

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra analytické chemie

**VYUŽITÍ KAPILÁRNÍCH ELEKTROFORETICKÝCH
METOD V ANALÝZE BIOLOGICKY AKTIVNÍCH
LÁTEK V ČESKÉ REPUBLICE 2001-2005**

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce:
Vedoucí katedry:

DOC. RNDr. Marie Pospíšilová, Csc.
Doc. RNDr. Petr Solich, CSc.

Hradec Králové 2006

Martina Novotná

Ráda bych poděkovala všem, kteří mi pomáhali při vypracování bakalářské práce, zejména však své školitelce, Doc.Marii Pospíšilové, za cenné rady, ochotu a trpělivost.

OBSAH

1. ÚVOD	5
2. CÍL BAKALÁŘSKÉ PRÁCE	6
3. TEORETICKÁ ČÁST	7
3.1 ELEKTROFORETICKÉ METODY.....	7
3.1.1 Kapilární zónová elektroforéza.....	7
3.1.1.1 Princip.....	7
3.1.2 Izotachoforéza.....	9
3.1.3 Micelární elektrokinetická chromatografie.....	11
3.1.4 Kapilární elektrochromatografie.....	12
3.1.5 Izoelektrická fokusace.....	12
3.2 INSTRUMENTACE.....	13
3.2.1 Kapiláry.....	13
3.2.2 Detekce.....	14
4. METODICKÁ ČÁST	15
5. VÝSLEDKY	16
6. DISKUZE	39
6.1 Analyty.....	39
6.2 Použité CE metody.....	39
6.3 Seznam pracovišť v ČR využívající CE metody.....	40
6.4 Použitá instrumentace.....	44
6.4.1 Kapiláry.....	44
6.4.2 Přístrojové vybavení.....	44
6.4.3 Detekce.....	44

7. ZÁVĚR.....	45
8. KLÍČOVÁ SLOVA.....	46
9. POUŽITÉ ZKRATKY A SYMBOLY.....	47
10. POUŽITÁ LITERATURA.....	50

1. ÚVOD

Elektroforetické migrační metody jsou separační metody založené na putování (migraci) nabitých částic v elektrickém poli, jehož intenzita je hybnou silou, která uvádí částice do pohybu definovaným směrem. Toto elektrické pole se vytváří vkládáním konstantního stejnosměrného napětí mezi dvě elektrody [1]. Brzdivou silou, která působí na pohyb částic, je tření v kapalném prostředí, které je podmíněné jeho viskozitou. Lze tedy separovat látky povahy elektrolytů, tj. ionty, nízkomolekulární či vysokomolekulární látky, a systémy elektricky nabitých koloidních částic. Migračním prostředím je roztok elektrolytů, který může být buď náplní kolony nebo je uspořádán plošně [2]. Rychlost pohybu jednotlivých iontů závisí na jejich náboji a velikosti. To znamená, že každý ion, v závislosti na uvedených faktorech, migruje v elektrickém poli rozdílnou rychlostí. Díky tomu se jednotlivé složky separované směsi rozdělí do zón, které se následně detekují vhodným detekčním systémem.

V dnešní době se tyto metody dostávají do popředí jako alternativa jiných separačních metod, jakou je např. HPLC, a to zejména díky vysoké selektivitě, separační účinnosti, citlivosti a nebo rychlosti. Nacházejí také uplatnění ve farmaceutickém průmyslu při separaci optických izomerů.

Pro potřeby této práce za biologicky aktivní látky považujeme takové látky, které pozitivně nebo i negativně ovlivňují fyziologické pochody v lidském organismu. Jedná se především o látky syntetické povahy, jako např. léčiva, dále pak o produkty rostlinného původu, rostlinné extrakty, např. flavonoidy nebo námelové alkaloidy, v menší míře pak aminokyseliny či enzymaticky aktivní látky (viz. tabulky. č.2-6).

2. CÍL BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Cílem bakalářské práce bylo na základě studia literatury vytvořit přehled elektroforetických metod používaných v analýzách biologicky aktivních látek v České republice za období 2001-2005 včetně zhodnocení řešené problematiky, použité instrumentace, způsobů detekce a vytvoření seznamu základních pracovišť a výzkumných týmů, které se touto problematikou zabývají.

3. *TEORETICKÁ ČÁST*

3.1 *ELEKTROFORETICKÉ METODY*

3.1.1 *Kapilární zónová elektroforéza (CZE)*

Kapilární zónová elektroforéza je v dnešní době velmi rozšířená díky jednoduchosti provedení a širokém rozsahu použití. CZE využívá tři transportních jevů – elektroforetické migrace iontů v elektrickém poli, elektroosmotického a hydrodynamického toku kapilárou.

3.1.1.1 *Princip*

Kapilární zónová elektroforéza probíhá v systému základního elektrolytu (BGE), který v CZE hraje klíčovou úlohu, protože jeho složení, zejména pH, určuje migrační chování analytů. Analyty (nabité částice) se dělí na základě svých rozdílných elektroforetických pohyblivostí. Elektroforetická pohyblivost u iontu je rychlost, s jakou se částice v roztoku pohybuje vlivem elektrického pole. Je definována jako

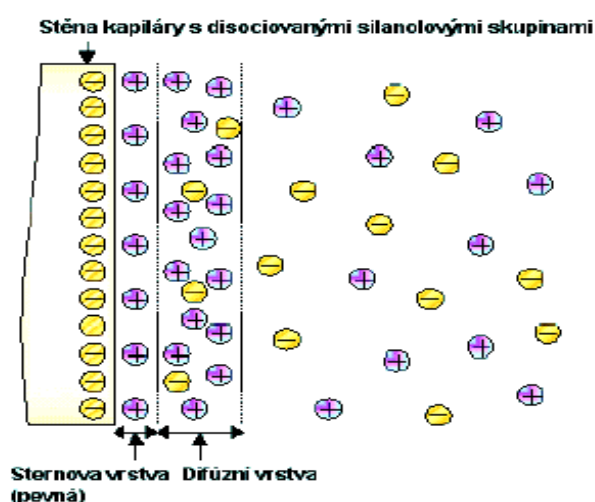
$$u = \frac{v}{E} \quad (3.1)$$

Každý ion je charakterizován svou absolutní pohyblivostí, která popisuje jeho pohyb v nekonečně zředěném roztoku. V reálném roztoku však dochází k vzájemným interakcím mezi ionty. Skutečná pohyblivost nabitých částic v reálném roztoku je pak vyjádřena ve formě tzv. efektivní pohyblivosti u_{ef} , která vykazuje nižší hodnoty než absolutní. Efektivní pohyblivost silných elektrolytů můžeme považovat za stálou, naproti tomu u slabých elektrolytů je závislá na stupni disociace α :

$$u_{ef} = u \alpha. \quad (3.2)$$

Pokud se jednotlivé analyty dostatečně liší svými elektroforetickými pohyblivostmi, rozdělí se v základním elektrolytu do samostatných zón, které putují konstantní rychlostí.

Pohyb roztoku směrem k detektoru je vyvolán tzv. elektroosmotickým tokem (elektroosmóza, EOF), který vzniká v kapiláře jako následek vložení konstantního napětí mezi elektrody na koncích kapiláry. V kapilárách z taveného křemene naplněných roztokem elektrolytu dochází v závislosti na pH tohoto elektrolytu k disociaci křemičitanových skupin ($-\text{SiOH}$) na vnitřní stěně kapiláry. Touto disociací pak na stěně kapiláry vzniká záporný náboj. Ke stěně je pak přitažena vrstva kovových iontů základního elektrolytu a tím vzniká stabilní elektrická dvojvrstva (tzv. Sternova vrstva)[1]. Kationty, které se nacházejí ve středu kapiláry vytvářejí tzv. difúzní vrstvu. U většiny používaných základních elektrolytů je EOF signifikantně větší než elektroforetické pohyblivosti jednotlivých iontů, což umožňuje současnou separaci kationtů i aniontů v jednom experimentu, které během analýzy putují jedním směrem, ke katodě.



Obr. 1: Schematické znázornění elektrické dvojvrstvy podle Sternova modelu[3]

Pohyblivost elektroosmotického toku lze vyjádřit rovnicí:

$$\mu_{EOF} = \frac{\varepsilon \xi}{4\pi\eta r}, \quad (3.3)$$

kde μ_{EOF} je pohyblivost elektroosmotického toku a ε permitivita základního elektrolytu. Z této rovnice je tedy zřejmé, že EOF je ovlivněn nejen vlastnostmi základního elektrolytu, ale i poloměrem kapiláry. Elektroosmózu je třeba často regulovat a to prostřednictvím experimentálních podmínek, při kterých daný pokus probíhá. Regulací EOF můžeme dosáhnout např. lepšího rozlišení nebo zkrácení separačních časů.

3.1.2 Izotachofórzeza (ITP)

Izotachofórzeza je elektroseparační metoda, která na rozdíl od zónové elektroforézy neprobíhá v jediném základním elektrolytu, ale v nespojitě soustavě dvou elektrolytů (tj. operační systém), kterými jsou vedoucí elektrolyt (LE) a koncový elektrolyt (TE). LE obsahuje ionty, jejichž efektivní pohyblivost je oproti iontům vzorku vyšší a naproti tomu ionty TE elektrolytu mají efektivní pohyblivost nižší.

