

**Univerzita Karlova**

**3. lékařská fakulta**

**Dizertační práce**

Praha, 2016

**Mgr. Václav Pavlíček**

**Univerzita Karlova**

**3. lékařská fakulta**

## Dizertační práce

Využití kapilární a čipové elektroforézy pro klinický výzkum

**The use of a capillary electrophoresis and capillary electrophoresis on chip for  
clinical research**

Školitel: Doc. RNDr. Ing. Petr Tůma, Ph.D.

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem řádně uvedl a citoval všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 5. října 2016

Václav Pavlíček

## **Poděkování**

Tyto řádky patří osobám, které mi byly nápomocné během celého doktorandského studia. Proto mé vřelé díky patří nejen mému školiteli, Doc. RNDr. Ing. Petru Tůmovi, Ph.D., za trpělivost, kritické, avšak hodnotné rady během studia a i při sepisování této práce, ale také mé rodině, přátelům a přítelkyni.

**Identifikační záznam:**

PAVLÍČEK, Václav. Využití kapilární a čipové elektroforézy pro klinický výzkum. [**The use of a capillary electrophoresis and capillary electrophoresis on chip for clinical research**]. Praha, 2016. Počet stran 129, počet příloh 2. Dizertační práce. Univerzita Karlova, 3. lékařská fakulta, Ústav biochemie, buněčné a molekulární biochemie 3. LF UK – oddělení biochemie. Vedoucí závěrečné práce Doc. RNDr. Ing. Petr Tůma, Ph.D.

**Klíčová slova v ČJ:**

rychlé separace, bezkontaktní vodivostní detekce, kapilární elektroforéza, kyselina močová, kreatinin, steviol glykosidy, Rebaudiosid A, steviosid

**Klíčová slova v AJ:**

very fast separation, contactless conductivity detection, capillary electrophoresis, uric acid, creatinine, steviol glycosides, Rebaudioside A, Stevioside

## Obsah

<b>Seznam použitých zkratk</b> .....	<b>11</b>
<b>Seznam použitých symbolů</b> .....	<b>14</b>
<b>Abstrakt</b> .....	<b>18</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>20</b>
<b>1 Kapilární elektroforéza: Obecný přehled a možnosti použití v klinické laboratoři</b> .....	<b>22</b>
1.1 Od minulosti k dnešku .....	22
1.1.2 Začlenění kapilární elektroforézy do klinických laboratoří .....	24
1.1.3 Náklady CE analýz a úprava klinického materiálu .....	24
1.1.4 Rychlost CE analýz .....	25
1.1.5 Vývoj elektroforetické metody a automatizace CE .....	27
1.1.6 Detekce v CE .....	28
1.1.7 Uplatnění kapilární elektroforézy v dnešní době .....	31
1.2 Princip kapilární elektroforézy .....	32
1.2.1 Kapilára .....	33
1.2.2 Negativní jevy uplatňující se při CE separaci.....	35
<b>2 Vývoj elektroforetických postupů pro rychlé monitorování kyseliny močové a kreatininu pro klinické účely</b> .....	<b>37</b>
2.1 Chemické vlastnosti kyseliny močové.....	37
2.2 Biochemické a fyziologické vlastnosti kyseliny močové .....	38
2.3 Metabolismus kyseliny močové v lidském těle.....	39
2.4 Antioxidační vlastnosti kyseliny močové .....	41

2.5 Hladina kyseliny močové v séru a moči .....	42
2.6 Patobiochemie kyseliny močové .....	43
2.6.1 Hyperurikémie a její příčiny .....	44
2.6.2 Lesch-Nyhanův syndrom.....	45
2.6.3 Dnavá artritida .....	45
2.6.4 Vliv kyseliny močové na hypertenzi a diabetes mellitus II. typu .....	46
2.6.5 Metody stanovení kyseliny močové.....	46
2.7 Stanovení kyseliny močové pomocí urikázového testu.....	47
2.8 Chemické vlastnosti kreatininu a jeho klinický význam .....	47
2.8.1 Syntéza a exkrece kreatininu .....	48
2.8.2 Variabilita kreatininu.....	50
2.8.3 Klinický význam stanovení kreatininu .....	51
2.8.4 Metody stanovení kreatininu .....	52
<b>2.9 Cíl práce .....</b>	<b>60</b>
<b>3 Úvod do problematiky rychlého elektroforetického stanovení kyseliny močové a kreatininu.....</b>	<b>61</b>
3.1 Elektroforéza v krátkých kapilárách.....	62
3.2 Experimentální podmínky.....	64
3.3 Statistické zpracování výsledků .....	65
3.4 Chemikálie .....	65
3.5 Odběr a úprava vzorků.....	66

3.6 Rychlé elektroforetické stanovení kyseliny močové při dávkování do krátkého konce kapiláry .....	67
3.6.1 Kalibrační závislosti.....	69
<b>3.7 Využití spojených kapilár o různém vnitřním průměru pro rychlé separace kyseliny močové a kreatininu .....</b>	<b>71</b>
3.7.1 Laboratorní výroba spojené kapiláry.....	73
3.7.2 Stanovení kyseliny močové a kreatininu v moči za pomoci spojené kapiláry .....	75
3.7.3 Kalibrační závislosti pro kreatinin a kyselinu močovou .....	79
3.7.4 Stanovení kreatininu a kyseliny močové referenční metodou.....	80
<b>3.8 Výsledky a diskuze .....</b>	<b>81</b>
<b>3.9 Závěr.....</b>	<b>82</b>
<b>4 Stanovení steviol - glykosidů v potravinových doplňcích a nápojích pomocí kapilární elektroforézy s bezkontaktní vodivostní detekcí .....</b>	<b>83</b>
4.1 Steviol glykosidy z rostliny Stévie .....	83
4.2 Senzorický profil steviol glykosidů .....	84
4.3 Nutriční aspekty Stévie rebaudiana Bertoni.....	85
4.4 Biochemicky významné látky obsažené v rostlině Stevia rebaudiana Bertoni.....	86
4.5 Benefity rostliny stévie prospěšné pro zdraví .....	87
4.6 Komerční využití steviol glykosidů.....	88
4.7 Metabolismus steviol glykosidů .....	89
4.8 Působení steviol glykosidů na homeostázu glukózy .....	90
4.9 Působení steviol glykosidů na tvrdé zubní tkáň .....	90
4.10 Analytické metody pro stanovení steviol glykosidů.....	91



<b>4.11 Cíl práce.....</b>	<b>92</b>
4.12 Materiál a metody.....	92
4.13 Aparatura a optimální experimentální podmínky.....	93
4.14 Příprava vzorků .....	94
4.15 Statistické zpracování výsledků .....	94
<b>5 Stanovení steviol glykosidů pomocí kapilární elektroforézy s C<sup>4</sup>D.....</b>	<b>95</b>
5.1 Optimalizace separačních podmínek pro stanovení steviol glykosidů v modelových vzorcích.....	96
5.1.2 Vliv acetonitrilu na zaostření zóny analytu .....	96
5.1.3 Vliv pH základního elektrolytu na separační podmínky .....	97
5.1.4 Vliv koncentrace separačního pufru.....	99
5.1.5 Vliv hydrofilních polymerů na oddělení směsného píku steviosidu a rebaudiosidu A od zóny neutrálních látek .....	99
5.1.6 Vliv separačního napětí .....	101
5.1.7 Využití kapiláry o malém vnitřním průměru při CE separaci steviol glykosidů .....	102
5.2 CE/C <sup>4</sup> D stanovení steviol glykosidů v nápojích a potravinách .....	102
5.2.1 Stanovení celkové koncentrace steviol glykosidů v nápojích a potravinách v separačním elektrolytu bez přídavku modifikátoru EOF .....	103
5.2.2 Separace jednotlivých steviol glykosidů v reálných vzorcích v separačním elektrolytu s PEG 8.000.....	105
5.2.3 Stanovení rebaudiosidu A a steviosidusteviol glykosidů v nápojích a potravinách za použití INST modifikátoru EOF .....	108
5.2.4 Analýza nápojů a potravinových doplňků s obsahem steviol glykosidů.....	111

<b>5.3 Závěr.....</b>	<b>113</b>
<b>6 Literatura .....</b>	<b>114</b>
<b>Příloha 1. ....</b>	<b>129</b>
<b>Příloha 2. ....</b>	<b>129</b>

## Seznam použitých zkratk

AAP	4-aminoantipyrin
ACN	acetonitril
ATP	adenosintrifosfát
BGE	základní elektrolyt
C <sup>4</sup> D	bezkontaktní vodivostní detektor
cca	přibližně
CE	kapilární elektroforéza
CZE	kapilární zónová elektroforéza
ČR	Česká republika
DAD	detektor diodového pole
DEI	deionizovaná voda
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
EOF	elektroosmotický tok
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv
GC	plynová chromatografie
GC-MS	plynová chromatografie s hmotnostní detekcí
HbA	glykosylovaný hemoglobin

HILIC	hydrofilní interakční chromatografie
HP	Hewlett-Packard
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HPRT	hypoxanthin-guaninfosforibosyltransferáza
HPTLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie na tenké vrstvě
CHES	4-(cyclohexylamino)ethansulfonová kyselina
INST	INST Coating Solution
$K_A$	disociační konstanta
KM	kyselina močová
LDL	lipoprotein o nízké hustotě
LIF	laserem indukovaná fluorescence
LOD	limit detekce
MECK	mikroemulzní elektrokinetická kapilární chromatografie
MES	2-(N-morpholin)ethansulfonová kyselina
MS	hmotnostní spektrometrie
NAD	nikotin amidadenindinukleotid
NO·	radikál NO
PAS	<i>p</i> -aminosalicylová kyselina

PEG	polyethylenglykol
pH	vodíkový exponent
$pK_A$	záporný dekadický logaritmus disociační konstanty
PVDF	polyvinylidenfluorid
PTFE	polytetrafluoroethylen
PVA	polyvinylchlorid
Reb A	Rebaudiosid A
RP	reverzní fáze
RP18C	reverzní fáze C18
RSD	relativní směrodatná odchylka
SDS	sodidum lauryl sulfát
Stev	Steviosid
TBHBA	4,6-tribrom-3-hydroxybenzoovou kyselinu
USA	Spojené státy americké
UV	ultrafialové záření
UV-VIS	ultrafialovo-viditelná spektroskopie

## Seznam použitých symbolů

<u>Symbol</u>	<u>Význam</u>	<u>Jednotka</u>
%	procento	
°C	stupně Celsia	
cm	centimetr	
$c_m$	koncentrace kreatininu v moči	[mmol.l <sup>-1</sup> ]
$c_p$	koncentrace kreatininu v plazmě	[mmol.l <sup>-1</sup> ]
D	difúzní koeficient	
$d$	vnitřní průměr kapiláry	[μm]
$E$	intenzita elektrického pole	[V/cm]
g	gram	
Hz	hertz	
I	proudová hustota	[A.m <sup>-2</sup> ]
$l_p$	délka dávkované zóny analytu	[mm]
kcal	kilokalorie	
kV	kilovolt	
l	litr	
$l_c$	celková délka kapiláry	[cm]

<b><u>Symbol</u></b>	<b><u>Význam</u></b>	<b><u>Jednotka</u></b>
$l_D$	délka kapiláry k detektoru	[cm]
$l_{ef}$	efektivní délka kapiláry	[cm]
m	metr	
M	molární koncentrace	[mol.l <sup>-1</sup> ]
m/v	poměr hmotnosti analytu ve vodné substanci	
mbar	milibar	
mg	miligram	
min	minuta	
ml	mililitr	
M <sub>r</sub>	relativní molekulová hmotnost	
N	počet teoretických pater	
nm	nanometr	
$od$	vnější průměr kapiláry	[μm]
ot	otáčka	
Q	Jouleovo teplo	[W]
$q_i$	náboj iontu	
r	poloměr	[cm]

<b><u>Symbol</u></b>	<b><u>Význam</u></b>	<b><u>Jednotka</u></b>
$R_{1,2}$	rozlišení	
$r_i$	poloměr iontu	
$S$	průřez separační kapiláry	[m <sup>2</sup> ]
$s$	sekunda	
$t_k$	objem moči vyprodukovaný v časovém intervalu	[s]
$t_{EOF}$	migrační čas elektroosmotického toku	[s]
$t_M$	migrační čas	[s]
$U$	separační napětí	[V]
$U_{ef}$	efektivní separační napětí	[V]
$u_{el}$	elektroforetická mobilita	[m <sup>2</sup> s <sup>-1</sup> V <sup>-1</sup> ]
$u_{EOF}$	elektroosmotická mobilita	[m <sup>2</sup> s <sup>-1</sup> V <sup>-1</sup> ]
$u_{eff}$	efektivní mobilita	[m <sup>2</sup> s <sup>-1</sup> V <sup>-1</sup> ]
$u_{poz}$	pozorovaná elektroforetická mobilita	[m <sup>2</sup> s <sup>-1</sup> V <sup>-1</sup> ]
$V$	volt	
$v/v$	objemový poměr	
$V_m$	objem moči	[ml]
$v_{el}$	elektroforetická rychlost	



<b><u>Symbol</u></b>	<b><u>Význam</u></b>	<b><u>Jednotka</u></b>
$V_p$	dávkovaný objem do kapiláry	[nl]
$V_{pp}$	efektivní napětí (peak to peak)	[V]
$w$	šířka píku	[mm]
$w_{1/2}$	šířka píku v polovině jeho výšky	[mm]
$\alpha$	stupeň ionizace nebo disociace	
$\beta$	prostorová orientace	
$\eta$	dynamická viskozita	[Pa·s]
$\mu\text{l}$	mikrolitr	
$\mu\text{M}$	mikromol	[ $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ]
$\pi$	Ludolfovo číslo	

## Abstrakt

Předkládaná dizertační práce na téma „Využití kapilární a čipové elektroforézy pro klinický výzkum“ je rozdělena na dvě samostatné části. První kapitola shrnuje problematiku vývoje velmi rychlého stanovení kyseliny močové a kreatininu v lidské moči a séru prostřednictvím kapilární elektroforézy s UV detekcí, kdy bylo vyvinuto zcela originální řešení pro provádění desetivteřinové elektroforetické separace na komerčním elektroforetickém přístroji Agilent HP<sup>3D</sup> CE. Separace byly prováděny v laboratorně sestavené kapiláře vytvořené spojením 9,7 cm dlouhé analytické kapiláry s vnitřním průměrem ( $d$ ) 25  $\mu\text{m}$  a 22,9 cm dlouhé pomocné kapiláry s  $d$  100  $\mu\text{m}$ . Vlastní elektroforetická separace probíhá na krátké separační dráze o délce 8,3 cm při současné aplikaci elektrického separačního pole o vysoké intenzitě cca 2,3  $\text{kV}\cdot\text{cm}^{-1}$  (při většině elektroforetických separací nepřekračuje intenzita hodnotu 1,0  $\text{kV}\cdot\text{cm}^{-1}$ ). Spojená kapilára byla testována při praktických klinických stanoveních: i) stanovení kreatininu v lidské moči prováděné v základním elektrolytu – o složení 20 mM kyselina citronová / NaOH, pH 3,0; ii) stanovení kyseliny močové v lidské moči v základním elektrolytu, 20 mM MES / NaOH, pH 6,0. Za těchto experimentálních podmínek bylo dosaženo velmi krátkých migračních časů, 12,2 s pro kreatinin a 8,6 s pro kyselinu močovou ve vzorcích moče. Dosažená separační účinnost se pohybuje v rozmezí 1660 až 2760 teoretických pater za sekundu a limity detekce (LOD) dosahují mikromolární až submikromolární úrovně, což je dostatečné pro provádění praktických analýz. V dizertační práci je podrobně diskutována teorie separace při vysokých intenzitách elektrického pole a její praktické využití pro separaci klinických vzorků.

Druhá část dizertační práce je věnována vývoji zcela nové metodiky rychlého stanovení steviol glykosidů v potravinách a potravinových doplňcích pomocí kapilární elektroforézy s bezkontaktní vodivostní detekcí. *Stevia rebaudiana* Bertoni je bílé kvetoucí, světlomilná,

vytrvalá rostlina, která je celosvětově pěstována pro sladký extrakt izolovaný z jejích lístků. Listy stévie obsahují celou řadu diterpenických glykosidů, jejichž chemická struktura je odvozena ze společného aglykonu zvaného steviol. V současnosti je známa struktura jedenácti steviol glykosidů, z nichž majoritní zastoupení ve stévii zaujímá steviosid (cca 300 krát sladší než sacharóza) a rebaudiosid A (cca 450krát sladší než sacharóza). Steviol glykosidy se používají jako nekalorická, vysoce intenzivní sladidla v potravinových doplncích a nápojích. Využití steviol glykosidů se v současnosti velmi rozšiřuje, což s sebou přináší požadavek pro kontrolu jejich obsahu v potravinách z důvodů možné falzifikace. Elektroforetická separace steviol glykosidů byla provedena rovněž na přístroji kapilární elektroforézy Agilent HP<sup>3D</sup> CE s využitím bezkontaktní vodivostní detekce, jako alternativní techniky pro detekci látek neabsorbujících ve viditelné a ultrafialové oblasti spektra. Použitá křemenná kapilára pro vlastní separace byla 33 cm dlouhá (18 cm k detektoru) s 10  $\mu\text{m}$  vnitřním průměrem. Optimalizovaný základní elektrolyt byl roztok 170 mM kyseliny borité / LiOH, pH 9,0, s obsahem 0,5 % v/v INST Coating Solution. Separace byly provedeny za použití vysokého napětí +20 kV a hydrodynamického dávkování vzorku tlakem 50 mbar po dobu 100 s. Vzorky potravin a nápojů jsou před elektroforetickou analýzou pouze rozpuštěny ve vodě, zfiltrvány a finálně ředěny acetonitrilem. Migrační časy testovaných steviol glykosidů měly hodnoty 5,0 min. pro rebaudiosid A a 5,1 min. pro steviosid. Dosažená separační účinnost byla mezi 305 000 až 347 000 teoretických pater / m.

## Abstract

Present the dissertation thesis on the topic "The use of a capillary electrophoresis and electrophoresis on chip for clinical research" is divided into two separate parts. The first chapter summarizes the problems of development new method of very rapid determination of uric acid and creatinine using capillary electrophoresis in human urine and serum, when the entirely original solution has been developed for implementation of very fast electrophoretic separations in a commercial electrophoretic apparatus. The separations were performed in a laboratory made capillary formed by connecting a 9.7 cm long separation capillary with inner diameter ( $d$ ) 25  $\mu\text{m}$  with an auxiliary 22.9 cm long capillary with  $d$  100  $\mu\text{m}$ . The coupled capillary is characterized by the effective separation path 8.3 cm (short-end injection mode) and the high electric field intensity around 2.3 kV per cm. The coupled capillary was tested at several high-speed analysis; i) the determination of creatinine in human urine, background electrolyte - 20 mM citric acid/NaOH, pH 3.0; ii) the determination of uric acid in human urine, background electrolyte - 20 mM MES/NaOH, pH 6.0. Under these experimental conditions, migration times of 12.2 s for creatinine and 8.6 s for uric acid were achieved and the attained separation efficiency was between 1660 to 2760 theoretical plates per second for all analysis. LODs for both analytes were on submicromolar level. The theory of separation in coupled capillary and its practical applications for separation of clinical samples is discussed in the thesis. The second chapter summarizes the problems of development a new method of capillary electrophoresis with contactless conductivity detection for sensitive determination of stevioside and rebaudioside A in foods and beverages. The plant *Stevia rebaudiana* Bertoni has been widely cultivated in the world for the sweet diterpene glycosides. The leaves contain different diterpene glycosides arising from the same aglycone, steviol. There are eleven steviol glycosides with stevioside being the most abundant (about 300 times sweeter than saccharose), followed by rebaudioside A which is known to be even sweeter (about 450 times sweeter than saccharose). Steviol-glycoside

sweeteners are commonly used as nonnutritive and high-intensity sweeteners in food supplements and beverages. In the present time, the use of steviol glycosides is becoming increasingly widespread, leading to the requirement of controlling the content of steviol glycosides in foodstuffs to monitor possible falsification. The CE separations were performed by means of the HP<sup>3D</sup> CE system with contactless conductivity detection. The fused-silica capillary was 33 cm long (18 cm to the contactless conductivity detector) with 10 µm internal diameter. The optimized background electrolyte was 170 mM boric acid/LiOH, pH 9.0, containing 0.5 % v/v INST Coating Solution. Separations were performed by applying high voltage of +20 kV and samples were injected into the capillary by pressure 50 mbar for 100 s. Samples were directly dissolved in water and diluted with acetonitrile. The migration times of the tested steviol glycosides had values 5.0 min. for rebaudioside A and 5.1 min. for stevioside, respectively. The attained separation efficiency was between 305 000 – 347 000 plates per meter in real samples.

# 1 Kapilární elektroforéza: Obecný přehled a možnosti použití v klinické laboratoři

## 1.1 Od minulosti k dnešku

Termín elektroforéza (slovo pochází z řečtiny znamenající transport pomocí elektřiny) označuje separační metodu využívající pohyb nabitých částic v kapalném roztoku vlivem elektrického pole. Nabitými částicemi mohou být malé anorganické ionty, organické molekuly nebo i makromolekuly, jako jsou např. plasmatické proteiny, nukleové kyseliny nebo fosfolipidy [1]. Pohyb anorganických iontů v elektrickém poli byl nejdříve objeven v koloidním a později i ve vodném roztoku, což je datováno od roku 1892. V roce 1930 byla popsána a o sedm let později švédským elektrochemikem Arne Tiselielem i sestavena první elektroforetická aparatura [2]. Jako separační kolonu použil křemennou trubici ve tvaru U, ve které provedl úspěšnou elektroforetickou separaci proteinů krevního séra. Za tyto objevy byla A. Tiseliovi v roce 1948 udělena Nobelova cena [3]. Navzdory novému potenciálu zůstala elektroforéza několik let bez povšimnutí. Další vývoj elektroforézy je spjat se jménem Stellan Hjertén, který ke konci 60. let dvacátého století sestavil první variantu kapilární elektroforézy (CE) sestávající ze zdroje vysokého napětí, detektoru a křemenné separační trubice o vnitřním průměru 1 – 3 mm zanořené v externím chladícím kapalném médiu. Tento nadmíru jednoduchý elektroforetický systém umožnil základní oddělení anorganických iontů, proteinů a nukleových kyselin. Navzdory průkopnické práci ze strany Hjerténa zůstala CE relativně neznámou separační technikou [4]. Zásadní zlom nastal až počátkem 80. let minulého století a je spojený se jmény J. W. Jorgensona a K. D. Lukacsové [5, 6], kteří začali v CE používat tenké kapiláry z křemenného skla s malými vnitřními průměry ( $d$ ) o velikosti 75 – 100  $\mu\text{m}$  a jako první v nich provedli účinné separace směsí aminů, dipeptidů a aminokyselin. Křehkost křemenných kapilár byla eliminována vrstvou polyimidu nanesenou na vnější povrch kapiláry, která zajišťuje vysokou mechanickou pevnost.

Kapiláry tohoto typu se používají dodnes. Prováděním separace v kapilárách s malým vnitřním průměrem bylo potlačeno rozmývání zón vlivem konvektivního proudění kapaliny a zároveň se v takto tenkých kapilárách začal projevovat fenomén elektroosmotického toku (EOF). Výsledkem byla vysoká separační účinnost dosahující stovek tisíc teoretických pater. Kapiláry byly navíc technikou *on-column* spojeny s fotometrickým detektorem, původně vyvinutým pro vysoko-účinnou kapalinovou chromatografii (HPLC), a tak nastaly první předpoklady pro vývoj komerčních přístrojů CE [5].

Vysoká separační účinnost, jednodušší vývoj metody včetně optimalizace separačních parametrů, nízké provozní náklady, minimální spotřeba vzorku a činidel jsou hlavní důvody pro široké používání elektroforetických metod. K rozmachu CE a k jejímu širšímu aplikačnímu využívání došlo až po uvedení komerčně dostupných přístrojů na trh, které zajistily zvýšení robustnosti a reprodukovatelnosti elektroforetických analýz a tím i konkurenceschopnost vzhledem k HPLC. Současní výrobci CE přístrojů jsou;

- a) Agilent Technologies <http://www.agilent.com/>
- b) Beckman Coulter <https://www.beckmancoulter.com/>
- c) Dionex <http://www.dionex.com/>
- d) Lumex <http://www.lumex.ru/>
- e) Villa Labeco spol. s r. o. <http://www.villalabeco.sk/>
- f) WynSep <http://www.wynsep.com/en/>

Rodina nových analytických metod využívajících elektromigrační princip se rozrůstá a CE se postupně začíná uplatňovat nejen ve výzkumném a vývojovém prostředí, ale i v rutinním analytickém provozu či při řešení mezioborových otázek z oblasti chemie, biochemie, molekulární biologie, biotechnologie, potravinářského průmyslu a životního prostředí [7-9].

### **1.1.2 Začlenění kapilární elektroforézy do klinických laboratoří**

Neutuchající rozvoj v oblasti klinické analýzy sledujeme od začátku 80. let dvacátého století a nezpomaluje ani v dnešní době. Míří stále kupředu v podobě využívání nejmodernější instrumentace. Spokojenost pacienta je dána minimální dobou hospitalizace, pohodlím a rychlou diagnostikou jeho obtíží. Pro splnění těchto úkolů musí být lékař schopen v reálném čase na základě symptomů a klinického obrazu získaného na podkladě výsledků z klinické laboratoře rozhodnout o optimálním postupu, který povede k pacientovu uzdravení. Moderní doba vyvíjí tlak na klinické laboratoře, aby vyvinuly metody, které budou levné, rychlé, přístupné automatizaci a současně budou poskytovat správné a přesné výsledky. Dosud se v klinické analýze s úspěchem uplatňuje gelová elektroforéza při vyšetření plasmatických proteinů, ale prudký rozvoj technik separačně účinnější a rychlejší CE pravděpodobně povede k jejímu mnohem širšímu využití v laboratořích klinické medicíny. Jaké jsou hlavní perspektivy CE v klinické analýze, se pokusím nastínit v následujících odstavcích.

### **1.1.3 Náklady CE analýz a úprava klinického materiálu**

V oblasti separačních technik je CE soustředěna zejména na stanovení disociovatelných látek nízkomolekulárního i vysokomolekulárního charakteru, vhodně tak doplňuje plynovou chromatografii (GC) zaměřenou na analýzu těkavých látek a vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii (HPLC), jejíž aplikační možnosti jsou nejšířší. Srovnáme-li tyto separační techniky z hlediska nákladů na provedení jedné analýzy, vychází nejvýhodněji právě CE. Zatímco pořizovací náklady na zakoupení moderní instrumentace jsou pro jednotlivé separační techniky zhruba stejné, tak v provozních nákladech vychází CE nejlépe. Aktuální pořizovací cena přístroje HPLC a CE u společnosti Agilent je 1 450 000 a 1 500 000 Kč. Pro přístroj GC 850 000 Kč. Hlavní úspory nákladů u CE vycházejí z používání křemenných kapilár, jejichž



ceny jsou minimálně třetinové v porovnání s cenami kolon určených pro HPLC nebo GC. Pořizovací cena HPLC kolony *C18* pro testování klinicky významných látek se pohybuje v rozmezí 8 000 – 20 000 Kč. Zatímco desetimetrový úsek křemenné kapiláry vyjde na cca 3 000 Kč. Za předpokladu, že CE stanovení bude probíhat v kapiláře dlouhé 60 cm, na které se analyzuje minimálně 100 klinických vzorků, tak při velmi konzervativním odhadu vydrží 10 metrů dlouhý úsek kapiláry nejméně 1 800 analýz. HPLC kolona se může „pochlubit“ výdrží „jen“ na 800 analýz. Navíc laboratorní úprava klinických vzorků pro CE analýzu není tak přísná jako pro HPLC a v mnohých případech postačuje ředění klinického vzorku v kombinaci s jeho filtrací, v případě potřeby doplněné o deproteinizaci klinického materiálu přidavkem silné kyseliny nebo organického rozpouštědla. V případě, že dojde k ucpání separační kapiláry, lze ji jednoduše vyměnit za jinou levnou kapiláru s minimálními materiálními následky ve srovnání se zničením drahé HPLC kolony. Také spotřeba separačních elektrolytů a dalších činidel je v CE naprosto minimální a denní množství se pohybuje v jednotkách mililitrů, zatímco spotřeba mobilní fáze v HPLC je nesrovnatelně vyšší. Takové výhody činí z CE separační techniku kompatibilní s ideou zelené chemie. Použití jiného druhu kapilár, např. s inaktivovaným vnitřním povrchem, které jsou podstatně dražší, je opět ve srovnání s kolonou v systému reverzní fáze (RP) nebo HPLC ionto-měničovou kolonou stále méně nákladné. Při srovnání všech vstupních a výstupních nákladů se CE jeví jako srovnatelná separační metoda k tradičním chromatografickým technikám.

#### **1.1.4 Rychlost CE analýz**

Je známou skutečností, že CE separace prováděné v kapiláře jsou mnohem rychlejší a účinnější než běžnější gelové elektroforézy v plošném uspořádání. Rychlost CE analýzy měřená jako migrační čas  $t_M$  závisí na experimentálních parametrech dle vztahu:

$$t_M = \frac{l_D}{v_{poz}} = \frac{l_D}{E \cdot (u_{el} + u_{EOF})} \quad (1-1)$$

kde  $l_D$  je délka kapiláry k detektoru (efektivní délka),  $v_{poz}$  je pozorovaná rychlost,  $u_{el}$  elektroforetická mobilita,  $u_{EOF}$  mobilita elektroosmotického toku,  $E$  intenzita elektrického pole. Při srovnání intenzit elektrického pole  $E$  pro CE (cca 200 až 800 V/cm) a gelovou plošnou elektroforézou (cca 15 – 40 V/cm) je to více než zřejmé. Provádění separace při vysokých hodnotách intenzity elektrického pole s sebou samozřejmě přináší nežádoucí efekt v podobě zvýšené generace Jouleova tepla  $Q$ ;  $Q$  závisí na geometrických parametrech dle vztahu:

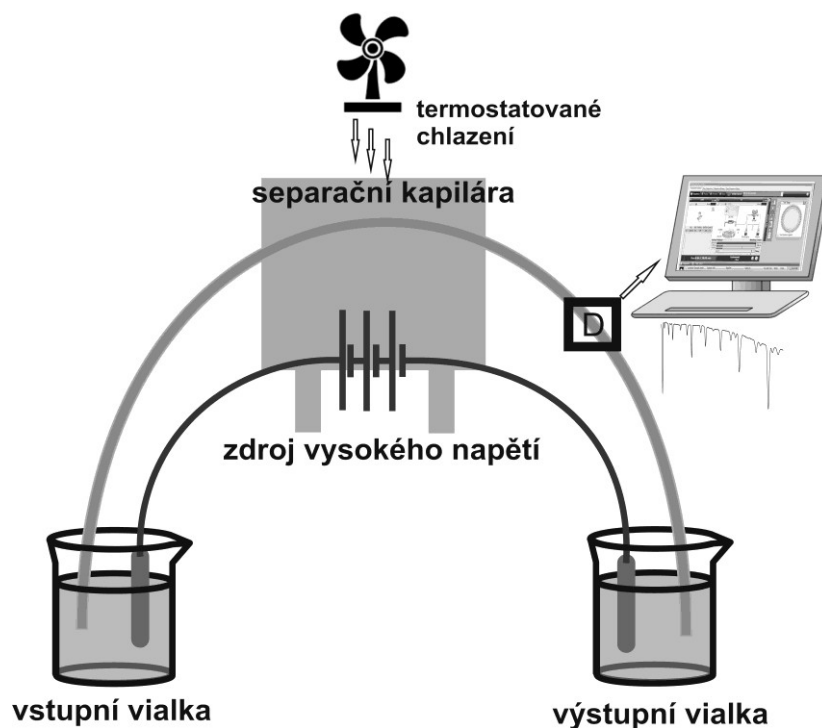
$$\frac{dQ}{dt} = E \cdot I \cdot \pi \cdot d^2 / 4 \quad (1-2)$$

kde  $dQ/dt$  [ $W \cdot m^{-1}$ ] je tepelný výkon na jednotku délky kapiláry,  $I$  je proudová hustota [ $A \cdot m^{-2}$ ] a  $d$  [m] je vnitřní průměr separační kapiláry.  $Q$  je produkováno z celého objemu roztoku, kterým protéká elektrický proud; zatímco k jeho odvodu dochází z povrchu. Účinnost odvodu tepla je přímo úměrná poměru obvod příčného průřezu separačního prostředí/plocha, což pro kapiláru s kruhovým průřezem lze vyjádřit jako  $\frac{\pi d}{\pi d^2 / 4} = \frac{4}{d}$ . Zajištění účinného odvodu  $Q$  je tak jedním z limitujících faktorů pro zdárný průběh elektroforetické separace a pro dosažení vysoké reprodukovatelnosti analýz.

Srovnáme-li např. separaci proteinu prováděnou i) na standardní agarózové destičce o rozměrech 14 cm (délka)  $\times$  12 cm (šířka)  $\times$  0,15 cm (výška) a ii) v křemenné kapiláře s vnitřním průměrem 75  $\mu m$ , vychází poměr obvod/plocha příčného průřezu 40krát vyšší ve prospěch elektroforetické kapiláry. To současně znamená, že v kapiláře můžeme teoreticky provádět separace při 40krát vyšší  $E$  a dosahovat 40krát kratších separačních časů. Pravděpodobně jedním z hlavních důvodů, proč CE nenahradila gelovou elektroforézou pro rutinní analýzy sérových proteinů, je fakt, že není schopna během jedné analýzy separovat současně více vzorků a získané výsledky analýzy nelze následně vzájemně porovnat [10].

### 1.1.5 Vývoj elektroforetické metody a automatizace CE

Komerčně dostupný přístroj CE je z instrumentálního hlediska až pozoruhodně jednoduchý, viz Obr. 1.1. Většina přístrojů je navíc vybavena účinnou technikou pro regulaci teploty v kapiláře. A to buď za použití Peltierova článku chlazeného proudem vzduchu, nebo je kapilára uzavřena v kartuši, která je naplněna chladicí kapalinou, jejíž teplota je udržována na konstantní hladině. Všechny systémové komponenty CE jsou monitorovány nebo kontrolovány pomocí počítačového softwaru [11]. Koncovému uživateli je tak umožněno, aby jednoduše optimalizoval parametry ovlivňující separaci během jejího vývoje, vyvinul metodu a poté analyzoval klinické vzorky. Nicméně, na rozdíl od automatizovaných systémů používaných v klinické laboratoři, vyžaduje přístroj CE nadprůměrné technické znalosti. Nejedná se o černou skříňku, do které jsou vloženy vzorky, stisknuto tlačítko a během jednotek vteřin je očekáván výsledek bez již zavedené metody.



