

Univerzita Karlova

3. lékařská fakulta

Autoreferát dizertační práce

Využití kapilární a čipové elektroforézy pro klinický výzkum

Mgr. Václav Pavlíček

Praha, 2016

Doktorské studijní programy v biomedicíně

Univerzita Karlova, 3. lékařská fakulta

Obor: **Biochemie a Patobiochemie**

Předseda oborové rady: Prof. MUDr. Stanislav Štípek, DrSc.
Ústav lékařské biochemie 1. LF UK
Kateřinská 32, 121 08 Praha 2

Školící pracoviště: 3. lékařská fakulta Univerzity Karlovy
Ústav biochemie, buněčné a molekulární biologie
Oddělení biochemie
Ruská 87, Praha 10

Autor: Mgr. Václav Pavlíček

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

Oponenti:

Autoreferát byl rozeslán dne:

Obhajoba se koná dne v hod kde

S dizertační prací je možno se seznámit na děkanátu
3. lékařské fakulty Univerzity Karlovy.

Obsah

1 Shrnutí	4
2 Summary	6
3 Kapitoly	7
1. Úvod - Velmi rychlé stanovení kyseliny močové a kreatininu pomocí kapilární elektroforézy v lidské moči a séru	8
2.1 Hypotézy a cíle práce.....	8
3.1 Materiál a metodika	9
3.1.1 Experimentální část	10
4.1 Výsledky a diskuze	11
5.1 Závěr	15
6.1. Použitá literatura.....	15
2. Úvod - Stanovení steviol glykosidů v potravinových doplňcích a nápojích pomocí kapilární elektroforézy s bezkontaktní vodivostní detekcí.....	16
2.2 Hypotézy a cíle práce.....	16
3.2 Materiál a metodika	17
3.2.1 Aparatura a optimální experimentální podmínky	17
3.2.2 Příprava vzorků.....	18
3.2.3 Statistické zpracování výsledků	18
4.2 Výsledky a diskuze	18
4.2.1 Analýza nápojů a potravinových doplňků s obsahem steviol glykosidů.....	20
5.2 Závěr	21
6.2 Použitá literatura.....	22
Seznam publikací doktoranda	23

1 Shrnutí

Předkládaný autoreferát 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^{3D} CE. Separace byly prováděny v laboratorně sestavené kapiláře vytvořené spojením 9,7 cm dlouhé analytické kapiláry s vnitřním průměrem (d) 25 μm a 22,9 cm dlouhé pomocné kapiláry s d 100 μm . 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 autoreferátu a i 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 bíle 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 doplňcích 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^{3D} 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 μm 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, zfiltrovány 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.

2 Summary

Present the self 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 μm with an auxiliary 22.9 cm long capillary with d 100 μm . 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^{3D} 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.

3 Kapitoly

1. Velmi rychlé stanovení kyseliny močové a kreatininu pomocí kapilární elektroforézy v lidské moči a séru.
2. Stanovení steviol glykosidů v potravinových doplňcích a nápojích pomocí kapilární elektroforézy s bezkontaktní vodivostní detekcí.

1. Úvod - Velmi rychlé stanovení kyseliny močové a kreatininu pomocí kapilární elektroforézy v lidské moči a séru

Kapilární elektroforéza (CE) je účinná a instrumentálně jednoduchá separační technika, která používá malé objemy činidel a vzorků. 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:

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

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 způsoby¹:

- (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.

2.1 Hypotézy a cíle práce

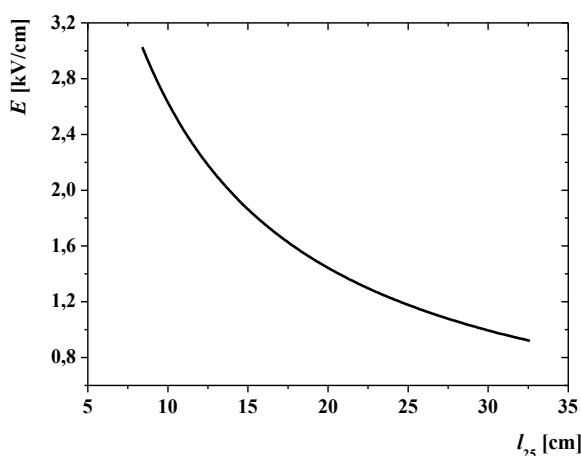
Cílem první části dizertační práce bylo vyvinout kapilárně elektroforetickou metodu pro sledování kyseliny močové a kreatinu v moči a séru s časem kratším než 30 s, která by byla konkurenceschopná běžně užívaným enzymatickým metodám, používaných v klinických laboratořích. Hypotéza tohoto příspěvku spočívá 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.

