

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta



Tomáš Křížek

FLEXIBILITA KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZY
A JEJÍ ANALYTICKÉ APLIKACE

Flexibility of capillary electrophoresis
and its analytical applications

Habilitační práce

Praha 2021

OBSAH

SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ	3
PŘEDMLUVA	6
1 ÚVOD.....	7
2 FLEXIBILITA KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZY	9
2.1 Změna separačního prostředí.....	9
2.1.1 Kapilární zónová elektroforéza.....	9
2.1.2 Další separační režimy kapilární elektroforézy	10
2.2 Mobilizace zón	12
2.2.1 Elektroforetická migrace	12
2.2.2 Elektroosmotický tok.....	12
2.2.3 Tlakový rozdíl	14
2.3 Částečné plnění kapiláry a vzájemné mísení zón.....	15
2.3.1 Zakoncentrování analytů zesílením pole.....	15
2.3.2 Reakce a interakce v kapiláře	19
2.3.2.1 Elektroforetické mísení.....	20
2.3.2.2 Difuzní mísení	23
2.4 Změna rozměrů kapiláry a její vliv na separaci	32
2.4.1 Vliv délky kapiláry	32
2.4.2 Vliv vnitřního průměru kapiláry	35
2.4.3 Separace na krátkém konci kapiláry	36
2.5 Nepřímá UV detekce	42
3 MOBILIZACE MARKERŮ ELEKTROOSMOTICKÉHO TOKU.....	44
4 ZÁVĚR.....	52
5 PŘEHLED PUBLIKOVANÝCH PRACÍ	54
5.1 Původní vědecké práce v impaktovaných časopisech	54
5.2 Přehledové články v impaktovaných časopisech	58
5.3 Jiné články v časopisech.....	58
5.4 Překlad odborné knihy	58
LITERATURA.....	59
PŘÍLOHY	67

SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ

Některé běžně používané zkratky vycházejí z angličtiny. Pro lepší srozumitelnost jsou proto v závorce uvedeny původní anglické výrazy.

Ac	aceton
AAd	akrylamid
BGE	základní elektrolyt (<i>background electrolyte</i>)
CBD	kanabidiol (<i>cannabidiol</i>)
CBDA	kanabidiolová kyselina (<i>cannabidiolic acid</i>)
CE	kapilární elektroforéza (<i>capillary electrophoresis</i>)
CZE	kapilární zónová elektroforéza (<i>capillary zone electrophoresis</i>)
DES	hluboce eutektické rozpouštědlo (<i>deep-eutectic solvent</i>)
DMAA	<i>N,N</i> -dimethylacetamid
DMFA	<i>N,N</i> -dimethylformamid
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
EOF	elektroosmotický tok (<i>electroosmotic flow</i>)
FA	formamid
FASI	(<i>field-amplified sample injection</i>)
FASS	(<i>field-amplified sample stacking</i>)
H ⁻	záporně nabitá molekula heparinu
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (<i>high-performance liquid chromatography</i>)
i.d.	vnitřní průměr (<i>inner diameter</i>)
K ⁻	záporně nabitý komplex heparinu a tetraargininu
MEKC	micelární elektrokinetická chromatografie
NMA	<i>N</i> -methylacetamid
NMFA	<i>N</i> -methylformamid
NPH	Neutral Protamine Hagedorn (formulace insulinu s postupným uvolňováním)
SCFA	nižší mastné kyseliny (<i>short-chain fatty acids</i>)
T ⁺	kladně nabitá molekula tetraargininu
TDLFP	příčná difúze laminárních profilů toku (<i>transverse diffusion of laminar flow profiles</i>)
THC	tetrahydrokanabinol (<i>tetrahydrocannabinol</i>)

THCA	tetrahydrokanabinolová kyselina (<i>tetrahydrocannabinolic acid</i>)
TUR	thiomočovina (<i>thiourea</i>)
UV	ultrafialová oblast spektra (<i>ultraviolet</i>)
UV/VIS	ultrafialová a viditelná oblast spektra (<i>ultraviolet and visible</i>)
<i>A</i>	absorbance, plocha píku
<i>c</i>	látková koncentrace
<i>d</i>	vzdálenost od vstupního konce kapiláry
<i>E</i>	intenzita elektrického pole
<i>F_e</i>	elektrostatická síla
<i>F_f</i>	frikční síla
<i>I</i>	elektrický proud
<i>l</i>	délka absorbujícího prostředí
<i>l_C</i>	celková délka kapiláry
<i>l_D</i>	efektivní délka kapiláry
<i>p</i>	tlak
pH	dekadický logaritmus aktivity vodíkového iontu
<i>q</i>	elektrický náboj
<i>r</i>	vnitřní poloměr kapiláry, hydratovaný poloměr iontu
<i>R</i>	elektrický odpor
<i>R_{1,2}</i>	rozlišení píků 1 a 2
<i>R²</i>	coefficient of determination
<i>m</i>	elektroforetická mobilita
<i>m_{EOF}</i>	mobilita elektroosmotického toku
<i>N</i>	účinnost separace
<i>t</i>	čas
<i>t_{reakce}</i>	doba trvání reakce
<i>U</i>	elektrické napětí
<i>v</i>	rychlost pohybu
<i>v_{EOF}</i>	rychlost elektroosmotického toku
<i>v/v</i>	objemový poměr
<i>w</i>	hmotnostní zlomek, šířka píku při základně
<i>α_{1,2}</i>	koeficient selektivity pro látky 1 a 2
<i>ε</i>	permitivita

ε	molární absorpční koeficient při vlnové délce λ
η	dynamická viskozita
ζ	zeta potenciál
$\frac{dV}{dt}$	objemový průtok

PŘEDMLUVA

Tato práce je zaměřena na analytickou metodu kapilární elektroforézy, s níž byla spojena velká část mé dosavadní vědecké činnosti. Při řešení různých výzkumných úkolů a problémů jsem mnohokrát ocenil a využil flexibilitu kapilární elektroforézy, proto se jí na následujících stranách podrobně věnuji. Do své habilitační práce jsem vybral jedenáct článků publikovaných v odborných časopisech v letech 2013-2021, které jsou praktickou ukázkou využití různých přístupů a řešení, jež kapilární elektroforéza na rozdíl od rozšířenější kolonové chromatografie umožňuje.

V práci jsou rozebrány jednotlivé charakteristické rysy kapilární elektroforézy. Konkrétně je pozornost věnována existenci různých způsobů mobilizace zón, jež lze snadno kombinovat, a s tím související možnosti částečného plnění kapiláry a vzájemného mísení zón. Druhým rysem, který je diskutován, je jednoduchá úprava rozměrů kapiláry a možnost provádění rychlých separací na jejím kratším konci. Třetím výhodným rysem metody je fakt, že v elektroforetickém systému je vždy zachována elektroneutralita, což umožňuje nepřímou UV detekci látek neabsorbujících v dostatečné míře UV záření. Na příkladech z přiložených publikací i na některých dosud nepublikovaných datech je ilustrováno využití těchto výhod ve vědeckém výzkumu i v praktické analytické chemii. Je zde podtržen celkový přínos takovýchto méně běžných experimentálních řešení. V další části práce je pozornost věnována elektroosmotickému toku, který přináší do kapilární elektroforézy výhody i jisté komplikace. Konkrétně je pojednáno o problematice měření rychlosti elektroosmotického toku s využitím neutrálních markerů. Jsou nastíněny výsledky studií, ve kterých jsme ukázali, že spolehlivost tohoto přístupu může být negativně ovlivněna interakcemi neutrálních markerů s iontovými složkami základního elektrolytu. Poslední součástí práce jsou přiložené publikace, které jsou označeny římskými číslicemi.

Na tomto místě bych chtěl upřímně poděkovat všem svým kolegům a studentům, kteří se podíleli na vzniku této práce a publikací, na nichž je založena, ať už šlo o plánování a provedení experimentů, vyhodnocení a interpretaci dat, konzultace a rady při řešení problémů nebo jakoukoli jinou spolupráci. Děkuji také své rodině a přátelům za všeobecnou podporu.

1 ÚVOD

Analytická chemie má nezastupitelnou úlohu v moderní společnosti. Na výsledcích chemických analýz jsou založeny rozhodovací, řídicí a kontrolní procesy ve většině oblastí lidské činnosti. Příkladem může být potravinářství, kde se stanovením obsahu pesticidů v zemědělských plodinách určuje jejich závadnost či nezávadnost pro lidské zdraví. Ve zdravotnictví je výsledek stanovení obsahu vybraných látek v krvi nebo moči pacienta často důležitým vodítkem při diagnóze, rozhodování o způsobu léčby a dávkování léků. Bez analytické chemie se neobejde ani soudní aparát. Typickým příkladem z této oblasti je stanovení obsahu omamných nebo toxických látek v krvi pachatelů a obětí trestných činů. Výzkum a vývoj si v dnešní době bez analytické chemie rovněž nelze představit.

Zatímco suroviny, meziprodukty nebo konečné produkty průmyslových procesů jsou často poměrně jednoduché směsi a jejich složky je možné stanovit přímo vhodnou klasickou, elektroanalytickou nebo spektrometrickou metodou, v případě analýzy biologických materiálů nebo složek životního prostředí představují vzorky často velmi složité směsi látek, na které klasické, elektroanalytické ani spektrometrické metody svou poněkud omezenou selektivitou nedostačují. V takových případech je třeba provést před samotnou detekcí analytů fyzickou separaci jednotlivých složek vzorku. Pro separace směsí těkavých látek s výhodou využíváme plynovou chromatografii. Pro látky méně těkavé pak vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii nebo kapilární elektroforézu.

Kapilární elektroforéza (CE) jako analytická separační metoda nabízí řadu výhod oproti do jisté míry konkurenční vysokoúčinné kapalinové chromatografii (HPLC). Jedná se především o krátkou dobu analýzy, vysokou separační účinnost, velmi nízkou spotřebu vzorků, rozpouštědel a činidel, s čímž souvisí nízké provozní náklady i šetrnost k životnímu prostředí. Pro ilustraci je možné uvést, že objem vzorku typicky dávkovaný do systému HPLC se pohybuje v jednotkách mikrolitrů, doba analýzy je řádově 10-30 minut a na 10 analýz se spotřebuje zhruba 100-300 ml mobilní fáze. V CE se dávkované objemy vzorku pohybují v desítkách nanolitrů, doba analýzy je typicky 1-10 minut a spotřeba základního elektrolytu na 10 analýz je 1-2 ml. Za zmínku stojí i řádově nižší cena křemenné separační kapiláry pro CE ve srovnání se separačními kolonami pro HPLC. Díky tomu je v CE možné bez větších obav pracovat i s málo upravovanými vzorky, což snižuje pracnost a časovou náročnost analýzy.

V době jejího rozmachu v devadesátých letech dvacátého století se soudilo, že CE v analytické praxi z velké části postupně nahradí HPLC. Kromě výše uvedených výhod lze totiž do separace v CE prostřednictvím aditiv do základního elektrolytu zapojit nejrůznější separační mechanismy, nejen elektroforetickou migraci, ale i rozdělování mezi polární základní elektrolyt a nepolární micelární pseudofázi, síťový efekt, afinitní interakce a další [1]. Nicméně kvůli někdy problematické robustnosti metody, která vyžaduje větší zkušenosti operátora, a nižší citlivosti detekce k tak rozsáhlému uplatnění CE v praxi nedošlo. To však neznamená, že by CE jako analytická metoda ztratila svůj význam. Ten dnes spočívá v následujících bodech:

1) Jedná se o metodu s několika separačními módy, které mají principiálně odlišný separační mechanismus, než jaký se uplatňuje v jednotlivých módech HPLC. CE tedy poskytuje data komplementární k HPLC, je možné ji využít k doplnění informací, jež jsou pomocí HPLC obtížně dosažitelné nebo zcela nedosažitelné. Dále je tuto komplementaritu možné využít pro potvrzení výsledků získaných metodou HPLC.

2) Jedná se o metodu s velmi jednoduchým experimentálním uspořádáním, díky kterému lze snadno měnit separační mechanismy, a které umožňuje nejrůznější speciální aplikace, ať už analytické, fyzikálně chemické nebo jiné.

V této habilitační práci bude věnována pozornost bodu 2) a rozmanitosti řešení, která metoda CE umožňuje.

2 FLEXIBILITA KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZY

Základem flexibility CE je to, že separační kapilára není, na rozdíl od HPLC, naplněna částicemi se stacionární fází. Z tohoto prostého faktu vyplývají následující důsledky:

- 1) Vnitřní prostředí v kapiláře lze snadno měnit.
- 2) Je možné kombinovat různé způsoby mobilizace zón a směr jejich pohybu lze jednoduše obracet.
- 3) Různé části kapiláry mohou být naplněny odlišnými roztoky a tyto roztoky je možné přímo v kapiláře vzájemně mísit.
- 4) Délka i šířka separační kapiláry mohou být snadno změněny tím, že je použita nová kapilára jiných rozměrů, která je naplněná stejným roztokem základního elektrolytu.

V následujícím textu budou detailněji rozebrány tyto aspekty CE a prostřednictvím příkladů z vybraných publikací budou ilustrovány možnosti jejich praktické aplikace.

2.1 Změna separačního prostředí

Separací prostředí uvnitř kapiláry je možné zcela změnit během několika desítek sekund promytím kapiláry příslušným roztokem. Spotřeba roztoku základního elektrolytu se přitom pohybuje v desetinách až jednotkách mililitru. Tato možnost je další velkou výhodou CE ve srovnání s HPLC, kde je výměna stacionární fáze v koloně z praktického hlediska nereálná a je nutné vyměnit celou separační kolonu. Na výběr přitom máme z celé řady separačních režimů, které jsou stručně popsány v následujícím textu.

2.1.1 Kapilární zónová elektroforéza

V základním uspořádání kapilární elektroforézy, tzv. *kapilární zónové elektroforéze* (CZE), je separace založena na rozdílné migraci iontů v roztoku základního elektrolytu ve vloženém elektrickém poli. Při takovéto migraci je pohyb iontu urychlován elektrickou silou F_e , která je dána součinem intenzity elektrického pole E a elektrického náboje iontu q (rovn. 1) [2].

$$F_e = q \cdot E \quad (1)$$

Proti této síle působí frikční síla prostředí, která je přímo úměrná dynamické viskozitě roztoku η , hydratovanému poloměru iontu r a rychlosti pohybu v (rovn. 2) [2].

$$F_f = -6\pi \cdot \eta \cdot r \cdot v \quad (2)$$

Frikční síla s rostoucí rychlostí pohybu iontu narůstá, takže v určitém okamžiku se obě síly vyrovnají a platí *rovn. 3*.

$$q \cdot E = 6\pi \cdot \eta \cdot r \cdot v \quad (3)$$

Rychlost migrace iontu v elektrickém poli je možné charakterizovat elektroforetickou mobilitou (pohyblivostí) m , která je definována jako rychlost pohybu iontu v elektrickém poli o intenzitě 1 V m^{-1} . Z *rovn. 3* pak dostáváme *rovn. 4* [2].

$$m = \frac{v}{E} = \frac{q}{6\pi \cdot \eta \cdot r} \quad (4)$$

Z *rovn. 4* je zřejmé, že elektroforetická mobilita v CZE je přímo úměrná velikosti náboje iontu a nepřímo úměrná jeho hydratovanému poloměru a dynamické viskozitě roztoku základního elektrolytu. Separace je tedy založena na rozdílných poměrech náboje a hydratovaného poloměru, což je separační mechanismus zcela odlišný od separačních mechanismů, které se uplatňují v HPLC.

2.1.2 Další separační režimy kapilární elektroforézy

V případě, že prostý rozdíl mobilit není dostačující pro separaci analytů, je snadno možné zavést do separačního systému další separační mechanismy. V nejjednodušším případě se to provádí přidáním vhodného aditiva do roztoku základního elektrolytu. V jiných případech je k separaci nutná například přítomnost gelu v kapiláře. Dále budou již stručnějším formou popsány jednotlivé separační režimy, které v CE známe.

Jedním typem aditiv pro úpravu selektivity separace jsou povrchově aktivní látky, které v roztoku základního elektrolytu vytvářejí micely. Méně polární analyty nebo jejich části mohou v průběhu separace vstupovat do těchto micel, čímž je ovlivněna jejich pozorovaná mobilita. Do výsledné separace se pak promítá kombinace vlastní migrace analytů, migrace micel a polarita analytů, která určuje jejich afinitu k micelám. Tento režim CE se nazývá *micelární elektrokinetická chromatografie* (MEKC) [3].

Aditiva přidávaná do roztoku základního elektrolytu nemusejí mít povrchově aktivní charakter. Aby došlo ke změně selektivity separace, musejí tyto látky více či méně

specificky interagovat s vybraným analytem nebo analyty. Typickým příkladem z této oblasti jsou cykloextriny, jejichž chirální povaha a hydrofobní kavita umožňují chirální separace širokého spektra analytů [4], nebo 18-crown-6 ether, který se vytváří stabilní komplex s draselnými ionty a umožňuje tak jejich separaci od iontů amonných [5]. Separace s využitím aditiv, která s analyty interagují specificky na základě bioafinitní interakce (antigen-protilátka, enzym-inhibitor, hormon-receptor) se nazývají *afinitní kapilární elektroforéza* [6].

Dalším separačním mechanismem, který může být v CE využit, je síťový efekt. V režimu nazývaném *kapilární gelová elektroforéza* [7] je kapilára naplněna vhodným gelem, jehož řetězce zpomalují migraci velkých biomolekul (proteiny, fragmenty DNA), případně syntetických polymerů, na základě jejich velikosti.

V případě, kdy je kapilára naplněna směsí amfolytů schopnou pufrovat v požadovaném rozmezí hodnot pH, na její anodický konec se umístí nádobka s elektrolytem o nízkém pH a na katodický konec nádobka obsahující elektrolyt s vysokým pH, migrace hydroxoniových kationtů ke katodě a hydroxidových aniontů k anodě vytvoří po délce kapiláry gradient pH. Tento separační režim se nazývá *kapilární isoelektrická fokusace* [8] a využívá se k separacím amfoterních látek, které se v kapiláře s gradientem pH pohybují směrem k místu, ve kterém se pH rovná jejich isoelektrickému bodu. V tomto místě ztrácejí náboj a přestávají se pohybovat.

V režimu *izotachoforézy* [9] je vzorek umístěn mezi vedoucí a koncový elektrolyt. Jsou-li stanovovány kationty, obsahuje vedoucí elektrolyt kation s mobilitou vyšší, než jsou mobility všech stanovovaných kationtů, koncový elektrolyt obsahuje naopak kation s mobilitou nižší. Při stanovení aniontů je uspořádání analogické. Kvůli nutnosti zachování kontinuity systému se přítomné analyty uspořádají do zón, v nichž je odlišná intenzita elektrického pole. V zónách analytů s vyšší elektroforetickou mobilitou je intenzita elektrického pole nižší, v zónách analytů s nižší mobilitou je intenzita pole naopak vyšší. Díky tomu se všechny zóny pohybují shodnou rychlostí. Separace je tedy založena na elektroforetické mobilitě podobně jako v CZE.

Za zmínku stojí i *nevodná kapilární elektroforéza* [10]. Ta díky použití nevodného rozpouštědla umožňuje separaci analytů nerozpustných ve vodě a dále tak rozšiřuje aplikační portfolio CE.

2.2 Mobilizace zón

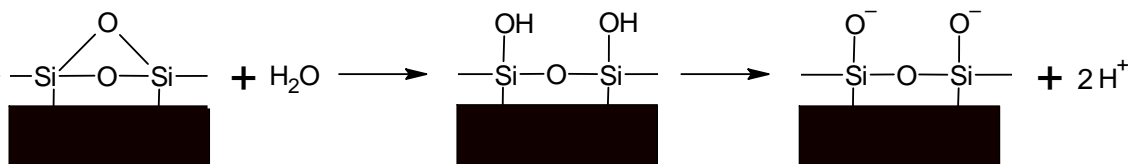
Druhou výhodou CE je existence několika způsobů, kterými lze zóny v kapiláře uvést do pohybu. Jsou jimi elektroforetická migrace iontů, elektroosmotický tok či tlakový rozdíl mezi oběma konci kapiláry, který vyvolá hydrodynamický tok směrem od konce s vyšším ke konci s nižším tlakem.

2.2.1 Elektroforetická migrace

Elektroforetická migrace je jediným ze zmíněných transportních mechanismů, který zároveň funguje i jako mechanismus separační. Její princip byl proto popsán již v odd. 2.1.1. Hodnoty elektroforetické mobility se obvykle pohybují v řádu $10^{-8} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ [11]. Pro představu, jak velké rychlosti pohybu kapilárou to ve skutečnosti odpovídá, vezměme například analyt s mobilitou $4 \cdot 10^{-8} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Při vloženém napětí 30 kV a délce kapiláry 50 cm (tedy při intenzitě elektrického pole 600 V cm^{-1}) zjistíme po dosazení do *rovn. 4*, že rychlost migrace tohoto analytu bude $2,4 \cdot 10^{-3} \text{ m s}^{-1}$, tedy 14 cm min^{-1} .

2.2.2 Elektroosmotický tok

Kapilární elektroforéza se zpravidla realizuje v kapilárách z taveného křemene, který má na svém povrchu siloxanové skupiny. Tyto skupiny v přítomnosti vody hydrolyzují za vzniku silanolových skupin, které vykazují chování slabé kyseliny a při hodnotách pH větších než zhruba 3 disociují a tím propůjčují vnitřní stěně kapiláry záporný elektrický náboj [12]. Celý proces je znázorněn na Obr. 1.



Obr. 1 Hydrolyza siloxanových skupin na silanolové a jejich následná disociace.

Záporný náboj stěny kapiláry přitahuje z roztoku kationty, což má za následek vznik elektrické dvojvrstvy. Část kationtů je adsorbována přímo na stěnu a vytváří nepohyblivou Sternovu vrstvu. Na Sternovu vrstvu navazuje pohyblivá difuzní vrstva. Elektrický potenciál v rovině stříhu na rozhraní Sternovy a difuzní vrstvy se nazývá zeta-potenciál [13]. Difuzní vrstva se při vložení elektrického pole pohybuje

směrem ke katodě a vlivem viskozity s sebou strhává i ostatní roztok v kapiláře, čímž vzniká elektroosmotický tok (EOF), který je jedním z transportních mechanismů v CE. Na rozdíl od elektroforetické migrace je však EOF neselektivní a unáší všechny složky systému stejnou rychlostí. Podobně jako je rychlost elektroforetické migrace charakterizována elektroforetickou mobilitou, je možné charakterizovat rychlost EOF mobilitou elektroosmotickou m_{EOF} , která je rovna podílu rychlosti elektroosmotického toku v_{EOF} a intenzity elektrického pole E (rovn. 5) [2].

$$m_{\text{EOF}} = \frac{v_{\text{EOF}}}{E} \quad (5)$$

Hodnota mobility EOF je přímo úměrná permitivitě roztoku a velikosti zeta-potenciálu a nepřímo úměrná viskozitě roztoku (rovn. 6) [2].

$$m_{\text{EOF}} = \frac{\varepsilon \cdot \zeta}{\eta} \quad (6)$$

Pro praktické aplikace je z rovn. 6 možné vyvodit následující závěry. Mobilita EOF roste s velikostí zeta-potenciálu, která je ovlivněna povrchovou hustotou náboje na vnitřní stěně kapiláry a iontovou silou roztoku. Povrchový náboj stěny kapiláry je v první řadě řízen pH roztoku základního elektrolytu, které určuje míru disociace silanolových skupin. Rostoucí iontová síla „odstíní“ vliv elektrické dvojvrstvy a zeta-potenciál tak snižuje. Z rovn. 6 je dále zřejmé, že mobilita EOF roste s klesající viskozitou roztoku, což je jev, ke kterému v praxi dochází především při zvyšování teploty systému. Mobilita EOF se při vyšších hodnotách pH roztoku základního elektrolytu pohybuje podobně jako elektroforetická mobilita v řádu $10^{-8} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ [13]. Rychlost pohybu roztoku způsobená EOF je tedy podobná jako v případě elektroforetické migrace, okolo 10 cm min^{-1} .