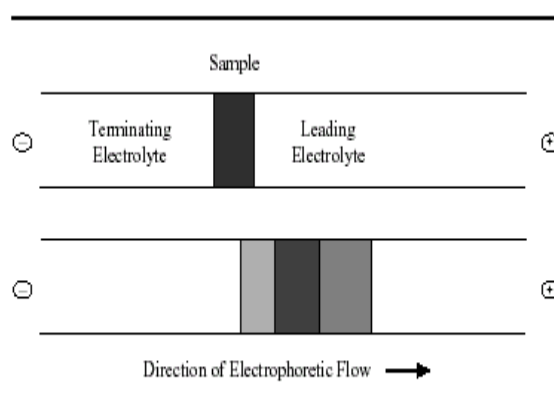
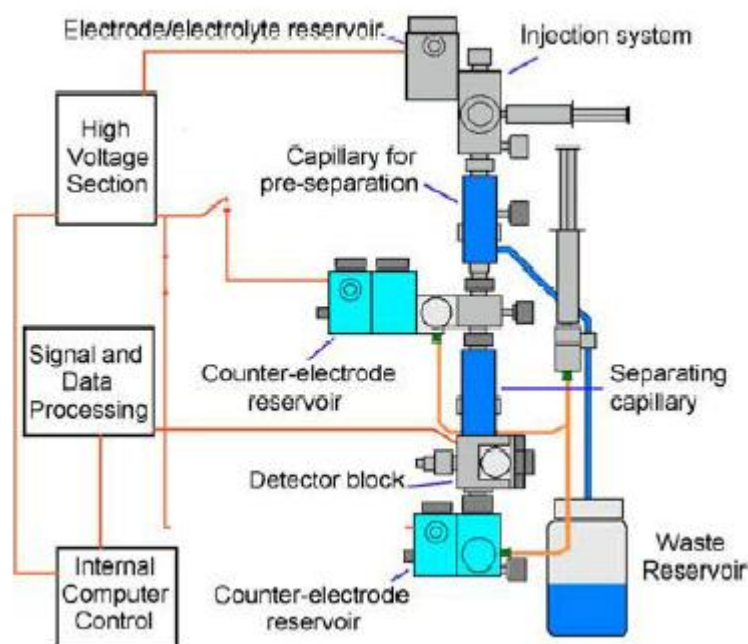


Figure 13. Anionic Isotachopheresis

Obr. Č.2: Schéma operačního systému [4]

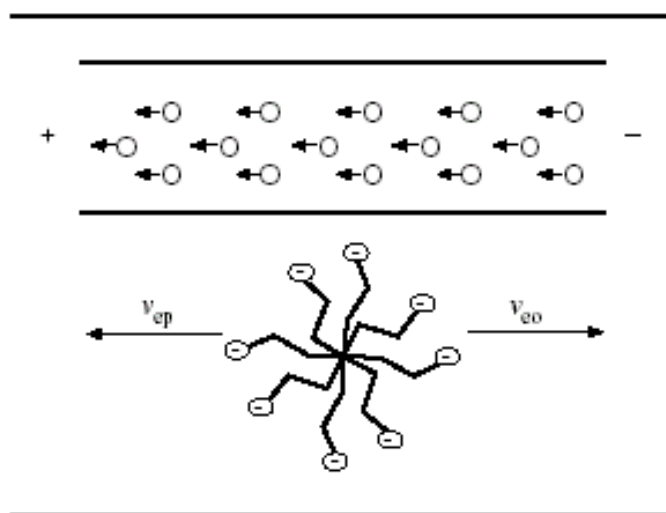
Kromě separovaných iontů jsou v systému obsaženy i opačně nabitě protionty, jejichž přítomnost je podmínkou zachování elektroneutality v zónách [1]. Jejich funkce spočívá v kompenzaci náboje dělených iontů, dále mají pufrací účinek a určují pH migračního prostředí [2]. Pro izotachofórezu jsou typická ostrá zónová rozhraní, která jsou výsledkem tzv. samozaostřovacího efektu. Tento efekt je dán nespojitou hodnotou intenzity elektrického pole. Během jednoho experimentu nelze současně separovat kationty a anionty. Proto ITP dělíme na kationtovou a aniontovou. Průběh ITP lze rozdělit do dvou fází. V první fázi složky putují rozdílnou rychlostí. Ve druhé fázi (tj. v ustáleném stavu) jsou již složky od sebe odděleny a jednotlivé zóny se pohybují stejnou rychlostí. Koncentrace iontu uvnitř zóny je konstantní [1]. Charakteristické jsou diskontinuální změny řady parametrů, které se mění od zóny k zóně skokem: intenzita pole, elektrický odpor, koncentrace, teplota, optické vlastnosti, pH [5]. Roztok vzorku se vnáší do oblasti mezi vedoucí a koncový elektrolyt.



Obr.č.3: Schematické znázornění ITP systému [6]

3.1.3 Micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC)

Micelární elektrokinetická chromatografie byla vyvinuta pro separaci nenabitých částic [1]. Pracovní elektrolyt obsahuje ionogenní smáčedlo v takové koncentraci (kritická micelární koncentrace), při které vznikají micely. Na povrchu micely jsou uloženy hydrofilní (polární) části molekul ionogenního smáčedla, uvnitř jsou naopak části hydrofobní, které tvoří pseudostacionární fázi. Analyt vstupuje do hydrofobního jádra micely v takovém množství, které lze vyjádřit rozdělovacím koeficientem. Mezi nejčastější smáčedla patří dodecylsulfát sodný (SDS) a cetyltrimethylamonium-bromid (kationtový surfaktant). Micely SDS nesou záporný náboj a putují proti EOF, který je při vysokém pH BGE dostatečně silný na to, aby je unášel směrem k detektoru [1].



Obr.č.4: Schéma putování micel proti elektroosmotickému toku [2]

Retenční čas t_R pro neutrální složky se vždy nachází mezi hodnotami t_0 a t_{mc} , kde

t_0retenční čas neutrálního inertu, který není zadržován pseudostacionární fází

t_{mc}retenční čas micel.

Látky, které jsou micelami zadržovány více mají retenční časy delší a naopak. Extrémně hydrofobní sloučeniny mohou být zcela zahrnuty do micel, a proto mohou být detekovány při t_{mc} . [1]

3.1.4 Kapilární elektrochromatografie (CEC) [5]

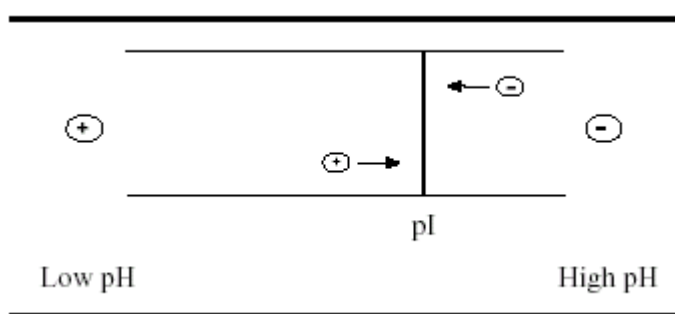
CEC je moderní a velmi rychle rozvíjející se metoda. Jedná se o hybridní technologii, která kombinuje selektivitu HPLC a vysokou účinnost kapilární elektroforézy a možnost miniaturizace. Tok mobilní fáze je způsoben elektroosmotickým tokem, který je vyvolán vložím elektrického pole. Dochází k separaci složek na stejném principu jako u HPLC (separace na obrácených fázích, na normálních fázích, gelová permeační chromatografie atd.). Kapilára je naplněna mikročásticemi, které okolo sebe vytváří iontovou atmosféru.

CEC je separační metoda, kterou lze využít jak pro separaci neutrálních částic, tak i pro separaci nabitých částic různé chemické povahy. Její předností je vysoká rychlost separace a nízká spotřeba rozpouštědla.

3.1.5 Izoelektrická fokusace (IEF) [5]

Izoelektrická fokusace se využívá k dělení amfolytů (např. aminokyseliny, peptidy, proteiny). Amfolyty obsahují kladnou i zápornou skupinu, a proto můžou existovat ve formě kationtů, aniontů nebo jako elektroneutrální částice v závislosti na pH prostředí a na hodnotě pK_a . K dělení jednotlivých látek dochází v prostředí s pH

gradientem na základě rozdílných hodnot izoelektrických bodů. V místě, kde se hodnoty pH a pI rovnají získá látka elektroneutrální povahu a její pohyblivost je nulová, tzn. analyt se v elektrickém poli nepohybuje, fokusuje. Původně byla používána IEF v plošném uspořádání. Dále je možné analýzu provést v uspořádání sloupcovém či kapilárním.



Obr.č.5: Izoelektrická fokusace [2]

3.2 INSTRUMENTACE

3.2.1 Kapiláry [2]

Tavený křemen je nejběžnějším používaným materiálem pro výrobu kapilár, a to díky své chemické a elektrické neutralitě, propustnosti UV záření, flexibilitě a nízké ceně. Jelikož není dostatečně pevný, bývá pokrýván vrstvou polyamidu. Tento polymer nepropouští UV záření, a proto je nutné vytvořit detekční okno, malé místo, kde je polymer přerušen. Kromě křemene se pro výrobu kapilár používá také teflon.

Vnitřní průměr kapilár se pohybuje v rozmezí 10-100 μm , obvykle však 25-75 μm . Nejčastější vnější průměr je 350-400 μm . Běžné kapiláry dosahují délky 50-75 cm.

3.2.2 Detekce

Nejčastěji používané detekční metody v CE jsou uvedeny v následující tabulce, společně s jejich výhodami a nevýhodami a detekčními limity.