3.1 Materiál a metodika

Princip nové techniky je založen na spojení dvou kapilár o různém vnitřním průměru (d). Intenzita elektrického pole (E) je v sériovém spojení dvou kapilár řízena plochou vnitřního průřezu kapiláry ($\pi d^2/4$). Pro spojení separačních kapilár o d 25 μm a 100 μm pak platí, že 25 μm separační kapilára klade průchodu elektrického proudu 16krát vyšší odpor na jednotku délky, než je tomu u 100 μm kapiláry. Z toho lze usoudit, že intenzita elektrického pole, E , je v části 25 μm kapiláry ² 16krát vyšší a řídí se vztahem:

$$E = \frac{U}{l_{25} + l_{100} / \left(\frac{d_{25}}{d_{100}} \right)^2} = \frac{U}{l_{25} + (l - l_{25}) / \left(\frac{d_{25}}{d_{100}} \right)^2} \quad (1-2)$$

kde U je separační napětí, l_{25} , l_{100} , jsou délky jednotlivých částí kapiláry, d_{25} a d_{100} jsou jejich vnitřní průměry a l je celková délka spojené kapiláry. Ze vztahu je zřejmé, že intenzita elektrického pole v separační části kapiláry se s rostoucí délkou kapiláry hyperbolicky snižuje, jak je ukázáno na Obr. 1.1.



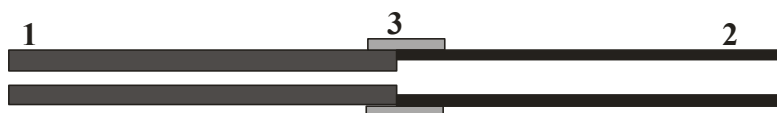
Obr. 1.1. Závislost intenzity elektrického pole v 25 μm části kapiláry na délce této části, při celkové délce kapiláry 32,5 cm a vloženém napětí +30 kV. Grafické znázornění vztahu (1-2) simulovaného pomocí programu Mathcad, 13.1.

Pro dosažení vysoké intenzity elektrického pole je nezbytné používat minimální celkovou délku kapiláry, která u komerčního přístroje CE (HP^{3D} CE, Agilent Technologies) činí 32,5 cm. Při používání techniky dávkování vzorku do krátkého konce kapiláry je minimální délka 25 μm části kapiláry (vlastní analytická část) 9,7 cm. 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. Spojená kapilára byla testována pro stanovení kreatininu a kyseliny močové v lidské moči. Kreatinin je využíván v humánní medicíně jako indikátor správné funkce ledvin, je vedlejším produktem energetického metabolismu svalů a z těla je vylučován ledvinami ³. Kyselina močová je u člověka konečným produktem metabolismu purinů a z těla je vylučována močí v podobě solí urátů, především urátu sodného a amonného ⁴. Pro stanovení těchto dvou látek v moči a krvi jsou používány nejrůznější separační, spektrofotometrické, elektrochemické a enzymatické techniky.

3.1.1 Experimentální část

Separace byly provedeny v laboratorně sestavené kapiláře vytvořené spojením dvou standardních křemenných kapilár o vnějším průměru 363 μm (Composite Metal Services, UK). Separací kapilára, vnitřní průměr 25 μm , délka 9,7 cm, a pomocná kapilára, vnitřní průměr 100 μm , délka 22,9 cm, byly spojeny pomocí 9 mm dlouhé teflonové kapiláry pro HPLC (vnější průměr 1/16', vnitřní průměr 0,25 mm, Watrex), viz Obr. 1.2. Trubička byla zahřátá pomocí horkovzdušné pistole nad teplotu tání teflonu, která je 330 $^{\circ}\text{C}$ (na horkovzdušné pistoli byla nastavena teplota 420 $^{\circ}\text{C}$). Ohřátá a změkklá teflonová 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. V dalším kroku je 8,3 mm 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 ⁵.



Obr. 1.2. Detail spojení dvou kapilár: (1) 25 μm analytická kapilára, (2) 100 μm pomocná kapilára a (3) teflonová trubička.

Takto připravená kapilára byla vložena do kazety elektroforetického přístroje (HP^{3D} CE, Agilent Technologies) a separace byly provedeny při dávkování do krátkého konce kapiláry. Vzdálenost injekčního konce kapiláry k diode-array detektoru byla 8,3 cm. Před použitím byla nová kapilára aktivována promytím 0,1 M roztokem NaOH po dobu 15 min., poté 10 min. deionizovanou vodou a na závěr 10 min. separačním elektrolytem. Mezi jednotlivými analýzami modelových vzorků i upravené moči, byla kapilára promývána pouze separačním elektrolytem po dobu 2 min. Vzorek byl do vstupu

25 μm kapiláry dávkován tlakem 50 mbar po dobu 5 s, což odpovídá 4 mm délce zóny vzorku. 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 je nutné aplikovat z konce pomocné kapiláry (d 100 μm), což vede k účinnému odstranění vzduchových bublin, které by způsobily přerušení separace. Separace probíhaly při konstantní teplotě 25 $^{\circ}\text{C}$.