V případě, kdy se změní povrchový náboj vnitřní stěny kapiláry ze záporného na kladný, čehož lze docílit přidáním kationtových detergentů [14] nebo polymerů, případně permanentním pokrytím stěny kationtovým polymerem [15], se směr EOF obrací k anodě.

2.2.3 Tlakový rozdíl

Dalším transportním mechanismem, který lze v CE využít, je hydrodynamický tok způsobený tlakovým rozdílem mezi konci kapiláry. V některých starších přístrojích se tlakový rozdíl vyvolával zvednutím nádoby s roztokem základního elektrolytu na jednom konci kapiláry do větší výšky. V současných komerčních přístrojích se tlakový rozdíl dosahuje zvýšením, resp. snížením tlaku plynu nad kapalinou v nádobce s roztokem základního elektrolytu prostřednictvím vzduchové pumpy nebo externího zdroje plynu. Rychlost hydrodynamického toku vyvolaného daným tlakovým rozdílem Δp je dána Poiseuillovým zákonem (rovn. 7) [16].

$$\frac{dV}{dt} = (p_1 - p_2) \frac{\pi r^4}{8l_c \eta} \quad (7)$$

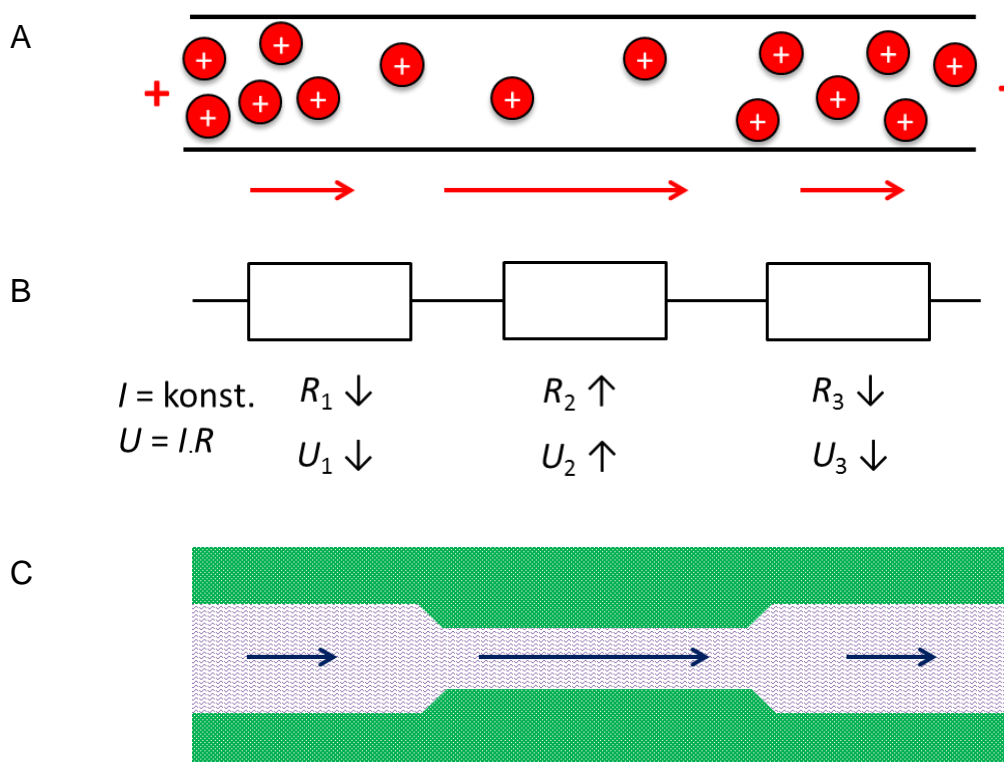
kde $\frac{dV}{dt}$ je objemový průtok roztoku, $p_1 - p_2$ je tlakový rozdíl mezi konci kapiláry, r je vnitřní poloměr kapiláry, l_c délka kapiláry a η dynamická viskozita roztoku. Při aplikaci tlakového rozdílu o velikosti 10 kPa na kapiláru o vnitřním průměru 50 μm a délce 50 cm při dosazení hodnoty dynamické viskozity vody při teplotě 25 $^\circ\text{C}$ (0,891 mPa s [11]), je objemový průtok $3,5 \cdot 10^{-12} \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$, což odpovídá lineární rychlosti 1,8 mm s^{-1} , tedy 10,5 cm min^{-1} .

Z výše uvedeného je zřejmé, že všechny tři způsoby mobilizace vedou k řádově srovnatelné rychlosti pohybu zón v kapiláře. Velmi zajímavé možnosti nabízejí různé kombinace těchto způsobů mobilizace, vzhledem k tomu, že rychlost elektroforetické migrace se pro různé látky liší, zatímco rychlost pohybu způsobeného elektroosmotickým nebo hydrodynamickým tokem je pro všechny látky v kapiláře shodná, je možné vhodnými kombinacemi těchto prvků například docílit postupné mísení různých zón uvnitř kapiláry a podobně. Rovněž je možné kombinovat tyto hnací pohyby v různých směrech a měnit v průběhu experimentů jejich směr, a to prakticky okamžitě. U hydrodynamického toku se směr snadno změní změnou tlakového rozdílu mezi konci kapiláry. Směr elektroforetické migrace i EOF se naopak změní obrácením polarity vloženého elektrického pole. Směr EOF lze navíc ovlivňovat nezávisle na směru elektroforetické migrace analytů přidávkem kationtových detergentů do základního elektrolytu nebo pokrytím stěn kapiláry vhodným polymerem.

2.3 Částečné plnění kapiláry a vzájemné mísení zón

2.3.1 Zakoncentrování analytů zesílením pole

Třetí z výhod CE vyjmenovaných v úvodu této kapitoly, možnost plnění různých částí kapiláry různými roztoky, otevírá cestu celé řadě aplikací. Jedním z příkladů je technika v angličtině označovaná jako *field-amplified sample injection* (FASI) [17], což lze do češtiny přeložit jako dávkování vzorku zesílením pole. Princip metody je znázorněn na Obr. 2.

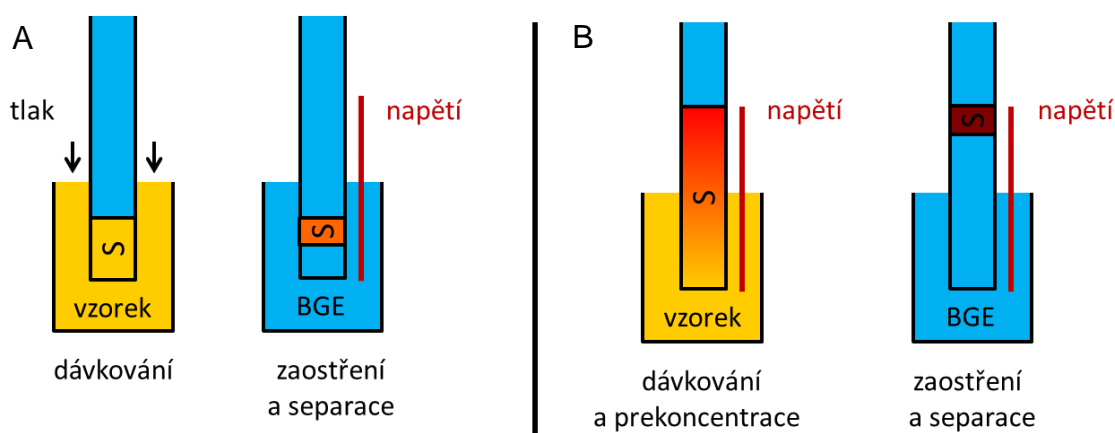


Obr. 2 Princip zakoncentrování analytů na rozhraní zón vzorku a základního elektrolytu při technice *field-amplified sample injection*. (A) Znázornění rozdílné koncentrace a rychlosti migrace iontů v méně vodivé zóně vzorku uprostřed. (B) Reprezentace systému pomocí elektrických rezistorů. (C) Analogická situace zrychlení průtoku vody v užším místě říčního koryta.

V základním provedení je tato technika založena na rozdílu v elektrické vodivosti mezi roztokem základního elektrolytu a analyzovaným vzorkem. Na Obr. 2 je znázorněno, jak přítomnost zón s rozdílnou vodivostí vede k rozdílné intenzitě elektrického pole v jednotlivých částech kapiláry. Pro přehlednost jsou zde zobrazeny pouze kationty. Ve skutečnosti je roztok samozřejmě elektroneutrální a obsahuje tedy odpovídající množství aniontů, které kladný náboj kationtů kompenzují. Vzhledem k tomu, že průřezem kapiláry musí v každém bodě po její délce procházet stejný elektrický proud, vynutí si nižší vodivost zóny uprostřed kapiláry na Obr. 2A lokálně

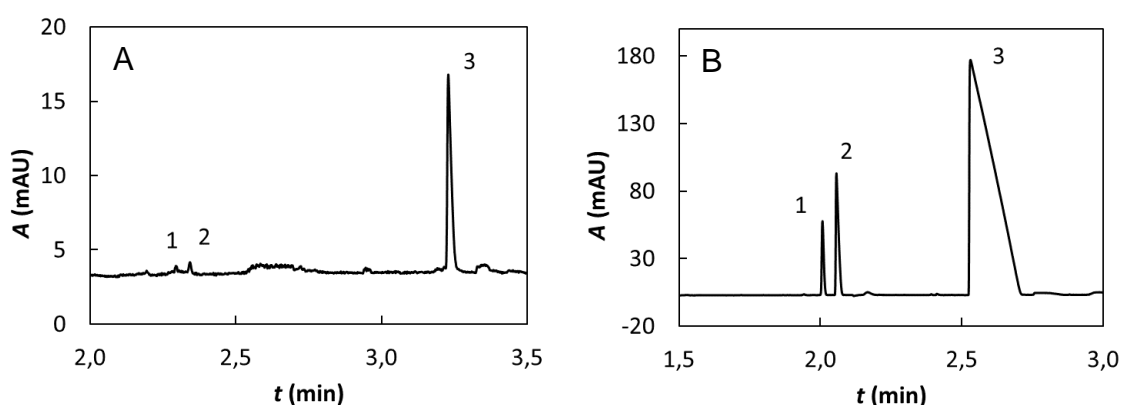
vyšší intenzitu elektrického pole. Celou situaci lze reprezentovat nahrazením zón v kapiláře třemi rezistory zapojenými v sérii, jako je tomu na Obr. 2B. Všemi rezistory prochází stejný elektrický proud. Pokud má prostřední rezistor vyšší elektrický odpor, naměříme na něm také vyšší napětí. Z rovn. 5 pak vyplývá, že při zvýšení intenzity elektrického pole v zóně s nízkou vodivostí dojde ke urychlení pohybu iontů v tomto místě kapiláry. Jakmile ionty domigrují na okraj zóny s vyšší elektrickou vodivostí, dostávají se do oblasti s nižší intenzitou elektrického pole, což vede ke zpomalení jejich migrace. Ionty se potom díky tomuto zpomalení pohybu hromadí na rozhraní obou zón. Jinou analogií může být proudění vody v řece zobrazené na Obr. 2C. Aby byla zachována kontinuita toku, musí v místě, kde je koryto řeky užší, voda proudit větší rychlostí než v místě, kde je koryto řeky širší. Zúžení koryta v prostřední části klade „větší odpor“ průtoku vody a je tedy analogií zvýšeného elektrického odporu prostředního rezistoru na Obr. 2B, resp. zóny s nízkou elektrickou vodivostí na Obr. 2A.

Tohoto principu lze využít k zakoncentrování analytů ze vzorku do úzké zóny na rozhraní mezi vzorkem a roztokem základního elektrolytu. Dávkuje-li vzorek do kapiláry tlakem, následně vyměníme nádobku se vzorkem za nádobku se základním elektrolytem a vložíme separační napětí, dojde na základě tohoto principu v případě vzorku o nízké vodivosti k zakoncentrování analytů do úzké zóny. Zvýší se tím účinnost separace a citlivost měření. Tato technika se nazývá *field-amplified sample stacking* (FASS). Zvýšení citlivosti o několik řádů lze dosáhnout při použití dávkování pomocí vloženého napětí po dobu i několika desítek sekund. V takovém případě analyty neustále migrují ze vzorku do kapiláry a hromadí se na rozhraní vzorku a základního elektrolytu. V takovém případě se jedná o *field-amplified sample injection* (FASI). Rozdíl mezi FAASS a FASI je znázorněn na Obr. 3.



Obr. 3 Znázornění rozdílu mezi dávkovacími technikami (A) FAASS (*field-amplified sample stacking*) a (B) FASI (*field-amplified sample injection*).

Techniku FASI jsme využili k vývoji elektroforetické metody pro současné stanovení dusitanů a dusičnanů v pitné vodě (**Příloha I**). Na jedné straně je stanovení této dvojice iontů usnadněno faktem, že jako jedny z mála běžných anorganických aniontů, které se ve vodách vyskytují, absorbují UV záření. Lze je tedy detekovat přímou UV detekcí. Zároveň je zde malé riziko interference ze strany dalších hojně zastoupených anorganických aniontů, které záření v UV oblasti zpravidla neabsorbují. Problémem u tohoto stanovení však je, že oba ionty se ve vzorcích vyskytují na výrazně odlišných koncentračních hladinách. Zatímco nejvyšší mezní hodnota obsahu dusičnanů v pitné vodě je dle vyhlášky č. 252/2004 Sb. 50 mg l^{-1} , v případě dusitanů je to pouhých $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ [18]. Většina publikovaných elektroforetických metod umožňujících stanovení dusitanů a dusičnanů [19-22] neposkytovala dostatečnou citlivost pro stanovení dusitanů. Problémem může být také to, že velký pík dusičnanů překryje velmi malý pík dusitanů a znemožní tak jejich stanovení. Na Obr. 4 je vidět ukázka zvýšení citlivosti stanovení použitím techniky FASI. Obr. 4A zobrazuje elektroferogram vzorku obsahujícího dusitany a dusičnany v koncentraci $0,1 \text{ mg l}^{-1}$ a jodičnan o koncentraci 15 mg l^{-1} (použitý jako vnitřní standard) při hydrodynamickém dávkování vzorku tlakem 3 kPa po dobu 3 s. Obr. 4B zobrazuje elektroferogram stejného vzorku dávkovaný elektrokineticky napětím -5 kV po dobu 15 s. Na první pohled by se mohlo zdát, že rozdíl ve velikosti odezvy je způsobem především delší dobou trvání elektrokinetického dávkování. Je však nutno si uvědomit, že zvětšení signálů je výrazně větší než pětinasobné. Při prodlužování hydrodynamického dávkování se navíc potýkáme s problémy plynoucími z velké délky nadávkované zóny málo vodivého vzorku, která se projevuje deformací píků a nižší stabilitou proudu v průběhu separace.

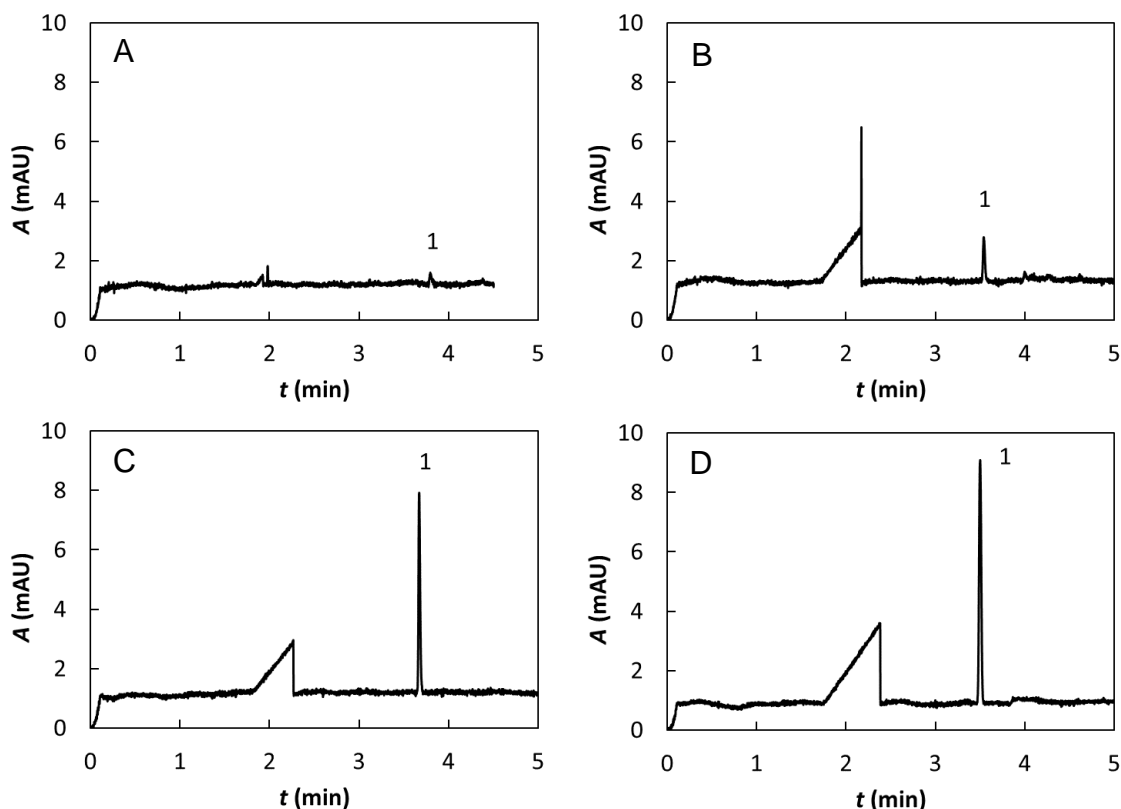


Obr. 4 Elektroferogramy separace vzorku obsahujícího (1) dusitany, (2) dusičnany ($0,1 \text{ mg l}^{-1}$) a (3) jodičnany jako vnitřní standard (15 mg l^{-1}) při použití (A) hydrodynamického dávkování tlakem 3 kPa po dobu 3 s a (B) elektrokinetického dávkování napětím -5 kV po dobu 15 s.

Jednou z nevýhod metody FASI je závislost účinnosti dávkování analytů na rozdílu ve vodivosti vzorku a základního elektrolytu. Vzhledem k tomu, že vodivost jednotlivých vzorků pitné vody se může poměrně hodně lišit, nelze použít jednoduše metodu vnějšího standardu a provádět kvantifikaci na základě kalibrační závislosti plochy píku dusitanů a dusičnanů na jejich koncentraci. Tento problém byl v naší práci vyřešen přidáním vnitřního standardu jodičnanu, jehož pík je od píků obou analytů dostatečně separován a zároveň není jeho přítomnost ve vzorcích pitné vody pravděpodobná.

Následně byla tato metoda využita nejen při analýze pitné vody, ale i při analýze toxikologické. Metodou byly analyzovány vzorky moči a krevního séra osoby, u níž bylo podezření na otravu dusitany. Koncentrace dusitanů a dusičnanů nalezené ve vzorcích byly srovnány s výsledky měření vzorků od tří zdravých dobrovolníků. Zatímco v moči ani krevním séru dobrovolníků nebyly dusitany detekovány, v moči otrávené osoby byla nalezena velmi vysoká koncentrace $1,86 \text{ mmol l}^{-1}$. Relativně nízká koncentrace $0,017 \text{ mmol l}^{-1}$ byla stanovena i v krevním séru. V případě dusičnanů byly nalezené koncentrace ve všech vzorcích moči na srovnatelné úrovni, okolo 1 mmol l^{-1} . Ve vzorcích krevního séra byla koncentrace v případě otrávené osoby velmi vysoká, $2,08 \text{ mmol l}^{-1}$, zatímco u zdravých dobrovolníků se pohybovala okolo $0,070 \text{ mmol l}^{-1}$. Výsledky s využitím námi vyvinuté metody tedy potvrdily otravu dusitanem.

Není-li účinnost FASI dostatečně vysoká při ředění vzorku vodou, je možné snížit vodivost vzorku jeho naředěním organickým rozpouštědlem, např. acetonitrilem. Tento postup jsme využili při stanovení denathoniového kationtu v nemrznoucích směsích na bázi ethylen- a propylenglykolu. Denathonium benzoát, známý také jako bitrex, se do těchto směsí povinně přidává kvůli své extrémně hořké chuti jako prevence před náhodným požitím. V rámci projektu podpořeného Technologickou agenturou České republiky jsme vyvíjeli sadu rychlých a jednoduchých elektroforetických metod pro analýzu chladicích kapalin před a po jejich recyklaci na elektrodialyzační lince. Řádové zvýšení odezvy detektoru na denathoniový ion nahrazením hydrodynamického dávkování dávkováním elektrokinetickým a dále nahrazením vody acetonitrilem při úpravě vzorku je patrné na Obr. 5.



Obr. 5 Využití FASI pro zvýšení citlivosti stanovení denathonium benzoátu v nemrznoucích směsích. A) Vzorek ředěný vodou 1:9, dávkování 5 kPa × 3 s, B) vzorek ředěný vodou 1:9, dávkování 5 kV × 30 s, C) vzorek ředěný acetonitrilem 1:9, dávkování 5 kV × 30 s, D) vzorek ředěný acetonitrilem 1:9, dávkování 5 kV × 60 s. Číslo 1 označuje pík denathioniového kationtu, který byl ve všech případech přítomen v koncentraci 10 mg l⁻¹.

2.3.2 Reakce a interakce v kapiláře

Při metodě FASI je v kapiláře přítomna jedna zóna vzorku, která má odlišnou vodivost než roztok základního elektrolytu. Vhodnou kombinací transportních mechanismů uvedených v kap. 2.1 a 2.2 je však možné pracovat v kapiláře během jednoho experimentu s několika různými zónami, které lze vzájemně mísit a opět separovat. Tímto způsobem je možné provádět přímo v kapiláře chemické derivatizační reakce [23], enzymově katalyzované reakce [24] nebo lze takto uvést do kontaktu zóny látek pro jejich vzájemnou afinitní interakci [25]. Kontakt interagujících či reagujících látek je možno docílit v principu dvěma způsoby. Jednou možností je promísení jejich zón díky jejich elektroforetické migraci, druhou možností je promísení zón vyvolané difúzí.

2.3.2.1 Elektroforetické mísení

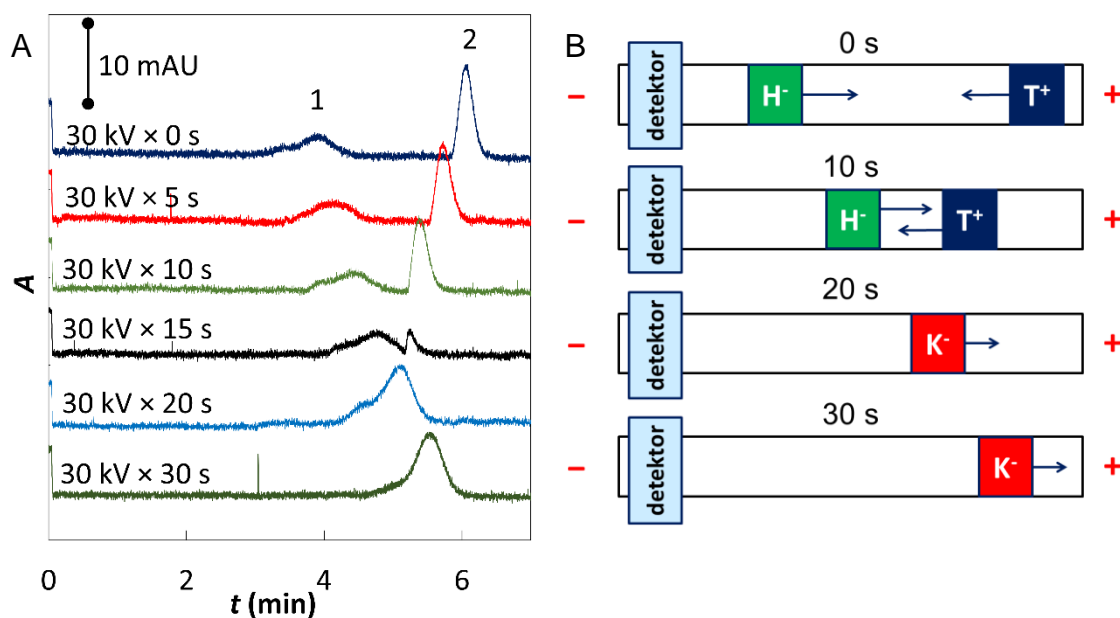
Principu elektroforetického mísení jsme využili při studiu vzájemné interakce heparinu a tetraargininu a hodnocení jejího potenciálu pro analytickou chemii (**Příloha II**).

