

1. Úvod

„Často, když pod starostmi kloní se už šije, častokrát v bitvy vřavě zazní hlas, ozve se nevyslovitelná touha objevit život skrytý kdesi v nás: žíznivá touha napřít všechnu sílu a znovu hledat směr, s rukama na kormidlu, toužení vnikat znova do záhad toho srdce zde, jež bije tak divoce, tak přehluboko – znát, odkud se život bere a kam se ubírá.“

ARNOLD

Touha po poznání je základní předpoklad vědeckého pracovníka. Snad každý dá mi za pravdu, že pokud je poznání spojeno s objevem a odhalováním principů, zákonitostí a délky lidského života, je touha poznávat mnohonásobně umocněna. V průběhu historie lidstva se setkáváme s šamany, léčiteli, čaroději, alchymisty, kteří se s velkým nadšením pokoušeli o přípravu zázračného nápoje věčného mládí. Dnes už snad jen blázen by věřil na účinnost lektvarů a elixírů mládí. Žijeme ve světě techniky, pokroků a stále nových objevů, které bez vědecky prokázané účinnosti a funkčnosti, nemají možnost na přežití. Přesto stále otázka délky života naplňuje touhu po poznání leckterých vědců a vědeckých pracovišť.

Elixíry se sice nepřipravují, ale byly objeveny látky, které svými účinky v lidském organismu pomáhají některé patologické procesy zpomalit nebo dokonce zastavit. Jednou z těchto zázračných látek je hormon melatonin.

Prvním krokem k ověření nebo zjištění nových účinků zkoumané látky je umět látku stanovit v biologickém materiálu, a to jak kvalitativně, tak i kvantitativně. Nepopírám, že neexistují spolehlivé metody na stanovení melatoninu. Existují. Patřím však k vědeckým pracovníkům, jejichž pracoviště si nemůže tak finančně náročné techniky dovolit. A právě zde hraje velkou roli už zmíněná touha po poznání, která dodává sílu, energii a inspiraci našemu pracovnímu kolektivu k nalezení alternativní a relativně přístupné techniky stanovení.

Bylo prokázáno, že koncentrace jednoho metabolitu melatoninu, 6-sulfatoxymelatoninu, v ranní moči, odpovídá fyziologickým koncentracím melatoninu vyloučeného epifýzou během noci. Prvním krokem byla zajisté volba některé ze separačních technik. Stanovení 6-sulfatoxymelatoninu pomocí vysokoúčinné

kapalinové chromatografie selhalo na problému stanovení silně polárních látek pomocí HPLC, což 6-sulfatoxymelatonin beze sporu je. V roztoku je molekula 6-sulfatoxymelatoninu nabitá a tento jednoduchý poznatek otevřel cestu nového poznání a zkoumání tak zajímavé molekuly pomocí elektromigrační techniky – kapilární elektroforézy.

V předložené práci bude snahou nastínit možnost stanovení 6-sulfatoxymelatoninu pomocí kapilárně elektroforetické techniky.

2. Cíl práce

V teoretické části rigorózní práce je zpracována problematika teorie separační techniky elektroforézy.

Teoretická část je členěna do šesti oddílů. V úvodu teoretické části je zmíněno několik poznámek k historii zkoumané techniky. Dále bylo snahou popsat základní jevy a analytické parametry kapilární elektroforézy. Na konci tohoto oddílu jsou vysvětleny principy variant provedení elektroforetické techniky.

V experimentální části jsou aplikovány poznatky získané z teorie. Cílem bylo optimalizovat separační podmínky pro analýzu SaMT pomocí kapilární elektroforézy. SaMT je středem zájmu a předmětem výzkumu na katedře biofyziky a fyzikální chemie díky svým antioxidačním účinkům a vlivem na procesy stárnutí.

Doposud byly experimenty prováděny pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie, konkrétně na kolonách Discovery Cyano, Discovery HS C18 a ABZ⁺. Na těchto kolonách bylo dosaženo podobných výsledků. Vůbec se neosvědčila kolona Discovery Carbon Zr C18.

3. Teoretická část

3.1. Historie objevů elektroforézy

V roce 1892 byl popsán pohyb anorganických částic v elektrickém poli v koloidním roztoku. Následně se ukázalo, že podobně putují i proteiny ve vodných roztocích. V třicátých letech 20. století zkonstruoval švédský elektrochemik Arne Tiselius zařízení umožňující rozdělit proteiny krevního séra na základě jejich rozdílných rychlostí pohybu v elektrickém poli. Elektroforézu charakterizoval definicí: k separaci dochází rozdílnou pohyblivostí nabitých částic (iontů), způsobenou přitažlivými nebo odpudivými silami v elektrickém poli. Za tento objev dostal v roce 1948 Nobelovu cenu. V nepříliš odlišném uspořádání se elektroforéza proteinů krevního séra jako diagnostická metoda dodnes používá na mnoha klinikách.¹

V polovině šedesátých let vznikla elektromigrační technika kapilární izotachoforéza, určená převážně pro analýzu směsi malých iontů, anorganických i organických.

První práce týkající se kapilární elektroforézy popsal Hjertén v roce 1967.² K dispozici však byly pouze kapiláry s průměrem 1 mm. Později Virtanen a potom Mikkers³ provedli elektroforézu v kapiláře o vnitřním průměru 0,2 mm vyrobené ze skla a teflonu. Roku 1981 J. W. Jorgenson a K. D. Lukacs⁴ publikovali práci o separaci různých iontů (aminokyselin, dipeptidů, aminů) zónovou elektroforézou ve velmi tenké skleněné kapiláře z taveného křemene s vnitřním průměrem 0,075 mm. Demonstrovali tak vysokou účinnost separace v úzké kapiláře v porovnání s velmi rozšířenou kapalinovou chromatografií. Jorgenson také vypracoval teorii popisující vztahy mezi operačními parametry a kvalitou separace a poukázal na možnosti vysoce účinné kapilární elektroforézy (HPCE) jako analytické techniky.

Dalším významným krokem ve vývoji CE byl objev micelární elektrokinetické chromatografie. Tato technika využívá tenzidy, jež vytvářejí micely s nepolárními sloučeninami a lze tedy separovat nenabitě látky. Dodnes bylo objeveno velké spektrum látek posilující účinek a selektivitu CE separace.

V posledních letech byly vyvinuty další modifikace elektroforézy, které našly široké uplatnění v řadě separací. Jsou to například miniaturizace na čipy, nebo

spojení s lasery pro širokou oblast molekulárně biologických metod. Také spojení kapilární elektroforézy s hmotnostní spektrometrií je hojně využíváno pro stanovení nabitých látek.

3.2. Kapilární elektroforéza dnes

V současnosti se tímto termínem označuje separační metoda využívající pohyb nabitých částic, ať už malých iontů či makromolekul (proteinů, fragmentů DNA) v elektrickém poli, a to buď přímo ve volném roztoku elektrolytu nebo v nějakém nosném médiu, např. gelu. Je-li elektrolytem nebo médiem naplněná kapilára, říká se technice kapilární elektroforéza.

Kapilární elektroforéza je analytická technika, která se vyznačuje vysokou citlivostí, účinností a reprodukovatelností na úrovni HPLC. Své uplatnění nachází i při analýzách anorganických iontů v biologických vzorcích. V mnoha případech bývá kapilární elektroforéza spojena s diode-array detektorem, který je speciálně konstruován pro přímou detekci migrujících analytů kapilárou.

Hlavní předností kapilární elektroforézy jsou tedy velmi vysoká účinnost, která dovoluje separaci až stovek sloučenin v jednom roztoku, požadavek minimálního množství jak vzorku, tak pufrů a jiných analytických činidel, snadná automatizace a možnost kvantifikace.⁵

3.3. Teorie kapilární elektroforézy

3.3.1. Elektroforéza

Princip elektroforézy spočívá v separaci nabitých částic, které se pohybují nezávisle různými rychlostmi ve stejnosměrném elektrickém poli. Rychlost nabité částice je přímo úměrná intenzitě elektrického pole. Intenzita elektrického pole je funkcí aplikovaného napětí a délky kapiláry (V/cm). Konstantou úměrnosti je tzv. pohyblivost μ_e .

$$v = \mu_e \cdot E = \mu_e \cdot \frac{U}{l}, \quad (1)$$

kde je v – rychlost iontu, μ_e – elektroforetická pohyblivost (mobilita), E – intenzita elektrického pole, U – napětí mezi elektrodami, l – délka kapiláry.

Pohyblivost je konstanta charakteristická pro daný ion a prostředí. Jednotkou je $\text{m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ a tedy platí, že ion s jednotkovou pohyblivostí urazí za 1 s vzdálenost 1 m při intenzitě elektrického pole 1 V/m.

Elektricky nabitá částice se pohybuje vlivem působení elektrické síly, která je dána vztahem

$$F_E = q \cdot E, \quad (2)$$

kde q je náboj iontu.

Proti tomuto pohybu působí odpor prostředí. Pro kulovou částici s nepříliš velkou rychlostí platí vztah pro velikost třecí síly (Stokesův zákon)

$$F_F = -6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r \cdot v, \quad (3)$$

kde η je viskozita analytu, r – iontový poloměr a v – iontová rychlost.

Při elektroforetickém ději v ustáleném stavu dojde k rovnováze obou sil. Za tohoto stavu mají síly stejnou velikost, ale působí proti sobě.

$$q \cdot E = 6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r \cdot v \quad (4)$$

Z rovnosti (4) lze vyjádřit rychlost, dosadit do vztahu pro výpočet rychlosti (1) a dostaneme vztah pro veličinu popisující **mobilitu** (pohyblivost):

$$\mu_e = \frac{q}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r} \quad (5)$$

Uvedený vztah napovídá, že malé a více nabité částice mají větší mobilitu než velké, málo nabité látky.

Limitní elektroforetická mobilita je fyzikální konstanta, charakteristická pro danou částici a prostředí. Limitní pohyblivost je závislá pouze na teplotě a použitém rozpouštědle. Není závislá na koncentracích složek analytu, tedy na iontové síle. Hodnoty limitní elektroforetické mobility jsou tabelovány.