**Obr. 1.1.** Zjednodušené schéma základního instrumentálního uspořádání v CE. Písmeno „D“ označuje detektor.

### 1.1.6 Detekce v CE

Jedním z limitujících faktorů pro široké využití CE v klinické praxi jsou vysoké koncentrační limity detekce (LOD). Nejčastěji používaným detekčním systémem v CE je fotometrická detekce v ultrafialové a viditelné oblasti spektra (UV-VIS detekce). Fotometrická detekce v UV-VIS oblasti spektra nedosahuje v CE takové citlivosti jako při použití v kapalinové chromatografii. K absorpci záření v CE dochází na velice krátké dráze, která je přímo úměrná vnitřnímu průměru kapiláry. Tuto dráhu lze pro zvýšení citlivosti vhodným způsobem upravit, aby byla opticky i mechanicky prodloužena. Způsobů se nabízí několik: i) Z-zalomení separační kapiláry v místě detekce tzv. Z-cela, u které je citlivost v porovnání s kapilárou stejného průměru až 10násobně vyšší (10krát se prodlouží optická dráha). Zároveň s tím ovšem vzrůstá i nežádoucí šum základní linie detektoru. ii) Druhým způsobem je rozšíření vnitřního prostoru kapiláry v místě detekce, tzv. bubble cell, která zvyšuje citlivost detekce až na 5násobek při zachování separační účinnosti. Fotometrickou detekci lze použít jen na látky, které absorbují v UV oblasti elektromagnetického spektra. Citlivější detekční technikou pro CE je fluorescenční detekce, zejména její inovovaná varianta, laserem indukovaná fluorescence (LIF). Pro její použití musí být splněna podmínka přítomnosti silných chromoforů nebo fluoroforů v analyzované matrici. LOD této techniky dosahuje až nanomolárních hodnot [12, 13].

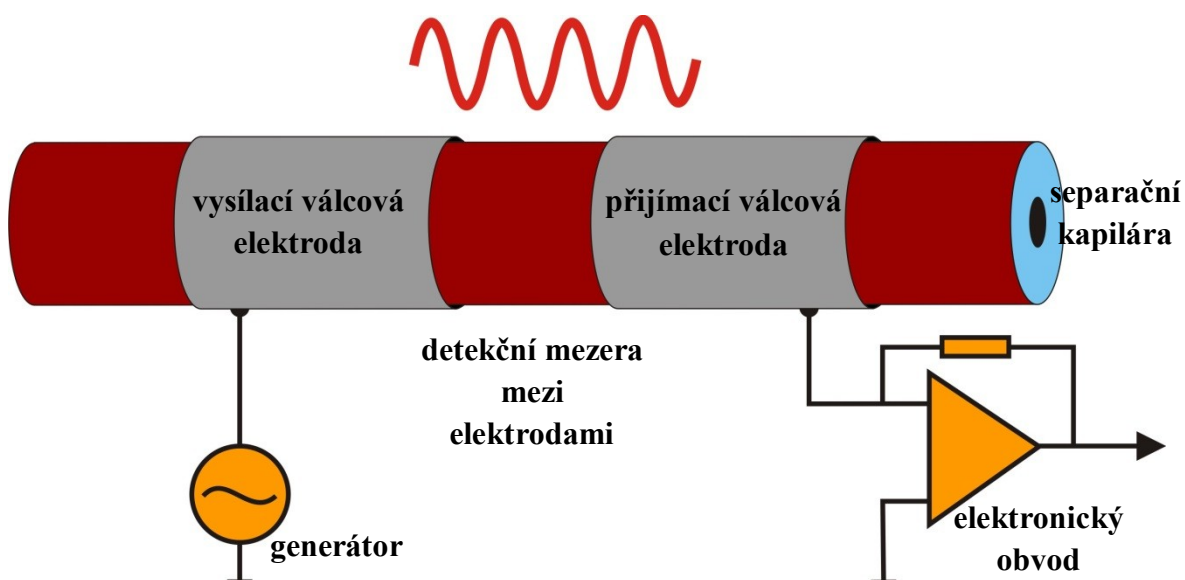
Hmotnostní detekce (MS) je velmi populární detekční technikou ve spojení s CE, která se vyznačuje vysokou selektivitou a navíc podává informace o chemické struktuře neznámých látek. Z tohoto důvodu je velmi často používána pro analýzu biomolekul. Spojení CE s MS není z konstrukčního hlediska jednoduchou záležitostí. Uzemněný konec separační kapiláry není v tomto uspořádání ponořen do separačního elektrolytu v koncové nádobce, ale je volně zasunut do vstupu hmotnostního detektoru. To ve spojení s malým objemovým průtokem separačního elektrolytu v kapiláře představuje problém pro uzavření elektrického obvodu v CE. K odstranění

tohoto problému se nejčastěji používá pomocná kapalina (*sheat liquid*), která je vedena z externího čerpadla na konec separační kapiláry a zajišťuje vodivé spojení se zemnicí elektrodou a zároveň slouží i jako stabilizátor ionizačního spreje. Další omezení CE spojené s MS představuje orientace na těkavé separační elektrolyty založené především na kyselině mravenčí nebo octové jako kyselá složce a hydroxidu amonném jako bazické složce. Používání v CE běžných pufrů, jako je borátový, fosfátový či SDS, není doporučeno z důvodu nežádoucího zanesení hmotnostního detektoru solemi, které dlouhodobě snižují jeho citlivost.

Důležitou detekční technikou pro CE představují elektrochemické detektory, které lze na rozdíl od MS snadno miniaturizovat. Klasická elektrochemická detekce založená na oxidaci nebo redukci analytu na elektrodě bohužel nenachází v elektromigračních technikách tak široké uplatnění jako v kapalinové chromatografii. Tento fakt je způsoben rušivým vlivem vysokonapětového separačního pole CE na elektrický signál v nízkonapětovém poli elektrochemického detektoru. To je také hlavním důvodem, proč nejsou citlivé elektrochemické detektory běžnou výbavou komerčních elektroforetických sestav a jednotlivé výzkumné laboratoře si je vyrábějí sami.

Takové tvrzení ovšem neplatí pro bezkontaktní vodivostní detekci ( $C^4D$ ), která se za posledních 15 let rozšířila do podoby široce používané detekční techniky pro CE. Bezkontaktní vodivostní detektory dodává několik firem a postupně se tak stávají běžnou součástí elektroforetických sestav. Princip  $C^4D$  spočívá v bezkontaktním měření vodivosti roztoku uvnitř separační kapiláry pomocí dvou tubulárních elektrod, které jsou umístěné kolem vnějšího povrchu kapiláry. Měřicí elektrody nejsou v přímém, řekněme galvanickém kontaktu s měřeným roztokem a nedochází zde k interferenci se separačním stejnosměrným polem. Na excitační elektrodu je z generátoru přiveden střídavý budící signál o vysoké frekvenci (desítky kHz až jednotky MHz) a amplitudě (jednotky až desítky voltů), zpravidla sinusového průběhu. Střídavý signál prochází přes stěnu separační kapiláry a je ovlivněn vodivostí roztoku uvnitř kapiláry a následně je pomocí snímací

elektrody sbírán a elektronicky zpracován. Valná většina konstrukcí detekčních cel pro bezkontaktní vodivostní detekci v CE využívá tubulárních elektrod o délce v řádu jednotek milimetrů, vzájemně od sebe oddělených detekční mezerou v rozmezí 1 až 3 mm, viz Obr. 1.2.



**Obr. 1.2.** Schema bezkontaktního vodivostního detektoru s tubulárními elektrodami pro kapilární elektroforézu.

$C^4D$  je univerzální detekční technikou, která se používá nejen k detekci malých anorganických iontů v reálných matricích, jako je dešťová, pitná nebo odpadní voda, lidské sérum nebo moč a jiné, ale i pro citlivé CE stanovení malých organických látek, které neabsorbují v UV oblasti spektra. V literatuře je popsána řada CE/ $C^4D$  aplikací pro stanovení biochemicky významných molekul, jako jsou aminokyseliny, nízkomolekulární organické kyseliny, biogenní aminy, mastné kyseliny, mono- a disacharidy, peptidy, proteiny nebo polysacharidy [14-19]. Interpretace odezvy  $C^4D$  na jednotlivé analyty není tak jednoduchá jako v případě fotometrické detekce, neboť analyty se ve vodivostním detektoru mohou zobrazovat jako pozitivní i jako negativní píky v závislosti na složení základního elektrolytu. To klade vyšší nároky na vývoj elektroforetické metody a zejména na optimalizaci separačního elektrolytu. Důležitým pomocníkem pro tyto účely jsou simulační programy *PeakMaster* a *Simul* vytvořené pracovní

skupinou profesora B. Gaše, <http://echmet.natur.cuni.cz/>. Pomocí zmíněných programů lze simulovat CE separaci s vodivostní detekcí a optimalizovat odezvu C<sup>4</sup>D. Určitým omezením při používání C<sup>4</sup>D představuje zvlnění základní linie detektoru vyvolané fluktuací teploty v průběhu separace a změnami ve složení dvojvrstvy na vnitřním povrchu kapiláry spojené s používáním povrchově aktivních látek.

### **1.1.7 Uplatnění kapilární elektroforézy v dnešní době**

V současné době nachází CE praktické využití nejen na poli komplexního studia metabolického složení živých organismů. Včasné odhalování závažných chorob je jedním z hlavních zájmů moderního fyziologického, biochemického a farmakologického výzkumu. Slibným směrem bádání je sledování metabolického profilu biologických systémů. Jde o velmi rychle se rozvíjející vědní obor používající moderních instrumentálních technik [20, 21]. Využití kapilární elektroforézy v metabolomice zaujímá rozsáhlou oblast. Naprostá většina metabolitů jsou nízkomolekulární ve vodě rozpustné látky, které jsou přímo separovány na základě rozdílné elektroforetické pohyblivosti ve volném roztoku bez použití stacionární fáze [22]. Navíc pro většinu CE stanovení není nutné vzorek derivatizovat a metabolity lze stanovit v nativním stavu, ve kterém se vyskytují v živé tkáni. Úprava vzorku pro CE analýzu je výrazně jednodušší v porovnání s vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií [23]. V mnoha aplikacích postačí pouze provést filtraci a ředění vzorku [24]. Další výhodou jsou minimální nároky na množství vzorku potřebného k analýze, což umožňuje provádění metabolomických studií na malých laboratorních organismech, nebo dokonce je možné monitorovat složení jediné buňky [25]. Spojení jednoduché úpravy biologického materiálu s velmi rychlou elektroforetickou separací představuje účinný analytický nástroj pro provádění klinických studií na velkých souborech vzorků [26]. Limitací elektroforetické analýzy metabolitů

je pouze používání spektrofotometrické detekce v UV/VIS oblasti spektra, která je standardní součástí komerčních elektroforetických přístrojů. Pouze báze nukleových kyselin a od nich odvozené látky, několik málo vybraných aminokyselin a nízkomolekulárních organických kyselin, poskytuje silnou odezvu při UV detekci a přímé použití fluorescenční detekce bez předřazené derivatizace vzorku, má ještě mnohem užší uplatnění [27]. Nadějným řešením tohoto problému je využívání i dalších detekčních technik pracujících na jiných fyzikálně-chemických principech, jako je i) univerzální  $C^4D$  vhodná pro detekci velmi širokého spektra nízkomolekulárních látek [28]; ii) laserem indukovaná fluorescence umožňující vysoce citlivou detekci na úrovni  $10^{-9} \text{ mol.l}^{-1}$  po předchozí derivatizaci [29]; iii) hmotnostní detekce pro citlivou detekci spojenou se strukturální charakterizací neznámých metabolitů [30].

## 1.2 Princip kapilární elektroforézy

Kapilární elektroforéza je jednou z nejjednodušších separačních metod. Je to především díky nesporné výhodě v podobě relativně jednoduché instrumentace, vysoké separační účinnosti a rychlosti separace, malé spotřebě vzorku, základního elektrolytu i ostatních chemikálií. Elementárním mechanismem kapilární elektroforézy je separace jednotlivých analyzovaných iontů, které vykazují rozdílnou pohyblivost v homogenním prostředí základního elektrolytu (BGE). Ionty jsou odděleny dle náboje, velikosti a tvaru. Elektroforetická rychlost iontu  $v_{el}$  je přímo úměrná elektroforetické pohyblivosti  $u_{el}$  a intenzitě elektrického pole  $E$ , respektive poměru vloženého napětí  $U$  a celkové délky kapiláry  $l_C$ , pak platí:

$$v_{el} = u_{el} \cdot E = u_{el} \cdot U/l_C \quad (1-3)$$

Elektroforetická pohyblivost plně disociovaného iontu  $i$ , nebo též iontová pohyblivost, závisí na základních fyzikálně chemických vlastnostech separačního prostředí podle vztahu:



$$u_{el} = \frac{q_i}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r_i} \quad (1-4)$$

kde  $q_i$  je náboj iontu,  $\eta$  je dynamická viskozita prostředí a  $r_i$  je poloměr velikosti iontu. Tento jednoduchý vztah platí pouze pro malé ionty o tvaru koule a pro složitější molekuly typu proteinů nebo nukleových kyselin se nahrazuje komplexnějšími vztahy. Z tohoto vzorce je zároveň patrné, že rychle budou migrovat malé ionty s velkým elektrickým nábojem. Je-li analyt slabým částečně disociovaným elektrolytem, charakterizuje se pomocí efektivní elektroforetické pohyblivosti  $u_{eff}$ , která je součinem iontové pohyblivosti příslušného analytu a stupně jeho disociace  $\alpha$ . V případě, že se jedná o slabou kyselinu s hodnotou disociační konstanty  $K_A$ , je efektivní mobilita závislá na pH separačního elektrolytu dle vzorce:

$$u_{eff} = u_{el} \cdot \alpha = u_{el} \cdot \frac{1}{1 + 10^{pK_A - pH}} \quad (1-5)$$

Jde-li o slabou zásadu, potom platí:

$$u_{eff} = u_{el} \cdot \alpha = u_{el} \cdot \frac{1}{1 + 10^{pH - pK_A}} \quad (1-6)$$

Z těchto vzorců vyplývá silná závislost efektivní elektroforetické pohyblivosti na pH separačního elektrolytu, která patří mezi hlavní parametry pro optimalizaci separačních podmínek.

### 1.2.1 Kapilára

Separace analytů v CE jsou prováděny v silnostěnných kapilárách nejčastěji vyrobených z taveného křemene (*fused silica*), které jsou na povrchu potaženy tenkou vrstvou polyimidu. Vrstva polyimidu dodává kapiláře pevnost a pružnost, což umožňuje snadnou manipulaci s jinak křehkým křemenným materiálem. Kapiláry se vyrábějí o různých vnitřních průměrech ( $d$ ) nejčastěji mezi 5 - 150  $\mu\text{m}$ , vnější průměr se pohybuje kolem 360  $\mu\text{m}$ , ale existují i slabostěnné kapiláry o vnějším průměru 150  $\mu\text{m}$ , [http://www.cmscientific.com/glass\\_capillaries.php](http://www.cmscientific.com/glass_capillaries.php). Celková délka kapiláry se pohybuje

v rozmezí od cca cca 31,5 cm (minimální délka kapiláry pro na trhu nejběžnější elektroforetický přístroj od firmy Agilent) po cca 100 cm. Při používání laboratorních *home-made* elektroforéz lze celkovou délku kapiláry snížit až na cca 10 cm [26, 31, 32]. Před instalací do přístroje je kapilára nejprve zkrácena na požadovanou délku pomocí keramického nože a precizně jsou seříznuty oba její konce do kolmých hran, což je nezbytné pro dosažení vysoké reprodukovatelnosti hydrodynamického dávkování. Pro použití spektrofotometrické detekce je ještě potřeba v pozici detektoru na několika milimetrech délky kapiláry odstranit vnější polyimidovou vrstvu z důvodu optické nepropustnosti tohoto materiálu.

Vnitřní povrch křemenné kapiláry velmi často podléhá chemicko-fyzikálním změnám a mezi nejčastější patří adsorpce celé řady látek na tento vnitřní povrch, náchylné jsou zejména proteiny. Takto vyvolané změny ve složení vnitřního povrchu vedou k nestabilitě elektroosmotického toku, k rozmývání píku v důsledku adsorpce, což ve finále sníží reprodukovatelnost migračních časů a zároveň sníží separační účinnost. Z těchto důvodů se pro řadu aplikací vnitřní povrch kapiláry pokrývá látkami typu polyakrylamid, polyvinylalkohol, polyethylenglykol a jinými [11, 33]. Vnitřní povrch křemenné kapiláry ovšem také disociuje, což je příčinou vzniku důležitého transportního jevu běžně pozorovaného v kapilárách a označovaného jako elektroosmotický tok (EOF) [34]. Silanolové skupiny Si-OH na vnitřním povrchu disociují na Si-O<sup>-</sup>, čímž na povrchu kapiláry vzniká permanentní negativní náboj. Tento náboj je pouze částečně odstíněn pevně adsorbovanou vrstvou kationtů ze separačního elektrolytu [35]. Zbytek kationtů odstíňujících povrchový náboj se již nachází dále od povrchu kapiláry v tzv. pohyblivé difúzní zóně, která se po aplikaci separačního napětí začne pohybovat ve směru migrace kationtů a hydratované ionty s sebou strhávají i celý roztok nacházející se uvnitř kapiláry. Tímto procesem je celý roztok uvnitř kapiláry o malém vnitřním průměru transportován ve směru pohybu kationtů a tento fyzikální jev je označován jako EOF. Důsledkem existence EOF je: i) pohyb kationtů součtem elektroforetické rychlosti a rychlosti EOF; ii) elektroneutrální látky se

pohybují rychlostí EOF a od sebe se neseparují; iii) rychlost pohybu aniontů je rozdílem mezi elektroforetickou rychlostí a rychlostí EOF; z toho zároveň vyplývá, že do detektoru domigrují pouze anionty, jejichž elektroforetická rychlost je menší než rychlost EOF.

EOF tak nepřispívá k separaci analytů, ale pouze urychluje jejich pohyb. Rychlostní profil EOF je navíc kolmý v porovnání s parabolickým tlakovým profilem a nezpůsobuje rozmývání elektroforetických zón. Hodnota  $pK_A$  silanolových skupin je kolem 5,5 a rychlý EOF je pozorován v bazických separačních elektrolytech, zatímco v kyselých je pomalý [33, 36, 37].

### **1.2.2 Negativní jevy uplatňující se při CE separaci**

Na CE separaci negativně působí Jouleovo teplo, difúze a elektrodisperze. Uvedené vlivy mohou být potlačeny optimálně zvolenými experimentálními podmínkami. Jouleovo teplo vzniká působením elektrického proudu procházejícího vodivým BGE uvnitř kapiláry, které je zároveň jejím povrchem odváděno. Množství produkovaného tepla je úměrné druhé mocnině poloměru kapiláry, vodivosti BGE a intenzitě elektrického pole. Teplotní gradient mezi středem a stěnou kapiláry způsobuje rozdíly ve viskozitě BGE a vede k deformaci rovného rychlostního profilu EOF, což má za následek nežádoucí rozmývání zón analytu. Odvod Jouleova tepla může být účinně regulován za použití kapilár s malým vnitřním průměrem, snížením intenzity elektrického pole, snížením vodivosti BGE a účinnějším odvodem Jouleova tepla. Obecně platí, že nejméně tepla je generováno v kapilárách s malými vnitřními průměry, jimiž teče malý elektrický proud daný vysokým odporem elektrolytu v těchto kapilárách.

Analyty při CE separaci migrují kapilárou v zónách, na jejichž rozhraní je ostrý koncentrační spád způsobující rozmytí zóny analytu vlivem difúze. Difúze vede ke snížení separační účinnosti

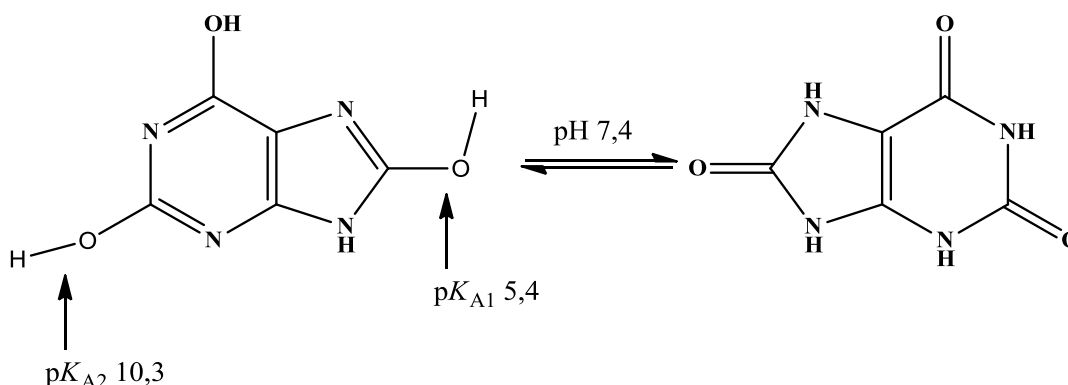
a vzniku Gaussovských píků. Vliv difúze lze účinně potlačit zkrácením migračního času a snížením teploty uvnitř kapiláry prostřednictvím účinného odvodu Jouleova tepla.

Vlivem elektrodisperze dochází k nerovnoměrnému rozmývání zón s následkem vzniku trojúhelníkovitých píků. Diference mezi vodivostmi zóny vzorku a okolního separačního elektrolytu vede k rozdílnému rozložení elektrického separačního pole v obou zónách. Má-li zóna vzorku vyšší vodivost (elektroforetická pohyblivost iontů analytu je vyšší než pohyblivost iontů stejného znaménka pocházejících ze separačního elektrolytu, tzv. co-ionty), ustanoví se z důvodu platnosti Ohmova zákona na zóně vzorku nižší intenzita elektrického pole v porovnání s okolním BGE; v důsledku toho ionty analytu pronikající ve směru migrace do zóny BGE o vyšší intenzitě elektrického pole, kde jsou následně v BGE urychleny a toto rozhraní se rozmývá. Naopak ionty difundující do zóny BGE v protisměru migrace jsou vlivem větší intenzity elektrického pole taženy zpět, čím vzniká ostré rozhraní. Konečným důsledkem je trojúhelníkový frontující pík. Pro ionty analytu s nižší pohyblivostí, než je pohyblivost co-iontů BGE, dochází k opačnému efektu a na elektroferogramu se zobrazují jako trojúhelníkovité chvostující píky.

## 2 Vývoj elektroforetických postupů pro rychlé monitorování kyseliny močové a kreatininu pro klinické účely

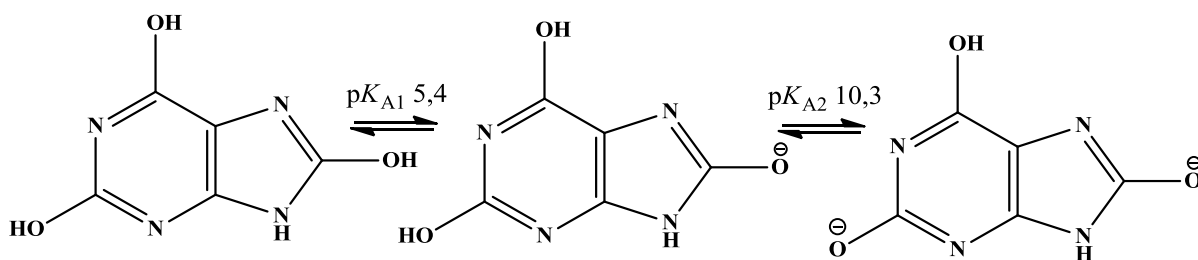
### 2.1 Chemické vlastnosti kyseliny močové

Systematickým názvem 2,6,8-trioxypurin je triviálně a běžně označována kyselina močová. Strukturně je odvozena od dusíkatého heterocyklu purinu, jehož primární skelet je tvořen šestičlenným pyrimidinovým a pětičlenným imidazolovým kruhem. Heterocyklická kyselina močová s molární hmotností  $168,11 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$  se vyskytuje ve dvou izomerních formách – keto- a enol-formě, které jsou za fyziologických podmínek v rovnováze, viz Obr. 2.1.



**Obr. 2.1** Izomerní formy kyseliny močové při fyziologickém pH.

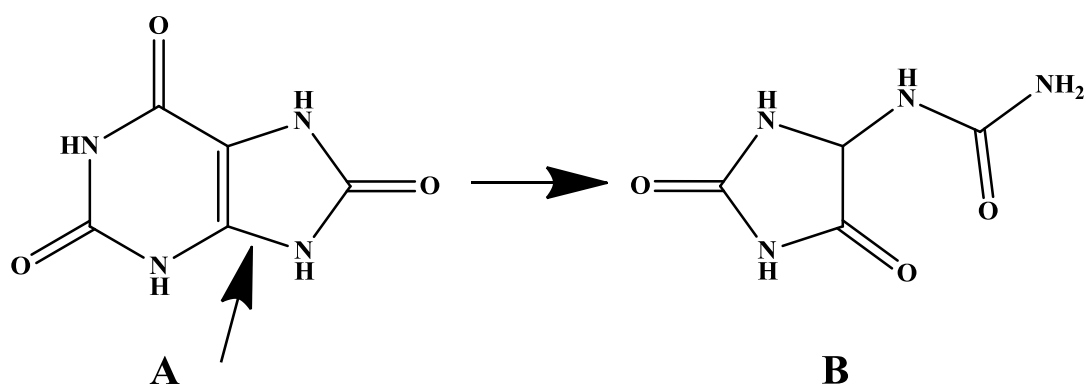
Z acidobazického hlediska je kyselina močová slabou dvojsytnou kyselinou s hodnotami disociačních konstant,  $pK_{A1} = 5,4$  a  $pK_{A2} = 10,3$ ; Obr. 2.2. Kyselina močová je málo rozpustná ve vodě (s hodnotou rozpustnosti  $0,064 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ ) a téměř nerozpustná v éteru, methanolu a ethanolu. Dobrou rozpustnost naopak vykazuje v glycerolu a vodných alkalických roztocích hydroxidů, uhličitanů, octanů a fosforečnanů [38].



**Obr. 2.2.** Disociace dvojsytné kyseliny močové při  $pK_{A1} = 5,4$  a  $pK_{A2} = 10,3$ .

## 2.2 Biochemické a fyziologické vlastnosti kyseliny močové

Kyselina močová (obr. 2.3A) je u člověka a primátů konečným metabolitem purinů, které jsou součástí nukleových kyselin a řady koenzymů (ATP,  $NAD^+$  aj.). Ostatní savci ji dále přeměňují na alantoin (obr. 2.3B). Malé množství alantoinu lze prokázat i v krvi člověka, kde je ukazatelem zátěže organismu volnými radikály, jejichž účinkem na kyselinu močovou vzniká alantoin. Celkový pool kyseliny močové činí kolem 1 g a denní obrat tvoří asi 60 %. V lidském organismu se kyselina močová nachází v krvi (ve volné i vázané formě na plasmatické proteiny jako je albumin nebo specifický globulin), moči, synoviální tekutině, sekretu dýchacích cest a v kolostru [39, 40].

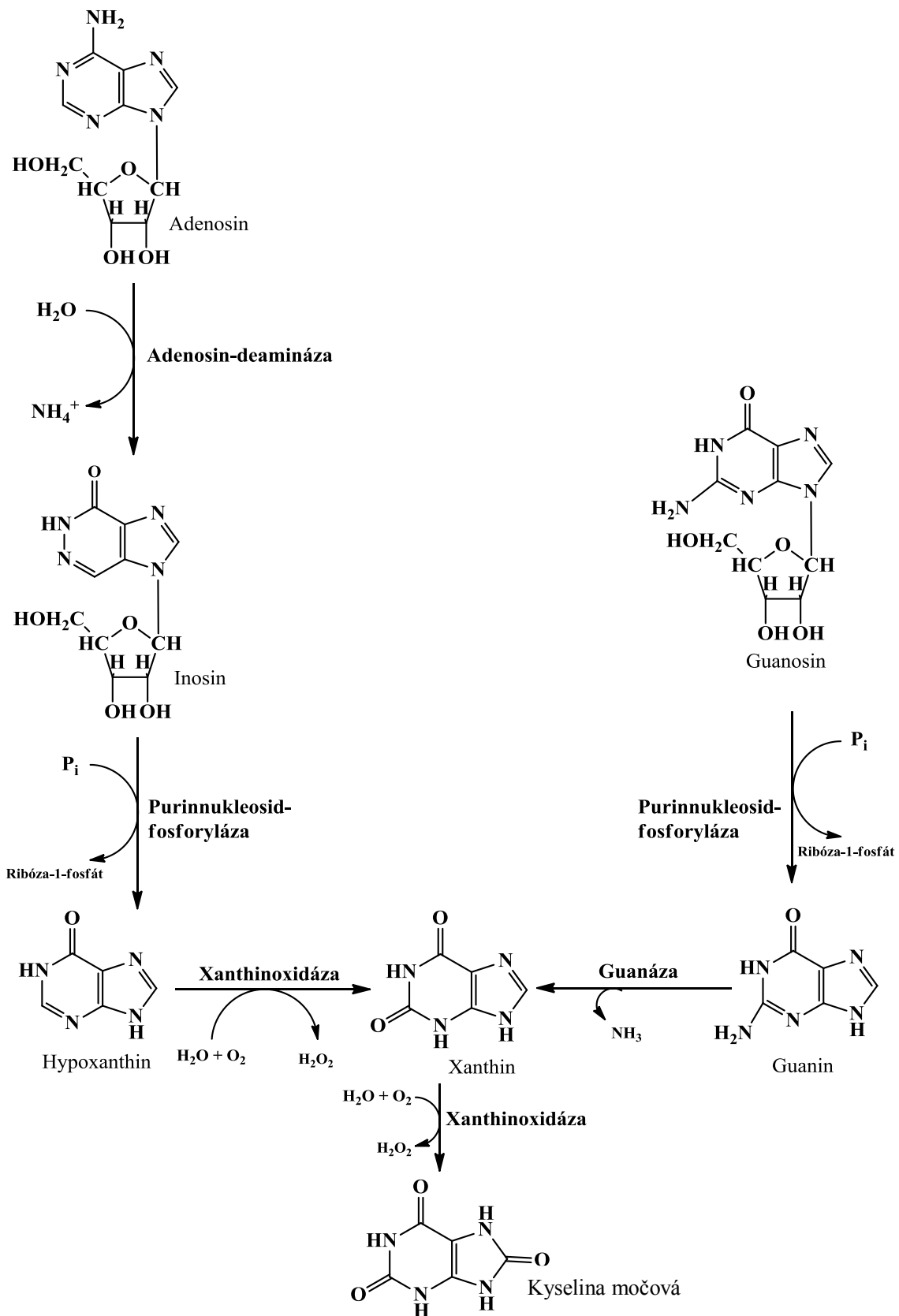


**Obr. 2.3.** Přeměna kyseliny močové (A) na alantoin (B) s označením štěpení imidazolového kruhu.

Při fyziologickém pH krve 7,4 je nedisociovaná kyselina močová přítomna pouze v malém množství, převládá ionizovaná forma v podobě monosodné soli, neboli mononatrium-urát. Poměr mezi nedisociovanou formou a disociovaným urátem je v tělních tekutinách závislý na pH. Rozpustnost volné kyseliny močové při 37 °C je 64 mg.l<sup>-1</sup> (381 μmol.l<sup>-1</sup>), rozpustnost urátů je 84 mg.l<sup>-1</sup> (500 μmol.l<sup>-1</sup>). Pokud je hladina kyseliny močové v séru vyšší, než je její rozpustnost, stává se sérum přesyceným roztokem kyseliny močové, což za určitých podmínek vede ke krystalizaci mononatrium-urátu. Referenční rozmezí kyseliny močové v séru je u dospělých lidí závislé na pohlaví a věku [40-42]. U mužů se pohybuje v rozmezí 180 – 420 μmol.l<sup>-1</sup> a u žen mezi 120 – 350 μmol.l<sup>-1</sup>. V moči je celková koncentrace kyseliny močové podstatně vyšší, a to 1,5 – 4,8 mmol.l<sup>-1</sup>.

### **2.3 Metabolismus kyseliny močové v lidském těle**

Syntéza kyseliny močové je potažmo katabolickou drahou metabolismu purinových nukleotidů (nukleotid = nukleosid + fosfát; nukleosid = báze + monosacharid): adeninové nukleotidy jsou metabolizovány přes nukleosidy adenosin a inosin až na hypoxanthin. Guaninové nukleotidy se odbourávají přes guanosin a guanin za vzniku xanthinu. Hypoxanthin a xanthin jsou heterocyklické dusíkaté báze odvozené od struktury purinu. Enzym xanthinoxidáza katalyzuje obě poslední reakce syntézy kyseliny močové, tj. oxiduje hypoxanthin na xanthin a následně xanthin na kyselinu močovou, viz Obr. 2.4.



Obr. 2.4. Schematické znázornění metabolismu kyseliny močové v lidském těle.



Při této reakci mohou vznikat i reaktivní superoxidové radikály a peroxid vodíku. Kyselina močová nevzniká pouze z *de novo* syntetizovaných purinových bází, ale rovněž nukleotidů získaných z potravy a z rozpadu tkáňových nukleoproteinů [41, 43]. Játra, střevní sliznice a mléčná žláza jsou tkáně, které vykazují vysokou aktivitu xanthinoxidázy a jsou primárním místem degradace purinů a vzniku kyseliny močové. Naopak syntéza purinů probíhá i ve všech ostatních tkáních. Průměrná denní exkrece kyseliny močové se u zdravého jedince pohybuje mezi 0,4 – 0,8 g/24 hodin a více jak 50 % z této hodnoty pochází z degradace endogenních purinů. Exogenně přijímané puriny (přítomny hlavně v buněčných jádrech, v potravě tedy nejvíce v mase) jsou metabolizovány zejména ve střevní sliznici. Resorpce do enterocytů je poměrně snadná za kompletní oxidace na kyselinu močovou, která je katalyzovaná enzymem xanthindehydrogenázou. Xanthinoxidáza i xanthindehydrogenáza jsou dvě formy téhož enzymu odlišující se konečným akceptorem elektronů. Xanthindehydrogenáza předává po oxidaci elektrony na  $\text{NAD}^+$ , xanthinoxidáza na  $\text{O}_2$ . Kyselina močová přechází z jater, střevní sliznice a mléčné žlázy do krve, kde je přítomna především jako sodná sůl mononatrium-urát. Exkrece kyseliny močové z organismu probíhá ze tří čtvrtin ledvinami a přibližně z jedné třetiny trávicím traktem. Kyselina močová ze slin, žaludeční sekrece, žluči a pankreatických šťáv je v tlustém střevu degradována bakteriální intestinální urikolýzou až na amoniak a oxid uhličitý [44, 45].