Heparin je jedním z nejstarších léků, které jsou stále využívány v klinické praxi. Patří do skupiny glykosaminyglykanů, také nazývaných mukopolysacharidy [26]. Jedná se o směs lineárních i rozvětvených polysacharidů a jeho primární funkcí je snižování srážlivosti krve [27]. Heparin je v nízkých koncentracích přirozeně přítomen v lidském organismu, pro terapeutické účely se extrahuje z hovězích nebo vepřových sliznic střev a plic [26]. Podává se v situacích, kdy je srážení krve nežádoucí a je vyžadován rychlý, krátkodobý účinek, například při akutní hluboké žilní trombóze, akutním infarktu myokardu, plicní embolii nebo během dialýzy a ostatních zákroků s mimotělním krevním oběhem. Heparin interaguje s řadou proteinů, přičemž také jeho antikoagulační účinek je spojen s interakcí s glykoproteinem antitrombinem III. Tato interakce patří k nejvíce prostudovaným interakcím heparinu s proteiny [27]. V omezené míře byla studována i interakce heparinu a protaminu, který se používá jako antidotum heparinu [28]. Ve vzájemné afinitě obou látek hraje významnou roli elektrostatická interakce. Heparin se skládá z polysacharidových řetězců s vysokým obsahem sulfátových a karboxylových skupin, jedná se tedy o vysoce záporně nabitou látku. Protamin je naproti tomu směsí několika peptidů s vysokým obsahem bazických argininových zbytků, takže v neutrálním nebo kyselém prostředí vykazuje vysoký kladný náboj. Problematickou vlastností obou látek je fakt, že nemají jasně definovanou strukturu. Protamin je navíc směsí několika peptidů, jejichž přesné složení závisí mimo jiné na zdroji. V rámci naší studie jsme protamin nahradili tetraargininem, což je peptid, který má jasně definovanou strukturu, zároveň si však zachovává afinitu k heparinu podobnou, jakou má protamin. V rámci studie jsme zjistili, že dalším zjednodušením situace, nahrazením tetraargininu monomerním argininem, dojde ke ztrátě afinity k heparinu, je tedy nutné použít alespoň krátký peptidový řetězec, nejen jednoduchou aminokyselinu.

Pro sledování chování těchto dvou látek při vzájemné interakci v CE jsme využili kombinaci různých elektroforetických přístupů. Všechny experimenty jsme prováděli v základním elektrolytu obsahujícím 10mM kyselinu fosforečnou o pH 2,3. Kyselé prostředí zajišťovalo vysoký kladný náboj tetraargininu a potlačovalo jeho adsorpci na stěnu kapiláry díky protonaci silanolových skupin. K prvním experimentům byla využita technika *nonequilibrium capillary electrophoresis of equilibrium mixtures* [25], což lze přeložit jako nerovnovážná kapilární elektroforéza rovnovážných směsí. Tento režim

studia afinitních interakcí spočívá ve smísení obou interagujících látek mimo přístroj. Směs je následně dávkována do kapiláry a podrobena elektroforetické separaci. Do kapiláry byly dávkovány směsi heparinu a tetraargininu v různých koncentračních poměrech a byly podrobena elektroforetické separaci. S rostoucím obsahem heparinu se postupně zmenšoval pozorovaný pík tetraargininu, přitom však nebyla pozorována změna jeho migračního času. Z toho bylo možno vyvodit závěr, že obě látky vytvářejí velmi stabilní komplex, který se nerozpadá po vložení elektrického pole, jinak by obě látky okamžitě migrovaly opačnými směry a velikost píku tetraargininu by nebyla ovlivněna koncentrací heparinu. Jelikož takovýto experiment nabízí pouze integrální obraz děje v kapiláře, byla pro další studium interakce využita kombinace elektroforetické migrace a následné mobilizace zón v kapiláře tlakem.

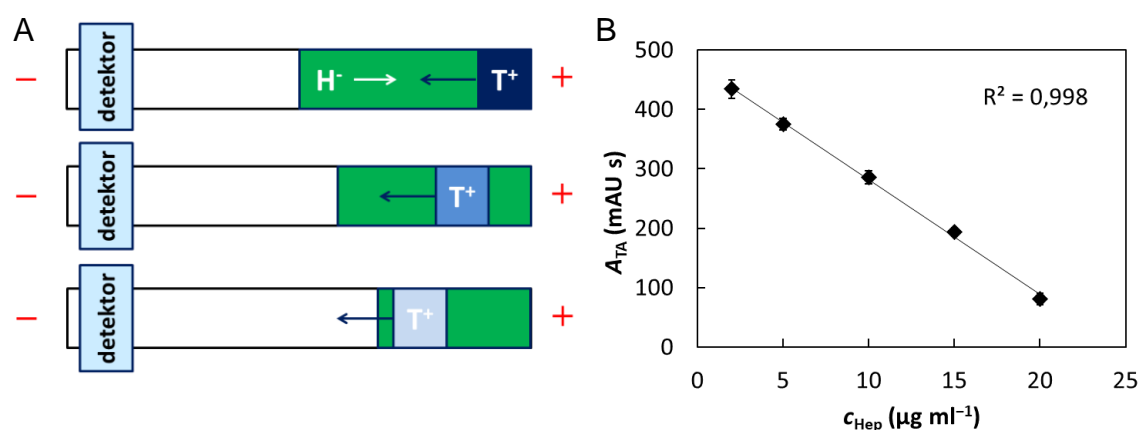
Nejprve byla dávkována zóna obsahující heparin, ta byla tlakem zasunuta hluboko do kapiláry, načež byla dávkována zóna obsahující tetraarginin. Poté bylo mezi konce kapiláry vloženo napětí a zóny heparinu a tetraargininu se elektroforetickou migrací začaly pohybovat směrem k sobě. Napětí bylo po uplynutí určitého časového intervalu vypnuto a zóny uvnitř kapiláry byly mobilizovány pomocí tlaku, takže postupně prošly detektorem. Provedením série experimentů s různou dobou vložení napětí bylo možné zobrazit postupnou migraci obou látek uvnitř kapiláry. Výsledné elektroferogramy jsou na Obr. 6A a schematické znázornění průběhu experimentu na Obr. 6B.



Obr. 6 Sledování interakce heparinu (H^-) s tetraargininem (T^+) za vzniku záporně nabitého komplexu (K^-) v elektroforetické kapiláře pomocí kombinace elektroforetické migrace a mobilizace zón v kapiláře tlakem. A) Elektroferogramy získané při různě dlouhé době vložení napětí (0–30 s). B) Schematické znázornění dějů v kapiláře.

Z elektroferogramů je patrné, jak se zóny obou látek postupně přibližují. Zhruba po 15-20 s od vložení napětí probíhá jejich vzájemná interakce. Po 30 s je patrný výrazný pík, který migruje směrem k anodě tak jako heparin. Ve srovnání s původním píkem heparinu má však vysokou absorbanci, což naznačuje přítomnost tetraargininu. Z toho je patrné, že se jedná o zónu komplexu heparinu a tetraargininu, který vzniká okamžitě po kontaktu obou látek, dokonce i v případě, že jejich zóny pouze migrují jedna skrz druhou. Tento komplex má podle směru jeho migrace záporný celkový náboj.

Následně jsme hodnotili analytický potenciál této interakce pro stanovení heparinu. Za tímto účelem jsme provedli sérii experimentů s o dva řády nižší koncentrací heparinu, která již není detekovatelná UV detektorem. Výsledkem těchto experimentů bylo zjištění, že pokud je nadávkována delší zóna heparinu o nízké koncentraci, za ní je dávkována krátká zóna tetraargininu o vyšší koncentraci a je vloženo napětí, tetraarginin migruje zónou heparinu a vlivem postupného vzniku komplexu tetraarginin z migrující zóny ubývá, jak je naznačeno na Obr. 7.



Obr. 7 Úbytek tetraargininu (T^+) v zóně migrující zónou heparinu (H^-). A) Schematické znázornění průběhu experimentu. B) Závislost plochy píku tetraargininu na koncentraci heparinu.

V tomto uspořádání vykazuje velikost píku klesající lineární závislost na koncentraci heparinu. Díky tomu je tedy možné měřit koncentrace heparinu, které se nacházejí dva řády pod mezí přímé UV detekce. Využívá se přitom vzniku komplexu při elektroforetickém mísení zón a jeho vlivu na velikost píku tetraargininu, který je detekován. Metoda pracuje v koncentracích řádu $\mu\text{g ml}^{-1}$, což odpovídá koncentracím heparinu přítomným po podání v krevní plasmě. Ověřili jsme také, že stejného principu lze využít pro stanovení nízkomolekulárního heparinu, který se dnes v medicíně čím dál častěji využívá. S využitím flexibility CE jsme díky kombinaci elektroforetického mísení

zón a mobilizace zón v kapiláře pomocí tlaku poprvé popsali vznik a chování komplexu heparinu a tetraargininu v elektroforetických podmínkách. Poukázali jsme na velký potenciál této interakce pro kvantitativní analýzu, kdy je možné prostřednictvím tetraargininu měřit koncentrace heparinu, které nejsou detekovatelné přímo. Právě stanovení heparinu je jedním z ožehavých problémů analytické a bioanalytické chemie. Přestože je heparin jedním z nestarších stále používaných léků, jeho stanovení je problematické kvůli absenci elektroaktivních funkčních skupin, která komplikuje jeho stanovení s využitím elektroanalytických metod, absenci chromoforů, která komplikuje jeho stanovení pomocí UV/VIS spektrometrie, a polydisperzité, která komplikuje jeho stanovení pomocí separačních analytických metod.

2.3.2.2 Difuzní mísení

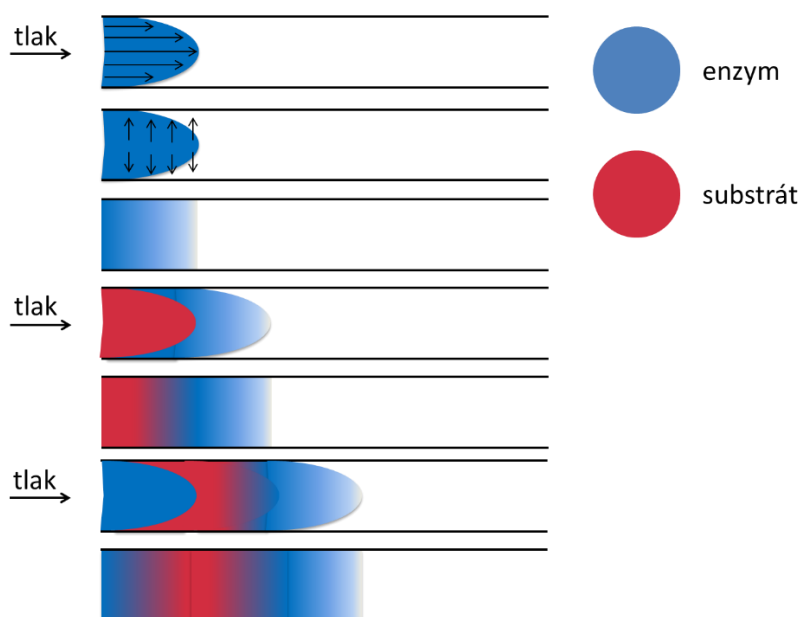
Difúzi řízené mísení zón probíhá v elektroforetické kapiláře bez vložení napětí a je tedy nezávislé na elektroforetických mobilitách jednotlivých složek. Napětí je v těchto případech obvykle vkládáno až po promísení zón a případném proběhnutí chemické reakce, pro dosažení následné elektroforetické separace jednotlivých složek systému. Tento způsob mísení je založen na faktu, že dvě sousední zóny uvnitř kapiláry se postupně vzájemně překrývají vlivem jejich difúze. Difuzní mísení lze s výhodou využít v případech, kdy chceme v kapiláře smísit reaktanty, nechat zde proběhnout chemickou reakci a následně separovat zbylé výchozí látky a produkty. Příkladem takových reakcí jsou enzymové reakce. Možnost sledování enzymové aktivity s využitím elektroforetické kapiláry jako reaktoru a zároveň separačního prostoru je výhodná z několika důvodů. K reakci uvnitř kapiláry je zapotřebí extrémně nízké množství roztoků reaktantů a dalších činidel, dávkují řádově desítky nanolitřů. Moderní elektroforetické přístroje jsou vysoce automatizované, je tedy možné provádět dlouhé série automatických měření s různými kombinacemi reaktantů. Tento přístup může být extrémně užitečný například při hledání inhibitorů enzymů. Stanovení enzymové aktivity v nejrůznějších vzorcích poskytuje cenné informace pro vědu, výzkum i praxi v oborech jako je medicína, biochemie, biologie apod. V živých organismech musí být aktivity jednotlivých enzymů přesně regulovány, jakákoli nerovnováha systému může způsobit poruchy funkce organismu nebo onemocnění. Nalezení případných abnormalit v aktivitě enzymů je proto možné využít při diagnóze jak vrozených, tak získaných onemocnění včetně těch metabolických, infekčních nebo rakoviny [29-31].

Způsob provedení enzymové reakce, kdy se nadávkují bezprostředně za sebou zóny substrátu a enzymu a nechají se po stanovenou dobu difundovat a vzájemně reagovat, se někdy nazývá *at-inlet reaction*. Průběh vzájemné difúze zón v kapiláře však není tak přímočarý, jak se může na první pohled zdát. Vzhledem k velmi malému vnitřnímu průměru kapiláry nepředstavují zóny roztoků nadávkované za sebou do kapiláry jednoduše dva sloupce kapaliny s rovným kruhovým rozhraním. Tok poháněný tlakem, který zpravidla zajišťuje dávkování zón do kapiláry, má napříč kapilárou parabolický rychlostní profil. U stěn je pohyb kapaliny pomalejší, uprostřed naopak nejrychlejší. Kvůli tomu se parabolicky tvarovaná zóna, která je tlakem dávkována do kapiláry, „zasouvá“ do roztoku, který již je v kapiláře přítomen.

Svůj parabolický profil si však zóny uvnitř kapiláry zachovávají pouze po dobu působení vnějšího tlaku. Prakticky okamžitě po jeho ukončení změni svůj tvar díky difúzi. Pro lepší pochopení těchto jevů je nutno si uvědomit, že vnitřní průměr kapiláry (desítky mikrometrů) je zhruba o čtyři řády menší než její délka (desítky centimetrů). Pro samotné mísení zón je ještě významnější fakt, že vnitřní průměr kapiláry je zhruba o dva řády menší než délka dávkovaných zón (jednotky milimetrů). Zatímco difúze v podélném směru je v poměru k velikosti kapiláry a délce zón v časovém horizontu sekund a desítek sekund zanedbatelná, difúze v příčném směru je prakticky okamžitá. Jak je patrné z Obr. 8, „zasouvání“ parabolických zón do sebe vede k jejich překryvu v příčném směru. Po ukončení působení dávkovacího tlaku proto dochází k velmi rychlému mísení zón příčnou difúzí. Jak ukázali Krylov a kol. [32-34], lze vhodnou kombinací pořadí a počtu dávkovaných zón dosáhnout i reakční zóny s vysoce homogenním zastoupením jednotlivých reaktantů, které lze navíc poměrně přesně vypočítat. Tím je možné překonat jednu z hlavních nevýhod mísení zón difúzí, tedy nehomogenitu reakční zóny a neznámé koncentrace reaktantů v ní.

Principu difuzního mísení zón v kapiláře jsme využili při vývoji dvou nových metod pro sledování enzymové aktivity. První z nich (**Příloha III**) byla metoda pro sledování aktivity enzymu β -*N*-acetylhexosaminidasa (EC 3.2.1.52). Tento enzym katalyzuje hydrolýzu terminálních β -vázaných *N*-acetyl-D-glukosaminových a *N*-acetyl-D-galaktosaminových zbytků oligosacharidů a glykokonjugátů [35]. β -*N*-acetylhexosaminidasa je přítomna v houbách a bakteriích, kde je součástí chitinolytických systémů, které přispívají k regeneraci buněčných stěn a mají i obranné funkce [36-38]. Tento enzym se však vyskytuje i u vyšších obratlovců. U člověka se β -*N*-acetylhexosaminidasa podílí na degradačních procesech v lysozomech. Mutace genů

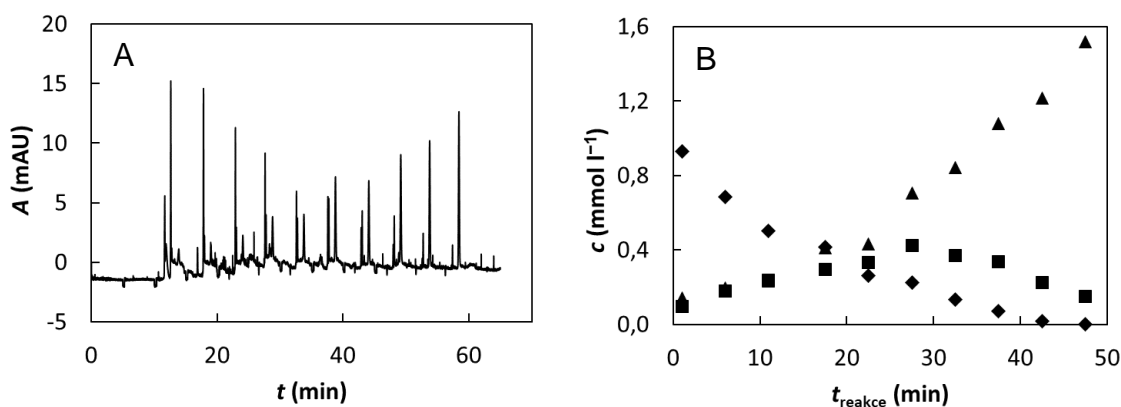
pro β -*N*-acetylhexosaminidasu u člověka způsobují dvě vrozené metabolické vady, které se projevují jako Tay-Sachsova nebo Sandhoffova nemoc [35]. Vlivem snížení nebo absence aktivity β -*N*-acetylhexosaminidasy dochází k hromadění gangliosidů v mozku, což vede u pacientů k závažným postižením. Sledování aktivity β -*N*-acetylhexosaminidasy je tedy významné jak z hlediska biochemického výzkumu, kde může napomoci lepšímu pochopení mechanismů regenerace buněčných stěn a konkurenčního boje hub a bakterií, tak z hlediska výzkumu medicínského, kde může napomoci lepšímu pochopení a diagnostice Tay-Sachsovy a Sandhoffovy nemoci.



Obr. 8 Princip mísení zón v kapiláře prostřednictvím příčné difúze.

Pro účely biochemického výzkumu jsme vyvinuli elektroforetickou metodu pro separaci *N*-acetyl-D-glukosaminu, jeho dimeru chitobiosy a trimeru chitotriosy. Následně jsme sledovali průběh enzymového štěpení chitobiosy na *N*-acetyl-D-glukosamin a štěpení chitotriosy na chitobiosu a *N*-acetyl-D-glukosamin. V případě sledování hydrolyzy chitotriosy jsme využili zajímavý přístup. Jednalo se o offline provedení enzymové reakce v elektroforetické nádobce na vzorky v objemu 40 μ l. Reaktanty byly smíseny ručně mimo elektroforetický přístroj. Reakce v nádobce postupně probíhala a průběžně z ní byly automaticky dávkovány vzorky do separační kapiláry. Celá elektroforetická separace trvala 15 minut. Aby bylo získáno více experimentálních bodů z průběhu reakce, byla separace vždy po pěti minutách přerušena vypnutím napětí. Do

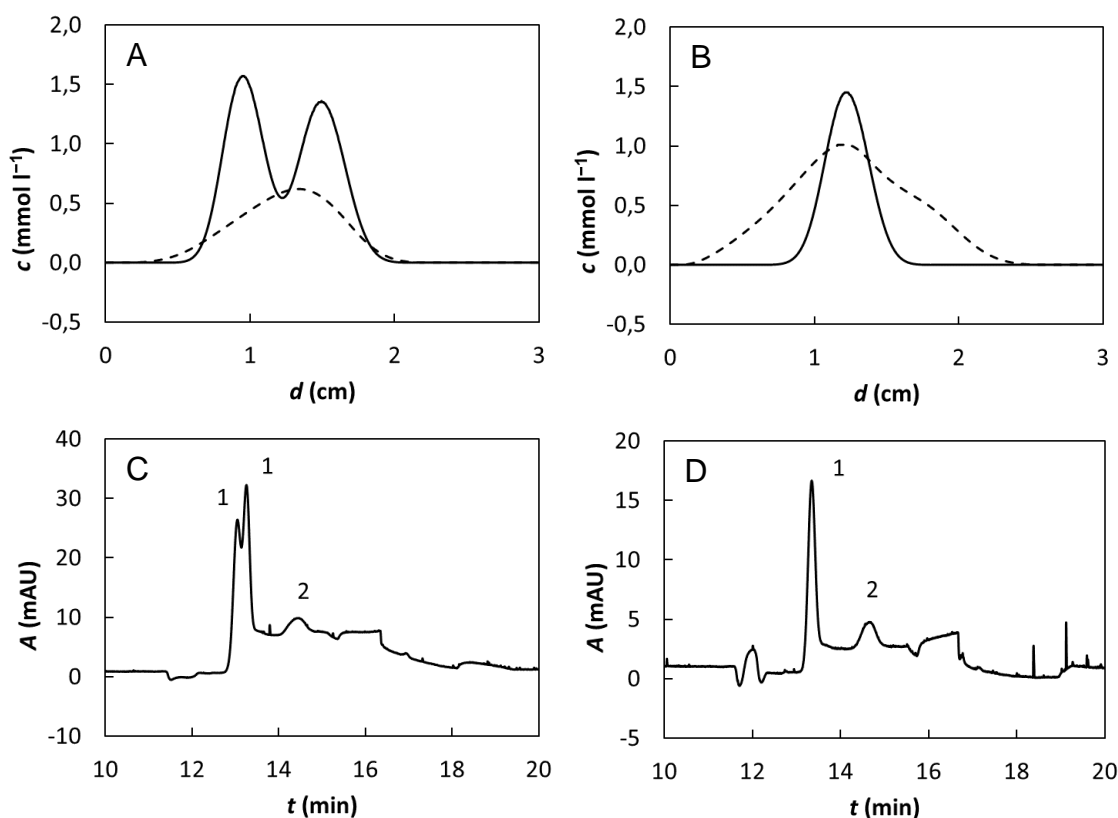
vstupního konce kapiláry byl nadávkován další vzorek reakční směsi a po vložení napětí započala separace nového vzorku, zatímco ještě pokračovala separace předchozích dvou vzorků. Tímto způsobem bylo možné nadávkovat a zanalyzovat během šedesáti minut deset vzorků, zatímco klasické provedení by umožnilo pouze čtyři analýzy. Výsledek tohoto způsobu provedení je na Obr. 9. Průběh reakce je na Obr. 9B podrobně vykreslen. Je zde patrný vznik meziproduktu chitobiosy, jejíž koncentrace v první polovině sledovaného času narůstala, následně s ubývající chitotriosou, začala opět klesat.