Tabulka č. 1: Metody detekce [7]

Metoda	Limit detekce [M]	Výhody/Nevýhody
Absorpční fotometrie (UV/VIS)	$10^{-5} - 10^{-8}$	- univerzálnost - možnost využití DAD
Fluorescence	$10^{-7} - 10^{-9}$	- senzitivita
LIF	$10^{-14} - 10^{-16}$	- extrémně senzitivní - běžná derivatizace - cena
Amperometrie	$10^{-10} - 10^{-11}$	- senzitivita - užitečné, ale pouze pro elektroaktivní analyty - vyžaduje speciální zařízení
Vodivostní detekce	$10^{-7} - 10^{-8}$	- univerzální - vyžaduje speciální zařízení
Hmotnostní spektrometrie	$10^{-8} - 10^{-9}$	-senzitivní - poskytuje strukturální informace

4. METODICKÁ ČÁST

Při vyhledávání materiálů pro tuto kompilační práci jsem využila zejména databázi Analytical Abstract. V ní jsem vyhledávala podle klíčových slov: CZE, ITP, MEKC, CEC, electrophoresis, isotachophoresis, micellar electrokinetic chromatography, capillary electrochromatography a isoelectric focusing. Pomocí této databáze jsem získala odkazy a abstrakty požadovaných článků. Ty jsem poté vyhledala na internetových stránkách. Jejich seznam je uveden níže:

- [Web of Science](#)
- www.suweco.cz
- www.sciencedirect.com
- www.springerlink.com
- www3.interscience.wiley.com
- www.pubs.acs.org
- www.google.com
- www.scopus.com

5. VÝSLEDKY

Tab.č. 2 : Charakteristiky použitých CZE metod

Sloučenina/matrice	Příprava vzorku	Cíl práce	Separální podmínky (kapilára/napětí/BGE)	Detekce	Kalibrační rozmezí (limit detekce)	Literatura
Deriváty thiakridinu: 9-methylthioakridin, 9-ethylthioakridin, 2-methoxy-9-methyl-thioakridin, 2-methoxy-9-ethyl-thioakridin, 2-methoxy-9-propyl-thioakridin, 2-methoxy-9-pentyl-thioakridin, 2-methoxy-9-hexyl-thioakridin	Rozpuštění 25mg každé látky ve 2 ml 0,1 M HCl a doplnění na objem 50 ml deionizovanou vodou	Popis analýzy sedmi strukturálně podobných thioakridinových derivátů pomocí CZE, studium její potencionální vhodnosti pro kontrolu kvality a testování čistoty těchto látek, odhad disociačních konstant studovaných derivátů	65 cm (50 cm) x 75 µm ID/ 25 kV - BGEs: (1) 20 mM k. citronová, pH 2,54 (2,3) 30mM k. citronová + β-alanin titrovaný na pH 3,16 a 3,74 (4,5) 30mM octová k. + 6-aminokapronová k., pH 4,03 a 4,52 (6) 30mM 2-(N -morfolino) ethansulfonová k.+ 30mM histidin, pH 6,20 (7) 20 mM tetraboritan sodný + kys.boritá, pH 8,24	UV 200 nm	1-500 µg/ml	[8]
Lisurid/ <i>Lisurid hydrogenmaleat a Lisurid base</i>	Rozpuštění v 0,01 M HCl	Studium elektroforetické separace enantiomerů lisuridu a vhodnosti	350 mm (265 mm) x 50 µm ID/12 kV BGE :	DAD 230 nm	1,2,5,10 a 20 mg/l	[9]

		metody pro stanovení jeho nežádoucího L-enantiomeru	- 100mM Tris + 140 mM H ₃ PO ₄ + 20mM γ -CD			
Rivastigmin/ <i>Exelon capsules</i> (Novartis, Basel, Švýcarsko)	160 mg RIV do 100 volumetrické baňky s 60 ml methanolu, ultrazvuková lázeň (10 min) a centrifugace (1300g, 15 min), asi 5 ml supernatantu zředěno na 10 ml.	Popis metody pro separaci enantiomerů základních drog (RIV) s využitím cyklodextrinů (CD), výzkum specifických interakcí mezi S- β -CD a RIV a efektu molekulové struktury RIV na jeho migrační chování	60cm x 50 μ m I.D./30 kV 30 cm x 50 μ m I.D./20 kV BGE: S- β -CD ve 100 ml fosforečné kys., pH 2,5 upraveno pomocí (TRIS, TEA nebo NaOH)	DAD 200 nm	5-500 μ M každého enantiomeru LOD 5 μ M (oba enantiomery)	[10]
Rhodanesa/ hovězí játra	Všechny roztoky připraveny z Milli-Q vody a filtrováním přes 0,45 μ m membránový filtr	Aplikace EMMA pro inhibiční studium rhodanesy 2-oxoglutarátem kombinované s technikou částečného plnění	64.5 cm (56 cm) x 75 μ m I.D./18 kV BGE: HCl + 0,1M roztok β -alaninu (pH 3.5)	DAD UV-VIS 200 nm,	-	[11]
Silymarin/ bodlák	Rozpuštění v 0,1 M hydroxidů amonném	Separace a stanovení čtyř hlavních složek silymarinu: <i>SB_A, ISB_A, ISB_B, SD, SC</i> , využití HPLC a CZE a jejich porovnání	FEP kapilára, 25 cm (20 cm) x 320 μ m I.D. BGE: 10 mM EACA + 100 mM hydroxid amonný + 0,5% PVP10 + 0,1% HEC	UV 254 nm	10, 25, 50, 100 a 200 μ g/ml	[12]

Sanguinarin (SA), Chelerythrin (CHE)/ <i>Macleya cordata</i>	Extrakce preparativní kapalinovou chromatografií - 2 mM zásobní roztoky	Rozšíření CZE metody pro stanovení pKa SA a CHE za podmínek používaných při elektroforetických interakčních studiích	57 cm (50 cm) x 75 µm I.D. a 375 µm O.D.	UV 280 nm	3, 5, 15 a 50 µM LOD 3 µM	[13]
Sanguinarin (SA), Chelerythrin (CHE)/ <i>Macleya cordata</i>	Rozpuštění v přibližně 1 mM HCl, koncentrace nepřevyšující hodnotu 5x10 ⁻⁵ M	Elektroforetický výzkum interakcí SA a CHE s molekulami obsahujícími merkpto skupiny	57 cm (50 cm) x 75 µm I.D., 363 µm O.D. BGE: 2-[N-morfolino] propansulfonový pufr, pH 7.4, I = 30 mM 45 cm (35 cm) x 75 µm I.D., 150 µm O.D.	UV-VIS 280 nm	-	[14]
Sanguinarin/ fibroblasty z lidského jazyka, kryší hepatocyty, potravinová aditiva, prasečí výkaly, prasečí plazma a vybrané tkáně (játra, žaludek, střeva a svaly)	Extrakce buněčného sedimentu: Vzorek, 0,5 ml methanolu, HCl. Supernatanty smíchaný s 250 µl mobilní fáze Vzorky <i>in vivo</i> : Extrakce okyseleným (0.1% HCl) methanolem 12 hod	Nalézt optimální experimentální podmínky pro extrakci sanguinarinu z biologických vzorků a následné přímé měření využívající HPLC a CE	75 cm (45 cm) x 75 µm I.D./30 kV, obrácená pola-rita (-→+) BGE: 0.05 M k. fosforečná, pH 2.5 (upraveno 50% NaOH), SDS (výsledná koncentrace 150 mM)	fast- scanning UV/VIS 240-320 nm	1 – 0.08 µM SA LODs 20 a 12 nM	[15]
3-quinuclidinol a	Všechny roztoky	Studium	100 cm (70 a 50 cm) x	fast scan	5-100 µmol/l	[16]

jeho deriváty: N-methyl-3- QNu, N-ethyl-3- QNu, N-propyl-3- QNu, N-isopropyl-3- Qnu/ voda z nádrže	připraveny s využitím purifikované vody	elektroforetického chování 3-Qnu a jeho čtyř kvarterních N- alkylových derivátů - diskuse o potenciálu CE s nepřímou UV detekcí v jejich analýze	75 µm I.D. BGE: Vodný roztok imidazolu (5 nebo 10 mmol/l), octovou kyselinou, pH 2.5-5.0, β-CD nebo 25% PEG 2000	UV/VIS 210 nm	LOD 2.5 µmol/l	
Doxorubicin (DOX), Daunorubicin DAU)/ lidská plazma	100 µl plasmy, 100 µl 100 mM fosforečnanového pufru (pH 7.4), 50 µl acetonitrilu a 1 µl chloroformu míchány 2 min a centrifugovány 10 min (1500 x g), 800 µl chloroformové vrstvy odpařeno v proudu dusíku, vysušený zbytek rozpuštěn ve 40 µl methanolu a zředěn 60 µl vody	Vyvinutí CE metody pro analýzu terapeutických hladin antracyklinů v s využitím zakoncentrování a UV absorpce	75 cm (45 cm) x 50 µm I.D./ 30 kV, obrácená pola-rita (- → +) BGE: 100 mM fosforečná k., pH 2.5 (pomocí 50% NaOH), SDS 100 mM, methanol	fast scanning UV/VIS 190-260 nm	5×10^{-7} - 2×10^{-8} M	[17]
Esmolol/ prasečí krev	1 ml krve + 5 ml dichlormethanu, extrakce (15 min třepání), centrifugace (5 min), reextrakce	Vyvinutí vhodné metody pro monitorování hladiny esmololu v krvi, vhodné pro aplikaci	42.6 cm (35 cm) x 75 µm I.D./15 kV BGE: 50 mM fosforečnanový	UV 222 nm	0.1-40.0 µg/ml průměrný LOD 0.051 µg/ml	[18]

	esmololu do vodní fáze pomocí 0.6 ml 0.01 M HCl (pH 2.0), 5 min třepání, centrifugace (5 min), použito 200 µl kyselé vodní fáze	v srdeční chirurgii pro TDM	pufr (pH 8.0)			
Hydroxyfenylkarboxylové kyseliny a flavonoidy/ <i>Sambucus nigra</i> , <i>Crataegus</i>	Extrakce z 0,5 g květů do 50 ml methanolu, filtrace, ředění vodou (1:20)	Vývoj ITP-CZE metody (mód BGE-S-BGE) pro simultánní stanovení farmaceuticky významných flavonoidů a hydroxyfenylkarboxylových kyselin	9.0 cm x 0,8 mm I.D. (předseparační kapilára) 16 cm x 0,3 mm I.D. (analytická kapilára) TE: voda-methanol (4:1), 50 mM H ₃ BO ₃ , pH 8,2 (přídavek Ba(OH) ₂) LE: voda-methanol (4:1), 10 mM Cl ⁻ , Tris, pH 7,20, 0,2% w/v HEC BGE: 25 mM MOPSO/50 mM Tris + 10 mM H ₃ BO ₃ , pH 8,10	vodivostní, UV 254 nm	LOD (flavonoidy): 100 ng/ml LOD (kys.skořicová a p-kumarová): 20 ng/ml LOD (ostatní): 50 ng/ml	[19]
Chloritany	Analýza bez úpravy vzorku	Prezentace výsledků stanovení chloritanů v pitné vodě pomocí on-line spojení ITP a CZE (systém T-S-T)	160 mm x 0.8 mm I.D. (předseparační kapilára) 160 mm x 0.3 mm I.D. (analytická kapilára) LE:	kontaktní vodivostní	KK lineární do konc. 0.25 mg/l LODs 0.012-0.017 mg/l	[20]