#### **2.4 Antioxidační vlastnosti kyseliny močové**

Kyselina močová není pouze odpadním metabolitem, ale zastává i významnou funkci v organismu při antioxidační ochraně biomolekul proti nepříznivým účinkům volných radikálů a oxidantů, a její podíl na celkové antioxidační kapacitě krevní plazmy dosahuje až 65 %. Je to způsobeno tím, že plasmatické koncentrace kyseliny močové jsou vysoké a několikanásobně převyšují koncentrace ostatních extracelulárních antioxidantů. Plasmatické

proteiny představují 10 - 50 % a kyselina askorbová maximálně 24 % z celkové antioxidační kapacity. Mechanismus antioxidačního působení kyseliny močové je založen na schopnosti kyseliny močové vytvářet stabilní koordinační komplexy s dvojmocnými ionty železa a jednomocnými ionty mědi, čímž zabraňuje průběhu Fentonovy reakce a vzniku hyper-reaktivního hydroxylového radikálu. Hydroxylový radikál představuje velmi reaktivní částici, která v živé hmotě okamžitě reaguje s okolními biomolekulami (nenasyčenými mastnými kyselinami, aminokyselinami a bázemi nukleových kyselin), které po oxidaci ztrácí svoji biogenní funkci. Kyselina močová dále přímo reaguje s volným hydroxylovým či peroxidovým radikálem nebo oxidem dusnatým, přijímá od nich nepárový elektron, čímž je eliminuje, a sama se tím mění na urátový aniontový radikál, který je pro organismus mnohem méně nebezpečný a nakonec je účinně vychytáván kyselinou askorbovou. Při těchto oxidačních pochodech se část kyseliny močové neenzymaticky přeměňuje na allantoin. Některé studie však naznačují, že kyselina močová při vysokých intracelulárních koncentracích naopak působí prozánětlivě a prooxidačně. Při syntéze kyseliny močové se jako vedlejší produkt uvolňuje velmi reaktivní superoxid a dále za jejích zvýšených koncentrací dochází při reakcích s oxidanty ke vzniku následných radikálů, které poškozují především lipidy (LDL a biologické membrány) [44, 46, 47].

## **2.5 Hladina kyseliny močové v séru a moči**

Hladina kyseliny močové v séru (urikémie) je závislá na pohlaví i na věku jedince. Rozdíly mezi pohlavími jsou zřetelné od pubertálního věku, ale ani u dětí nejsou zcela vyrovnané, viz Tabulka 2.1. V pubertě dochází u mužů k vzestupu urikémie, která již během dalšího života téměř nekolísá a pohybuje se v intervalu 190 – 440  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ . U žen je změna urikémie během puberty minimální a začíná se zvyšovat až kolem 20. roku a poté je až do menopauzy

(kolem 45. roku) konstantní a zároveň o 30 – 60  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  nižší než u mužů. V menopauze se urikémie zvyšuje a dosahuje mužských hodnot. Toto zvýšení lze vysvětlit jako kompenzaci úbytku estrogenů a jejich antioxidačních účinků. Vedle toho vykazuje urikémie i fluktuace v průběhu dne a u většiny zdravých osob je obvykle vyšší ráno a nižší večer; mezidenní fluktuace dosahují až 10 %. Naopak koncentrace kyseliny močové v moči je silně závislá na stravě [48, 49]. Při normální dietě dosahuje hodnot  $\leq 4,76 \text{ mmol.l}^{-1}$ , zatímco při redukované dietě je její hladina  $\leq 3,46 \text{ mmol.l}^{-1}$ .

**Tabulka 2.1.** Referenční hodnoty kyseliny močové u dětí a dospělých v séru a plazmě.

Sérum / plazma	Koncentrace $\mu\text{mol.l}^{-1}$	
<b>Dospělí</b>	<b>Ženy</b>	<b>Muži</b>
	137 – 363	214 - 488
<b>Děti</b>		
0 – 5 dnů	113 – 470	113 - 470
1 – 4 let	101 – 303	131 - 340
5 – 11 let	178 – 381	178 - 381
12 – 14 let	190 – 363	190 - 440
15 – 17 let	180 – 381	268 - 482

## 2.6 Patobiochemie kyseliny močové

Porucha metabolismu kyseliny močové souvisí se vznikem řady onemocnění, především se vznikem močových či ledvinových kamenů nebo s onemocněním zvaném dna, Lesch-Nyhanův syndrom aj. Její zvýšená koncentrace v organismu (hyperurikémie) může indikovat hypertenzi, kardiovaskulární a ledvinné onemocnění. Mezi závažné poruchy patří:

## 2.6.1 Hyperurikémie a její příčiny

Hyperurikémie je diagnostikována jako zvýšená hladina kyseliny močové v séru. Je důsledkem disbalance mezi vznikem z endo- i exogenních purinů, aktuální plasmatickou koncentrací a její exkrecí. Biochemický nález hyperurikémie je diagnostikován až u 30 % mužů a zhruba u 3 % žen ve středním věku, u dětí je vzácný. Za hraniční koncentraci kyseliny močové je považována hladina vyšší než  $420 \mu\text{mol.l}^{-1}$  u mužů a  $350 \mu\text{mol.l}^{-1}$  u žen. K hyperurikémii dochází na podkladě získaných dědičně podmíněných onemocnění, ale i dietních stereotypů. Velmi často se jedná o souhru více činitelů. Včasné odhalení zvýšené hladiny kyseliny močové v séru je důležité u mnoha patologických stavů, jako je poškození ledvin a vývodných cest močových, dědičné metabolické poruchy, kardiovaskulárního onemocnění včetně hypertenze a také diabetes mellitus II. typu.

Hyperurikémie může být primárním i sekundárním faktorem poškození ledvin. Vysrážení kyseliny močové v ledvinách a vývodných cestách močových je spojeno se vznikem nefropatie doprovázené urolitiázou a urátovou nefropatií. Při nefropatii doprovázené urolitiázou dochází k vysrážení urátu ve sběrných kanálcích, ledvinné pánvičce a močovodu. Následkem je snížená reabsorpce doprovázená zvýšenou exkrecí kyseliny močové močí. Při chronické hyperurikémii dochází ke vzniku urátové urolitiázy, tj. ke vzniku konkrementů z kyseliny močové a jejích solí ve vývodných cestách močových a ledvinách. Urátové kameny jsou složeny z drobných krystalků kyseliny močové, jenž jsou zbarveny močovými pigmenty od žluto-oranžové až do hnědé. Vyznačují se skelným leskem. Vznik urátových kamenů je kromě hyperurikémie podmíněn především nízkým pH moči. Krystaly kyseliny močové a urátů lze nalézt asi u 10 % pacientů s močovými kameny. U urátové nefropatie dochází k precipitaci mononatrium-urátu v intersticiu ledvin a je spojeno se zánětem a poškozením glomerulární filtrace s častým doprovodem hyperurikémie, hypertenze a proteinurie [50, 51].

### **2.6.2 Lesch-Nyhanův syndrom**

Lesch-Nyhanův syndrom je dědičné metabolické onemocnění způsobené kompletním deficitem enzymu hypoxanthin-guaninfosforibosyltransferázy (HPRT), které je X-recesivně vázané s výskytem pouze u chlapců. Ztrátou aktivity hypoxanthin-guaninfosforibosyltransferázy dochází k poruše recyklační dráhy v metabolismu purinů a zároveň ke zvýšení koncentrace intracelulárního intermediátu; 5-fosforibosyl-1-difosfátu, který je následně během recyklační dráhy spotřebováván. Výsledkem je nadměrné odbourávání i nadměrná tvorba purinových látek. Klinicky je syndrom manifestován hyperurikémií spojenou se závažnými neurologickými projevy. Zvýšené vylučování kyseliny močové lze prokázat bezprostředně po narození červeno-oranžovým zbarvením moči, jehož příčinou jsou vysrážené krystaly kyseliny močové. Kolem 3. až 4. měsíce života chlapců dochází k prvním neurologickým projevům, zejména k retardaci v celkovém psychomotorickém vývoji [50, 52].

### **2.6.3 Dnavá artritida**

Dnavou artritidou neboli dnou je označováno chronické metabolické onemocnění způsobené ukládáním mononatrium-urátu do synoviální kloubní tkáně (dnavá artritida) anebo ledvinného parenchymu (dnavá nefropatie) [53]. Dnavá artritida je poruchou metabolismu purinů. Hladina kyseliny močové v séru je u dny zvýšená (nad  $400 \mu\text{mol.l}^{-1}$ ) a její krystalky se ukládají v různých měkkých, zejména kloubních tkáních s následkem pohybových obtíží. Zvýšená koncentrace urátů v moči může vést k rozvoji urátové urolitiázy. Klinický obraz akutní dny je charakteristický a známý byl již starověkým lékařům. Jedná se o první popsanou revmatickou chorobu spojenou se zvýšeným přísunem masa a nadměrným pitím alkoholu. Dna byla středověkými lékaři a kronikáři často nazývána „nemocí králů“.

#### **2.6.4 Vliv kyseliny močové na hypertenzi a diabetes mellitus II. typu**

Přímá souvislost mezi zvýšenou hladinou kyseliny močové a hypertenzí u pacientů trpících dnou je velmi dobře známa. Nově byl sledován vztah mezi hladinou kyseliny močové, insulinovou resistencí a hypertenzí u mladých žen. Ukázalo se, že hyperurikémie může souviset s rozvojem insulinové rezistence spojené s rozvojem diabetes mellitus II. typu. Kyselina močová se přímo podílí na vzniku insulinové rezistence potlačením syntézy endoteliálního oxidu dusnatého (NO<sup>•</sup>), jehož nedostatek následně blokuje působení inzulínu [54]. Inzulínová rezistence v dalším kroku navozuje hypertenzi.

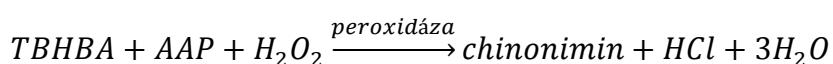
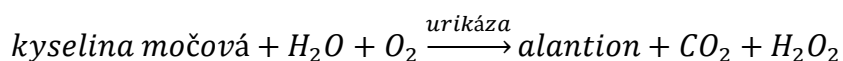
#### **2.6.5 Metody stanovení kyseliny močové**

V klinické praxi se stanovení kyseliny močové v moči a séru rutinně provádí enzymatickými metodami. Stanovení v krevní plazmě se provádí pouze omezeně. Jako antikoagulační látka nesmí být použita kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA), která inhibuje enzym urikázu, čímž dochází k falešně nízkým hodnotám. Nejběžnější z enzymatických metod využívá oxidace kyseliny močové molekulárním kyslíkem za katalýzy enzymem urikázou. Využít lze však i řadu dalších metod: a) voltametrické stanovení na uhlíkové pastové elektrodě modifikované nanočásticemi palladia uloženými v nanovláčkách uhlíku [55], b) ampérometrické stanovení na zlaté pracovní elektrodě pokryté membránou z polystyrenu s ukotvenou urikázou pro měření kyseliny močové i za přítomnosti kyseliny askorbové, která je interferujícím činitelem [56], c) vysoce účinná kapalinová chromatografie [57], d) kapilární elektroforéza a elektroforéza na mikročipu [38, 58, 59].

## 2.7 Stanovení kyseliny močové pomocí urikázového testu

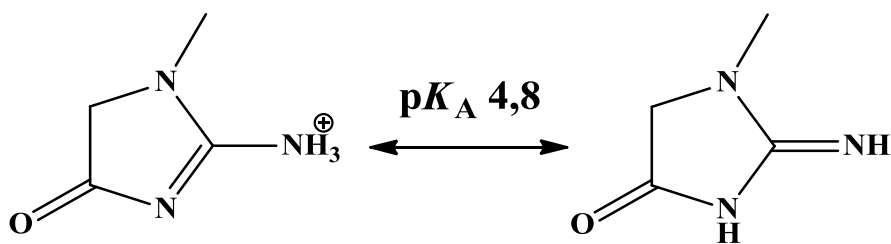
Enzymatické metody pro stanovení kyseliny močové jsou vysoce specifické a v klinické praxi hojně využívané jako rychlá, levná a poměrně přesná stanovení, která nevyžadují náročné instrumentální vybavení a vysoce specializovanou obsluhu. Principiálně jsou založeny na oxidaci kyseliny močové za katalýzy enzymem urikázou za vzniku alantoinu, oxidu uhličitého a peroxidu vodíku. Pro určení koncentrace kyseliny močové ve vzorku je možné využít dvou rozdílných přístupů:

- a) Přímé měření poklesu absorpance kyseliny močové při vlnové délce 293 nm,
- b) Měření vzniklého peroxidu vodíku, který reaguje v prostředí fosfátového pufru obsahujícího 2,4,6-tribrom-3-hydroxybenzoovou kyselinu (TBHBA) a 4-aminoantipyrin (AAP) za vzniku červeně zbarveného chinoniminového komplexu, který se stanovuje fotometricky a intenzita zbarvení je úměrná koncentraci kyseliny močové. Měření probíhá spektrofotometricky při vlnové délce 550 nm po 5 minutové inkubaci při teplotě 37 °C a pH = 7,0 [38, 48].



## 2.8 Chemické vlastnosti kreatininu a jeho klinický význam

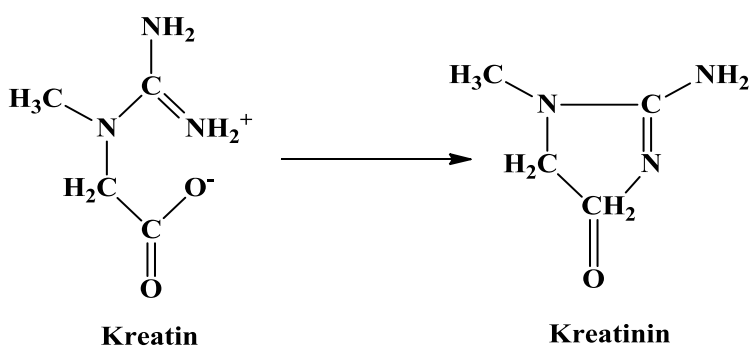
Kreatinin je cyklickým imidem kreatinu a vzniká ve svalech vnitřní ireverzibilní neenzymovou dehydratací a odštěpením fosfátu z kreatinfosfátu, který slouží ve svalu jako zdroj energie pro svalovou kontrakci. V systematickém názvosloví je kreatinin označován jako **2-amino-1-methyl-2-imidazolin-4-on** s molekulovou hmotností 113,12 g.mol<sup>-1</sup> a kyselou disociační konstantou pK<sub>A</sub> 4,8. Kreatinin ve vodných substancích disociuje dle Obr. 2.5.



**Obr. 2.5.** Disociace kreatininu.

### 2.8.1 Syntéza a exkrece kreatininu

Kreatinin je heterocyklickým imidem důležité biogenní molekuly kreatinu. Kreatin je ve svalovině fosforylován enzymem kreatinkinázou na kreatinfosfát a tento systém funguje jako pufr hladiny ATP pro svalový stah a při namáhavé fyzické práci je schopen udržet konstantní hladinu ATP po několik sekund. Kreatin i kreatinfosfát jsou nestabilní molekuly a jejich samovolným neenzymatickým rozpadem vzniká odpadní kreatinin, viz Obr. 2.6. Tato látka již nemá biologickou funkci a je vylučována z těla močí.

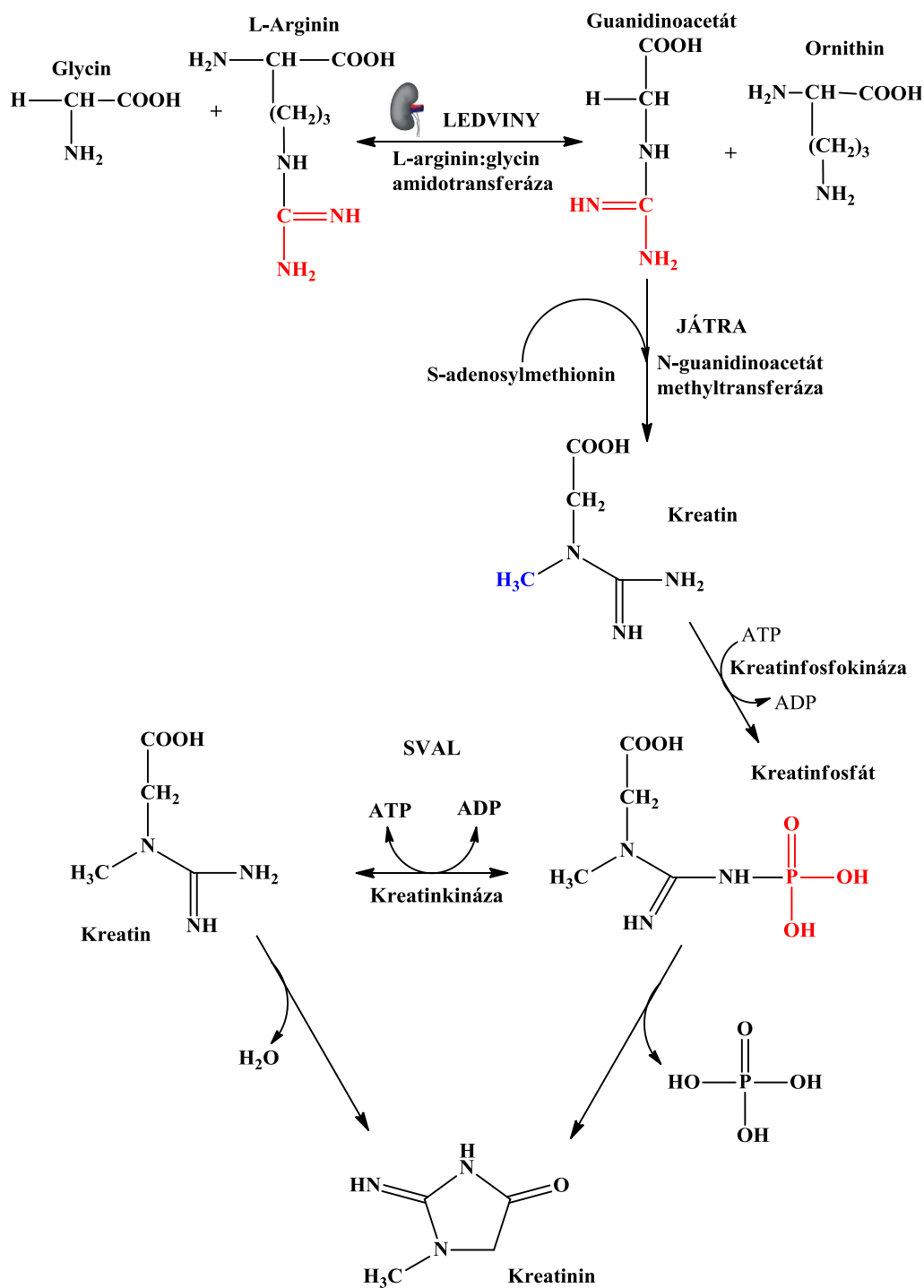


**Obr. 2.6.** Neenzymatická přeměna kreatinu na kreatinin.

Syntéza kreatinu začíná v ledvinách, kde je na aminokyselinu glycin přenesena guanidová skupina z argininu za vzniku guanidinacetátu. Guanidinacetát je transportován krví do jater, kde dochází k methylaci amidinové skupiny za vzniku kreatinu; donorem methylu je



S-adenosylmethionin. Ve vodě dobře rozpustný kreatin je následně transportován do svalů, kde je opakovaně fosforylován na kreatinfosfát, viz Obr. 2.7.



Obr. 2.7. Schematické znázornění syntézy kreatininu v lidském těle.

Zhruba 2 % kreatinfosfátu je denně cyklizováno na kreatinin, který je z těla vyloučen jako odpadní látka. Produkce a vylučování kreatininu jsou za normálních okolností rovnocenné. Veškerý kreatinin přefiltrovaný glomerulární filtrací v ledvinách je z těla vyloučen močí, protože nedochází k jeho zpětné resorpci v tubulech. Množství vyloučeného kreatininu je závislé na množství svalové hmoty, správné funkci ledvin a jeho exogenním příjmu potravou v podobě masa a mastných výrobků [60-62]. Biologický poločas plasmatického kreatininu je velmi krátký, cca 2,5 hodiny.

### **2.8.2 Variabilita kreatininu**

Cirkadiální rytmus výrazně ovlivňuje plasmatickou hladinu kreatininu. Nejvyšší koncentrační hodnoty jsou nalezeny večer, nízké ráno s rozdílem až 50 % v závislosti na fyzické aktivitě. U žen jsou koncentrace kreatininu v séru ( $50 - 90 \mu\text{mol.l}^{-1}$ ) cca o 15 % nižší než u mužů ( $62 - 115 \mu\text{mol.l}^{-1}$ ). Rozdíl je dán konstitučně a závisí na objemu svalové hmoty. O poznání nižší koncentrace kreatininu se nacházejí u dětí ve věku od 1 do 15 let:  $27 - 62 \mu\text{mol.l}^{-1}$ . Z mezidenního hlediska kolísá hladina kreatininu v rozmezí až 10 %. Patologické koncentrace kreatininu mají celou řadu příčin. Nízké hladiny plasmatického kreatininu jsou v důsledku zvýšené rychlosti glomerulární filtrace pozorovány v průběhu těhotenství a při léčbě glukokortikoidy. Odrazem nízkých hladin je i dlouhodobá imobilizace pacienta spojená se svalovou atrofií a také výživa chudá na proteiny. Vyšší hodnoty kreatininu jsou naopak způsobeny sníženou exkrecí ledvinami, která je vyvolána z celé řady příčin jako je nefróza, vrozené anomálie ledvin, snížené množství fungujících nefronů, infekce, ledvinové kameny, snížené prokrvení ledvinných tepen a žil následkem užívání léků omezující glomerulární filtraci. Zvýšené koncentrace kreatininu v důsledku zvýšené endogenní syntézy jsou nalezeny především

u polytraumat a pooperačně, kdy došlo k rozsáhlému poškození svalové hmoty. Nejvyšších hladin kreatininu je dosaženo při chronickém poškození ledvin [63-65].

### 2.8.3 Klinický význam stanovení kreatininu

Stanovení hladiny kreatininu v krvi a moči slouží k monitorování intenzity glomerulární filtrace, jež přímo zrcadlí funkci ledvin. Měření glomerulární filtrace, tedy množství krve profiltrované v ledvinných glomerulech za určitý časový úsek, je běžně používanou metodou, která má stěžejní význam pro sledování stavu funkce ledvin. Nedostatečnost nebo selhání ledvin je určena především poklesem glomerulární filtrace, která se projevuje zvýšenou plasmatickou a naopak sníženou hladinou kreatininu v moči. Glomerulární filtrace je nejnázne stanovena pomocí látek, které se vylučují pouze glomerulární filtrací a nejsou zpětně resorbovány. Proto lze snadno provést odhad glomerulární filtrace, který je založen na měření hodnot kreatininu. Změna hladiny kreatininu v krvi může být zapříčiněna uvolněním kreatininu ze svalů při akutním rozpadu svalové hmoty. Pro sledování správné funkce ledvin a svalů slouží monitorování clearance endogenního kreatininu, frakční exkrece, tubulární resorpce a glomerulární filtrace.

Clearance endogenního kreatininu je objem plasmy v mililitrech ( $V_p$ ), který je za časovou jednotku (sekunda) očištěna ledvinami od kreatininu. Toto funkční vyšetření ledvin informuje o rychlosti glomerulární filtrace v jednotkách  $\text{ml}\cdot\text{s}^{-1}$ . Stanovení kreatininové clearance vychází z hypotézy, že v případě kreatininu dochází k jeho úplné glomerulární filtraci a zároveň není zpětně resorbován v tubulech. K výpočtu kreatininové clearance je nutno znát koncentraci kreatininu v plasmě ( $c_p$ ) a v moči ( $c_m$ ) a objem moči ( $V_m$ ) vyprodukované v časovém intervalu ( $t_k$ ); obvykle se sbírá moč po dobu 24 hodin, ale je možné provádět i frakcionované sběry po 3, 4 nebo 5 hodinách. Množství vyloučeného kreatininu odpovídá množství profiltrované plazmy, dle rovnice 2-1.

$$V_p = c_m / c_p \cdot V_m / t_k \quad (2-1)$$

Role kreatininu v diagnostice dědičných metabolických poruch je významná, a to především z důvodu korelace většiny stanovovaných analytů v moči (organické kyseliny, aminokyseliny, puriny a pirimidiny aj.) na jednotkovou koncentraci kreatininu.

Další významný kalkulovaný parametr, Kaufmanův koeficient (poměr kyseliny močové vztažený na množství kreatininu v moči) je v dnešní době nezbytný při stanovení hyper/hypourikosurií souvisejících s dědičnými poruchami purinového a pyrimidinového metabolismu a stádavými onemocněními. Zvýšený Kaufmanův koeficient je nalézán u částečného i kompletního deficitu hypoxanthin-guanin fosforibosyltransferázy související s Lesch-Nyhanovým syndromem. Dále při zvýšené aktivitě fosforibosylpyrofosfát syntetázy, jaterní a svalové glykogenázy I. a VII. typu (intolerance k fruktóze) a také při deficitu uridinmonofosfátsyntázy. Naopak číselně nižší Kaufmanův koeficient je patrný u deficitu purinnukleosidfosforylázy, xanthindehydrogenázy, kombinovaného deficitu xanthin dehydrogenázy a sulfitoxidázy a při zvýšené aktivitě buněčné nukleotidázy. V případě dědičných metabolických onemocnění metabolismu kreatinu se jako majoritní diagnostický nástroj využívá magnetické rezonance, a to díky specifickému spektru, které jasně zachycuje deficit kreatinu a kreatinfosfátu ve svalech a mozku. Toto náročné stanovení enzymové aktivity nebo mutačních screeningů je možno využít i pro stanovení kreatininu v tělních tekutinách [65-67].

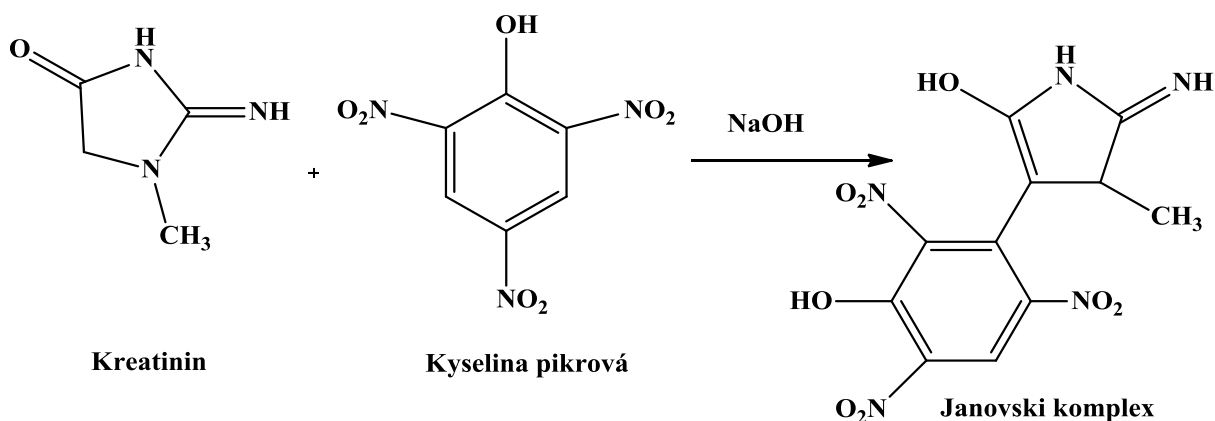
#### **2.8.4 Metody stanovení kreatininu**

Stanovení koncentrace kreatininu má význam při sledování poruch funkce ledvin a je nejčastěji prováděno Jaffého kolorimetrickou metodou. Kromě ní lze kreatinin stanovit pomocí enzymatické metody a dále celou řadou dalších chromatografických technik, jako je kapalinová

chromatografie s UV detekcí (HPLC-UV) [68], vysokoúčinná papírová chromatografie (HPTLC) [69], plynová chromatografie s hmotnostní detekcí (GC-MS) [70] a kapilární elektroforéza (CE) [71-73].

#### **2.8.4.1 Stanovení kreatininu Jaffého kolorimetrickou metodou**

Jaffého metoda představuje pravé synonymum kolorimetrického stanovení kreatininu v tělních tekutinách, které je rutinně využíváno v klinických laboratořích. Historicky je metoda zakořeněna do roku 1875 a krom nepatrných vývojových změn zůstala její podstata nezměněna až do současnosti. Jejím principem je reakce mezi nasyceným roztokem kyseliny pikrové a kreatininem v alkalickém prostředí za současného zabarvení roztoku do červeno-oranžové barvy, které je přímo úměrné koncentraci kreatininu v biologickém médiu viz Obr. 2.8. Absorbance je měřena spektrofotometricky při vlnové délce 505 nm po 10 – 15ti minutách inkubace při pokojové teplotě, kdy je docíleno rovnovážného stavu. Měření je možné provést i kineticky. Jaffého reakce není selektivní pouze pro kreatinin. Barevný adukt vytváří i další tzv. Jaffého pozitivními chromogeny, jako jsou  $\alpha$ -ketokyseliny, ketolátky, kyselina askorbová, glukóza, aj. Za normálního stavu jsou hodnoty kreatininu v důsledku interferencí o 8 - 20  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  nižší oproti skutečným. Pokles analytické specifičnosti Jaffého metody pro měření kreatininu v séru nebo plazmě je příčinou pozitivní systematické chyby pro diagnostiku koncentrací nižších než cca 130  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ . U koncentrací nad 150  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  není pozitivní systematická chyba již pozorována [74].



**Obr. 2.8.** Stanovení kreatininu Jaffého metodou

#### 2.8.4.2 Simultánní stanovení kyseliny močové a kreatininu pomocí metody HPLC

Velmi časté a významné simultánní stanovení kyseliny močové a kreatininu vedle sebe v moči lze provést pomocí celé řady metod HPLC, viz níže. V tabulce 2.2 jsou shrnuty limity detekce a registrované časy pro jednotlivé metody a analyty.

- i) V prvním případě může být pracováno na kolonách reverzní fáze *C18 Phenomenex* (250 mm x 4,6 mm s velikostí použitých částic 5 μm). Jednoduchá úprava vzorků moči, které byly po odběru filtrovány přes centrifugační filtry Millipore 0,45 μm, ředěny deionizovanou vodou a jejich pH bylo upraveno 0,01 M NaOH nebo 0,01 M roztokem sulfonové kyseliny na hodnotu pH 7. Použitá mobilní fáze byla 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> o pH 4,7. Průtoková rychlost mobilní fáze činila 1 ml.min<sup>-1</sup>. Sběr dat při vlnové délce 220 nm a isokratické eluci obstarával UV detektor. Zaznamenané časy kyseliny močové byly 10,2 min. a kreatininu 4,2 min. s LOD pro kyselinu močovou 0,13 μg.ml<sup>-1</sup> a 0,11 μg.ml<sup>-1</sup> pro kreatinin [75].
- ii) Druhý velmi častý způsob simultánního stanovení je velice obdobný. Vzorky moči byly po odebrání až 200násobně ředěny mobilní fází a okyseleny H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> na pH 2,24 k precipitaci proteinů, následně filtrovány přes 0,22 μm PVDF filtry

a analyzovány. Použitá kolona byla shodná, *C18-RP* (250 mm x 4,6 mm s porézností částic 5  $\mu\text{m}$ ). Mobilní fázi byl filtrovaný 50 mM  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  o pH 7,4, opět se pracovalo systémem isokratické eluce. S průtokovou rychlostí 1  $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$  a UV detekcí při vlnové délce 235 nm. Registrovaný retenční čas pro kyselinu močovou činil 3,56 minuty s LOD 0,13  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  a pro kreatinin 4,82 minuty s LOD 0,16  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  [76].

- iii) Dalším příkladem může být využití kolon HILIC. V této práci byl vzorek moči 100násobně zředěn mobilní fází a bylo použito acetonitrilu k precipitaci proteinů. Po filtraci přes centrifugační filtry bylo přistoupeno k úpravě pH pomocí 0,01 M NaOH a následně k vlastní analýze. Použita byla kolona  $\text{S}_3\text{-NH}_2$  o shodných rozměrech jako v předchozích případech (250 mm x 4,6 mm), s velikostí částic stacionární fáze 5  $\mu\text{m}$  a s předřazenou kolonou Adsorbal  $\text{NH}_2$  s geometrickými parametry: 7,5 mm x 4,6 mm; velikost částic 5  $\mu\text{m}$ . Mobilní fáze byla tvořena směsí 50 % ACN a 50 % 10 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  o pH 4,75. Při vysoké průtokové rychlosti mobilní fáze 4,75  $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$  a za použití UV detekce při vlnové délce 205 nm, byl registrován pík kyseliny močové v čase 5,1 min. a pík kreatininu v čase 3,08 min. s limity detekce 0,06  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  pro kyselinu močovou a 0,04  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  pro kreatinin [77].
- iv) Stanovení kyseliny močové a kreatininu nemusí vždy být pouze simultánní. Rychlé stanovení kyseliny močové v moči pomocí spojení HPLC s hmotnostní detekcí s registrovaným píkem kyseliny močové v čase 3,01 min. a LOD 0,21  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Úprava vzorku moče je založena na jeho 100násobném zředění deionizovanou vodou a na následné filtraci přes 0,45  $\mu\text{m}$  filtry. K separaci byla použita krátká aniontová kolona o rozměrech 150 mm x 4,6 mm s porézností částic 5  $\mu\text{m}$  opatřená předkolonou o velikosti 12,5 mm x 4,6 mm. Mobilní fáze o složení;

50 % ACN a 50 % 1 mM vodného roztoku kyseliny citronové o pH 6,5. Průtok mobilní fáze byl nastaven na 1 ml.min<sup>-1</sup> [78].

**Tabulka 2.2.** Limity detekce a migrační časy kyseliny močové a kreatininu při stanovení metodou HPLC, označení metod v tabulce se shoduje s doprovodným textem.

Metoda HPLC	Parametr	Analyt	
		Kyselina močová	Kreatinin
i)	$t_M$ , s	612	252
	LOD, $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	0,13	0,11
ii)	$t_M$ , s	213	289
	LOD, $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	0,13	0,16
iii)	$t_M$ , s	306	185
	LOD, $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	0,06	0,04
iv)	$t_M$ , s	180	-
	LOD, $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	0,21	-

Obdobných prací využívajících kolon *C18-RP* je mnoho, odlišují se pouze v postupu zpracování vzorku, použité hodnotě pH mobilní fáze a v registrované vlnové délce UV detektoru. Limity detekce jsou ale velmi podobné [79].