Obr. 9 Sledování průběhu enzymového štěpení chitotriosy β -*N*-acetylhexosaminidasou po smísení reaktantů offline ve vzorkové nádobce a dávkování dalších vzorků v průběhu předcházející separace. A) Elektroferogram celého experimentu. B) Vývoj koncentrace substrátu chitotriosy (\blacklozenge), meziproduktu chitobiosy (\blacksquare) a konečného produktu *N*-acetyl-D-glukosaminu (\blacktriangle).

Dále jsme již vyvinuli metodu pro online mísení reaktantů a provedení enzymové reakce přímo v kapiláře. Pro dosažení optimálních výsledků se často využívá sendvičové uspořádání zón v kapiláře, kdy je zóna jednoho reaktantu vložena mezi dvě zóny reaktantu druhého. Mísení bývá následně podpořeno ještě následným dávkováním delší zóny roztoku základního elektrolytu nebo vhodného reakčního pufru. K optimalizaci dávkování jsme využili program, který umožňuje simulovat vývoj koncentračních profilů při mísení zón vyvinutý skupinou prof. Krylova [39]. Prvním bodem bylo určení vhodnějšího pořadí zón, tedy zda mají být dávkovány v pořadí substrát-enzym-substrát nebo v pořadí enzym-substrát-enzym. Všechny tři zóny byly dávkovány tlakem 5 kPa po dobu 3 s a následně byl dávkován citrátový pufr tlakem 5 kPa po dobu 9 s. Výsledek simulace těchto dvou přístupů a následné experimentální ověření je na Obr. 10. Je zřejmé, že výhodnější je dávkování jedné zóny substrátu vložené mezi dvě zóny enzymu. Při opačném postupu se v kapiláře vyskytují dvě z velké části separované zóny substrátu (Obr. 10A), což vede jednak k proměnlivému složení reakční zóny, jednak

k problematickému vyhodnocení výsledného elektroferogramu, a to nejen z důvodu rozdvojení píku substrátu, ale také z důvodu rozšíření a snížení symetrie píku produktu, jak je patrné z Obr. 10C. Jednovrcholový koncentrační profil enzymu získaný při dávkování dvou zón enzymu a jedné zóny substrátu (Obr. 10B) je způsoben větší hodnotou difuzního koeficientu substrátu ve srovnání s enzymem. Jedná se o zdánlivě paradoxní jev, kdy zóny rychleji difundující látky jsou promíseny méně než zóny pomaleji difundující látky. Analogicky paradoxní se jeví větší šířka zón enzymu ve srovnání se zónami substrátu, kde bychom opět očekávali větší rozšíření zón rychleji difundujícího substrátu. Zde je však nutné si uvědomit, že podélná difúze zón je v podmínkách tohoto experimentu v rámci sekund zanedbatelná, zatímco klíčovou roli hraje difúze příčná, ke které dochází již v průběhu dávkování zóny ještě před ukončením



Obr. 10 Optimalizace pořadí dávkovaných zón při vývoji online metody stanovení aktivity β -N-acetylhexosaminidasy. Vypočtené koncentrační profily substrátu chitobiosy (plná čára) a enzymu (přerušovaná čára) pro pořadí substrát-enzym-substrát (A) a pořadí enzym-substrát-enzym (B). Elektroferogramy příslušných experimentů pro pořadí substrát-enzym-substrát (C) a pořadí enzym-substrát-enzym (D). Identifikace piků: (1) substrát chitobiosa, (2) produkt *N*-acetyl-D-glukosamin.

působení tlaku. Zóny pomaleji difundujícího enzymu si tedy v průběhu jejich „zasouvání“ do dalších zón lépe udrží parabolický profil, který má za následek vznik širší zóny a tím pádem efektivnější promísení. Rychlejší difúze substrátu narušuje parabolický tvar jeho zóny již v průběhu dávkování. Vzniká tak zóna užší, méně efektivně promísená. Dobrý souhlas simulace s experimentem je patrný také při porovnání obou píků substrátu na Obr. 10A a 10C. Zóna, která byla do kapiláry nadávkována jako první (zóna vpravo na Obr. 10A a zóna vlevo na Obr. 10C) podstoupila větší míru difúze, proto je nižší a širší než zóna, která byla dávkována jako třetí.

Po optimalizaci dalších parametrů, jakými byla například reakční doba mezi smísením reaktantů a zahájením elektroforetické separace, byla ověřena funkčnost metody pro sledování aktivity enzymu a hodnocení efektu jeho inhibitorů. Do nádoby se substrátem bylo přidáno určité množství dimethylformamidu, jehož inhibiční efekt na β -N-acetylhexosaminidasu je znám [40]. Metoda potvrdila snížení aktivity enzymu na 6 % původní hodnoty při přidavku 0,2 % dimethylformamidu.

Druhou metodou, kterou jsme vyvinuli s použitím difuzního mísení enzymu a substrátu (**Příloha IV**), byla metoda pro hledání inhibitorů α -amylasy (EC 3.2.1.1). Tento enzym, který je vylučován slinivkou břišní, hraje významnou roli v procesu trávení, jelikož hydrolyzuje škrob na kratší řetězce, resp. katalyzuje hydrolyzu $\alpha(1\rightarrow4)$ glykosidových vazeb [41]. Aktivita α -amylasy přímo ovlivňuje rychlost absorpce glukosy jako konečného produktu hydrolyzy škrobu do krve. Proces štěpení složitějších sacharidů a proces přechodu glukosy do krve jsou úzce spjaty se zdravotními potížemi diabetiků.

Diabetes mellitus je závažné chronické onemocnění, ke kterému dochází, když slinivka břišní neprodukuje dostatek insulínu nebo když tělo není schopno produkovat insulín efektivně využívat. Podle odhadu z roku 2014 žilo na světě s diabetem přibližně 422 milionů dospělých. Výskyt diabetu v posledních desetiletích setrvale narůstá. Jeho prevalence v celosvětové populaci se od roku 1980 téměř zdvojnásobila z 4,7 na 8,5 %, k čemuž přispívá i nárůst rizikových faktorů, jako jsou nadváha a obezita [42]. Diabetes mellitus je tak jednou z nejzávažnějších civilizačních chorob, se kterými se lidstvo v současnosti potýká.

Nedostatečné vylučování insulínu nebo snížená citlivost jeho receptorů vede u pacientů s diabetem 2. typu k postprandiální hyperglykémii. U takových pacientů může inhibice aktivity α -amylasy snížit rychlost uvolňování glukosy do krve, tím pádem potlačit postprandiální hyperglykémii a působit preventivně proti vzniku kardiovaskulárních onemocnění [43]. Komerčně dostupné léky založené na inhibici

α -amylasy mají často nepříjemné vedlejší účinky. Výzkumná pozornost v této oblasti se proto upřela také k hledání inhibitorů α -amylasy mezi přírodními látkami, jako jsou flavonoidy [44].

Klasickou metodou sledování aktivity, a tím pádem i inhibice, α -amylasy je UV/VIS spektrometrie s chromogenními substráty [45, 46]. Nevýhodou využití chromogenních substrátů je fakt, že se nejedná o zcela přirozené substráty daného enzymu a jeho aktivita vůči nim se tedy může do jisté míry lišit ve srovnání s aktivitou vůči substrátu přirozenému. Pro účely rychlého automatizovaného screeningu potenciálních inhibitorů jsme vyvinuli online metodu stanovení aktivity α -amylasy. Aktivitu enzymu lze v principu měřit dvěma způsoby, jedním je sledování obsahu substrátu, druhým sledování obsahu produktu v reakční směsi. V případě β -*N*-acetylhexosaminidasy jsme využívali druhou možnost, která je obecně citlivější, neboť měření malé koncentrace vniklého produktu je přesnější než měření malého úbytku koncentrace substrátu. V případě α -amylasy jsme zvolili sledování koncentrace substrátu, tedy škrobu. Hlavní důvody byly dva. Zaprvé, hydrolýzou škrobu vzniká složitá směs různých látek, z nichž by bylo nutno vybrat jednu, kterou by bylo třeba separovat od ostatních. Zadruhé, glukosa a kratší oligosacharidové řetězce vznikající hydrolýzou škrobu jsou obtížně detekovatelné, zatímco pro detekci škrobu bylo možno využít tvorbu jeho modrého komplexu s jódem. Přídavek jódu a jodidu do základního elektrolytu vede k tvorbě komplexu se škrobem s absorpčním maximem při vlnové délce 560 nm [47]. Jako základní elektrolyt byl tedy použit fosfátový pufr o pH 7,0 s přídavkem jódu a jodidu draselného. Výhodou detekce ve viditelné oblasti spektra je mimo jiné vysoká selektivita a nízké riziko interference látek přítomných v matici vzorku. To je velkou výhodou zvláště při testování inhibičního efektu komplexních vzorků, jakými jsou rostlinné extrakty. Nejprve jsme v rámci offline experimentu, kdy byla enzymová reakce prováděna ve vzorkové nádobce mimo kapiláru, ověřili schopnost elektroforetické metody separovat a detekovat škrob a jeho úbytek hydrolýzou. Reakce byla prováděna ve fosfátovém pufru o pH 7,0 s přídavkem chloridu sodného, neboť chloridové ionty jsou nezbytné pro správnou funkci enzymu [48]. Za těchto podmínek jsme rovněž zjistili, že přítomnost směsi jódu a jodidu draselného v reakční směsi inhibuje enzym, proto bylo nutné, aby oblast kapiláry, v níž bude probíhat enzymová reakce, byla bez přítomnosti těchto látek.

Na základě optimalizace pořadí a délky dávkování jednotlivých zón jsme pro online metodu dospěli k dávkování v režimu:

- 1) Dávkování roztoku škrobu v 10 mM fosfátovém pufru, pH 7,0 s 10 mM chloridem sodným (10 kPa × 2 s)
- 2) Dávkování roztoku potenciálního inhibitoru v 96% ethanolu (3 kPa × 1 s)
- 3) Ponoření konce kapiláry do deionizované vody
- 4) Dávkování roztoku α -amylasy v 10 mM fosfátovém pufru, pH 7,0 s 10 mM chloridem sodným (10 kPa × 4 s)
- 5) Ponoření konce kapiláry do deionizované vody
- 6) Dávkování základního elektrolytu, tj. 10 mM fosfátového pufru, pH 7,0 s přídavkem 1,2 mM jódu a 7,2 mM jodidu draselného (10 kPa × 1 s)

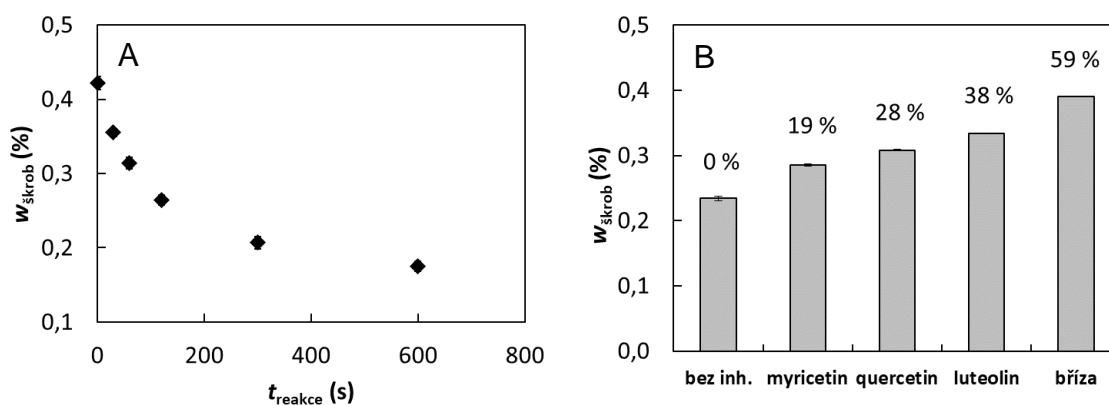
V rámci dávkovacího režimu je možno si povšimnout několika detailů, které mají velký vliv na funkčnost metody:

- A) Dávkované roztoky škrobu, inhibitoru a α -amylasy neobsahují jód, který inhibuje aktivitu enzymu. Dochází tím k vytvoření reakční zóny s jiným složením, než je složení základního elektrolytu, která průběh reakce umožňuje. Z tohoto důvodu je rovněž doba dávkování posledně dávkované zóny enzymu nejdelší. Zadní část zóny enzymu slouží mimo jiné jako ochranná zóna, která zamezuje průniku jódu do zóny reakční.
- B) Roztok škrobu jako substrátu a roztok potenciálního inhibitoru jsou dávkovány odděleně ze dvou různých nádobek a jsou míseny až v kapiláře. Tento způsob provedení zvyšuje míru automatizace screeningu inhibitorů tím, že se substrát a inhibitor nemísí ručně předem. Operátor tak připraví pouze jednu nádobku se substrátem, jednu s enzymem a libovolný počet nádobek s potenciálními inhibitory.
- C) Před a po dávkování enzymu je konec kapiláry krátce ponořen do vody. Zařazení tohoto kroku zajišťuje spolehlivost a opakovatelnost výsledků. Pokud by se kapilára po vyjmutí z roztoku inhibitoru bezprostředně ponořila do roztoku enzymu, mohlo by dojít ke kontaminaci zásobního roztoku enzymu inhibitorem a tím ke znehodnocení celé následující série měření. Stejně tak toto opatření brání kontaminaci roztoku základního elektrolytu enzymem. Toto opatření je obzvláště podstatné při použití přístrojů, které mají tubulární elektrody, jimiž prochází separační kapilára do dávkovaného roztoku. V takto konstruovaných přístrojích

obvykle velmi malé množství dávkovaného roztoku ulpí v prostoru mezi vnější stěnou kapiláry a vnitřní stěnou elektrody. Pro běžné aplikace se jedná o naprosto zanedbatelný jev. V případě online enzymových reakcí však jeho význam prudce narůstá, neboť i nepatrná kontaminace roztoku enzymu substrátem nebo obráceně může vést v delších časových intervalech k výrazným chybám ve výsledcích.

- D) Na konci je do kapiláry dávkována krátká zóna základního elektrolytu, která slouží jednak k lepšímu promísení reakční zóny, jednak snižuje riziko úniku části reakční zóny ven z kapiláry v průběhu reakce vlivem difúze či pomalého hydrodynamického toku způsobeného např. ne zcela shodnou výškou hladiny v nádobkách se základní elektrolytem.

V rámci vývoje metody je nutno rovněž optimalizovat dobu, po kterou je reakční směs ponechána v klidu před vložení napětí a zahájením separace. Výsledek experimentů s různou dobou vložení napětí znázorňuje Obr. 11A. Křivka vykazuje charakteristický klesající exponenciální průběh. K nejvýraznějšímu poklesu koncentrace škrobu dochází během prvních dvou minut, proto byl tento časový interval zvolen jako doba reakce. Doba separace byla díky využití separace na krátkém konci kapiláry, o které bude pojednáno v kap. 2.4.3, pouhých 30 s. Celé trvání experimentu od promývání kapiláry před analýzou, přes enzymovou reakci až po separaci a následnou detekci škrobu bylo pouhých 5,5 minuty, což je vzhledem ke složitosti celého procesu velmi krátká doba.



Obr. 11 Online metoda stanovení aktivity α -amylasy. (A) Optimalizace doby reakce, tj. intervalu mezi smísením reaktantů a zahájením separace. (B) Zbytkový obsah škrobu pro provedení online reakce v přítomnosti různých inhibitorů enzymu. Hodnoty nad jednotlivými sloupci vyjadřují inhibiční efekt vyjádřený v procentech.

Na Obr. 11B je zobrazena úspěšná aplikace vyvinuté metody na sledování inhibičního efektu standardů jednotlivých látek a ethanolového extraktu z kůry břízy bělokoré. Výška sloupců představuje koncentraci škrobu v reakční zóně po skončení enzymové reakce. Hodnoty nad jednotlivými sloupci vyjadřují inhibiční efekt vyjádřený v procentech. U standardů všech tří testovaných flavonoidů se projevila inhibice enzymu v rozsahu 19–38 %, což je patrné na zvýšeném obsahu škrobu po reakci ve srovnání s experimentem, kdy byl místo inhibitoru dávkován pouze 96% ethanol. Experiment s extraktem z břízy bělokoré potvrdil, že složitější matrice rostlinných extraktů měření neruší. Ukázalo se rovněž, že inhibiční efekt extraktu z březové kůry je silnější než v případě samostatných flavonoidů.

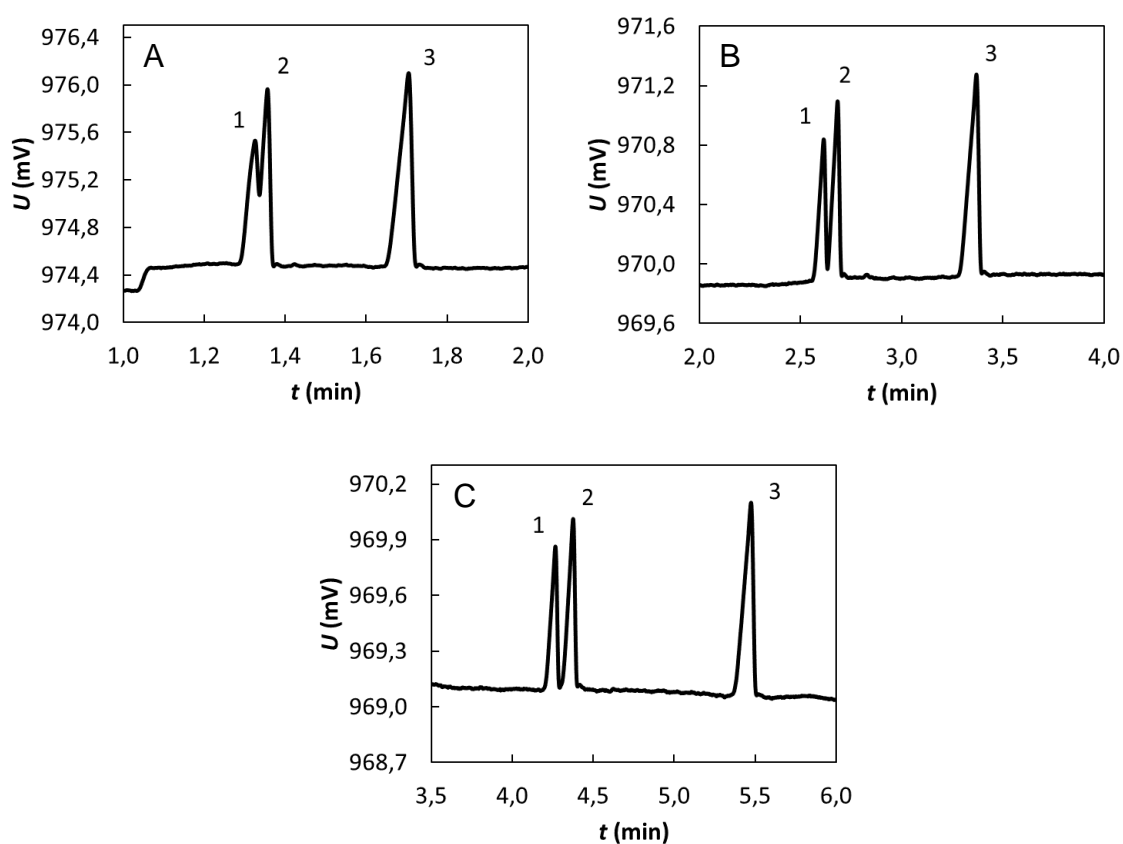
2.4 Změna rozměrů kapiláry a její vliv na separaci

Velká flexibilita experimentálního uspořádání CE ve srovnání s kapalinovou chromatografií se projevuje i v možnosti snadné a nenákladné úpravy rozměrů separačního prostoru. Zatímco v kapalinové chromatografii je nutno zakoupit, případně připravit separační kolonu jiných rozměrů, laboratoře zabývající se CE obvykle disponují sadou kapilár různých vnitřních průměrů v rozsahu typicky od 10 do 75 nebo i 100 μm . Délku kapiláry lze snadno, rychle a nenákladně upravit dle potřeby. V komerčních přístrojích se délky kapilár pohybují zhruba od 30 do 100 cm. Variace rozměrů separační kapiláry v CE tak lze provádět za zlomek nákladu na výměnu separační kolony v chromatografii.

2.4.1 Vliv délky kapiláry

Délka kapiláry ovlivňuje elektroforetickou analýzu s několika úhlů pohledu. Nejprůmočařejším vlivem zvětšení délky kapiláry je prodloužení času, který je k dispozici pro separaci analytů. Pro složité směsi nebo směsi, jejichž složky se málo liší elektroforetickou mobilitou, je možné využít kapiláry délky až 100 cm. Máme-li naopak separaci, při které je rozlišení analytů zbytečně velké, můžeme zkrácením kapiláry výrazně zkrátit dobu analýzy při zachování dostatečného rozlišení. Principiální výhodou CE ve srovnání s chromatografií je plochý rychlostní profil elektroosmotického toku, díky němuž dochází s prodlužováním kapiláry k výrazně menší disperzi jednotlivých zón, než k jaké dochází při prodlužování chromatografické kolony. Díky tomu při prodlužování kapiláry výrazně narůstá rozlišení vzhledem k většímu časovému rozdílu

mezi vrcholy píků a jejich nepříliš výraznému rozšiřování. Příklad dosažení dostatečného rozlišení prostým prodloužením separační kapiláry je na Obr. 12. Na Obr. 12A je elektroferogram separace bromidů, chloridů a síranů v kapiláře o vnitřním průměru 50 μm , celkové délce 50,0 cm a efektivní délce 35,0 cm. Je zřejmé, že již 35 cm dlouhá dráha od vstupního konce kapiláry k detektoru postačuje pro separaci chloridů a síranů. Jako rozlišení, při kterém dochází k úplné separaci zón, jež pak mohou být spolehlivě kvantifikovány, se zpravidla uvádí hodnota 1,5 [49]. Rozlišení píků chloridů a síranů na Obr. 12A je velmi vysoké, jeho hodnota činí 7,3. Metodu proto bylo možné používat pro stanovení síranů v krevní plazmě a moči, kde jsou chloridy přítomny v řádově vyšší koncentraci. Díky dostatečnému rozlišení se ani výrazně větší pík chloridů nepřekrývá s píkem síranů. V této formě jsme metodu využili pro studium dědičných poruch metabolismu siriých aminokyselin [50], kterým se zabývá tým prof. MUDr. Viktora Kožicha, CSc. (Klinika pediatrie a dědičných poruch metabolismu, 1. lékařská fakulta UV a Všeobecná fakultní nemocnice v Praze). Při pokusu o použití metody ke stanovení poměrného zastoupení chloridů a bromidů v krystalech připravených na Katedře



Obr. 12 Postupné zvýšení rozlišení (1) bromidů, (2) chloridů a (3) síranů v kapiláře o celkové/efektivní délce (A) 50,0/35,0 cm, (B) 65,0/50,0 cm, (C) 80,0/65,0 cm.

anorganické chemie PřF UK nebylo však při délce kapiláry 50,0 cm dosaženo dostatečného rozlišení. Obr. 12B a 12C ilustrují postupné zvyšování rozlišení a současné prodlužování doby analýzy při prodlužování kapiláry na 65,0 a následně až na 80,0 cm.

Kvantitativně jsou změny popsány v Tab. 1. Je patrné, že s rostoucí délkou kapiláry l_c se prakticky nemění koeficient selektivity $\alpha_{\text{Br,Cl}}$, jelikož poměr elektroforetických mobilit obou iontů zůstává stejný. Vzhledem k delší dráze od vstupního konce kapiláry k detektoru se však zvětšuje rozdíl migračních časů obou píků Δt . Na rozdíl od chromatografie se s prodlužující se délkou kapiláry zóny analytů rozšiřují jen mírně, zatímco jejich migrační časy se zvyšují z přibližně 1,3 min na více než 4 min. Z definice účinnosti separace (rovn. 8) [51]

$$N = 16 \left(\frac{t}{w} \right)^2 \quad (8)$$

kde N je účinnost separace vyjádřená počtem teoretických pater, t je migrační čas a w je šířka píku při základně, je zřejmé, že výrazné prodloužení migračního času při pouze mírném rozšíření píků vede k výraznému zvýšení účinnosti separace. Při zachování konstantní selektivity a zvýšení účinnosti separace tak dochází ke zvýšení rozlišení na dostačující hodnotu 1,5 v případě kapiláry o délce 80,0 cm.