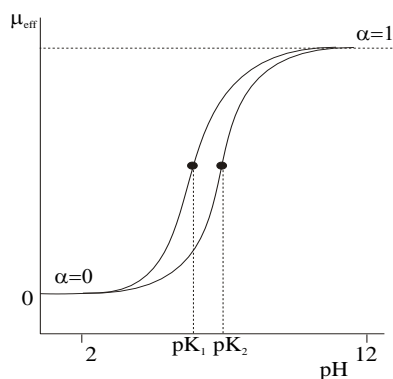
Praktické využití má zdánlivá a efektivní pohyblivost. **Zdánlivá pohyblivost** μ_{av} zohledňuje příspěvek elektroosmotického toku (EOF) a popisuje ji následující vztah

$$\mu_{av} = \frac{v}{E} = \frac{L_d}{t \cdot E}, \quad (6)$$

kde v je migrační rychlost zóny dané látky, E – intenzita elektrického pole, t – migrační čas zóny, L_d – vzdálenost od bodu nástřiku do detektoru.

Efektivní pohyblivost hraje úlohu při popisu neúplně disociovaného systému. Neúplně disociované látky mají určitý podíl nenabitých částic, proto se budou v elektrickém poli pohybovat pomaleji. Při stálé intenzitě elektrického pole budou mít látky v prostředí, kde nejsou úplně disociovány, menší pohyblivost než v prostředí, kde budou disociovány úplně.

Mají-li dva analyty stejnou limitní pohyblivost (zcela disociovaná forma), jeví se jako nedělitelné. Tyto látky však mají různé disociační konstanty a tedy i hodnoty efektivních mobilit při vhodném pH. Proto je lze úspěšně separovat.



Obr. 1: Zobrazení mobility dvou slabých kyselin v závislosti na pH.

Pro efektivní pohyblivost dané složky analytu platí vztah

$$\mu_{ef} = \mu_{av} - \mu_{EOF} \quad (7)$$

μ_{av} je zdánlivá pohyblivost, μ_{EOF} je pohyblivost elektroosmotického toku vyjádřená vztahem

$$\mu_{EOF} = \frac{L_d}{t_{EOF} \cdot E} \quad (8)$$

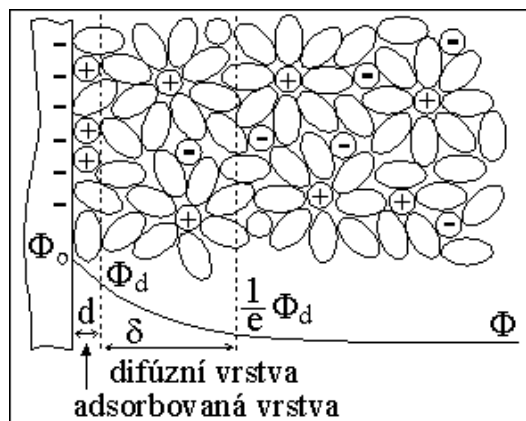
t_{EOF} – migrační čas nenabitě částice (EOF) markeru, L_d – vzdálenost od bodu nástřiku k detektoru.

Pohyblivost elektroosmotického toku není fyzikální konstantou, závisí na experimentálních podmínkách.⁶

3.3.2. Elektroosmóza

Elektroosmóza je jev přítomný vždy, když se aplikuje elektrické pole na systém zahrnující pevnou (stacionární) fázi, která je v kontaktu s mobilní kapalnou fází. Na rozhraní obou fází dochází ke vzniku elektrické dvojvrstvy, která hraje klíčovou roli v elektroosmóze. Existuje řada teorií popisující strukturu elektrické dvojvrstvy, z nichž nejznámější jsou Helmholtzova teorie, Gouyova-Chapmanova teorie a Sternova teorie.

Elektrická dvojvrstva se skládá ze dvou vrstev. Systém jako celek je elektricky neutrální. Vnitřní vrstva je součástí tuhé fáze a vzniká disociací vlastních ionizovatelných skupin situovaných na povrchu struktury nebo adsorpcí iontů přítomných v roztoku na povrch částic. Vnější, difúzní vrstva, je každou teorií charakterizovaná jiným způsobem. Mezi nabitým povrchem a objemovou fází roztoku vzniká rozdíl potenciálů, jež popisuje danou dvojvrstvu v klidovém stavu.⁷



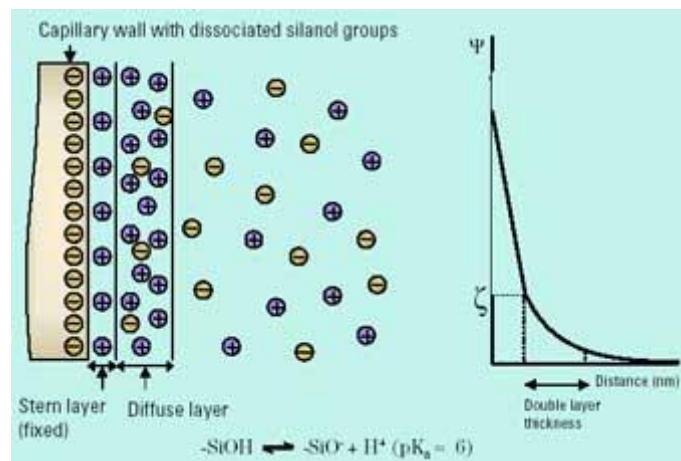
Obr. 2: Elektrická dvojvrstva.

Mezi pevnou relativně nevodivou fází (u CE sklo z taveného křemene) a elektrolytickým roztokem vzniká určitý potenciálový rozdíl, který závisí na koncentraci iontů v roztoku. Sklo se v roztoku chová jako vodíková elektroda. Rozdíl potenciálů pevné a kapalně fáze se nazývá fázový potenciál a je charakterizován Nernstovou rovnicí.

$$\varepsilon = -\frac{R \cdot T}{n \cdot F} \log \frac{\pi}{p} \quad (9)$$

ε – fázový potenciál, R – univerzální plynová konstanta, T – teplota v Kelvinech, n – počet vyměněných nábojů, F – Faradayova konstanta, π – konstantní tlak vodíku povrchové vrstvy skla, p – osmotický tlak H^+ iontů v roztoku.

Zbývající část fázového potenciálu, tvořená difúzní (pohyblivou) částí elektrické dvojvrstvy, se nazývá elektrokinetický potenciál, tzv. zeta potenciál ζ . Zeta potenciál charakterizuje potenciálový rozdíl mezi nepohyblivou primární vrstvou a objemovou fází. Je určen povrchovou hustotou náboje elektrické dvojvrstvy a je závislý především na vnitřním povrchu kapiláry a na použitém elektrolytu.

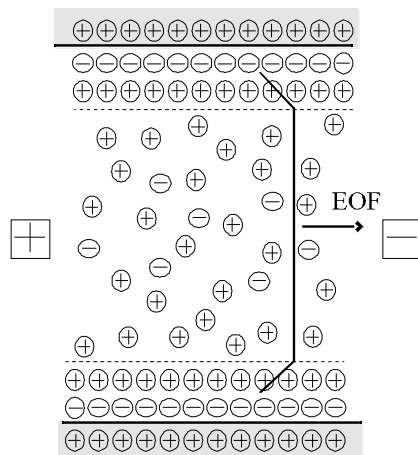


Obr. 3: Zeta potenciál.

3.3.3. Elektroosmotický tok (EOF)

Ve vodném roztoku má většina povrchů kapilár záporný náboj, který je výsledkem ionizace stěny v důsledku ustavení acidobazické rovnováhy (disociace silanolových Si-OH skupin na aniontovou formu SiO⁻), popř. adsorpce iontových látek na povrch. U křemenných kapilár se při pH > 4 významněji uplatňuje disociace silanolových skupin. U neiontových materiálů (teflonové kapiláry) se také v malé míře uplatňuje EOF, a to v důsledku adsorpce iontů.

Povrchový náboj kapiláry je kompenzován protiionty (obvykle kationty) z objemové fáze. Vytváří se elektrická dvojvrstva charakterizovaná určitým potenciálovým rozdílem, tzv. ζ-potenciálem. Vložíme-li na kapiláru vnější napětí, začnou se kationy difúzní části dvojvrstvy i se svými solvatačními obaly pohybovat ke katodě. Tímto pohybem se strhává i roztok uvnitř kapiláry a vzniká tak makroskopický tok kapaliny směrem ke katodě nazývaný **elektroosmotický tok** (Electroosmotic Flow – EOF).



Obr. 4: Elektroosmotický tok.

Povrchový náboj stěny kapiláry určuje velikost zeta potenciálu. Velikost EOF se tak mění v závislosti na pH, protože náboj je na pH závislý. Při vysokém pH jsou silanolové skupiny z větší části disociované a EOF je velký. Při nízkém pH, kdy jsou silanolové skupiny protonizované (nenabitě), je EOF významně menší. Největší změny v EOF jsou v rozmezí pH 2 až 12.

Jelikož zeta potenciál je závislý také na iontové síle elektrolytu, lze EOF ovlivňovat i tímto způsobem. Zvýšení iontové síly způsobí „stlačení“ dvojvrstvy a snížení zeta potenciálu. Dojde k redukci EOF.

Za normálních podmínek se pohybují ionty od anody ke katodě. EOF způsobuje pohyb všech molekul ve stejném směru bez ohledu na náboj. Anionty budou tedy unášeny směrem ke katodě, protože jejich elektroforetická mobilita je menší než EOF.

3.4. Analytické parametry

Níže uvedené analytické parametry jsou popsány a aplikovány na nejjednodušší techniku HPCE, a to kapilární zónovou elektroforézu (CZE).

3.4.1. Mobilita a migrační čas

Migrační čas je doba, která charakterizuje migraci analytu od bodu nástřiku do bodu detekce. Migrační čas je roven podílu migrační vzdálenosti a rychlosti.

Migrační čas a další experimentální parametry se využívají k výpočtu zdánlivé mobility analytu.

$$\mu_{av} = \frac{l}{t \cdot E} = \frac{l \cdot L}{t \cdot V} \quad (10)$$

$\mu_{av} = \mu_{ef} + \mu_{EOF}$ – zdánlivá mobilita (= efektivní mobilita + velikost EOF), V – aplikované napětí, l – efektivní délka kapiláry, L – celková délka kapiláry, t – migrační čas, E – intenzita elektrického pole.

Pro detekci na kapiláře (UV-Vis detekce) je obvykle účinná délka kapiláry asi o 10 cm kratší než celková délka. Při MS-detekci se obě délky rovnají.