#### 2.8.4.3 Stanovení kyseliny močové a kreatininu pomocí kapilární elektroforézy

Elektroforetické stanovení kyseliny močové a kreatininu lze provést mnoha způsoby s využitím jak optických detekčních systémů, bezkontaktní vodivostní detekce, tak prostřednictvím elektrochemické detekce založené na oxidaci nebo redukci analytu. Na rozdíl od metod kapalinové chromatografie postačí pro úpravu biologického materiálu ve většině případů CE



stanovení pouhé ředění vzorku deionizovanou vodou a následná filtrace. Valná většina CE metod má společnou proceduru pro aktivaci separační kapiláry před samotnou analýzou, která spočívá v aktivaci silanolových skupin na vnitřní straně křemenné kapiláry 1 M roztokem NaOH po dobu 20 - 30 min. a následnou reaktivací 0,1 M NaOH mezi jednotlivými analýzami. Během promývání kapiláry roztokem NaOH dochází k účinnému odstranění naadsorbovaných látek pocházejících z biologického materiálu z povrchu vnitřní stěny kapiláry, a tím ke zvýšení reprodukovatelnosti CE stanovení. Limity detekce CE metod pro stanovení kyseliny močové a kreatininu v moči se pohybují na submikromolární koncentrační hladině. Různé CE přístupy ke stanovení kyseliny močové a kreatininu jsou uvedené v následujících bodech; limity detekce a registrované migrační časy jsou shrnuty v příslušné Tabulce 2.3:

- i) Stanovení kyseliny močové v moči v křemenné kapiláře o vnitřním průměru  $d$  75  $\mu\text{m}$  a celkové délce  $l_c$  50 cm, v optimalizovaném separačním elektrolytu 30 mM  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$  o pH 9,2 s přídavkem  $1 \cdot 10^{-4}$  M luminolu. Vzorek byl dávkován hydrodynamicky a separace probíhaly při napětí +18 kV. Před prvním použitím separační kapiláry došlo k její aktivaci, promýváním 1 M NaOH po dobu 30 min. a mezi jednotlivými analýzami 0,1 M NaOH po dobu 3 min. Celková doba separace kyseliny močové za takovýchto podmínek činila cca 6 min. s dosaženým limitem detekce 0,35  $\mu\text{M}$ . [80]
- ii) Jiný přístup stanovení kyseliny močové využívá křemennou kapiláru o  $d$  50  $\mu\text{m}$  a celkové délce 60 cm, efektivní délka kapiláry k detektoru byla 8 cm. Při tomto stanovení byla aplikována bezkontaktní vodivostní detekce za použití dvou tubulárních elektrod dlouhých 4 mm umístěných ve vzdálenosti 1 mm od sebe. Detektor pracoval při frekvenci 300 kHz a amplitudě 300 Vpp. Separace probíhala při vloženém napětí +25 kV; v optimalizovaném separačním elektrolytu o složení 10 mM MES + 10 mM His + 0,1 mM CTAB, pH 6,0, byl migrační čas stanovení

kyseliny močové 410 s. Určený limit detekce se pohyboval na mikromolární úrovni, 3,3  $\mu\text{M}$ . Vlastní analýze předcházela aktivace křemenné kapiláry v sekvenci: 0,1 M HCl po dobu 5 min., deionizovaná voda rovněž po 5 min., 0,1 M NaOH po 5 min. a nakonec vlastní separační elektrolyt po dobu 15 min. [58].

iii) Další přístup ke stanovení kyseliny močové v moči spočívá v použití kapiláry o malém vnitřním průměru  $d$  25  $\mu\text{m}$  a celkové délce 75 cm při elektrokinetickém dávkování vzorku pomocí napětí 14 kV po dobu 6 s. Detekci obstarával elektrochemický detektor sestávající ze tří uhlíkových diskových elektrod, se kterým se autorům podařilo stanovit kyselinu močovou za 20 s, s nízkým LOD 0,66  $\mu\text{M}$ , a to v základním elektrolytu 80 mM borátovém pufru o pH 9,2 při vloženém separačním napětí 30 kV [81].

iv) Jiný přístup CE stanovení využívá techniku micelární elektrokinetické chromatografie (MEKC) k současnému stanovení kyseliny močové i kreatininu ve vzorku moči. Délka kapiláry pro tento experiment byla 67 cm s vnitřním průměrem  $d$  75  $\mu\text{m}$  za použití hydrodynamického dávkování vzorku tlakem 3500 Pa po dobu 5 s. UV detekce při vlnové délce 245 nm registrovala kyselinu močovou za 13 s a kreatinin za 7 s. S limity detekce pro kyselinu močovou 5,9  $\mu\text{M}$  a pro kreatinin 4,4  $\mu\text{M}$ . A to vše ve 30 mM fosfátovém separačním elektrolytu o pH 7 s přidavkem 150 mM SDS. [82]

**Tabulka 2.3.** Limity detekce a migrační časy kyseliny močové a kreatininu při stanovení metodou CE, podrobnosti k jednotlivým metodám v textu pod tabulkou.

Metoda CE	Parametr	Analyt	
		Kyselina močová	Kreatinin
i)	$t_M$ , s	180	22
	LOD, $\mu\text{M}$	0,35	0,44
ii)	$t_M$ , s	410	60
	LOD, $\mu\text{M}$	3,3	5,0
iii)	$t_M$ , s	20	-
	LOD, $\mu\text{M}$	0,66	-
iv)	$t_M$ , s	13	7
	LOD, $\mu\text{M}$	5,9	4,4

Pro CE stanovení samotného kreatininu bylo použito několik dalších metod:

- i) V základním separačním elektrolytu o složení 10 mM TRIS + 20 mM HIBA o pH 3,93, kdy separace probíhala v kapiláře o vnitřním průměru 50  $\mu\text{m}$  a celkové délce 32 cm. Dále bylo použito hydrodynamické dávkování vzorku tlakem 50 mbar po dobu 9 s do krátkého konce kapiláry. Separační dráha k UV detektoru zaznamenávajícího při vlnové délce 215 nm byla 8,5 cm. Při aplikovaném separačním napětí 30 kV byl registrován pík kreatininu za 22 s. LOD této metody je 0,44  $\mu\text{M}$ . Vlastnímu stanovení předcházela aktivace separační kapiláry a úprava vzorku dle následující metodiky: vzorek moči byl deproteinován směsí 1:3 v/v deionizovaná voda/ACN; následně centrifugován, filtrován a zředěn 12,5 mM roztokem HIBA v poměru 1:4 v/v. [83]

- ii) Obdobně rychlého stanovení kreatininu ve vzorku moči bylo dosaženo v 0,2 mM fosfátovém + 0,2 mM citrátovém separačním elektrolytu o pH 3,8, v kapiláře o efektivní délce 10 cm a vnitřním průměru 50  $\mu\text{m}$ . Použité separační napětí bylo 25 kV. Kreatinin byl registrován UV detektorem při vlnové délce 200 nm v čase 22 s.
- [84]

## 2.9 Cíl práce

Cílem první části dizertační práce bylo vyvinout jednoduchou, kapilárně elektroforetickou metodu pro sledování kyseliny močové a kreatininu v moči a séru s časem kratším než 30 s, která by byla konkurenceschopná běžně užívaným enzymatickým metodám. Hypotéza tohoto příspěvku spočívá v nově navrženém způsobu snížení  $t_M$  za použití kombinace krátké separační dráhy a vysoké intenzity separačního pole, kdy je na krátké separační dráze redukováno rozmývání píků vlivem difúze, elektrodisperze i adsorpce, což v konečném důsledku vede ke snížení limitu detekce.

### 3 Úvod do problematiky rychlého elektroforetického stanovení kyseliny močové a kreatininu<sup>1</sup>

Pro potřeby monitorování kyseliny močové a kreatininu na rozsáhlých souborech klinických vzorků se stává standardní doba separace v CE, pohybující se mezi 5 až 40 min., příliš dlouhou. Existuje ovšem několik účinných technik pro její efektivní zkrácení. Migrační čas ( $t_M$ ) v CE závisí na ostatních experimentálních parametrech podle vztahu:

$$t_M = \frac{l_C \cdot l_D}{U \cdot (u_{el} + u_{EOF})} \quad (3-1)$$

kde  $l_C$  je celková délka kapiláry,  $l_D$  délka kapiláry k detektoru (označovaná též jako efektivní délka kapiláry),  $U$  je separační napětí a  $u_{el}$  a  $u_{EOF}$  jsou elektroforetická a elektroosmotická mobilita. Ze vztahu je patrné, že cílené redukce migračního času lze dosáhnout několika způsoby [85]:

- ( a ) zkrácením efektivní nebo celkové délky kapiláry,
- ( b ) zvýšením separačního napětí,
- ( c ) zvýšením rychlosti elektroosmotického toku (EOF) pomocí modifikátorů EOF nebo prováděním analýz při vysokém pH,
- ( d ) prováděním analýz za zvýšené teploty;  $u_{el}$  i  $u_{EOF}$  se zvyšují s rostoucí teplotou.

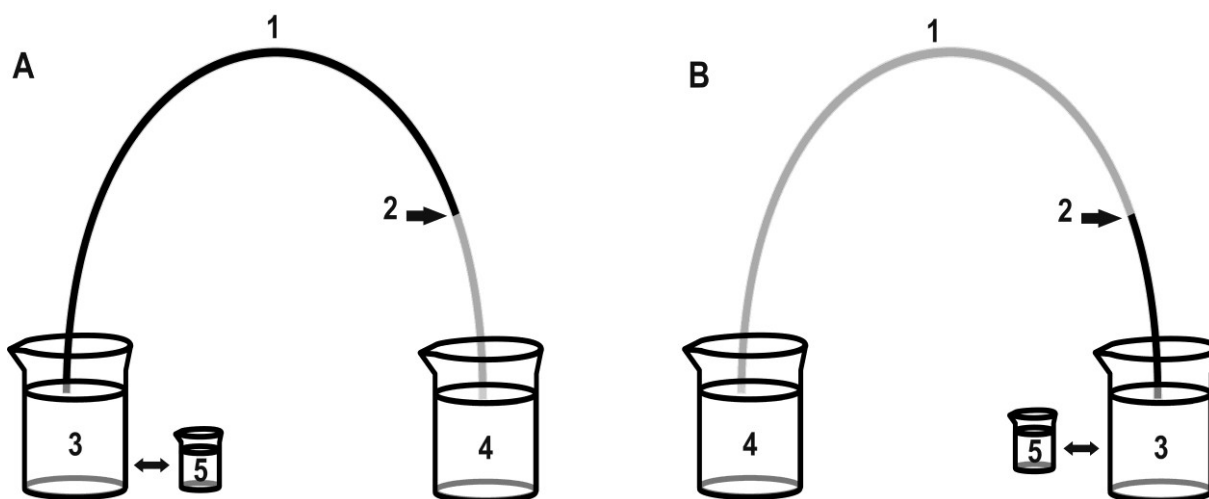
---

1

Výsledky, které jsou shrnuty v této části práce, byly publikovány v původním článku: Pavlíček V., Tůma P., Matějčková J., Samcová E.: Very fast electrophoretic determination of creatinine and uric acid in human urine using a combination of two capillaries with different internal diameters, *Electrophoresis* 2014, 35, 956-961. IF<sup>2014</sup> 3,028; <http://dx.doi.org/10.1002/elps.201300293>

### 3.1 Elektroforéza v krátkých kapilárách

Dobu samotné elektroforetické separace lze významně zkrátit snížením délky separační dráhy. Separační dráhy o délce cca 4 až 8 cm jsou používány v elektroforéze na čipu a doba separace na mikročipech nebývá větší než 1 min [86]. Pro elektroforézu v krátkých cca 10 cm dlouhých kapilárách byly sestaveny specializované laboratorní přístroje, na kterých bylo provedeno stanovení kofeinu a taurinu s dobou separace 60 s a 43 s [87], stanovení amoniaku za 34 s a kreatininu za 36 s [88], kyseliny močové za 54 s a kyseliny hippurové v moči za 69 s [31]. Podrobný přehled o rychlých separacích na krátké separační dráze lze nalézt v rozsáhlém přehledovém článku [26]. Zařízení pro čipovou elektroforézu či elektroforézu v krátkých kapilárách nejsou dosud široce rozšířeny do laboratoří provádějících praktické elektroforetické analýzy. To ale nebrání těmto laboratořím provádět rychlé rutinní separace i za použití komerčních elektroforetických sestav. U komerčního přístroje CE firmy Agilent lze snížit délku separační kapiláry až na cca 31,5 cm a při aplikaci maximálního napětí přístroje 30 kV [11] lze provádět separace při maximální intenzitě elektrického pole cca 1 kV/cm (30 kV/31,5 cm). Vyšších hodnot intenzit již nelze za běžných podmínek dosáhnout. Další snížení  $t_M$  lze zajistit zkrácením  $l_D$  a tato technika se označuje jako dávkování vzorku do krátkého konce kapiláry. U elektroforetických přístrojů je detektor umístěn asymetricky vzhledem k poloze konců separační kapiláry. Vzorek je obvykle dávkován do delšího konce kapiláry a kratší konec se označuje jako konec detekční. Většina CE přístrojů umožňuje dávkovat vzorek do detekčního konce kapiláry, čímž se pro separaci využije pouze úseku kapiláry mezi krátkým koncem a detektorem a délka tohoto úseku je u přístroje HP<sup>3D</sup> CE od firmy Agilent 8,3 cm [89]. Schematicky je rozdíl mezi standardním způsobem dávkování do dlouhého konce kapiláry a méně běžným dávkováním do krátkého konce kapiláry znázorněn na Obr. 3.1.



**Obr. 3.1.** Schematické znázornění standardního typu dávkování v CE do dlouhého konce kapiláry (A) a dávkování do krátkého konce kapiláry (B); 1 – separační kapilára s plně černým úsekem využitým k separaci; 2 – pozice detektoru; 3 – vstupní nádobka s BGE; 4 – výstupní nádobka s BGE; 5 – nádobka se vzorkem.

V práci Tůma et al. bylo provedeno srovnání mezi dávkováním do krátkého a do dlouhého konce kapiláry při praktickém CE stanovení kyseliny močové v allantoické tekutině, kde bylo jasně ukázáno, že citlivost stanovení určená z plochy píku je stejná pro oba způsoby dávkování a velmi dobře koresponduje se stejným množstvím nadávkovaného vzorku do kapiláry [89]. Diametrální rozdíl mezi oběma typy dávkování je v citlivosti určené z výšky píku, která přímo souvisí s limitem detekce. Citlivost stanovení byla pro dávkování do krátkého konce 3krát vyšší a dosažený LOD 3násobně nižší v porovnání s normálním způsobem dávkování. Výška píku odpovídá koncentraci analytu v zóně, která kontinuálně klesá v průběhu separace vlivem elektroforetické disperze zóny analytu a dále vlivem difúze a adsorpce analytu na stěnu kapiláry. Všechny zmíněné efekty zapříčinily rozmývání zóny analytu a byly daleko menší na krátké separační dráze. Z porovnání migračních časů pro dávkování do dlouhého (71,8 cm) a krátkého (8,2 cm) konce vyplynulo výrazné zkrácení migračního času na krátké separační dráze. Pozorovaný migrační čas v krátké kapiláře se pohybuje kolem 1 min. a je 10krát kratší

v porovnání s dávkováním do dlouhého konce kapiláry, pro nějž činila doba separace 10 min. Pozorována šířka píku v polovině výšky, byla 3krát menší a přesně souvisí s 3násobně vyšší výškou píku. Dalším kritickým parametrem je počet teoretických pater ( $N$ ), který měl 10tinásobně nižší hodnotu pro dávkování do krátkého konce kapiláry a opět souvisí s krátkou dráhou, na které probíhá separace. Srovnatelnějším parametrem charakterizujícím separační účinnost je počet teoretických pater přepočítaný na jeden metr kapiláry, jehož hodnota je pro dávkování z obou konců kapiláry přibližně shodná. Rozlišení píku ( $R_{1,2}$ ) na krátké dráze bylo pozorováno menší, ale zároveň jeho hodnota 3,9 pro krátkou kapiláru je plně dostačující a výrazně převyšuje kritickou hodnotu 1,5; jejíž dosažení je považováno za úplné rozdělení dvou píků. V literatuře lze dohledat nespočet aplikací dávkování do krátkého konce kapiláry, který byl využit pro rychlé stanovení celé řady rozmanitých směsí analytů.

### 3.2 Experimentální podmínky

Elektroforetická měření byla provedena na přístroji kapilární elektroforézy HP<sup>3D</sup>CE (Agilent Technologies, Německo) s integrovaným detektorem diodového pole (diode-array detector - DAD) a kontrolovaným softwarem ChemStation. Elektroferogramy byly zaznamenávány a vyhodnocovány při vlnové délce 191 nm (kreatinin, alantoin), 214 nm (kreatinin) a 292 nm (kyselina močová). K analýze byla použita křemenná kapilára (Composite Metal Services, Velká Británie) s vnější ochrannou vrstvou polyimidu, o celkové délce 32,5 cm, vnitřním průměru 50  $\mu\text{m}$  a vnějším průměru 363  $\mu\text{m}$ . Vzdálenost k detektoru od krátkého konce kapiláry činila 8,3 cm. Před použitím byla nová kapilára aktivována promytím 0,1 M NaOH po dobu 10 min., poté byla 10 min. promývána deionizovanou vodou a na závěr 10 min. separačním elektrolytem. Vybraná měření byla prováděna v kapiláře pokryté pomocí INST Coating solution (Biotaq, USA), který zastavuje EOF. Před každou separací modelového vzorku i biologického materiálu



byla INST-pokrytá kapilára promyta v sekvenci: 2 min. deionizovaná voda a 2 min. separační elektrolyt. Nepokrytá kapilára byla promyta v sekvenci: 30 s 0,1 M NaOH, 30 s deionizovaná voda a 30 s separační elektrolyt. Vzorek byl dávkován hydrodynamicky do krátkého konce kapiláry tlakem 50 mbar po dobu 4 s. Separace probíhaly při napětí +25 kV a konstantní teplotě 25 °C.

### 3.3 Statistické zpracování výsledků

Naměřená data CE analýz jsou uvedena jako průměrná hodnota  $\pm$  standardní odchylka, každé měření bylo provedeno třikrát, pokud není uvedeno jinak. Pro statistické zpracování dat byl použit program Origin 8.0 (OriginLab Corporation, USA). Počet teoretických pater ( $N$ ) byl určen ze vztahu  $N = 5,54 \cdot (t_M/w_{1/2})^2$ , kde  $t_M$  je migrační čas analytu a  $w_{1/2}$  je šířka píku v polovině jeho výšky. Rozlišení píků bylo určeno ze vztahu  $R = 2 \cdot (t_{M2} - t_{M1}) / (w_1 + w_2)$ , kde  $w_1$  a  $w_2$  jsou šířky píků při jejich základně.

### 3.4 Chemikálie

Veškeré použité chemikálie vykazovaly analytický stupeň čistoty: kyselina močová (Fluka), kyselina citronová (Fluka), hydroxid sodný (Fluka), kyselina 4-aminosalicylová (PAS, Sigma - Aldrich), 2-(N-morfolin)ethansulfonová kyselina (MES hydrát, Sigma - Aldrich), alantoin (Fluka), 2-(cyklohexylamino)ethansulfonová kyselina (CHES, Sigma - Aldrich). K přípravě separačních elektrolytů a zásobních roztoků standardů byla použita deionizovaná voda (Millipore, Bedford, USA). Standardní roztok kyseliny močové (1 mg.ml<sup>-1</sup>) a 4-aminosalicylové kyseliny (1 mg.ml<sup>-1</sup>, PAS) byl získán rozpuštěním pevných látek v deionizované vodě s přídavkem NaOH do úplného rozpuštění. Separací pufrů o složení i) 60 mM MES + 30 mM

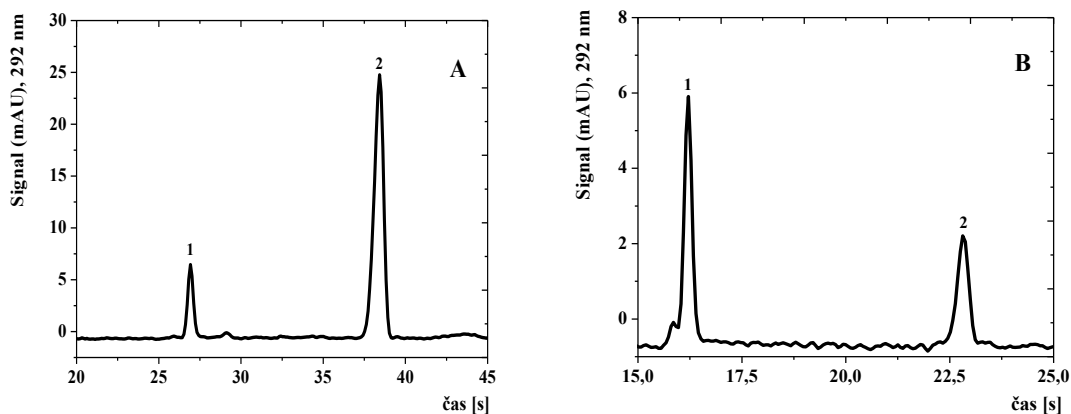
NaOH pH 6,0; ii) 20 mM MES + 10 mM NaOH pH 6,0; iii) 80 mM CHES + 30 mM NaOH pH 9,6, a iv) 20 mM kyselina citronová + 9 mM NaOH pH 3,0 byly připravovány k analýze vždy čerstvé. pH bylo měřeno laboratorním pH metrem pMX 3000 WTW (Německo).

### 3.5 Odběr a úprava vzorků

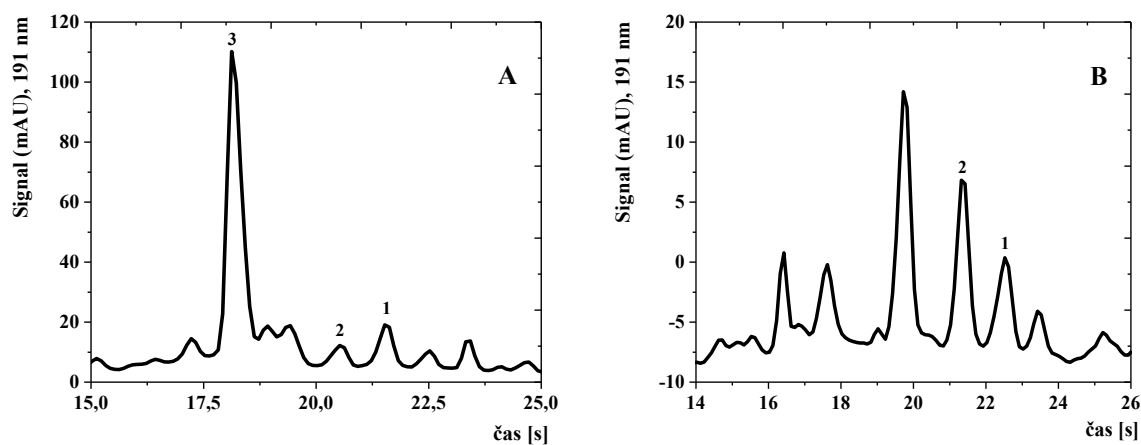
Vzorky krve byly odebrány nalačno. Krevní plazma byla získána odebráním nesrážlivé krve do vakuových zkumavek s antikoagulantem EDTA, centrifugována při 4 000 ot. min<sup>-1</sup> po dobu 15 minut. Vzorky krevní plazmy byly dlouhodobě uchovány v 0,5 ml nádobkách Eppendorf při teplotě -20 °C. Před elektroforetickou separací byly vzorky temperovány na laboratorní teplotu, poté zpracovány dle následujícího schématu: 50 µl vzorku bylo smícháno s 10 µl 10 mg.l<sup>-1</sup> PAS, 10 µl 1 mol.l<sup>-1</sup> NaOH a 930 µl deionizované vody. Tímto postupem je získán 20x zředěný vzorek. Výsledná koncentrace PAS je 10 mg.l<sup>-1</sup> a koncentrace NaOH 0,01 mol.l<sup>-1</sup>. Vzorky ranní moči od 7 zdravých dobrovolníků byly filtrovány přes centrifugační filtry (Amicon 0,45 µm, Millipore, USA) při 14 100 ot. min<sup>-1</sup> po 3 minuty a uchovávány v plastových uzavíratelných zkumavkách při teplotě 4 °C až do vlastního stanovení, které bylo provedeno tentýž nebo druhý den po odběru. Před elektroforetickou separací byly vzorky temperovány na laboratorní teplotu, poté zpracovány dle následující metodiky: pro stanovení kreatininu v moči bylo 20 µl vzorku smícháno s 979 µl deionizované vody s přídavkem 1 µl 1 mol.l<sup>-1</sup> HCl. Pro stanovení kyseliny močové v moči bylo 20 µl vzorku smícháno s 20 µl 1 mg.ml<sup>-1</sup> PAS a 959 µl deionizované vody s přídavkem 1 µl 1 mol.l<sup>-1</sup> NaOH. Tímto postupem je získán 50násobně zředěný vzorek. Výsledná koncentrace PAS je 20 mg.l<sup>-1</sup>, jež je v obou případech použita jako vnitřní standard pro zvýšení přesnosti elektroforetického stanovení a NaOH je přidáván z důvodu malé rozpustnosti kyseliny močové v neutrálním roztoku.

### 3.6 Rychlé elektroforetické stanovení kyseliny močové při dávkování do krátkého konce kapiláry

Kyselina močová je slabá dvojsytná kyselina s hodnotou  $pK_{A1}$  pro první disociační stupeň 5,4. Pro její elektroforetické stanovení byly testovány dva separační elektrolyty o složení: 60 mM MES + 30 mM NaOH, pH 6,0 a 80 mM CHES + 40 mM NaOH, pH 9,6. Anionty organických kyselin MES a CHES vykazují nízkou specifickou vodivost, a mohou být tedy použity i ve vyšších koncentracích při přípravě separačních elektrolytů. V koncentrovanějších základních elektrolytech dochází k zaostření zón analyzovaných látek, které se od sebe lépe oddělí, což má zásadní význam při separaci biologických vzorků. Vysoké koncentrace složek separačního elektrolytu mohou též bránit adsorpci proteinů přítomných v biologickém vzorku na vnitřní stěnu separační kapiláry. Separace v BGE 60 mM MES + 30 mM NaOH, pH 6,0 byla prováděna v pokryté kapiláře se zastaveným elektroosmotickým tokem při použití negativního separačního napětí -30 kV. Naopak separace v BGE 80 mM CHES + 40 mM NaOH, pH 9,6 byla prováděna v nepokryté kapiláře při pozitivní polaritě +30 kV. Za těchto podmínek migruje kyselina močová jako aniont proti elektroosmotickému toku, který byl zaznamenán v čase cca 12 s. Parametry kalibračních závislostí pro obě metody jsou shrnuty do Tabulky 3.1. V alkalickém separačním elektrolytu CHES/NaOH bylo souběžně provedeno stanovení alantoinu ( $pK_A$  8,5) v moči psa. Registrované elektroferogramy pro sledované analyty jsou zaznamenány na Obr. 3.2 a 3.3.



**Obr. 3.2.** Záznam elektroforetického stanovení kyseliny močové v lidské moči (A,  $541 \text{ mg.l}^{-1}$ ) a v krevní plasmě (B,  $49,8 \text{ mg.l}^{-1}$ ) v kapiláře s potlačeným EOF pomocí INST Coating solution. Experimentální podmínky: separační elektrolyt,  $60 \text{ mM MES} + 30 \text{ mM NaOH}$ , pH 6,0, hydrodynamické dávkování  $200 \text{ mbar.s}$ , napětí  $+30 \text{ kV}$ , UV detekce při  $292 \text{ nm}$ , identifikace píků, PAS (1) a kyselina močová (2).



**Obr. 3.3.** Záznam elektroforetického stanovení kyseliny močové v psí moči (A,  $11,2 \text{ mg.l}^{-1}$ ) a v lidské moči (B,  $322 \text{ mg.l}^{-1}$ ) v kapiláře s rychlým EOF. Experimentální podmínky: separační elektrolyt,  $80 \text{ mM CHES} + 40 \text{ mM NaOH}$ , pH 9,6, hydrodynamické dávkování  $100 \text{ mbar.s}$ , napětí  $-30 \text{ kV}$ , UV detekce při  $191 \text{ nm}$ , identifikace píků, PAS (1), kyselina močová (2) a alantoin (3).

### 3.6.1 Kalibrační závislosti

Obě metody poskytují lineární kalibrační závislosti v testovaném koncentračním rozsahu 2,5 – 10 mg.l<sup>-1</sup> s hodnotou korelačního koeficientu (*R*) větší než 0,999 a s limitem detekce cca 5 μM. Hodnoty RSD pro 10 po sobě jdoucích opakovaných stanovení kyseliny močové v lidské moči se nelišily o více jak 3 % pro plochu píku a o 2 % pro migrační čas. Pro kontrolu bylo stanovení kyseliny močové provedeno i standardní enzymatickou metodou (KM, Urikáza – PAP (146200), Greiner Diagnostic GmbH, Německo) používanou v klinických laboratořích, která poskytla hodnoty lišící se o 7 % pro krevní sérum a o 4 % pro moč.

**Tabulka 3.1.** Parametry lineárních regresních závislostí výšky píku na koncentraci kyseliny močové. Parametry byly získány ze čtyř různých koncentrací v rozmezí 2,5 až 10 mg.l<sup>-1</sup>.

Separáční elektrolyt	Citlivost [mAU.mg <sup>-1</sup> .l]	úsek [mAU]	<i>R</i>	LOD [mg.l <sup>-1</sup> ]	LOD [�mol.l <sup>-1</sup> ]
60 mM MES + 30 mM NaOH, pH 6,0	0,318	-0,135	0,9991	0,8	4,8
80 mM CHES + 40 mM NaOH, pH 9,6	1,071	-0,048	0,9997	0,8	4,7

Hodnoty separační činnosti vyjádrené jako počet teoretických pater a hodnoty rozlišení píků kyseliny mo ov  a interního standardu (PAS) jsou shrnuty v Tabulce 3.2. Získané separační parametry pro dávkování z krátkého konce kapiláry byly dále porovnány s parametry pro dávkování z dlouhého konce kapiláry uvedenými v práci: Mat j kov  J., T ma P., Samcová E., Zemanov  Z. [90], rovněž viz Tabulka 3.2. Zkr cen  separační dráhy vede k v razn  časov  úspoře analýzy. Zároveň však dochází k sniŹen  separační činnosti charakterizovan  počtem teoretických pater (*N*). Vhodn j m parametrem pro srovnání separační činnosti je počet

teoretických pater přepočítaný na jeden metr kapiláry. Rozdíly separačních účinností pro oba typy dávkování se poté minimalizují.

**Tabulka 3.2.** Separační parametry pro kyselinu močovou, migrační čas, separační účinnost, rozlišení (kyselina močová/PAS) a LOD.

Separační elektrolyt	Efektivní délka kapiláry [cm]	$t_M$ [s]	$N$ [ $m^{-1}$ ]	$R$	LOD [ $\mu M$ ]	$u_{poz}^a$ [ $m^2 V^{-1} s^{-1}$ ]	Vlnová délka [nm]
MES/NaOH	8,3	38,0	320000	12,1	4,7	$28,4 \cdot 10^{-9}$	292
CHES/NaOH	8,3	22,5	209000	1,2	4,8	$54,0 \cdot 10^{-9}$	191
MES/Tris + polybren <sup>43</sup>	69,0	588,0	229000	5,6	1,2	$36,4 \cdot 10^{-9}$	292

<sup>a</sup>  $u_{poz}$  je pozorovaná mobilita,  $u_{poz} = u_{el} + u_{EOF}$

Výše uvedený text shrnuje použití metody umožňující jednoduché a velmi rychlé stanovení kyseliny močové v biologickém materiálu. Použití vhodného separačního elektrolytu a dávkování z krátkého konce kapiláry lze dosáhnout významné časové úspory potřebné k provedení jedné analýzy. Migrační časy sledovaných analytů se pohybují okolo 30 s.

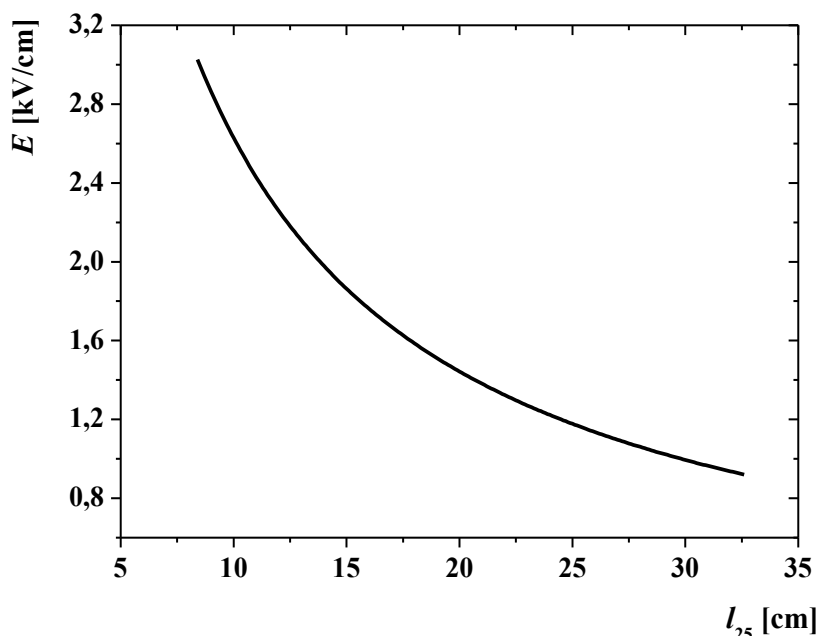
### 3.7 Využití spojených kapilár o různém vnitřním průměru pro rychlé separace kyseliny močové a kreatininu

K dalšímu snížení migračního času u komerčních CE přístrojů, u kterých již nelze zkrátit celkovou ani efektivní délku kapiláry a ani zvýšit separační napětí, je možné dospět prováděním separace ve spojené kapiláře [91]. Princip této nově vyvinuté techniky je založen na sériovém spojení dvou kapilár o různých vnitřních průměrech ( $d$ ). V tomto případě 25  $\mu\text{m}$  kapiláry ( $d_{25}$ ), ve které probíhá vlastní elektroforetická separace, tzv. kapilára analytická; a pomocné 100  $\mu\text{m}$  kapiláry ( $d_{100}$ ), která vytváří vodivé spojení pro uzavření elektrického separačního obvodu. Připojením elektrického napětí mezi konce takto vytvořené spojené kapiláry se intenzita elektrického pole rozloží tak, aby byl splněn Ohmův zákon a oběma částmi kapiláry protékal stejný elektrický proud  $I$ ;  $I = E \cdot \kappa \cdot d^2$ , kde  $E$  je intenzita elektrického pole v dané části kapiláry (spád separačního napětí na jeden centimetr její délky),  $\kappa$  specifická vodivost roztoku v kapiláře (pro obě části kapiláry naplněné totožným separačním elektrolytem má stejnou hodnotu). Pro spojení separačních kapilár o  $d$  25 a 100  $\mu\text{m}$  pak platí:  $E_{25} = 100^2/25^2 \cdot E_{100} = 16 \cdot E_{100}$ , neboli intenzita v 25  $\mu\text{m}$  kapiláře ( $E_{25}$ ) je 16krát vyšší než intenzita ve 100  $\mu\text{m}$  části kapiláry ( $E_{100}$ ), protože 25  $\mu\text{m}$  kapilára klade průchodu elektrického proudu 16krát vyšší odpor na jednotku délky. Pro výpočet skutečné hodnoty intenzity elektrického pole v separační části kapiláry ( $E_{25}$ ) v závislosti na ostatních separačních parametrech platí vztah:

$$E_{25} = \frac{U}{l_{25} + l_{100} \cdot (d_{25}/d_{100})^2} = \frac{U}{l_{25} + (l_C - l_{25}) \cdot (d_{25}/d_{100})^2} \quad (3-2)$$

kde  $U$  je separační napětí vložené mezi oba konce spojené kapiláry,  $l_{25}$ ,  $l_{100}$ , jsou délky jednotlivých částí kapiláry,  $d_{25}$  a  $d_{100}$  jsou jejich vnitřní průměry a  $l_C$  je celková délka spojené

kapiláry. Ze vztahu je zřejmé, že intenzita elektrického pole v separační části kapiláry se s její rostoucí délkou hyperbolicky snižuje, jak je ukázáno na Obr. 3.4.