			Cl ⁻ (10 mM), EACA, pH 3,9, voda TE (ITP): jantarová kyselina (5 mM), pH 3,5, voda - TE (CZE): jantarová kyselina (10 mM), EACA, pH 3,9, voda			
Flavonoidy: hyperosid, isoquercitrin, quercitrin, quercetin a rutin/ <i>Hypericum perforatum</i>	Extrakce 0,5 g listů a květů <i>H. Perforatum</i> v 50 ml methanolu, filtrace, 1 ml supernatantu upraven 1 ml methanolu a 2 ml zásobního roztoku kaempferolu (vnitřní standard), zředění vodou na 20 ml	Optimalizace elektroforetické separace quercetin-3-O-glykosidů použitím on-line spojení ITP a CZE	9.0 cm x 0,8 mm I.D. (ITP) 16 cm x 0,3 mm I.D. (CZE) LE : voda – methanol (4:1), 10mM Cl ⁻ , Tris, pH 7,20, 0,2% (w/v) HEC TE : voda – methanol (4:1), 50 mM H ₃ BO ₃ , pH 8,20 (přídavek Ba(OH) ₂) BGE 1: MOPSO (25 mM), Tris (50 mM), H ₃ BO ₃ (55 mM), HEC (0,2%), methanol (20%), pH 8,3 BGE 2 : TAPS (25 mM), Tris (50	vodivostní, spektrofotometrický 254 nm	1-10 µg/ml, pro quercetin 2-10 µg/ml. LOD 100ng/ml LOQ 0,5µg/ml, pro quercetin 0,3µg/ml	[21]

			mM), H ₃ BO ₃ (55 mM), HEC (0,2%), methanol (20%), pH 8,75			
Pylové alergeny a organické polutanty/ vzorky létavého prachu	450 mg prachu, 5x25 ml acetonu, 3 různá extrakční činidla (voda, kyselý vodný roztok k. octové, roztok alkalického vodného pufru s anionickým detergentem), 0,5 mg vzorku, 1 ml extrakčního činidla	Test použitelnosti kapilárních elektromigračních metod pro analýzu kapalných extraktů létavého prachu	315 mm (200 mm) x 50 μm I.D./8,0-12,0 kV BGE: 0,5 mol/l k. octová, pH 2,5 (CZE) a 20 mmol/l Tris, 5 mmol/l k. fosforečná, 50 mmol/l SDS, pH 8,7 (MEKC)	UV 206 nm		[22]
Thiokyanát/ lidské sérum, moč a plasma	Sérum 10x zředěno deionizovanou vodou, denaturace acetonitrilem (1:2), moč a sliny 20x zředěny deionizovanou vodou	Výsledky zkoumání použitelnosti CZE a MEKC pro analýzu thiokyanátu v různých biologických tekutinách	64.5 cm (56.0 cm) x 75 μm I.D./18 kV (negativní polarita) BGE: HCl, 0.1 M roztok β-alaninu (pH 3.50)	diode-array UV/VIS 200 nm	sérum: 15-500 μM LOD 1.5 μM moč: 25-500 μM LOD 0.7 μM	[23]
Oxytocin, Deaminoxycocin, Arg ⁸ -vazopresin, (Deamino-D-Arg ⁸)va-zopresin, Hmyzí diuretický hormon,	Syntetická příprava vzorků, rozpuštění v deionizované vodě nebo v BGE	Analýza syntetických derivátů peptidových hormonů pomocí CZE a MEKC	30 cm (19 cm) x 50 μm I.D. 40 cm (30.2 cm) x 75μm I.D./ 10-20 kV BGE: a) ionogenní peptidy: 100 mM H ₃ PO ₄ , 50 mM	UV absorpční fotometrický 206 nm, UV světelný	LODs: 0,016-5,86 μmol/dm ⁻³	[24]

(Deamino-D- Arg ⁸)-IDH, (D- Arg ⁸)-IDH, (Deamino- Arg ⁸)-vazopresin, NBD-derivát B23-B30-lidského insulinového fragmentu/standardní látky			Tris, pH 2,25/ 10 kV CZE mód b) peptidy s fluorescenční značkou: 0,5M octová kyselina, pH 2,5/ 15 kV CZE mód c) neionogenní peptidy : 20 mM Tris, 5 mM H ₃ PO ₄ , pH 8,8/20 kV MEKC mód	detektor, PDA 190- 600 nm, LIF: excitační vlnová délka 488nm a emisní vlnová délka 520 nm		
Fenyloctová kyselina, L-histidin monohydrochlorid monohydrát, MOPSO/ standardy	Vzorky rozpuštěny ve vodě, BGE nebo v roztoku makrosložky	Kritická studie úprav vzorku pro stopovou kvantitativní analýzu na základě měření výšky píku	37 cm (30 cm) x 0,1 mm I.D./-10 kV BGE: 15 mM ACES, histidin, 0,005% HPC, Ph 6,5	UV 214 nm	6×10^{-7} - 1×10^{-3} LOD 8×10^{-7} - 1×10^{-6}	[25]
Acetoacetát, malát, citrát/ lidské sérum	Použito čerstvé neupravené lidské sérum od pacientů s Diabetes mellitus. Připraven roztok z neionizované vody	Výzkum úlohy chloridů jako stackerů pro analýzu stopových množství aniontových analytů v lidském séru	36,7, 37, 47, 60 cm (26,5, 30, 40, 50 cm) x 0,100 nebo 0,075 mm/ I.D./ -15 kV BGE: 5 mM k. mandlová, EACA, pH 3,8 a 0,005% HPC (0,001 mm I.D.) a 0,05% HPMC (0,075 mm I.D.), fosfát, laktát	nepřímá UV 214 nm	LODs: $1,4 \times 10^{-6}$ M (malát), $1,1 \times 10^{-6}$ M (acetoacetát), $2,2$ $\times 10^{-6}$ M (citrát)	[26]
Octan, benzoan,	Připraveny roztoky	Využití boritanového	57 cm (50 cm) x 0,075	UV 200	-	[27]

boritan, chlorid, 2-chlorbenzoát, 2,4-dichlorbenzoát, hippurát, laktát, mandelát, MOPSO, TAPS, salicylát, tryptofan, urát, sodík, amonný iont/ standardy	v deionizované vodě.	BGE co-iontu a také, protiontu v analýze aniontů ve vzorku s komplexní matricí, oba významně ovlivňují charakteristiky elektrolytového systému a chování analytů	mm I.D./+(-)17 kV BGE: 50 mM k. boritá, pH 9,5, NaOH nebo NH ₄ OH	nm		
Ethyl glukuronid/ lidské sérum	Lyofilizovaná, vlastní séra a séra vybraných pacientů rozpuštěna v deionizované vodě v poměru 1:1. Směs 50 mM chloridu, 1 mM fosfátu, 0,05-0,32 mM citrátu, 0,034 mM malátu, 0,038 mM acetoacetátu a 1 mM laktátu použita jako modelový vzorek (bezproteinový)	Odhad iontové pohyblivosti a pK _a EtG, výběr co-iontu vhodného pro optimalizaci samozaostřování a nepřímou detekci EtG v přítomnosti endogenních makrokomponent, CZE stanovení EtG v séru	60,2 , 47, 57, 67 cm (50, 40, 50, 60 cm) x 0,075 mm a 0,1 mm I.D./ -10 až -30 kV BGEs: 5 mM L-mandlová k., β-alanin, pH 3,2-3,5 5 mM L-mandlová k., β-alanin, 0,02% a 0,05% HPC, pH 3,5 a 3,2 10 mM L-mandlová k., β-alanin, pH 3,2 a 3,5 6 mM k. salicylová, histidin, pH 6,0 5 a 7 mM k. skořicová, EACA, pH 4,1-4,4 10 mM fenyloctová k., EACA, pH 4,4 10 mM k. benzoová,	UV 214 nm	LOD 0,45-22,5 μM (0,1 a 5 μg/ml)	[28]

			EACA, pH 4,4 10 mM k. nikotinová, EACA, pH 4,0 a 4,2-4,4			
Λ -DNA fragmenty/ standardy	Směs fragmentů délky 1,1-48,5 kbp	Experimentální pozorování elektromigračního chování velkých DNA fragmentů v polymerním roztoku při různých teplotách	10,8 cm (5,5 cm) x 100 μ m I.D./ 10 kV BGE: 50 mM TAPS, 0,5% HEC, 2 μ g/ml ethidium bromidu	LIF	-	[29]
Ph_4P^+ , Ph_4B^- / standardy	Rozpuštění v organických rozpuštědlech: N,N- dimethylformamid, N,N- dimethylacetamid, propylen karbonát, methanol, acetonitril	Stanovení pohyblivosti EOF na základě porovnání pohyblivost dvou opačně nabitých referenčních iontů (Ph_4P^+ , Ph_4B^-) se známou elektroforetickou pohyblivostí	30,5 cm (16,5 a 22,0 cm) x 50 μ m I.D. BGEs: 2,6-dihydroxybenzoová k.-hydroxid tetraethyl- amonný (TEA), 2,6- dihydroxybenzoát, k. salicylová-TEA salicylát, octová k., TEA acetát, pH 2,6-dihydroxybenzoová k.- 2,6 dihydroxybezoát sodný k. salicylová-salicylát sodný octová k.-octan sodný	DAD, vodivost- ní	-	[30]