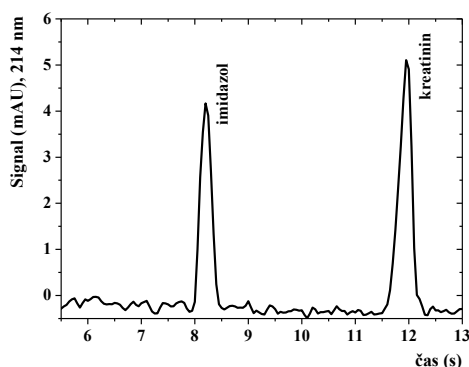
Veškeré použité chemikálie měly analytický stupeň čistoty. Separací pufrů (BGE) o složení 20 mM MES + 10 mM NaOH, pH 6,0 pro stanovení kyseliny močové a 20 mM kyselina citronová + 9 mM NaOH, pH 3,0 pro stanovení kreatininu byly připravovány každý den čerstvé. pH bylo měřeno laboratorním pH metrem pMX 3000 WTW (Německo).

Vzorky ranní moče získané od 7 zdravých dobrovolníků byly filtrovány přes centrifugační filtry (Amicon 0,45 μm , Millipore, USA) při 14 100 otáčkách/min. po dobu 3 minuty. Přefiltrované vzorky moče byly uchovávány v plastových uzavíratelných zkumavkách při teplotě 4 $^{\circ}\text{C}$, 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. i) Pro stanovení kreatininu bylo k 20 μl vzorku moče přidáno 20 μl 1 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ imidazolu (interní standard) a 960 μl 1 mM HCl. ii) Pro stanovení kyseliny močové v moči bylo 20 μl vzorku smícháno s 20 μl 1 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ roztoku kyseliny *p*-aminosalicylové (PAS, interní standard) a 960 μl 1 mM NaOH. Tímto postupem je získán 50krát zředěný vzorek moče. Výsledné koncentrace vnitřního standardu imidazolu i PAS v obou vzorcích dosahují shodně 20 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Hladina kreatininu a kyseliny močové byla pro kontrolu ověřena pomocí komerčních kolorimetrických kitů běžně používaných v klinických laboratořích; Bio-test (Creatinine liquid 500, Lachema, ČR) a Bio-test (Uric acid liquid 500, Lachema, ČR). Veškerá spektrofotometrická měření byla provedena v 1 cm kyvetě na spektrofotometrickém přístroji Boeco (Model S-22, Německo). Pro statistické zpracování dat byl použit program Origin 8.0 (OriginLab Corporation, USA).

4.1 Výsledky a diskuze

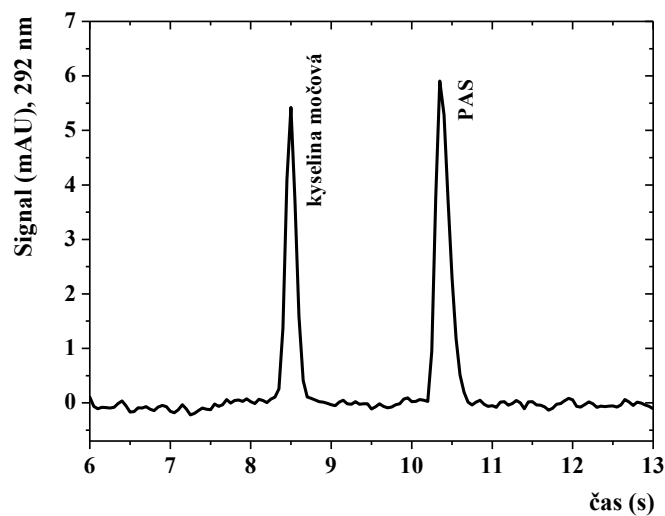
Kreatinin je dusíkatý heterocyklus s hodnotou $\text{p}K_{\text{a}}$ 4,8. V kyselém BGE o složení 20 mM kyselina citronová + 9 mM NaOH, pH 3,0 migruje kreatinin jako kationt. Při pH 3,0 je elektroosmotický tok v kapiláře pokryté INST Coating roztokem potlačen a pozice neutrálního markeru nebyla registrována 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 je dosaženo krátkého migračního času, 12,2 s pro kreatinin a 8,5 s pro imidazol, s hodnotou rozlišení obou látek 8,5. Na elektroferogramu, 50násobně ředěné lidské moči je patrný výrazný dobře kvantifikovatelný pík kreatininu zaznamenaný při vlnové délce 214 nm, viz Obr. 1.3.



Obr. 1.3. Záznam elektroforetického stanovení kyseliny močové v lidské moči. Experimentální podmínky; separační elektrolyt: 20 mM kyselina citronová + 9 mM NaOH, pH 3,0, hydrodynamické dávkování vzorku tlakem 50 mbar po dobu 5 s, napětí +25 kV, UV detekce při 214 nm.

