous capillary electrophoresis. They described the analysis of yohimbine within 7 minutes with a limit of quantification of 10 μ g mL⁻¹. Cooper and Craig [17] published a meeting

* E-mail: secJPetr@gmail.com

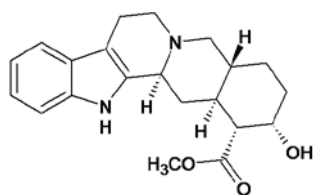


Figure 1. A structure of yohimbine.

abstract with a proposition for a micellar electrokinetic chromatography (MEKC) method for the determination of yohimbine, but lacked any details including the the background electrolyte (BGE) composition and validation results. In this article, we present a MEKC method with sample stacking for a fast and sensitive determination of yohimbine in pharmaceuticals.

2. Experimental Procedure

The background electrolyte components used in this study: phosphoric acid, boric acid, sodium hydroxide and sodium dodecylsulfate, methanol, acetonitrile, yohimbine and caffeine standards were purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). All of the chemicals used were of analytical grade purity. The separations were performed on a capillary electrophoresis system HP ^{3D}CE (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) with a diode array detection; and a detection wavelength of 200 nm (detection wavelength was chosen according to the best signal/noise ratio in a BGE). The uncoated fused silica capillaries (MicroSolv Technology Corporation, NJ, USA), 50 μm i.d. with a total capillary length of 33 cm and an effective length of 24.5 cm were used in these experiments. The capillary cassette was thermostated to 25°C.

The capillary was rinsed daily before the first experiment with 0.1 mol L⁻¹ NaOH (10 min), deionised water (20 min), and then with a buffer (10 min). The capillary was rinsed with 0.1 mol L⁻¹ NaOH (1 min), deionised water (1 min) and then with a buffer (1 min) between the individual runs. The electrolytes were prepared by the dissolution of appropriate amounts of the acid in deionised water (18 M Ω cm, Elga Bucks, UK), the pH was adjusted by 50% (w/w) sodium hydroxide to the desired value; and then sodium dodecylsulfate was added. The stock standard solution of yohimbine (concentration 10⁻² mol L⁻¹) was prepared in the background electrolyte without SDS. Medicaments used for treating sexual dysfunctions were obtained from a local drugstore. The medicaments were diluted in the background electrolyte without SDS with 10% (v/v) methanol; and then were filtered using a 0.2 μm filter syringe (Nalgene Brand Products, NY, USA). The

caffeine (stock solution concentration 10⁻² mol L⁻¹ in the buffer with 50% methanol) was used as an internal standard. All of the measurements were performed five times if not otherwise stated.

3. Results and Discussion

3.1. Method development

The strategies for method development in CE have been previously detailed along with the key roles of the pH, complexation, and addition of surfactants plays within the various methods [18]. In our case, yohimbine represents quite a complicated structure that has a less polar character (Fig. 1) and therefore we decided to use micellar electrokinetic chromatography (MEKC) in following experiments. Three electrolytes with acidic, neutral and basic pH were selected at the beginning of the experiments: (a) 50 mM sodium phosphate pH 2.5, (b) 50 mM sodium phosphate pH 7.0, and (c) 50 mM sodium borate pH 9.5. All of the electrolytes contained sodium dodecylsulfate (SDS) in a 50 mM concentration. The counter-current migration of SDS and the electroosmotic flow (EOF) led to the choice of voltage polarity: with a pH 2.5, reverse polarity was used (-20 kV), and between a pH of 7.0 and 9.5, normal polarity was used (20 kV). The internal standard, caffeine, was chosen according to its relatively similar structure and migration behavior.

The separation of yohimbine and the internal standard was acceptable with both the acidic and basic electrolytes. The analysis with the electrolyte at a pH of 7.0 was irreproducible in the terms of migration times and electrical current stability. Subsequently, a study of variation of experimental conditions was performed for BGE's pH and SDS concentration. The pH was studied in the range of between 2.2 to 3.2 for 50 mM sodium phosphate and between 8.5 to 10.0 for 50 mM sodium borate. There was not observed any significant change in the effective mobilities of yohimbine and therefore the pH's of 2.5 and 9.5 were chosen for the next experiments. The second parameter studied was SDS concentration, and this affects retention factors of the analytes and therefore it has a pronounced influence on separation. Moreover, the SDS concentration also affects the analysis time due to the counter-current migration of SDS and the EOF. In our case, four levels of SDS concentration were tested: 10 mmol L⁻¹, 25 mmol L⁻¹, 50 mmol L⁻¹, and 100 mmol L⁻¹. By increasing the SDS concentration results in an increase in the yohimbine migration time in sodium borate pH 9.5 (from 2.2 min to 3.5 min). However, the best resolution between the internal standard and yohimbine was achieved

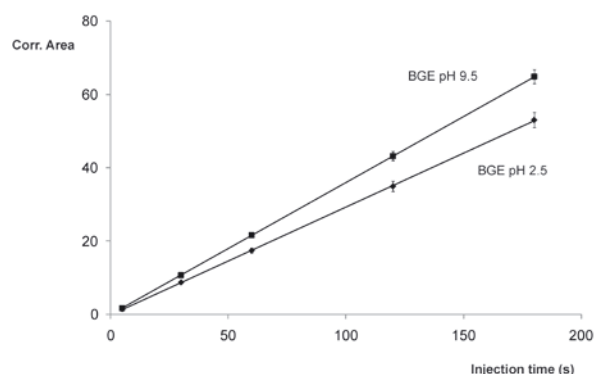


Figure 2. The effect of the sample plug length.

BGEs: 50 mM sodium borate pH 9.5, 100 mM SDS, 10% methanol, 10 kV, and 50 mM sodium phosphate pH 2.5, 100 mM SDS, 10% methanol, -10 kV

with 100 mM SDS. In the case of sodium phosphate pH 2.5, the increase of SDS concentration resulted in the decrease of migration time of yohimbine. Here, the electrolyte with 100 mM SDS provided the fastest analysis with electrical currents up to 60 μ A.

The addition of an organic solvent to the BGE could enhance the separation performance by changing the dissociation equilibriums, partitioning, and BGEs' permittivity [19-21]. Due to this effect two common organic solvents, methanol and acetonitrile, were also investigated. Methanol was previously described as a good solvent together with ammonium acetate and glacial acetic acid for non-aqueous CE of yohimbine [16]. The addition of methanol and acetonitrile was studied in concentrations from 0 to 50% (v/v) in both buffers. Acetonitrile caused instabilities of electrical currents and therefore it was not used in further experiments. The addition of 10% (v/v) methanol was observed to be favorable for both the separation performance and electrical current stability.

The last parameter studied was the sample plug length. It is well known that electrokinetic separation techniques allow for the stacking of large sample plugs to sharp zones [22-24]. MEKC also offers such possibilities [25,26]. In our experiments, the sample solution was injected for the times of 5 s, 30 s, 60 s, 120 s, and 180 s with a pressure of 50 mbar. Data showed a linear increase of corrected peak area of yohimbine in both electrolytes (Fig. 2). Longer injections resulted in roughly irreproducible electrical currents and therefore the long-time injection was not studied further. The best results were obtained with a 180 s injection time. Fig. 3 shows examples of the analysis of yohimbine under the best conditions: (A) 50 mM sodium borate pH 9.5, 100 mM SDS, 10% methanol, +10 kV, and (B) 50 mM sodium phosphate pH 2.5, 100 mM SDS, 10% methanol, -10 kV.

3.2. Validation and the real analysis

Both methods developed for the determination of yohimbine were validated according to the ICH recommendations [18]. The performance characteristics, precision of corrected migration times, precision of corrected peak areas, recovery at two calibration levels, linearity, limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ) are summarized in Table 1. Both methods provided good analytical results which is important for pharmaceutical analysis. Moreover, LOD and LOQ values were lower than a previously published method using the non-aqueous electrolyte environment [16]. In addition, the performance characteristics were marginally better using 50 mM sodium borate pH 9.5, 100 mM SDS, 10% methanol and therefore this electrolyte was used for the analysis of real samples.

The most challenging task in any method development is to transfer the method to the real world. To accomplish this task, we analyzed several hand-made

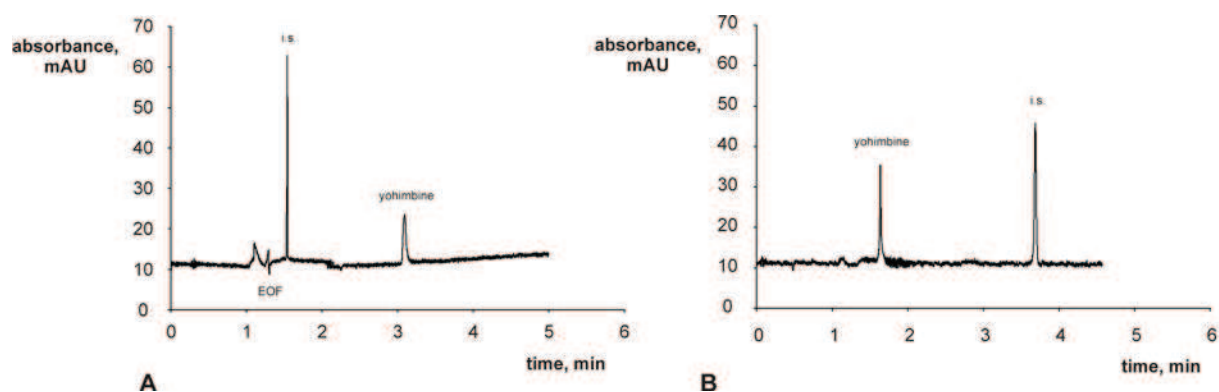


Figure 3. An example of analysis of yohimbine in acidic and basic buffers.

BGEs: (A) 50 mM sodium borate pH 9.5, 100 mM SDS, 10% methanol, 10 kV, \sim 45 μ A, and (B) 50 mM sodium phosphate pH 2.5, 100 mM SDS, 10% methanol, -10 kV, \sim -50 μ A

Table 1. Method validation.