3.4.2. Teoretické patro

Teoretické patro slouží k posouzení účinnosti separace. Tento pojem je znám hlavně z teorie separačního mechanismu chromatografických metod. U elektromigračních technik se zavádí pojem výškového ekvivalentu teoretického patra. Princip je stejný. Separační lože (chromatografická kolona, sloupec) je rozděleno na části tak, aby v každé takové části během separace došlo právě k dosažení rovnovážného rozdělení analytu mezi mobilní a stacionární fázi. Taková část kolony se potom nazývá výškový ekvivalent teoretického patra.

Separace dvou látek bude tím účinnější, čím větší počet teoretických pater bude existovat pro danou separaci. Počet teoretických pater na téže koloně bude různý pro každou látku. Účinnost kolony tak může být definována buď počtem teoretických pater (n) nebo výškovým ekvivalentem teoretického patra (H).

$$H = \frac{1}{n} \quad (11)$$

Teoretické patro je nejen ukazatelem účinnosti separace, ale také fenoménem ovlivňující rozmývání zón, což už je vlastnost více specifická pro kapilární elektroforézu. Platí, že čím více pater, tím menší rozmytí. Souvislost mezi šířkou píku (rozmytím zóny) a počtem teoretických pater popisuje následující rovnice

$$n = \left(\frac{l}{\sigma} \right)^2 = 16 \cdot \left(\frac{t_R}{Y_t} \right)^2 = 5,545 \cdot \left(\frac{t_R}{Y_{h/2}} \right)^2 \quad (12)$$

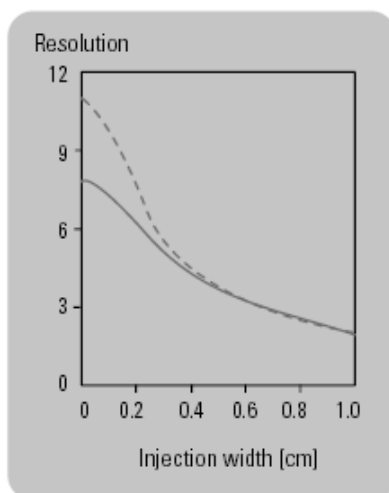
l – efektivní délka kolony, σ – parametr rozptýlení (směrodatná odchylka) gaussovy křivky, t_R – retenční čas, Y_t – šířka píku u základny, $Y_{h/2}$ – šířka píku v poloviční výšce.

Rovnice má praktické využití při výpočtu počtu teoretických pater z naměřeného elektroforeogramu.

3.4.3. Množství dávkovaného vzorku

Proces injekce je další významný faktor při separaci. Je důležité, aby množství vzorku bylo minimální. Větší objemy vzorku (overloading) mohou způsobit nežádoucí efekty, dochází ke snížení rozlišení i účinnosti. Jestliže je délka nástřiku větší než difúzí kontrolovaná šířka zóny, pík se úměrně rozšiřuje. Je patrná deformace píků vlivem nehomogenního prostředí a rozdílné konduktivity zóny analytu a pufru. Naopak malé množství vzorku způsobuje zředění analytu a následné problémy s detekcí.

Praktický limit pro dávkování je 1 – 2 % délky kapiláry, což vede k injekci řádu nl vzorku.

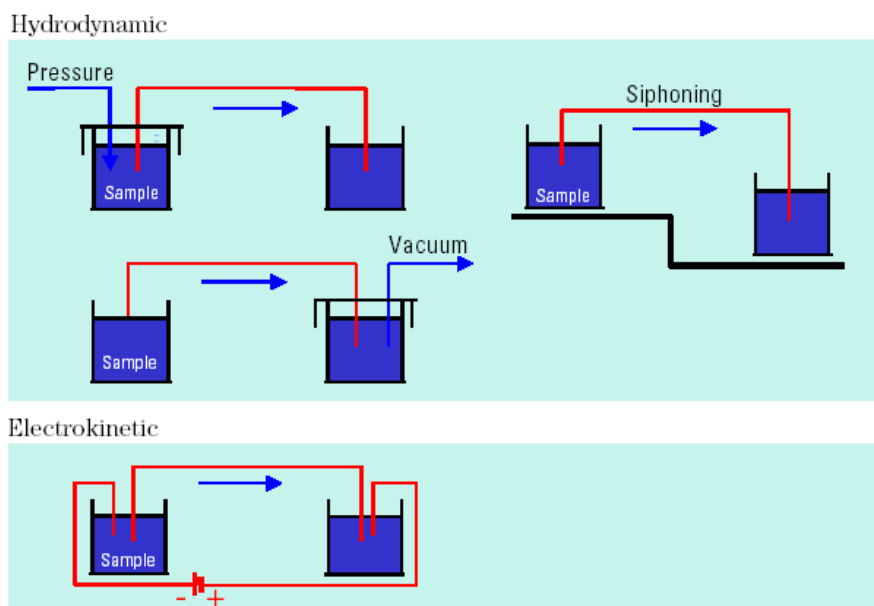


Obr. 5: Vliv délky injekce na rozlišení.

Vzorek může být dávkován dvěma způsoby, a to buď s použitím tlaku nebo elektrické síly. Možné způsoby dávkování jsou přehledně znázorněny na obrázku 6.

Hydrodynamické dávkování se provádí aplikací tlaku, vakua nebo změnou výšky hladin na koncích kapiláry. Výhodou je téměř nezávislost kvantity na složení vzorku.

Elektrokinetické nebo-li elektromigrační dávkování se provádí výměnou vstupního rezervoáru s puřem za vzorek a vložení napětí. Intenzita elektrického pole je 3 – 5x menší než při separaci. Analyt vstupuje do kapiláry migrací a vlivem EOF. Zajímavostí je závislost kvantity dávkování na elektroforetické mobilitě.



Obr. 6: Dva hlavní způsoby dávkování vzorku.

Ačkoliv se v CE dávkuje pouze nepatrné množství vzorku, dosahuje se při měření vysoké citlivosti. Dávkovaná množství jsou úměrná objemu kapiláry a objem je závislý na vnitřním průměru kapiláry.

3.4.4. Jouleův ohřev a teplotní gradient

Na kapiláru vložené napětí generuje určitý proud. Součin proudu a napětí (tj. příkon do kapiláry) se uvolní v podobě Jouleova tepla. Provedení elektroforézy v kapiláře je velmi výhodné z pohledu redukce tepla. Se zmenšujícím se průměrem kapiláry, klesá poměr povrchu k objemu separačního prostoru. Na množství tepla vygenerovaného v jednotce objemu připadá větší plocha, kterou se toto teplo musí vyzářit. Vygenerovaná energie se obvykle pohybuje v rozmezí $0,5 - 5 \text{ W/m}^2$. Teplotní rozsah stanovení bývá od $10 \text{ }^\circ\text{C}$ až po $70 \text{ }^\circ\text{C}$. Při lokálním vysokém vzrůstu teploty se může elektrolyt vypařovat, čímž vznikají bublinky plynu, které působí jako izolant a brání průchodu elektrického proudu.

Absolutní vzrůst teploty z pohledu analýz není rozhodující. Největší problém představuje nelineární teplotní gradient v průřezu kapiláry. Teplo generované v kapiláře se musí vyzářit stěnou. Tímto je vždy roztok u stěny kapiláry chladnější

než uprostřed. Tento fakt způsobí vzrůst mobility (o 2 – 3 % na 1 °C), protože s rostoucí teplotou klesá viskozita. Při průchodu detektorem se takové rozmytí projeví rozšířením píků.

Proměnná	Účinek
Snížení intenzity elektrického pole	<ul style="list-style-type: none"> • Proporční snížení tepla • Redukce účinnosti a rozlišení
Redukce průměru kapiláry	<ul style="list-style-type: none"> • Snížení elektrického proudu • Omezení citlivosti • Může snížit adsorpci vzorku
Snížení iontové síly pufru nebo koncentrace	<ul style="list-style-type: none"> • Proporční snížení proudu • Může snížit adsorpci vzorku
Aktivní kontrola teploty	<ul style="list-style-type: none"> • Termostatování a odstranění tepla z kapiláry

Tab. 1: Různé metody pro omezení Jouleova tepla.

3.4.5. Interakce analyt – stěna kapiláry

Molekuly analytu se mohou adsorbovat na stěnu kapiláry, což je způsobeno coulombickými interakcemi mezi kationy z roztoku a negativně nabitou stěnou. Nepochopitelné molekuly adsorbují díky hydrofobním interakcím. Pravděpodobnost adsorpce zvyšuje velký poměr povrchu k objemu kapiláry, který je však významný pro tepelný přenos.

K redukci uvedených interakcí se využívá několik metod. Snížení efektivního povrchového náboje lze docílit zvýšením koncentrace pufru. Interakce solutu se sníží a pufr současně vysytí sorpční centra. Vysoká iontová síla také snižuje EOF, což způsobí prodloužení migračních časů. Tuto aplikaci omezuje vzrůst proudu a Jouleova tepla.

Zvláště při separaci proteinů lze snížit adsorpci nastavením extrémních hodnot pH. Při nízkém pH (<2 až 3) jsou silanolové skupiny z větší části bez náboje. EOF je téměř nulový a proteinové skupiny, které jsou protonizovány a kladně nabitě, migrují směrem ke katodě. Při vysokém pH (>9 až 10) jsou stěna i analyt disociovány, tedy záporně nabitě a interakce se stěnou kapiláry jsou omezeny odpuzováním nábojů.

Redukovat nežádoucí adsorpci lze také pokrytím kapilární stěny. Povlak může mít různé formy. Buď je to formou přídavku do pufru (hydrofilní polymery, tenzidy – dynamická deaktivace) nebo se kovalentně naváže modifikátor stěny.

3.4.6. Rozlišení

Cílem každé separace je rozdělit vzorek na jednotlivé složky. Rozlišení píku látek je definováno jako poměr jejich vzdálenosti a průměrné šířky píku při základně.

$$R = \frac{2 \cdot (t_2 - t_1)}{w_1 + w_2} = \frac{t_2 - t_1}{4 \cdot \sigma} \quad (13)$$

t – migrační čas, w – šířka podstavy píku v čase, σ – standardní časová odchylka, 1, 2 – složky analyzovaného vzorku.

Separční proces je ve vztahu (13) charakterizován v čitateli. Disperzní procesy působící proti separaci jsou zahrnuty ve jmenovateli.

Separace v HPCE je primárně řízena vysokou účinností, ne selektivitou, jak je tomu u chromatografických technik. Vznikají velmi ostré úzké zóny i při malých rozdílech v mobilitě.