Kyselina močová je slabá dvojsytná kyselina s hodnotou první disociační konstanty pK_a 5,4. Pro CE stanovení kyseliny močové byl použit optimalizovaný 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 rychlý a strhává kyselinu močovou směrem k detektoru. Rychlost EOF je při pH 6 vyšší než elektroforetická pohyblivost kyseliny močové. Proto pík kyseliny močové (t_M 8,5 s) je zaznamenan později než pozice EOF. Jako interní standard byla použita PAS (pK_A 3,6), která vykazuje vyšší elektroforetickou pohyblivost a při pohybu proti směru EOF dosáhne detektoru později (t_M pro PAS je 10,5 s, s hodnotou rozlišení obou látek 9,7). PAS opět nepatří mezi látky přirozeně se vyskytující v moči. Elektroferogram 50násobně ředěné lidské moči s přidavkem interního standardu PAS, registrovaný při vlnové délce 292 nm je znázorněn na Obr. 1.4.



Obr. 1.4. Záznam elektroforetického stanovení kyseliny močové v lidské moči. Experimentální podmínky; separační elektrolyt: 20 mM MES + 10 mM NaOH, pH 6,0, hydrodynamické dávkování vzorku tlakem 50 mbar po dobu 5 s, napětí +25 kV, UV detekce při 292 nm.

Stanovené hodnoty kreatininu pomocí CE se v 7 vzorcích lidské moče pohybovaly v koncentračním rozmezí 221 – 1394 mg.l⁻¹ pro kreatinin a 87 – 556 mg.l⁻¹ pro kyselinu močovou. Stanovení kreatininu i kyseliny močové bylo současně provedeno pomocí standardních metod používaných v klinických laboratořích; Jaffého kolorimetrickou metodou pro stanovení kreatininu a enzymatickou technikou s enzymem urikázou pro stanovení kyseliny močové. Takto získané hodnoty byly ve velmi dobré shodě s CE stanovením; porovnání metod je shrnuto v Tabulce I.

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

Vzorek moči	kreatinin, mg.l ⁻¹		kyselina močová, mg.l ⁻¹	
	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

Nově vyvinutá elektroforetická metodika poskytuje pro oba sledované analyty velmi krátké migrační časy kolem 10 s, s limitem detekce 2,4 mg.l⁻¹ pro kreatinin a 0,9 mg.l⁻¹ pro kyselinu močovou. Pro deset po sobě se opakujících CE analýz jednoho vzorku moče jsou hodnoty relativní směrodatné odchylky (RSD) pro migrační čas a plochu píku kreatininu 0,3 a 4,1 % a 1,8 a 5,7 % pro kyselinu močovou. Počet teoretických pater (N) se pohybuje kolem 120 tisíc na metr délky kapiláry pro kreatinin a 345 tisíc pater/m pro kyselinu močovou. Vyšší hodnota N pro kyselinu močovou je dána kratším migračním časem a nižším vlivem elektrodisperze na rozmytí píku. Pro velmi rychlé separace je vhodnější vyjádřit separační účinnost jako N za jednotku času (N/t_M), která lépe vystihuje rychlost separačního procesu⁶. Pro kreatinin bylo dosaženo hodnoty 830 pater/s a pro kyselinu močovou 3400 pater/s. Experimentálně určená hodnota mobility pro kreatinin (u 35,3·10⁻⁹ m²s⁻¹V⁻¹) za podmínek vysoké intenzity elektrického pole a dávkování do krátkého konce kapiláry dobře koresponduje s teoretickou hodnotou mobility vypočtenou pomocí programu Peak-Master 5.3 (u 33,4·10⁻⁹ m²s⁻¹V⁻¹). Tato shoda ukazuje, že i za použití vysoké intenzity elektrického pole je odvod Jouleova tepla z kapiláry dostatečný a separace probíhá obdobně jako při nízkých hodnotách E .

5.1 Závěr

Spojením dvou kapilár o různých vnitřních průměrech se podařilo zvýšit hodnotu intenzity elektrického pole v kapiláře na 2,3 kV/cm. Za těchto podmínek jsou dosažené migrační časy pro kreatinin a kyselinu močovou cca 10 s. Nová metodika velmi rychlého stanovení obou analytů je dostatečně citlivá pro jejich monitorování v lidské moči. Moč je před analýzou pouze filtrována a ředěna. Takto validovaná elektroforetická metoda 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.

6.1. Použitá literatura

1. GLATZ, Z. Electrophoresis, Mar 2013, 34 (5), 631-642.
2. TŮMA, P., OPEKAR, F., SAMCOVÁ, E. Electrophoresis, 2013, 34 (4), 552-556.
3. ČERMÁKOVÁ, M., ŠTĚPÁKOVÁ, I. Klinická biochemie: 1.díl. edited by V. B. I. PZ. Edition ed., 2003. ISBN 80-7013-372-4.
4. RACEK, J., A KOL. Klinická biochemie. První vydání. Edition ed.: Praha: Galén – Karolinum, 1999. ISBN 80-7262-023-1.
5. PAVLÍČEK, V., TŮMA, P., MATĚJČKOVÁ, J., SAMCOVÁ, E.. Electrophoresis, Apr 2014, 35 (7), 956-961.
6. MONNIG, C. A., JORGENSON, J. W.. Anal. Chem., Apr 15 1991, 63 (8), 802-807.