**Obr. 3.4.** Závislost intenzity elektrického pole v 25  $\mu\text{m}$  části kapiláry na délce této části při celkové délce kapiláry 32,5 cm a vloženém napětí +30 kV. Grafické znázornění vztahu (3-2) simulovaného pomocí programu Mathcad, 13.1.

Pro dosažení vysoké intenzity elektrického pole je nezbytné používat minimální délku separační části kapiláry, což je spojeno s použitím techniky dávkování vzorku do krátkého konce kapiláry. Za těchto podmínek lze zkrátit separační část kapiláry až na 9,7 cm a při použití maximálního separačního napětí 30 kV je za těchto podmínek dosaženo intenzity elektrického pole v analytické části kapiláry 2,9 kV/cm. Tato hodnota je 2,8krát vyšší než maximální elektrická intenzita v běžné kapiláře s jednotným vnitřním průměrem, která činí necelý 1 kV/cm. Po potřeby našeho experimentu bylo použito separační napětí +25 kV, což odpovídá intenzitě elektrického pole o 0,5 kV/cm nižší, než při aplikaci maximálního napětí. Velice obdobným způsobem lze určit hodnotu efektivního napětí, které se podílí na vlastní pozorované separaci:

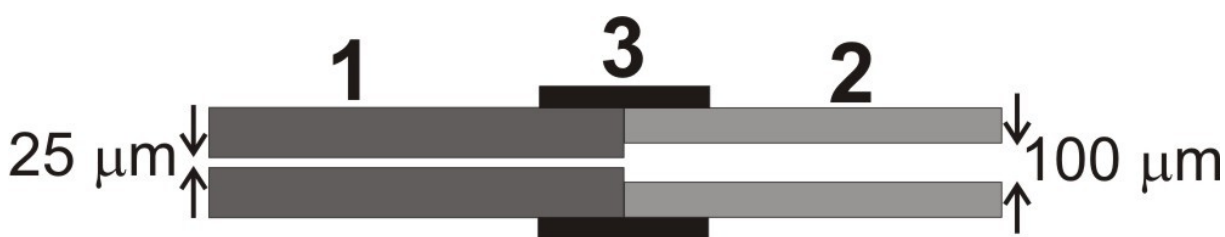


$$U_{ef} = U \cdot \frac{l_{ef}}{l_{25} + (l_C - l_{25})/16} \quad (3-3)$$

kde  $l_{ef}$  je efektivní délka spojené separační kapiláry 8,3 cm. Výsledná hodnota efektivního napětí  $U_{ef}$  činila 21,2 kV a odpovídá cca 3násobné hodnotě běžně používaného napětí [92].

### 3.7.1 Laboratorní výroba spojené kapiláry

Spojená kapilára byla vyrobena v laboratoři spojením dvou standardních křemenných kapilár o vnějším průměru 363  $\mu\text{m}$  (Composite Metal Services, UK) viz Obr. 3.5 a 3.6. Separální kapilára, vnitřní průměr 25  $\mu\text{m}$ , délka 9,7 cm, a pomocná kapilára, vnitřní průměr 100  $\mu\text{m}$ , délka 22,9 cm, byly spojeny pomocí 9 mm dlouhé PTFE trubičky pro HPLC (vnější průměr 1/16', vnitřní průměr 0,25 mm, Watrex). PTFE trubička byla zahřáta pomocí horkovzdušné pistole nad teplotu tání PTFE; 330  $^{\circ}\text{C}$  (na horkovzdušné pistoli byla nastavena teplota 420  $^{\circ}\text{C}$ ). Ohřátá a změkklá PTFE trubička byla přetažena přes konce obou rovně zaříznutých kapilár. Po vychladnutí (cca 60 s) vznikne hydrodynamicky těsné a mechanicky pevné spojení elektroforetických kapilár s minimálním mrtvým objemem.



**Obr. 3.5.** Detail spojení 25  $\mu\text{m}$  analytické kapiláry (1) a 100  $\mu\text{m}$  pomocné kapiláry (2) pomocí 9 mm dlouhé PTFE trubičky (3).



**Obr. 3.6** Fotografická dokumentace spojené kapiláry umístěné v elektroforetické kazetě.

V následném kroku bylo 8,3 cm od injekčního konce 25 μm kapiláry vytvořeno detekční okénko a kapilára je použitelná pro CE měření. Tento technicky nenáročný postup spojení dvou kapilár o různém  $d$ , trvá cca 15 min. [93]. Spojená kapilára byla vložena do kazety elektroforetického přístroje HP<sup>3D</sup> CE, Agilent Technologies a separace byly prováděny při dávkování do krátkého konce kapiláry. Vzdálenost injekčního konce kapiláry k diode-array detektoru byla 8,3 cm. Před použitím byla nová kapilára aktivována obvyklým způsobem. Mezi jednotlivými analýzami modelových vzorků i upravené moče byla kapilára promývána pouze separačním elektrolytem po 2 min. U vybraných stanovení byl elektroosmotický tok v kapiláře potlačen pokrytím kapiláry komerčním roztokem INST Coating solution, Biotaq, USA, po dobu 2 min. Vzorek byl dávkován hydrodynamicky tlakem 50 mbar po dobu 5 s, což odpovídá 4 mm délce zóny nadávkované v 25 μm separační kapiláře, viz Tabulka 3.3.

**Tabulka 3.3.** Přehled dávkovaného objemu a délky zóny do separační kapiláry v závislosti na dávkovacím tlaku a čase [11].

<b>Průměr kapiláry (<i>d</i>)</b>	<b>10 μm</b>	<b>25 μm</b>	<b>50 μm</b>	<b>75 μm</b>	<b>100 μm</b>
Dávkovací tlak × čas [mbar.s]	$V_p$ [nl] / $I_p$ [mm]	$V_p$ [nl] / $I_p$ [mm]	$V_p$ [nl] / $I_p$ [mm]	$V_p$ [nl] / $I_p$ [mm]	$V_p$ [nl] / $I_p$ [mm]
25	0,0008 / 0,01	0,03 / 0,06	0,5 / 0,25	2,6 / 0,59	8,2 / 1,04
50	0,0016 / 0,02	0,06 / 0,12	1,0 / 0,50	5,2 / 1,18	16,4 / 2,08
75	0,0024 / 0,03	0,09 / 0,18	1,5 / 0,75	7,8 / 1,77	24,6 / 3,13
100	0,0032 / 0,04	0,12 / 0,24	2,0 / 1,00	10,4 / 2,26	32,8 / 4,16
150	0,0048 / 0,06	0,18 / 0,36	2,5 / 1,50	15,6 / 3,54	49,2 / 6,26

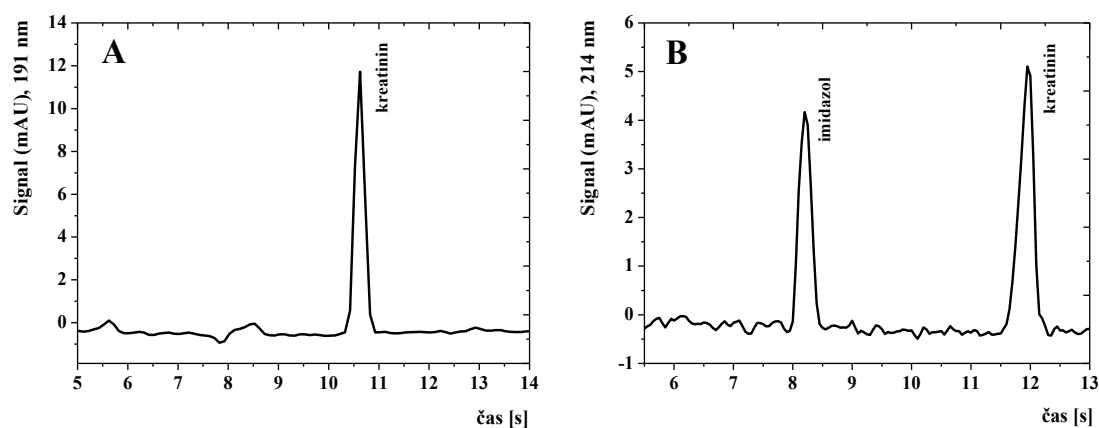
$V_p$  [nl] - dávkovaný objem do kapiláry;  $I_p$  [mm] – délka dávkované zóny analytu.

Separace probíhaly v kationtovém módu při napětí +25 kV a odpovídající intenzitě elektrického pole v separační části kapiláry 2,3 kV/cm. Tlak nutný pro promytí kapiláry a pro nadávkování vzorku byl aplikován z konce pomocné kapiláry ( $d$  100 μm), čímž došlo k potlačení tvorby vzduchových bublin, v konstrukčním spojení kapilár, které mohou vést až k přerušení separace. Separace probíhaly při konstantní teplotě 25 °C.

### 3.7.2 Stanovení kyseliny močové a kreatininu v moči za pomoci spojené kapiláry

Moč jako komplexní vzorek obsahuje značné množství ionizovatelných látek, které mohou potenciálně ovlivnit elektroforetické stanovení. Z tohoto důvodu je důležitá správná volba separačního pufru (BGE), ve kterém dochází k úplnému oddělení analytu od ostatních složek moče. Kreatinin je dusíkatý heterocyklus s hodnotou  $pK_A$  4,8. V kyselém BGE o složení 20 mM

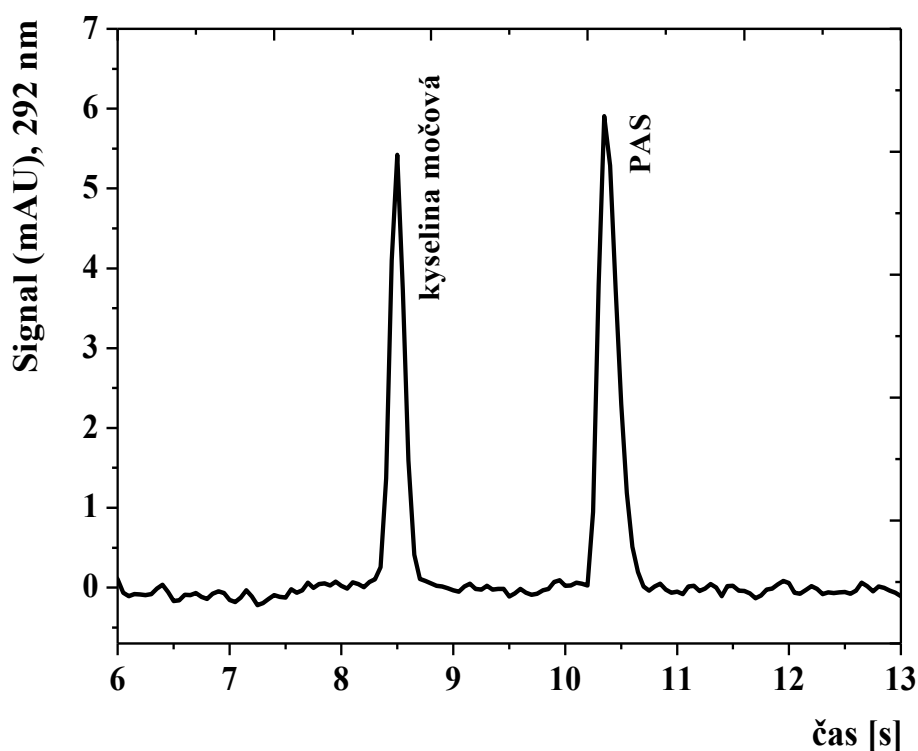
kyselina citronová + 9 mM NaOH, pH 3,0 migruje jako kationt při současném potlačení elektroosmotického toku (pozice EOF nebyla registrována do 60 s). Jako vnitřní standard byl použit imidazol, který vykazuje obdobnou kationtovou pohyblivost a přirozeně se nevyskytuje v lidské moči. Za takto nastavených experimentálních podmínek bylo dosaženo krátkého migračního času, 12,2 s pro kreatinin a 8,5 s pro imidazol, s hodnotou rozlišení obou látek 8,5, která je pro spojenou kapiláru dostačující a dostatečně převyšuje kritickou hodnotu 1,5; jejíž dosažení je považováno za úplné rozdělení dvou píků. Na elektroferogramu 50násobně ředěné lidské moči je patrný výrazný, dobře kvantifikovatelný pík kreatininu, viz Obr. 3.7. Z uvedených záznamů je patrné, že separace kreatininu provedená za stejných separačních podmínek je v nepokryté kapiláře o cca 1,6 s pomalejší Obr. 3.7B. Pro další experimentální měření byla použita nepokrytá kapilára.



**Obr. 3.7.** Záznam elektroforetického stanovení kreatininu v lidské moči snímaný při dvou vlnových délkách (A) 191 nm v pokryté kapiláře roztokem INST Coating solution a (B) 214 nm v kapiláře bez INST média. Experimentální podmínky: BGE 20 mM kyselina citronová + 9 mM NaOH pH 3,0, hydrodynamické dávkování 250 mbar.s, napětí +25 kV.

Kyselina močová je slabá dvojsytná kyselina s hodnotou  $pK_{A1}$  5,4. Pro CE stanovení kyseliny močové byl použit základní separační elektrolyt o složení: 20 mM MES + 10 mM NaOH, pH 6,0 a separace byla provedena v kationtovém módu při napětí +25 kV. Za těchto podmínek migruje

kyselina močová jako aniont proti elektroosmotickému toku, který je při pH 6,0 velmi rychlý (pozice EOF byla registrována v čase cca 6 s, odpovídající hodnota  $u_{EOF}$  je  $70,8 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1} \text{ V}^{-1}$ ) a strhává kyselinu močovou ( $u_{el}$   $25,6 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1} \text{ V}^{-1}$ ) s sebou směrem k detektoru. Rychlost EOF je při pH 6 vyšší, než elektroforetická pohyblivost kyseliny močové. Proto je pík kyseliny močové,  $t_M$  8,5 s, zaznamenán později než pozice EOF. Jako interní standard byla použita PAS,  $pK_A$  3,6, která vykazuje vyšší elektroforetickou pohyblivost ( $u_{el}$   $31,4 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1} \text{ V}^{-1}$ ) a při pohybu proti směru EOF dosáhne detektoru později ( $t_M$  pro PAS je 13,7 s, s rozlišením obou látek 10,5). PAS nepatří mezi látky přirozeně se vyskytující v moči. Elektroferogram 50násobně ředěné lidské moči s přidavkem interního standardu PAS je znázorněn na Obr. 3.8.



**Obr. 3.8.** Záznam elektroforetického stanovení kyseliny močové v lidské moči. Experimentální podmínky: separační elektrolyt 20 mM MES + 10 mM NaOH, pH 6,0, hydrodynamické dávkování 250 mbar.s, napětí +25 kV, UV detekce při 292 nm.

Ostatní látky přítomné v moči nejsou na elektroferogramech zaznamenány z důvodu jejich nízké koncentrace v moči nebo proto, že absorbují při jiných vlnových délkách. Ze získaných elektroferogramů a separačních parametrů (Tabulka 3.4.) je patrné, že při zvýšené intenzitě elektrického pole 2,3 kV/cm a efektivní separační dráze 8,3 cm lze dosáhnout velmi krátkých migračních časů kolem 10 s.

**Tabulka 3.4.** Migrační čas ( $t_M$ ), počet teoretických pater ( $N$ ), limity detekce (LOD), citlivost a korelační koeficient ( $R$ ) v 50krát ředěné moči. Hodnoty RSD byly určeny pro 3 analýzy jednoho vzorku moče.

Parametr	Analyt	
	kreatinin	kyselina močová
$t_M$ , s	12,2	8,5
$N$ , $m^{-1}$	120000	345000
$N$ , $s^{-1}$	830	3400
$R_{1,2}$	8,5	10,5
LOD, $mg.l^{-1}$	2,4	0,9
LOD, $\mu M$	21,2	5,4
Citlivost, $mAU.s.l.mg^{-1}$	0,0558	0,0417
$R$	0,9998	0,9994
RSD pro $t_M$ , %	0,3	1,8
RSD pro plochu píku, %	4,1	5,7
Fyziologické hodnoty v moči, mM	5,7 – 14,7	1,5 – 4,5
Stanovené koncentrace v moči, $mg.l^{-1}$	221 - 1394	87 – 556

V literatuře popsaném rychlém CE stanovení kreatininu v kapiláře o efektivní délce kapiláry 10 cm [71] při použitím napětí 15 kV činí doba separace necelých 60 s a v kapiláře o efektivní délce 8,5 cm a při napětí 30 kV je doba separace dokonce 22 s [94]; kyselina močová byla stanovena i na 8,2 cm dlouhé separační dráze při napětí 20 kV za cca 50 s [89].

### 3.7.3 Kalibrační závislosti pro kreatinin a kyselinu močovou

Kalibrace kreatininu i kyseliny močové byly provedeny v koncentračním rozsahu 5 – 70 mg.l<sup>-1</sup>. Testované koncentrační rozmezí dobře pokrývá rozsah fyziologických hodnot obou látek v moči při použití 50násobného ředění moče před CE analýzou (kreatinin 370 – 2200 mg.l<sup>-1</sup> a kyselina močová 85 – 970 mg.l<sup>-1</sup>). Kalibrační závislosti jsou v měřeném intervalu pro obě látky lineární s hodnotami korelačního koeficientů  $R \geq 0,999$ . Získané relativní směrodatné odchylky (RSD) pro migrační čas i plochu píku byly určeny z 10 následných analýz jednoho vzorku moče a odpovídají běžným hodnotám pro CE analýzu.

Hodnoty LOD byly určeny jako výška píku odpovídající trojnásobku průměrné hodnoty šumu. Pro zvýšení přesnosti kvantifikace v moči a pro odstranění fluktuací při dávkování vzorku byly plochy píků normalizovány na plochu interního standardu. Získané hodnoty citlivosti pro plochu píku se nacházejí v koncentračním rozmezí 0 až 70 mg.l<sup>-1</sup>. Ukázalo se, že 50násobné ředění moče je dostatečné pro odstranění nežádoucího vlivu matrice na CE separaci. Stanovené hodnoty kreatininu v 7 vzorcích lidské moče se pohybovaly v koncentračním rozmezí 221 – 1394 mg.l<sup>-1</sup> pro kreatinin a 87 – 556 mg.l<sup>-1</sup> pro kyselinu močovou.

### 3.7.4 Stanovení kreatininu a kyseliny močové referenční metodou

Stanovení kreatininu i kyseliny močové bylo současně provedeno pomocí standardních metod používaných v klinických laboratořích. Bio-test (Creatinine liquid 500, Lachema, ČR) založený na Jaffého reakci a následném fotometrickém stanovení při 505 nm a bio-test (Uric acid liquid 500, Lachema, ČR) založený na enzymatické reakci s urikázou a následném fotometrickém stanovení při 550 nm. Veškerá spektrofotometrická měření byla provedena v 1 cm kyvetě na spektrofotometrickém přístroji Boeco (Model S-22, Německo).

Párový *t-test* neprokázal statisticky významný rozdíl na hladině významnosti 0,05 mezi oběma způsoby stanovení kreatininu a kyseliny močové v sedmi vzorcích lidské moči. Obě detekční techniky poskytují velmi podobné výsledky, viz Tabulka 3.5.

**Tabulka. 3.5.** Výsledky stanovení kreatininu a kyseliny močové v lidské moči pomocí CE a referenčních metod.

Vzorek moči	kreatinin, mg.l <sup>-1</sup>		kyselina močová, mg.l <sup>-1</sup>	
	CE	Jaffého test	CE	enzymatický test - urikáza
1.	1320	1128	556	558
2.	1394	1407	382	339
3.	931	981	269	326
4.	221	272	87	82
5.	1085	1125	501	495
6.	1245	1436	356	305
7.	840	975	278	298



### 3.8 Výsledky a diskuze

Technika spojených kapilár poskytuje v CE stanovení pro oba sledované analyty velmi krátké migrační časy. Počet teoretických pater ( $N$ ) se pohybuje kolem 120 tisíc na metr délky kapiláry pro kreatinin a 345 tisíc pater na metr délky kapiláry pro kyselinu močovou. Vyšší hodnota  $N$  pro kyselinu močovou je dána kratším migračním časem a nižším vlivem rozmyvacích efektů, zejména elektrodisperze, na asymetrické rozmytí píku. Pro velmi rychlé separace je výhodnější vyjádřit separační účinnost jako  $N$  za jednotku času ( $N/t_M$ ), která lépe vystihuje rychlost separačního procesu [91]; 830 pater. $s^{-1}$  pro kreatinin a 3400 pater. $s^{-1}$  pro kyselinu močovou. Dosažené limity detekce jsou o něco horší v porovnání s limitem detekce jiných CE stanovení těchto analytů na krátké separační dráze: a) kreatinin, 0,5 mg. $l^{-1}$  v 50  $\mu m$  kapiláře s efektivní délkou 8,5 cm nebo 0,7 mg. $l^{-1}$  v 75  $\mu m$  kapiláře s efektivní délkou 10 cm [71, 83]; b) kyselina močová, 0,1 mg. $l^{-1}$  v 75  $\mu m$  kapiláře s efektivní délkou 8,5 cm [89]. Zhoršený limit detekce při použití kombinace dvou kapilár je dán kratší absorpční dráhou v 25  $\mu m$  kapiláře a také malým nadávkovaným objemem vzorku do tenké kapiláry. Získané LOD v moči jsou ovšem dostatečné pro kvantifikaci kreatininu i kyseliny močové v 50násobně ředěných vzorcích moče. Experimentálně určená hodnota elektroforetické mobility pro kreatinin za podmínek vysoké intenzity elektrického pole ( $u_{el} 35,1 \cdot 10^{-9} m^2 s^{-1} V^{-1}$ ) při dávkování z krátkého konce kapiláry dobře koresponduje s teoretickou hodnotou mobility určenou pomocí programu Peak-Master 5.3 ( $u_{el} 33,2 \cdot 10^{-9} m^2 s^{-1} V^{-1}$ ). Z téměř totožných elektroforetických mobilit vyplývá, že i za použití vysoké intenzity elektrického pole je odvod Jouleova tepla z kapiláry postačující. Separace probíhá standardním způsobem, s obdobnou separační účinností a limitem detekce, jako při nízkých hodnotách  $E$ , viz Tabulka 3.6.

**Tabulka 3.6.** Srovnání vyvinutých metod pro kyselinu močovou v separačním elektrolytu MES/NaOH, pH 6,0, při dávkování z krátkého konce kapiláry v jednokanálové a spojené kapiláře.

Parametr	Analyt – kyselina močová	
	Jednokanálová kapilára	Spojená kapilára
$t_M, s$	38,2	8,5
$N, m^{-1}$	320000	345000
LOD, $\mu M$	4,8	5,4
$E, kV.cm^{-1}$	0,8	2,3

### 3.9 Závěr

Tato studie jasně ukazuje, že kapilární elektroforéza nemá v současnosti ve srovnání s ostatními vysokoúčinnými separačními technikami konkurenci, co se týká rychlosti analýzy. Obě vypracované metody pro stanovení kreatininu a kyseliny močové se vyznačují dobrou separací kolem 10 s. Moč je před analýzou pouze filtrována a ředěna. Takto vypracovaná elektroforetická metodika je vhodnou alternativou ke standardním kolorimetrickým a enzymatickým stanovením rutinně používaných v klinických laboratořích a umožňuje provádění rychlého screeningu kreatininu a kyseliny močové na rozsáhlých souborech vzorků.

## 4 Stanovení steviol - glykosidů v potravinových doplňcích a nápojích pomocí kapilární elektroforézy s bezkontaktní vodivostní detekcí<sup>2</sup>

### 4.1 Steviol glykosidy z rostliny Stévie

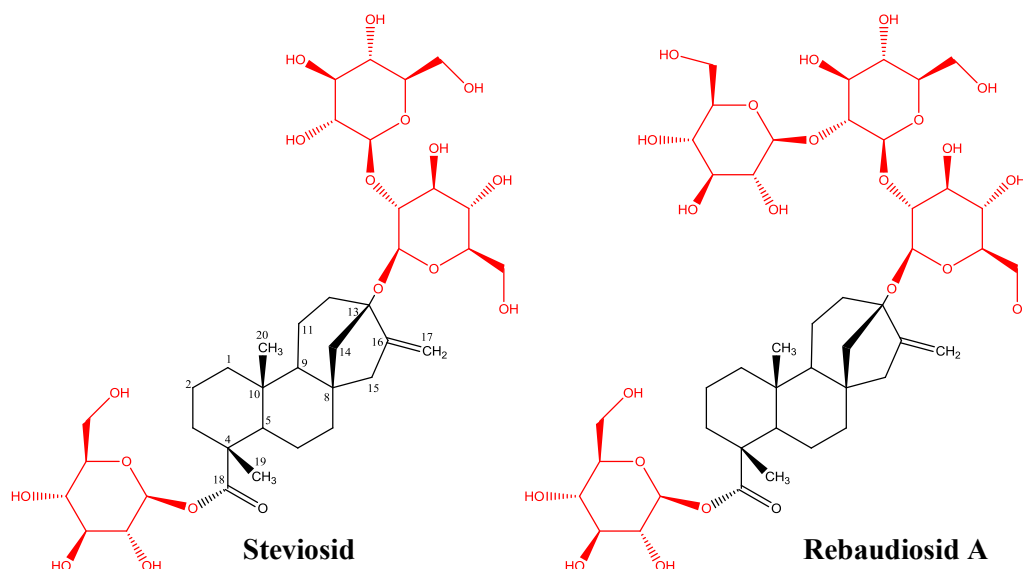
*Stévie rebaudiana Bertoni* je bíle kvetoucí světlomilná subtropická rostlina z čeledi hvězdnicovitých, známá jako stévie sladká, cukrová či medová tráva a v současné době se stává jednou z nejrozšířenějších přírodních náhražek sacharózy [95, 96]. Původní teritorium rostliny je lokalizováno od severovýchodní Paragvaye západně od And v povodí řeky Ypame až do oblasti jižní Brazílie, odkud se velmi rychle rozšířila díky dobytí Jižní Ameriky španělskými a portugalskými námořníky. O zhruba dvě stolení později roku 1887 jihoamerický přírodovědec Dr. Moisés Santiago Bertoni pojmenoval tuto sladkou rostlinu *Eupatorium Rebaudianum*, neboť se mylně domníval, že jde o rostlinu příbuznou *Sadci konopáči*. Až roku 1905 byla rostlina správně taxonomicky zařazena a pojmenována po svém objeviteli *Stevia Rebaudiana* var. *Bertoni*. M. S. Bertoni v roce 1918 charakterizoval základní přednosti stévie, které pramení z její ohromné sladivosti, netoxičnosti, cenové nenáročnosti a možnosti konzumace rostliny v přirozeném či suchém stavu bez negativních vlivů. Francouzští chemici přispěli k odhalení sladkého tajemství již v roce 1931, kdy z lístku stévie izolovali sladkou sloučeninu steviosid, který zůstal poté téměř dvacet let bez povšimnutí. Analýzou struktury steviosidu roku 1952 byla zjištěna jeho glykosidová povaha, jež je složena ze tří molekul glukózy připojených na aglykonovou - steviolovou kostru, která tvoří základní skelet všech steviol glykosidů. V následujících letech byly postupně objeveny další sladké molekuly až na současný stav 11ti steviol glykosidů [97, 98].

---

<sup>2</sup> Výsledky, které jsou shrnuty v této části práce, byly publikovány v původním článku: Pavlíček V., Tůma P.: The use of capillary electrophoresis with contactless conductivity detection for sensitive determination of stevioside and rebaudioside A in foods and beverages, *Food Chemistry* 2017, 219, 193-198. IF<sup>2015</sup> 4,052 <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.135>

## 4.2 Senzorický profil steviol glykosidů

Sladkost lístků stévie je dána přítomností steviol glykosidů. Tyto sladké sloučeniny se získávají z listů stévie extrakcí, purifikací a následnou separací jednotlivých glykosidů. Nejvyšší podíl na sladké chuti extraktu je dán přítomností steviosidu (Stev) a rebaudiosidu A (Reb A). Mezi steviol glykosidy lze zařadit celou skupinu těchto látek; rebaudiosidy A, B, C, D, E a F, steviosid, steviobiosid a dulcosid A a B [99]. Jednotlivé látky disponují rozličným sensorickým profilem. U všech glykosidů přetrvává sladká chuť lišící se pouze intenzitou. Sladká chuť je dána chemickou strukturou, jejímž základem je steviol, 13-hydroxykaur-16-en-18-onová kyselina, na kterou jsou v pozici C<sub>13</sub> a C<sub>19</sub> navázány sladké molekuly, jako D-glukopyranosylové, L-rhamnopyranosylové (Rebaudiosid C, Dulcosid A), D-xylopyranosylové (Rebaudiosid F) nebo β-D-glukopyranosyl-β-D-glukopyranosylové jednotky viz Obr 4.1. Zatímco rebaudiosidy A a D vykazují čistě sladkou chuť s minimálním nádechem hořkosti se sladivostí cca 300 – 450násobně vyšší než u sacharózy, dulkosidy poskytují sladkost pouze 100násobně vyšší, ale již se značně vyvinutou hořkou až metalickou příchutí. Hořká chuť je u steviol glykosidů intenzivnější, pokud je na uhlíku C<sub>13</sub> molekuly steviolu přítomna sophorosylová jednotka, glukosa-β(1-2)-glukosa a dojde-li k záměně methylenové skupiny na uhlíku C<sub>17</sub> za ketonovou [100-103]. Steviol glykosidy používané v potravinách a potravinových doplňcích by měly obsahovat minimálně 95 % rebaudiosidu A nebo steviosidu s nepatrným zastoupením ostatních steviol glykosidů tak, aby bylo dosaženo čistě sladké chuti a sensorického požitku srovnatelného se sacharózou.



**Obr. 4.1** Molekulová struktura majoritních steviol glykosidů obsažených v rostlině Stévie; **Steviosidu** ( $\beta$ -D-glukopyranosyl ester, 13-[(2-O- $\beta$ -D-glukopyranosyl- $\beta$ -D-glukopyranosyl)oxy]kaur-16-en-18-ové kyseliny) a **Rebaudiosidu A** ( $\beta$ -D-glukopyranosyl ester 13-[(2-O- $\beta$ -D-glukopyranosyl-3-O- $\beta$ -D-glukopyranosyl- $\beta$ -D-glukopyranosyl)oxy] kaur-16-en-18-ové kyseliny).

### 4.3 Nutriční aspekty Stévie rebaudiana Bertoni

Vysoce sladivé lístky stévie mají v suchém stavu energetickou hodnotu  $2,7 \text{ kcal.g}^{-1}$ , která ji právem řadí do skupiny nízkokalorických sladidel [104]; pro srovnání sacharóza má energetickou hodnotu  $4,2 \text{ kcal.g}^{-1}$ . Význam steviol glykosidů v potravinářství souvisí právě s jejich téměř nulovou energetickou hodnotou, což přináší výhodu zejména oproti jiným přírodním sladidlům (fruktóza, glukóza a glukózo-fruktózový sirup), která mají značnou energetickou hodnotu. Z tohoto důvodu jsou steviol glykosidy přednostně používány ke slazení nápojů u jedinců trpících nadváhou, kteří nejsou schopni naplnit svůj pitný režim pouze čistou vodou. Steviol glykosidy mohou být efektivně využívány při regulaci příjmu potravy a dosažení

pocitu sladkého nasycení [105]. V porovnání s umělými sladidly typu aspartamu, steviol glykosidy nevyvolávají sekreci inzulínu a navíc je lze používat u jedinců trpících fenylketonurií [106].

#### **4.4 Biochemicky významné látky obsažené v rostlině *Stevia rebaudiana* Bertoni**

Lístky rostliny stévie, ať už v sušené či přirozené formě, jsou kvalitním, byť omezeným zdrojem sacharidů, aminokyselin a nativní vlákniny. Svým charakterem a rozmanitostí obsažených látek jsou vhodné k podpoře zdravého životního stylu, neboť kromě glykosidů obsahují i celou řadu dalších důležitých látek:

- a) spektrum 17-ti aminokyselin [107]: argininu, lysinu, histidinu, fenylalaninu, leucinu, methioninu, valinu, threoninu, isoleucinu, asparaginu, serinu, glutaminu, prolinu, glycinu, alaninu, cysteinu a tyrosinu,
- b) 6 mastných kyselin [108]: palmitové (C16), palmito-olejové (C16-1), stearové (C18), olejové (C18-1), linolové (C18-2) a linolenové (C18-3),
- c) vitamíny rozpustné ve vodě [109], vitamin C, B2 a B6,
- d) a minerální látky [110], mající v lidském organismu mnoho důležitých funkcí.