3.4.7. Faktory ovlivňující účinnost

Zdroj rozšiřování zóny	Ovlivnění systému
Podélná difúze	<ul style="list-style-type: none"> definuje hlavní omezení účinnosti analyty s nízkým difúzním koeficientem tvoří úzké zóny
Jouleův ohřev	<ul style="list-style-type: none"> způsobuje teplotní gradient a laminární proudění
Délka nástřiku	<ul style="list-style-type: none"> délka nástřiku by měla být menší než příspěvek difúze k rozmytí zóny nedostatečná citlivost detekce často vyžaduje delší nástřik
Adsorpce vzorku	<ul style="list-style-type: none"> interakce se stěnou kapiláry způsobují chvostování píků
Rozdílná vodivost vzorku a elektrolytu	<ul style="list-style-type: none"> rozdílná vodivost způsobuje rozmývání zón
Různá výška rezervoárů	<ul style="list-style-type: none"> vytváří laminární, hydrodynamický tok
Šířka detekčního okna	<ul style="list-style-type: none"> ovlivňuje šířku zaznamenaného píku

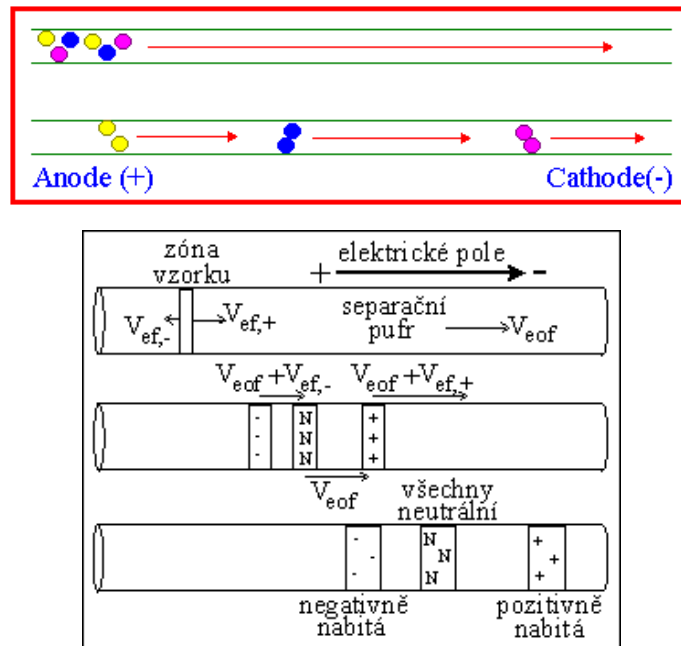
Tab. 2: Faktory ovlivňující účinnost.

3.5. Rozdělení CE

3.5.1. Kapilární zónová elektroforéza (CZE)

Kapilární zónová elektroforéza je také známa pod zkratkou FSCE (free solution capillary electrophoresis). Představuje nejjednodušší uspořádání z elektromigračních technik a je široce používaná díky své jednoduchosti a univerzálnosti. Kapilární zónová elektroforéza (CZE) je vhodná pro separaci nabitých molekul (iontů) lišících se svou molekulovou hmotností, tvarem a nábojem. Rozsah aplikace této techniky je různorodý, zahrnuje analýzu aminokyselin, peptidů, iontů, také stanovení opticky aktivních látek a mnoho dalších iontových sloučenin.⁸ U proteinů se CZE používá hlavně k ověření jejich čistoty a konformačních variant.⁹

Jednoduchost této metody spočívá v tom, že kapilára je naplněna pouze základním elektrolytem (pufr), který je svým složením homogenní v celé délce kapiláry. Taktéž je konstantní intenzita elektrického pole. Separace je docílena migrací analytů v diskrétních zónách s různou rychlostí. Metoda CZE umožňuje separovat anionty i kationty současně, a to díky EOF. Neutrální molekuly se nerozdělují, pouze jsou unášeny s EOF.



Obr. 7: Princip separace pomocí CZE.

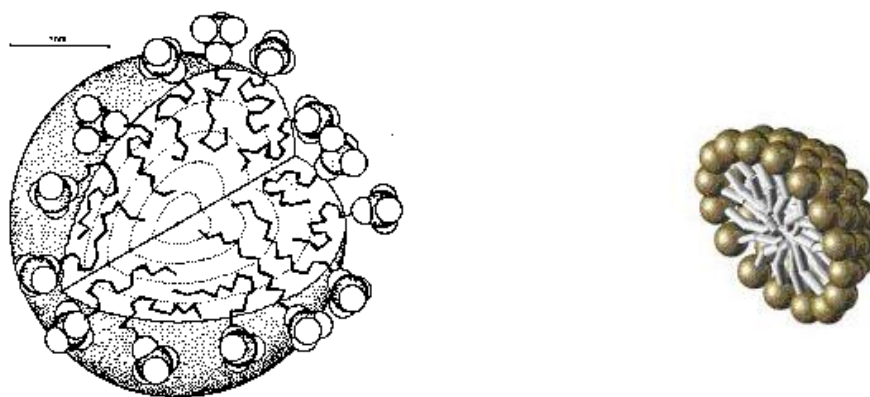
3.5.2. Micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC)

Micelární elektrokinetická chromatografie je technika spojující prvky elektroforézy a chromatografie. V literatuře je často označována jako *Micelární elektrokinetická kapilární chromatografie (MECC)*.

Micelární elektrokinetická kapilární chromatografie je nejzajímavější technikou kapilární elektroforézy z hlediska možnosti rozdělení směsí obsahujících jak nabitě, tak nepolární molekuly. Dá se použít i při separaci směsi velmi hydrofóbních léčiv a jejich velmi polárních metabolitů.

Při separaci analytů hrají důležitou roli tenzidy (surfaktanty) obsažené v pufru. Tenzidy mají ve své struktuře polární a nepolární část s opačnou afinitou k pufru. Polární část tvoří hydrofilní hlavička a nepolární část se skládá z dlouhého hydrofóbního řetězce, který je tvořen 10 – 50 atomy uhlíku. Jsou-li tyto amfipatické látky přítomny v základním elektrolytu v nízké koncentraci, existují odděleně. Se vzrůstající koncentrací proběhne jejich shlukování za vzniku částic s 50 a více molekulami amfifilní látky a velikosti částice nad 5 nm. Těmto částicím říkáme **micely** a vytvářejí se v roztoku při koncentraci nad tzv. kritickou micelární koncentrací (CMC). Tyto soustavy jsou vratné, neboť jejich náležitým zředěním vznikne opět pravý roztok.

Micely jsou tedy agregáty tenzidů, mají sférický tvar a amfifilní vlastnosti. Ve vodném roztoku jsou hydrofóbní konce orientovány do středu molekuly a hydrofilní hlavičky směřují ven do vodného roztoku.



Obr. 7: Různá znázornění struktury micely.

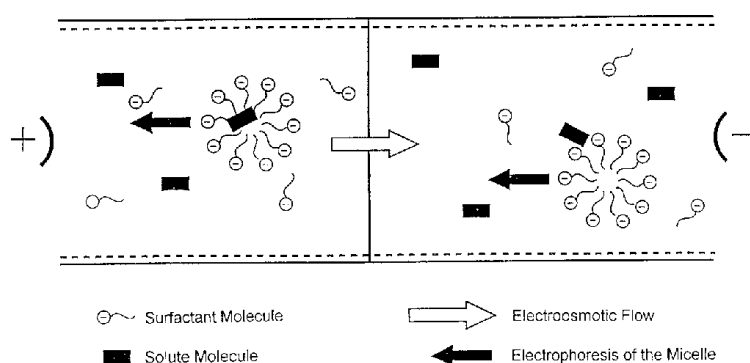
Rozlišujeme čtyři hlavní třídy surfaktantů: aniontové, kationtové, neiontové a amfolytické. V MECC se nejvíce používají první dva typy.

Surfaktant	Typ	CMC/M	Agregační číslo
SDS	Anionický	$8,1 \cdot 10^{-3}$	62
CTAB	Kationický	$9,2 \cdot 10^{-4}$	170
Brij-35	Neionický	$1,0 \cdot 10^{-4}$	40
Sulfobetaine	Amfolytický	$3,3 \cdot 10^{-3}$	55

SDS – sodium dodecyl sulfát; CTAB – cetyltrimethylamonium bromid; Brij-35 – polyoxyethylen-23-lauryl ether; sulfobetain – N-dodecyl-N,N-dimethylamonium-3-propan-1-sulfonová kyselina.

Tab. 3: Třídy surfaktantů a jejich kritická micelární koncentrace.

Princip separace je založen na interakci micel a nepolárních látek rozpuštěných v roztoku. Podle toho, jaký nesou micely náboj, migrují s nebo proti EOF. Aniontové tenzidy (př. SDS) migrují směrem k anodě, tj. opačným směrem než EOF. Jelikož je ale EOF obvykle rychlejší než migrační rychlost micel při neutrálním nebo zásaditém pH, dochází k migraci souhlasným směrem elektroosmotického toku. Během migrace mohou micely interagovat s molekulami analytu na chromatografickém principu na základě jak hydrofóbních, tak elektrostatických interakcí. Pokud analyt s micelou neinteraguje, je jednoduše unášen EOF. Látky hydrofóbní povahy, které samy nemají žádný náboj, interagují s micelami a získávají mobilitu díky polárním částem micel. Jejich výsledná migrační rychlost je menší, jelikož jsou micelou unášeny proti EOF.



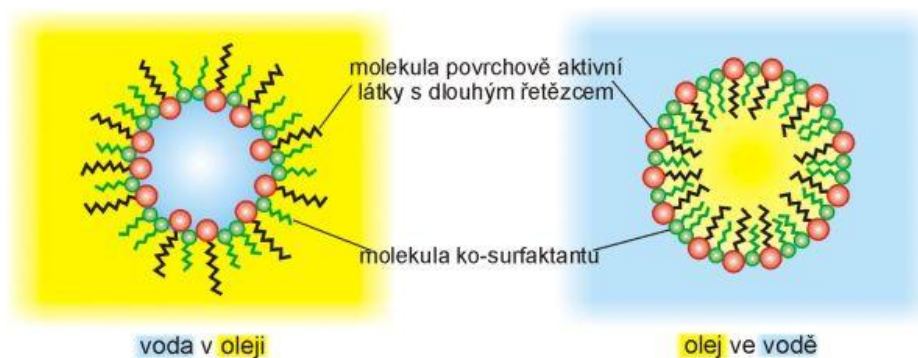
Obr. 8: Micelární elektrokinetická kapilární chromatografie.