	50 mM sodium phosphate pH 2.5, 100 mM SDS, 10% methanol, -10 kV	50 mM sodium borate pH 9.5, 100 mM SDS, 10% methanol, 10 kV
	Precision of corrected migration time	
Intraday RSD (%) ^a	1.1	0.9
Interday RSD (%) ^b	5.4	4.8
	Precision of corrected peak area	
Intraday RSD (%) ^a	2.7	2.6
Interday RSD (%) ^b	9.1	8.5
	Recovery	
Recovery at 50 µg mL ⁻¹	98 ± 1	99 ± 1
Recovery at 5 µg mL ⁻¹	94 ± 3	96 ± 2
	Calibration	
Linearity (µg mL ⁻¹)	1 – 100	1 – 100
Correlation coefficient	0.987	0.991
LOD ^c (µg mL ⁻¹)	0.82	0.67
LOQ ^c (µg mL ⁻¹)	2.73	2.23

^a Intraday precision was determined from calibrations from the peak area divided by the area of an internal standard (calibrations between 1 µg mL⁻¹ and 100 µg mL⁻¹, five points, each point measured 5 times). The calibrations were done for four days and the average RSD values were calculated.

^b Interday precision was determined by taking all the calibrations made in the 4 days.

^c LODs and LOQs were estimated by the software QC.Expert (Pardubice, Czech Republic) as 3σ and 10σ, respectively.

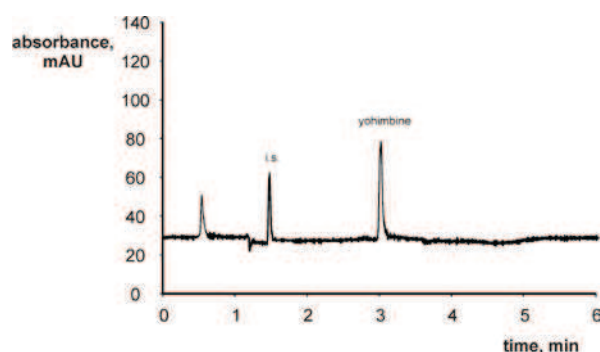


Figure 4. An example of analysis of yohimbine in medicaments.

BGE: 50 mM sodium borate pH 9.5, 100 mM SDS, 10% methanol, 10 kV

medicaments obtained from a local drug store containing yohimbine of 20 mg g⁻¹ according to the prescription. The basic electrolyte, 50 mM sodium borate pH 9.5, 100 mM SDS, 10% methanol, was employed for the individual analysis of ten tablets (see an example of the analysis in Fig. 4). The quantification of yohimbine was done by the standard addition method using caffeine as the internal standard. Results showed the same amount of yohimbine in all of the analyzed tablets (with a 0.05 confidence level). Moreover, the average amount of yohimbine, 19.5±0.4 mg g⁻¹, was in correspondence with the amount declared by the manufacturer.

4. Conclusions

A fast method for the determination of yohimbine in pharmaceuticals by micellar electrokinetic chromatography was presented in this article. Using two electrolytes, an acidic and a basic, with SDS as the micellar environment was described in details. The most appealing fact of these methods of the analysis is the speed. In both cases, the analysis took around 4 minutes what means that approximately 10 analyses could be performed per hour (including the 2 minutes for capillary rinsing). Both methods were validated. The basic electrolyte was selected for the real analysis, 50 mM sodium borate pH 9.5 with 100 mM SDS and 10% methanol and yohimbine in the hand-made medicaments was successfully quantificated. In view of our results, we can assume that the method could be favorably be used in routine analytical/pharmaceutical laboratories.

Acknowledgment

The financial support of the research by the Research Project MSM6198959216 is gratefully acknowledged.

References

- [1] S.W. Tam, M. Worcel, M. Wyllie, *Pharmacol Therap.* 91, 215 (2001)
- [2] A.J. Riley, *Brit. J. Clin. Practic.* 48, 133 (1994)
- [3] K. Valentová, P. Entnerová, J. Urbaníková, V. Šimánek, *Chem. Listy* 98, 1119 (2004)
- [4] P. Le Corre, G. Dollo, F. Chevanne, R. Le Verge, *Eur. J. Pharm. Sci.* 9, 79 (1999)
- [5] B. Diquet, L. Doare, G. Gaudel, *J. Chromatogr.* 311, 449 (1984)
- [6] R. Chiba, Y. Ishii, *J. Chromatogr.* 588, 344 (1991)
- [7] R. Le Verge, P. Le Corre, F. Chevanne, M.D. De Maindreville, D. Royer, J. Levy, *J. Chromatogr.* 574, 283 (1992)
- [8] T. K. Natishan, *J. Liq. Chromatogr. RT* 28, 1115 (2005)
- [9] P.T.T. Ha, J. Hoogmartens, A. Van Schepdael, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 41, 1 (2006)
- [10] J. Zhang, J. Konečný, Z. Glatz, J. Hoogmartens, A. Van Schepdael, *Curr. Anal. Chem.* 3, 197 (2007)
- [11] A. Jouyban, E. Kenndler, *Electrophoresis* 29, 3531 (2008)
- [12] S. Terabe, K. Otsuka, K. Ichikawa, A. Tsuchiya, T. Ando, *Anal. Chem.* 56, 111 (1984).
- [13] D.E. Burton, M.J. Sepaniak, M.P. Maskarinec, *J. Chromatogr. Sci.* 24, 347 (1986).
- [14] S. Terabe, *Chem. Rec.* 8, 291 (2008)
- [15] M. Silva, *Electrophoresis* 30, 50 (2009)
- [16] Q. Chen, P. Li, Z. Zhang, K. Li, J. Liu, Q. Li, *J. Sep. Sci.* 31, 2211 (2008)
- [17] J.W. Cooper, P.A. Craig, *FASEB J.* 14, A1470 (2000)
- [18] H. Wätzig, M. Degenhardt, A. Kunkel, *Electrophoresis* 19, 2695 (1998)
- [19] M.L. Riekkola, S.K. Wiedmer, I.E. Valko, H. Siren, *J. Chromatogr. A* 792, 13 (1997)
- [20] J.S. Fritz, *Electrophoresis* 24, 1530 (2003)
- [21] E. Kenndler, *Electrophoresis* 30, S101 (2009)
- [22] Z. Malá, A. Šlampová, P. Gebauer, P. Boček, *Electrophoresis* 30, 215 (2009)
- [23] M.C. Breadmore, J.R.E. Thabano, M. Dawod, A.A. Kazarian, J.P. Quirino, R.M. Guijt, *Electrophoresis* 30, 230 (2009)
- [24] P. Gebauer, P. Boček, *Electrophoresis* 30, S27 (2009)
- [25] J.P. Quirino, S. Terabe, *J. Chromatogr. A* 781, 119 (1997)
- [26] S.L. Simpson, J.P. Quirino, S. Terabe, *J. Chromatogr. A* 1184, 504 (2008)

Determination of Some Phenolic Acids in *Majorana hortensis* by Capillary Electrophoresis with Online Electrokinetic Preconcentration

JAN PETR,* KATEŘINA VÍTKOVÁ, VÁCLAV RANČ, JOANNA ZNALEZIONA,
VÍTĚZSLAV MAIER, RADIM KNOB, AND JURAJ ŠEVČÍK

Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Palacký University in Olomouc, Třída Svobody 8, CZ-77146 Olomouc, Czech Republic

An online accumulation/mobilization preconcentration technique based on a dynamic pH junction technique and electrokinetic injection was employed for analysis of phenolic acids (sinapic, ferulic, coumarinic, caffeic, syringic, vanillic, and 4-hydroxybenzoic acid) in extracts from *Majorana hortensis* leaves. Samples were extracted by pressurized solvent extraction with acetone at 150 °C and 15 MPa. The capillary electrophoretic method employed 50 mmol·L⁻¹ sodium borate, pH 9.5, as the sample electrolyte, 50 mmol·L⁻¹ sodium phosphate, pH 2.5, as the background electrolyte, and 50 mmol·L⁻¹ sodium phosphate, pH 2.5, with 60 mmol·L⁻¹ sodium dodecyl sulfate as the mobilization electrolyte. The method allowed 720-fold to 5560-fold preconcentration of the phenolic acids during 30 min of electrokinetic accumulation with detection limits from 0.38 to 4.22 ng·mL⁻¹.

KEYWORDS: Online preconcentration; capillary electrophoresis; phenolic acids; electrokinetic accumulation; *Majorana hortensis*; plant extracts

INTRODUCTION

Phenolic acids are secondary plant metabolites having hydroxycinnamic or hydroxybenzoic structures. Their role concerns color and sensory characteristics of plants as well as antioxidant properties of plant-based food (1–3). This role in the organoleptic properties of foods (flavor, astringency, and hardness) has been a big interest of analytical and food chemists (4, 5). Additionally, the content and profile of phenolic acids, their effect on fruit maturation and prevention of enzymatic browning, and their roles as food preservatives have been evaluated too (6, 7). Recent interest comes from their potential protective role against diseases that may be related to oxidative damage, such as coronary heart diseases or cancers (8–10).

Bendini et al. (11) described several issues of why the phenolic acids are interesting; these cover the levels and chemical structure of antioxidant phenols in different plants, the probable role of plant phenols in the prevention of various diseases, the ability of plant phenols to modulate the activity of enzymes, the ability of certain classes of plant phenols such as flavonoids to bind to proteins (this binding is not related to their direct activity as antioxidants), and the preparation of food supplements.

Each task listed above needs an analytical methodology suitable for separation of phenolic compounds usually from a complicated matrix and their identification and quantification (12–14). These days, the use of chromatographic

methods, both gas chromatography and high-performance liquid chromatography, together with mass spectrometry has been well established (15–19). Capillary electrophoresis (CE) represents another alternative for fast and highly efficient separation of compounds of interest. CE usually suffers from a lack of detection sensitivity with use of a common UV–vis detector. On the other hand, CE provides a simple solution by using one of the online preconcentration techniques (20–22). Online preconcentration of phenolic acids was described by isotachopheresis and stacking. Urbánek et al. (23) introduced a “background electrolyte–sample–background electrolyte” system with a methanolic sample and a background electrolyte consisting of β -hydroxy-4-morpholinopropanesulfonic acid (MOPSO), tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris), and boric acid at pH 9.0 for plant extracts with limits of detection (LODs) around 50 ng·mL⁻¹. Hamoudová et al. (24) used the same system for red wine

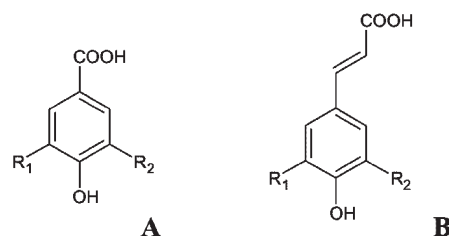


Figure 1. Phenolic acid structures: (A) R₁ = R₂ = H, 4-hydroxybenzoic acid; R₁ = CH₃, R₂ = H, syringic acid; R₁ = H, R₂ = OCH₃, vanillic acid; (B) R₁ = R₂ = H, coumarinic acid; R₁ = H, R₂ = OH, caffeic acid; R₁ = OCH₃, R₂ = H, ferulic acid; R₁ = OCH₃, R₂ = OCH₃, sinapic acid.