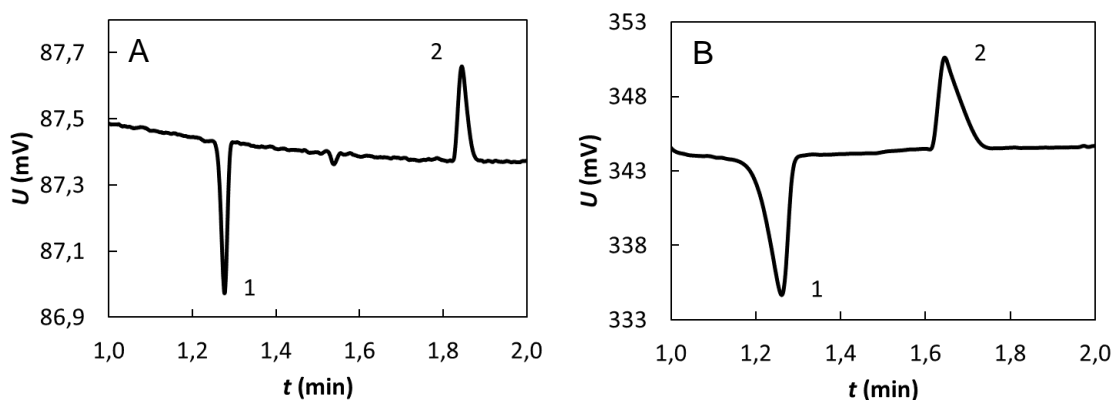
Ke zvýšení účinnosti separace při prodloužení kapiláry může přispět i to, že hodnota intenzity elektrického pole při vložení shodného napětí je nižší a delší kapilára naplněná stejným separačním pufrem má vyšší elektrický odpor. Ve výše uvedeném případě se elektrický proud procházející systémem snížil z 63 μA v kapiláře délky 50,0 cm na 37 μA v kapiláře délky 80,0 cm. Průchodem menšího proudu je generováno méně Jouleova tepla, které může způsobovat přehřívání roztoku, neuniformní teplotní gradienty a tím i změny viskozity v kapiláře, což může vyústit v nadměrné rozšiřování zón analytů [52].

Tabulka 1 Vliv celkové délky kapiláry na jednotlivé parametry separace: koeficient selektivity bromidů a chloridů $\alpha_{\text{Br,Cl}}$, rozdíl migračních časů píků bromidů a chloridů Δt , počet teoretických pater pro bromidy a chloridy N_{Br} a N_{Cl} a rozlišení píků bromidů a chloridů $R_{\text{Br,Cl}}$. V závorkách jsou uvedeny směrodatné odchylky ($n = 3$, $\alpha = 0,05$).

l_c [cm]	$\alpha_{\text{Br,Cl}}$	Δt [min]	N_{Br}	N_{Cl}	$R_{\text{Br,Cl}}$
50,0	1,023 (0,005)	0,031 (0,000)	10 200 (190)	19 700 (600)	0,67 (0,01)
65,0	1,026 (0,000)	0,068 (0,000)	39 100 (5 200)	37 500 (4 300)	1,24 (0,06)
80,0	1,026 (0,000)	0,109 (0,001)	59 300 (2 200)	53 800 (900)	1,51 (0,03)

2.4.2 Vliv vnitřního průměru kapiláry

Na tomto místě je nutno rovněž zmínit vliv vnitřního průměru kapiláry. Vezměme jako příklad výměnu kapiláry o vnitřní průměru 50 μm za kapiláru o vnitřním průměru 20 μm , což činí 40 % původní hodnoty. Je však třeba si uvědomit, že vlastnosti jako elektrický nebo hydrodynamický odpor závisí na průřezu kapiláry, který klesá s druhou mocninou vnitřního poloměru a v tomto případě se změní z 1 963 na 314 μm^2 , tedy na 16 % původní hodnoty. Mezi pozitivní důsledky použití kapiláry s menším vnitřním průměrem patří snížení hodnoty procházejícího elektrického proudu a s ním související zmenšení uvolněného Jouleova tepla. Uvolněné teplo se rovněž účinněji odvádí vzhledem k většímu poměru povrchu a objemu vnitřního prostoru kapiláry. Důsledkem je zvýšení účinnosti separace, které je možné pozorovat na Obr. 13. Jedná se o elektroferogramy separace složek Del Nido kardioplegického roztoku. Při studii vlivu úprav složení roztoku na jeho stabilitu a při objasňování sorpce jedné z jeho složek, lidokainu, na stěny infuzních vaků [53] jsme použili elektroforetickou metodu pro sledování koncentrace mannitolu a glukonátu. V zájmu zvýšení účinnosti separace byla použita kapilára o vnitřním průměru 20 μm namísto původně testované kapiláry o průměru 50 μm .



Obr. 13 Srovnání účinnosti separace složek Del Nido kardioplegického roztoku, (1) mannitolu a (2) glukonátu v kapiláře o vnitřním průměru (A) 20 μm a (B) 50 μm .

Negativní vliv menšího průměru kapiláry spočívá ve zvýšení hydrodynamického odporu. Pro promývání kapiláry a dávkování vzorků je nutno používat vyšší tlaky. Přesný tlak je však v přístrojích často limitován na 5 nebo 10 kPa, v důsledku čehož je nutno prodlužovat dobu promývání a dávkování, a tedy celkovou dobu trvání analýzy. Poměrně

výraznou nevýhodou je snížení citlivosti běžně používané UV/VIS spektrometrické detekce. Tento problém je zřejmý z Lambertova-Beerova zákona (rovn. 9) [54]:

$$A_{\lambda} = \varepsilon_{\lambda} c l \quad (9)$$

podle kterého je absorbance A_{λ} naměřená při vlnové délce λ rovna součinu molárního absorpčního koeficientu analytu pro danou vlnovou délku ε_{λ} , látkové koncentrace analytu c a délky dráhy paprsku v absorbujícím prostředí l . V běžné elektroforetické instrumentaci prochází paprsek záření kapilárou kolmo k její ose. Délka dráhy v absorbujícím prostředí tak odpovídá vnitřnímu průměru kapiláry. Při zmenšení vnitřního průměru z 50 na 20 μm se tak snižuje citlivost na 40 %. Použití kapilár menšího vnitřního průměru než 50 μm není proto v kombinaci s UV/VIS detekcí běžné. Na druhé straně lze kapiláry malých vnitřních průměrů s výhodou používat v kombinaci s bezkontaktní vodivostní detekcí, jak tomu bylo v případě separací na Obr. 13. Kapiláry malého vnitřního průměru se kombinaci s vodivostní detekcí využívají i v případech, kdy je nutné použití základního elektrolytu s vysokou vodivostí. Příkladem je separace neutrálních sacharidů, pro jejichž ionizaci je nutné vysoké pH základního elektrolytu, které je spojeno s vysokou vodivostí. Elektroforéza v kapilárách o vnitřním průměru 50 nebo 75 μm v těchto případech vede k neúnosnému přehřívání roztoku. Poslední nevýhodou kapilár malého vnitřního průměru je větší riziko jejich zanesení a zneprůchodnění pevnými nečistotami nebo precipitací složek vzorku či základního elektrolytu.

2.4.3 Separace na krátkém konci kapiláry

V předchozím textu bylo zmíněno prodloužení kapiláry za účelem zvýšení rozlišení analytů. V případech, kdy se mobility našich analytů značně liší, bývá dosažené rozlišení naopak zbytečně vysoké. V takových případech je možné prostřednictvím zkrácení kapiláry výrazně zkrátit dobu trvání analýzy při zachování dostatečného rozlišení. Zvláštní kapitolou jsou separace ve velmi krátkých kapilárách o délce 10-15 cm i méně [55-57]. Takové kapiláry však zpravidla nelze instalovat a provozovat v běžných komerčních přístrojích, kde bývá nejkratší použitelná délka kapiláry kolem 30 cm. Druhou nevýhodou velmi krátkých kapilár je menší celkový elektrický odpor, který má za následek průchod větších proudů, obvykle se proto používají kapiláry menších

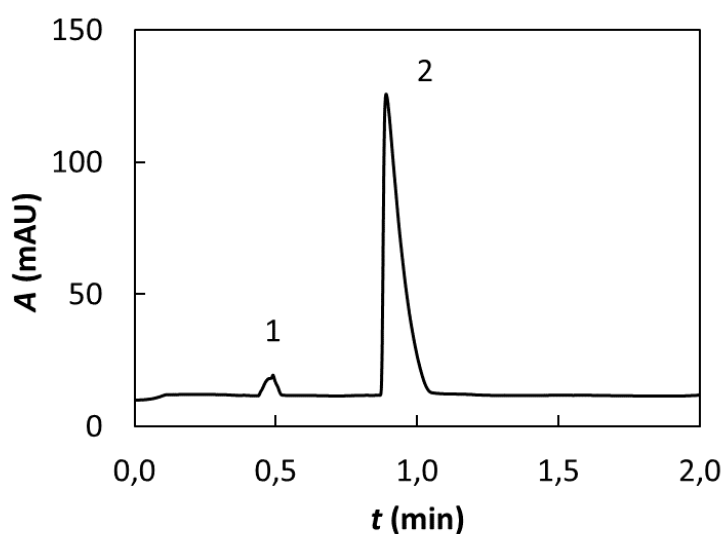
vnitřních průměrů, jejichž výhody a nevýhody byly diskutovány výše.

Elegantním řešením pro případy, kdy máme neúměrně velké rozlišení a zbytečně dlouhou analýzu, je použití tzv. separace na krátkém konci kapiláry, angl. *short-end separation* nebo *short-end injection* [58]. Při tomto provedení elektroforetického experimentu je vzorek dávkován na konec kapiláry, který je blíže k detektoru (obvykle ve vzdálenosti 8-10 cm) a separace se provádí s obrácenou polaritou elektrického pole. Dochází tedy k separaci pouze na dráze dlouhé 8-10 cm. Taková separace je výrazně rychlejší, doba trvání se pohybuje v sekundách až desítkách sekund. Celková délka kapiláry přitom může být klasických 50 cm. Díky tomu je i při vložení vysokého separačního napětí udržována přijatelná hodnota elektrického proudu. Ve zmíněném uspořádání je tedy možné pracovat i v kapilárách s většími průměry a dosahovat tak citlivější UV/VIS detekce.

Elektroforetické separace na krátkém konci kapiláry jsme využili v několika případech. Prvním z nich byla metoda pro současné stanovení protaminu a insulínu v injekčním roztoku NPH insulínu (**Příloha V**). NPH insulín (Neutral Protamine Hagedorn Insulin) je lék, který se využívá od padesátých let dvacátého století u pacientů s diabetem, o jehož závažnosti a rostoucím výskytu v celosvětové populaci bylo pojednáno v kap. 2.3.2.2. NPH insulín je obvykle podáván subkutánně. Skládá se z komplexu šesti molekul insulínu vázaných histidinovými aminokyselinovými zbytky na zinečnatý ion. Celý komplex je obklopen molekulami protaminu. Nebylo potvrzeno, zda se protaminové molekuly vážou na specifická místa, takže se předpokládá, že jde o interakci elektrostatické povahy [59]. Krystaly NPH insulínu se po aplikaci do podkoží velmi pomalu rozpadají, což vede k postupnému pozvolnému uvolňování aktivní formy insulínu v průběhu několika hodin. Prodloužený účinek je hlavním smyslem použití této formy insulínu.

Publikované metody stanovení protaminu zahrnují spektrofotometrii po reakci s Bradfordovým činidlem [60], jejíž nevýhodou je nízká specifita. Byla publikována metoda využívající optické senzory založené na interakci protaminu s heparinem [61], která však vyžaduje pracnou ruční přípravu těchto senzorů a pro rutinní použití tedy není vhodná. Další metody zahrnují využití separačních metod jako je HPLC [62, 63] nebo CE [64, 65]. Zapojení separačních kroků je obvykle spojeno s prodloužením analýzy řádově na 20 až 30 minut. Metody současného stanovení protaminu a insulínu publikovány nebyly. V naší práci jsme s využitím separace na krátkém konci kapiláry vyvinuli a validovali rychlou a nenákladnou metodu šetrnou k životnímu prostředí, která umožňuje

separaci protaminu a insulinu během jedné minuty. Celková doba analýzy včetně promývání kapiláry činí 4 minuty. Základní elektrolyt obsahuje pouze vodu a kyselinu fosforečnou a jeho spotřeba je 12 ml na 100 analýz. Tento základní elektrolyt díky své kyselosti zajišťuje dostatečně vysoký kladný náboj protaminu i insulinu a jeho přidavek do vzorku způsobuje okamžité rozpuštění suspenze NPH insulinu. Přesnost metody byla ověřena na modelových vzorcích i reálném vzorku injekčního roztoku. Chyba stanovení byla ve všech případech menší než 5 %. Obr. 14 znázorňuje separaci protaminu a insulinu ze vzorku injekce NPH insulinu.



Obr. 14 Separace protaminu (1) a insulinu (2) ze vzorku NPH insulinu naředěného 1:7 základním elektrolytem na krátkém konci kapiláry.

Dalším případem, kdy jsme využili separaci na krátkém konci kapiláry, bylo hodnocení hluboce eutektických rozpouštědel, angl. *deep eutectic solvents* (DES) jako účinných, nenákladných a netoxických činidel pro extrakci fytoKANABINOIDŮ z rostlinného materiálu (**Příloha VI**).

FytoKANABINOIDY jsou sloučeniny, které se vyskytují v konopí setém (*Cannabis sativa*), a které jsou v lidském organismu rozpoznávány KANABINOIDNÍMI receptory, díky čemuž ovlivňují psychické, psychomotorické a fyziologické funkce [66]. FytoKANABINOIDY jsou na jedné straně využívány pro terapeutické účely, na straně druhé jsou jejich psychotropní účinky zneužívány ve formě nejrozšířenějšího typu nelegálních drog. Konopí obsahuje celou řadu fytoKANABINOIDŮ, nicméně dva hlavní, které jsou nejvíce zkoumány pro své terapeutické účinky, jsou tetrahydroKANABINOL (THC) a KANABIDIOL (CBD). V rostlinách se nevyskytují ve své neutrální formě, ale jako

karboxylové kyseliny tetrahydrokanabinolová (THCA) a kanabidiolová (CBDA) kyselina. Neutrální formy vznikají spontánní dekarboxylací vlivem světla nebo tepla. THC je považován za hlavní psychoaktivní složku konopí a má euforizující efekt spojený s jeho zneužíváním. Naproti tomu CBD nevykazuje psychoaktivní účinky, naopak potlačuje vliv THC, vykazuje také anxiolytické a antipsychotické účinky [67]. Požadavky na stanovení obsahu fytoKANABINOIDŮ v různých matricích v současnosti strmě narůstají, a to jednak v souvislosti s velkým rozšířením a dostupností nelegálních konopných drog, jednak v souvislosti s rostoucí poptávkou po konopných léčivých přípravcích. Stanovení absolutního obsahu THC a CBD i jejich vzájemného poměru tedy přináší informace o míře psychoaktivních i terapeutických účinků rostlinného materiálu, případně přípravků z něho vyrobených, a je tedy zásadní pro hodnocení kvality léčivých přípravků stejně tak jako pro posouzení míry závažnosti kriminální činnosti spojené s jeho zneužíváním.

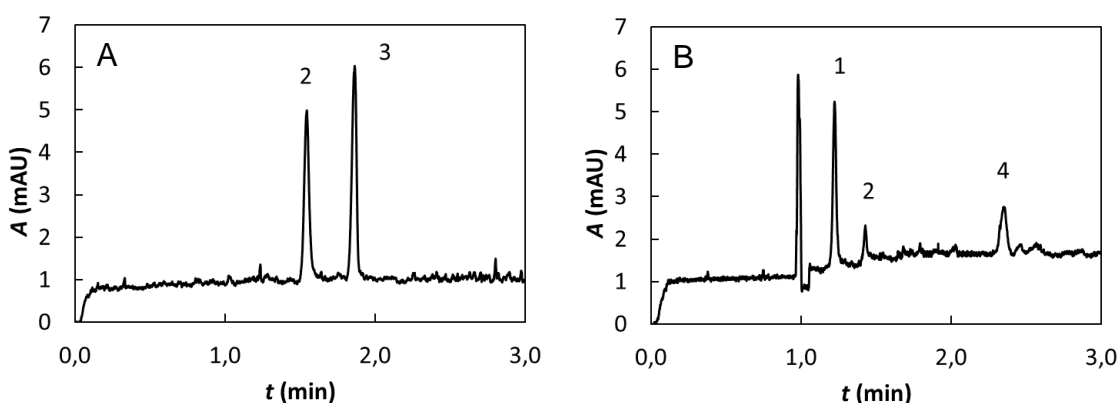
Před samotným stanovením je nutno fytoKANABINOIDY ze vzorků vhodným způsobem extrahovat. Tradiční extrakční postupy zahrnují použití organických rozpouštědel škodlivých pro člověka i životní prostředí, například směsi methanolu a chloroformu [68, 69]. V posledních letech byla věnována velká výzkumná pozornost novému typu extrakčních médií nazývanému „hluboce eutektická rozpouštědla“, angl. *deep eutectic solvents* (DES) [70]. Jedná se o eutektické směsi vhodného donoru a akceptoru vodíkové vazby, které asociují právě prostřednictvím vodíkových vazeb. To vede ke snížení jejich bodu tání, který je často výrazně nižší než body tání jednotlivých složek. DES jsou slibnou alternativou populárních iontových kapalin vzhledem k tomu, že podobně jako ony vykazují velmi nízkou těkavost v kombinaci s vysokou rozpouštěcí silou. Na rozdíl od iontových kapalin je však řada DES složena z obnovitelných a netoxických látek, jako jsou karboxylové kyseliny, aminokyseliny, sacharidy, aminy nebo polyoly. Vyznačují se proto také nízkou toxicitou a vysokou biodegradabilitou. Jejich příprava je snadná a vychází z nenákladných výchozích látek [71].

Pro extrakci fytoKANABINOIDŮ je výhodnější použití DES hydrofobní povahy. Jedna třída takových DES se skládá z mentholu jako akceptoru vodíkové vazby a přírodní organické kyseliny jako donoru [72]. V naší studii jsme sledovali účinnost extrakce fytoKANABINOIDŮ THC, THCA, CBD a CBDA z rostlinného materiálu pomocí DES složených z mentholu a různých přírodních organických kyselin, konkrétně mravenčí, octové, propionové, máselné, hexanové, oktanové, dodekanové, mléčné, phenylmléčné a mandlové. Nejvyšší sumární účinnost extrakce všech sledovaných KANABINOIDŮ byla pozorována pro směs mentholu s octovou kyselinou. Extrakční účinnost klesala

v homologické řadě od octové po hexanovou kyselinu. Mezi oktanovou a dodekanovou kyselinou byl naopak pozorován nárůst. Pravděpodobně se jednalo o kompetitivní efekt dvou faktorů, kterými byly rostoucí viskozita omezující přenos hmoty, a tedy i účinnost extrakce, na straně jedné a rostoucí délka alkylových řetězců kyselin podporující extrakci málo polárních analytů na straně druhé. Stejně tak byl studován vliv akceptoru vodíkové vazby, kdy byl menthol nahrazen vždy jedním z následujících terpenů: terpineol, linalool, geraniol, borneol. Žádný z těchto terpenů však nedosáhl extrakční účinnosti mentholu.

Extrakční účinnost DES složené z mentholu a octové kyseliny byla porovnána s účinností klasických organických rozpouštědel: methanolu, ethanolu a směsi methanolu s chloroformem v poměru 9:1 (v/v). V tomto srovnání prokázala DES nejvyšší účinnost extrakce, kdy o 20-30 % převýšila účinnost historicky nejpoužívanější směsi methanolu a chloroformu.

Studie účinnosti extrakce by nebyla možná bez spolehlivé analytické metody umožňující stanovení všech čtyř sledovaných fytoakanabinoidů. Jak již bylo uvedeno, využili jsme v tomto případě elektroforetickou separaci na krátkém konci kapiláry. Jako základní elektrolyt sloužila směs fosfátového pufru o pH 12,5 a methanolu v poměru 6:4 (v/v). Methanol byl přidáván kvůli omezené rozpustnosti některých analytů ve vodě. Vysoké pH základního elektrolytu umožnilo disociaci a tím pádem elektroforetickou separaci neutrálních fytoakanabinoidů THC a CBD. Separace trvala 2,5 minuty, celá analýza včetně promývání kapiláry trvala 4 minuty. Ukázka elektroferogramů vzorků rostlin bohatých na THC a CBD je na Obr. 15.

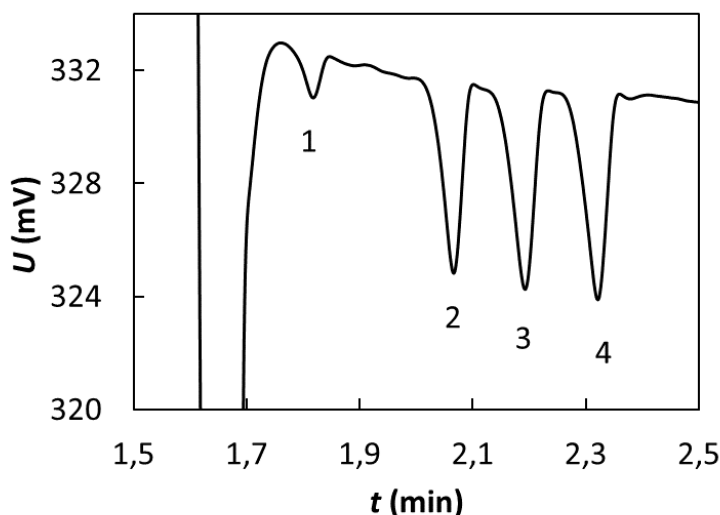


Obr. 15 Separace fytoakanabinoidů extrahovaných pomocí hluboce eutektických rozpouštědel ze vzorků rostliny konopí bohaté na THC (A) a rostliny bohaté na CBD (B) na krátkém konci kapiláry. Identifikace píků: (1) CBD, (2) THC, (3) THCA, (4) CBDA.

Separace na krátkém konci se ukázala jako výhodná rovněž při stanovení sacharidů (**Příloha VII**). Při elektroforetických separacích neutrálních sacharidů, jako jsou glukosa, fruktosa a sacharosa je nutné v první řadě převést analyty do iontového stavu. Přímočárým způsobem je použití základního elektrolytu o vysokém pH, které vede k disociaci hydroxylových skupin sacharidů [73, 74]. Roztoky o pH vyšším než 12 mají vysokou vodivost, proto je v těchto případech výhodné použití kapilár menšího vnitřního průměru v kombinaci s bezkontaktní vodivostní detekcí. Glukosa, fruktosa ani sacharosa navíc nevykazují výraznou absorpci UV záření při vlnových délkách nad 200 nm, což je další důvod pro použití vodivostní detekce. Při stanovení glukosy, fruktosy a sacharosy jsme využili metodu se základním elektrolytem tvořeným 40 mM NaOH a kapilárou o vnitřním průměru 20 μm . Separace sacharidů trvá 2,5 minuty, celá analýza včetně promývání kapiláry mezi nástřiky vzorků pak 5 minut. S pomocí této metody jsme v rámci středoškolské odborné činnosti a programu PřF UK „Začni (si) s přírodovědou“ sledovali hydrolyzu sacharosy v tzv. pampeliškovém medu. Jedná se o sirup, který se tradičně používá jako náhražka včelího medu [75]. Jeho receptura se může mírně lišit, v zásadě však zahrnuje extrakci květů smetanky lékařské (*Taraxacum officinale*) ve vroucí vodě, následovanou přidavkem velkého množství cukru (sacharosy) a menšího množství citronové šťávy. Následuje zahřívání směsi na vodní lázni po určitou dobu. Na první pohled se zdá, že pampeliškový med se sacharidovým složením (pouze sacharosa) zcela liší od medu včelího (převážně glukosa a fruktosa). V rámci naší studie jsme však ukázali, že díky přidavku citronové šťávy dochází v průběhu zahřívání směsi ke kyselé katalyzované hydrolyze sacharosy na glukosu a fruktosu. Rychlost hydrolyzy silně závisí na pH, době reakce a teplotě. Například při pH = 2 dojde během 1,5 hodiny na vroucí vodní lázni k hydrolyze více než 99 % sacharosy, při pH = 3 se za stejnou dobu hydrolyzuje 39 % sacharosy a při pH = 4 pouze 5 %. Ukázali jsme tedy, že pokud je směs při přípravě pampeliškového medu dostatečně okyselená a je zahřívána po dostatečně dlouhou dobu na dostatečně vysokou teplotu, může mít prakticky stejné sacharidové složení jako včelí med.