2. Úvod - Stanovení steviol glykosidů v potravinových doplňcích a nápojích pomocí kapilární elektroforézy s bezkontaktní vodivostní detekcí

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^{1, 2}. 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 extrémní sladivosti, netoxičnosti, cenové nenáročnosti a možnosti konzumace rostliny v přirozeném či suchém stavu bez negativních vlivů. 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 jedenácti steviol glykosidů^{3, 4}. Sladké steviol glykosidy se izolují 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 ovšem zařadit celou skupinu těchto látek; rebaudiosidy A, B, C, D a E, steviosid, steviobiosid a dulcosid A a B, a další⁵. Jednotlivé látky disponují rozličným sensorickým profilem. U všech glykosidů přetrvává sladká chuť lišící se pouze intenzitou. Zatímco rebaudiosidy A a D vykazují čistě sladkou chuť s minimálním nádechem hořkosti a se sladivostí cca 300 – 450násobně vyšší než u sacharózy; dulcosidy 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 C₁₃ molekuly steviolu přítomna sophorosylová jednotka, glukosa-β(1-2)-glukosa a dojde-li k záměně methylenové skupiny na uhlíku C₁₇ za ketonovou⁶⁻⁸. 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.

2.2 Hypotézy a cíle práce

Cílem této části práce byl vývoj a využití vysokoúčinné elektroforetické separace v kombinaci s citlivou bezkontaktní vodivostní detekcí (C⁴D)⁹ pro stanovení rebaudiosidu A a steviosidu v potravinových doplňcích 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, což je ve shodě s ideou zelené chemie.

3.2 Materiál a metodika

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 mg.ml⁻¹. Deionizovaná voda (DEI) Milli-Q (18,2 MΩ.cm, Millipore) byla použita k přípravě BGE a zásobních roztoků standardů, které byly uchovány v ledničce při 4 °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 ve studené vodě) a poté použity jako hydrofilní polymery pro potlačení EOF. BGE byl připraven rozpuštěním požadovaného množství kyseliny borité v deionizované vodě s následným přidavkem pevného LiOH k dosažení požadovaného pH. Titrace pevným LiOH je použita z důvodu omezení sorpce CO₂ do roztoku. pH bylo měřeno laboratorním pH metrem pMX 3000 WTW (Německo).

3.2.1 Aparatura a optimální experimentální podmínky

Elektroforetické separace byly provedeny při laboratorní teplotě 25 °C na přístroji HP^{3D} CE (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) s bezkontaktním vodivostním detektorem (C⁴D). Bezkontaktní vodivostní detektor byl konstruován z 2,5 mm dlouhých tubulárních elektrod vzájemně oddělených 1,0 mm mezerou s vloženým stíněním. C⁴D používá střídavý sinusový signál o frekvenci 1,0 MHz a efektivní hodnotu napětí 50 V (peak to peak)¹⁰. Separační křemenná kapilára byla 31,5 cm dlouhá (18 cm k C⁴D) o vnitřním průměru 10 μm. Optimalizovaný separační elektrolyt o složení: 170 mM kyselina boritá/LiOH, pH 9,0 s přidavkem 0,5 % *v/v* INST Coating solution přímo do základního elektrolytu pro potlačení EOF. 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.

3.2.2 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⁻¹ 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.

3.2.3 Statistické zpracování výsledků

Naměřená data CE analýz jsou uvedena 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 v při základní linii. Elektroforetická mobilita (u) byla vypočítána dle vztahu:

$$u = \frac{l_C \cdot l_D}{U} \cdot \left(\frac{1}{t_{EOF}} - \frac{1}{t_M} \right) \quad (2-1)$$

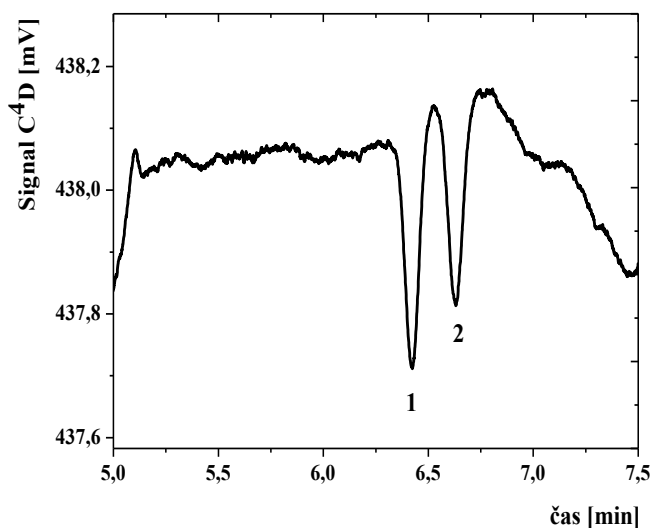
kde l_C je celková délka separační kapiláry, l_D je délka kapiláry k detektoru (18 cm), U je separační napětí, t_{EOF} je migrační čas elektroosmotického toku a t_M je migrační čas sledovaného analytu.