20 esenciálních aminokyselin (Lys, Arg, His, Gly, Ala, Val, Ile, Leu, Ser, Thr, Asn, Met, Gln, Trp, Glu, Phe, Pro, Tyr, Cys, Asp)/pivo, moč, kvasnice, sliny a rostlinné extrakty	Pivo sonifikováno 10 min, lidské sliny filtrovány přes 0,45 µm polypropylenový filtr, lidská moč nebyla upravována, jedna kvasnicová Pangaminová tableta sonifikována s 10 ml deionizované vody a roztok přefiltrován přes papírový filtr, 10% extrakt rozrazilu a 20% přesličky rolní doručeny z místní lékárny	Využití CCD pro detekci 20 esenciálních aminokyselin po jejich separaci v silně kyselých elektrolytech pomocí CZE	80,0 cm (66,5 a 71,5 cm) x 50 µm I.D./ 30 kV BGE: 2,3 M octová kyselina, pH 2,2, 0,1% HEC	CCD, DAD	LODs: 9,1 µM- 29 µM	[31]
22 aminokyselin (Ile, Lys, Met, Ala, Asp, Arg, Cys, Glu, Gln, His, Leu, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val, OH-Pro, Asn, Gly, β-Ala/standardy	Zředění vzorku destilovanou vodou na koncentraci 10 mmol/l	Aplikace CZE pro spolehlivé stanovení pK _a a pohyblivosti některých forem běžných, proteinogenních, aminokyselin ve formě kationů. Využití programu PeakMaster pro zjištění vhodného složení BGE.	50,2 cm (35,1, 36,6, 41,7 cm) x 25 µm I.D./ 20 kV BGEs: k. chloroctová 14,2, 16,37, 20,50, 26,68, 36,50, 51,90, 63,0, 69,0, 70,0 mmol/l, NaOH 0, 0,15, 1,18, 3,05, 5,63, 7,22, 8,25, 8,94, 9,30 mmol/l, pH 2,043- 3,198	DAD, CCD	-	[32]
Chloroctová,	Příprava	Aplikace dříve	45,7 a 48,6 cm (13,8,	DAD		[33]

dichlorooctová, trichlorooctová a salicylová kyselina/ standarty	methanolických roztoků	vyvinutých matematických modelů elektromigrace pro methanolické BGE s využitím programu PeakMaster	15,3, 8,5 cm) x 25 a 50 μm I.D./ ± 30 kV BGEs: k. benzoová 0,625, 1,25, 1,875, 2,5 5,0, 7,5 mmol/l, benzoan sodný 2,5, 5,0, 7,5, 10,0, 20,0, 30,0 mmol/l, pH 9,77- 9,92 octová k., octan sodný, pH 9,40 salicylová k., salicylát sodný, pH 8,30 dichlorooctová k., dichloracetát sodný, pH 6,30 trichlorooctová k., trichloracetát sodný, pH 4,30	CCD		
HBr, HCl, HF, dusitá, dusičná, sírová, mravenčí, fosforečná, propionová, máselná, valerová, kapronová kyselina, fruktóza, glukóza, laktóza, sacharóza	Pracovní standardní směs připravena zředěním zásobních roztoků Milli-Q vodou	Zavedení programu PeakMaster v optimalizaci BGEs pro dosažení dobrých signálů ve vodivostní detekci a pro minimum elektromigrační disperze	BGE: 20 mM PDC, NaOH, pH 12,1, 0,5 TTAOH	CCD	-	[34]

Tab.č. 3 : Charakteristiky použitých ITP metod

Sloučenina/matrice	Příprava vzorku	Cíl práce	Separační podmínky (kapilára/napětí/BGE)	Detekce	Kalibrační rozmezí (limit detekce)	Literatura
Bopindolol/ Bopindolol hydrogen malonát a Sandonorm, tablety (Léčiva a.s.)	5 mg bopindololu přeneseno do kádinky + 20 ml ledového methanolu, filtrace (0,45 µm), následná analýza	Vyvinutí a valilace ITP metody vhodné pro selektivní rozbor farmaceutických preparátů.	160 mm x 0,3 mm I.D. LE : pufr obsahující 5mM k. pikolinovou a 5mM pikolinát sodný (pH 5,37) TE: 10 mM k.mravenčí, pH 2,6	Vodivost- ní	10-100mg/l ve vodném 20% methanolu LOD je 0,7 µg/ml- LOQ je 6 µg/ml	[35]
Bromhexin (BX), ambroxol (AX)/ Ambrosan tablety, Ambrobene injekční roztoky, Mucosolvan roztok, Solvolan tablety, Bromhexin 12 BC roztok, Bromhexin 8 potahované tab., Paxirasol roztok	1) roztoky a injekce: Drogy ve formě Cl ⁻ solí, zředění pikolinátovým pufrem 2) tablety a potahované tablety: 10 ks zhomogenizováno, množství prášku odpovídající 10 mg analytu v 80 ml LE, filtrace	Vývoj kapilární ITP metody pro stanovení AX nebo BX ve farmaceutických přípravcích	160 x 0,3 mm I.D. LE: roztok pufru obsahující 5 mM pikolinovou k. a 5 mM pikolinát sodný (pH 5,20) TE: 0,01 M k. mravenčí (pH 2.50)	vodivost- ní	10-200 mg/l (AX.HCl) a 20-200 mg/l (BX.HCl) LOD: 4 a 8 µg/ml pro AX.HCl a BX.HCl	[36]
Hydroxyfenylkarbo-	Extrakce z 0,5 g	Vývoj ITP-CZE	9.0 cm x 0,8 mm I.D.	vodivost-	LOD (flavonoidy):	[19]

xylové kyseliny a flavonoidy/ <i>Sambucus nigra</i> , <i>Crataegus</i>	květů do 50 ml methanolu, filtrace, ředění vodou (1:20)	metody (mód BGE-S-BGE) pro simultánní stanovení farmaceuticky významných flavonoidů a hydroxyfenylkarboxylových kyselin	(předseparační kapilára) 16 cm x 0,3 mm I.D. (analytická kapilára) TE: voda-methanol (4:1), 50 mM H ₃ BO ₃ , pH 8,2 (přídavek Ba(OH) ₂) LE: voda-methanol (4:1), 10 mM Cl ⁻ , Tris, pH 7,20, 0,2% w/v HEC BGE: 25 mM MOPSO/50 mM Tris + 10 mM H ₃ BO ₃ , pH 8,10	ní, UV 254 nm	100 ng/ml LOD (kys.skořicová a p-kumarová): 20 ng/ml LOD (ostatní): 50 ng/ml	
Chloritany	Analýza bez úpravy vzorku	Prezentace výsledků stanovení chloritanů v pitné vodě pomocí on-line spojení ITP a CZE (systém T-S-T)	160 mm x 0.8 mm I.D. (předseparační kapilára) 160 mm x 0.3 mm I.D. (analytická kapilára) LE: Cl ⁻ (10 mM), EACA, pH 3,9, voda TE (ITP): jantarová kyselina (5 mM), pH 3,5, voda - TE (CZE): jantarová kyselina (10	kontaktní vodivostní	KK lineární do konc. 0.25 mg/l LODs 0.012-0.017 mg/l	[20]

			mM), EACA, pH 3,9, voda			
Flavonoidy: hyperosid, isoquercitrin, quercitrin, quercetin a rutin/ <i>Hypericum perforatum</i>	Extrakce 0,5 g listů a květů <i>H. Perforatum</i> v 50 ml methanolu, filtrace, 1 ml supernatantu upraven 1 ml methanolu a 2 ml zásobního roztoku kaempferolu (vnitřní standard), zředění vodou na 20 ml	Optimalizace elektroforetické separace quercetin-3-O-glykosidů použitím on-line spojení ITP a CZE	9.0 cm x 0,8 mm I.D. (ITP) 16 cm x 0,3 mm I.D. (CZE) LE : voda – methanol (4:1), 10mM Cl ⁻ , Tris, pH 7,20, 0,2% (w/v) HEC TE : voda – methanol (4:1), 50 mM H ₃ BO ₃ , pH 8,20 (přídavek Ba(OH) ₂) BGE 1: MOPSO (25 mM), Tris (50 mM), H ₃ BO ₃ (55 mM), HEC (0,2%), methanol (20%), pH 8,3 BGE 2 : TAPS (25 mM), Tris (50 mM), H ₃ BO ₃ (55 mM), HEC (0,2%), methanol (20%), pH 8,75	vodivostní, spektrofotometrický 254 nm	1-10 µg/ml, pro quercetin 2-10 µg/ml. LOD 100ng/ml LOQ 0,5µg/ml, pro quercetin 0,3µg/ml	[21]

Tab.č. 4 : Charakteristiky použitých MEKC metod

Sloučenina/matrice	Příprava vzorku	Cíl práce	Separální podmínky (kapilára/napětí/BGE)	Detekce	Kalibrační rozmezí (limit detekce)	Literatura
Ampicilin (AMP) a příbuzné látky: 6-aminopenicilinová kys., fenylglycylampicilin dimer ampicilinu, ampicilin diketopiperazin, ampicilin fenylglycylamid, ampicilin penicilová kyselina, 3-fenylpyrazin-2-ol, 2-fenylglycin/ farmaceutické přípravky obsahující AMP ve formě prášku	Analyty rozpuštěny ve 20 mM fosforečnanovém pufru, pH 7,0 (2 mg/ml)	Rozvoj a validace MEKC metody (popř. HPLC) pro stanovení čistoty AMP	47 cm (40 cm) x 50 µm I.D. a 57 cm (50 cm) x 50 µm I.D./ 23 kV (30 kV) BGE: 40 mM fosforečnan-boritanový pufr, 75 mM SDS	DAD 200nm	4-80 µg/ml LOQ 0,10-0,40	[37]
Antibakteriální isothiazolony: 2-methyl-4-isothiazolin-3-on, 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-on/ ProClin 300	Vzorky s nízkou koncentrací aktivní látky upraveny na pH 12 a extrahovány diethyletherem, extrakt odpařen a převeden do pufru ředěného 1:2	Aplikace vysoce výkonného separačního systému založeném na MEKC	27 cm (20 cm) x 75 µm I.D./15 kV fosforečnanový pufr (0.05 M, pH 7.0) s 0.025 M SDS a 0.05 M boritanový pufr (pH 9.5) s 0.1 M SDS	DAD		[38]