Stejnou metodu jsme následně využili pro analýzu rozsáhlé série vzorků nektaru z květů, který obsahuje převážně sacharosu, glukosu a fruktosu. Měření byly podrobeny vzorky nektaru pocházející z Kamerunu a účelem studie bylo lepší pochopení interakcí mezi opylovačem a rostlinou, jelikož obsah a poměrné zastoupení sacharidů jsou jedním z faktorů, které rozhodují o atraktivnosti nektaru pro daný druh opylovače. V tomto případě byla pro zajištění spolehlivější kvantifikace do vzorků přidávána laktosa jako

vnitřní standard. Obr. 16 znázorňuje elektroferogram vzorku nektaru z květů rostliny *Peucedanum angustisectum* analyzovaného v rámci studie. Zde bylo měření na krátkém konci kapiláry a s ním spojené zkrácení analýzy vzhledem k počtu vzorků (více než 700) velkou výhodou.



Obr. 16 Separace sacharidů ze vzorku nektaru z květů rostliny *Peucedanum angustisectum* na krátkém konci kapiláry. Identifikace píků: (1) sacharosa, (2) laktosa (vnitřní standard), (3) glukosa, (4) fruktosa.

2.5 Nepřímá UV detekce

Další z výhod, které nabízí CE oproti kapalinové chromatografii, je možnost využití nepřímé UV detekce analytů, které neabsorbují v dostatečné míře UV záření. Vzhledem k nutnosti zachování elektroneutrálnosti roztoku vytěsňují ionty analytů ze své zóny stejně nabitě ionty základního elektrolytu. Absorbují-li ionty základního elektrolytu elektromagnetické záření v ultrafialové nebo viditelné oblasti, projeví se pokles jejich koncentrace v zóně analytu poklesem absorbance. Chceme-li tedy využít nepřímou UV detekci při separaci aniontů, je nutno zvolit základní elektrolyt s aniontem, který absorbuje UV záření. V případě kationtů pak zvolíme absorbující kation.

Nepřímou UV detekci jsme využili k vývoji metody stanovení nižších mastných kyseliny (SCFA), angl. *short-chain fatty acids* (**Příloha VIII**). SCFA zahrnují karboxylové kyseliny obsahující maximálně šest atomů uhlíku. V našem případě jsme se zabývali kyselinami octovou, propionovou, máselnou a isomáselnou. Tyto kyseliny vznikají mikrobiální fermentací nestravitelných sacharidů v tlustém střevě savců. SCFA pomáhají jeho normální funkci a jejich přítomnost je důležitým faktorem ovlivňujícím celkové zdraví tlustého střeva. Bylo prokázáno, že máselná kyselina hraje významnou roli v prevenci kolitidy a kolorektálního karcinomu [76, 77].

V rámci optimalizace složení základního elektrolytu jsme z několika anionogenních látek absorbujících UV záření jako složku pro nepřímou UV detekci zvolili pufr o pH 5,7 obsahující benzoovou kyselinu. Díky blízkým hodnotám efektivní elektroforetické mobility aniontu benzoové kyseliny a analytů při pH 5,7 byly získány symetrické píky nezátížené výrazně elektromigrační disperzí [52]. Dalšího zvýšení účinnosti separace a rozlišení aniontů máselné a isomáselné kyseliny jsme dosáhli přidavkem β -alaninu, jehož pozitivní vliv při separacích podobných látek publikovali Azavedo a kol. [78]. Nicméně ani s přidavkem β -alaninu nebyly ionty máselné a isomáselné kyseliny zcela separovány. Pro dosažení úplné separace byla využita další výhoda flexibility CE, kterou je možnost zavedení dalších separačních mechanismů přidavkem pseudostacionární fáze do základního elektrolytu. Cyklodextriny jsou vhodnými aditivami nejen pro chirální separace, ale také pro separace achirální. Hydrofobní kavita přítomná ve struktuře cyklodextrinů umožňuje tvorbu inkluzních komplexů s analyty, jejichž molekuly obsahují málo polární části. Příkladem takové málo polární části jsou uhlíkaté řetězce máselné a isomáselné kyseliny. Tvorba komplexů zpomaluje migraci aniontů kyselin. Vzhledem ke sterické rozdílnosti obou kyselin mají jejich komplexy rozdílnou stabilitu, která zvyšuje rozdíl v jejich efektivní elektroforetické mobilitě. Z cyklodextrinů byl pro účely této metody použit α -cyklodextrin, jehož malá hydrofobní kavita je kompatibilní s krátkými hydrofobními řetězci máselné a isomáselné kyseliny.

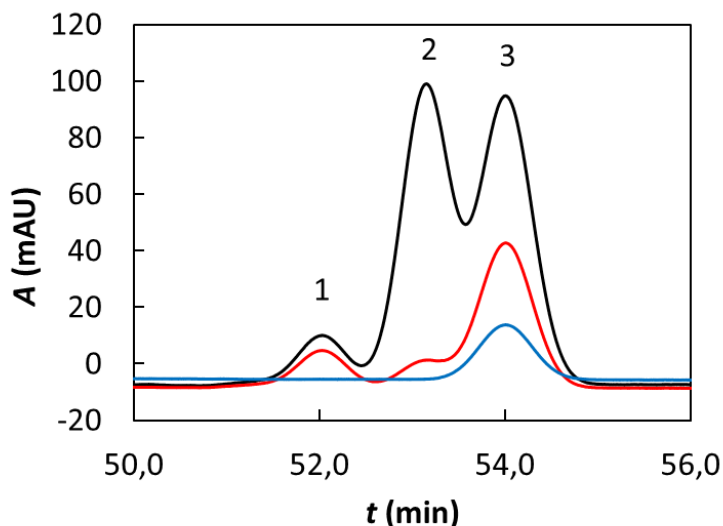
Při separacích aniontových analytů, jako jsou SCFA, je často nutné přidávat do základního elektrolytu vhodný kationogenní detergent, typickým příkladem je cetyltrimethylamonium bromid. V kombinaci s α -cyklodextrinem je však použití tohoto detergentu problematické, protože alifatický řetězec cetyltrimethylamonia vstupuje do kavit α -cyklodextrinu, čímž limituje jeho pozitivní vliv na rozlišení isomerů máselné kyseliny. Proto byl takový detergent v naší metodě nahrazen kationtovým polymerem polybrenem. Metoda se základním elektrolytem složeným z benzoátu, β -alaninu, α -cyklodextrinu a polybrenu byla následně validována a úspěšně použita k separaci a stanovení všech čtyř sledovaných SCFA ve vzorcích psí a lidské stolice.

3 MOBILIZACE MARKERŮ ELEKTROOSMOTICKÉHO TOKU

Z jistého úhlu pohledu může mít velká flexibilita CE i své stinné stránky. Jednou z nich je někdy problematická opakovatelnost mobility elektroosmotického toku, jejíž hodnota silně závisí na hodnotě zeta-potenciálu. Ta je úzce spjata se stavem vnitřní stěny kapiláry. Povrchové jevy, jako je sorpce složek matrice vzorku nebo i samotných analytů, mohou mobilitu EOF výrazně ovlivňovat. Pro řadu aplikací je proto zásadní přesně stanovit migrační čas látek se zcela nulovou vlastní mobilitou, které se kapilárou pohybují pouze vlivem elektroosmotického toku, případně toku generovaného tlakovým rozdílem mezi oběma konci kapiláry. Stanovení přesné hodnoty mobility EOF je zásadní nejen pro analytické aplikace, ale také při stanovení konstant stability komplexů a dalších fyzikálně chemických měření [79, 80]. Nejčastěji používané metody jsou založeny na přidavku neutrálních markerů do vzorku [81, 82]. Tato měření jsou založena na předpokladu, že markery se pohybují kapilárou přesně rychlostí EOF. Jak ukázaly naše studie, tento předpoklad nemusí vždy platit, jelikož i neutrální látky mohou vlivem interakcí se složkami základního elektrolytu získat jistou mobilitu. Při měření velmi malých mobilit může chyba způsobená nenulovou mobilitou markeru hrát významnou roli.

Na potíže s přesným stanovením rychlosti EOF jsme narazili při měření vlivu anorganických a malých organických iontů na chování a elektroforetickou mobilitu biomolekul ve spolupráci se skupinou prof. Mgr. Pavla Jungwirtha, DrSc. z Ústavu organické chemie a biochemie Akademie věd České republiky [83-86]. V rámci jedné ze studií (**Příloha IX**) jsme se pokoušeli sledovat interakci *N*-methylacetamidu (NMA) jako jednoduchého modelu peptidové vazby s ionty solí Hofmeisterovy řady v zájmu objasnění jevů vsolování a vysolování proteinů na základě interakcí iontů solí s peptidovou páteří proteinů. Interakce NMA s ionty se měla projevit velmi nízkou, avšak nenulovou elektroforetickou mobilitou NMA.

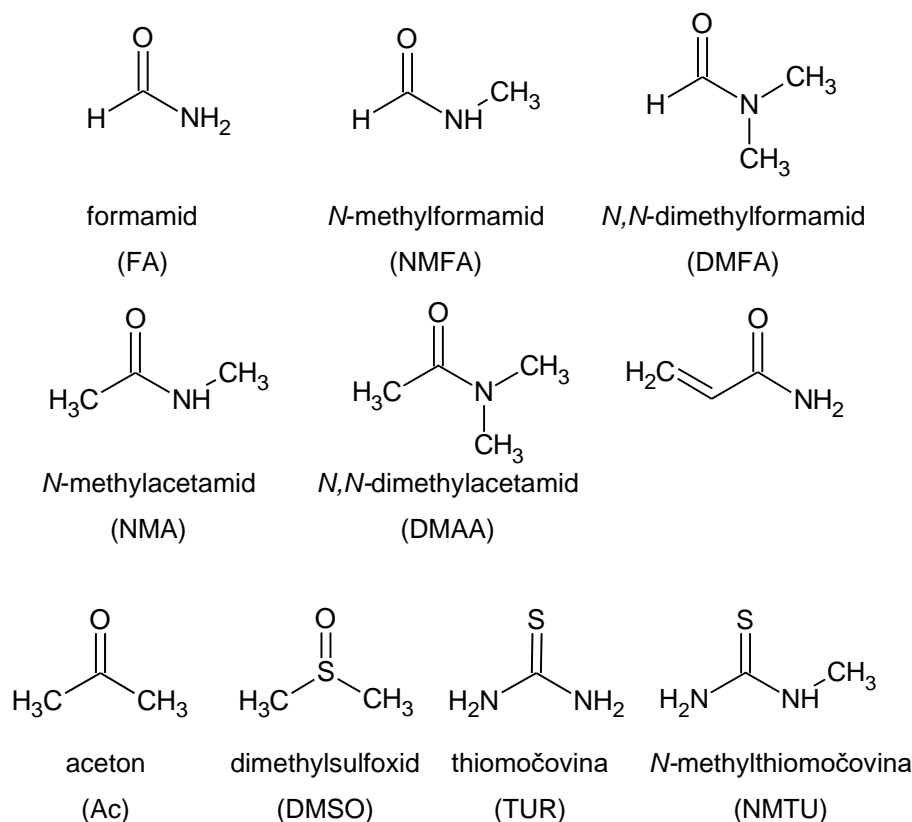
Přítom při použití dimethylsulfoxidu (DMSO) a thiomočoviny (TUR) jako neutrálních markerů EOF jsme získali mobility NMA s opačným znaménkem a při experimentu, ve kterém jsme do kapiláry nadávkovali všechny tři látky najednou, došlo k jejich úplné separaci, jak je patrné z Obr. 17.



Obr. 17 Separace tří neutrálních látek, dimethylsulfoxidu, *N*-methylacetamidu a thiomocoviny v základním elektrolytu složeném ze směsi acetátového pufru o pH = 5,5 a methansulfonátu sodného. Vlnová délka detekce 200 nm (černá čára), 214 nm (červená čára), 254 nm (modrá čára).

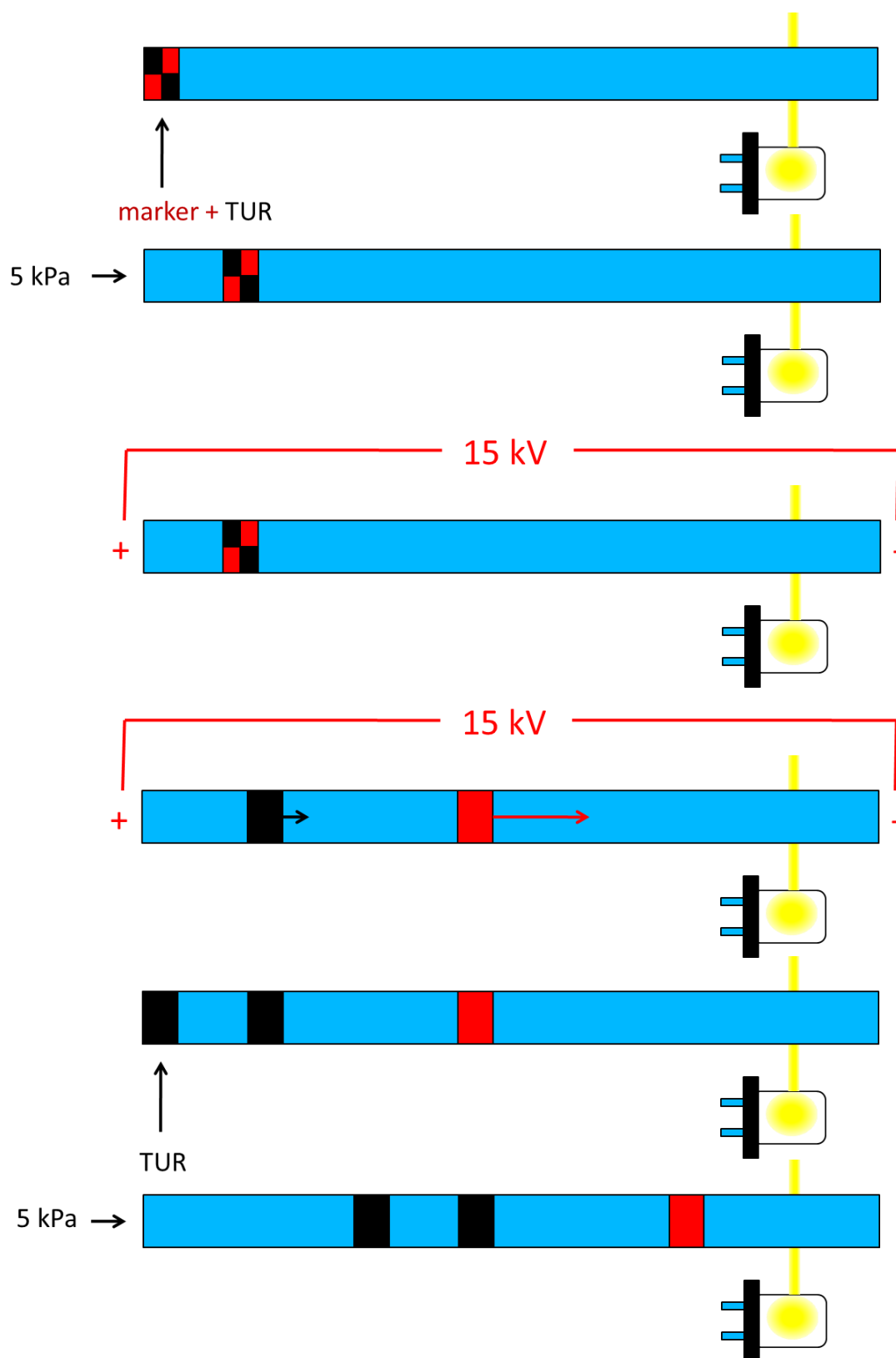
Přestože mobilizace neutrálních molekul byla již dříve pozorována, jednalo se o specifické případy, kdy neutrálními analyty byly například polymery [87] nebo antibiotika [88]. Na druhé straně byla pozorována mobilizace malých neutrálních molekul používaných jako markery EOF v systémech se sulfatovanými cyklodextriny [89]. Možnost interakce malých neutrálních markerů EOF s běžnými anorganickými a malými organickými ionty však předpokládána nebyla. V naší práci jsme poukázali na tento opomíjený problém. Provedli jsme sérii měření relativní elektroforetické mobility NMA vůči TUR v základních elektrolytech složených z acetátových pufrů s různými kationty a v základních elektrolytech složených ze směsí sodných solí různých aniontů a acetátového pufru. Bylo zjištěno, že kationty Ca^{2+} , Mg^{2+} a Li^{+} mobilizují NMA vůči TUR v kladném směru. Pufri s Na^{+} neumožňují separaci obou látek a pufri obsahující Cs^{+} vede naopak k mobilizaci NMA vůči TUR v záporném směru. Co se týče aniontů, SO_4^{2-} mobilizovaly NMA výrazně pozitivně vůči TUR, F^{-} , Cl^{-} a $\text{CH}_3\text{SO}_3^{-}$ vedly rovněž ke kladné, avšak méně intenzivní mobilizaci. Na druhé straně ClO_4^{-} způsobily mobilizaci negativní. Tyto experimenty byly doplněny simulacemi molekulové dynamiky, které nabídly pohled na rozložení iontů základního elektrolytu v okolí studovaných neutrálních látek. Z porovnání výsledků experimentů a simulací bylo zřejmé, že významnou roli v mobilizačních efektech hrají struktury neutrálních markerů, které obsahují části s povrchem spíše hydrofobnějšího charakteru a části s povrchem spíše hydrofilnějšího charakteru. Například velká a pouze slabě polární karbothionylová skupina v TUR váže

velké kationty spíše než malé, na rozdíl od malé a polárnější karbonylové skupiny v NMA a sulfinylové skupiny v DMSO.



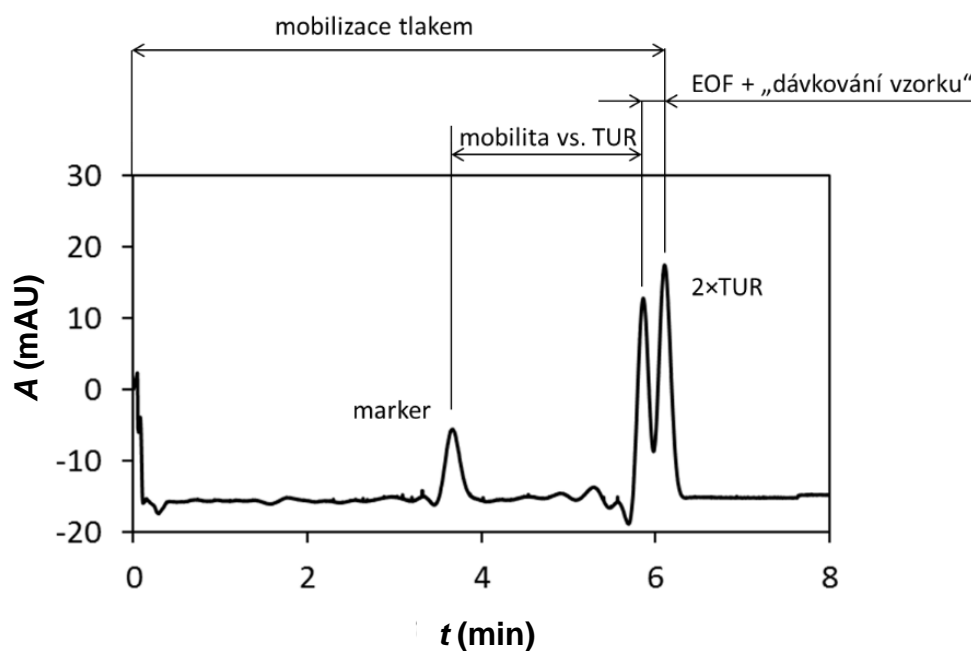
Obr. 18 Struktury markerů EOF a jejich strukturálních analogů ze studie v Příloze X. Zobrazeny jsou pouze látky diskutované v této práci.

Následně jsme provedli systematickou studii mobilizace 11 látek používaných jako markery EOF a jejich analogů (struktury látek diskutovaných v této práci jsou uvedeny na Obr. 18) v acetátovém pufru se sodným, lithným, amonným, hořečnatým a vápenatým kationtem (**Příloha X**). Pro měření velmi malých mobilit jsme využili flexibilitu CE a kombinovali jsme elektroforetickou migraci s mobilizací zón tlakem. Stejný postup byl využit i v předchozí studii (**Příloha IX**). Obr. 19 znázorňuje postup experimentu. Nejprve byla do kapiláry dávkována směs studovaného markeru a TUR jako referenčního markeru. Zóna byla zasunuta tlakem do kapiláry, aby v případě migrace k anodě nedošlo k úniku zóny markeru nebo TUR vstupním koncem z kapiláry. Následně bylo vloženo elektrické napětí po dobu 60 minut, aby bylo možné měřit velmi malé mobility s přijatelnou spolehlivostí. Během těchto 60 minut se všechny zóny pohybovaly společně rychlostí zbytkového EOF, který byl však velmi nízký díky použití kyselého BGE o pH = 4,5. Při tomto pohybu se od sebe zóny markeru a TUR navzájem separovaly vlivem jejich



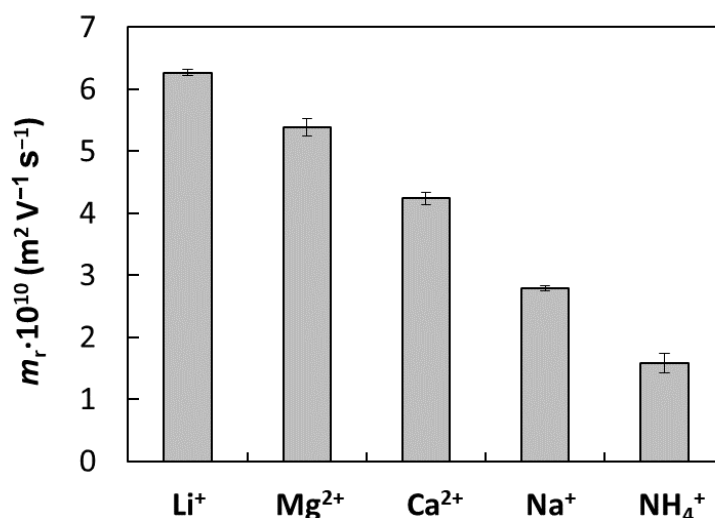
Obr. 19 Schematické znázornění průběhu experimentů měření relativní mobility markerů elektroosmotického toku a jejich strukturně příbuzných látek v rámci studií v Příloze IX, X a XI.

mobilizace interakcemi se složkami základního elektrolytu. Po vypnutí napětí byla na vstupní konec kapiláry nadávkována ještě jedna zóna TUR, která sloužila k měření rychlosti tlakové mobilizace. Následně byly všechny zóny vytlačeny z kapiláry skrz detektor, který je zaznamenal. Ukázkový záznam detektoru z tohoto typu experimentu spolu s popisem obsažených informací je zobrazen na Obr. 20.