* To whom correspondence should be addressed. Phone: +420585634416. Fax: +420585634433. E-mail: petrjan1@gmail.com.

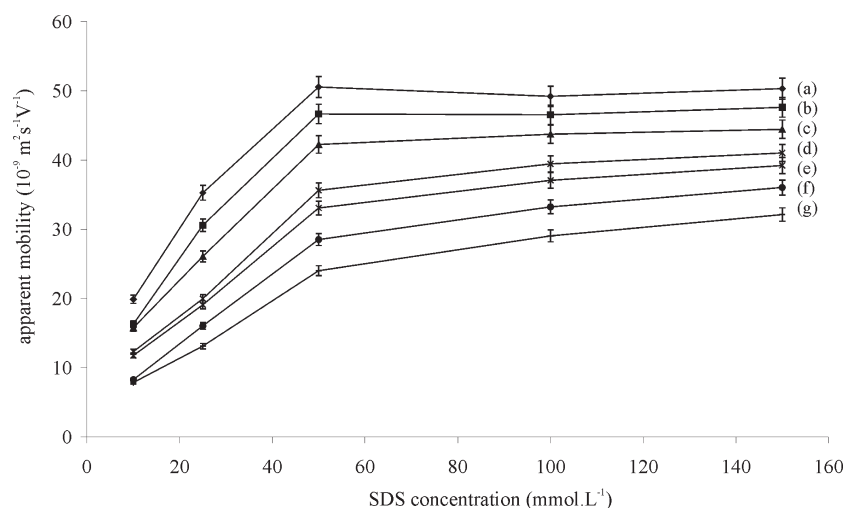


Figure 2. Influence of the SDS concentration on the apparent mobilities of the studied compounds: (a) sinapic, (b) ferulic, (c) coumarinic, (d) caffeic, (e) syringic, (f) vanillic, and (g) 4-hydroxybenzoic acid. Conditions: sample electrolyte, $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ sodium borate, pH 9.5; junction electrolyte, $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ sodium phosphate, pH 2.5; mobilization electrolyte, $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ sodium phosphate, pH 2.5, with SDS; electrokinetic injection, 10 min at -10 kV ; separation voltage, -10 kV ; standard concentration, $50 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$.

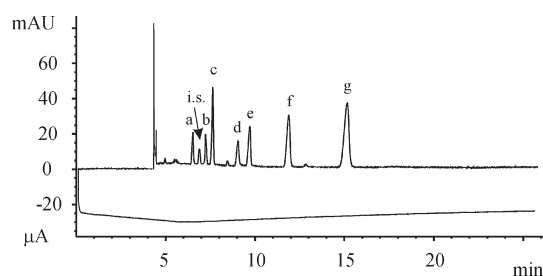


Figure 3. Example of analysis of phenolic acid standards: (a) sinapic, (b) ferulic, (c) coumarinic, (d) caffeic, (e) syringic, (f) vanillic, and (g) 4-hydroxybenzoic acid. Conditions: sample electrolyte, $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ sodium borate, pH 9.5; junction electrolyte, $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ sodium phosphate, pH 2.5; mobilization electrolyte, $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ sodium phosphate, pH 2.5, with $60 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ SDS; electrokinetic injection, 10 min at -10 kV ; separation voltage, -10 kV ; standard concentration, $50 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$.

samples. Šafra et al. (25) published an ITP-CE system with column coupling for methanolic extracts and obtained LODs from 5 to $61 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$. Deng et al. (26) and Kubáň et al. (27) used water as a background for the samples, which resulted in stacking conditions. Šafra et al. (28) described using a methanolic sample for 40-fold sensitivity enhancement (LODs between $10\text{--}66 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$).

The aim of our work was to develop a method for determination of some phenolic acids (sinapic, ferulic, coumarinic, caffeic, syringic, vanillic, and 4-hydroxybenzoic acid; for the structures see **Figure 1**) by capillary electrophoresis with online preconcentration via an electrokinetic accumulation/mobilization technique after pressurized solvent extraction. This research followed similar studies on determination of phenolics for purposes of studying antioxidant properties of plants and plant products, such as that published, e.g., by Jirovský et al. (18) or by Ayaz et al. (19). *Majorana* sp. were chosen as common food supplies that contain these phenolic acids.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals. Boric acid, phosphoric acid, sodium hydroxide, and sodium dodecyl sulfate (SDS) were purchased from Sigma (St. Louis, MO). Standards of phenolic acids, syringic, sinapic, ferulic, coumarinic, 4-hydroxybenzoic, and caffeic acid, were also obtained

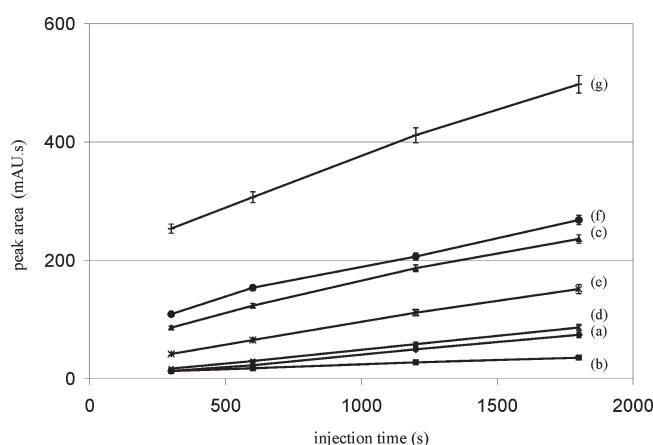


Figure 4. Influence of the injection duration on the peak areas of the studied compounds: (a) sinapic, (b) ferulic, (c) coumarinic, (d) caffeic, (e) syringic, (f) vanillic, and (g) 4-hydroxybenzoic acid. Conditions: sample electrolyte, $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ sodium borate, pH 9.5; junction electrolyte, $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ sodium phosphate, pH 2.5; mobilization electrolyte, $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ sodium phosphate, pH 2.5, with $60 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ SDS; electrokinetic injection at -10 kV ; separation voltage, -10 kV ; standard concentration $50 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$.

from Sigma. All of the chemicals were of analytical grade purity. *Majorana hortensis* leaves for foods were obtained from the supermarket Globus (Olomouc, Czech Republic).

Capillary Electrophoresis. Separations were performed on the capillary electrophoresis system HP ³DCE (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) with diode array detection; the detection wavelength was 200 nm. Uncoated fused silica capillaries (Polymicro Technologies, Phoenix, AZ), $50 \mu\text{m}$ i.d., with a total capillary length of 48.5 cm and an effective length of 40.0 cm were used in these experiments. The capillary cassette was thermostated at $20 \text{ }^\circ\text{C}$; the applied accumulation and separation voltage was -10 kV .

The capillary was washed daily before the first experiment with $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH (10 min), deionized water (20 min), and then sodium phosphate buffer (10 min). The capillary was washed with $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH (2 min), deionized water (3 min), and then sodium phosphate buffer (5 min) between the individual analysis runs. Electrolytes were prepared by dissolution of appropriate amounts of the acid in deionized water ($18 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$, Elga Bucks, U.K.), and the pH was adjusted by 50% (w/w) sodium hydroxide to the desired value; then in the case of mobilization the electrolyte sodium dodecyl sulfate was added. The stock standard solutions of phenolic acids were prepared in $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$

Table 1. Validation Results

	sinapic acid	ferulic acid	coumarinic acid	caffeic acid	syringic acid	vanillic acid	4-hydroxybenzoic acid
Precision of Corrected Migration Times ^a							
intraday RSD (%)	1.3	0.9	1.4	1.8	1.9	1.6	2.8
interday RSD (%)	7.6	8.9	11.0	9.7	10.3	9.6	12.1
Precision of Corrected Peak Areas ^a							
intraday RSD (%)	2.5	3.2	1.9	6.5	6.3	6.6	6.9
interday RSD (%)	12.3	14.5	13.2	15.1	14.6	13.8	14.9
Recovery, Correlation Coefficients							
recovery (%)	94 ± 2	94 ± 3	97 ± 2	96 ± 3	96 ± 1	98 ± 1	93 ± 3
correlation coefficient	0.984	0.993	0.986	0.993	0.981	0.985	0.976
Detection and Quantification Limits, Enrichment Factor							
LOD of developed method (ng/mL)	2.23	4.22	0.71	2.04	1.14	0.62	0.38
LOQ of developed method (ng/mL)	7.43	14.07	2.37	6.80	3.80	2.07	1.27
LOD of MEKC method ^a (μg/mL)	1.61	3.29	2.87	3.32	2.89	2.35	2.14
enrichment factor	723	780	4048	1627	2544	3762	5565

^a For details, see the Materials and Methods.

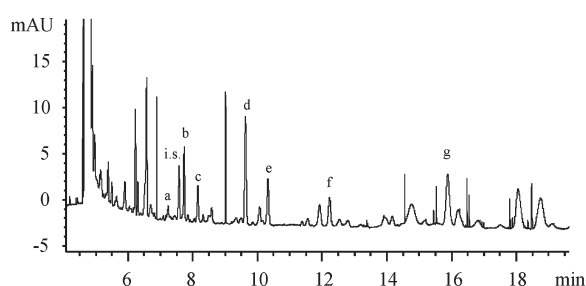


Figure 5. Example of analysis of the *Majorana* extract: (a) sinapic, (b) ferulic, (c) coumarinic, (d) caffeic, (e) syringic, (f) vanillic, and (g) 4-hydroxybenzoic acid. Conditions: sample electrolyte, 50 mmol·L⁻¹ sodium borate, pH 9.5; junction electrolyte, 50 mmol·L⁻¹ sodium phosphate, pH 2.5; mobilization electrolyte, 50 mmol·L⁻¹ sodium phosphate, pH 2.5, with 60 mmol·L⁻¹ SDS; electrokinetic injection, 30 min at -10 kV; separation voltage, -10 kV.

and then mixed and diluted to the desired concentrations. All of the measurements were performed five times if not stated otherwise.