Některé z nich jsou potřebné pouze ve stopovém množství, ale životní pochody jsou na nich závislé daleko více, než samotný údaj naznačuje. Celá řada anorganických prvků hraje velmi důležitou roli v mnoha biochemických procesech. Hlavními minerálními složkami listů stévie jsou sodík, hořčík, fosfor, síra, chlor, draslík a vápník, které jsou klasifikovány jako makroelementy. Z mikroelementů je zastoupen chrom, mangan, železo, kobalt, měď, zinek, selen, molybden a jód. Přítomnost makro- a mikroelementů je v potravinách důležitá pro rozvoj

a udržování životně důležitých tělesných funkcí [111]. Minerální látky jsou zapojeny ve všech aspektech růstu, zdraví a reprodukce, účastní také při procesu tvorby buněk, tkání a orgánů, regulují a udržují rozmanité metabolické pochody.

#### **4.5 Benefity rostliny stévie prospěšné pro zdraví**

Mnoho rostlinných glykosidů má prokazatelnou aktivitu v prevenci proti rakovině, stejně tak projevy antidiabetické, antiobezitní, antibakteriální nebo antineoplastické účinky. Lístky stévie obsahují nekariogenní a nekalorické substance, jejichž užívání by mohlo mít hodnotné účinky na lidský organismus. Steviol glykosidy mají cenné biologické vlastnosti a jejich pravidelná konzumace snižuje obsah cukru, radionuklidů a cholesterolu v krevním řečišti, zlepšuje regeneraci buněk a posiluje krevní cévy. Jsou prokázány i protizánětlivé a diuretické (zabraňují ulceraci v gastrointestinálním traktu), antihypertenzivní a antihyperglykemické vlastnosti [112]. Kromě zmíněných může být využito extraktů ze stévie k léčbě rakoviny a jako náhrada sacharózy v léčbě diabetu, obezity a hypertenze. Rovněž mohou působit před zubním kazem a zánětem dásní. Toxikologické vlastnosti jsou u steviol glykosidů stále předmětem rozsáhlých studií. Bylo prokázáno, že molekula steviosidu nevykazuje toxické, mutagenní a karcinogenní vlastnosti [113, 114]. I značně vysoké koncentrace sladidla rebaudiosidu A nebyly spojeny se známkami toxicity či alergickými reakcemi, pokud jej bylo používáno jako sladidla. Rovněž řada studií prokázala zanedbatelný vliv na snížení plodnosti. Ke komercializaci steviol glykosidů jako potravin není příliš vřele přistupováno. Předpokládají se alergické reakce u osob citlivých na rostliny z čeledi Asteraceae, proto se také doporučuje, aby těhotné ženy nekonzumovaly výrobky obsahující steviol glykosidy [115, 116].

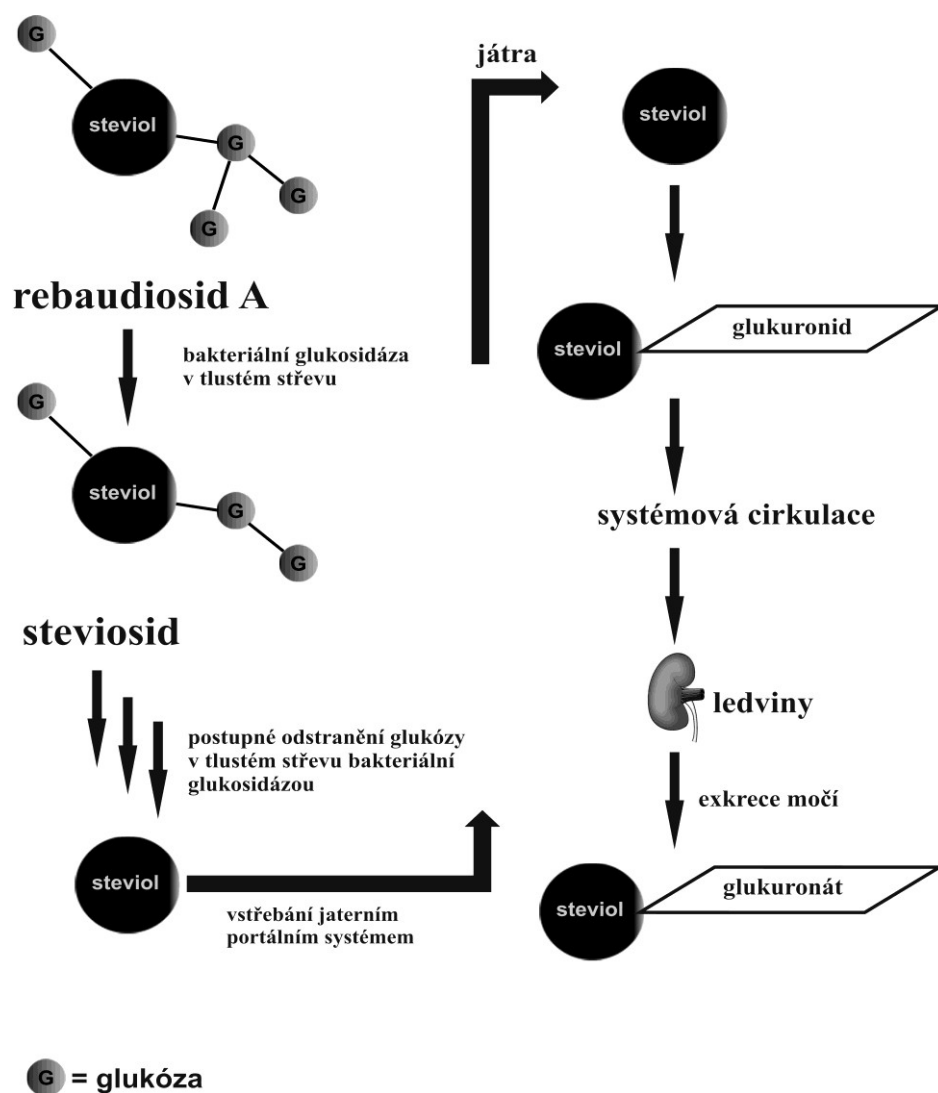
#### 4.6 Komerční využití steviol glykosidů

Steviol glykosidy jsou velmi stabilní při skladování v práškové formě. Pokud jsou uloženy v uzavíratelných polyethylenových sáčcích, jejich degradace je velmi pomalá a pohybuje se v rozmezí 1 až 2 % hm. za jeden rok. Také jejich tepelná stabilita je značná, bez měřitelné degradace za podmínek pasterizace mléčných výrobků, a dají se proto s výhodou použít k pečení až na hranici 200 °C. Steviol glykosidy jsou též stabilní v širokém rozmezí pH. Ve vodných roztocích s hodnotu pH menší než 3,0 a současně za působení teploty nad 40 °C klesá jejich stabilita a rozkladné procesy jsou na stejné úrovni jako v případě práškové substance [117, 118]. Takové vlastnosti steviol glykosidů rozšiřují potenciál jejich použití. Jsou komerčně dostupné nejen v Japonsku, Koreji, Číně, jihovýchodní Asii a Jižní Americe, kde jsou hojně používány ke slazení potravin a nápojů. V USA je extrakt z listů stévie využíván nejen ke slazení potravin a pochutin, ale je jej přidáváno i do dermatologických přípravků. FDA (Food and Drug Administration) v roce 2008 uvedla, že rebaudiosid A lze považovat za bezpečný, pokud není užíván v nadlimitní denní dávce vyšší než 400 mg. Při rozkladu takového množství steviol glykosidů v tlustém střevu by došlo k uvolnění cca 80 mg glukózy, která by byla resorbována zpět. Listy stévie přirozeně obsahují komplexní směs sladkých diterpenických glykosidů, včetně steviosidu, steviolbiosidu, rebaudiosidů (A, B, C, D, E) a dulkosidu A a B. Steviol glykosidy jsou v současné době celosvětově používány jako sladidlo v řadě průmyslových potravin, jako jsou nealkoholické i alkoholické nebo ovocné nápoje, dezerty, studené cukrovinky, omáčky, lahůdky, kukuřičné výrobky, pečivo, sušenky a stolní sladidla [119].



#### 4.7 Metabolismus steviol glykosidů

Metabolické studie provedené na zvířatech i lidech ukázaly, že steviol glykosidy jsou po orální aplikaci absorbovány a hydrolyzovány střevní mikroflórou na steviol, viz Obr. 4.2. Steviol se ve značné míře resorbuje a pouze v malé míře je přímo vyloučen z těla stolicí [120]. V játrech steviol podléhá konjugaci s glukuronovou kyselinou za vzniku steviol glukuronidátu, který je u lidí vylučován močí a u krys převážně žlučí [121]. V organismu nedochází k žádné retenci derivátů steviol glykosidu. Podezření na přítomnost steroidních hormonů, které mohou být rozkladnými produkty steviol glykosidů, se v moči nepodařilo prokázat [122].



Obr. 4.2 Schematické znázornění metabolismu rebaudiosidu A v lidském organismu.

#### **4.8 Působení steviol glykosidů na homeostázu glukózy**

V samostatné klinické studii byly podrobeny randomizované subjekty s diabetem mellitu II. typu denní dávce 1000 mg rebaudiosidu A nebo placebo podávanou po dobu 16 týdnů [123] a byl sledován glykosylovaný hemoglobin (HbA). Doplňkovými ukazateli byly kontroly; glykémie nalačno, inzulínu a C-peptidu. Výsledky ukázaly, že denní dávka 1000 mg rebaudiosidu A substituovaná po dobu 16 týdnů nemá vliv na homeostázu glukózy; rovněž nebyly prokázány nežádoucí účinky na krevní tlak nebo lipidový profil [124]. Výsledky této studie jsou v dobré shodě s prací Jeppesen a kol. [125], která uvádí, že 3měsíční denní spotřeba steviosidu o dávce 1500 mg, neovlivnila krevní tlak nebo krevní profil lipidů u pacientů s diabetem II. typu.

#### **4.9 Působení steviol glykosidů na tvrdé zubní tkáň**

Rostlina *Stevia rebaudiana* Bertoni byla využívána v prevenci zubního plaku a kazu, stejně tak proti krvácení dásní a jejich zánětu již po staletí Indiány z Jižní Ameriky. Její antibakteriální a antivirový účinek tkví ve struktuře, chlorofylové aktivitě a přítomnosti vitaminů a minerálů [126, 127]. V praxi bylo ověřeno, že již 0,5 % roztok steviosidu dokáže účinně potlačit bujení hlavních kariogenních mikroorganismů *Streptococcus mutans* [128] i *Lactobacillus plantarum* [98]. Produkty metabolismu bakterie *Streptococcus mutans* v roztocích glukózy, fruktózy či snadno fermentujících sacharidů jsou organické kyseliny jako: mléčná, propionová, máselná, octová, které mají za následek snížení pH v dutině ústní na hodnotu kolem 4, a tím působí zvýšenou měrou na degradaci tvrdých zubních tkání, zejména hydroxyapatitových struktur. Při pH 4 až 5 se již začíná utvářet zubní plak, který pokrývá povrch zubů i sliznic. V roztocích steviol glykosidů zůstala hodnota pH nad hranicí 5, čímž byla potlačena tvorba tohoto bio-filmu, respektive i počátek kariogenní léze na povrchu zubu. Česká legislativa udává přísný zákaz

použití fermentujících sacharidů v doplňcích pro ústní hygienu. Otázkou jen zůstává, zda-li steviol glykosidy mohou nahradit stávající nefermentující sladidla v zubních pastách a vodách. Navzdory tomu se využívání steviol glykosidů v současnosti velmi rozšiřuje, což s sebou přináší požadavek pro kontrolu jejich obsahu v potravinách z důvodů možné falzifikace.

#### **4.10 Analytické metody pro stanovení steviol glykosidů**

Z dosud známých analytických metod byla pro stanovení steviol glykosidů v listech stévie použita ionizace desorpcí elektrosprejem [129], blízká infračervená spektroskopie [130] a vysokoúčinná tenkovrstvá chromatografie s denzitometrickou kvantifikací [131] nebo hmotnostní spektrometrií [101]. V analýze potravin mají ovšem zcela dominantní postavení techniky HPLC za použití  $\text{NH}_2$  kolon [132, 133], *RP-18C* kolon [134, 135] a nově také kolon HILIC [136, 137]. HPLC byla v roce 2010 doporučena Světovou zdravotnickou organizací jako referenční metoda pro stanovení steviol glykosidů v potravinách [137, 138]. Hlavním nedostatkem HPLC analýzy slabě absorbujících glykosidů se stává nalezení citlivé detekční techniky. Při použití UV detekce se pracuje při krátkých vlnových délkách kolem 190 nm [139] nebo se citlivost zvyšuje derivatizací glykosidů pomocí *p*-bromophenacyl bromidu [132]. Z tohoto důvodu se HPLC kombinuje se všemi typy hmotnostních analyzátorů, které současně zajistí selektivitu stanovení [112, 140, 141]. První pokusy s analýzou steviol glykosidů byly provedeny i pomocí kapilární elektroforézy [142]. Základem separačního elektrolytu byl tetraboritan sodný s přidavkem organického rozpouštědla a pracovalo se technikou CZE; v jednom případě byl k tetraboritanu sodnému přidáván SDS a separovalo se technikou MECK [143, 144]. V nejnovější CE studii byl pro oddělení rebaudiosidu A a steviosidu použit přídatek modifikovaného  $\beta$ -cyclodextrinu přímo do fosfátového pufru. V této metodě bylo detekováno pomocí málo citlivé UV detekce bez derivatizace steviol

glykosidů [143-146]; při CZE analýze extraktu z lístků stévie byla použita selektivní MS detekce [147]. Citlivost dosud popsaných CE stanovení je nízká a lze ji použít pro stanovení steviol glykosidů v koncentrovaných extraktech ze stévie. Na druhou stranu analýza potravin s obsahem steviol glykosidů nebyla v literatuře doposud popsána.

#### 4.11 Cíl práce

Cílem této kapitoly byl vývoj a využití vysokoúčinné elektroforetické separace v kombinaci s citlivou bezkontaktní vodivostní detekcí ( $C^4D$ ) [28, 145, 148] pro stanovení rebaudiosidu A a steviosidu v potravinových doplncích a nápojích běžně dostupných v obchodní síti v České republice. Předpokladem nově vyvinuté metody bude, že CE nabídne v porovnání s HPLC řadu předností, jako je krátká doba analýzy, snadná úprava vzorku založená pouze na ředění a v neposlední řadě také miniaturizaci celého procesu analýzy včetně minimální spotřeby činidel [149], což je opět ve shodě s ideou zelené chemie.

#### 4.12 Materiál a metody

Veškeré použité chemikálie vykazovaly analytický stupeň čistoty. Steviosid (Sigma), rebaudiosid A (Sigma), rebaudiosid B (Sigma), hydroxid lithný (Fluka), kyselina boritá (Sigma), polyethylenglykol (PEG  $M_r$  8.000), polyvinylalkohol (PVA; Fluka), INST Coating solution (INST; Biotaq, USA). Zásobní roztoky jednotlivých analytů steviosidu, rebaudiosidu A, rebaudiosidu B, byly připraveny o koncentraci  $1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Deionizovaná voda (DEI) Milli-Q (18,2  $M\Omega\cdot\text{cm}$ , Millipore) byla použita k přípravě BGE a zásobních roztoků standardů, které byly uchovány v ledničce při teplotě  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  až do vlastního stanovení. Zásobní roztoky 20 %  $m/v$  PEG 8.000 a 5 %  $m/v$  PVA byly připraveny rozpuštěním pevných látek ve vodě (PEG 8.000 v ledové

vodě) a poté použity jako hydrofilní médium k CE separaci. BGE byl připraven rozpuštěním požadovaného množství kyseliny borité v deionizované vodě, ke kterému byl přidán pevný LiOH k dosažení požadovaného pH. Titrace pevným LiOH je zvolena z důvodu omezení sorpce CO<sub>2</sub> do roztoku, a tím potlačení vzniku nežádoucích systémových píků během samotné CE analýzy. pH bylo měřeno laboratorním pH metrem pMX 3000 WTW (Německo).

#### 4.13 Aparatura a optimální experimentální podmínky

Elektroforetické separace byly provedeny při laboratorní teplotě 25 °C na přístroji HP<sup>3D</sup> CE (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) s bezkontaktním vodivostním detektorem (C<sup>4</sup>D). Bezkontaktní vodivostní detektor byl konstruován z 2,5 mm dlouhých tubulárních elektrod vzájemně oddělených 1,0 mm mezerou s vloženým stíněním. C<sup>4</sup>D pracující při střídavém signálu o vhodné frekvenci 1,0 MHz a efektivním napětí 50 V<sub>pp</sub> (peak to peak) [150], viz Obr 4.3. Separační křemenná kapilára byla 31,5 cm dlouhá (18 cm k C<sup>4</sup>D) o vnitřním průměru 10 µm. Optimalizovaný separační elektrolyt o složení: a) 170 mM kyselina boritá/LiOH, pH 9,0; b) identický BGE s přídavkem 2 % *m/v* polyethylenglykolu (8000) nebo c) přídavkem 0,5 % *v/v* INST Coating solution přímo do základního elektrolytu. Elektroforetické separace byly provedeny v kationtovém módu při napětí +20 kV, příslušný elektrický proud byl 2,3 µA; při hydrodynamickém dávkování vzorku do kapiláry působením tlaku 50 mbar po dobu 100 s. Separační kapilára byla vložena do elektroforetické kazety a termostatována na teplotu 25 °C. Nová kapilára byla před vlastní separací aktivována v sekvenci: 0,1 M NaOH (10 min.), voda (10 min.) a BGE (10 min.); mezi jednotlivými analýzami byl použit 3 min. proplach BGE.

#### 4.14 Příprava vzorků

Vzorky sladidel a nápojů pocházely z produktů běžně dostupných na českém trhu. Jednalo se o tekuté stolní sladidlo na bázi steviol glykosidů s názvem Stevia (F&N dodavatelé, ČR, 2,5% obsah steviol glykosidů), sypké sladidlo z přírodních zdrojů s názvem Stevia (F&N dodavatelé, ČR, fruktóza, rebaudiosid A o čistotě 97 %; obsah steviol glykosidu neuveden); sladidlo STEVIA v tabletách (ARIKA s.r.o., SR, s obsahem steviol glykosidů 16,8 mg v jedné tabletě); ovocný nápoj Jupík Funny Fruit Cherry Cola (Kofola a.s., ČR, obsah steviol glykosidů neuveden); ovocné pivo Staropramen Cool Lemon (Pivovary Staropramen, ČR, obsah steviol glykosidů neuveden). Pevné vzorky byly nejprve rozpuštěny v poměru 1 mg pevného vzorku na 1 ml deionizované vody za pomoci ultrazvuku. Následně byly všechny vzorky filtrovány přes centrifugační filtry Durapore (velikost póru 0,45 μm, Millipore) po dobu 2 min. při 14,100 ot.min<sup>-1</sup> v centrifuze. Finálně byly vzorky před vlastní CE analýzou ředěny dle potřeby 5 – 100násobně směsí acetonitrilu/deionizovaná voda tak, že výsledný obsah ACN ve vzorku dosahoval 80 % v/v.

#### 4.15 Statistické zpracování výsledků

Naměřená data CE analýz jsou uvedeny jako průměrná hodnota ± standardní odchylka z 10ti po sobě jdoucích měření. Pro statistické zpracování dat byl použit program Origin 8.0 (OriginLab Corporation, USA). Počet teoretických pater byl vypočítán jako  $N = 5,54 (t_M/w_{1/2})^2$ , kde  $t_M$  je migrační čas,  $w_{1/2}$  je šířka píku v polovině jeho výšky. Rozlišení analytů  $R$  bylo určeno ze vztahu  $R = 2(t_{M2} - t_{M1})/(w_1 + w_2)$ , kde  $w_1$  and  $w_2$  jsou šířky píků při základní linii. Elektroforetická mobilita ( $u$ ) byla vypočítána dle vztahu;

$$u = \frac{l_C \cdot l_D}{U} \cdot \left( \frac{1}{t_{EOF}} - \frac{1}{t_M} \right) \quad (4-1)$$

kde  $l_C$  je celková délka separační kapiláry,  $l_D$  je délka kapiláry k detektoru (18 cm),  $U$  je separační napětí,  $t_{EOF}$  je migrační čas elektroosmotického toku a  $t_M$  je migrační čas sledovaného analytu.

## 5 Stanovení steviol glykosidů pomocí kapilární elektroforézy s C<sup>4</sup>D

Sacharidové jednotky vázané na jádro steviolu neobsahují žádnou snadno ionizovatelnou funkční skupinu. Pro získání záporného náboje na molekule je potřeba silně alkalického prostředí, podobně jako je tomu při elektroforetickém stanovení mono- či disacharidových jednotek. Steviol glykosidy jsou látky komplexní povahy se značnou molekulovou hmotností  $M_r(\text{Reb A})$  967 a  $M_r(\text{Stev})$  857, které by bylo nutné separovat až při značně vysokých hodnotách pH separačního elektrolytu,  $\text{pH} > 13$  [151-153]. Takové podmínky jsou ovšem nevhodné pro provádění elektroforetické separace. Z praktického hlediska je mnohem přívětivější separovat takové látky ve formě nabitých komplexů s  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , a využít tak schopnosti kyseliny borité vytvářet chemické vazby s molekulami s vicinálním 1,2 nebo příležitostně 1,3 diolovým uskupením. V důsledku toho vytváří kyselina boritá kovalentní, reversibilní komplexy se sacharidy. Tyto komplexy vykazují aniontickou pohyblivost a při pH blízkém 9,0 se pohybují proti směru elektroosmotického toku. Vysoká hodnota pH separačního elektrolytu podporuje vznik silného elektroosmotického toku v separační kapiláře, který je nutné redukovat. Rychlost elektroosmotického toku může být řízena přidávkou hydrofilních polymerů, jako polyethylenglykol, polyvinylalkohol či INST, do základního elektrolytu.

## 5.1 Optimalizace separačních podmínek pro stanovení steviol glykosidů v modelových vzorcích

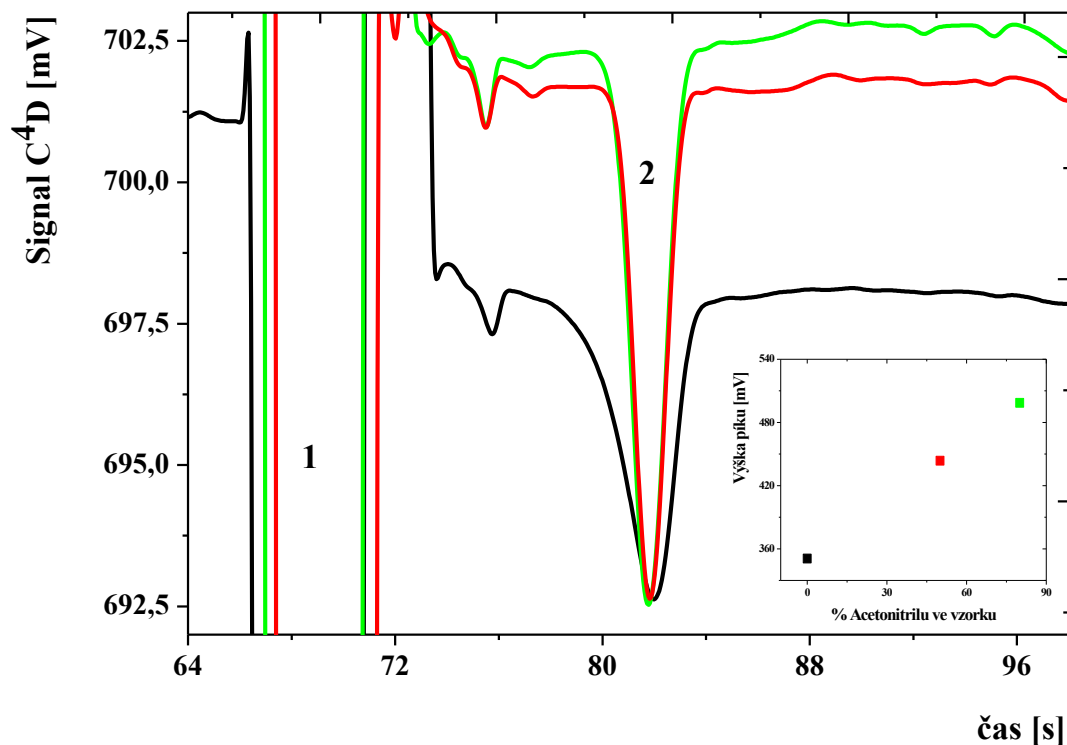
Optimalizace separačních podmínek je multifaktoriální proces, v němž mohou hrát významnou roli různé parametry. Hlavní faktory, které je třeba brát v úvahu při vývoji nové CE metodiky, jsou vnitřní průměr separační kapiláry, intenzita separačního elektrického pole a především složení základního elektrolytu, jeho koncentrace a pH. Pro zvýšení citlivosti CE stanovení je potřeba také optimalizovat složení vzorku volbou vhodného rozpouštědla, aby mohlo být do kapiláry nadávkováno velké množství vzorku, který je následně pod vlivem elektrického pole zaostřen do úzké zóny, tzv. *zaostření nebo stacking*. Jednou z metod stackingu je přidavek organického rozpouštědla do vzorku, který byl testován i v této práci [24, 154].

### 5.1.2 Vliv acetonitrilu na zaostření zóny analytu

Jako organické rozpouštědlo pro přípravu vzorků steviol glykosidů byl testován ACN. ACN je mísitelný s vodou a zároveň jsou v něm steviol glykosidy rozpustné. Tato studie byla provedena se standardním roztokem steviosidu o koncentraci  $0,4 \text{ mg.ml}^{-1}$ , který byl rozpuštěn i) ve vodě, ii) v 50% v/v směsi ACN/H<sub>2</sub>O a iii) v 80% v/v směsi ACN/H<sub>2</sub>O. Bylo zjištěno, že migrační čas je pro všechna tři testovaná média v separačním elektrolytu 30 mM kyselina boritá/LiOH, pH 9,0 obdobný, odchylovající se od průměrného času  $1,17 \pm 0,01 \text{ min.}$ , ne o více než 2 %. Plocha a výška registrované zóny úměrně narůstá se zvyšujícím se procentem ACN ve vzorku. Pro vodnou fázi byla registrovaná plocha  $1197 \pm 40 \text{ mV.s}$  a výška  $350 \pm 10 \text{ mV}$ , pro směs 50% ACN/H<sub>2</sub>O byla plocha  $1276 \pm 189 \text{ mV.s}$  a výška  $443 \pm 20 \text{ mV}$  a pro 80% ACN/H<sub>2</sub>O plocha  $1588 \pm 95 \text{ mV.s}$  a výška  $499 \pm 6 \text{ mV}$ . Pro další experimentální měření bylo vybráno separační prostředí s nejhodnějšími separačními parametry; směs 80% ACN/H<sub>2</sub>O. Elektroferogramy separace modelového vzorku steviosidu v závislosti na obsahu ACN ve vzorku jsou znázorněny na



Obr. 5.1, ve kterém je zároveň vynesena lineární závislost výšky píku steviosidu na obsahu ACN.

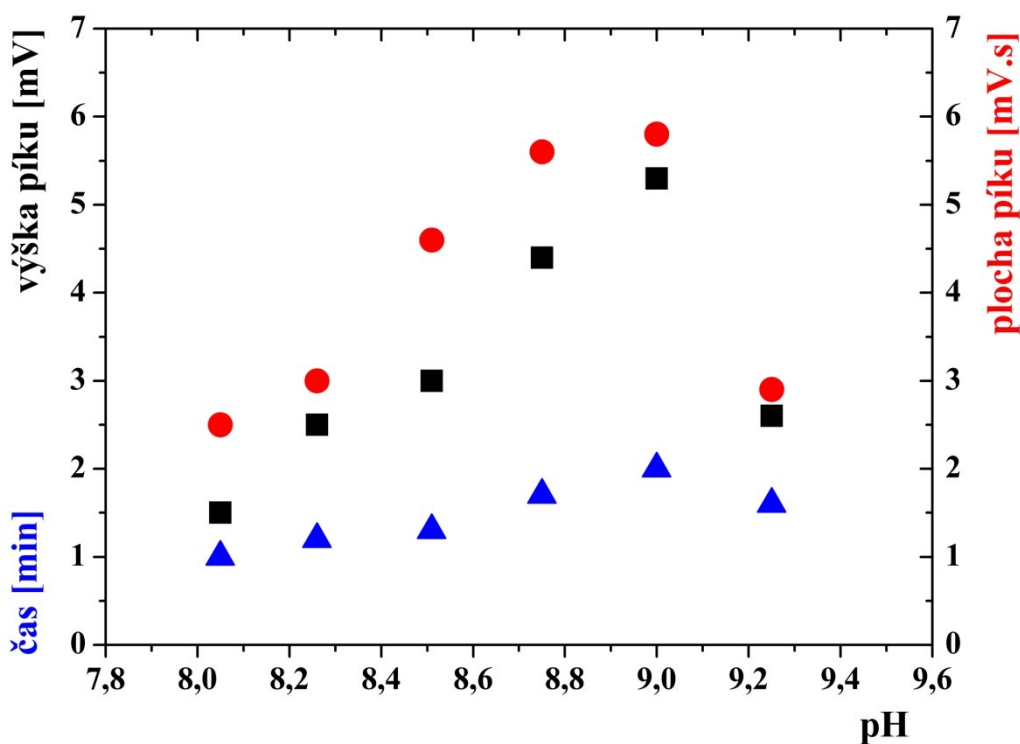


**Obr. 5.1.** Elektroferogramy modelového vzorku steviosidu o koncentraci  $0,4 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ , který byl rozpuštěn: i) ve vodě – černá, ii) v 50% v/v ACN/H<sub>2</sub>O – červená, iii) v 80% v/v ACN/H<sub>2</sub>O – zelená. Separační elektrolyt 30 mM kyselina boritá/LiOH, pH 9,0, napětí +20 kV, hydrodynamické dávkování 50 mbar . 20 s.

### 5.1.3 Vliv pH základního elektrolytu na separační podmínky

Hodnota pH separačního elektrolytu hraje významnou roli během celého separačního procesu, neboť přímo úměrně ovlivňuje elektroosmotický tok, ale i disociační stupeň analytu, jehož komplex s H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> je slabým elektrolytem. V této části práce byl testován vliv pH v úzkém rozmezí hodnot 8,05 – 9,25 pro BGE tvořený 30 mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>/LiOH; analyzován byl standard

steviosidu o koncentraci  $0,4 \text{ mg.ml}^{-1}$  rozpuštěný v 80% v/v ACN. Sledovány byly tyto parametry: migrační čas, plocha píku a výška píku. Z registrovaných dat je patrné, že migrační čas pozvolna vzrůstá od  $1,0 \pm 0,02 \text{ min.}$ , při pH 9,0 dosahuje maxima  $2,0 \pm 0,04 \text{ min.}$ , následně klesá na  $1,6 \pm 0,02 \text{ min.}$  při pH 9,25. Maximální plocha píku byla pozorována při pH separačního elektrolytu 9,0; stejně jako výška píku. Ze získaných dat lze dovodit, že optimální separační podmínky pro kvantitativní i kvalitativní analýzu se nacházejí v úzkém rozpětí pH 8,75 – 9,0, viz Obr. 5.2.



**Obr. 5.2.** Vliv pH BGE na separační parametry: ▲ – čas [min], ■ – výška píku [mV], ● – plocha píku [mV.s]. Experimentální podmínky: BGE 30 mM  $\text{H}_3\text{BO}_3/\text{LiOH}$ ; vzorek standard steviosidu o koncentraci  $0,4 \text{ mg.ml}^{-1}$  rozpuštěný v 80% v/v ACN; hydrodynamické dávkování tlakem 50 mbar po dobu 20 s; napětí +20 kV.

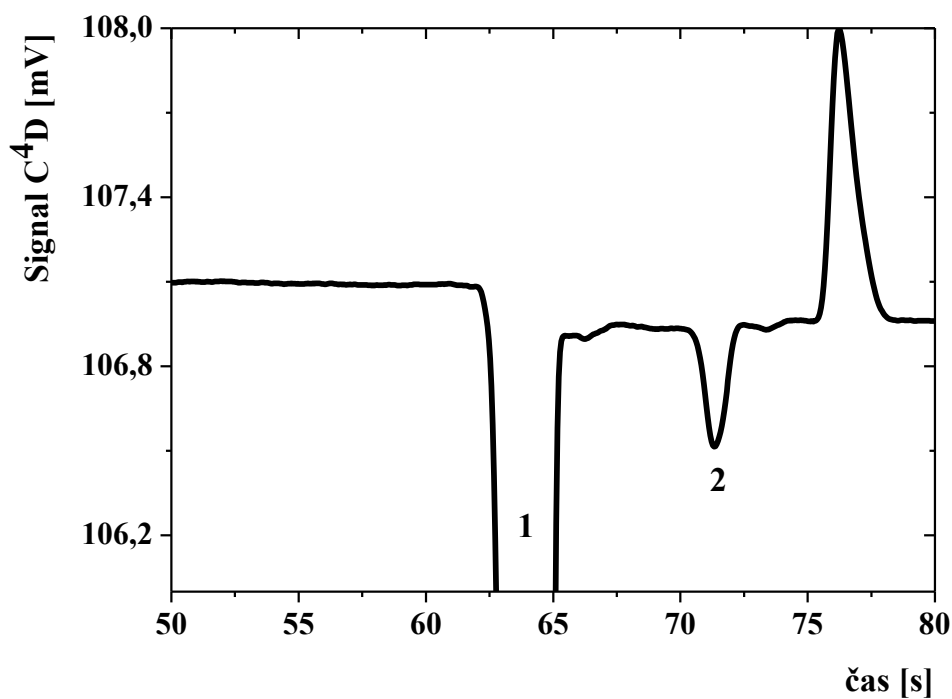
### 5.1.4 Vliv koncentrace separačního pufu

Koncentrace separačního elektrolytu ovlivní migrační čas, ale i rozlišení sledovaných analytů. Separační elektrolyt o složení kyselina boritá/LiOH byl testován v širokém rozmezí koncentrací 10 – 200 mM. Experimenty ukázaly, že Reb A a Stev se začínají separovat od koncentrace 100 mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>/LiOH, s rozlišením  $R_{1,2} = 1,3$ ; ve 170 mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>/LiOH je dosaženo rozlišení  $R_{1,2} = 1,7$ , které je dostačující pro úplné oddělení obou látek a převyšuje kritickou hodnotu 1,5. Při dalším zvyšování koncentrace nad hodnotu 180 mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>/LiOH již docházelo k značnému rozmývání sledovaných zón vlivem nadbytečného uvolňování Jouleova tepla.