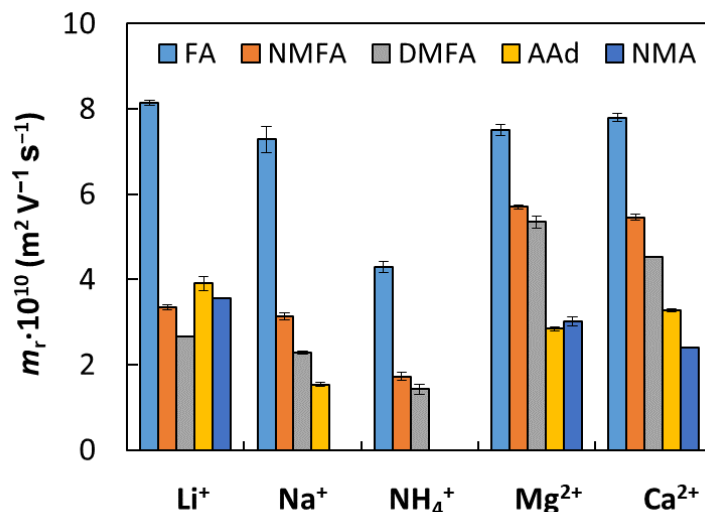
Obr. 20 Ukázkový záznam detektoru při měření relativní mobility markerů elektroosmotického toku a jejich strukturně příbuzných látek v rámci studií v Příloze IX, X a XI. Průběh experimentu je schematicky znázorněn na Obr. 19.

Ze získaných hodnot relativních mobilit studovaných látek vůči TUR jsme vypočítali několik trendů, které mohou sloužit jako vodítko pro volbu optimálních kombinací základního elektrolytu a markeru EOF. Konkrétně jsme pozorovali vliv velikosti a náboje kationtu základního elektrolytu, který je dobře patrný na relativní mobilitě DMSO. Z Obr. 21 je zřejmé, že relativní mobilita DMSO, a tedy jeho pozitivní mobilizace vůči TUR, klesá ve skupinách periodické tabulky s rostoucím iontovým poloměrem od Li^+ (iontový poloměr 59 pm) k Na^+ (iontový poloměr 102 pm) a od Mg^{2+} (iontový poloměr 72 pm) k Ca^{2+} (iontový poloměr 100 pm) [90]. Relativní mobilita DMSO naopak roste v periodách vlivem zvětšujícího se náboje iontů od Na^+ k Ca^{2+} .



Obr. 21 Vliv velikosti a náboje kationtu základního elektrolytu na relativní mobilitu dimethylsulfoxidu vztahenou k mobilitě thiomochoviny.

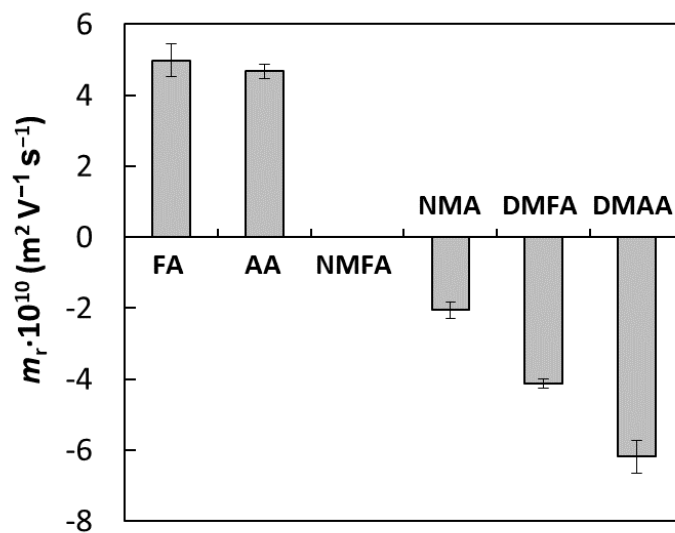
Druhým výrazným trendem, který byl pozorován, je vliv míry methylace molekuly neutrálního markeru. Ten je patrný ve skupině amidů (Obr. 22). Vodík vázaný na amidovém dusíku může tvořit vodíkové vazby s acetátovým aniontem přítomným v základním elektrolytu. Parciální záporný náboj na atomech kyslíku naopak umožňuje interakci molekuly s kationty základního elektrolytu. Jak je patrné na Obr. 22, substitucí atomu vodíku na dusíku methylovou skupinou (formamid \rightarrow *N*-methylformamid \rightarrow *N,N*-dimethylformamid) klesá parciální záporný náboj atomu dusíku, jelikož methylové skupiny nejsou tak pozitivní jako atom vodíku vázaný přímo na dusík. Mění se také poměr polárního a nepolárního povrchu molekuly. Nadto je kyslíkový atom amidu s rostoucí methylací více stéricky bráněn a tím pádem je méně přístupný pro kationty BGE. S rostoucí mírou methylace tak pozitivní mobilizace markeru klesá. Ve dvojici *N*-methylacetamid – akrylamid je methylová skupina NMA nahrazena vinylovou v akrylamidu. Vyšší elektronová hustota dvojně vazby v kombinaci s nemethylovaným amidovým dusíkem akrylamidu vedou k jeho silnějším interakcím s kationty, a tedy pozitivnější mobilizaci. V případě thiomochoviny nezpůsobila methylace na *N*-methylthiomochovinu žádnou změnu mobility, což naznačuje, že absolutní mobilita thiomochoviny jako referenčního markeru je velmi nízká.



Obr. 22 Vliv míry methylace studovaných amidů na jejich mobilizaci kationty základního elektrolytu. V grafu jsou vyneseny relativní mobility amidů vztahované k mobilitě thiomochoviny.

Výraznou změnu v relativní mobilitě způsobilo nahrazení atomu síry v DMSO za atom uhlíku v acetonu. Atom síry je výrazně větší a jeho volné elektronové páry rovněž způsobují změnu geometrie molekuly. Zatímco aceton je planární, DMSO nikoli. To činí strukturu DMSO otevřenější a atomy síry a kyslíku jsou v něm více vystaveny kationtům BGE. Na druhé straně struktura acetonu je výrazně kompaktnější a větší části jeho povrchu jsou nepolární. Vlivem toho vykazuje DMSO výrazně větší pozitivní mobilizaci než aceton.

V následující studii (**Příloha XI**) jsme se věnovali vlivu aniontů základního elektrolytu. Měřili jsme relativní mobilitu markerů vůči TUR v základních elektrolytech složených ze sodné soli studovaného aniontu a octátového pufru o pH 4,5. I v tomto případě byl dobře patrný vliv methylace markeru, konkrétně v případě chloristanu (Obr. 23). Z obrázku je patrné, že s rostoucí mírou methylace markeru přecházela postupně relativní mobilita z kladných do záporných hodnot. Narůstající nepolární povrch molekuly společně se sterickým bráněním odstiňoval pozitivně mobilizující vliv kationtů BGE. Naproti tomu chloristan, který vykazuje afinitu jak k polárním, tak k nepolárním částem molekul, s rostoucí methylací intenzivněji mobilizoval markery v negativním směru. Kromě toho jsme pozorovali, že základní elektrolyt složený z chloridu sodného a octanového pufru vykazuje pozitivnější mobilizaci markeru než čistý octanový pufr, trend ve srovnání různých markerů je však u obou elektrolytů podobný. V souladu s pozorováním z **Přílohy IX** bylo i zde zjištěno, že síran interaguje s markery velmi slabě, všechny markery vykazovaly v základním elektrolytu založeném na síranu podobnou, poměrně vysokou pozitivní relativní mobilitu vůči TUR.



Obr. 23 Vliv míry methylace studovaných amidů na jejich relativní mobility vztažené k mobilitě thiomočoviny v základním elektrolytu obsahujícím chloristan sodný a acetátový pufr o pH = 4,5.

4 ZÁVĚR

Ačkoli kapilární elektroforéza není nejrozšířenější analytickou separační metodou a tam, kde je to možné, dávají uživatelé často přednost vysokoúčinné kapalinové chromatografii, jedná se o metodu rychlou, úspornou a šetrnou k životnímu prostředí, která díky jednoduchosti a flexibilitě svého experimentálního uspořádání nabízí široké spektrum netradičních aplikací, ať už pro oblast základního a aplikovaného výzkumu, nebo pro rutinní analýzu. Takové speciální aplikace jsou přitom v kapalinové chromatografii jen obtížně realizovatelné či zcela nerealizovatelné. V této práci jsem na příkladech jedenácti publikací, vycházejících z mé výzkumné činnosti v letech 2013-2021, ilustroval některé z těchto méně běžných aplikací a přístupů.

Jednou z výhod, které kapilární elektroforéza nabízí, je možnost zvýšení citlivosti stanovení o několik řádů prostřednictvím zesílení intenzity elektrického pole v zóně dávkovaného vzorku. Tento přístup jsme využili pro stanovení dusitanů a dusičnanů v pitné vodě (**Příloha I**). V kapilární elektroforéze nadto existuje několik způsobů mobilizace zón, které lze navzájem kombinovat. To umožňuje mísení zón různých látek přímo v kapiláře, a to buď prostřednictvím elektroforetické migrace, což jsme uplatnili při studiu vzájemné interakce heparinu a tetraargininu (**Příloha II**), nebo prostřednictvím difúze, což ilustruji na příkladech studia enzymové aktivity β -*N*-acetylhexosaminidasy (**Příloha III**) a vývoje metody pro hledání inhibitorů α -amylasy (**Příloha IV**). Možnost provedení separace na krátkém konci kapiláry přináší výrazné zkrácení doby analýzy, které je zásadní výhodou při rutinním analytickém využití metody. Příkladem takové aplikace je současné stanovení protaminu a insulinu v injekční suspenzi NPH insulinu (**Příloha V**). Druhým příkladem je stanovení fytoKANabinoidů, které bylo využito při hodnocení hluboce eutektických rozpouštědel jako činidel pro extrakci fytoKANabinoidů z rostlinného materiálu (**Příloha VI**). Třetím příkladem praktického využití separace na krátkém konci kapiláry je stanovení glukosy, fruktosy a sacharosy, které bylo využito ke studiu hydrolyzy sacharosy při přípravě sirupu ze smetanky lékařské (**Příloha VII**) nebo při stanovení sacharidů obsažených v nektaru z květů v rámci studie jejich vlivu na atraktivitu květů pro opylovače. Poslední výhodou kapilární elektroforézy, které byla věnována pozornost, je možnost využití nepřímé UV detekce. Ta nám posloužila při stanovení nižších mastných kyselin ve stolici (**Příloha VIII**).

Charakteristické rysy kapilární elektroforézy s sebou přinášejí i jisté potíže spojené s elektroosmotickým tokem a jeho omezenou reprodukovatelností. K probádání této

problematiky jsme přispěli třemi studiemi poukazujícími na možnou nespolehlivost měření rychlosti elektroosmotického toku založeného na sledování migračního času neutrálního markeru. V první z nich jsme poukázali na to, že i látky běžně používané jako markery elektroosmotického toku mohou vlivem svých interakcí s anorganickými a malými organickými ionty běžně obsaženými v základních elektrolytech získat jistou elektroforetickou mobilitu (**Příloha IX**). V dalších dvou studiích jsme systematicky studovali různé kombinace markerů s kationty (**Příloha X**) a anionty (**Příloha XI**) obsaženými v základním elektrolytu a hodnotili jejich vliv na pozorovanou mobilitu.

Jsem přesvědčen, že experimentální přístupy popsané v této práci, včetně praktických příkladů jejich využití, dokládají nezastupitelnou roli kapilární elektroforézy v analytické chemii. Věřím, že i v budoucnosti bude tato metoda předmětem dynamického rozvoje a bude přinášet další až nečekaně prostá a elegantní řešení výzkumných i praktických problémů, která by byla v jiných separačních metodách jen obtížně realizovatelná. V naší laboratoři se tímto směrem ubíráme. V současnosti mimo jiné pracujeme na možnostech online derivatizace sacharidů pro kapilární elektroforézu s fluorescenční detekcí, která bude sloužit pro separace a stanovení velmi nízkých koncentrací glykanů v biologických vzorcích. Takový typ analýz bude přínosem v rychle se rozvíjejících oblastech glykoproteomiky a biologických léčiv. Druhým příkladem našich současných výzkumných aktivit, které využívají specifických vlastností kapilární elektroforézy, je studium enkapsulace farmaceuticky významných látek do liposomů a jejich následné uvolňování. Zde může kapilární elektroforéza významně přispět na poli cíleného transportu a uvolňování léčiv v organismu, což je jeden z výrazných trendů současného výzkumu.

5 PŘEHLED PUBLIKOVANÝCH PRACÍ

5.1 Původní vědecké práce v impaktovaných časopisech

1. Ryšánek P., Grus T., Lukáš P., Kozlík P., **Křížek T.**, Pozniak J., Roušarová J., Královičová J., Kutinová Canová N., Boleslavská T., Bosák J., Štěpánek F., Šíma M., Slanař O.: Validity of cycloheximide chylomikron flow blocking method for the evaluation of lymphatic transport of drugs. *British Journal of Pharmacology* (2021) 15644.
2. Vymyslický F., **Křížek T.**, Kozlík P., Kubíčková A., Heřt, J., Bartosińska E.: Alternative method for canagliflozin oxidation analysis using an electrochemical flow cell - Comparative study. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* (2021) 114341.
3. Čokrtová K., **Křížek T.**, Kubíčková A., Coufal P.: Effect of background electrolyte anions on markers of electroosmotic flow in capillary electrophoresis. *Monatshefte für Chemie* 152 (2021) 1061-1065.
4. Martínková E., **Křížek T.**, Kubíčková A., Coufal P.: Mobilization of electroosmotic flow markers in capillary zone electrophoresis. *Electrophoresis* 42 (2021) 932-938.
5. Bartosińska E., Kozlík P., Kubíčková A., Heřt J., Fischer J., **Křížek T.**: Comparison of static and dynamic mode in the electrochemical oxidation of fesoterodine with the use of experimental design approach. *Talanta* 226 (2021) 122141.
6. Boleslavská T., Rychecký O., Krov M., Žvátora P., Dammer O., Beránek O., Kozlík P., **Křížek T.**, Hořínková J., Ryšánek P., Roušarová J., Kutinová Canová N., Šíma M., Slanař O., Štěpánek F.: Bioavailability enhancement and food effect elimination of abiraterone acetate by encapsulation in surfactant-enriched oil marbles. *The AAPS Journal* 22 (2020) 122.
7. Bělonožníková B., Vaverová K., Vaněk T., Kolařík M., Hýsková V., Vaňková R., Dobrev P., **Křížek T.**, Hodek O., Čokrtová K., Štípek A., Ryšlavá H.: Novel insights into the effect of Phythium strains on rapeseed metabolism. *Microorganisms* 8 (2020) 1472.
8. **Křížek T.**, Müllerová R.: Sucrose hydrolysis during the preparation of “dandelion honey”. *Monatshefte für Chemie* 151 (2020) 1231-1234.
9. Kozlík P., Molnárová K., Ječmen T., **Křížek T.**, Goldman R.: Glycan-specific precipitation of glycopeptides in high organic content sample solvents used in HILIC. *Journal of Chromatography B* 1150 (2020) 122196.

10. **Křížek T.**, Kozlík P., Hodek O., Štěpánová E., Nesměrák K.: Lidocaine adsorption to ethylene-vinyl acetate infusion bags decreases its availability in del Nido cardioplegia solution. *Monatshefte für Chemie* 151 (2020) 1217-1223.
11. Boleslavská T., Světlík S., Žvátora P., Bosák J., Dammer O., Beránek J., Kozlík P., **Křížek T.**, Kutinová Canová N., Šíma M., Slanař O., Štěpánek F.: Preclinical evaluation of new formulation concepts for abiraterone acetate bioavailability enhancement based on the inhibition of pH-induced precipitation. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 151 (2020) 81-90.
12. **Křížek T.**, Molnářová K., Pavlů V., Filounová B., Martínková E.: Interaction of heparin and tetraarginine in capillary electrophoresis: implication for analytical applications. *Electrophoresis* 41 (2020) 1826-1831.
13. Hodek O., **Křížek T.**: Determination of short-chain fatty acids in feces by capillary electrophoresis with indirect UV-VIS detection. *Analytical Methods* 11 (2019) 4575-4579.
14. Březina K., Duboué-Dijon E., Palivec V., Jiráček J., **Křížek T.**, Viola C. M., Ganderton T. R., Brzozowski A. M., Jungwirth P.: Can Arginine Inhibit Insulin Aggregation? A Combined Protein Crystallography, Capillary Electrophoresis and Molecular Simulation Study. *Journal of Physical Chemistry B* 122 (2018) 10069-10076.
15. Hodek O., Jans U., Yang L. J., **Křížek T.**: Chlorpyrifos-methyl oxon hydrolysis and its monitoring by HPLC-MS/MS. *Monatshefte für Chemie* 149 (2018) 1515-1519.
16. Taraba L., **Křížek T.**, Kozlík P., Hodek O., Coufal P.: Protonation of polyaniline-coated silica stationary phase affects the retention behavior of neutral hydrophobic solutes in reverse-phased capillary liquid chromatography. *Journal of Separation Science* 41 (2018) 2865-3008.
17. **Křížek T.**, Bursová M., Horsley R., Kuchař M., Tůma P., Čabala R., Hložek T.: Menthol-based hydrophobic deep eutectic solvents: Towards greener and efficient extraction of phytocannabinoids. *Journal of Cleaner Production* 193 (2018) 391-396.
18. Hodek O., **Křížek T.**, Coufal P., Ryšlavá H.: Online screening of alpha-amylase inhibitors by capillary electrophoresis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 410 (2018) 4213-4218.

19. Duboué-Dijon E., Delcroix P., Martinez-Seara H., Hladílková J., Coufal P., **Křížek T.**, Jungwirth P.: Binding of divalent cations to insulin: Capillary electrophoresis and molecular simulations. *Journal of Physical Chemistry B* 122 (2018) 5640-5648.
20. Hložek T., **Křížek T.**, Tůma P., Bursová M., Coufal P., Čabala R.: Quantification of paracetamol and 5-oxoproline in serum by capillary electrophoresis: Implication for clinical toxicology. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 145 (2017) 616-620.
21. Seydlová G., Pohl R., Zborníková E., Ehn M., Šimák O., Panova N., Kolář M., Bogdanová K., Večeřová R., Fišer R., Šanderová H., Vítovská D., Sudzinová P., Pospíšil J., Benada O., **Křížek T.**, Sedlák D., Bartůněk P., Krásný L., Rejman D.: Lipophosphonoxins II: Design, Synthesis, and Properties of Novel Broad Spectrum Antibacterial Agents. *Journal of Medicinal Chemistry* 60 (2017) 6098-6118.
22. **Křížek T.**: Study of polyaniline-coated silica gel as a stationary phase in different modes of capillary liquid chromatography. *Monatshefte für Chemie* 148 (2017) 1605-1611.
23. Hodek O., **Křížek T.**, Coufal P., Ryšlavá H.: Design of experiments for amino acid extraction from tobacco leaves and their subsequent determination by capillary zone electrophoresis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 409 (2017) 2383-2391.
24. Taraba L., **Křížek T.**, Hodek O., Kalíková K., Coufal P.: Characterization of polyaniline-coated stationary phases by using the linear solvation energy relationships in the hydrophilic interaction liquid chromatography mode using capillary liquid chromatography. *Journal of Separation Science* 40 (2017) 677-687.
25. Malý M., **Křížek T.**: Determination of protamine and insulin using short-end injection capillary electrophoresis. *Chromatographia* 79 (2016) 1643-1648.
26. Taraba L., **Křížek T.**, Kubíčková A., Coufal P.: Sample pretreatment for the capillary electrophoretic determination of organic acids in chromium(III) plating baths. *Journal of Separation Science* 38 (2016) 4255-4261.
27. Gawron E. L., **Křížek T.**, Kowalik M. A., Josowicz M., Janata J.: Preparation of a carbon-platinum-polyaniline support for atomic metal deposition. *Journal of The Electrochemical Society* 162 (2015) H432-H427.
28. Ryšlavá H., Valenta R., Hýsková V., **Křížek T.**, Liberda J., Coufal P.: Purification and enzymatic characterization of tobacco leaf beta-N-acetylhexosaminidase. *Biochimie* 107 B (2014) 263-269.

-
29. Martínková E., **Křížek T.**, Coufal P.: Determination of nitrites and nitrates in drinking water using capillary electrophoresis. *Chemical Papers* 68 (2014) 1008-1014.
 30. **Křížek T.**, Kubíčková A., Hladílková J., Coufal P., Heyda J., Jungwirth P.: Electrophoretic mobilities of neutral analytes and electroosmotic flow markers in aqueous solutions of Hofmeister salts. *Electrophoresis* 35 (2014) 617-624.
 31. **Křížek T.**, Doubnerová V., Ryšlavá H., Coufal P., Bosáková Z.: Offline and online capillary electrophoresis enzyme assays of beta-N-acetylhexosaminidase. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 405 (2013) 2425-2434.
 32. Kubíčková A., **Křížek T.**, Coufal P., Vazdar M., Wernersson E., Heyda J., Jungwirth P.: Overcharging in biological systems: Reversal of electrophoretic mobility of aqueous Polyaspartate by multivalent cations. *Physical Review Letters* 18 (2012) 18610.
 33. Wernersson E., Heyda J., Kubíčková A., **Křížek T.**, Coufal P., Jungwirth P.: Counterion condensation in short cationic peptides: Limiting mobilities beyond the Onsager-Fuoss theory. *Electrophoresis* 33 (2012) 981-989.
 34. Kubíčková A., **Křížek T.**, Coufal P., Wernersson E., Heyda J., Jungwirth P.: Guanidinium cations pair with positively charged arginine side chains in water. *Journal of Physical Chemistry Letters* 2 (2011) 1387-1389.
 35. Svobodová A., **Křížek T.**, Širc J., Šálek P., Tesařová E., Coufal P., Štulík K.: Monolithic columns based on a poly(styrene-divinylbenzene-methacrylic acid) copolymer for capillary liquid chromatography of small organic molecules. *Journal of Chromatography A* 1218 (2011) 1544-1547.
 36. Wernersson E., Heyda J., Kubíčková A., **Křížek T.**, Coufal P., Jungwirth P.: Effect of association with sulfate on the electrophoretic mobility of polyarginine and polylysine. *Journal of Physical Chemistry B* 114 (2010) 11934-11941.
 37. **Křížek T.**, Coufal P., Tesařová E., Sobotníková J., Bosáková Z.: Pluronic F-127 as the buffer additive in capillary entangled polymer electrophoresis: Some fundamental aspects. *Journal of Separation Science* 33 (2010) 2458-2464.
 38. Franc M., **Křížek T.**, Coufal P., Štulík K.: Differentiation among various kinds of cheese by identification of casein using HPLC-chip/MS/MS. *Journal of Separation Science* 33 (2010) 2515-2519.

39. Hamplová A., **Křížek T.**, Kubíček V., Bosáková Z., Coufal P.: Comparison of HPLC and CZE methods for analysis of DOTA-like esters - reaction intermediates in synthesis of magnetic resonance contrast agents. *Journal of Separation Science* 33 (2010) 658-663.
40. **Křížek T.**, Breitbach Z. S., Armstrong D. W., Tesařová E., Coufal P.: Separation of inorganic and small organic anions by CE using phosphonium-based mono- and dicationic reagents. *Electrophoresis* 30 (2009) 3955-3963.

5.2 Přehledové články v impaktovaných časopisech

1. **Křížek T.**, Kubíčková A.: Microscale separation methods for enzyme kinetics assays. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 403 (2012) 2185-2195.
2. **Křížek T.**, Coufal P., Bosáková Z., Tesařová E., Sobotníková-Suchánková J.: Fyzikální gely v kapilární gelové elektroforéze a jejich uplatnění v analýze bílkovin. *Chemické listy* 103 (2009) 130-135.