Validation experiments and all the real sample measurements were done under the following conditions: sample electrolyte, 50 mmol·L⁻¹ sodium borate, pH 9.5; junction electrolyte, 50 mmol·L⁻¹ sodium phosphate, pH 2.5; mobilization electrolyte, 50 mmol·L⁻¹ sodium phosphate, pH 2.5, with 60 mmol·L⁻¹ SDS; electrokinetic injection, 30 min at -10 kV; separation voltage, -10 kV. Identification was done by using UV spectral matching, migration times, and the standard addition method. The statistical program QC.Expert 2.5 (TriloByte Statistical Software, Pardubice, Czech Republic) was used to evaluate the obtained data. Precision values were determined from calibrations from the peak area divided by the area of an internal standard, phenylalanine (25 ng·mL⁻¹). The intraday precision was determined from the calibration curve between 5 and 50 ng·mL⁻¹ (four points, each point measured five times). The calibrations were done for 4 days, and the average RSD values were then calculated. The interday precision was determined by taking all the calibrations made in the 4 days. LODs and limits of quantification (LOQs) were estimated by the software QC.Expert as 3σ and 10σ, respectively. Detection limits for micellar electrokinetic chromatography (MEKC) were determined from separate calibrations employing 50 mmol·L⁻¹ sodium phosphate, pH 2.5, with 50 mmol·L⁻¹ SDS, 10% (v/v) methanol, and a running voltage of 10 kV (for more details see ref 29). The enrichment factor was calculated as a ratio between the LODs of the proposed preconcentration technique and the LODs of the MEKC method. Recovery was calculated from the addition of 10 ng·mL⁻¹ phenolic acid standard to the plant extract.

Majorana Samples. Extracts from *M. hortensis* L. leaves were prepared by using pressurized solvent extraction (PSE) according to the following setup (optimization of the setup is described in ref 29):

1.0000 g of dried homogenized plant material was weighed directly into the extraction cartridge (total volume 22 mL) and extracted with acetone at 150 °C and 15 MPa by two static cycles (2–10 min) on the automatic extractor *one* PSE (Applied Separations Inc., Allentown, PA). The extracts were collected in glass vials, evaporated using nitrogen flow, and diluted in water–methanol (90:10, v/v). Then they were filtered through a Microcon YM-10 filter (regenerated cellulose, 10 000, Millipore Corp., Bedford, MA). Finally, the extracts were diluted in 50 mM sodium borate, pH 9.5.

RESULTS AND DISCUSSION

Development and Optimization of the Method. The online accumulation/mobilization preconcentration technique for weak acids introduced by Horáková et al. (30) is based on two steps: first, negatively charged analytes in alkaline buffer are electrokinetically introduced into the pH boundary (formed by acidic buffer); here they are neutralized and stacked (accumulation part). After the accumulation, the inlet vial is changed to the vial with acidic buffer with SDS. Partitioning between micelles and the free electrolyte causes mobilization and separation of the analytes.

The influence of the concentration and pH of the sample electrolyte, pH of the junction electrolyte, concentration of SDS, separation voltage, and injection voltage was studied to obtain the best separation and preconcentration conditions.

Concentrations of 100, 75, 50, and 25 mmol·L⁻¹ sodium borate electrolyte at pH 9.5 were tested. The higher conductivity of highly concentrated electrolytes (100 and 75 mmol·L⁻¹) was reflected in higher currents during the accumulation that caused instabilities in the process because of heat generation. A 50 mmol·L⁻¹ concentration of electrolyte was chosen as the best because higher responses of the acids were given in this electrolyte in comparison with a 25 mmol·L⁻¹ concentration (the preconcentration was more effective).

pH, the main characteristic attribute of the junction electrolytes, was studied in both electrolytes. The pH has to be chosen in accordance with the buffering capacity of the electrolyte; phosphoric acid has pK_a values of 2.16, 7.21, and 12.32, and boric acid has a pK_a equal to 9.27 (31). Therefore, the following pH values were studied: 50 mM sodium phosphate, pH 2.0, 2.5, and 3.0; 50 mM sodium borate, pH 9.0, 9.5, and 10.0. pH values of 2.0 and 3.0 caused instabilities in the currents, and intraday repeatability of the peak areas was worse than 20%. A pH value of 10 resulted in small injected amounts. pH values of 9.5 and 9.0 seemed

to be equal for preconcentration. A pH value of 9.5 was chosen because the value is closer to the pK_a value (higher buffering capacity).

The influence of the SDS concentration was examined in the range 10–150 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$. Because the separation mechanism was partitioning between micelles and the free electrolyte, this parameter was very important. It was observed that the highest SDS concentration led to the fastest and the most efficient separation (**Figure 2**); 100 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ SDS was chosen because it gave results similar to those of 150 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ SDS but with less additive consumption. However, in the case of analysis *Majorana* extracts an incomplete separation of phenolic acids from the matrix was observed. This situation needed a titration of the SDS concentration, resulting in using 60 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ SDS solutions. Within these conditions, it was possible to separate both phenolic acids and matrix components.

The last studied parameter was the accumulation and separation voltage. In both tasks, higher voltage provided higher current (see the current profile in **Figure 3**) that was reflected in instabilities of the accumulation and separation process. Currents lower than 50 μA , which corresponded to voltages lower than -15 kV, enabled reproducible separation, while higher currents were reflected in the formation of spikes because of Joule heating. A voltage of -10 kV was chosen as a compromise between the system stability and the loaded amount of the analytes. The influence of the injection duration within -10 kV was studied in the range of 5–30 min with 50 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ standards (**Figure 4**). The peak areas increased linearly; 30 min was chosen because it provides the highest responses of the acids. Differences in the injection time did not have a significant effect on the migration times. Longer injections were not tested because they suppress one of the applauded characteristics of CE—the speed.

An example of separation of the phenolic acid standards is displayed in **Figure 3**. The internal standard phenylalanine at a concentration of 25 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ was added to the standard mixture of phenolic acids for accurate concentration determination.

Analysis of *Majorana* Extracts. The suggested online preconcentration technique was tested on an analysis of real samples—PSE extracts of *M. hortensis* leaves. Validation of the electrophoretic method was done before determination of the phenolic acid content. All the calculations were done using phenylalanine as the internal standard. The most important parameters are listed in **Table 1**. Calibrations were linear between 2 and 100 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ (six points, $n = 5$), with correlation coefficients between 0.976 and 0.993. No significance of an absolute parameter was found at the 0.05 confidence level. As can be seen from **Table 1**, the method allowed determination of phenolic acids in units of nanograms per milliliter (LODs were 0.4–4.2 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$), which was a 723-fold to 5565-fold improvement of the detection limits in comparison with those of the simple MEKC method. Moreover, the LODs were approximately 10 times lower than the LODs already published for electrophoretic techniques.

An example of analysis of the *Majorana* extract is displayed in **Figure 5**. Analyzed leaves contained 11 ± 2 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ sinapic acid, 61 ± 12 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ferulic acid, 7 ± 2 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ coumarinic acid, 78 ± 11 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ caffeic acid, 16 ± 4 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ syringic acid, 15 ± 4 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ vanillic acid, and 29 ± 5 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 4-hydroxybenzoic acid. These results reflected the antioxidant potential of the *Majorana* sample. The phenolic acid content in *Lamiaceae* is quite

broad (16, 17, 32–34) because the different growth regions affected the amount of phenolics. The effects of growing are of interest to researchers now, and the capillary electrophoretic method presented in this paper can be used to contribute to this task. In our opinion, the method can also be used for analyzing a broad variety of PSE extracts from plant materials for determination of the phenolic acids. Moreover, longer injection times can lead to lower detection and quantification limits, which can be important in some special cases, e.g., metabolic studies.

LITERATURE CITED

- (1) Maga, J. A. Simple phenol and phenolic compounds in food flavor. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **1978**, *10*, 323–372.
- (2) Nergiz, C.; Unal, K. Determination of phenolic acids in virgin olive oil. *Food Chem.* **1991**, *39*, 237–240.
- (3) Moure, A.; Cruz, J. M.; Franco, D.; Domínguez, J. M.; Sineiro, J.; Domínguez, H.; Núñez, M. J.; Parajó, J. C. Natural antioxidants from residual sources. *Food Chem.* **2001**, *72*, 145–171.
- (4) Peleg, H.; Naim, M.; Rouseff, R. L.; Zehavi, U. Distribution of bound and free phenolic acids in oranges (*Citrus sinensis*) and grapefruits (*Citrus paradisi*). *J. Sci. Food Agric.* **1991**, *57*, 417–426.
- (5) Canas, S.; Belchior, A. P.; Spranger, M. I.; Bruno-de-Sousa, R. High performance liquid chromatography for analysis of phenolic acids, phenolic aldehydes, and furanic derivatives in brandies. Development and validation. *J. Sep. Sci.* **2003**, *26*, 496–502.
- (6) Robbins, R. J. Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 2866–2887.
- (7) Nurmi, A.; Nurmi, T.; Mursu, J.; Hiltunen, R.; Voutilainen, S. Ingestion of oregano extract increases excretion of urinary phenolic metabolites in humans. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 6916–6923.
- (8) Masaki, H.; Okamoto, N.; Sakaki, S.; Sakurai, H. Protective effects of hydroxybenzoic acids and their esters on cell damage induced by hydroxyl radicals and hydrogen peroxides. *Biol. Pharm. Bull.* **1997**, *20*, 304–308.
- (9) Gomes, C. A.; Girao da Cruz, T.; Andrade, J. L.; Milhazes, N.; Borges, F.; Marques, M. P. M. Anticancer activity of phenolic acids of natural or synthetic origin: a structure-activity study. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 5395–5401.
- (10) Nichenametla, S. N.; Taruscio, T. G.; Barney, D. L.; Exon, J. L. A review of the effects and mechanisms of polyphenolics in cancer. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2006**, *46*, 161–183.
- (11) Bendini, A.; Cerretani, L.; Carrasco-Pancorbo, A.; Gómez-Caravaca, A. M.; Segura-Carretero, A.; Fernández-Gutiérrez, A.; Lercker, G. Phenolic molecules in virgin olive oils: a survey of their sensory properties, health effects, antioxidant activity and analytical methods. An overview of the last decade. *Molecules* **2007**, *12*, 1679–1719.
- (12) Robbins, R. J. Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 2866–2887.
- (13) Stalikas, C. D. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *J. Sep. Sci.* **2007**, *30*, 3268–3295.
- (14) Naczki, M.; Shahidi, F. Extraction and analysis of phenolics in food. *J. Chromatogr., A* **2004**, *1054*, 95–111.
- (15) Waksmundzka-Hajnos, M. Chromatographic separations of aromatic carboxylic acids. *J. Chromatogr., B* **1998**, *717*, 93–118.
- (16) Fiamegos, Y. C.; Nanos, C. G.; Vervoort, J.; Stalikas, C. D. Analytical procedure for the in-vial derivatization-extraction of phenolic acids and flavonoids in methanolic and aqueous plant extracts followed by gas chromatography with mass-selective detection. *J. Chromatogr., A* **2004**, *1041*, 11–18.
- (17) Kivilompolo, M.; Obürka, V.; Hyötyläinen, T. Comparison of GC-MS and LC-MS methods for the analysis of antioxidant phenolic acids in herbs. *Anal. Bioanal. Chem.* **2007**, *388*, 881–887.