	deionizovanou vodou					
Fenoxymethylpenicilin (PMP)	Analyty rozpuštěny v 20 mM fosforečnanovém pufru, pH 7,0 (2 mg/ml)	Využití MECK pro stanovení čistoty PMP	47 cm (40 cm) x 50 µm I.D./18 kV popř. 22 kV BGE: 40 mM fosforačnanboritanový pufr, SDS (125 mM), pH 8,0, 3.5% (v/v) methanol	DAD 200 nm	20-264 µg/ml	[39]
Quercetin/ jablka, bílé zelí a květák (chemicky neupravované)	Hydroýza: 0.5 g vzorku, kys. askorbová (80 mg v 7.5 ml vody), 12.5 ml methanolu, 5 ml 6 M HCl, var na vodní lázni, chlazení, neutralizace 2 g NaHCO ₃ , do 7.5 ml methanolu, pH upraveno na 3.0, 2 ml 5% kys. wolframofosforečné, filtrace, pro izolaci quercetinu využity SPE kolonky (RP-18), eluce 2 x 0.7 ml methanolu	Vyzkoušet možnosti stanovení quercetinu v přírodních vzorcích	70 cm (67 cm) x 75 µm I.D./20 kV BGE: 10 mM kys. boritá, 10 mM tetraboritan sodný, 20 mM SDS, 15% methanol, pH 9.2	UV-VIS skenovací detektor 270 nm	0, 3, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 a 100 µg quercetinu/ml LOD 0.5 µg/ml	[40]
Lignany:	Rostlinný extrakt:	Využití MEKC pro	64.5 cm (56.0 cm) x 50	DAD	0.025-1.0 mg/ml	[41]

Schizandrin, Gomisin A, Gomisin N, Wuweizisu C/ <i>Schisandra chinensis</i> , Fyto Kaps Schizandra kapsle, lidské sérum (popř. fyziologický roztok	Vzorek 8 hod extrahován s 300 ml petroleumetheru, zakoncentrován a extrahován s methanolem, 200 µl methanolového extraktu odpařeno do sucha, rozpuštěno ve 200 µl 20 mM SDS a 35% acetonitrilu v 10 mM tetraboritanovém pufriu (pH 9.3) Vzorek drogy: 40 µl oleje z kapslí zředěno 160 µl methanolu, 10 min bonifikace, methanolový roztok odpařen do sucha a rozpuštěn ve 200 µl 20 mM SDS a 35% acetonitrilu v 10 mM tetraboritanovém pufriu (pH 9.3)	stanovení některých lignanů, zkoumání reprodukovatelnosti ploch pod píkem, migračních časů a linearity detekce	µm I.D./ 28 kV	UV-VIS 200 nm	LODs: pod 0.4 µg/ml	
Dithiothreitol/ prasečí játra	1g jater zhomogenizován s 30 ml 50 mM fosforečnanovým	Demonstrace použitelnost MEKC pro monitorování DTT clearance	58,0 cm (49,5 cm) x 50 µm I.D./28 kV BGE: 50 mM fosforečnanový	DAD UV-VIS 200 a 343 nm	0,05-2,5 mM DTT LOD 2.5 µM	[42]

	pufrem (pH 7.5) obsahujícím 1 mM EDTA, centrifugace, 1 ml 0,1 M roztoku trichloroctové kys. obsahující 1 mM EDTA přidáno do 1,0 ml homogenátu s přidaným 1 mM DTT, míchání, centrifugace, filtrace supernatantu	během chemických a biochemických experimentů	puftr, pH 7.5			
Biogenní aminy (BAs): Histamin (HI), Tyramin (TY), Tryptamin (TR), Putrescin (PUT), Kadaverin (CAD), Spermidin (SPD), Spermin (SPM)/ špenátové purée, kečup, koncentrovaný rajčatový protlak, zmražený zelený hrách	hrách zhomogenizován s malým množstvím 0,6 M kys. chloristé, připraven kyselý extrakt pro BAs stanovení, 25 g produktu smícháno s 75 ml 0,6 M HClO ₄ a promícháno, poté centrifugace, filtrace supernatantu, sediment promyt chloristou k. a znovu centrifugován, přefiltrován a přidán k počátečnímu	Průzkum obsahu sedmi BAs v některých běžně konzumovaných zeleninových produktech s využitím MEKC	-	-	LOD: 1.0, 1.3, 1.4, 1.4, 2.1, 2.1 a 3.5 mg/kg produktu pro SPD, TR, CAD, SPM, PUT, HI a TY	[43]

	extraktu, objem doplněn na 100 ml					
Homocystein/ lidská plazma	450 µl plasmy, 50 µl 0,5 M TCEP, reakční směs míchána a inkubována při 37 °C, přidáno 50 µl 3 M roztoku trichloracetoctové kys. obsahující 1 mM EDTA, zavičkování a míchání, precipitované bílkoviny odstraněny centrifugací, supernatant přefiltrován 0,45 µm filtrem	Aplikace kapilární (on-capillary) detekční reakce DPDS pro specifickou detekci celkového homocysteinu v lidské plazmě během MEKC	64,5 cm (58,5 cm) x 50 µm I.D./28 kV BGE: 50 mM SDS v 50 mM fosforečnanovém pufru (pH 7,5)	DAD UV-VIS 343 nm	0,03-3 mM homo- cysteinu ve vzorku LOD 6 µM	[44]
Cystein/lidská moč	Celkový cystein: 500 µl moče do 500 µl 50 mM fosforečnanového pufru (pH 7,5) a 250 µl 0,1 M EDTA, přidána 25 µl část 10% TBP v N,N- dimethylformamidu a	Návrh aplikace MEKC pro stanovení celkového cysteinu v lidské moči	64,5 cm (56,0 cm) x 50 µm I.D./28 kV BGE: 50 mM SDS v 50 mM fosforečnanovém pufru (pH 7.5)	DAD UV-VIS 343 nm	0,05-5 mM LOD 2,5 µM LOQ 8,5 µM	[45]

	vzorek redukován, po inkubaci a zchlazení přidán 100 µl 0,1 M roztok kyseliny trichloroctové obsahující 1mM EDTA, míchání a centrifugace					
Pylové alergeny a organické polutanty/ vzorky létavého prachu	450 mg prachu, 5x25 ml acetonu, 3 různá extrakční činidla (voda, kyselý vodný roztok k. octové, roztok alkalického vodného pufru s anionickým detergentem), 0,5 mg vzorku, 1 ml extrakčního činidla	Test použitelnosti kapilárních elektromigračních metod pro analýzu kapalných extraktů létavého prachu	315 mm (200 mm) x 50 µm I.D./8,0-12,0 kV BGE: 0,5 mol/l k. octová, pH 2,5 (CZE) a 20 mmol/l Tris, 5 mmol/l k. fosforečná, 50 mmol/l SDS, pH 8,7 (MEKC)	UV 206 nm		[22]
Thiokyanát/ lidské sérum, moč a plasma	Sérum 10x zředěno deionizovanou vodou, denaturace acetonitrilem (1:2), moč a sliny 20x zředěny deionizovanou vodou	Výsledky zkoumání použitelnosti CZE a MEKC pro analýzu thiokyanátu v různých biologických tekutinách	64.5 cm (56.0 cm) x 75 µm I.D./18 kV (negativní polarita) BGE: HCl, 0.1 M roztok β-alaninu (pH 3.50)	diode-array UV/VIS 200 nm	sérum: 15-500 µM LOD 1.5 µM moč: 25-500 µM LOD 0.7 µM	[23]
Oxytocin, Deaminoxytocin,	Syntetická příprava vzorků, rozpuštění	Analýza syntetických derivátů peptidových	30 cm (19 cm) x 50 µm I.D.	UV absorpční	LODs: 0,016-5,86 µmol/dm ⁻³	[24]

<p>Arg⁸-vazopresin, (Deamino-D-Arg⁸)va-zopresin, Hmyzí diuretický hormon, (Deamino-D- Arg⁸)-IDH, (D- Arg⁸)-IDH, (Deamino- Arg⁸)-vazopresin, NBD-derivát B23-B30-lidského insulinového fragmentu/standardní látky</p>	<p>v deionizované vodě nebo v BGE</p>	<p>hormonů pomocí CZE a MEKC</p>	<p>40 cm (30.2 cm) x 75µm I.D./ 10-20 kV BGE: a) ionogenní peptidy: 100 mM H₃PO₄, 50 mM Tris, pH 2,25/ 10 kV b) peptidy s fluorescenční značkou: 0,5M octová kyselina, pH 2,5/ 15 kV c) neionogenní peptidy : 20 mM Tris, 5 mM H₃PO₄, pH 8,8/20 kV MEKC mód</p>	<p>fotometrický 206 nm, UV světelný, PDA 190-600 nm, LIF: λ_{ex}=488nm a λ_{em}=520 nm</p>		
---	---------------------------------------	----------------------------------	---	--	--	--

Tab.č. 5 : Charakteristiky použitých CEC metod

Sloučenina/matrice	Příprava vzorku	Cíl práce	Separační podmínky (kapilára/napětí/BGE)	Detekce	Kalibrační rozmezí (limit detekce)	Literatura
Acetylsalicylová kyselina, Ketoprofen, Fenytoin, Propranolol, Salicylová kyselina Warfarin /modelové drogy	Komerční roztoky vzorků (GlaxoSmithKline, Itálie)	Využití možnosti imobilizace liposomů na vnitřní stěně křemenné kapiláry a aplikace CEC módu pro odhalení interakcí droga – liposom	40,0 cm x 50 µm I.D./ 10kV	-	-	[46]

