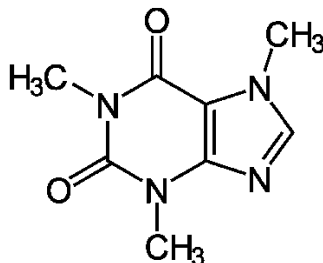


## ÚLOHA Č. 11: stanovení kofeinu v potravinářských produktech

Kofein je purinový alkaloid, který se vyskytuje v kávě a čaji a díky svým povzbuzujícím účinkům je součástí kolových a energetických nápojů. V této úloze bude stanoven pomocí micelární elektrokinetické chromatografie.



Obr. 1: Chemická struktura kofeinu

### Kapilární elektroforéza

Kapilární elektroforéza (CE) patří mezi elektromigrační separační techniky. CE umožňuje separaci částic různé velikosti; od jednoduchých iontů až po nabitě koloidní částice, makromolekuly (proteiny, nukleové kyseliny, polysacharidy), či dokonce živé bakteriální buňky. Našla si proto uplatnění v mnoha oborech. Používá se k analýzám potravin, léčiv, biologických vzorků, při identifikaci a stanovování metabolitů, a také při studiu enzymů. K jejím nesporným výhodám patří možnost separace nabitých i neutrálních látek, jednoduché provedení, vysoká účinnost, rychlost analýzy, potřeba malých objemů vzorků, malé množství odpadů, a také malé nároky na čistotu vzorku.

K základním jevům uplatňujícím se v CE patří elektroforéza a elektroosmóza. Projevem elektroforézy je pohyb iontů v elektrickém poli. Projevem elektroosmózy je tok celé kapaliny, kterým je kapilára naplněna, vlivem napětí.

Elektroforéza spočívá v migraci nabitých částic ve stejnosměrném elektrickém poli. To je vytvářeno vkládáním konstantního stejnosměrného napětí mezi elektrody vyrobené z inertních materiálů. K separaci dochází na základě různé elektroforetické mobility jednotlivých složek vzorku. Elektroforetická mobilita je definována jako rychlost pohybu nabitě částice roztokem ve stejnosměrném elektrickém poli o jednotkové intenzitě, což vyjadřuje vztah (1), kde  $\mu_e$  je elektroforetická mobilita,  $v$  je rychlost pohybu nabitě částice a  $E$  je intenzita elektrického pole.

$$\mu_e = \frac{v}{E} \quad (1)$$

Rovnoměrný pohyb iontů v roztoku je výsledkem působení dvou vzájemně opačných sil. Síla elektrického pole  $F_e$  uvádějící ion do pohybu je dána vztahem (2), kde  $Q$  je náboj iontu.

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

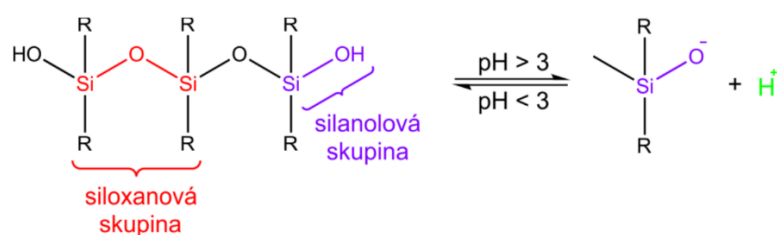
Opačným směrem působí frikční síla. S využitím Stokesovy aproximace tvaru částice jako koule s poloměrem  $r$  v roztoku o viskozitě  $\eta$  platí pro frikční sílu  $F_f$  vztah (3).

$$F_f = -6\pi\eta r v \quad (3)$$

V ustáleném stavu se obě síly rovnají ( $F_e = F_f$ ) a s využitím předchozích vztahů dostáváme pro elektroforetickou mobilitu vztah (4). Elektroforetická mobilita je tedy přímo úměrná jeho náboji a nepřímo úměrná jeho poloměru a viskozitě roztoku.

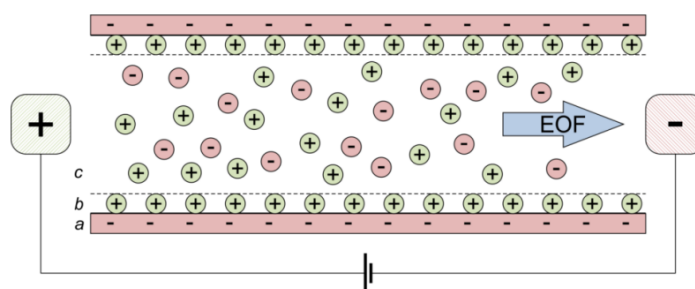
$$\mu_e = \frac{Q}{6\pi\eta r} \quad (4)$$

Elektroosmotický tok (EOF) je základním elektrokinetickým jevem v CE. Uvádí do pohybu celý objem uvnitř kapiláry, tedy molekuly různého náboje stejně. V průběhu pohybu roztoku kapilárou dochází k elektroforetické separaci nabitých látek. EOF je závislý na materiálu, ze kterého je kapilára vyrobena. V CE se nejčastěji používají křemenné kapiláry pro jejich vysokou transparentnost v UV oblasti a dobrou tepelnou vodivost pro odvod Jouleova tepla. Vnitřní vrstva křemenné kapiláry obsahuje silanolové a siloxanové skupiny. Silanolové skupiny v roztoku částečně disociují a vnitřní povrch křemenné kapiláry s vyšším pH získává záporný náboj (Obr.2.).