- (18) Jirovský, D.; Horáková, D.; Kotouček, M.; Valentová, K.; Ulrichová, J. Analysis of phenolic acids in plant materials using HPLC with amperometric detection at a platinum tubular electrode. *J. Sep. Sci.* **2003**, *26*, 739–742.
- (19) Ayaz, F. A.; Hayirlioglu-Ayaz, S.; Alpay-Karaoglu, S.; Grúz, J.; Valentová, K.; Ulrichová, J.; Strnad, M. Phenolic acid contents of kale (*Brassica oleracea* L. var. *acephala* DC.) extracts and their antioxidant and antibacterial activities. *Food Chem.* **2008**, *107*, 19–25.
- (20) Simpson, S. L.; Quirino, J. P.; Terabe, S. On-line sample preconcentration in capillary electrophoresis: fundamentals and applications. *J. Chromatogr., A* **2008**, *1184*, 504–541.
- (21) Malá, Z.; Křivánková, L.; Gebauer, P.; Boček, P. Contemporary sample stacking in CE: A sophisticated tool based on simple principles. *Electrophoresis* **2007**, *28*, 243–253.
- (22) Lin, C.-H.; Kaneta, T. On-line sample concentration techniques in capillary electrophoresis: Velocity gradient techniques and sample concentration techniques for biomolecules. *Electrophoresis* **2004**, *25*, 4058–4073.
- (23) Urbánek, M.; Pospíšilová, M.; Polášek, M. On-line coupling of capillary isotachopheresis and zone electrophoresis for the assay of phenolic compounds in plant extracts. *Electrophoresis* **2002**, *23*, 1045–1052.
- (24) Hamoudová, R.; Urbánek, M.; Pospíšilová, M.; Polášek, M. Assay of phenolic compounds in red wine by on-line combination of capillary isotachopheresis with capillary zone electrophoresis. *J. Chromatogr., A* **2004**, *1032*, 281–287.
- (25) Šafra, J.; Pospíšilová, M.; Spilková, J. Determination of phenolic acids in Herba Epilobi by ITP-CE in the column-coupling configuration. *Chromatographia* **2006**, *64*, 37–42.
- (26) Deng, Y.; Fan, X.; Delgado, A.; Nolan, C.; Furton, K.; Zuo, Y.; Jones, R. D. Separation and determination of aromatic acids in natural water with preconcentration by capillary zone electrophoresis. *J. Chromatogr., A* **1998**, *817*, 145–152.
- (27) Kubáň, P.; Štěrbová, D.; Kubáň, V. Separation of phenolic acids by capillary electrophoresis with indirect contactless conductometric detection. *Electrophoresis* **2006**, *27*, 1368–1375.
- (28) Šafra, J.; Pospíšilová, M.; Kavalířová, A. Development of a stacking-CZE method for the analysis of phenolic acids. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2006**, *41*, 1022–1024.
- (29) Vítková, K.; Ranc, V.; Petr, J.; Maier, V.; Čáp, L.; Barták, P. Determination of some phenolic acids in *Majorana hortensis*: a comparison of separation techniques Manuscript in preparation.
- (30) Horáková, J.; Petr, J.; Maier, V.; Tesařová, E.; Veis, L.; Armstrong, D. W.; Gaš, B.; Ševčík, J. On-line preconcentration of weak electrolytes by electrokinetic accumulation in CE: Experiment and simulation. *Electrophoresis* **2007**, *28*, 1540–1547.
- (31) Lide, D. R. Ed. *CRC Handbook of Chemistry and Physics*; CRC Press: Boca Raton, FL, 2004.
- (32) Štěrbová, D.; Matějčiček, D.; Vlček, J.; Kubáň, V. Combined microwave-assisted isolation and solid-phase purification procedures prior to the chromatographic determination of phenolic compounds in plant materials. *Anal. Chim. Acta* **2004**, *513*, 435–444.
- (33) Zgórka, G.; Glowniak, K. Variation of free phenolic acids in medicinal plants belonging to the Lamiaceae family. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2001**, *26*, 79–87.
- (34) Sun, R.-C.; Sun, X.-F.; Zhang, S.-H. Quantitative determination of hydroxycinnamic acids in wheat, rice, rye, and barley straws, maize stems, oil palm frond fiber, and fast-growing poplar wood. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 5122–5129.

Received for review January 3, 2008. Revised manuscript received March 3, 2008. Accepted March 18, 2008. Financial support of this research by Research Project MSM6198959216 and Grant 203/07/P233 is gratefully acknowledged.

JF8000179

Kateřina Vítková^{1,2}
 Jan Petr¹
 Vítězslav Maier¹
 Joanna Znaleźiona¹
 Juraj Ševčík¹

¹Department of Analytical
 Chemistry, Faculty of Science,
 Palacký University in Olomouc,
 Olomouc, Czech Republic

²University Hospital Ostrava,
 Ostrava-Poruba, Czech Republic

Received November 7, 2009

Revised April 13, 2010

Accepted May 3, 2010

Research Article

Study of electromigration effects on a pH boundary during the on-line electrokinetic preconcentration by capillary electrophoresis

A contribution to the description of electrokinetic effects on the pH boundary formed by sodium borate pH 9.5 and sodium phosphate pH 2.5 electrolytes for on-line preconcentration of weak acids is presented in this article. Simulations of electrokinetic injections together with experimental studies using contactless conductivity detection verified that the preconcentration is induced mainly by dissociation changes of analytes on the pH boundary and transient ITP state. Moreover, a study of the addition of organic solvent to the injection electrolyte was performed with impressive results. Subnanomolar LODs of hydroxybenzoic acids were achieved with 80% of methanol in the injection electrolyte which represents more than 70 000-fold preconcentration in comparison with classical CZE method.

Keywords:

Boundary / CE / Electrokinetic accumulation / On-line preconcentration / Simulations
 DOI 10.1002/elps.200900663



1 Introduction

A boundary between two electrolytes represents an interesting possibility for improving both selectivity and sensitivity in capillary electromigration techniques. The first boundaries have been studied since the capillary ITP was born [1]. The formation of moving and stationary boundaries is still in interests of many authors (see *e.g.* [2–9]) because they have big effects on a separation performance. Actual mobilities of species moving through the boundary are changing which presents the most important feature of such boundaries. This behavior was first described by Kohlrausch [10, 11] who introduced nowadays well-known regulating function.

The effect of changing mobility and concentration of all the ionic species on the boundary led to the study of possibilities how to employ boundaries for on-line preconcentration of analytes. A lot of on-line preconcentration techniques were established till these days, see *e.g.* [12–17]. The most common ones are stacking, sweeping, ITP and

dynamic pH junction. However, a lot of combinations of those techniques and also other techniques were presented in the literature, *e.g.* electrokinetic supercharging [18, 19], analyte focusing by micelle collapse [20, 21] or moving reaction boundary-based preconcentration [22, 23].

An interesting on-line preconcentration method, called the dynamic pH junction, was introduced by Britz-McKibbin and Chen [24] in 2000 based on an idea of a junction of two electrolytes at different pH published 10 years before by Aebersold and Morrison [25]. This method was used by many authors for different tasks, *e.g.* Kazarian *et al.*, preconcentrated sugars [26]. Imani *et al.* [27], Nesbitt *et al.* [28], Jurcic *et al.* [29] and Su and Yu [30] stacked different peptides. Li *et al.* [31], preconcentrated lovastatin. Barbiturates were preconcentrated by Wang *et al.* [32]. Su *et al.* described method for preconcentration of riboflavin [33]. Biological amines were stacked by Hsieh and Chang [34], and pyrrolizidine alkaloids by Yu and Li [35]. Jaafar *et al.* published a setup for preconcentration of arsenic compounds [36]. Arnett and Lunte described a combination of pH stacking with dynamic pH junction [37]. Cao *et al.* [38, 39] described preconcentration of aminoacids. Booker and Yeung used discontinuous buffers for preconcentration of myoglobin prior MS [40]. Breadmore and Quirino [41] presented counterflow ITP stacking under field-amplified conditions. Cheng *et al.* [42], preconcentrated methotrexate and its metabolites. Zhang *et al.* [43], stacked some cardiovascular drugs with cyclodextrin-modified MEKC.

Correspondence: Dr. Jan Petr, Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Palacký University in Olomouc, Trida 17. listopadu 12, CZ-77146 Olomouc, Czech Republic

E-mail: secjpetr@gmail.com

Fax: +420-585-63-4433

Abbreviation: MeOH, methanol

Last but not least, our group with cooperation of others [44–46] presented a similar approach based on an electrokinetic injection to the pH boundary formed from borate pH 9.5 and phosphate pH 2.5 electrolytes (called as an electrokinetic accumulation) followed by mobilization of stacked analytes by partitioning in SDS micelles. Horáková *et al.* [44] made a few simulations in advanced Simul program and discussed a possible mechanism of the preconcentration. In this article, we present a contribution to the description of electrokinetic effects on the pH boundary formed by borate and phosphate electrolytes from both theoretical and experimental point of view. A study of different preconcentration conditions was done by using Simul program and model experiments using the contactless conductivity detection. Moreover, an interesting preliminary study employing partially nonaqueous injection electrolytes is covered in this article.