### 5.1.5 Vliv hydrofilních polymerů na oddělení směsného píku steviosidu a rebaudiosidu A od zóny neutrálních látek

Pro vzájemné oddělení pomalu migrujících steviol glykosidů; rebaudiosidu A a steviosidu je potřeba snížit rychlost EOF tak, aby byl dán dostatek času na separaci látek s blízkými hodnotami elektroforetických mobilit. Celkový obsah steviol glykosidů lze stanovit od koncentrace separačního elektrolytu 25 mM kyselina boritá/LiOH, pH 9,0 jako společný pík, neboť rebaudiosid A a steviosid migrují v téměř totožný čas. Za těchto podmínek nelze obě látky stanovit vedle sebe a je potřeba snížit rychlost EOF, např. dynamickým pokrytím vnitřních stěn kapiláry hydrofilním polymerem přidávaným do separačního elektrolytu. Pro tento účel byly testovány tři hydrofilní polymery i) polyethylenglykol  $M_r$  8.000 o koncentraci 2 % *m/v*, ii) polyvinylalkohol o koncentraci 0,5 % *m/v* a iii) 0,5 % *v/v* komerční produkt INST Coating Solution. Tyto polymery dokáží účinně snížit rychlost EOF z 53,6 m<sup>2</sup>V<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> na přijatelnou mez 10 - 20·10<sup>-9</sup> m<sup>2</sup>V<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> a výsledkem je vzájemné oddělení rebaudiosidu A a steviosidu až na základní linii. Ze záznamu, viz Obr. 5.3, je patrné, že pokud jsou steviol

glykosidy separovány bez hydrofilního polymeru, jejich detekce je možná jako směsný pík v čase  $72 \pm 0,6$  s pro 100 mM kyselina boritá/LiOH o pH 9,0.

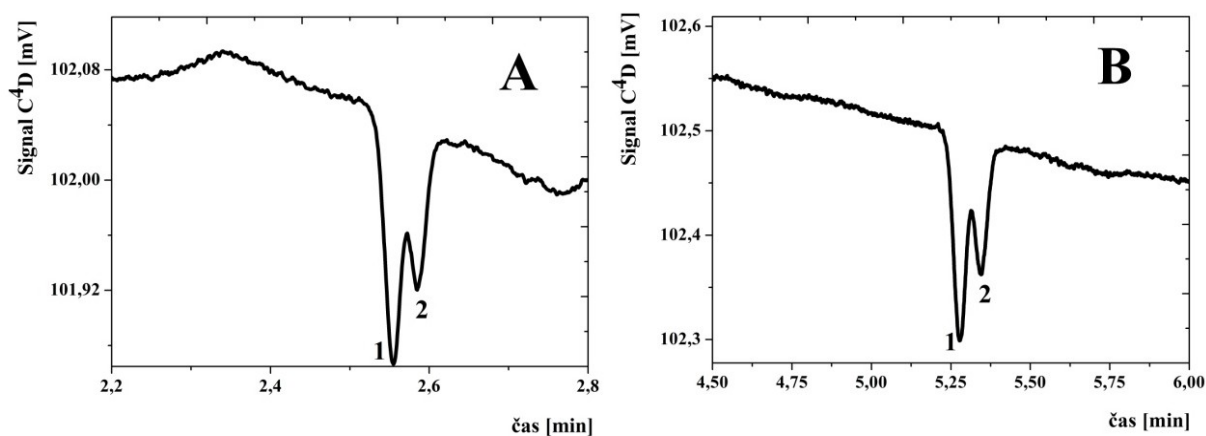


**Obr. 5.3.** Záznam separace rebaudiosidu A a steviosidu v BGE 100 mM kyselina boritá/LiOH bez přídavku hydrofilního polymeru, pH 9,0, +20 kV, hydrodynamické dávkování 50 mbar. 20 s. Identifikace píků: 1. EOF, 2. směsný pík rebaudiosidu A a steviosidu o celkové koncentraci  $0,1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  v 80% *v/v* ACN.

Použití polyvinylalkoholu nemá na separaci zásadní vliv, protože nevede k úplnému oddělení obou analytů a pouze mírně prodlužuje migrační čas směsného píku Reb A a Stev o zhruba 6 s na celkový čas  $78 \pm 0,4$  s. Celou situaci mění přídavek PEG 8.000, který účinněji zpomaluje silný EOF. Díky tomu je možné dosáhnout částečného oddělení rebaudiosidu A a steviosidu, které je spojeno s prodloužením migračního času na  $2,57 \pm 0,2$  min. pro Reb A a  $2,59 \pm 0,1$  min. pro Stev, s rozlišením obou látek  $R_{1,2} = 0,7$ , viz Obr. 5.4A.

### 5.1.6 Vliv separačního napětí

Vložené napětí v podobě intenzity elektrického pole má na separaci zásadní vliv, neboť účinnost separačního procesu v CE se řídí vztahem pro počet teoretických pater  $N$ ,  $N = u_{el} \cdot E / 2D$ , kde  $u_{el}$  a  $D$  jsou elektroforetická mobilita a difúzní koeficient sledovaného analytu,  $E$  intenzita elektrického pole [5]. Ze vztahu vyplývá, že vysoké separační účinnosti je docíleno při vysokých hodnotách  $E$ . To má ovšem své limity. Při práci v koncentrovaných separačních elektrolytech, jako je tento případ, s rostoucím  $E$  roste množství Jouleova tepla vznikajícího průchodem proudu roztokem, které způsobuje nežádoucí rozmývání separovaných zón. V této studii bylo testováno separační napětí v rozmezí 10 – 30 kV. Při napětí vyšším než +20 kV bylo dosaženo kratšího migračního času, avšak s nerozděleným směsným píkem sledovaných steviol glykosidů. Navíc byl pozorován zvýšený šum základní linie detektoru, který přímo souvisí s vyšší měrou uvolňování Jouleova tepla. Při vloženém napětí +10 kV dochází k mírně lepšímu dělení sledovaných analytů, avšak na úkor delšího migračního času, viz Obr 5.4. Jako optimální separační napětí pro analýzu steviol glykosidů bylo zvoleno napětí +20 kV.



**Obr. 5.4.** Záznam elektroforetického stanovení standardu rebaudiosidu A a steviosidu o koncentraci 10 mg.l<sup>-1</sup>. Experimentální podmínky: 100 mM kyselina boritá/LiOH, pH 9,0, 2 % *m/v* PEG 8.000, hydrodynamické dávkování 50 mbar po 100 s, napětí +20 kV (A), +10 kV (B). Identifikace píků; 1. rebaudiosid A, 2. steviosid.

### 5.1.7 Využití kapiláry o malém vnitřním průměru při CE separaci steviol glykosidů

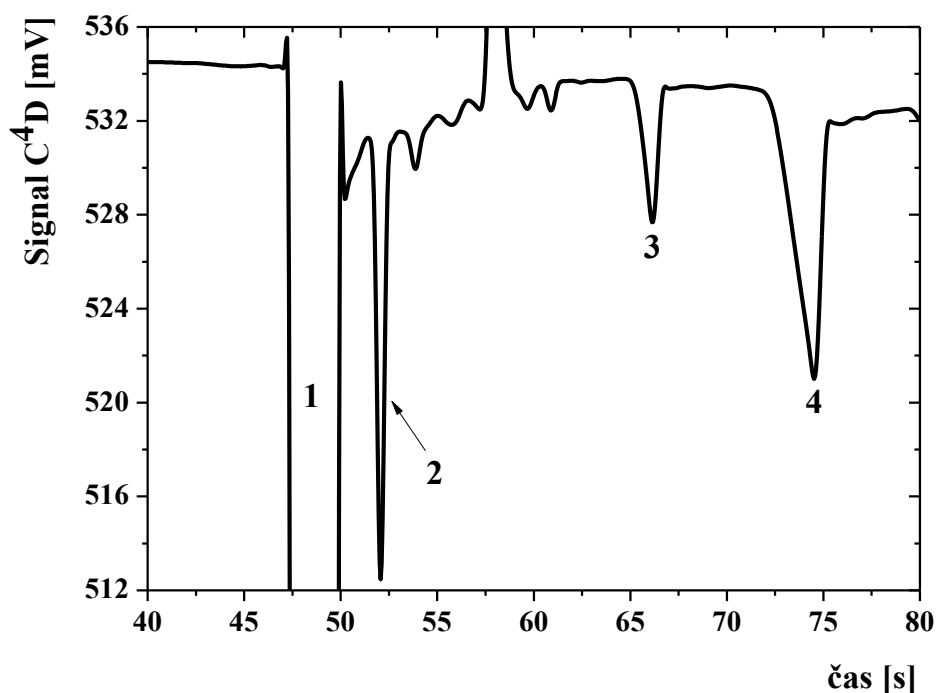
V kapilární elektroforéze se separace standardně provádí v jednokanálových kapilárách o vnitřním průměru ( $d$ ) 5 až 100  $\mu\text{m}$ . Vnější průměr kapiláry ( $od$ ) je v porovnání s  $d$  několikanásobně větší, pohybuje se kolem 363  $\mu\text{m}$ . Pro účinný odvod tepla z kapiláry je žádoucí, aby poměr povrch/vnitřní objem kapiláry byl co možná největší. Proto je výhodné používání kapilár s malým  $d$  a z tohoto důvodu byly testovány 10  $\mu\text{m}$  kapiláry [28]. Provádění separace v kapilárách o malém  $d$  je nevýhodné v kombinaci s optickou detekcí, kde se snižuje optická dráha pro absorpci elektromagnetického záření, a tím i citlivost detekce. Na druhou stranu při používání  $\text{C}^4\text{D}$ , která je univerzální detekční technikou v CE a lze pomocí ní detekovat analyty nezávisle na jejich absorpčních vlastnostech [155-157], to neplatí. Přenos signálu mezi vysílací a přijímací elektrodou je v  $\text{C}^4\text{D}$  především řízen odporem roztoku v detekční cele. To znamená, že stejné citlivosti lze dosáhnout v kapilárách s velkým  $d$  a nízkou specifickou vodivostí BGE jako v kapilárách s malým  $d$  při vysokých specifických vodivostech BGE. To je právě tento případ, kdy jsou separace prováděny ve vysoce vodivém BGE za použití 10  $\mu\text{m}$  kapiláry, jejímž konečným výsledkem jsou LOD na submikromolární úrovni.

### 5.2 CE/ $\text{C}^4\text{D}$ stanovení steviol glykosidů v nápojích a potravinách

Výše uvedený text shrnuje základní poznatky o vývoji a optimalizaci CE metody umožňující jednoduché a efektivní stanovení steviol glykosidů, na které navázala analýza reálných vzorků potravin a stolních sladidel. Použitím vhodného separačního elektrolytu obsahujícího modifikátor EOF a kapiláry o malém vnitřním průměru v kombinaci s bezkontaktním vodivostním detektorem lze využít pro stanovení steviol glykosidů v reálných vzorcích potravinových doplňků a nápojů.

### 5.2.1 Stanovení celkové koncentrace steviol glykosidů v nápojích a potravinách v separačním elektrolytu bez přidavku modifikátoru EOF

K CE separacím steviol glykosidů byl použit základní roztok  $\text{H}_3\text{BO}_3/\text{LiOH}$  v koncentračním rozmezí 25 – 200 mM o pH 9,0. Za těchto podmínek teče kapilárou rychlý kationtický EOF a za ním je zaznamenán směsný pík rebaudiosidu A a steviosidu. Experimentální data ukázala, že směsný pík steviol glykosidů se začíná od EOF oddělovat počínaje od koncentrace 75 mM  $\text{H}_3\text{BO}_3/\text{LiOH}$  a hodnota rozlišení postupně roste v celém testovaném rozsahu koncentrací separačního elektrolytu až do 200 mM  $\text{H}_3\text{BO}_3/\text{LiOH}$ , kde dosahuje hodnoty  $R_{1,2}$  7,0. S rostoucí koncentrací  $\text{H}_3\text{BO}_3$  narůstá podíl steviol glykosidu vázaného do nabitého komplexu, a tím i jeho elektroforetická mobilita. Citlivost stanovení zaznamenaná jako výška píku dosahuje svého maxima kolem hodnoty 170 mM  $\text{H}_3\text{BO}_3/\text{LiOH}$ . V krátkých kapilárách o malém vnitřním průměru lze pracovat při vysokých intenzitách elektrického pole, které je nezbytné pro oddělení komplexu steviol-glykosid- $\text{H}_3\text{BO}_3$  s malou hodnotou elektroforetické mobility, cca  $4 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$  od rychlého EOF s mobilitou cca  $54 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ . Za optimálních podmínek (170 mM  $\text{H}_3\text{BO}_3/\text{LiOH}$ , pH 9,0) je na elektroferogramu reálných vzorků v čase  $51,8 \pm 0,4$  s pozorován směsný pík rebaudiosidu A a steviosidu, který je oddělen od zóny elektroneutrálních látek a také od dalších možných interferujících sacharidů, jako je fruktóza a glukóza s časovým odstupem minimálně 10 vteřin, viz Obr. 5.5.



**Obr. 5.5.** CE separace sladidla Stevia v tabletové formě. Experimentální podmínky: BGE, 170 mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>/LiOH, pH 9,0; separační napětí/proud, +20 kV/2,3 μA; hydrodynamické dávkování tlakem 50 mbar po 100 s. Identifikace píků: 1. EOF, 2. směsný pík rebaudiosidu A a steviosidu, 3. fruktóza, 4. glukóza.

Kalibrační závislost pro plochu píku lze v koncentračním rozmezí 10 až 100 mg.l<sup>-1</sup> popsat lineární regresní rovnicí pro;

**rebaudiosid A:**  $y[\text{mV}\cdot\text{s}] = 0,035 (0,002) c[\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}] + 0,026 (0,095), R^2 0,999;$

**steviosid:**  $y[\text{mV}\cdot\text{s}] = 0,034 (0,000) c[\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}] + 0,043 (0,022), R^2 0,999.$

LOD vypočtený ze závislosti výšky píku na koncentraci dosahuje pro obě látky hodnoty 0,04 mg.l<sup>-1</sup>. Stanovený celkový obsah rebaudiosidu A a steviosidu ve sladidle Stevia v tabletách je 10,1 mg. Opakovatelnost migračního času pro 10 po sobě následujících analýz



směsného vzorku rebaudiosidu A a steviosidu o koncentraci  $50 \text{ mg.l}^{-1}$  je 0,6 % RSD a pro plochu píku 1,9 %; mezidenní reprodukovatelnost měřená po tři následující dny (každý den 10 analýz) dosahuje hodnot 1,3 % pro migrační čas a 3,5 % pro plochu píku.

### **5.2.2 Separace jednotlivých steviol glykosidů v reálných vzorcích v separačním elektrolytu s PEG 8.000**

Pro CE stanovení steviol glykosidů byl použit optimalizovaný separační elektrolyt o složení: 170 mM kyselina boritá/LiOH, pH 9,0 s přídavkem 2% *m/v* PEG 8.000. Hydroxid lithný byl zvolen z praktického důvodu nízké vodivosti lithných iontů. Separace byly provedeny v kationtovém módu při napětí +20 kV. Za takových podmínek migrují steviol glykosidy jako aniontové komplexy proti elektroosmotickému toku, který je při pH blízkém 9,0 rychlejší (watergap byl registrován v čase cca 3 min) a táhne steviol glykosidové komplexy s sebou směrem k detektoru. Rychlost EOF je při pH 9,0 vyšší než elektroforetická pohyblivost steviol glykosidových komplexů, a proto jsou jejich píky Reb A a Stev,  $t_M$  5,7 a 5,9 min., zaznamenány později než pozice EOF.

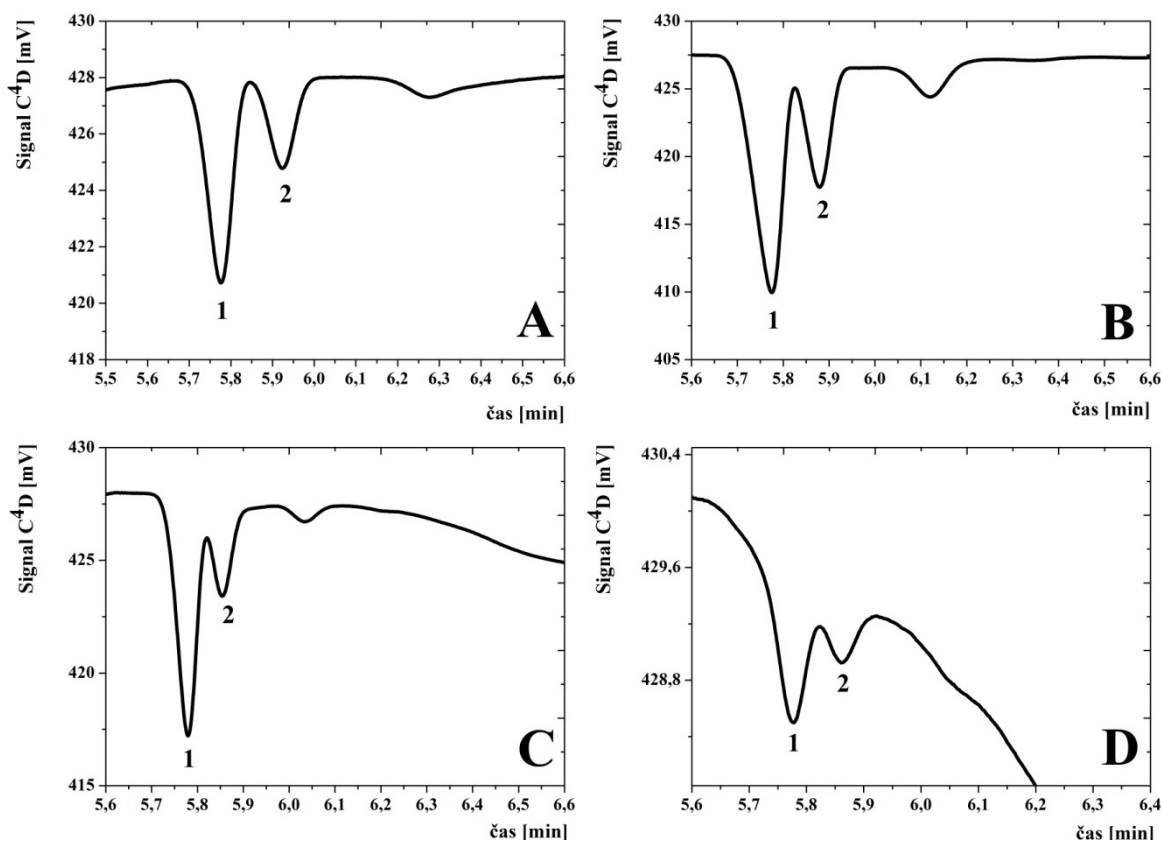
Kalibrace rebaudiosidu A i steviosidu byla provedena v koncentračním rozmezí 10 – 200  $\text{mg.l}^{-1}$ , které zároveň dobře pokrývá rozsah steviol glykosidů v reálných vzorcích, při použití 5 - 100násobného ředění vzorku před CE analýzou. Kalibrační závislosti byly v měřeném intervalu pro obě látky lineární s hodnotami korelačního koeficientů  $R \geq 0,99$ . Získané relativní směrodatné odchylky (RSD) pro migrační čas i plochu píku byly určeny z 10ti po sobě následujících analýz jednoho vzorku a odpovídají hodnotám běžně dosahovaných při CE analýzách, viz Tabulka 5.1.

**Tabulka 5.1.** Migrační čas ( $t_M$ ), počet teoretických pater ( $N$ ), limity detekce (LOD), citlivost a korelační koeficient ( $R$ ) v reálných potravinových vzorcích a nápojích. Hodnoty RSD byly určeny pro 10 analýz jednoho vzorku.

Parametr	Analyt	
	Rebaudiosid A	Steviosid
$t_M$ , min (intra day)	5,7	5,9
$t_M$ , min (inter day)	5,8	6,1
$N$ , m <sup>-1</sup>	347000	305000
LOD, mg.l <sup>-1</sup>	0,8	0,8
LOD, μM	3,7	4,6
Citlivost, mAU.s.l.mg <sup>-1</sup>	0,9554	1,0796
$R^2$	0,9979	0,9935
RSD pro $t_M$ , % (intra day)	12,6	13,1
RSD pro $t_M$ , % (inter day)	6,1	6,2
RSD pro plochu píku, % (intra day)	9,4	12,5
RSD pro plochu píku, % (inter day)	9,1	11,0

Hodnoty LOD byly určeny jako výška píku odpovídající trojnásobku průměrné hodnoty šumu. Počet teoretických pater ( $N$ ) se pohybuje kolem 347 tisíc na metr délky kapiláry pro rebaudiosid A a 305 tisíc pater na metr délky kapiláry pro steviosid. Vyšší hodnota  $N$  pro rebaudiosid A je dána kratším migračním časem a nižším vlivem nežádoucích rozmývacích efektů, zejména elektrodisperze, na asymetrické rozmytí píku. Získané LOD v reálných vzorcích jsou dostatečné pro kvantifikaci rebaudiosidu A i steviosidu v 5 - 100násobně zředěných vzorcích potravinových sladidel a nápojů. Stanovené hodnoty steviol glykosidů ve 3 potravinových vzorcích a 2 nápojích

se pohybovaly v koncentračním rozmezí 70 – 11090 mg.l<sup>-1</sup> pro rebaudiosid A a 20 – 3500 mg.l<sup>-1</sup> pro steviosid. Registrované záznamy reálných vzorků jsou uvedeny na Obr. 5.6 A – D.



**Obr. 5.6.** Záznam CE separace rebaudiosidu A a steviosidu v: A) stolní sladidlo v práškové formě; B) stolní sladidlo v tekuté formě; C) stolní sladidlo v tabletové formě; D) ovocný nápoj Jupík. Experimentální podmínky: separační elektrolyt 170 mM kyselina boritá/LiOH 2% *m/v* PEG 8.000, pH 9,0; hydrodynamické dávkování tlakem 50 mbar po dobu 100 s, separační napětí +20 kV, identifikace píků: rebaudiosid A (1) a steviosid (2).

Získané hodnoty obsahu sledovaných steviol glykosidů (Tabulka 5.2.) byly porovnány s údaji uvedenými na zadní straně etikety stolního sladidla nebo nápoje. U sladidla v tabletové formě uvádí výrobce celkový obsah steviol glykosidů: 16,8 mg na 1 tabletu (0,0575g), která byla pro účel experimentu rozpuštěna v 1 ml deionizované vody. U práškové formy sladidla výrobce uvádí pouze obsaženou sladivou látku, 97 % fruktózy a rebaudiosid A. U sladidla v tekuté formě

není specifikován obsah jednotlivých steviol glykosidů, pouze jejich suma a to v množství 2,5 % na 200 ml. Výrobce ovocného nápoje Jupík a ovocného piva Staropramen Cool Lemon udává výskyt steviol glykosidů, avšak nespecifikuje jejich množství a druh.

**Tabulka 5.2.** Stanovené obsahy rebaudiosidu A a steviosidu v reálných potravinových vzorcích a nápojích z 10 měření.

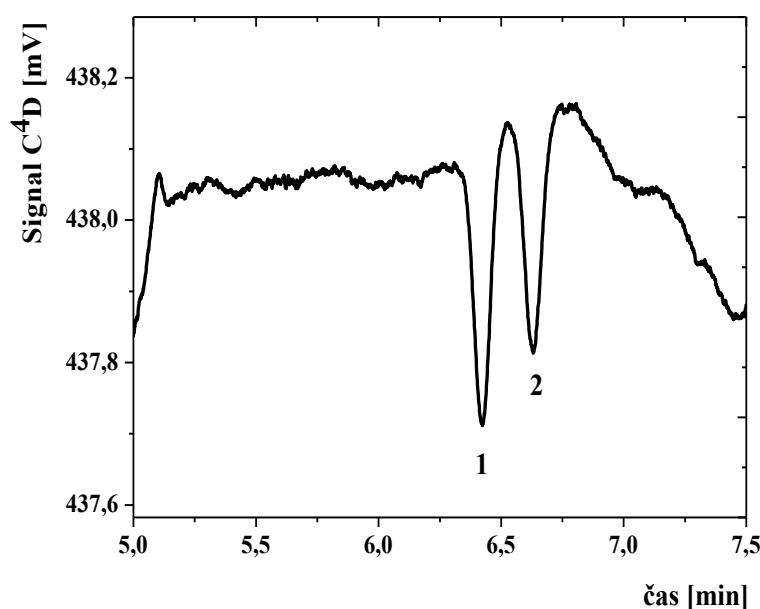
	<b>Rebaudiosid A, mg.l<sup>-1</sup></b>	<b>Steviosid, mg.l<sup>-1</sup></b>
Sladidlo v prášku	2330 ± 40	210 ± 5
Sladidlo v tabletách	7320 ± 210	2130 ± 60
Tekuté sladidlo	11090 ± 300	3500 ± 100
Ovocný nápoj Jupík	130 ± 4	40 ± 2
Ovocné pivo Staropramen	70 ± 3	20 ± 1

Z Tabulky 5.1 je rovněž patrné, že hodnoty RSD pro migrační čas i plochu píku jsou vysoké. Je to způsobeno postupným zvyšováním rychlosti EOF analýza od analýzy. V alkalickém separačním elektrolytu dochází k postupnému vymývání polymeru PEG 8.000 z aktivních center povrchu kapiláry. Proto bylo od hydrofilního polymeru PEG 8.000 upuštěno a experiment byl zaměřen na využití komerčně dostupného polymeru INST Coating solution od firmy Biotaq USA.

### **5.2.3 Stanovení rebaudiosidu A a steviosidusteviol glykosidů v nápojích a potravinách za použití INST modifikátoru EOF**

Nejlepších výsledků z testovaných hydrofilních polymerů bylo dosaženo s 0,5% v/v přidavkem INST přímo do 170 mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>/LiOH, pH 9,0, a tím dosažení separace rebaudiosidu A

a steviosidu až po základní linii, viz Obr. 5.7. Tento polymer se v porovnání s PVA a PEG nejpevněji váže na vnitřní stěnu kapiláry a jeho postupné vymývání projevující se zvyšováním rychlosti EOF je značně pomalejší než v případě 2% *m/v* PEG a 0,5% *m/v* PVA. V optimalizovaných BGE o výsledném složení 170 mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>/LiOH + 0,5 % *v/v* INST (pH 9.0) je migrační čas pro rebaudiosid A cca 6,3 min a pro steviosid cca 6,4 min, s hodnotou rozlišení  $R_{1,2} = 2$ . Migrační časy obou steviol glykosidů se mohou dle způsobu pokrytí kapiláry a celkové doby jejího používání posouvat v širším rozmezí cca 3 až 7 min v rámci jednoho dne ovšem zůstávají stabilní.



**Obr. 5.7.** CE separace směsi rebaudiosidu A a steviosidu rozpuštěných ve vodě při koncentraci 100 mg.l<sup>-1</sup>. Experimentální podmínky: BGE, 170 mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>/LiOH, + 0,5 % *v/v* INST, pH 9,0; separační napětí/proud, +20 kV/2,3 μA; hydrodynamické dávkování tlakem 50 mbar po dobu 100 s. Identifikace píků: (1) rebaudiosid A, (2) steviosid.

Závislost plochy píku na koncentraci sledovaných steviol glykosidů lze v rozmezí 10 až 200 mg.l<sup>-1</sup> popsat lineárními regresními rovnicemi ve tvaru:

**rebaudiosid A:**  $y[\text{mV.s}] = 0,143 (0,003) c[\text{mg.l}^{-1}] - 0,183 (0,341), R^2 0,999;$

**steviosid:**  $y[\text{mV.s}] = 0,145 (0,011) c[\text{mg.l}^{-1}] - 0,120 (0,687), R^2 0,989.$

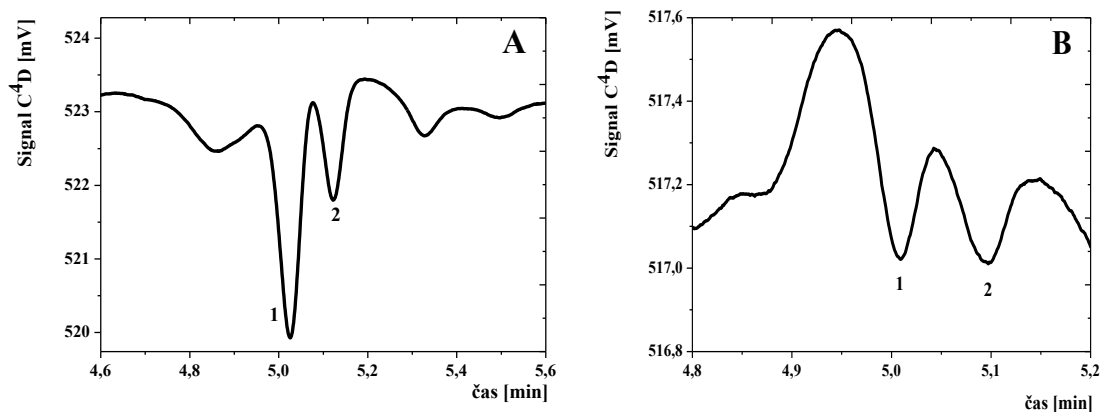
Limit detekce (LOD), vypočtený jako  $3 \times \text{výška šumu/směrnice}$  (směrnice pro závislost výšky píku na koncentraci), dosahuje pro oba steviol glykosidy hodnoty 0,1 mg.l<sup>-1</sup> a LOQ -  $10 \times \text{výška šumu/směrnice}$  hodnoty 0,3 mg.l<sup>-1</sup>. Po přepočtení na molární koncentraci je LOD pro rebaudiosid A a steviosid shodný s hodnotou 0,1 μmol.l<sup>-1</sup>. Takto nízké LOD umožňují použít 5 až 100násobné zředění vzorků nápojů a stolních sladidel, a tím účinně redukovat vliv matrice.

Opakovatelnost migračního času pro deset po sobě následujících analýz 100 mg.l<sup>-1</sup> směsi obou steviol glykosidů dosahuje hodnoty RSD 1,8 % pro rebaudiosid A a i steviosid; opakovatelnost plochy píku činila 4,4 % pro rebaudiosid A a 4,5 % pro steviosid. Opakovatelnost migračního času po tři následující dny dosahovala hodnot RSD 4,6 % pro rebaudiosid A a 4,7 % pro steviosid. Obdobně určené hodnoty RSD pro plochu píku jsou 4,8 % pro rebaudiosid A a 3,4 % pro steviosid. Důležitou podmínkou pro dosažení dobré reprodukovatelnosti je nutná častá výměna separační kapiláry. Po aktivaci nové separační kapiláry, která byla provedena ráno, byla kapilára používána po celý den a pokles migračního času EOF představoval cca 2 %. Postupný pokles migračního času je způsoben desorpcí povrchově aktivní látky INST z vnitřního povrchu kapiláry výměnou za Li<sup>+</sup>. Opětovnou aktivací jednou použité kapiláry se nepodařilo zpomalit EOF tak, aby dosáhl původní hodnoty. A to ani v případě, kdy separační kapilára byla promývána 0,1 mol.l<sup>-1</sup> NaOH po dobu 60 min. Z tohoto důvodu byla kapilára měněna každý druhý den. Častá výměna kapiláry analýzu výrazně

neprodražuje. Cena 31,5 centimetrového kusu kapiláry je cca 100 Kč (50 m kapiláry o  $d$  10  $\mu\text{m}$  stojí v přepočtu 15000 Kč).

#### **5.2.4 Analýza nápojů a potravinových doplňků s obsahem steviol glykosidů**

Úprava vzorků steviol glykosidů byla provedena dle jednoduchého postupu, viz kap 4.14. Stanovené hodnoty obsahu rebaudiosidu A a steviosidu jsou shrnuty v Tabulce 5.3.; příslušné elektroferogramy jsou demonstrovány na Obr. 5.8A - B. Obsahy steviol glykosidů byly v jednotlivých vzorcích značně rozdílné a pohybují se ve velmi širokém rozmezí. Rebaudiosid B, který se za zvolených experimentálních podmínek dobře odděluje od obou sledovaných steviol glykosidů s časovým zpožděním cca 40 s, nebyl v žádném z analyzovaných potravinových vzorků registrován. Stanovený obsah steviol glykosidů v tabletě sladidla Stevia odpovídal množství 7,0 mg rebaudiosidu A a 2,6 mg steviosidu. Při vzájemném srovnání získaných hodnot je patrné, že vyvinuté CE metody poskytují relativně shodné výsledky a lze je použít pro stanovení jak rebaudiosidu A, tak i steviosidu ve sladidlech a nápojích. Ze srovnání stanoveného obsahu rebaudiosidu A a steviosidu s celkovým množstvím všech steviol glykosidů uváděných výrobcem (16,8 mg na tabletu) lze konstatovat, že rebaudiosid A a steviosid mají ve sladivé tabletě majoritní zastoupení, stejně tak i v přírodních produktech izolovaných z rostliny *Stevia rebaudiana* Bertoni.



**Obr. 5.8.** CE/C<sup>4</sup>D stanovení rebaudiosidu A a steviosidu ve stolním sladidle a nápoji za optimalizovaných experimentálních podmínek. (A) stolní sladidlo v tabletové formě; (B) ovocné pivo Staropramen. Experimentální podmínky: BGE, 170 mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>/LiOH, + 0,5 % v/v INST, pH 9,0; separační napětí/proud, +20 kV/2,6 μA; hydrodynamické dávkování tlakem 50 mbar po dobu 100 s.

**Tabulka 5.3.** Stanovené obsahy rebaudiosidu A a steviosidu ve vzorcích potravin a nápojů z obchodní sítě běžně dostupné v ČR.

	Rebaudiosid A, mg.l <sup>-1</sup>	Steviosid, mg.l <sup>-1</sup>
Sladidlo v prášku	1850 ± 30	620 ± 30
Sladidlo v tabletách	6960 ± 310	2520 ± 90
Tekuté sladidlo	10800 ± 400	3630 ± 120
Ovocný nápoj Jupík	130 ± 4	40 ± 2
Ovocné pivo Staropramen	57 ± 2	29 ± 1



### 5.3 Závěr

Obsahy steviol glykosidů lze ve sladidlech a nápojích jednoduše stanovit pomocí kapilární elektroforézy ve spojení s  $C^4D$ . CE separaci je potřeba provádět v roztocích  $H_3BO_3$  o vysoké koncentraci, v nichž se tvoří stabilní komplexy mezi steviol glykosidem a  $H_3BO_3$ , které se následně oddělují od zóny elektroneutrálních látek. Provádění CE separací v koncentrovaných roztocích BGE je nutně spojeno s použitím tenkých kapilár o vnitřním průměru cca 10  $\mu m$ . Pro zvýšení citlivosti CE stanovení v UV-VIS oblasti spektra neabsorbujících steviol glykosidů byla použita  $C^4D$ , jejíž citlivost je řízena vodivostí roztoku v kapiláře, a nikoliv délkou optické dráhy. Vysoká citlivost  $C^4D$  ve spojení s on-line prekoncentrací vzorku zajistila dosažení nízkých LOD celého CE stanovení. Využitím jednoduché CE/ $C^4D$  instrumentace lze dosahovat limitů detekce na submikromolární koncentrační hladině, a to bez náročné derivatizace vzorku. Z uvedených důvodů lze vzorky sladidel a nápojů jen dostatečně ředit, a tím eliminovat vliv matrice na CE separaci.