Obr. 2: Disociace silanolových skupin stěny kapiláry

Disociované kationty vytvářejí na stěně kapiláry statickou Sternovu vrstvu. Ionty elektrolytu vzdálenější od stěny kapiláry tvoří pohyblivou neboli difuzní vrstvu. Mezi vrstvami vzniká elektrokinetický potenciál dvojvrstvy označovaný jako  $\zeta$ -potenciál (viz Obr. 3). Po aplikaci elektrického napětí se začne difuzní vrstva spolu s molekulami rozpouštědla díky silné solvataci kationtů pohybovat směrem ke katodě (katodický EOF) konstantní rychlostí EOF



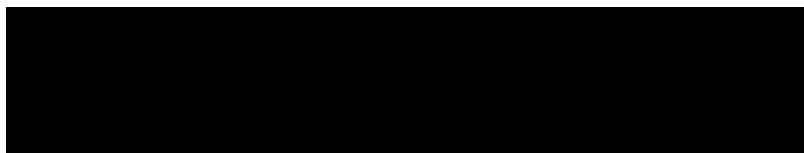
Obr. 3: Znázornění elektroosmotického toku (EOF) vznikajícího po připojení elektrického pole

Směr a rychlost pohybu iontu jsou obecně dány součtem elektroforetické mobility analytu a mobility EOF. EOF unáší všechny ionty stejnou rychlostí a působí tedy jako neselektivní síla. Je silně závislý na iontové síle a pH základního elektrolytu. EOF mezi pH 3-8 několiknásobně vzrůstá a způsobuje pohyb všech částic ve stejném směru. Nejprve jsou detekovány kationty, které migrují ke katodě a jsou urychleny EOF; dále neutrální látky, které nejsou separovány a migrují pouze rychlostí EOF; nakonec anionty, které migrují k anodě, ale mobilita EOF je obvykle větší než mobilita aniontů, a proto jsou také unášeny ke katodě.

Přístroj pro CE se v základním uspořádání skládá ze separační kapiláry, zdroje vysokého napětí, dvou elektrod, které jsou spolu s kapilárou ponořeny do nádob (vialek) se základním

elektrolytem (background electrolyte, BGE), systému dávkování, detektoru a zařízení pro záznam a vyhodnocení analytického signálu, kterým je v současné době počítač s vhodným softwarem. CE je možné kombinovat s různými typy detekčních technik, výběr závisí na fyzikálně-chemických vlastnostech stanovované látky. Detektor zaznamenává změnu signálu v čase a tento záznam se nazývá elektroforeogram.

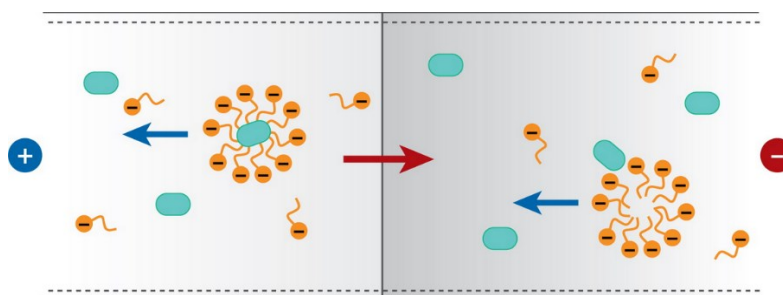
### Micelární elektrokinetická chromatografie



Obr. 4: Dodecylsírán sodný

Micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC) je analytická metoda prováděná na instrumentaci kapilární elektroforézy. Díky přítomnosti surfaktantu v základním elektrolytu dochází po překročení tzv *kritické micelární koncentrace* k tvorbě micel, které slouží jako takzvaná pseudostacionární fáze. Kromě elektroforézy nabitých molekul dochází také k chromatografickému dělení analytů mezi micelami a roztokem. Látky používané pro tvorbu micel disponují nábojem a samy o sobě tedy mají určitou mobilitu v elektrickém poli, což umožňuje separovat i nenabitě molekuly na základě jejich interakce s nimi. Mezi nejčastěji používané látky vytvářející micely patří dodecylsírán sodný (SDS)

Shrnutí: V MEKC tedy kromě EOF (pohyb celého objemu kapiláry), elektroforézy (oddělení látek s různými náboji) dochází také k separaci nenabitých látek a to na základě jejich interakce s pseudostacionární fází.



Obr. 5: Micely SDS (hydrofilní části molekuly směřující do vodného roztoku, hydrofobní dovnitř micely) díky svému zápornému náboji migrují ke kladné elektrodě (modrá šipka) a dochází k separaci látek na základě dělení mezi roztokem a pseudostacionární fází (micely), Terabe, S. *Capillary Separation: Micellar Electrokinetic Chromatography. Annual Review of Analytical Chemistry* **2009**, 2: 99-120



## Výsledky

Píky odpovídající kofeinu byly identifikovány na základě srovnání migračních časů a absorpčních spekter se standardními vzorky kofeinu. Pomocí softwaru Chemstation byly odečteny výšky píků kofeinu a pomocí kalibrační závislosti přepočteny na koncentraci kofeinu v jednotlivých nápojích.

Graf závislosti absorbance na koncentraci kofeinu

Tabulka koncentrací kofeinu zjištěných ve vzorcích

Vzorek	Ředění	Výška píku	Koncentrace kofeinu