Tab.č.6 : Charakteristiky IEF metod

Sloučenina/matrice	Příprava vzorku	Cíl práce	Separační podmínky (kapilára/napětí/BGE)	Detekce	Kalibrační rozmezí (limit detekce)	Literatura
Cytochrom <i>c</i> , hovězí sérový albumin, HPMC, myoglobin, ribonukleasa A, roztok syntetických nosných amfolytů/ srdce koně, kosterní svalstvo, hovězí pankreas	Složky vzorku (pI markery/proteiny, 25 µg/ml) rozpuštěny v 2-3% (v/w) syntetickém nosném amfolytů (Ampholine) bez přídavku HPMC, převedení na Dns deriváty	Navržení fluoreskujících nízkomolekulárních amfolytů se známými izoelektrickými body jako UV fotometrické a fluorescenční pI markery	400 mm (500 mm) x 0,072 mm I.D./- 19 kV BGE: 20 mM NaOH, 100 mM o-fosforečná kyselina, 0,001% a 0,25% HPMC	UV/VIS, Fast-scanning UV/VIS 250-360 nm, fluorome -tr 365 nm- excitace, 418 nm- emise	-	[47]

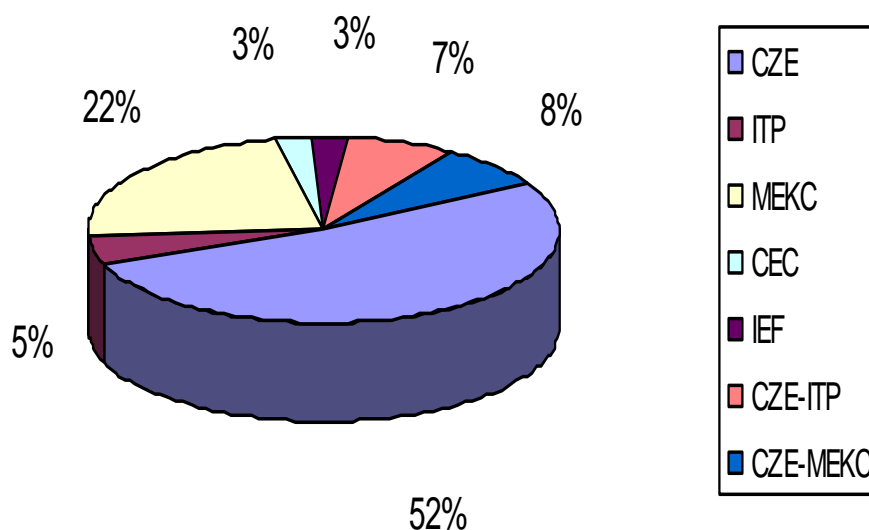
6. DISKUZE

6.1 Analyty

Jednotlivá pracoviště se zabývají analýzou různých druhů sloučenin, a to biologického či nebiologického původu. Nejčastěji analyzovanými vzorky byly farmaceutické přípravky [8, 10, 17-19, 35-39, 42, 46], např. rivastigmin, doxorubicin, daunorubicin, Bromhexin a další. Cílem analýzy bylo monitorování hladiny léku v krvi, určení terapeutické hladiny, testování čistoty léčivého přípravku (tj. stanovení obsahu jednotlivých enantiomerů, ať už žádoucích či nežádoucích) a nebo monitorování clearance. Dále pak alkaloidy jako lisurid, sanguinarin a chelerythrin, kde se taktéž stanovovaly jejich enantiomery [9, 13-15], flavonoidy [19,21,40], aminokyseliny cystein [45] a homocystein [44]. V tomto případě se stanovovaly jejich hladiny v plazmě či moči, hormony [24], enzymy [11], polyfenolické sloučeniny [12], lignany [41], biogenní aminy v běžně konzumovaných zeleninových produktech [43], pylové alergenů [22], elektromigrační chování fragmentů DNA [29] a další.

6.2 Použité CE metody

Z výše uvedených tabulek (č.2-6) je zřejmé, že na pracovištích v České republice se používají některé CE metody častěji než jiné. Největší oblibě se těší CZE, jak je znázorněno na obrázku č. 6. Daná pracoviště jsou uvedena níže, v odstavci č. 6.3



Obr.č.6 : Zastoupení jednotlivých CE metod v ČR

6.3 Seznam pracovišť v ČR využívající CE metody

CZE

- Karlova Univerzita v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra analytické chemie
- pracovníci: R. Matalová, I. Jelínek, P. Coufal
- Karlova Univerzita v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra fyzikální a makromolekulární chemie
- pracovníci: J. Zuska, B. Gaš, Z. Kabátek, K. Včeláková, I.Zusková, M. Jaroš
- Institut chemické technologie v Praze, Oddělení potravinářské technologie
- pracovníci: F. Kvasnička, R. Ševčík, M. Oldřich, J. Krátká
- IVAX Pharmaceuticals v Opavě
- pracovníci: B. Bíba, L. Cvak
- Karlova Univerzita v Hradci Králové, Farmaceutická fakulta,

Katedra analytické chemie

- pracovníci: M. Pospíšilová, M. Polášek, A. Kavalírová, R. R. Hamoudová, R. Karlíček

- Masarykova Univerzita v Brně, Přírodovědecká fakulta, Katedra biochemie
- pracovníci: S. Nováková, M. Telnarová, Z. Glatz
- Masarykova Univerzita v Brně, Přírodovědecká fakulta, Katedra analytické chemie
- pracovníci: S. Malovaná, D. Gajdošová, J. Havel
- Mendělevova lesnická a zemědělská univerzita v Brně, Katedra chemie a biochemie
-pracovníci: M. Vlčková, V. Kubáň
- Univerzita Palackého v Olomouci, Lékařská fakulta, Ústav lékařské chemie a biochemie
- pracovníci: P. Barták, P. Kosina, M. Modranský, D. Walterová, J. Ulrichová, V. Šimánek, J. Psotová
- Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta, Katedra Analytické chemie
- pracovníci: J. Ševčík, A. Gavenda, P. Bednář, P. Barták, K. Lemr, Z. Stránský, P. Adamovský
- Akademie věd ČR v Brně, Ústav analytické chemie
-pracovníci: Křivánková L., R. Vespalec, P. Barták, V.Šimánek, M. Vlčková, Gebauer P., Pantůčková P., Boček P., Březková M., Malášková H. ,Klepárník K.
- Centrum pro kardiovaskulární chirurgii a transplantace v Brně
-pracovníci: J. Bendík

ITP

- Karlova Univerzita v Hradci Králové, Farmaceutická fakulta, Katedra analytické chemie
-pracovníci: V. Jokl, M. Urbánek, M. Pospíšilová, M. Polášek

MEKC

- Státní ústav pro kontrolu léčiv v Praze
- pracovníci: M. Doležalová, R. Jobánek
- Karlova Univerzita v Hradci Králové, Farmaceutická fakulta, Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv
- pracovníci: B. Kunteová
- Univerzita Palackého v Olomouci, Katedra analytické chemie
pracovníci: P. Barták, P. Bednář, D. Friedecký, A. Haviger, J. Ševčík
- Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra analytické chemie
- pracovníci: H. Čápková
- Jihočeská Univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, Katedra chemie
- pracovníci: E. Dadáková, E. Procházková, M. Křížek, P. Kalač, S. Švecová, T. Pelikánová
- Masarykova Univerzita v Brně, Lékařská fakulta, Katedra biochemie
- pracovníci: H. Štěrbová, P. Ševčíková, L. Kvasničková, Z. Glatz, J. Slanina, J. Tomandl
- Masarykova Univerzita v Brně, Přírodovědecká fakulta, Katedra biochemie
- pracovníci: Z. Glatz, P. Ševčík, P. Ševčíková

CEC

- Akademie věd ČR Praze, Ústav fyziologie
- pracovníci: Z. Deyl

CZE-ITP

- Karlova Univerzita v Hradci Králové, Farmaceutická fakulta,
Katedra analytické chemie
- pracovníci: M. Urbánek, M. Pospíšilová, M. Polášek,
L. Blechtová
- VSB- Technická Univerzita v Ostravě, Katedra analytické
chemie a testování materiálu
- pracovníci: P. Praus

CZE-MEKC

- Akademie věd ČR v Praze, Ústav organické chemie a
biochemie
- pracovníci: P. Sázelová, V. Kašička, D. Koval, Z. Prusík,
V. Šolínová, T. Barth, A. Ciencialová, L. Žáková
- Masarykova Univerzita v Brně, Přírodovědecká fakulta,
Katedra biochemie
- pracovníci: Z. Glatz, S. Nováková, H. Štěřbová

IEF

- Akademie věd ČR v Brně, Ústav analytické chemie
- pracovníci : M. Horká, K. Šlais
- Brněnská Univerzita technologická, Fakulta Chemie
- pracovníci: Z. Friedel

6.4 Použitá instrumentace

6.4.1 Kapiláry

V CZE analýzách jsou v největší míře používány nepokryté kapiláry z taveného křemene, které dosahují průměrné délky okolo 70 cm. Průměrná efektivní délka je asi 50 cm.. Nejčastěji používanými průměry jsou 50 a 75 μm . Dále se využívají holé křemenné kapiláry délky 60 cm s vnitřním průměrem 50 μm , PAA-kryté kapiláry délky 30 cm také o průměru 50 μm . V neposlední řadě lze pro analýzu úspěšně použít FEP kapiláry dlouhé 25 cm s vnitřním průměrem 320 μm .

6.4.2 Přístrojové vybavení

Pro experimenty bylo využito několik typů zařízení, mezi které patří SpectraPHORESIS 100 [15-17], Spectra/Phoresis 1000 CZE systém [17], dále je hojně využíván Beckman P/ACE Systém 5510 [13,14,26,28], Beckman P/ACE Systém 5010 [25-27] či MDQ [10,26] nebo Hewlett-Packard ^{3D}CE systém [9,11,30-33]. V neposlední řadě je to potom Crystal CE zařízení [8].

6.4.3 Detekce

Detektory by měly být co nejvíce citlivé, protože průměr kapilár je malý. Nejpoužívanější jsou UV detektory [8,12,13,18], které jsou založeny na absorpci ultrafialového záření (100-400 nm). Někdy se používají ve spojení UV/VIS, kdy se kromě ultrafialové oblasti měří i v oblasti viditelného světla (400-800 nm). Využívá se i rychle skenující UV/VIS [15-7] detektor, CCD [31-34] a DAD [9,10], který pro měření využívá diodového pole, které mu umožní měření při více vlnových délkách.