2 Materials and methods

2.1 Chemicals

Electrolyte components: boric acid, phosphoric acid, sodium hydroxide, SDS; sample standards: benzoic acid, ferulic acid and cinnamic acid, and additives: methanol and ACN were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). All the chemicals were of analytical grade purity.

2.2 CE

Separations were performed on the CE system HP ^{3D}CE (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) with diode array detection and contactless conductivity detector (Gaš *et al.* construction [47]); the detection wavelengths were 200 and 280 nm. Uncoated fused silica capillaries (Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, USA) with 50 μm id, total capillary length 48.5 cm, effective length 33.0 cm (to the contactless conductivity detector), 40.0 cm (to the UV detector), were used in these experiments. The capillary cassette was thermostated at 25°C.

The capillary was rinsed every day before the initial experiment with 0.1 M NaOH (10 min), deionized water (20 min) and then with the analysis buffer (10 min). The capillary was further rinsed with 0.1 M NaOH (5 min), deionized water (10 min) and then with the buffer (5 min) before each analysis. All the rinsing was carried out under the pressure of 925 mbar. Electrolytes were prepared by dissolving appropriate amounts of the acid in deionized water (18 M Ω cm, Elga Bucks, UK) and pH was adjusted by 50% w/w sodium hydroxide to the desired value.

A model pH boundary was created by injection of a plug of the injection electrolyte at definite pH by pressure of 50 mbar for 120 s (5% of the capillary length). Afterward, the voltage was applied for a certain time (inlet vial and outlet vial contained the electrolytes at different pHs according to

the system used for preconcentration). Then zones formed by electromigration were flushed to the detection cell of CC detector and UV detector by the pressure of 50 mbar. All of the measurements were performed five times if not stated otherwise.

2.3 Simulations

Two freeware programs Peakmaster 5.2 and Simul 5.0 designed by the group of Gaš [48–50] (<http://www.natur.cuni.cz/gas/>) were used for the simulation of electrolyte components' behavior on the pH boundary. Simulation settings were as follows: capillary length 25 mm, voltage 40.0 V/cm (voltage was decreased five times because of a numerical instability of the system), negative polarity and simulations without ionic strength corrections. Composition and concentration of electrolytes are listed in Table 1, ionic mobility and pK_a values were used from the program database based on the Hirokawa's tables [51] and borate data from Malá *et al.* [52]: phosphoric acid pK_a = 2.16, 7.21, 12.67, $\mu_e = -34.6, -61.4, -71.5 (\times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1})$; benzoic acid pK_a = 4.203, $\mu_e = -33.6 (\times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1})$; sodium pK_a = 13.7, $\mu_e = 51.9 (\times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1})$; boric acid pK_a = 9.23, $\mu_e = -36.2 (\times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1})$ and segmentation 10 000 points.

3 Results and discussion

3.1 Electrokinetic accumulation

The electrokinetic accumulation preconcentration is based on the injection of a weak acid in an alkaline BGE to the boundary consisted of an acidic BGE. In our case (Fig. 1), sodium borate pH 9.5 and sodium phosphate pH 2.5 were used. Weak acidic analytes are dissolved in the borate electrolyte pH 9.5 and electrokinetically injected into the pH boundary formed by phosphate electrolyte pH 2.5 where they are get stacked. In the study of Horáková *et al.* [44], formation of a “less conductive” zone with a flat pH region in between both pHs of the adjoining electrolytes was discussed. The use of the junction between borate and phosphate electrolytes brings a theoretical possibility of transient ITP preconcentration as described *e.g.* by Adam *et al.* [53] or Kim *et al.* [54].

3.2 Simulations

A set of simulations with different electrolytes vary in ionic strengths were done to prove the hypothesis of formation of the transient ITP state (for a general overview of BGEs, see Table 1). Benzoic acid was chosen as a model analyte. Conductivity, pH and benzoic acid concentration profiles are shown in Fig. 2 after 200 s of electrokinetic injection (more details regarding the concentration profiles of other

Table 1. Preconcentration systems studied^{a)}

System	Composition	pH ^{b)}	Ionic strength (mM) ^{b)}	Conductivity (S/m) ^{b)}
A	IE: 50 mM boric acid, 35 mM sodium	9.53	35.0	0.26
	BGE: 50 mM phosphoric acid, 32.5 mM sodium	2.50	36.2	0.36
B	IE: 100 mM boric acid, 70 mM sodium	9.51	70.0	0.49
	BGE: 100 mM phosphoric acid, 69 mM sodium	2.50	72.9	0.60
C	IE: 12 mM phosphoric acid, 24.02 mM sodium	9.50	36.0	0.21
	BGE: 50 mM phosphoric acid, 32.5 mM sodium	2.50	36.2	0.36
D	IE: 10 mM boric acid, 7 mM sodium	9.55	7.0	0.06
	BGE: 10 mM phosphoric acid, 4 mM sodium	2.53	7.2	0.15
E	IE: 5 mM boric acid, 3.5 mM sodium	9.56	3.5	0.03
	BGE: 50 mM phosphoric acid, 32.5 mM sodium	2.50	36.2	0.36
F	IE: 50 mM boric acid, 35 mM sodium	9.53	35.0	0.26
	BGE: 10 mM phosphoric acid, 4 mM sodium	2.53	7.2	0.15

a) IE, injection electrolyte.

b) Estimated by Peakmaster 5.2; data used for simulations: phosphoric acid, pK_a s: 2.16, 7.21 and 12.67, mobilities: -34.6 , -61.4 and -71.5 ; boric acid, pK_a : 9.23, mobility: -36.2 ; hydrochloric acid, pK_a : -2.0 , mobility: 79.1 ; sodium, pK_a : 13.7 , mobility: 51.9 (all the mobilities in $10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$).

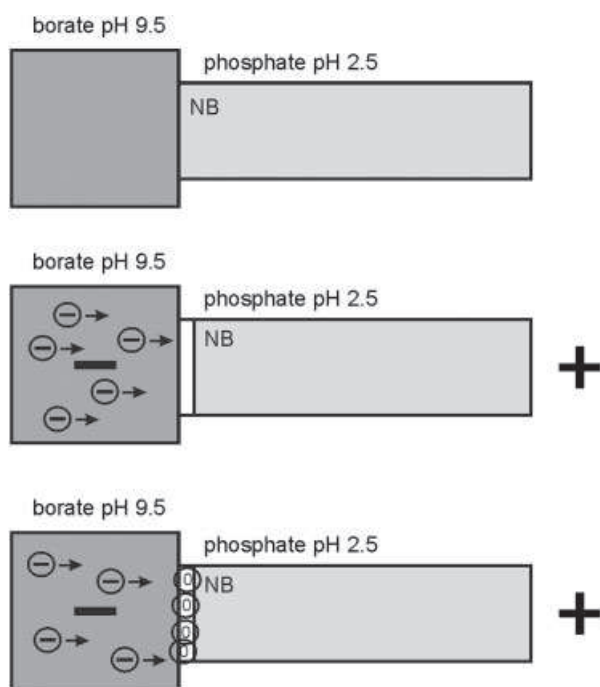


Figure 1. A scheme of the electrokinetic preconcentration method.

components from 37, 150, 300, 600 and 1200 s are shown in Supporting Information). First, a simulation of mobilities of anionic electrolyte components and benzoate was done in the pH range of 2.5–9.5 (Fig. 3). Since the mobilities showed the clear decreasing dependence phosphate > benzoate > borate in the whole pH range, the transient ITP state occurred during the preconcentration with borate as a terminator. Moreover, the same mobility dependencies could be calculated for other weak acids, e.g. *o*-toluic acid and vanillic acid.

From simulations, the transient ITP state could be supposed in the systems A, B, D and E (Fig. 2 and Supporting Information Figs. S1–S6). Systems A and E (Supporting Information Figs. S1 and S5) with 50 mM phosphate as the BGE (leading electrolyte for transient ITP) and different concentrations of borate were in fact the same systems because they had the same concentration of the leading electrolyte and thus they provided the same preconcentration using the same current density. With the system B (Supporting Information Fig. S2), transient ITP was also formed and the high ionic strength caused migration of the pH boundary similarly to the system A. In the system D (Supporting Information Fig. S4), the ITP state occurred too, but the low ionic strength of the electrolytes made the system not so effective in the view of preconcentration ability. The system F (Supporting Information Fig. S6) with lower concentration of the BGE (leading) than the concentration of the injection (terminating) electrolyte represented the one with destacking conditions. Finally, the system C (Supporting Information Fig. S3) that used phosphate as both injection and BGEs reflected the formation of low-conductive “water” zone and thus the preconcentration was based more on quasi-FASI state. Indeed, the simulations did not reflect exactly all the effects on real experiments because the real experiments are conducted between a capillary and an inlet vial and the EOF could play a role, too.