5.3 Jiné články v časopisech

1. **Křížek T.**: Co vše se dá dělat v mikrolitru. Od stanovení anorganických iontů k mikrobiologické analýze. *Živa: Časopis pro popularizaci biologie* 68 (2020) 116-119.
2. Hořínková J., Kozlík P., **Křížek T.**, Michaličková D., Šíma M., Slanař O.: Post-mortem redistribution of alprazolam in rats. *Prague Medical Report* 121 (2020) 244-253.

5.4 Překlad odborné knihy

1. Skoog D. A., West D. M., Holler F. J., Crouch S. R.: *Analytická chemie*, VŠCHT Praha, 2019, kap. 30-34.

LITERATURA

- [1] Skoog, D. A., Holler, F.J., Crouch, S. R.: *Principles of Instrumental Analysis*, 6th edition, Brooks/Cole, Cengage Learning, Belmont, 2007, kap. 30C.
- [2] Kašička, V.: Teoretické základy a separační principy kapilárních elektromigračních metod. *Chemické listy* 91 (1997) 320-329.
- [3] Matsubara, N., Terabe, S.: Micellar electrokinetic chromatography. *High Resolution Separation and Analysis of Biological Macromolecules Part A* 270 (1996) 319-341.
- [4] Snopek, J., Jelínek, I., Smolková-Keulemansová, E.: Chiral separations by electromigration methods. *Journal of Chromatography* 609 (1992) 1-17.
- [5] Riviello, J. M., Harrold, M. P.: Capillary electrophoresis of inorganic cations and low-molecular-mass amines using a copper-based electrolyte with indirect UV detection. *Journal of Chromatography A* 652 (1993) 385-392.
- [6] Takeo, K.: Advances in affinity electrophoresis. *Journal of Chromatography A* 698 (1995) 89-105.
- [7] Dolnik, V.: Capillary gel electrophoresis. *Journal of Microcolumn Separations* 6 (1994) 315-330.
- [8] Pritchett, T. J.: Capillary isoelectric focusing. *Electrophoresis* 17 (1996) 1195-1201.
- [9] Hjalmarsson, S. G., Baldesten, A.: Capillary isotachopheresis. *CRC Critical Reviews in Analytical Chemistry* 11 (1981) 261-352.
- [10] Geiser, L., Veuthey, J. L.: Non-aqueous capillary electrophoresis 2005-2008. *Electrophoresis* 30 (2009) 36-49.
- [11] Atkins, P., de Paula, J.: *Physical Chemistry*, 8th ed., W. H. Freeman, New York 2006, s. 1103.
- [12] Skoog, D. A., Holler, F.J., Crouch, S. R.: *Principles of Instrumental Analysis*, 6th edition, Brooks/Cole, Cengage Learning, Belmont, 2007, kap. 30B-3.
- [13] Lauer, H. H., Rozing, G. P. (eds): *High Performance Capillary Electrophoresis: A Primer*. Agilent Technologies, Waldbronn, 2014, kap. 1.3.2.
- [14] Tavares, M. F. M., Colombara, R., Massaro, R.: Modified electroosmotic flow by cationic surfactant additives in capillary electrophoresis - Evaluation of electrolyte systems for anion analysis. *Journal of Chromatography A* 772 (1997) 171-178.

-
- [15] Katayama, H., Ishihama, Y., Asakawa, N.: Stable capillary coating with successive multiple ionic polymer layers. *Analytical Chemistry* 70 (1998) 2254-2260.
- [16] Malijeviský, A.: *Physical Chemistry in Brief*, VŠCHT Praha, 2005, odd. 10.3.3.
- [17] Šlampová, A., Malá, Z., Gebauer, P.: Recent progress of sample stacking in capillary electrophoresis (2016-2018). *Electrophoresis* 40 (2019) 40-54.
- [18] Vyhláška č. 252/2004 Sb., kterou se stanoví hygienické požadavky na pitnou a teplou vodu a četnost a rozsah kontroly pitné vody.
- [19] Fukushi, K., Nakayama, Y., Tsujimoto, J.: Highly sensitive capillary zone electrophoresis with artificial seawater as the background electrolyte and transient isotachopheresis as the on-line concentration procedure for simultaneous determination of nitrite and nitrate in seawater. *Journal of Chromatography A* 1005 (2003) 197-205.
- [20] Tanaka, Y., Naruishi, N., Fukuya, H., Sakata, J., Saito, K., Wakida, S.: Simultaneous determination of nitrite, nitrate, thiocyanate and uric acid in human saliva by capillary zone electrophoresis and its application to the study of daily variations. *Journal of Chromatography A* 1051 (2004) 193-197.
- [21] Öztekin, N., Nutku, M. S., Erim, F. B.: Simultaneous determination of nitrite and nitrate in meat products and vegetables by capillary electrophoresis. *Food Chemistry* 76 (2002) 103-106.
- [22] Martínez, V., García, N., Antigüedad, I., Alonso, R. M., Jiménez, R. M.: Capillary electrophoresis as a useful tool for the analysis of chemical tracers applied to hydrological systems. *Journal of Chromatography A* 1032 (2004) 237-242.
- [23] Glatz, Z.: On-capillary derivatisation as an approach to enhancing sensitivity in capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 36 (2015) 774-763.
- [24] Zhang, J., Hoogmartens, J., van Schepdael, A.: Recent developments and applications of EMMA in enzymatic and derivatization reactions. *Electrophoresis* 31 (2010) 65-73.
- [25] Petrov, A., Okhonin, V., Berezovski, M., Krylov, S. N.: Kinetic capillary electrophoresis (KCE): A conceptual platform for kinetic homogeneous affinity methods. *Journal of the American Chemical Society* 127 (2005) 17104-17110.
- [26] Lüllmann, H., Mohr, K., Wehling, M.: *Farmakologie a toxikologie. Překlad 15., zcela přepracovaného vydání*. Grada, Praha 2004.

-
- [27] Kaushansky, K., Lichtman, M. A., Prchal, J., Levi, M. M., Press, O., Burns, L., Caligiuri, M.: *Williams Hematology*. 9th ed., McGraw Hill Education, New York 2016.
- [28] Abramova, N., Bratov, A.: Monitoring protamine-heparin interactions using microcapillary impedimetric sensor. *Electroanalysis* 27 (2015) 663-669.
- [29] Raja, M. M. M., Raja, A., Imran, M. M., Santha, A. M. I., Devasena, K.: Enzymes application in diagnostic prospects. *Biotechnology* 10 (2011) 51-59.
- [30] Thomason M. J., Lord, J., Bain, M. D., Chalmers, R. A., Littlejohns, P., Addison, G. M., Wilcox, A. H., Seymour, C. A.: A systematic review of evidence for the appropriateness of neonatal screening programmes for inborn errors of metabolism. *Journal of Public Health Medicine* 20 (1998) 331-343.
- [31] Zhao, Y., Liu, H., Riker, A. I., Fodstat, O., Ledoux, S. P., Wilson, G. L., Tan, M.: Emerging metabolic targets in cancer therapy. *Frontiers in Bioscience-Landmark* 16 (2011) 1844-1860.
- [32] Okhonin, V., Liu, X., Krylov, S. N.: Transverse diffusion of laminar flow profiles to produce capillary nanoreactors. *Analytical Chemistry* 77 (2005) 5925-5929.
- [33] Okhonin, V., Wong, E., Krylov, S. N.: Mathematical model for mixing reactants in a capillary microreactor by transverse diffusion of laminar flow profiles. *Analytical Chemistry* 80 (2008) 7482-7486.
- [34] Wong, E., Okhonin, V., Berezovski, M. V., Nozaki, T., Waldmann, H., Alexandrov, K., Krylov, S. N.: "Inject-Mix-React-Separate-and-Quantitate" (IMReSQ) method for screening enzyme inhibitors. *Journal of the American Chemical Society* 130 (2008) 11862-11863.
- [35] Plíhal, O., Sklenář, J., Kmoníčková, J., Man, P., Pompach, P., Havlíček, V., Křen, V., Bezouška, K.: N-glycosylated catalytic unit meets O-glycosylated propeptide: Complex protein architecture in a fungal hexosaminidase. *Biochemical Society Transactions* 32 (2004) 764-765.
- [36] Slámová, K., Bojarová, P., Petrásková, L., Křen, V.: beta-N-Acetylhexosaminidase: What's in a name...? *Biotechnology Advances* 28 (2010) 682-693.

- [37] Plíhal, O., Sklenář, J., Hofbauerová, K., Novák, P., Man, P., Pompach, P., Kavan, D., Ryšlavá, H., Weignerová, L., Charvátová-Pišvejcová, A., Křen, V., Bezouška, K.: Large propeptides of fungal beta-N-acetylhexosaminidases are novel enzyme regulators that must be intracellularly processed to control activity, dimerization, and secretion into the extracellular environment. *Biochemistry* 46 (2007) 2719-2734.
- [38] Ettrich, R., Kopecký, V., Hofbauerová, K., Baumruk, V., Novák, P., Pompach, P., Man, P., Plíhal, O., Kutý, M., Kulik, N., Sklenář, K., Ryšlavá, H., Křen, V., Bezouška, K.: Structure of the dimeric N-glycosylated form of fungal beta-N-acetylhexosaminidase revealed by computer modeling, vibrational spectroscopy, and biochemical studies. *BMC Structural Biology* 7 (2007) 32.
- [39] Krylov, S. N.: *TDLFP program*, dostupné na URL: < <http://www.yorku.ca/skrylov/resources.html> > [cit. 7. 9. 2021]
- [40] Kawahara, K.: Evaluation of diffusion coefficients of proteins from sedimentation boundary curves. *Biochemistry* 8 (1969) 2551-2557.
- [41] Rodwell, V. W., Kennelly, P. J.: *Harper's Illustrated Biochemistry, 26th edition*, McGraw-Hill, London, 2003, p. 474.
- [42] World Health Organization: *Global Report on Diabetes*, World Health Organization, 2016, p. 8.
- [43] Erickson, M. L., Jenkins, N. T., McCully, K. K.: Exercise after You Eat: Hitting the Postprandial Glucose Target. *Frontiers in Endocrinology* 8 (2017) 228.
- [44] Hemalatha, P., Bomzan, D. P., Rao, B. V. S., Sreerama, Y. N.: Distribution of phenolic antioxidants in whole and milled fractions of quinoa and their inhibitory effects on alpha-amylase and alpha-glucosidase activities. *Food Chemistry* 199 (2016) 330-338.
- [45] Liu, X., Zhu, L., Tan, J., Zhou, X., Xiao, L., Yang, X.: Glucosidase inhibitory activity and antioxidant activity of flavonoid compound and triterpenoid compound from *Agrimonia Pilosa* Ledeb: *BMC Complementary and Alternative Medicine* 14 (2014) 12.
- [46] Kuczmannová, A., Balažová, A., Račanská, E., Kameníková, M., Fialová, S., Majerník, J.: *Agrimonia eupatoria* L. and *Cynara cardunculus* L. Water Infusions: Comparison of Anti-Diabetic Activities. *Molecules* 21 (2016) 564.
- [47] Herrero-Martinez, J. M., Schoenmakers, P. J., Kok, W. T.: Determination of the amylose-amylopectin ratio of starches by iodine-affinity capillary electrophoresis.

- Journal of Chromatography A* 1053 (2004) 227-234.
- [48] Aghajari, N., Feller, G., Gerday, C., Haser, R.: Structural basis of alpha-amylase activation by chloride. *Protein Science* 11 (2002) 1435-1441.
- [49] Skoog, D. A., Holler, F.J., Crouch, S. R.: *Principles of Instrumental Analysis*, 6th edition, Brooks/Cole, Cengage Learning, Belmont, 2007, kap. 26.
- [50] Krijt, J., Sokolová, J., Šilhavý, J., Mlejnek, P., Kubovčíak, J., Liška, F., Malínská, H., Hüttl, M., Marková, I., Křížková, M., Stipanuk, M. H., Křížek, T., Ditroi, T., Nagy, P., Kožich, V., Pravenec, M.: High cysteine diet reduces insulin resistance in SHR-CRP rats. *Physiological Research* (2021) dostupné online.
- [51] Skoog, D. A., West, D. M., Holler, F.J., Crouch, S. R.: *Fundamentals of Analytical Chemistry*, 9th edition, Brooks/Cole, Cengage Learning, Belmont, 2014, kap. 31E.
- [52] Lauer, H. H., Rozing, G. P. (eds): *High Performance Capillary Electrophoresis: A Primer*. Agilent Technologies, Waldbronn, 2014, kap. 1.
- [53] Křížek, T., Kozlík, P., Hodek, O., Štěpánová, E., Nesměrák, K.: Lidocaine adsorption to ethylene-vinyl acetate infusion bags decreases its availability in del Nido cardioplegia solution. *Monatshefte für Chemie* 151 (2020) 1217-1223.
- [54] Skoog, D. A., West, D. M., Holler, F.J., Crouch, S. R.: *Fundamentals of Analytical Chemistry*, 9th edition, Brooks/Cole, Cengage Learning, Belmont, 2014, kap. 24C-1.
- [55] Opekar, F., Tůma, P.: Dialysis of one sample drop on-line connected with electrophoresis in short capillary. *Talanta* 219 (2020) 121252.
- [56] Opekar, F., Tůma, P.: Dual-channel capillary electrophoresis for simultaneous determination of cations and anions. *Journal of Chromatography A* 1446 (2016) 158-163.
- [57] Opekar, F., Coufal, P., Štulík, K.: Rapid Capillary Zone Electrophoresis Along Short Separation Pathways and Its Use in Some Hyphenated Systems: A Critical Review. *Chemical Reviews* 109 (2009) 4487-4499.
- [58] Glatz, Z.: Application of short-end injection procedure in CE. *Electrophoresis* 34 (2013) 631-642.
- [59] Norrman, M., Hubalek, F., Schluckebier, G.: Structural characterization of insulin NPH formulations. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 30 (2007) 414-423.
- [60] Chan, J., Thompson, J., Gill, T.: Quantitative-determination of protamines by Coomassie-blue-G assay. *Analytical Biochemistry* 226 (1995) 191-193.

-
- [61] Kim, S., Kang, T., Cho, H., Choi, M., Cha, G., Nam, H.: Determination of protamine using microtiter plate-format optodes. *Analytica Chimica Acta* 439 (2001) 47-53.
- [62] Hvass, A., Skelbaek-Pedersen, B.: Determination of protamine peptides in insulin drug products using reversed phase high performance liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 37 (2005) 551-557.
- [63] Gill, T., Singer, D., Thompson, J.: Purification and analysis of protamine. *Process Biochemistry* 41 (2006) 1875-1882.
- [64] Hirokado, M., Shimamura, Y., Nakajima, K., Ozawa, H., Kimura, K., Yasuda, K., Nishijima, M.: Methods for determination of milt protein and epsilon-polylysine in food additive preparations and processed foods by capillary zone electrophoresis. *Journal of the Food Hygienic Society of Japan* 42 (2001) 79-83.
- [65] Lamalle, C., Servais, A. C., Demelenne, A., Crommen, J., Fillet, M.: Analysis of protamine peptides in insulin pharmaceutical formulations by capillary electrophoresis. *Journal of Separation Science* 39 (2016) 1189-1194.
- [66] Fišar, Z.: Fytokanabinoidy. *Chemické Listy* 100 (2006) 233-242.
- [67] Hložek, T., Uttl, L., Kadeřábek, L., Balíková, M., Lhotková, E., Horsley, R. R., Nováková, P., Šichová, K., Štefková, K., Tylš, F., Kuchař, M., Páleníčke, T.: Pharmacokinetic and behavioural profile of THC, CBD, and THC plus CBD combination after pulmonary, oral, and subcutaneous administration in rats and confirmation of conversion in vivo of CBD to THC. *European Neuropsychopharmacology* 27 (2017) 1223-1237.
- [68] Smith, R. N., Vaughan, C. G.: High-pressure liquid-chromatography of cannabis quantitative-analysis of acidic and neutral cannabinoids. *Journal of Chromatography* 129 (1976) 347-354.
- [69] Gul, W., Ful, S. W., Radwan, M. M., Wanas, A. S., Mehmedic, Z., Khan, I. I., Sharaf, M. H. M., ElSohly, M. A.: Determination of 11 Cannabinoids in Biomass and Extracts of Different Varieties of Cannabis Using High-Performance Liquid Chromatography. *Journal of AOAC International* 98 (2015) 1523-1528.
- [70] Abbott, A. P., Capper, G., Davies, D. L., Rasheed, R. K., Tambyrajah, V.: Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures. *Chemical Communications* 1 (2003) 70-71.

-
- [71] Zainal-Abidin, M. H., Hayyan, M., Hayyan, A., Jayakumar, N. S.: New horizons in the extraction of bioactive compounds using deep eutectic solvents: A review. *Analytica Chimica Acta* 979 (2017) 1-23.
- [72] Ribeiro, B. D., Florindo, C., Iff, L. C., Coelho, M. A. Z., Marrucho, I. M.: Menthol-based Eutectic Mixtures: Hydrophobic Low Viscosity Solvents. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* 3 (2015) 2469-2477.
- [73] Rainelli, A., Hauser, P. C.: Fast electrophoresis in conventional capillaries by employing a rapid injection device and contactless conductivity detection. *Analytica and Bioanalytical Chemistry* 382 (2005) 789-794.
- [74] Tůma, P., Málková, K., Samcová, E., Štulík, K.: Rapid monitoring of mono- and disaccharides in drinks, foodstuffs and foodstuff additives by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection. *Analytica Chimica Acta* 698 (2011) 1-5.
- [75] Zinaková, J., Vaishar, A., Gezova, V.: Traditional collection of wild plants as support for weak regions. In: Skarpa, P., Ryant, P., Cerkal, R., Polak, O., Kovarnik, J., Vyskocil, I. (eds.) MENDELNET 2012 Mendel Univ. Brno, p. 714.
- [76] Topping, D. L., Clifton, P. M.: Short-chain fatty acids and human colonic function: Roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiological Reviews* 81 (2001) 1032-1064.
- [77] Pryde, S. E., Duncan, S. H., Hold, G. L., Steward, C. S., Flint, H. J.: The microbiology of butyrate formation in the human colon. *FEMS Microbiology Letters* 217 (2002) 133-139.
- [78] Azevedo, M. S., Pirassol, G., Fett, R., Micke, G. A., Vitali, L., Oliveira Costa, A. C.: Screening and determination of aliphatic organic acids in commercial Brazilian sugarcane spirits employing a new method involving capillary electrophoresis and a semi-permanent adsorbed polymer coating. *Food Research International* 60 (2014) 123-130.
- [79] Štěpánová, S., Kašička, V.: Capillary electrophoretic methods applied to the investigation of peptide complexes. *Journal of Separation Science* 38 (2015) 2708-2721.
- [80] Ušelová-Včeláková, K., Zusková, I., Gaš, B.: Stability constants of amino acids, peptides, proteins, and other biomolecules determined by CE and related methods: Recapitulation of published data. *Electrophoresis* 28 (2007) 2145-2152.

-
- [81] Hellqvist, A., Hedeland, Y., Pettersson, C.: Evaluation of electroosmotic markers in aqueous and nonaqueous capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 34 (2013) 3252-3259.
- [82] Wang, W., Zhou, F., Zhao, L., Zhang, J.-R., Zhu, J.-J.: Measurement of electroosmotic flow in capillary and microchip electrophoresis. *Journal of Chromatography A* 1170 (2007) 1-8.
- [83] Kubíčková, A., Křížek, T., Coufal, P., Vazdar, M., Wernersson, E., Heyda, J., Jungwirth P.: Overcharging in Biological Systems: Reversal of Electrophoretic Mobility of Aqueous Polyaspartate by Multivalent Cations. *Physical Review Letters* 108 (2012) 186101.
- [84] Wernersson, E., Heyda, J., Kubíčková, A., Křížek, T., Coufal, P., Jungwirth, P.: Counterion condensation in short cationic peptides: Limiting mobilities beyond the Onsager-Fuoss theory. *Electrophoresis* 33 (2012) 981-989.
- [85] Kubíčková, A., Křížek, T., Coufal, P., Wernersson, E., Heyda, J., Jungwirth, P.: Guanidinium Cations Pair with Positively Charged Arginine Side Chains in Water. *Journal of Physical Chemistry Letters* 2 (2011) 1387-1389.
- [86] Wernersson, E., Heyda, J., Kubíčková, A., Křížek, T., Coufal, P., Jungwirth, P.: Effect of Association with Sulfate on the Electrophoretic Mobility of Polyarginine and Polylysine. *Journal of Physical Chemistry B* 114 (2010) 11934-11941.
- [87] Chatterjee, S. K., Prokopová, E., Bohdanecký, M.: Electrophoretic and viscometric studies of interactions of polymethacrylamide and polyacrylamide with electrolytes in aqueous-solutions. *European Polymer Journal* 14 (1978) 665-670.
- [88] Ehala, S., Dybal, J., Makrlík, E., Kašička, V.: Capillary affinity electrophoresis and ab initio calculation studies of valinomycin complexation with Na⁺ ion. *Journal of Separation Science* 32 (2009) 597-604.
- [89] Müllerová, L., Dubský, P., Svobodová, J., Gaš, B.: Determination of effective mobilities of EOF markers in BGE containing sulfated beta-cyclodextrin by a two-detector method. *Electrophoresis* 34 (2013) 769-776.
- [90] Atkins, P., de Paula, J.: *Physical Chemistry*, 8th ed., W. H. Freeman, New York 2006.

PŘÍLOHY

- Příloha I Martínková, E., Křížek, T., Coufal, P.: Determination of nitrites and nitrates in drinking water using capillary electrophoresis. *Chemical Papers* 68 (2014) 1008-1014.
- Příloha II Křížek, T., Molnárová, K., Pavlů, V., Filounová, B., Martínková, E.: Interaction of heparin and tetraarginine in capillary electrophoresis: Implication for analytical applications. *Electrophoresis* 41 (2020) 1816-1831.
- Příloha III Křížek, T., Doubnerová, V., Ryšlavá, H., Coufal, P., Bosáková, Z.: Offline and online capillary electrophoresis enzyme assays of β -N-acetylhexosaminidase. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 405 (2013) 2425-2434.
- Příloha IV Hodek, O., Křížek, T., Coufal, P., Ryšlavá, H.: Online screening of α -amylase inhibitors by capillary electrophoresis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 410 (2018) 4213-4218.
- Příloha V Malý, M., Křížek, T.: Determination of protamine and insulin using short-end injection capillary electrophoresis. *Chromatographia* 79 (2016) 1643-1648.
- Příloha VI Křížek, T., Bursová, M., Horsley, R., Kuchař, M., Tůma, P., Čabala, R., Hložek, T.: Menthol-based hydrophobic deep eutectic solvents: Towards greener and efficient extraction of phytocannabinoids. *Journal of Cleaner Production* 193 (2018) 391-396.
- Příloha VII Křížek, T., Müllerová, R.: Sucrose hydrolysis during the preparation of "dandelion honey". *Monatshefte für Chemie* 151 (2020) 1231-1234.
- Příloha VIII Hodek, O., Křížek, T.: Determination of short-chain fatty acids in feces by capillary electrophoresis with indirect UV-VIS detection. *Analytical Methods* 11 (2019) 4575-4579.
- Příloha IX Křížek, T., Kubíčková, A., Hladílková, J., Coufal, P., Heyda, J., Jungwirth, P.: Electrophoretic mobilities of neutral analytes and electroosmotic flow markers in aqueous solutions of Hofmeister salts. *Electrophoresis* 35 (2014) 617-624.
- Příloha X Martínková, E., Křížek, T., Kubíčková, A., Coufal, P.: Mobilization of electroosmotic flow markers in capillary zone electrophoresis. *Electrophoresis* 42 (2021) 932-938.
- Příloha XI Čokrtová, K., Křížek, T., Kubíčková, A., Coufal, P.: Effect of background electrolyte anions on markers of electroosmotic flow in capillary electrophoresis. *Monatshefte für Chemie* 152 (2021) 1061-1065.