## 6 Literatura

- [1] GAŠ, B. Kapilární elektroforéza: Separační analytická metoda pro věk mikročipů. Vesmír, 2001, 80, 5.
- [2] TISELIUS, A. The moving boundary method of studying the electrophoresis of proteins. Nova Acta Regiae, Societatis Scientiarum Upsaliensis, Almqvist & Wiksell, Uppsala, Sweden, 1930, Ser IV, Vol. 17, No. 4, 1-107.
- [3] HJERTÉN, S. Free zone electrophoresis. Chromatographic Reviews, 1967, 9 (2), 122-219.
- [4] JORGENSON, J. W., LUKACS K. D. ZONE ELECTROPHORESIS IN OPEN-TUBULAR GLASS-CAPILLARIES. Analytical Chemistry, 1981, 53 (8), 1298-1302.
- [5] JORGENSON, J. W., LUKACS K. D. HIGH-RESOLUTION SEPARATIONS BASED ON ELECTROPHORESIS AND ELECTROOSMOSIS. Journal of Chromatography, 1981, 218 (1-3), 209-216.
- [6] JORGENSON, J. W., LUKACS K. D. Capillary Zone Electrophoresis. Science, 1983, 222 (4621), 266-272.
- [7] FRAZIER, R. A., H. NURSTEN, AMES J. M. Capillary electrophoresis for food analysis: method development. Edition ed.: Royal Society of Chemistry, 2000. ISBN 0854044922.
- [8] PETERSEN, J., MOHAMMAD A. A. Clinical and forensic applications of capillary electrophoresis. Edition ed.: Springer Science & Business Media, 2001. ISBN 1592591205.
- [9] SUBRAMANIAN, G. Quality Assurance in Environmental Monitoring. Commitment, 1995, 3, 12.
- [10] JOLLIFF, C. R., BLESSUM C. R. Comparison of serum protein electrophoresis by agarose gel and capillary zone electrophoresis in a clinical setting. Electrophoresis, 1997, 18 (10), 1781-1784.
- [11] [http://www.agilent.com/cs/library/primers/Public/5990\\_3777EN.pdf](http://www.agilent.com/cs/library/primers/Public/5990_3777EN.pdf). dostupné (3/2016)

- [12] LI, S. F. Y. Capillary electrophoresis: principles, practice and applications. Edition ed.: Elsevier, 1992. ISBN 0080858600.
- [13] ALTRIA, K. D. Capillary electrophoresis guidebook: principles, operation, and applications. Edition ed.: Springer Science & Business Media, 1996. ISBN 1592595391.
- [14] ŠOLÍNOVÁ, V., KAŠIČKA V. Recent applications of conductivity detection in capillary and chip electrophoresis. *Journal of Separation Science*, 2006, 29 (12), 1743-1762.
- [15] TŮMA, P., SAMCOVÁ E., ANDĚLOVÁ K. Determination of free amino acids and related compounds in amniotic fluid by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection. *Journal of Chromatography B*, 2006, 839 (1), 12-18.
- [16] COUFAL, P., ZUSKA J., VAN DE GOOR T., SMITH V., A KOL. Separation of twenty underivatized essential amino acids by capillary zone electrophoresis with contactless conductivity detection. *Electrophoresis*, 2003, 24 (4), 671-677.
- [17] GONG, X. Y., HAUSER P. C. Determination of different classes of amines with capillary zone electrophoresis and contactless conductivity detection. *Electrophoresis*, 2006, 27 (2), 468-473.
- [18] GONG, X. Y., HAUSER P. C. Enantiomeric separation of underivatized small amines in conventional and on-chip capillary electrophoresis with contactless conductivity detection. *Electrophoresis*, 2006, 27 (21), 4375-4382.
- [19] 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*, 2011, 698 (1), 1-5.
- [20] MUSILOVÁ, J., GLATZ, Z. Metabolomika – základní pojmy, strategie a metodologie. *Chemické Listy*, 2011, 105, 745-751.
- [21] NICHOLSON, J. K., WILSON, I. D. Opinion: understanding 'global' systems biology: metabolomics and the continuum of metabolism. *Nat. Rev. Drug. Discov.*, Aug 2003, 2 (8), 668-676.

- [22] RAMAUTAR, R., MAYBORODA, O. A., SOMSEN, G. W., DE JONG G. J. CE-MS for metabolomics: Developments and applications in the period 2008-2010. *Electrophoresis*, 2011, 32 (1), 52-65.
- [23] SMITH, J. T. Developments in amino acid analysis using capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 1997, 18 (12-13), 2377-2392.
- [24] SHIHABI, Z. K. Organic solvent high-field amplified stacking for basic compounds in capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 2005, 1066 (1), 205-210.
- [25] KLEPÁRNÍK K., FORET F. Recent advances in the development of single cell analysis--a review, *Anal. Chim. Acta*, 800 (2013) 12-21.
- [26] 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*, 2009, 109 (9), 4487-4499.
- [27] ISSAQ, H. J. A decade of capillary electrophoresis. In *A Century of Separation Science*. Marcel Dekker Inc. New York, 2001, p. 453-482
- [28] KUBÁŇ, P., HAUSER, P. C. Ten years of axial capacitively coupled contactless conductivity detection for CZE – A review. *Electrophoresis*, 2009, 30 (1), 176-188.
- [29] ISSAQ, H. J. A decade of capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, Jun 2000, 21 (10), 1921-1939.
- [30] CAI, J., HENION, J. Capillary electrophoresis-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1995, 703 (1), 667-692.
- [31] MAKRLÍKOVÁ, A., OPEKAR, F., TŮMA, P. Pressure-assisted introduction of urine samples into a short capillary for electrophoretic separation with contactless conductivity and UV spectrometry detection. *Electrophoresis*, 2015, 36 (16), 1962-1968.
- [32] OPEKAR, F., NESMĚRÁK, K., TŮMA, P. Electrokinetic injection of samples into a short electrophoretic capillary controlled by piezoelectric micropumps. *Electrophoresis*, 2016, 37 (4), 595-600.
- [33] <http://www.chem.agilent.com/scripts/generic.asp?lPage=389>. (dostupné 3/2016)
- [34] <http://vscht.cz/anl/paci/PAC/prezentace/separace.pdf> (dostupné 3/2016)
- [35] [http://www.lekopis.cz/Kap\\_2\\_2\\_47.htm](http://www.lekopis.cz/Kap_2_2_47.htm) (dostupné 3/2016)

- [36] KAŠIČKA, V. Teoretické základy a separační principy kapilárních elektromigračních metod. Chem. Listy, 1997, 91, 320-329.
- [37] ŠTULÍK, K., a kol. Analytické separační metody. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2004, 264.
- [38] LAKSHMI, D., WHITCOMBE, M. J., DAVIS, F., SHARMA, P. S., A KOL. Electrochemical detection of uric acid in mixed and clinical samples: a review. Electroanalysis, 2011, 23 (2), 305-320.
- [39] SCHNEIDERKA, P., a kol. Vybrané kapitoly z klinické biochemie. Karolinum 1998, 82-90.
- [40] MURRAY, R. K., GRANNER, D. K., MAYES, P. A., RODWEL, V. W. Harperova biochemie. Nakladatelství H + H, 2001, 388 – 390.
- [41] MENÈ, P., PUNZO, G. Uric acid: bystander or culprit in hypertension and progressive renal disease? Journal of Hypertension, 2008, 26 (11), 2085-2092.
- [42] PECHÁŇ, I. Kyselina močová ako významný antioxidantný metabolit. Klinická biochemie a metabolismus, 1995, Roč. 3 (č. 4), 207-210.
- [43] <http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/CD/hypertext/AJDJZ.htm>. (dostupné 4/2016)
- [44] EDWARDS, N. L. The role of hyperuricemia and gout in kidney and cardiovascular disease. Cleveland Clinic Journal of Medicine, 2008, 75, S13-16.
- [45] HAK, A. E., CHOI, H. K. Menopause, postmenopausal hormone use and serum uric acid levels in US women—the Third National Health and Nutrition Examination Survey. Arthritis Research & Therapy, 2008, 10 (5) 1.
- [46] KUTAL, V. Je kyselina močová jen odpadním produktem? Česká revmatologie, 2000, 8, 3-5.
- [47] ŠTÍPEK, S. Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a nemoci. Edtion ed.: Grada, 2000. ISBN 80-7169-704-4.
- [48] <http://medesa.testujeme.cz/Data/files/pdf/%C4%8Desk%C3%A9%20n%C3%A1vody/Grainer/Kyselina%20mo%C4%8Dov%C3%A1.pdf> (dostupné 2/2016)
- [49] STIBŮRKOVÁ, B., ŠEBESTA, I., POSPÍŠILOVÁ, E., ŠŤASTNÁ, S., KUMŠTA, M., a kol. Klinická biochemie a metabolismus, 2005, 18-23.

- [50] BAINBRIDGE, S. A., ROBERTS, J. M. Uric Acid as a Pathogenic Factor in Preeclampsia. *Placenta*, Mar 2008, 29 (Suppl A), S67-72.
- [51] JINNAH, H. A. Lesch-Nyhan disease: from mechanism to model and back again. *Dis. Model. Mech.*, Mar-Apr 2009, 2 (3-4), 116-121.
- [52] NYHAN, W. Lesch-Nyhan disease. *Nucleosides, Nucleotides, and Nucleic Acids*, 2008, 27 (6-7), 559-563.
- [53] MONU, J. U., POPE, T. L. Gout: A Clinical and Radiologic review. *Radiologic Clinics of North America*, 2004, 42 (1), 169-184
- [54] DEGHAN, A., VAN HOEK, M., SIJBRANDS, E. J., HOFMAN, A., a kol. High serum uric acid as a novel risk factor for type 2 diabetes. *Diabetes Care*, Feb 2008, 31 (2), 361-362.
- [55] HUANG, J., LIU, Y., HOU, H., YOU, T. Simultaneous electrochemical determination of dopamine, uric acid and ascorbic acid using palladium nanoparticle-loaded carbon nanofibers modified electrode. *Biosensors and Bioelectronics*, 2008, 24 (4), 632-637.
- [56] WANG, X., HAGIWARA, T., UCHIYAMA, S. Immobilization of uricase within polystyrene using polymaleimido-styrene as a stabilizer and its application to uric acid sensor. *Anal. Chim. Acta*, Mar 21 2007, 587 (1), 41-46.
- [57] KANDÁR, R., ŽÁKOVÁ, P., MOCO VÁ T., SKALICKÝ, J., KOVAŘÍK, J. Stanovení kyseliny močové v lidském séru pomocí HPLC detekcí – porovnání s enzymatickou metodou, *Klin. Biochem. Metab*, 2010,18 (39), 167-174.
- [58] PORMSILA, W., KRAHENBUHL, S., HAUSER, P. C. Capillary electrophoresis with contactless conductivity detection for uric acid determination in biological fluids. *Anal. Chim. Acta*, Mar 23 2009, 636 (2), 224-228.
- [59] FANGUY, J. C., HENRY, C. S. The analysis of uric acid in urine using microchip capillary electrophoresis with electrochemical detection. *Electrophoresis*, 2002, 23 (5), 767-773.
- [60] ČERMÁKOVÁ, M., ŠTĚPÁKOVÁ, I. *Klinická biochemie : 1.díl.* edited by V. B. I. PZ. Edtion ed., 2003. ISBN 80-7013-372-4.
- [61] MURRAY, R. K., A KOL. *Harperova biochemie.* Edtion ed.: 23th edition. Connecticut: Appleton, Lange, 1993. ISBN 80-85787-38-5

- [62] MASOPUST, J. Požadování a hodnocení biochemických vyšetření - I. Edition ed. Praha: Avicenum, 1990. ISBN 80-85047-04-7.
- [63] RACEK, J., A KOL. Klinická biochemie. První vydání. Edition ed.: Praha: Galén – Karolinum, 1999. ISBN 80-7262-023-1.
- [64] <http://www.ega.cz/encyklopedie/encyklopedie/A/KVAES.php> (dostupné 2/2016)
- [65] SKALICKÝ, J. Kreatinin- biochemie, metabolismus a dědičné metabolické poruchy ve FONS- informační bulletin. In., 2007, p. 23.25.
- [66] TEPLAN, V., A KOL. Praktická nefrologie. 2. přeprac. vyd. Praha. Edition ed.: Grada, 2006. 496 p. ISBN 80-247-1127-2
- [67] [http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/hypertext/200630/hypertext/\\_KOMP\\_URATCR.htm](http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/hypertext/200630/hypertext/_KOMP_URATCR.htm) (dostupné 3/2016)
- [68] WERNER, G., SCHNEIDER, V., EMMERT, J. Simultaneous determination of creatine, uric acid and creatinine by high-performance liquid chromatography with direct serum injection and multi-wavelength detection. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 1990, 525, 265-275.
- [69] KLAUS, R., FISCHER, W., HAUCK, H. E. Qualitative and quantitative analysis of uric acid, creatine and creatinine together with carbohydrates in biological material by HPTLC. *Chromatographia*, 1991, 32 (7), 307-316.
- [70] WELCH, M. J., COHEN, A., HERTZ, H. S., NG, K. J., A KOL. Determination of serum creatinine by isotope dilution mass spectrometry as a candidate definitive method. *Anal. Chem.*, July 1986, 58 (8), 1681-1685.
- [71] RODRÍGUEZ, J., BERZAS, J. J., CASTAÑEDA, G., MORA, N., A KOL. Very fast and direct capillary zone electrophoresis method for the determination of creatinine and creatine in human urine. *Analytica chimica acta*, 9/6/ 2004, 521 (1), 53-59.
- [72] COSTA, A. C. O., DA COSTA, J. L., TONIN, F. G, TAVARES, M. F. M., A KOL. Development of a fast capillary electrophoresis method for determination of creatinine in urine samples. *Journal of Chromatography A*, 11/9/ 2007, 1171 (1–2), 140-143.

- [73] TŮMA, P., SAMCOVÁ, E., DUŠKA, F. Determination of ammonia, creatinine and inorganic cations in urine using CE with contactless conductivity detection. *J. Sep. Sci.*, 2008, 31 (12), 2260-2264.
- [74] DELANGHE, J. R., SPEECKAERT, M. M. Creatinine Determination according to Jaffe-what Does It Stand For? In *NDT Plus 4.2 PMC*. 2011, p. 83-86.
- [75] GEORGE, S., DIPU, M., MEHRA, U., SINGH, P., A KOL. Improved HPLC method for the simultaneous determination of allantoin, uric acid and creatinine in cattle urine. *Journal of Chromatography B*, 2006, 832 (1), 134-137.
- [76] JEN, J. F., HSIAO, S. L., LIU K. H. Simultaneous determination of uric acid and creatinine in urine by an eco-friendly solvent-free high performance liquid chromatographic method. *Talanta*, 2002, 58 (4), 711-717.
- [77] ZUO, Y., YANG, Y., ZHU, Z., HE, W., A KOL. Determination of uric acid and creatinine in human urine using hydrophilic interaction chromatography. *Talanta*, 2011, 83 (5), 1707-1710.
- [78] PERELLÓ, J., SANCHIS, P., GRASES, F. Determination of uric acid in urine, saliva and calcium oxalate renal calculi by high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 2005, 824 (1), 175-180.
- [79] ZUO, Y., WANG, C., ZHOU, J., SACHDEVA, A., A KOL. Simultaneous determination of creatinine and uric acid in human urine by high-performance liquid chromatography. *Analytical Sciences*, 2008, 24 (12), 1589-1592.
- [80] ZHAO, S., WANG, J., YE, F., LIU, Y. M. Determination of uric acid in human urine and serum by capillary electrophoresis with chemiluminescence detection. *Analytical Biochemistry*, 2008, 378 (2), 127-131.
- [81] GUAN, Y., WU, T., YE, J. Determination of uric acid and p-aminohippuric acid in human saliva and urine using capillary electrophoresis with electrochemical detection: Potential application in fast diagnosis of renal disease. *Journal of Chromatography B*, 2005, 821 (2), 229-234.



- [82] SHIRAO, M. K., SUZUKI, S., KOBAYASHI, J., NAKAZAWA, H., A KOL. Analysis of creatinine, vanilmandelic acid, homovanillic acid and uric acid in urine by micellar electrokinetic chromatography. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 1997, 693 (2), 463-467.
- [83] COSTA A.C.O., DA COSTA J.L., TONIN F.G., TAVARES M.F., MICKE G.A., Development of a fast capillary electrophoresis method for determination of creatinine in urine samples, *Journal of Chromatography A*, 1171 (2007) 140-143.
- [84] LIOTTA, E., GOTTARDO, R., BONIZZATO, L., PASCALI, J. P., A KOL. Rapid and direct determination of creatinine in urine using capillary zone electrophoresis. *Clinica Chimica Acta*, 2009, 409 (1), 52-55
- [85] GLATZ, Z. Application of short-end injection procedure in CE. *Electrophoresis*, Mar 2013, 34 (5), 631-642.
- [86] LI, S. F. Y. AND L. J. KRICKA Clinical Analysis by Microchip Capillary Electrophoresis. *Clinical Chemistry*, 2006, 52 (1), 37-45.
- [87] VOCHYANOVÁ B., OPEKAR F., TŮMA P. Simultaneous and rapid determination of caffeine and taurine in energy drinks by MEKC in a short capillary with dual contactless conductivity/photometry detection, *Electrophoresis*, 35 (2014) 1660-1665.
- [88] TŮMA P., SAMCOVÁ E., DUŠKA F., Determination of ammonia, creatinine and inorganic cations in urine using CE with contactless conductivity detection, *Journal of separation science*, 31 (2008) 2260-2264.
- [89] TŮMA, P., SAMCOVÁ, E. RYCHLÉ ELEKTROFORETICKÉ STANOVENÍ MOČOVÉ KYSELINY V ALANTOICKÉ TEKUTINĚ S DÁVKOVÁNÍM Z KRÁTKÉHO KONCE KAPILÁRY. *Chemické listy*, 2009, 103, 919-923.
- [90] MATĚJČKOVÁ, J., TŮMA, P., SAMCOVÁ, E., ZEMANOVÁ, Z. Determination of uric acid in plasma and allantoic fluid of chicken embryos by capillary electrophoresis. *J. Sep. Sci.*, Aug 2007, 30 (12), 1947-1952.
- [91] MONNIG, C. A., JORGENSON, J. W. On-column sample gating for high-speed capillary zone electrophoresis. *Anal. Chem.*, Apr 15 1991, 63 (8), 802-807.

- [92] PAVLÍČEK, V., TŮMA, P., MATĚJČKOVÁ, J., SAMCOVÁ, E. Very fast electrophoretic determination of creatinine and uric acid in human urine using a combination of two capillaries with different internal diameters. *Electrophoresis*, Apr 2014, 35 (7), 956-961.
- [93] TŮMA, P., OPEKAR, F., SAMCOVÁ, E. Very fast electrophoretic separation on commercial instruments using a combination of two capillaries with different internal diameters. *Electrophoresis*, 2013, 34 (4), 552-556.
- [94] COSTA, A. C. O., DA COSTA, J. L., TONIN, F. G., TAVARES, M. F. M., A KOL. Development of a fast capillary electrophoresis method for determination of creatinine in urine samples. *Journal of Chromatography A*, 11/9/ 2007, 1171(1-2), 140-143.
- [95] LEMUS-MONDACA, R., VEGA-GÁLVEZ, A., ZURA-BRAVO, L., AH-HEN, K. Stevia rebaudiana Bertoni, source of a high-potency natural sweetener: A comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects. *Food Chemistry*, 6/1/ 2012, 132 (3), 1121-1132.
- [96] YADAV, A. K., SINGH, S., DHYANI, D., AHUJA, P. S. A review on the improvement of stevia [*Stevia rebaudiana* (Bertoni)]. *Canadian Journal of Plant Science*, 2011, 91 (1), 1-27.
- [97] BARRIOCANAL, L. A., PALACIOS, M., BENITEZ, G., BENITEZ, S., A KOL. Apparent lack of pharmacological effect of steviol glycosides used as sweeteners in humans. A pilot study of repeated exposures in some normotensive and hypotensive individuals and in Type 1 and Type 2 diabetics. *Regul Toxicol Pharmacol*, Jun 2008, 51 (1), 37-41.
- [98] SIMONHONSOVÁ B. *Stévie*. Edtion ed.: Praha Euromedia, 2012.
- [99] GEUNS, J. M. Stevioside. *Phytochemistry*, 2003, 64 (5), 913-921.
- [100] JACKSON, A. U., TATA, A., WU, C., PERRY, R. H., A KOL. Direct analysis of Stevia leaves for diterpene glycosides by desorption electrospray ionization mass spectrometry. *Analyst*, May 2009, 134 (5), 867-874.
- [101] MORLOCK, G. E., MEYER, S., ZIMMERMANN, B. F., ROUSSEL, J. M. High-performance thin-layer chromatography analysis of steviol glycosides in Stevia formulations and sugar-free food products, and benchmarking with (ultra) high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 2014, 1350, 102-111.

- [102] ZIMMERMANN, B. F. Tandem mass spectrometric fragmentation patterns of known and new steviol glycosides with structure proposals. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2011, 25 (11), 1575-1582.
- [103] KINGHORN, A. D. *Stevia: the genus Stevia*. Edtion ed.: CRC Press, 2003. ISBN 0203165942.
- [104] SAVITA, S., SHEELA, K., SUNANDA, S., SHANKAR, A., A KOL. Health implications of *Stevia rebaudiana*. *J. Hum. Ecol.*, 2004, 15 (3), 191-194.
- [105] CARAKOSTAS, M. C., CURRY, L. L., BOILEAU, A. C., BRUSICK, D. J. Overview: the history, technical function and safety of rebaudioside A, a naturally occurring steviol glycoside, for use in food and beverages. *Food Chem. Toxicol.*, Jul 2008, 46 Suppl 7, S1-S10.
- [106] KROGER, M., MEISTER, K., KAVA, R. Low-calorie Sweeteners and Other Sugar Substitutes: A Review of the Safety Issues. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2006, 5 (2), 35-47.
- [107] ABOU-ARAB, A. E., ABOU-ARAB, A. A., ABU-SALEM, M. F. Physico-chemical assessment of natural sweeteners steviosides produced from *Stevia rebaudiana* Bertoni plant. *African Journal of Food Science*, 2010, 4 (5), 269-281.
- [108] TADHANI, M., SUBHASH, R. Preliminary studies on *Stevia rebaudiana* leaves: proximal composition, mineral analysis and phytochemical screening. *J. Med. Sci*, 2006, 6 (3), 321-326.
- [109] KIM, I. S., YANG, M., LEE, O. H., KANG S. N. The antioxidant activity and the bioactive compound content of *Stevia rebaudiana* water extracts. *LWT-Food Science and Technology*, 2011, 44 (5), 1328-1332.
- [110] RAMESH, K., SINGH, V., MEGEJI, N. W. Cultivation of stevia [*Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni]: A comprehensive review. *Advances in Agronomy*, 2006, 89, 137-177.
- [111] LATHAM, M. C. *Nutrición humana en el mundo en desarrollo*. Edtion ed.: Fao, 2002.

- [112] GARDANA, C., SCAGLIANTI, M., SIMONETTI, P. Evaluation of steviol and its glycosides in *Stevia rebaudiana* leaves and commercial sweetener by ultra-high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 2010, 1217 (9), 1463-1470.
- [113] ROBERTS, A., RENWICK, A. Comparative toxicokinetics and metabolism of rebaudioside A, stevioside, and steviol in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 2008, 46 (7), S31-S39.
- [114] XILI, L., CHENGJIAN, B., ERYI, X., REIMING, S., A KOL. Chronic oral toxicity and carcinogenicity study of stevioside in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 1992, 30 (11), 957-965.
- [115] YODYINGYUAD, V., BUNYAWONG, S. Effect of stevioside on growth and reproduction. *Human Reproduction*, 1991, 6 (1), 158-165.
- [116] CLOS, J. F., DUBOIS, G. E., PRAKASH, I., Photostability of rebaudioside A and stevioside in beverages., in, The Coca-Cola company, 2008.
- [117] CHANG, S. S., COOK, J. M. Stability studies of stevioside and rebaudioside A in carbonated beverages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1983, 31 (2), 409-412.
- [118] CLOS, J. F., DUBOIS, G. E., PRAKASH, I. Photostability of rebaudioside A and stevioside in beverages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008, 56 (18), 8507-8513.
- [119] BOILEAU, A., FRY, J. C., MURRAY, R. A new calorie-free sugar substitute from the leaf of the stevia plant arrives in the UK. *Nutrition Bulletin*, 2012, 37(1), 47-50. [120] NAKAYAMA, K., KASAHARA, D., YAMAMOTO, F. Absorption, distribution, metabolism and excretion of stevioside in rats. *Food Hygiene and Safety Science (Shokuhin Eiseigaku Zasshi)*, 1986, 27 (1), 1-8.
- [121] GEUNS, J. M. C., BUYSE, J., VANKEIRSBILCK, A., TEMME, E. H. M. Metabolism of stevioside by healthy subjects. *Experimental Biology and Medicine*, 2007, 232 (1), 164-173.

- [122] RENWICK, A. G. Toxicokinetics In: Hayes, W. (Ed.), Principles and Methods of Toxicology, fifth ed. Edition ed. Philadelphia, PA: Taylor & Francis/CRC Press, 2008b.
- [123] MAKI, K., CURRY, L., CARAKOSTAS, M., TARKA, S., A KOL. The hemodynamic effects of rebaudioside A in healthy adults with normal and low-normal blood pressure. Food and Chemical Toxicology, 2008, 46 (7), S40-S46.
- [124] MAKI, K., CURRY, L., REEVES, M., TOTH, P., A KOL. Chronic consumption of rebaudioside A, a steviol glycoside, in men and women with type 2 diabetes mellitus. Food and Chemical Toxicology, 2008, 46 (7), S47-S53.
- [125] JEPPESEN, P. B., BARRIOCANAL, L., MEYER, M. T., PALACIOS, M., CANETE, F., BENITEZ, S., LOGWIN, S., SCHUPMANN, Y., BENITEZ, G., JIMENEZ, J.T. Efficacy and tolerability of oral stevioside in patients with type 2 diabetes: a long-term, randomized, double-blinded, placebo-controlled study. Diabetol. Suppl., 2006, 49, 511-512.
- [126] GOYAL, S., GOYAL, R. Stevia (*Stevia rebaudiana*) a bio-sweetener: A review. International Journal of Food Sciences and Nutrition, 2010.
- [127] SINGH, S., RAO, G. Stevia: the herbal sugar of 21st century. Sugar Tech., 2005, 7 (1), 17-24.
- [128] LOESCHE, W. J. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. Microbiological Reviews, 1986, 50 (4), 353.
- [129] JACKSON, A. U., TATA, A., WU, C., PERRY, R. H., A KOL. Direct analysis of Stevia leaves for diterpene glycosides by desorption electrospray ionization mass spectrometry. Analyst, 2009, 134 (5), 867-874.
- [130] HEARN, L., SUBEDI, P. Determining levels of steviol glycosides in the leaves of *Stevia rebaudiana* by near infrared reflectance spectroscopy. Journal of Food Composition and Analysis, 2009, 22 (2), 165-168.
- [131] JAITAK, V., GUPTA, A., KAUL, V., AHUJA, P. S. Validated high-performance thin-layer chromatography method for steviol glycosides in *Stevia rebaudiana*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2008, 47 (4), 790-794.

- [132] KITADA, Y., SASAKI, M., YAMAZOE, Y., NAKAZAWA, H. Simultaneous determination of stevioside, rebaudioside A and C and dulcoside A in foods by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1989, 474 (2), 447-451.
- [133] PÓL, J., OSTRÁ, E. V., KARÁSEK, P., ROTH, M., A KOL. Comparison of two different solvents employed for pressurised fluid extraction of stevioside from *Stevia rebaudiana*: methanol versus water. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2007, 388 (8), 1847-1857.
- [134] BOVANOVÁ, L., BRANDŠTETEROVÁ, E., BAXA, S. HPLC determination of stevioside in plant material and food samples. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und-Forschung A*, 1998, 207 (5), 352-355.
- [135] VANĚK, T., NEPOVÍM, A., VALÍČEK P. Determination of stevioside in plant material and fruit teas. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2001, 14 (4), 383-388.
- [136] ZIMMERMANN, B. F., WOELWER-RIECK, U., PAPAGIANNPOULOS, M. Separation of Steviol Glycosides by Hydrophilic Liquid Interaction Chromatography. *Food Analytical Methods*, 2012, 5 (2), 266-271.
- [137] TADA, A., ISHIZUKI, K., IWAMURA, J., MIKAMI, H., A KOL. Improvement of the assay method for steviol glycosides in the JECFA specifications 2013.
- [138] IN: ADDITIVES, J. F. W. E. C. O. F. E., COMPENDIUM OF FOOD ADDITIVE SPECIFICATIONS, FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, ROME 2010.
- [139] MAKAPUGAY, H., NANAYAKKARA, N., KINGHORN, A. D. Improved high-performance liquid chromatographic separation of the *Stevia rebaudiana* sweet diterpene glycosides using linear gradient elution. *Journal of Chromatography A*, 1984, 283, 390-395.
- [140] WÖLWER-RIECK, U., TOMBERG, W., WAWRZUN, A. Investigations on the stability of stevioside and rebaudioside A in soft drinks. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010, 58 (23), 12216-12220.

- [141] PÓL, J., HOHNOVÁ, B., HYÖTYLÄINEN, T. Characterisation of *Stevia rebaudiana* by comprehensive two-dimensional liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 2007, 1150 (1), 85-92.
- [142] LIU, J., LI, S. Separation and determination of *Stevia* sweeteners by capillary electrophoresis and high performance liquid chromatography. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 1995, 18 (9), 1703-1719.
- [143] DACOME, A. S., DA SILVA, C. C., DA COSTA, C. E., FONTANA, J. D., A KOL. Sweet diterpenic glycosides balance of a new cultivar of *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni: Isolation and quantitative distribution by chromatographic, spectroscopic, and electrophoretic methods. *Process Biochemistry*, 2005, 40 (11), 3587-3594.
- [144] LIU, J., ONG, C., LI, S. Subcritical fluid extraction of *Stevia* sweeteners from *Stevia rebaudiana*. *Journal of Chromatographic Science*, 1997, 35 (9), 446-450.
- [145] UBÁŇ, P., HAUSER, P. C. Contactless conductivity detection for analytical techniques: developments from 2010 to 2012. *Electrophoresis*, 2013, 34 (1), 55-69.
- [146] MAURI, P., CATALANO, G., GARDANA, C., PIETTA, P. Analysis of *Stevia* glycosides by capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 1996, 17 (2), 367-371.
- [147] AYYAPPA, B., KANCHI, S., SINGH, P., SABELA, M. I., A KOL. Analytical evaluation of steviol glycosides by capillary electrophoresis supported with molecular docking studies. *Journal of the Iranian Chemical Society*, 2015, 12 (1), 127-136.
- [148] OPEKAR, F., TŮMA, P., ŠTULÍK, K. Contactless impedance sensors and their application to flow measurements. *Sensors*, 2013, 13 (3), 2786-2801.
- [149] BERGAMO, A. B., DA SILVA, J. A. F., DE JESUS, D. P. Simultaneous determination of aspartame, cyclamate, saccharin and acesulfame-K in soft drinks and tabletop sweetener formulations by capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection. *Food Chemistry*, 2011, 124 (4), 1714-1717.
- [150] GAŠ, B., ZUSKA, J., COUFAL, P., VAN DE GOOR, T. Optimization of the high-frequency contactless conductivity detector for capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 2002, 23 (20), 3520-3527.

- [151] EL RASSI, Z., MECHREF, Y. Recent advances in capillary electrophoresis of carbohydrates. *Electrophoresis*, 1996, 17 (2), 275-301.
- [152] EL RASSI, Z. Recent developments in capillary electrophoresis and capillary electrochromatography of carbohydrate species. *Electrophoresis*, 1999, 20 (15-16), 3134-3144.
- [153] HONDA, S., YAMAMOTO, K., SUZUKI, S., UEDA, M., A KOL. High-performance capillary zone electrophoresis of carbohydrates in the presence of alkaline earth metal ions. *Journal of Chromatography A*, 1991, 588 (1), 327-333.
- [154] TŮMA, P., ŠUSTKOVÁ-FIŠEROVÁ, M., OPEKAR, F., PAVLÍČEK, V., A KOL. Large-volume sample stacking for in vivo monitoring of trace levels of  $\gamma$ -aminobutyric acid, glycine and glutamate in microdialysates of periaqueductal gray matter by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection. *Journal of Chromatography A*, 2013, 1303, 94-99.
- [155] TŮMA, P., SAMCOVÁ, E., ŠTULÍK, K. Contactless conductivity detection in capillary electrophoresis employing capillaries with very low inner diameters. *Electroanalysis*, 2011, 23 (8), 1870-1874.
- [156] MAI, T. D., HAUSER, P. C. Study on the interrelated effects of capillary diameter, background electrolyte concentration, and flow rate in pressure assisted capillary electrophoresis with contactless conductivity detection. *Electrophoresis*, 2013, 34 (12), 1796-1803.
- [157] ZHANG, M., STAMOS, B. N., AMORNTHAMMARONG, N., DASGUPTA, P. K. Capillary Scale Admittance Detection. *Analytical Chemistry*, 2014, 86 (23), 11538-11546.



### **Příloha 1.**

PAVLÍČEK, V., TŮMA, P., MATĚJČKOVÁ, J., SAMCOVÁ, E. Very fast electrophoretic determination of creatinine and uric acid in human urine using a combination of two capillaries with different internal diameters. *Electrophoresis*, Apr 2014, 35 (7), 956-961. IF<sup>2014</sup> 3,028; <http://dx.doi.org/10.1002/elps.201300293>

### **Příloha 2.**

PAVLÍČEK, V., TŮMA, P. The use of capillary electrophoresis with contactless conductivity detection for sensitive determination of stevioside and rebaudioside A in foods and beverages. *Food Chemistry* 2017, 219, 193-198. IF<sup>2015</sup> 4,052  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.135>