4.2 Výsledky a diskuze

Sacharidové jednotky vázané na jádro steviolu neobsahují žádnou snadno ionizovatelnou funkční skupinu. Pro deprotonizaci molekuly steviol glykosidu 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,

pH > 13¹¹⁻¹³. Takové podmínky jsou ovšem nevhodné pro provádění elektroforetické separace. Z praktického hlediska je mnohem přívětivější separovat takové látky ve formě nabitých komplexů s H₃BO₃, 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 byla redukována přidávkem hydrofilního polymeru komerční výroby INST Coating Solution přímo do základního elektrolytu.

S přidávkem INST Coating Solution do roztoku 170 mM H₃BO₃/LiOH (pH 9,0) se podařilo dosáhnout úplné separace rebaudiosidu A a steviosidu až na základní linii, viz Obr. 2.1. Tento polymer se velmi pevně váže na vnitřní stěnu kapiláry a jeho postupné vymývání projevující se zvyšováním rychlosti EOF je velmi pomalé. V optimalizovaných BGE o výsledném složení 170 mM H₃BO₃/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.

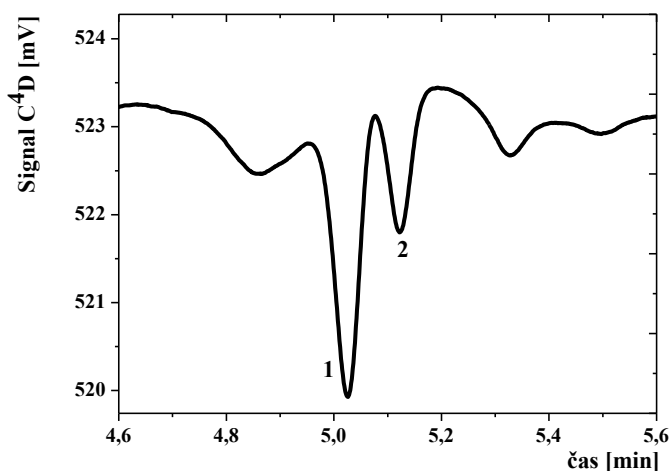


Obr. 2.1. CE separace směsi rebaudiosidu A a steviosidu rozpuštěných ve vodě při koncentraci 100 mg.l⁻¹. Experimentální podmínky: BGE, 170 mM H₃BO₃/LiOH, + 0,5 % v/v INST, pH 9,0; separační napětí/proud, +20 kV/2,3 μA; hydrodynamické dávkování tlakem 50 mbar po dobu 100 s. Identifikace píků: (1) rebaudiosid A, (2) steviosid.

Limit detekce dosahuje pro oba steviol glykosidy hodnoty $0,1 \text{ mg.l}^{-1}$ a LOQ hodnoty $0,3 \text{ mg.l}^{-1}$. Po přepočtení na molární koncentraci má LOD pro rebaudiosid A a steviosid shodnou hodnotu $0,1 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1}$. Takto nízké LOD umožňují použít 5 až 100násobné zředění vzorků nápojů a stolních sladidel, čímž se účinně redukuje nežádoucí vliv matrice. Důležitou podmínkou pro dosažení vysoké reprodukovatelnosti stanovení je častá výměna separační kapiláry, která však samotnou analýzu výrazně neprodrazuje. Cena 31,5 centimetrového úseku kapiláry je cca 100 Kč (50 m kapiláry o d 10 μm stojí v přepočtu 15000 Kč).

4.2.1 Analýza nápojů a potravinových doplňků s obsahem steviol glykosidů

Stanovené hodnoty obsahu rebaudiosidu A a steviosidu jsou shrnuty v Tabulce 2.1.; příslušný ukázkový elektroferogram je demonstrován na Obr. 2.2. Obsahy steviol glykosidů byly v jednotlivých vzorcích značně rozdílné a pohybují se ve velmi širokém rozmezí. Stanovený obsah steviol glykosidů v tabletě sladidla Stevia odpovídal množství 7,0 mg rebaudiosidu A a 2,6 mg steviosidu. Ze srovnání stanoveného obsahu rebaudiosidu A a steviosidu s celkovým množstvím všech steviol glykosidů uváděných výrobcem (16,8 mg na tabletu) lze usoudit, že rebaudiosid A a steviosid mají ve sladivé tabletě majoritní zastoupení, stejně tak i v přírodních produktech izolovaných z rostliny Stevia rebaudiana Bertoni.



Obr. 2.2. CE/C⁴D stanovení rebaudiosidu A a steviosidu ve stolním sladidle za optimalizovaných experimentálních podmínek. (A) stolní sladidlo v tabletách. Experimentální podmínky: BGE, 170 mM H₃BO₃/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. Identifikace píků: (1) rebaudiosid A, (2) steviosid.