MECC je dynamická varianta CE používaná jak pro nabitě, tak i pro nenabitě analyty a další látky s hydrofilními nebo hydrofóbními vlastnostmi. Pomocí MECC lze stanovit aminokyseliny, nukleotidy, vitamíny a rozsáhlou skupinu léčiv, aromatických uhlovodíků a dalších.^{10,11}

3.5.3. Mikroemulzní elektrokinetická chromatografie (MEEKC)

Mikroemulzní elektrokinetická kapilární chromatografie je elektricky řízená separační technika, která umožňuje vysoce účinné separace neutrálních i nabitých látek. K separaci zkoumaných látek se používají pufrы obsahující mikroemulze.

Mikroemulze jsou vlastně micely s velkým obsahem solubilizátu (povrchově aktivní látka). Tvoří přechod mezi emulzemi a micelárními koloidy. Vznikají spontánně při vysokých koncentracích povrchově aktivní látky v micelě za přítomnosti tzv. ko-surfaktantu (např. alkoholu o střední délce řetězce), což způsobuje další snížení mezifázového napětí. Velikost mikroemulze se pohybuje v řádu 30 nm. Mikroemulze jsou na rozdíl od většiny běžných emulzí průhledné a termodynamicky stabilní.¹²



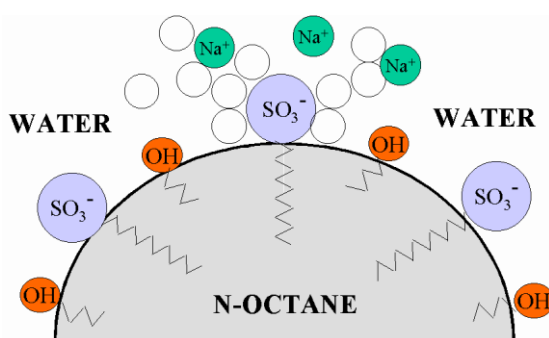
Obr. 9: Kapky mikroemulze.

Mikroemulze používané v MEEKC obsahují iontové surfaktanty. Umožňují separaci na chromatografickém principu, kdy dochází k dělení analytů mezi olejové kapénky a vodnou fázi pufru. Ve vodě nerozpustné, hydrofóbní látky se zadržují v olejové fázi a naopak.

Tento princip separace je velmi podobný technice MECC (MEKC). Micely ale tvoří pouze monomery surfaktantu. Povrch micel tvořený surfaktanty je však hůře prostupný pro některé analyty. Díky tomu má metoda MEEKC širší rozsah využití stanovení farmaceutických látek.

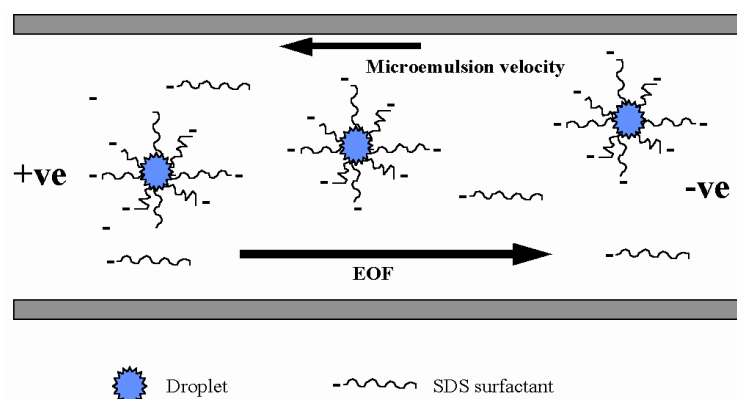
Nejpoužívanější surfaktant v MEEKC je sodium dodecyl sulfát (SDS). Olejové kapénky jsou obaleny molekulami SDS, který jím uděluje záporný náboj. Uhlíkový řetězec C_{12} surfaktantu penetruje dovnitř kapénky, zatímco záporně nabitá hydrofilní sulfátová skupina SDS zůstává na povrchu v kontaktu s vodnou fází.

Odpudivé síly negativně nabitě sulfátové skupiny zabraňují tvorbě emulze, povrchové síly nejsou dostatečně redukovány, proto se do roztoku přidává ko-surfaktant, alkohol se středně dlouhým řetězcem. Je nezbytný pro tvorbu emulze, vzniklou emulzi pak stabilizuje. Nejčastěji to bývá butan-1-ol.



Obr. 10: Kapka mikroemulze s navázaným SDS.

V MEEKC se většinou používají pufrы s vysokým pH, např. borátový nebo fosfátový. Aplikuje-li se napětí do kapiláry s pufrem, vznikne vysoký, relativně rychlý EOF směřující ke katodě. Olejové kapky se surfaktantem jsou negativně nabitы a snaží se putovat směrem k anodě. EOF je však dostatečně silný a je schopen zavléci olejové kapénky ke katodě. Neutrální, ve vodě rozpustné analyty, zůstávají ve vodné části a jsou unášeny EOF ke katodě. Naopak nerozpustné látky se dělí do kapek, jsou zadržovány, mají vysoký kapacitní faktor. Látky mírně rozpustné ve vodě, které mají kapacitní faktor roven 1, se dělí rovným dílem do vodné fáze a olejové kapky. Migrační čas nebo kapacitní faktor neutrálních analytů tedy přímo závisí na rozpustnosti (hydrofobicitě) analytu v separační technice MEEKC.



Obr. 11: Zobrazení principu MEEKC.

MEEKC je relativně nová metoda. Umožňuje stanovení jak ve vodě rozpustných, tak ve vodě nerozpustných sloučenin. Je efektivně využívána ve farmaceutickém průmyslu k analýze širokého spektra farmaceuticky aktivních látek. Jsou známy postupy stanovení polyaromatických uhlovodíků, proteinů, herbicidů, vitamínů, ketonů a β -diketonů, farmaceuticky aktivních látek, steroidů, kardiotonických glykosidů a dalších.¹³

3.5.4. Kapilární gelová elektroforéza (CGE)

Gelová elektroforéza nachází své uplatnění hlavně v biologických vědách. Byla vyvinuta za účelem stanovení makromolekul, jako jsou proteiny a nukleové kyseliny. Rozhodující úlohu při separaci látek má velikost molekuly, molekulová hmotnost. Látky jsou separovány v gelu, který tvoří vybraný vhodný polymer. Má zde úlohu tzv. „molekulového síta“.¹⁴



Obr. 12: Kapilární gelová elektroforéza.

Molekuly solutu migrují skrz síto a jsou zadržovány rozvětveným polymerem. Větší molekuly jsou zadržovány více, menší méně. Makromolekuly jako DNA nebo proteiny nemohou být separovány bez přidavku gelu, protože poměr hmotnosti molekuly k náboji se nemění s velikostí molekuly. Např. pro DNA každý další nukleotid přináší do řetězce DNA určitý příspěvek hmotnosti a určitý příspěvek náboje, takže výsledná mobilita ve volném roztoku není ovlivněna.

Separční mechanismus CGE je srovnatelný s tradiční plošnou (deskovou) gelovou elektroforézou. Uspořádání gelu do kapiláry má však řadu výhod oproti plošnému uspořádání. Lze aplikovat 10 až 100krát větší intenzity elektrického pole bez nežádoucích účinků Jouleova tepla. Při kapilárním provedení je jednodušší a citlivější detekce a snadná automatizace. Jednou z hlavních výhod plošných technik je možnost preparativní separace. Preparativní separace v kapiláře lze docílit použitím kapilár o velkém vnitřním průměru (wide-bore, i.d. 100 – 200 μm) a aplikací malých intenzit elektrického pole. V plošném uspořádání můžeme provádět paralelně více analýz. Naproti tomu délka analýz v kapilárním uspořádání je podstatně kratší při dobře reprodukovatelných podmínkách.

V plošných technikách se tradičně používá polyakrylamidový nebo agarozový gel. Má menší velikost pórů a je proto vhodný zejména pro separaci proteinů. Pro separaci DNA jsou vhodné gely s většími póry. Tato média v plošných metodách neplní jen funkci separační. Slouží zároveň jako antikonvektivní médium a zajišťují správný tvar gelového lože. Tím je vlastně dána jistá minimální koncentrace i složení vlastního gelu. V úzké kapiláře však nejsou na konzistenci gelu kladeny takové požadavky, což dovoluje volit složení v širších mezích koncentrace jednotlivých

komponent. Vhodnější je označovat gely v CGE jako „polymerní síť“. Polymery v CGE mohou být kovalentně zesíťované (např. bis-polyakrylamid), zesíťované vodíkovými vazbami (např. agaróza) nebo může jít o roztoky lineárních polymerních molekul (např. polyakrylamid, methylcelulóza). Ačkoliv struktura zesíťovaného gelu a lineární methylcelulózy je naprosto odlišná, separační mechanismus je stejný. Potenciální nevýhodou zesíťovaných gelů je jejich rigidní povaha. Díky tomu není možné používat hydrodynamické dávkování vzorku.

Lineární polymery se vyznačují oproti zesíťovaným řadou výhod. Jelikož jde o polymerní roztoky, jsou mnohem flexibilnější, a proto s nimi lze pracovat mnoha způsoby. Jak lineární, tak i polymerní gely mohou být polymerizovány přímo v kapiláře, ale není to nezbytně nutné. Hotový polymer může být rozpuštěn ve vhodném pufru a hydrodynamicky zaveden do kapiláry. Pro polyakrylamid lze použít široké rozmezí koncentrací (od méně než 1% do více než 20%). Obecně platí, že koncentrace polymeru je nepřímoúměrná velikosti analyzovaných molekul.

Pro maloviskózní polymerní roztoky může být použito hydrodynamické dávkování a mohou být opakovaně naplněny do kapiláry (podle koncentrace a viskozity). Roztoky polymerů jsou rovněž méně náchylné k tvorbě bublin a dalším negativním vlivům.

Rozlišení a účinnost CGE je definováno stejně jako u CZE (v obou případech jde o zónové techniky).

3.5.5. Kapilární izoelektrická fokusace (CIEF)

Kapilární izoelektrická fokusace je další vysoce účinnou elektroforetickou technikou, která je využívána k separaci látek amfolytického charakteru, např. peptidů a proteinů, aminokyselin a různých léčiv, na základě rozdílných hodnot jejich izoelektrického bodu, pI. Metoda CIEF je schopna separovat proteiny, jejichž pI se liší již o 0,005 logaritmické jednotky pH.