3.3 Experimental observations

Those preconcentration systems without the system F (the destacking one) described before (Table 1) were tested using 10^{-6} M benzoic acid and electrokinetic injection for 600 s followed by the SDS mobilization with 50 mM SDS

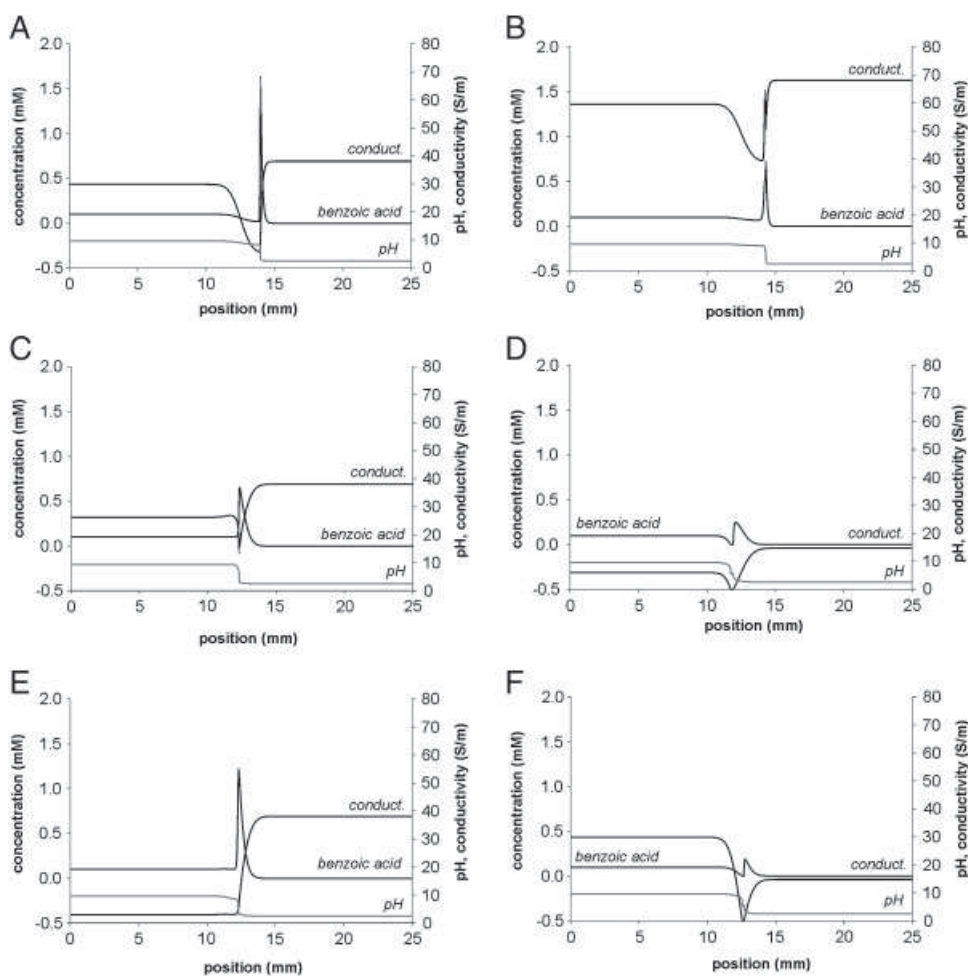


Figure 2. Simulation of benzoic acid concentration profiles, conductivity and pH in different preconcentration systems after 200 s of electrokinetic injection; starting position of the boundary is 12.5 mm.

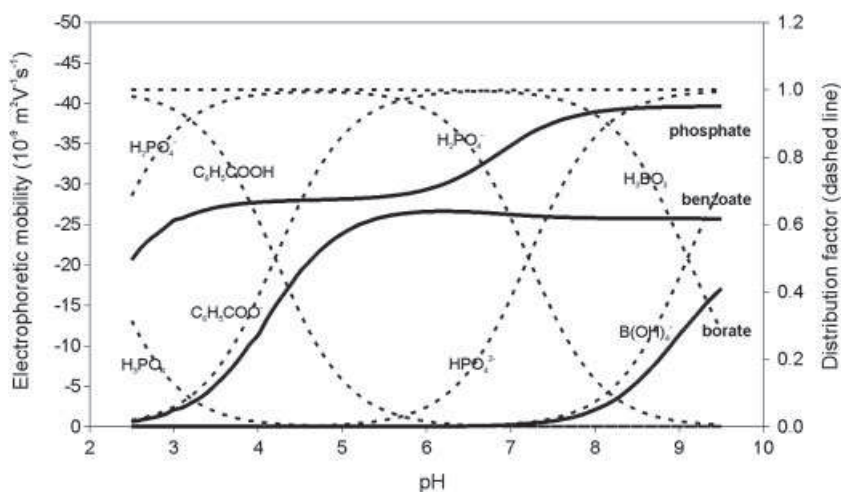


Figure 3. Simulation of electrophoretic mobilities of benzoic acid and BGE anions used in the preconcentration method.

according to the method published by Horáková *et al.* [44]. Experimental results showed that the most effective systems for such preconcentration were systems A, B and E (corresponding peak area was approx. 820 mAU s). Interestingly, the system C with the “water” zone provided about

threefold smaller peak area and wider peaks which proved that the preconcentration was based on different principle (quasi-FASI). Finally, with the system D, preconcentration effectiveness depended on the chemicals’ quality and impurities. If the conductivity of both injection and BGEs

increased due to impurities in chemicals, much higher preconcentration factor could be observed than supposed by mathematical simulations. If extra purified chemicals were used, then quite small peaks were observed (approx. 80 mAU s) similarly to the simulations. In the view of practical usefulness of the systems, the system A represented the most reproducible arrangement with good preconcentration effectiveness and reasonable current density.

Consequently, the formation of the neutralization boundary was studied under contactless conductivity detection. A model pH boundary with a junction of sodium borate pH 9.5 and sodium phosphate pH 2.5 both with ionic strength of 35 mM (system A) was tested upon application of constant voltage for desired time in an uncoated capillary (Fig. 4). The formation of a less conductive borate zone moving slowly to the anode is clearly visible from these results.

3.4 Effect of organic solvents

Organic solvents are well known for their general effects on separation performance in CE. They change BGE's permittivity, viscosity, conductance, *etc.* [55, 56]. Since that a study of addition of two common organic solvents methanol (MeOH, $\epsilon = 33$, $\eta = 0.544$ mPa s [57]) and ACN ($\epsilon = 36.6$, $\eta = 0.369$ mPa s [57]) to the injection electrolyte was performed. They were added to the electrolyte in concentrations of 0–80% v/v and 10 min injection of 10^{-6} M benzoic acid was studied with SDS mobilization (50 mM SDS). The increase of organic solvent in injection electrolyte led to the nonlinear increase of peak area of benzoic acid (Fig. 5). However, the injection reproducibility in the terms of current stability was lower with higher concentration of the organic solvent. The shape of the curve could be explained by three effects: (i) ionization/dissociation of benzoic acid is different due to the presence of the organic solvents;

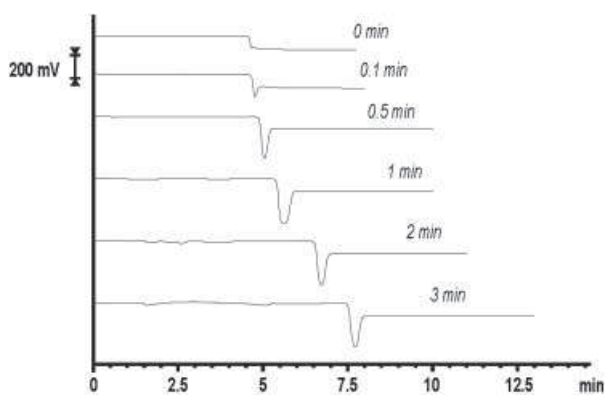


Figure 4. Experimental proof of the formation of a less conductive borate zone using contactless conductivity detection injection electrolyte: sodium borate pH 9.5, ionic strength of 35 mM, BGE: sodium phosphate pH 2.5, ionic strength of 36 mM.

similarly, the final mobility is affected by changes in the permittivity and viscosity, (ii) the conductivity of the injection electrolyte with organic solvents is much lower (Table 2) and it has a crucial effect on the quasi-FASI performance and (iii) the electrokinetic injection is generally influenced by other ions introduced in the same time according to their mobility. The addition of organic solvent decreased the concentration of ions of the injection electrolyte, and therefore it could also enhance the amount of benzoic acid injected.

The use of 80% v/v MeOH seemed to be the most interesting regarding the effectiveness of the on-line preconcentration. Therefore, a mixture of benzoic acid, ferulic acid and cinnamic acid was analyzed with 30 min of electrokinetic injection (Fig. 6). LODs, 0.3 nM for benzoic acid, 0.7 nM for ferulic acid and 1.0 nM for cinnamic acid (evaluated at 280 nm for cinnamic acid and at 200 nm for benzoic and ferulic acid), were much better in comparison with the previously published electrokinetic

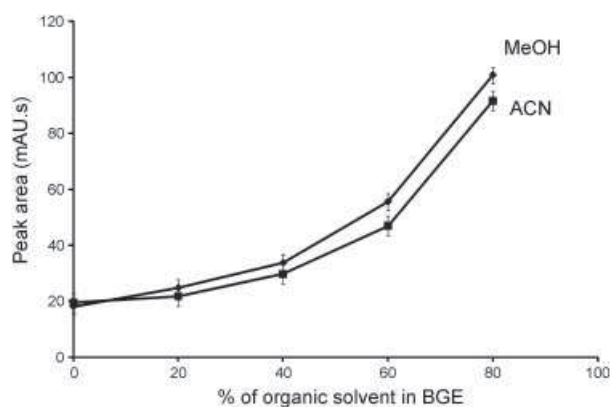


Figure 5. Influence of MeOH and ACN addition into the injection electrolyte on the preconcentration performance of benzoic acid injection electrolyte: sodium borate pH 9.5, ionic strength of 35 mM with addition of organic solvent, BGE: sodium phosphate pH 2.5, ionic strength of 36 mM, mobilization by 50 mM SDS at -20 kV, 10^{-6} M benzoic acid.

Table 2. Conductivities of partially nonaqueous BGEs studied for on-line preconcentration

Concentration of the organic additive (%)	Conductivity (S/m) ^{a)}	
	Sodium borate pH 9.5 with MeOH	Sodium borate pH 9.5 with ACN
0	0.720	0.720
20	0.482	0.567
40	0.334	0.439
60	0.242	0.294
80	0.186	0.197

a) Measured by the protocol described by Francois *et al.* [58], an average value is displayed from five replicates; the relative standard deviation did not exceed 3%.

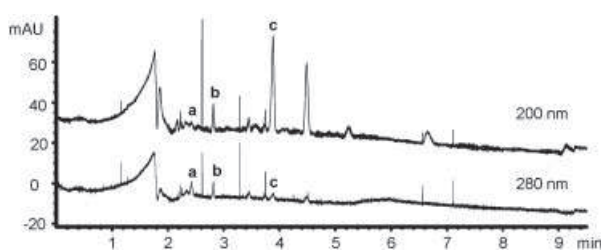


Figure 6. An example of the preconcentration of benzoic acid, ferulic acid and cinnamic acid from the mostly nonaqueous injection electrolyte: sodium borate pH 9.5, ionic strength of 35 mM with addition of 80% v/v MeOH, BGE: sodium phosphate pH 2.5, ionic strength of 36 mM, mobilization by 50 mM SDS at -20 kV, electrokinetic injection 30 min at -20 kV; (a) cinnamic acid, (b) ferulic acid and (c) benzoic acid.

accumulation methods without any addition of organic solvent (Horáková *et al.* [44] determined LOD of benzoic acid as 180 nM for 2 min injection and 5 nM for 120 min injections, and Petr *et al.* [45] determined LOD of ferulic acid as 22 nM for 30 min injection). Moreover, a classical CZE method [44] provided LOD of benzoic acid of 23.33 μ M which is approx. 70 000-fold higher than LOD obtained by the preconcentration with addition of MeOH. In comparison with the continuous dosing carrier ampholyte-free isoelectric focusing ITP-ITP/CZE method introduced by Pospíchal and Glovinová [59], the electrokinetic injection from partially nonaqueous BGEs is not so effective but the use of nonaqueous solvents in such preconcentrations could be profitable for many applications. Indeed, the limitation of our method is still in the analysis of real samples where other ions could also be presented in a sample and the preconcentration effect would not be so impressive and would require a sample cleanup step.