Tabulka 2.1. Stanovené obsahy rebaudiosidu A a steviosidu ve vzorcích potravin a nápojů z obchodní sítě běžně dostupné v ČR.

	Rebaudiosid A, mg.l⁻¹	Steviosid, mg.l⁻¹
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

5.2 Závěr

Obsahy steviol glykosidů lze ve sladidlech a nápojích jednoduše stanovit pomocí kapilární elektroforézy ve spojení s C⁴D. CE separaci je potřeba provádět v roztocích H₃BO₃ o vysoké koncentraci, v nichž se tvoří stabilní komplexy mezi steviol glykosidem a H₃BO₃, které se následně oddělují od zóny elektroneutrálních látek. Vysoká citlivost C⁴D ve spojení s on-line prekoncentrací vzorku zajistila dosažení nízkých LOD celého CE stanovení. Využitím jednoduché CE/C⁴D instrumentace lze dosahovat limitů detekce na submikromolární koncentrační hladině a to bez náročné derivatizace vzorku. Vzorky sladidel a nápojů postačuje dostatečně ředit a tím eliminovat nežádoucí vliv matrice na CE separaci.

6.2 Použitá literatura

1. LEMUS-MONDACA, R., VEGA-GÁLVEZ, A., ZURA-BRAVO, L., AH-HEN, K. Food Chemistry, 2012, 132 (3), 1121-1132.
2. YADAV, A. K., SINGH, S., DHYANI, D., AHUJA, P. S. Canadian Journal of Plant Science, 2011, 91 (1), 1-27.
3. BARRIOCANAL, L. A., PALACIOS, M., BENITEZ, G., BENITEZ, S., A KOL.. Regul Toxicol Pharmacol, Jun 2008, 51 (1), 37-41.
4. SIMONHONSOVÁ B. Stévie. Edtion ed.: Praha Euromedia, 2012.
5. GEUNS, J. M. Stevioside. Phytochemistry, 2003, 64 (5), 913-921
6. MORLOCK, G. E., MEYER, S., ZIMMERMANN, B. F., ROUSSEL, J. M. Journal of Chromatography A, 2014, 1350, 102-111.
7. ZIMMERMANN, B. F. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2011, 25 (11), 1575-1582.
8. KINGHORN, A. D. Stevia: the genus Stevia. Edtion ed.: CRC Press, 2003. ISBN 0203165942.
9. KUBÁŇ, P., HAUSER, P. C.. Electrophoresis, 2009, 30 (1), 176-188.
10. GAŠ, B., ZUSKA, J., COUFAL, P., VAN DE GOOR, T. Electrophoresis, 2002, 23 (20), 3520-3527
11. EL RASSI, Z., MECHREF, Y. Electrophoresis, 1996, 17 (2), 275-301.
12. EL RASSI, Z. Electrophoresis, 1999, 20 (15-16), 3134-3144.
13. HONDA, S., YAMAMOTO, K., SUZUKI, S., UEDA, M., A KOL. Journal of Chromatography A, 1991, 588 (1), 327-333.

Seznam publikací doktoranda

1. publikace *in extenso*, které jsou podkladem

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* 2014, 35, 956-961. IF²⁰¹⁴ 3,028

<http://dx.doi.org/10.1002/elps.201300293>

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 Chem.* 2017, 219, 193-198. IF²⁰¹⁵ 4,052

<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.135>

2. publikace *in extenso* bez vztahu k tématu dizertace

1) Tůma P., Šustková-Fišerová M., Opekar F., Pavlíček V., Málková K.: Large-volume sample stacking for in vivo monitoring of trace levels of γ -aminobutyric acid, glycine and glutamate in microdialysates of periaqueductal gray matter by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection. *Journal of Chromatography A*, 1303 (2013) 94-99. IF²⁰¹⁵ 3,926

<http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2013.06.019>

2) Pavlíček V.: Zuby a dutina ústní, In. fblt.cz: Výuková skripta 3. LF Univerzity Karlovy. Praha: 3. Lékařská fakulta UK, 2016. Dostupný z: <http://fblt.cz/skripta/ix-travici-soustava/zuby-a-dutina-ustni/> (20.11.2016)

3) Pavlíček V.: Anorganické látky v buňkách, In. fblt.cz: Výuková skripta 3. LF Univerzity Karlovy. Praha: 3. Lékařská fakulta UK, 2016. Dostupný z: <http://fblt.cz/skripta/i-struktura-bunky/anorganicke-latky-v-bunkach/> (20.11.2016)

3) Prezentace na kongresech, sympoziích

1. Pavlíček V., Málková K., Samcová E., Tůma P.: *Fast Determination of Uric Acid in Human Serum and Urine by Capillary Electrophoresis*. ve sb. Moderní elektrochemické metody XXXII, BEST Servis, Ústí nad Labem, Jetřichovice 2012, str. 107-111 (ISBN 978-80-905221-0-7).