U CIEF je potřeba vytvořit v kapiláře gradient pH. Toho lze dosáhnout pomocí amfolytů. Amfolyty jsou molekuly obsahující ve své struktuře řadu amfolytických skupin o různých hodnotách pI. To dovoluje dosáhnout širokého rozmezí pH v kapiláře. V elektrickém poli tak mohou vytvořit požadovaný gradient pH (př. pH 3 –

9), který je uspořádán tak, že alkalická oblast pH je na straně katody a kyselá oblast pH je u anody. Čím větší je počet amfolytů v roztoku, tím jemnější je gradient pH.

Vzorek je aplikován do kapiláry společně s amfolytem. Z hlediska meze detekce je to výhodné, protože je kapilára před zahájením experimentu celá naplněna vzorkem a na konci separace je prakticky celé množství vzorku nakoncentrováno v úzké zóně. Složky vzorku amfolytické povahy migrují v gradientu pH stabilizovaném amfolytem do místa, jehož pH odpovídá hodnotě pI analytu. Zde analyt ztrácí svůj náboj a dále nemigruje. Tento proces je znám jako **fokusace**. Jakékoliv rozšíření zóny vzorku je dynamicky eliminováno stále existujícím pH gradientem. Potencionálním nebezpečím je přílišné zakoncentrování vzorku a následná precipitace analytu v kapiláře.

Pro šířku zóny platí vztah:

$$\sigma = \sqrt{\left[\frac{D}{(d\mu/dpH)(dpH/dx)} \right]},$$

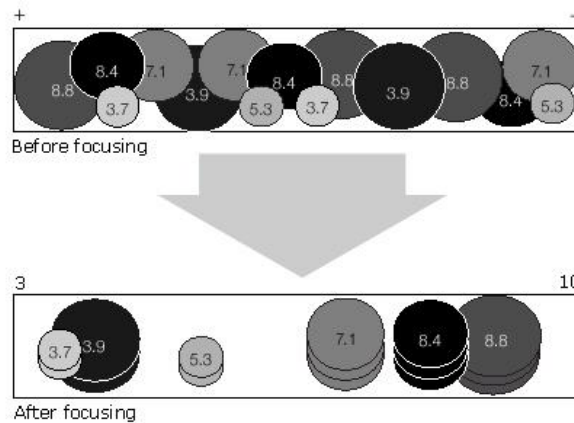
kde D je difúzní koeficient ($\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$),

μ je elektroforetická mobilita proteinu,

dpH/dx je gradient pH v zóně,

$d\mu/dpH$ je změna mobility v pI (závisí na náboji proteinu blízko jeho pI).

Ukončení fokusace je indikováno změnami procházejícího proudu. Vzniká ustálený stav, v němž molekuly vzorku zůstávají na svých místech podle hodnot pI. V izoelektrickém bodě nejsou nabitě a hodnoty proudu klesají k nule. Amfolyt i se zónami vzorku je tlačěn do detektoru některou z mnoha technik. Nejčastěji vnějším tlakem (popř. vakuem) nebo elektroforetickou elucí. Při elektroforetické eluci je po ukončení fokusace anodický (kyselý) elektrolyt zaměněn za zásaditý roztok nebo naopak. Pak se do kapiláry vloží elektrické pole, tím dojde ke zrušení pH gradientu a migrace analytů se ukončí. Analyty se stávají nabitě a migrují z kapiláry. Při konstantním napětí vzrůstá během separace elektrický proud.



Obr. 13: Princip kapilární izoelektrické fokusace.

Pokud má být dosaženo co nejefektivnější CIEF, musí se potlačit EOF a ostatní konvektivní síly. EOF by během fokusace vymýval amfolyty (a samozřejmě i vzorek) z kapiláry. Z tohoto důvodu se stěny kapiláry potahují např. methylcelulózou nebo polyakrylamidem. Pokrytí kapiláry pomáhá nejen snížit EOF, ale současně také potlačuje adsorpci proteinů a polypeptidů na stěny kapiláry.

Rozlišovací schopnost, ΔpI , v izoelektrické fokusaci je popsána rovnicí:

$$\Delta pI = 3 \cdot \sqrt{\frac{D \cdot (dpH / dx)}{E(d\mu / dpH)'}}$$

kde D je difúzní koeficient ($\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$),

E je intenzita elektrického pole ($\text{V} \cdot \text{cm}^{-1}$),

μ je elektroforetická mobilita proteinu,

dpH/dx je gradient pH v zóně,

$d\mu/dpH$ je změna mobility v pI (závisí na náboji proteinu blízko jeho pI).

Z rovnice vyplývá, že vysokého rozlišení se dosáhne aplikací velké intenzity elektrického pole, velké změny mobility při dosažení izoelektrického bodu a malé změny pH. Rozlišovací schopnost lze vypočítat už při pH 0,02.

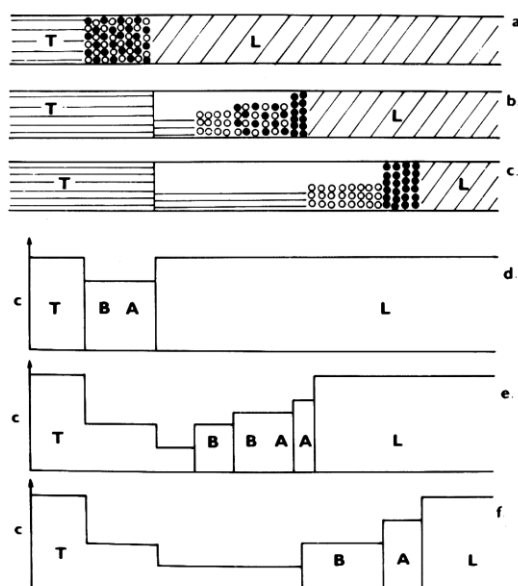
Techniky CIEF se běžně využívá k charakterizaci proteinů jako mechanismu stanovení jejich izoelektrického bodu. Metoda je rovněž velmi vhodná pro analýzu zředěných biologických roztoků.¹⁵

3.5.6. Kapilární izotachoforéza (CITP)

Kapilární izotachoforéza bývá označována jako technika pohyblivého rozhraní. ITP využívá systému dvou pufrů pro vytvoření ustáleného stavu, kdy se všechny zóny pohybují stejnou rychlostí a stejným směrem.

Před rokem 1981 byla izotachoforéza nejvíce používanou instrumentální kapilární elektroforetickou technikou, přestože byly kapiláry oproti dnešním standardům poměrně široké (250 – 500 μm).

Podobně jako při izoelektrické fokusaci je i při kapilární izotachoforéze podmínkou separace nulový EOF. Kapilára je naplněna **vedoucím elektrolytem**, který má největší mobilitu ze všech ostatních složek analyzovaného vzorku. Potom je do kapiláry aplikován samotný vzorek. **Terminální elektrolyt** s nejnižší iontovou mobilitou je do kapiláry aplikován z rezervoáru na opačném konci kapiláry. K separaci dochází v oblasti vymezené vedoucím a terminálním elektrolytem.



Obr. 14: Kapilární izotachoforéza.

V jednom izotachoforetickém experimentu tak mohou být analyzovány pouze kationty nebo jen anionty. Například pro aniontovou analýzu musí být pufr vybrán tak, aby vedoucí elektrolyt obsahoval aniont s efektivní pohyblivostí vyšší než

všechny anionty obsažené ve vzorku. Podobně koncový elektrolyt musí obsahovat aniont, jehož pohyblivost je nižší než pohyblivost všech ostatních aniontů v roztoku. Vložením elektrického pole na takový systém se všechny anionty začnou pohybovat k anodě. Po určité době dojde k vytvoření ustáleného stavu, v němž každý aniont vytvoří diskrétní, ostře ohraničenou zónu, pohybující se stejnou rychlostí jako vedoucí aniont. V ustáleném stavu obsahuje každá zóna pouze ionty příslušné složky, které vedou elektrický proud a nezbytný protiion R^+ bez jiných elektrolytů. Mezi zónami se tedy nevyskytuje žádná další složka schopná vést elektrický proud. Proto se všechny zóny musí pohybovat stejnou rychlostí, jinak by došlo k přetržení sloupce kapaliny v separační kapiláře.

Popsaný ustálený stav se může vytvořit pouze pokud je v každé zóně jiná intenzita elektrického pole. Tato veličina se automaticky upraví tak, aby rychlost zón byla konstantní. To znamená, že nejnižší intenzita elektrického pole bude v zóně nejpohyblivějšího iontu a naopak nejpomalejšímu iontu přísluší nejvyšší intenzita tak, aby rychlost všech zón byla stejná. Intenzita elektrického pole zůstává konstantní v celé délce zóny a mění se skokem vždy na rozhraní sousedních zón. Diskontinuita elektrického pole je dalším podstatným rozdílem mezi izotachoforézou a elektroforézou.

Fenomén ostrých rozhraní mezi zónami se projeví pokud některý ion opustí svou zónu a dostane se do zóny sousední. Tam je však jiná intenzita elektrického pole, rychlost iontu se změní a okamžitě se vrátí do své zóny. Tomuto fenoménu se říká samozaostřující (fokusační) efekt rozhraní mezi jednotlivými zónami.

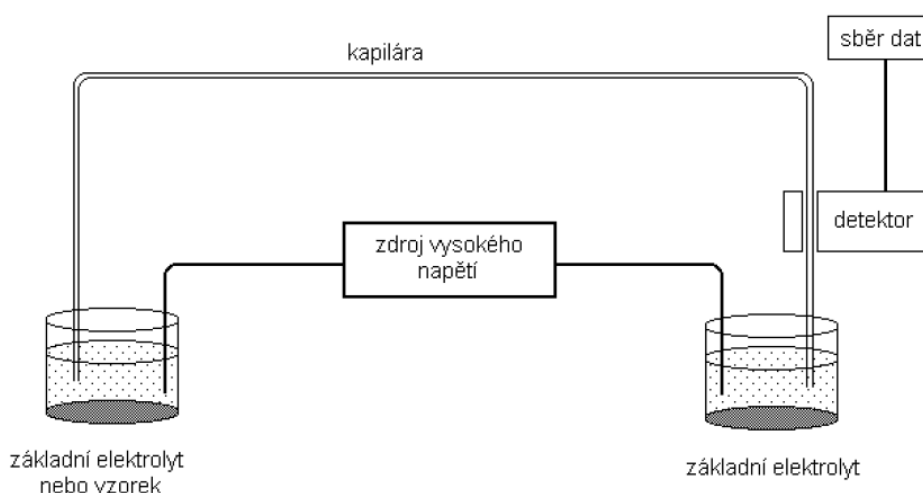
Dalším zajímavým rysem CITP je konstantní koncentrace v každé zóně, daná koncentrací vedoucího elektrolytu. CITP je obvykle prováděna za konstantního proudu. Musí tedy existovat konstantní poměr mezi koncentrací a pohyblivostí iontů v každé zóně. Zóny, které jsou méně koncentrované než zóna vedoucího elektrolytu, jsou zúženy tak, aby se koncentrace iontu zvýšila na potřebnou hodnotu. Koncentrovanější zóny jsou naopak protaženy (zředěny), aby se dosáhlo požadované koncentrace.