4 Concluding remarks

A contribution to the description of electrokinetic effects on the pH boundary formed by borate and phosphate electrolytes for on-line preconcentration of weak acids was discussed in this article. Simulations and experimental studies verified that the preconcentration is induced by following contributions: (i) the changes of analytes' mobilities in the pH boundary due to the different dissociation states in both adjoining electrolytes, (ii) the differences in mobilities of adjoining co-ions, borate and phosphate, that created the transient ITP state and (iii) the heterogeneity in the electric field strength across the capillary that caused field-amplified sample injection (in the system C). Moreover, the addition of organic solvent to the injection electrolyte could enhance the preconcentration performance. Subnanomolar LODs of hydroxybenzoic acids were achieved with 80% MeOH in the injection electrolyte which represents more than 70 000 fold preconcentration in comparison of classical CZE method [44].

The financial support by the Research project MSM 6198959216 is gratefully acknowledged. Authors thank Professor Bohuslav Gaš for making his programs Simul and Peakmaster freeware.

The authors have declared no conflict of interest.

5 References

- [1] Everaerts, F. M., Beckers, J. L., Verheggen, T. P. E. M., *Isotachopheresis. Theory, Instrumentation and Applications*. Elsevier, Amsterdam 1976.
- [2] Gebauer, P., Boček, P., *Electrophoresis* 2005, 26, 453–462.
- [3] Gebauer, P., Malá, Z., Boček, P., *Electrophoresis* 2006, 27, 519–525.
- [4] Gebauer, P., Malá, Z., Boček, P., *Electrophoresis* 2006, 27, 962–967.
- [5] Gebauer, P., Malá, Z., Šlampová, A., Boček, P., *Electrophoresis* 2008, 29, 1067–1076.
- [6] Křivánková, L., Březková, M., Gebauer, P., Boček, P., *Electrophoresis* 2004, 25, 3406–3415.
- [7] Breadmore, M. C., Mosher, R. A., Thormann, W., *Anal. Chem.* 2006, 78, 538–546.
- [8] Breadmore, M. C., *Electrophoresis* 2008, 29, 1082–1091.
- [9] Cao, C.-X., Fan, L.-Y., Zhang, W., *Analyst* 2008, 133, 1139–1157.
- [10] Kohlrausch, F., *Annu. Phys. Chem. N. F.* 1897, 62, 209–239.
- [11] Hruška, V., Gaš, B., *Electrophoresis* 2007, 28, 3–14.
- [12] Simpson, S. L., Quirino, J. P., Terabe, S., *J. Chromatogr. A* 2008, 1184, 504–541.
- [13] Breadmore, M. C., *Electrophoresis* 2007, 28, 254–281.
- [14] Ptolemy, A. S., Britz-McKibbin, P., *Analyst* 2008, 133, 1643–1648.
- [15] Malá, Z., Šlampová, A., Gebauer, P., Boček, P., *Electrophoresis* 2009, 30, 215–229.
- [16] Breadmore, M. C., Thabano, J. R. E., Dawod, M., Kazarian, A. A., Quirino, J. P., Guijt, R. M., *Electrophoresis* 2009, 30, 230–248.
- [17] Gebauer, P., Boček, P., *Electrophoresis* 2009, 30, S27–S33.
- [18] Hirokawa, T., Okamoto, H., Gaš, B., *Electrophoresis* 2003, 24, 498–504.
- [19] Urbánek, M., Delaunay, N., Miche, R., Varenne, A., Gareil, P., *Electrophoresis* 2007, 28, 3767–3776.
- [20] Quirino, J. P., Haddad, P. R., *Anal. Chem.* 2008, 80, 6824–6829.
- [21] Quirino, J. P., *J. Chromatogr. A* 2008, 1214, 171–177.
- [22] Cao, C. X., Zhou, S. L., Qian, Y. T., He, Y. Z., Wang, C. R., Yang, L., Qu, Q. S., Chen, W. K., *J. Chromatogr. A* 2002, 952, 29–38.
- [23] Cao, C. X., He, Y. Z., Li, M., Qian, Y. T., Gao, M. F., Ge, L. H., Zhou, S. L., Yang, L., Qu, Q. S., *Anal. Chem.* 2002, 74, 4167–4174.
- [24] Britz-McKibbin, P., Chen, D. D. Y., *Anal. Chem.* 2000, 72, 1242–1252.
- [25] Aebersold, R., Morrison, H. D., *J. Chromatogr.* 1990, 516, 79–88.

- [26] Kazarian, A. A., Hilder, E. F., Breadmore, M. C., *J. Chromatogr. A* 2008, **1200**, 84–91.
- [27] Imani, K., Monton, M. R. N., Ishihama, Y., Terabe, S., *J. Chromatogr. A* 2007, **1148**, 250–255.
- [28] Nesbitt, C. A., Lo, J. T. M., Yeung, K. K. C., *J. Chromatogr. A* 2005, **1073**, 175–180.
- [29] Jurcic, K., Nesbitt, C. A., Yeung, K. K. C., *J. Chromatogr. A* 2006, **1134**, 317–325.
- [30] Su, S., Yu, Y., *J. Chromatogr. A* 2009, **1216**, 1490–1495.
- [31] Li, M., Fan, L.-Y., Zhang, W., Cao, C.-X., *Anal. Bioanal. Chem.* 2007, **387**, 2719–2725.
- [32] Wang, Q.-L., Fan, L.-Y., Zhang, W., Cao, C.-X., *Anal. Chim. Acta* 2006, **580**, 200–205.
- [33] Su, A.-K., Chang, Y.-S., Lin, C.-H., *Talanta* 2004, **64**, 970–974.
- [34] Hsieh, M.-M., Chang, H.-T., *Electrophoresis* 2005, **26**, 187–195.
- [35] Yu, L., Li, S. F. Y., *Electrophoresis* 2005, **26**, 4360–4367.
- [36] Jaafar, J., Irwan, Z., Ahamad, R., Terabe, S., Ikegami, T., Tanaka, N., *J. Sep. Sci.* 2007, **30**, 391–398.
- [37] Arnett, S. D., Lunte, C. E., *Electrophoresis* 2007, **28**, 3786–3793.
- [38] Cao, C.-X., Zhang, W., Qin, W.-H., Li, S., Zhu, W., Liu, W., *Anal. Chem.* 2005, **77**, 955–963.
- [39] Zhu, W., Zhang, W., Fan, L.-Y., Shao, J., Li, S., Chen, J.-L., Cao, C.-X., *Talanta* 2009, **78**, 1194–1200.
- [40] Booker, C. J., Yeung, K. K. C., *Anal. Chem.* 2008, **80**, 8598–8604.
- [41] Breadmore, M. C., Quirino, J. P., *Anal. Chem.* 2008, **80**, 6373–6381.
- [42] Cheng, H.-L., Liao, Y.-M., Chiou, S.-S., Wu, S.-M., *Electrophoresis* 2008, **29**, 3665–3673.
- [43] Zhang, Z.-X., Zhang, M.-Z., Zhang, S.-S., *Electrophoresis* 2009, **30**, 1958–1966.
- [44] Horáková, J., Petr, J., Maier, V., Tesařová, E., Veis, L., Armstrong, D. W., Gaš, B., Ševčík, J., *Electrophoresis* 2007, **28**, 1540–1547.
- [45] Petr, J., Vítková, K., Ranc, V., Znaleziona, J., Maier, V., Knob, R., Ševčík, J., *J. Agric. Food Chem.* 2008, **56**, 3940–3944.
- [46] Petr, J., Maier, V., Znaleziona, J., Vítková, K., Ranc, V., Ševčík, J., *Chem. Listy* 2009, **103**, 661–666.
- [47] Gaš, B., Zuska, J., Coufal, P., van de Goor, T., *Electrophoresis* 2002, **23**, 3520–3527.
- [48] Jaroš, M., Hruška, V., Štědrý, M., Zusková, I., Gaš, B., *Electrophoresis* 2004, **25**, 3080–3085.
- [49] Schwer, C., Gaš, B., Lottspeich, F., Kenndler, E., *Anal. Chem.* 1993, **65**, 2108–2115.
- [50] Hruška, V., Jaroš, M., Gaš, B., *Electrophoresis* 2006, **27**, 984–991.
- [51] Hirokawa, T., Nishino, M., Aoki, N., Kiso, Y., Sawamoto, Y., Yagi, T., Akiyama, J.-I., *J. Chromatogr.* 1983, **271**, D1–D106.
- [52] Malá, Z., Gebauer, P., Boček, P., *Electrophoresis* 2009, **30**, 866–874.
- [53] Adam, T., Ševčík, J., Švagera, Z., Fairbanks, L. D., Barták, P., *Electrophoresis* 1999, **20**, 564–568.
- [54] Kim, J.-B., Britz-McKibbin, P., Hirokawa, T., Terabe, S., *Anal. Chem.* 2003, **75**, 3986–3993.
- [55] Riekkola, M. L., Wiedmer, S. K., Valko, I. E., Siren, H., *J. Chromatogr. A* 1997, **792**, 13–35.
- [56] Kenndler, E., *Electrophoresis* 2009, **30**, S101–S111.
- [57] Znaleziona, J., Petr, J., Knob, R., Maier, V., Ševčík, J., *Chromatographia* 2008, **67**, S5–S12.
- [58] Francois, Y., Zhang, K., Varenne, A., Gareil, P., *Anal. Chim. Acta* 2006, **562**, 164–170.
- [59] Pospíchal, J., Glovinová, E., *J. Chromatogr. A* 2001, **918**, 195–203.