7. ZÁVĚR

Byla provedena rešeršní práce na zhodnocení využití elektroforetických metod v České republice za období 2001-2005. Čeští vědci se věnují analýze látek jak biologického původu (hormony, aminokyseliny,, enzymy, DNA), tak i analýze syntetických, např. farmaceuticky významných látek (Bromhexin, Ambroxol, Ampicilin). Mezi další často analyzované látky patří alkaloidy, flavonoidy a lignany.

Čeští vědečtí pracovníci nejčastěji publikovali své práce v časopisech Journal of Chromatography A, Journal of Chromatography B, Electrophoresis a Journal of Separation Science. Méně často pak v časopisech Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, Food Chemistry, Analytica Chimica Acta a Talanta.

8. *KLÍČOVÁ SLOVA*

kapilární zónová elektroforéza

izotachoforéza

micelární elektrokinetická chromatografie

izoelektrická fokusace

kapilární elektrochromatografie

9. POUŽITÉ SYMBOLY A ZKRATKY

u	elektroforetická pohyblivost iontu
u_{ef}	efektivní elektroforetická pohyblivost iontu
α	stupeň disociace
ε	permitivita základního elektrolytu
ζ	zeta potenciál
η	viskozita
r	poloměr kapiláry
μ_{EOF}	pohyblivost elektroosmotického toku
λ_{EM}	emisní vlnová délka
λ_{EX}	excitační vlnová délka
pKa	negativní logaritmus acidické termodynamické disociační konstanty
AMP	ampicilin
AX	ambroxol
BAs	biogenní aminy
BGE	základní elektrolyt
BX	Bromhexin
CAD	cadaverin
CCD	bezkontaktní vodivostní detektor
CD	cyklodextrin
CEC	kapilární elektrochromatografie
CZE	kapilární zónová elektroforéza
DAD	detektor s diodovým polem
DAU	daunorubicin
Dns	dansyl
DOX	doxorubicin

DPDS	2,2'-dipyridyl disulfid
DTT	dithiotreitol
EACA	ϵ -aminokapronová kyselina
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
EMMA	elektricky zprostředkovaná mikroanalýza
EOF	elektroosmotický tok
EtG	ethyl glukuronid
FEP	fluorovaný ethylenpropylen kopolymer
HEC	hydroxyethylcelulosa
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina
HPC	hydroxyl(propyl)celulosa
HPMC	hydroxyl(propylmethyl)celulosa
CHE	chelerithrin
ID	vnitřní průměr kapiláry
IDH	hmyzí diuretický hormon
IEF	izoelektrická fokusace
ISB _A	isosilybin A
ISB _B	isosilybin B
ITP	izotachoforéza
LIF	laserem indukovaná fluorescence
LOD, LOQ	limit detekce, kvantifikace
MEKC	micelární elektrokinetická fokusace
MOPSO	β -hydroxy-4-morfolinopropansulfonová kyselina
NBD	4-chloro-7-nitrobenzo-1,2,5-oxadiazol
OD	vnější průměr kapiláry
PDA	fotodiodový detektor
PDC	2,6-pyridindikarboxylová kyselina
PEG	polyethylenglykol
Ph ₄ P ⁺	tetrafenylfosfonium

Ph ₄ B ⁻	tetrafenylboritan
PMP	fenoxymethylpenicilin
PUT	putrescin
PVP	polyvinylpyrrolidon
QNu	quinuclidinol
RIV	rivastigmin
SA	sanguinarin
SB _A	silybin A
SC	silychristin
SD	silydianin
SDS	dodecylsulfát sodný
SPD	spermidin
SPM	spermin
TAPS	N-[tris(hydroxymethyl)methyl]-3-aminopropansulfonová kyselina
TBP	tri- <i>n</i> -butyl-fosfin
TCEP	Tris-(2-karboxyethyl)fosfin hydrochlorid
TDM	terapeutické monitorování léčiv
TEA	triethylamin
TR	Tryptamin
TRIS	1,1,1-tris-hydroxymethylaminomethan
TTAOH	hydroxid tetradecyltrimethyl amonný
TY	Tyramin
UV/VIS	ultrafialová a viditelná oblast

10. POUŽITÁ LITERATURA

1. Pavel Klouda: Moderní analytické metody, 2003, nakladatelství P. Klouda, Ostrava
2. *Příprava na praktická cvičení z instrumentální analýzy*, Faf UK HK, 2005/2006
3. [http://analyt.wz.cz/capillary/capillary1 .pdf](http://analyt.wz.cz/capillary/capillary1.pdf)
4. <http://www.ceandcec.com/360643%20-%20CE%20Primer%201.pdf>
5. Pospíšilová M.: přednáška *Separační metody*, 2005/2006 *FaF UK HK*
6. http://www.flowspek.ch/download/datasheet_itp.pdf
7. http://www.chemsoc.org/ExemplarChem/entries/2003/leeds_chromatography/chromatography/detectors.htm
8. Matalová R., Jelínek I., Pumera M., Barbe J.: *J. Sep. Sci.* 2003, 26, 129-132
9. Kvasnička J., Bíba B., Cvak L.: *J. Chromatogr. A* 2005, 1066, 255-258
10. Kavalířová A., Pospíšilová M., Karlíček R.: *Anal. Chim. Acta* 2004, 525, 43-51
11. Nováková S., Telnarová M., Glatz Z.: *J. Chromatogr. B* 2003, 990, 189-195
12. Kvasnička F., Bíba B., Ševčík R., Voldřich M., Krátká J.: *J. Chromatogr. A* 2003, 990, 239-245
13. Vlčková M., Barták P., Kubáň V.: *J. Chromatogr. A* 2004, 1040, 141-145
14. Vespalec R., Barták P., Šimánek V., Vlčková m.: *J. Chromatogr. B* 2003, 797, 357-366
15. Kosina P., Ševčík J., Modrianský M., Gavenda A., Bednář P., Barták P., Walterová D., Ulrichová J.: *J. Sep. Sci.* 2003, 26, 679-685

16. Bednář P., Barták P., Lemr K., Ševčík J., Stránský Z.: *J. Sep. Sci.* 2003, 26, 709-714
17. Gavenda A., Ševčík J., Psotová J., Bednář P., Barták P., Adamovský P., Šimánek V.: *Electrophoresis* 2001, 22, 2782-2785.
18. Malovaná S., Gajdošová D., Benedlík J., Havel J.: *J. Chromatogr. B* 2001, 760, 37-43
19. Urbánek M., Pospíšilová M., Polášek M.: *Electrophoresis* 2002, 23, 1045-1052
20. Praus P.: *Talanta* 2004, 62, 977-982
21. Urbánek M., Blechtová L., Pospíšilová M., Polášek M.: *J. Chromatogr. A* 2002, 958, 261-272
22. Sázelová P., Kašička V., Koval D., Prusík Z., Peltre G.: *J. Chromatogr. B* 2002, 770, 303-311
23. Glatz Z., Nováková S., Štěrbová H.: *J. Chromatogr. A* 2001, 916, 273-277
24. Šolínová V., Kašička V., Koval D., Barth T., Ciencialová A., Žáková L.: *J. Chromatogr. B* 2004, 808, 75-82
25. Křivánková L., Gebauer P., Pantůčková P., Boček P.: *Electrophoresis* 2002, 23, 1833-1843
26. Křivánková L., Pantůčková P., Gebauer P., Boček P., Caslavská J., Thormann W.: *Electrophoresis* 2003, 24, 505-517
27. Křivánková L., Březková M., Gebauer P., Boček P.: *Electrophoresis* 2004, 25, 3406-3415
28. Křivánková L., Caslavská J., Malášková H., Gebauer P., Thormann W.: *J. Chromatogr. A* 2005, 1081, 2-8
29. Kabátek Z., Klepárnám K., Gaš B.: *J. Chromatogr. A* 2001, 916, 305-310
30. Muzikar J., van de Goor T., Gaš B., Kenndler E.:

- J. Chromatogr. A* 2002, 960, 199-208
31. Coufal P., Zuska J., van de Goor T., Smith V., Gaš B.:
Electrophoresis 2003, 24, 671-677
 32. Včeláková K., Zusková I., Kenndler E., GAš B.: *Electrophoresis*
2004, 25, 309-317
 33. Včeláková K., Zusková I., Porras S.P., Gaš B., Kenndler E.:
Electrophoresis 2005, 26, 463-472
 34. Jaroš M., Soga T., van de Goor T., Gaš B.: *Electrophoresis* 2005,
26, 1948-1953
 35. Urbánek M., Pospíšilová M., Polášek M. : *Journal of*
Pharmaceutical and Biomedical Analysis 2002, 28, 509-515
 36. Pospíšilová M., Polášek M., Jokl V.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2001,
24, 421-428
 37. Doležalová M., Kunteová B., Jobánek R.: *J. Sep. Sci.* 2004, 27, 560-
568
 38. Barták P., Bednář P., Friedecký D., Haviger A., Ševčík J.:
J. Chromatogr. B 2001, 758, 323-325
 39. Doležalová M., Čápková H., Jobánek R.: *J. Sep.Sci.* 2003, 26, 701-
708
 40. Dadáková E., Procházková E., Křížek M.: *Electrophoresis* 2001,
22, 1573-1578
 41. Štěrbová H., Ševčíková P., Kvasničková L., Glatz Z., Slanina J.:
Electrophoresis 2002, 23, 253-258
 42. Glatz Z., Ševčíková P.: *J. Chromatogr. B* 2002, 770, 237-241
 43. Kaláč P., Švecová S., Pelikánová T.: *Food Chem.* 2002, 77, 349-
351
 44. Ševčíková P., Glatz Z., Tomandl J.: *J. Chromatogr. A* 2003, 990,
197-204
 45. Ševčíková P., Glatz Z.: *J. Sep. Sci.* 2003, 26, 734-738

46. Manetto G., Bellini M.S., Deyl Z.: *J. Chromatogr. A* 2003, 990, 281-289
47. Horká M., Willimann T., Blum M., Nording P., Friedl Z., Šlais K.: *J. Chromatogr. A* 2001, 916, 65-71