Skutečný ITP ustálený stav většinou nelze v praxi dosáhnout, jelikož se operační módy vzájemně prolínají. Výhodou ITP však je možnost dávkovat značné objemy vzorku (30 – 50% objemu kapiláry) při zachování dobré kvality separace.

Díky tomu lze při ITP dosáhnout poměrně dobrých detekčních limitů i s poměrně málo citlivým detektory. Největším oříškem je optimalizace systému pufrů jednak z hlediska vedoucího a koncového elektrolytu, jednak z hlediska žádaného pH.

Zajímavostí je příprava velmi čistých chemikálií pomocí CITP. Separovaná látka tvoří zónu o konstantní koncentraci, z níž vymigrují prakticky všechny složky, které mají jakoukoli odlišnou efektivní pohyblivost (tedy i neutrální molekuly!). Na konci experimentu tak dostáváme dokonale čistou zónu požadované látky. Tento způsob čištění je poměrně nákladný a dovoluje čistit pouze malá množství látek. Získaný preparát však představuje absolutně čistou substanci. Látky s takovou čistotou se označují jako „izoforeticky čisté“. Přístroje pro preparativní ITP jsou již komerčně dodávány.

3.6. Instrumentace v CE, provedení analýzy



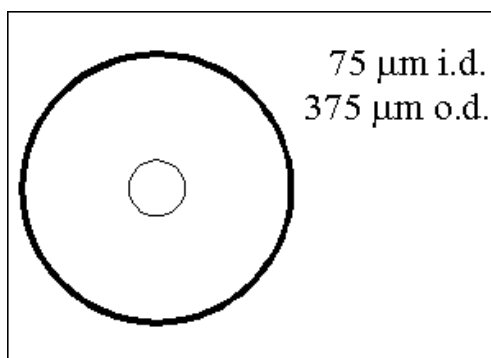
Obr. 15: Zjednodušené chéma kapilární elektroforézy.

3.6.1. Kapilára

Nejčastěji používaným materiálem jsou kapiláry z křemenného skla. Je to hlavně z důvodu, že je tento materiál chemicky i elektricky inertní, UV transparentní,

pružný a levný. Tavený křemen není ale tak silný, proto se pokrývá vrstvičkou polyimidu pro větší pevnost a snadnější zacházení. Jelikož polyimid není UV transparentní, musí se vytvořit malé detekční okénko, kde se vrstva polymeru odstraní. Dalším materiálem, ze kterého se kapiláry mohou vyrobit, je např. teflon. Teflon je UV transparentní, ale sám o sobě není nabitý. Jakákoliv významná adsorpce iontů na povrch kapiláry vede ke zvětšení EOF.

Vnitřní průměr kapilár se pohybuje v rozmezí 10 – 100 μm . Nejčastěji se používají kapiláry s vnitřním průměrem 25 – 75 μm s vnějším průměrem 350 – 400 μm . Délka kapiláry je v rozmezí od 10 cm do 100 cm. Čím je kapilára kratší, tím více se zkracuje doba analýz. Obvyklá délka je 50 – 75 cm.



Obr. 16: Křemenná kapilára s vnější vrstvou polyimidu.

3.6.2. Kondicionace kapiláry

Kondicionace povrchu kapiláry je velice důležitá k dosažení dobré reprodukovatelnosti analýz. Největší reprodukovatelnosti lze dosáhnout kondicionací povrchu kapiláry samotným pufrem používaným k separaci. Kondicionaci je potřeba provádět i mezi analýzami kvůli možné adsorpci vzorku na stěny a kvůli změnám EOF.

Obvykle se ke kondicionaci používá hydroxid sodný. Má schopnost odstranit adsorbenty a deprotonovat silanolové skupiny.

3.6.3. Termostatování kapiláry

Kontrola teploty v kapiláře je dalším důležitým aspektem optimalizace a pokud je tato kontrola efektivní, přispívá k větší reprodukovatelnosti metody. Regulace teploty s přesností $\pm 0,1$ °C je nezbytná, jelikož viskozita je silně závislá na teplotě. Při změně teploty tudíž dochází ke změnám dávkování vzorku a migračního času. Celý systém by měl být izolován od změn okolní teploty. Pro termostatování systému se s vysokou účinností používá proudění plynu nebo kapaliny.

3.6.4. Faktory ovlivňující reproduktivitu

Faktor	Příčina/Efekt	Řešení
Změna teploty	<ul style="list-style-type: none">• Změna viskozity a EOF	<ul style="list-style-type: none">• Termostatovat kapiláru
Adsorpce na stěny kapiláry	<ul style="list-style-type: none">• Změny EOF• Způsobeno pufrem, přídavnými látkami, adsorpcí vzorku	<ul style="list-style-type: none">• Kondicionovat kapiláru a nastavit dostatečnou dobu ekvilibrace
Hystereze náboje stěny kapiláry	<ul style="list-style-type: none">• Způsobeno kondicionací kapiláry při vysokém/nízkém pH a použitím nízkého/vysokého pH pufru při separaci	<ul style="list-style-type: none">• Vyhnout se větším diferencím pH• Dostatečný čas na ekvilibraci
Změny ve složení pufru	<ul style="list-style-type: none">• Změny pH v důsledku elektrolýzy• odpaření pufru• Odpad z kondicionace zanesený do outlet rezervoáru• Zanesení NaOH z kondicionační vialky do vialky pufru	<ul style="list-style-type: none">• Vyměnit pufr• Přikrýt vialku s pufrem a chladit karusel• Použít separační rezervoár ke sběru vodných roztoků• Nejprve ponořit kapiláru do separačního pufru nebo do vialky s vodou
Různá výška inlet/outlet	<ul style="list-style-type: none">• Nereprodukovatelný laminární tok	<ul style="list-style-type: none">• Stejná hladina v rezervoárech
Různý obsah křemičitanových skupin	<ul style="list-style-type: none">• Různý náboj na stěnách a změny v EOF	<ul style="list-style-type: none">• Měřit EOF a normalizovat, je-li potřeba
Změny v aplikovaném napětí	<ul style="list-style-type: none">• Proporcionální změny v migračním čase	<ul style="list-style-type: none">• Použít lepší zdroj energie

Tab. 4: Faktory ovlivňující reproduktivitu.

3.6.5. Detektory

Detektory jsou důležitým článkem k tomu, abychom mohli pozorovat, jak se jednotlivé analyty zvolenou metodou separují. Spousta metod detekce analytů v CE je velmi podobná těm, které se používají v chromatografii, jako je kapalinová chromatografie.

Metoda	Hmotnostní detekční limit (mol)	Koncentrační detekční limit (M)	Výhody/Nevýhody
UV-Vis	$10^{-13} - 10^{-16}$	$10^{-5} - 10^{-8}$	<ul style="list-style-type: none"> • Univerzální • DAD – spektrální informace
Fluorescence	$10^{-15} - 10^{-17}$	$10^{-7} - 10^{-9}$	<ul style="list-style-type: none"> • Citlivá • Obvykle vyžaduje derivatizaci
Laserem indukovaná fluorescence	$10^{-18} - 10^{-20}$	$10^{-14} - 10^{-16}$	<ul style="list-style-type: none"> • Vysoce citlivá • Obvykle vyžaduje derivatizaci • Drahá
Amperometrie	$10^{-18} - 10^{-19}$	$10^{-10} - 10^{-11}$	<ul style="list-style-type: none"> • Citlivá • Selektivní, ale použitelná pouze pro elektroaktivní analyty • Požaduje speciální elektronické a kapilární modifikace
Konduktivita	$10^{-15} - 10^{-16}$	$10^{-7} - 10^{-8}$	<ul style="list-style-type: none"> • Univerzální • Požaduje speciální elektronické a kapilární modifikace
Hmotnostní spektrometrie	$10^{-16} - 10^{-17}$	$10^{-8} - 10^{-9}$	<ul style="list-style-type: none"> • Citlivá • Poskytuje strukturální informace
Nepřímé UV, fluorescence, amperometrie	10 – 100 méně než u přímé metody		<ul style="list-style-type: none"> • Univerzální • Menší citlivost než ostatní metody

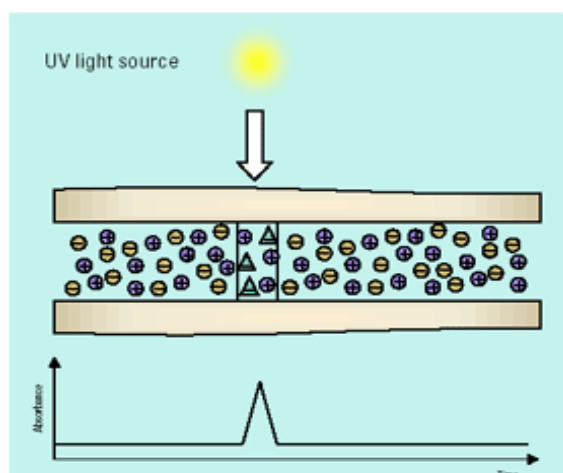
Tab. 5: Metody detekce.

UV-Vis absorpce patří mezi nejběžněji používané metody detekce díky její jednoduchosti použití a široké škále analytů, které mohou být pomocí UV-Vis detekovány. UV-Vis je také hojně používanou metodou detekce u dalších chromatografických analýz a může být využita kvantitativně.

Jestliže se pro separaci zvolí kapilára z křemenného skla, je možné detekovat látky až do vlnové délky 200 nm. V polyimidové ochranné vrstvě se vypálí okénko, kterým pak UV světlo prochází a je absorbováno zkoumanými analyty. Toto uspořádání je velmi účinné, detekční cela je v podstatě součástí kapiláry a odpadá tak přenos mobilní fáze do externí průtokové cely, jak je to běžné u LC detektorů.