2. Málková K., Pavlíček V., Tůma P., Samcová E.: *Determination of glycine, glutamic acid and GABA in microdialysate of periaqueductal gray matter by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection*, 29th International Symposium on Chromatography (the 29th ISC), 9 - 13 September 2012, Toruń, Poland, S2-P58. <http://en.isc2012.pl/home>.

3. Samcová E., Tůma P., Málková K., Pavlíček V.: *The Use of Large Volume Sample Stacking for the Determination of Sub-micromolar Levels of Neurotransmitters in Microdialysate of Periaqueductal Gray Matter by CE with Contactless Conductivity Detection*. ITP 2012 Book of Abstracts, 19th International Symposium, Exhibit & Workshops on Electro- and Liquid Phase-separation Techniques, September 30 – October 03 2012, Baltimore, Maryland, USA, P-102, str. 56, <http://itp2012.okstate.edu/>.

4. Pavlíček V., Tůma P.: *Very Fast Electrophoretic Determination of Creatinine and Uric Acid in Human Urine using a Combination of Two Capillaries with Different Inner Diameters*, ve sb. Moderní elektrochemické metody XXXII, BEST Servis, Ústí nad Labem, Jetřichovice 2013, str. 144 -148 (ISBN 978-80-905221-1-4).

5. Pavlíček V., Tůma P., Samcová E.: *Very Fast Electrophoretic Determination of Creatinine and Uric Acid in Human Urine using a Combination of Two Capillaries with Different Inner Diameters*, ve sb. ChemZi - SLOVENSKÝ ČASOPIS O CHÉMII PRE CHEMICKÉ VZDELÁVANIE, VÝSKUM A PRIEMYSL, Ročník 9, Číslo 1, Rok 2013, str. 152, ISSN 1336-7242. 65. ZJAZD CHEMIKOV, Vysoké Tatry, Tatranské Matliare, 9. – 13. September.

6. Tůma P., Málková K., Pavlíček V.: *In vivo monitoring of trace levels of GABA, glycine and glutamate in microdialysates of rat's brain by capillary electrophoresis with contactless conductivity*

dection, ve sb. 51S Collected Reports of the Natural Science Faculty, Palacký university Olomouc, Czech Republic, str. 217. ISBN 978-80-244-3950-1, ISSN 0232-0061. Int. Conf. Advances in Chromatography and Electrophoresis 2014 & Chiranal 2014, 10.-14.2.2014, Olomouc, Czech Republic.

7. Pavlíček V., Tůma P., E. Samcová: *New electrophoretic approach to the rapid determination of creatinine and uric acid in human urine using a coupled capillary*. ve sb. Moderní elektrochemické metody XXXIV., BEST Servis, Ústí nad Labem, Jetřichovice 2014, str. 121 -125 (ISBN 978-80-905221-2-1).

8. Pavlíček V.: *Rychlé elektroforetické stanovení kreatininu a kyseliny močové v lidské moči*, ve sb. SVK 2014 – Studentská vědecká konference 3. LF UK v Praze, 27.5.2014, str. 73 – 75. (ISBN 978-80-97878-09-5). 2. místo v postgraduální sekci.

9. Pavlíček V., Tůma P., E. Samcová: *A NEW ELECTROPHORETIC APPROACH USING COUPLED CAPILLARIES FOR THE RAPID DETERMINATION OF SUBSTANCES ON COMMERCIAL CAPILLARY INSTRUMENTS* - 21ST INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON ELECTRO- AND LIQUID PHASE-SEPARATION TECHNIQUES & THE 20TH LATIN-AMERICAN SYMPOSIUM ON BIOTECHNOLOGY, BIOMEDICAL, BIOPHAR-MACEUTICAL AND INDUSTRIAL APPLICATIONS OF CAPILLARY ELECTROPHORESIS AND MICROCHIP TECHNOLOGY, Natal – RN Brazil October 04 – 08, 2014, PP-A-68, <http://latince.com>. Získána cena za posterovou prezentaci a přínosnou inovaci v oblasti analytických metod.

10. Pavlíček V., Tůma P.: *Determination of steviol-glycosides in food supplements and beverages by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection*. 22nd International Symposium on Electro- and Liquid Phase-Separation Techniques (ITP2015) and the 8th Nordic Separation Science (NoSSS) symposium. Helsinki, Finland, August 30th – September 3rd. <http://www.helsinki.fi/itp2015/>.

11. Pavlíček V., Tůma P., Samcová E.: *Determination of rebaudioside A and stevioside in food supplements and beverages by capillary electrophoresis with contactless conductivity detector*. Ve sb. ChemZi - SLOVENSKÝ ČASOPIS O CHÉMII PRE CHEMICKÉ VZDELÁVANIE, VÝSKUM A PRIEMYSL, Ročník 11, Číslo 1, Rok 2015, str. 117, ISSN 1336-7242. 67. ZJAZD CHEMIKOV,

Vysoké Tatry, Horný Smokovec, 7. – 11. September 2015. <http://67zjazd.schems.sk/>. Poster oceněn - IUPAC Poster Award.