Jednou významnější spornou otázkou použití kapilár pro detekční celu u CE je její velmi úzký průměr. Optický paprsek musí být proto směřován velice pevně, aby se dosáhlo nejlepší citlivosti. Tím, že je kapilára velmi úzká, je dráha světla velmi krátká, a to může vést k nižší citlivosti některých analytů.

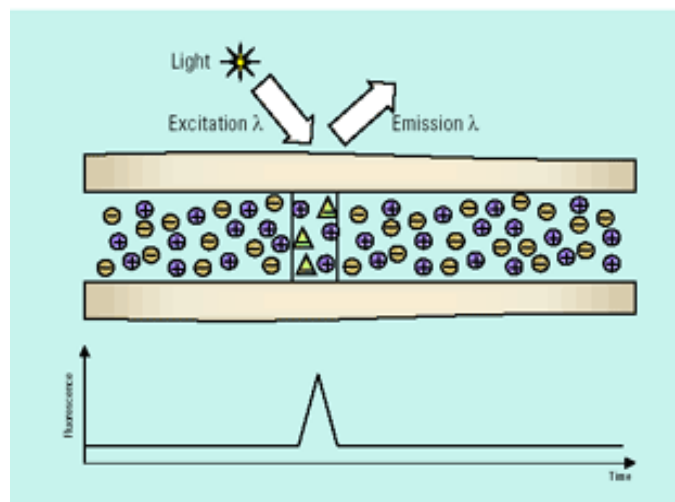
UV je nejvíce senzitivní při nízkých vlnových délkách.



Obr. 17: Princip UV detekce.

Analyty při průchodu detekčním okénkem absorbují UV záření, intenzita světelného paprsku poklesne. To se projeví jako signál. Koncentrace vzorku procházející detektorem je úměrná poklesu signálu. Tohoto poznatku se využívá při kvantitativním stanovení zkoumaných látek.

Některé molekuly se nedají stanovit UV detekcí. V jejich struktuře je nedostatek chromoforů, např. uhlovodíky, peptidy. K jejich detekci se používají alternativní metody. Jednou z nich je fluorescence. Fluorescenční detektory měří schopnost absorbovat a vydávat světlo při určité vlnové délce. Každá látka může charakteristicky fluoreskovat. Zdroj excitace prochází průtokovou celou do fotodetektoru. Měří se vlnová délka emitované světla. Fluorescenční detektory se využívají hlavně při analýze látek přítomných ve vzorku ve velmi nízké koncentraci.

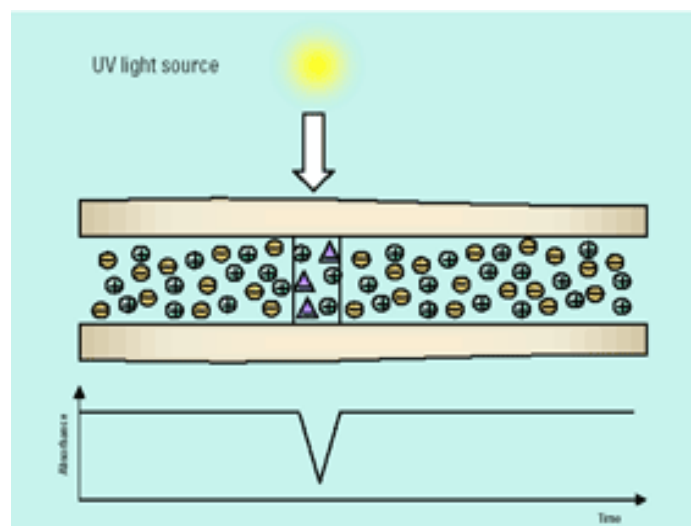


Obr. 18: Princip fluorescence.

Pro stopovou analýzu se využívá hlavně laserem indukovaná fluorescenční detekce.¹⁶ Speciální experimentální uspořádání umožňuje prosvěcovat kapiláru axiálně (ve směru podélné osy) na optické dráze až několik cm. Limity detekce se ve speciálních případech pohybují v rozmezí až 10^{-15} molů a méně. Je velice nutné pečlivě optimalizovat vlnovou délku excitačního a emitovaného záření podle excitačních a emisních spekter fluorescenčního derivátu.

Nevýhodou fluorescenční (ale i absorbanční) detekce je, že ne všechny látky mají chromofory vykazující dostatečnou fluorescenci nebo absorpci v obvyklé UV-Vis oblasti (180 – 800 nm) a jejich přímá detekce tedy není vždy možná. Pak je nutno analyty buď derivatizovat reakcí s látkou, která vhodný chromofor obsahuje nebo použít jiný druh detekce (refraktometrický, amperometrický, vodivostní, MS), případně použít detekci nepřímou.

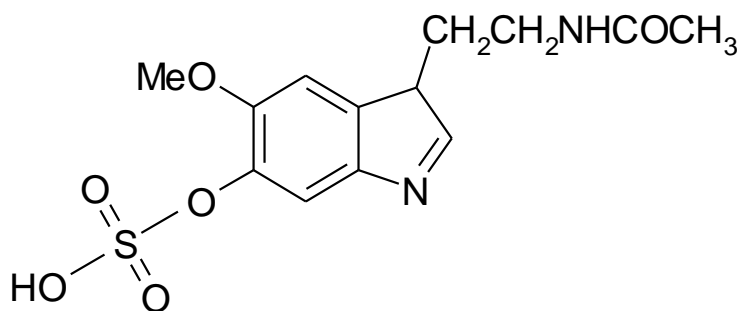
Při nepřímé detekci je v základním elektrolytu přítomna absorbující látka, kterou putující zóna analytu v daném místě „zředí“ a detektor registruje pokles absorbance (negativní pík). Kalibrace s nepřímou detekcí je proto univerzální. I když se takto významně rozšiřuje rozsah látek detekovatelných UV-Vis detektorem, meze detekce jsou zpravidla o několik řádu horší. Metoda je náročná na volbu vhodného absorbujícího iontu.



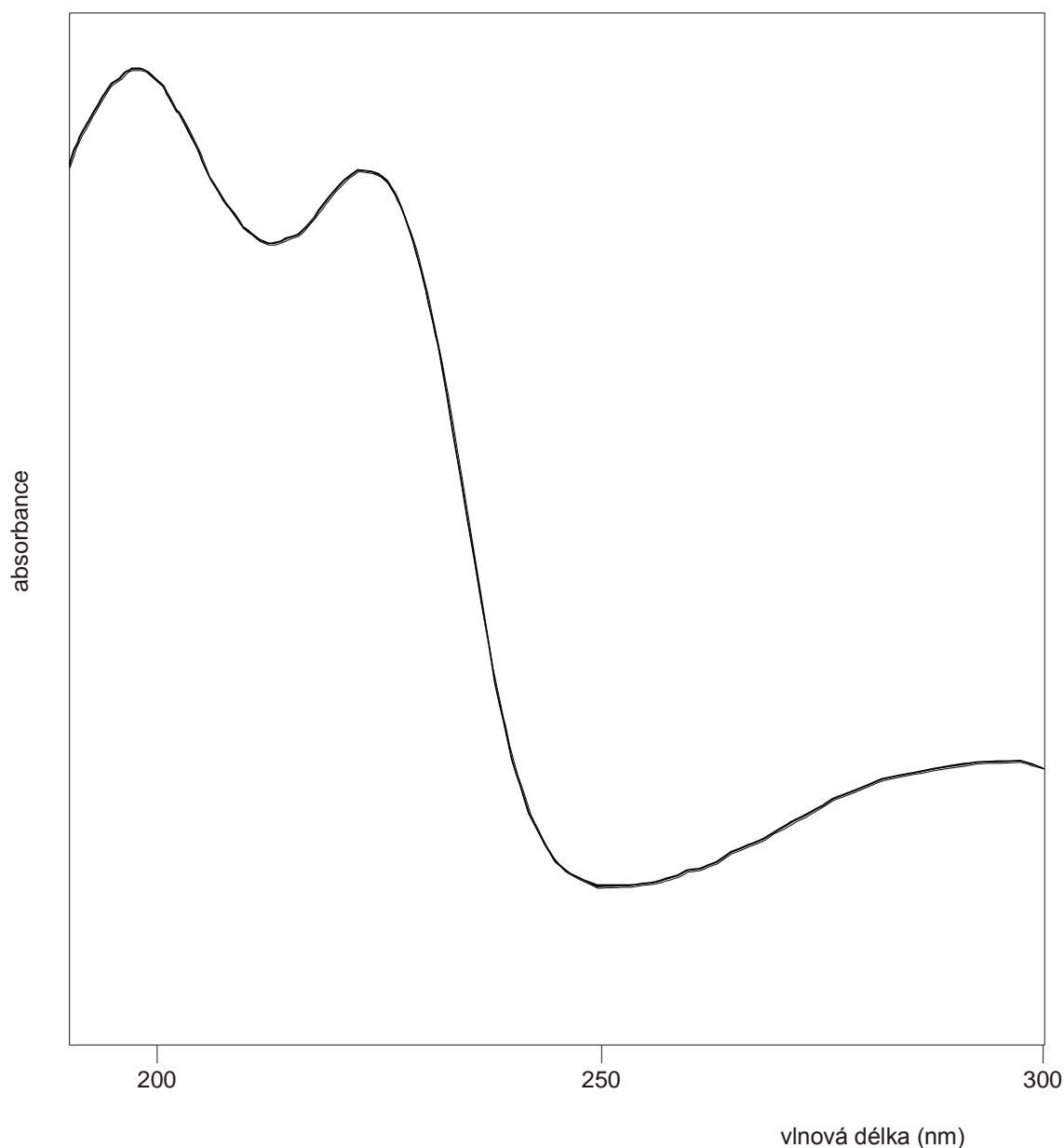
Obr. 19: Zobrazení nepřímé UV detekce.

4. 6-sulfatoxymelatonin (SaMT)

Sulfatoxymelatonin je ester kyseliny sírové s hydroxymelatoninem. Jeho hodnota pK_a se pohybuje okolo 1 a je plně disociovaný v celé oblasti pH. SaMT absorbuje v oblasti 190 – 240 nm s maximem v 225 nm.



Obr. 20: Strukturní vzorec 6-sulfatoxymelatoninu.



Obr. 21: Absorpční spektrum 6–sulfatoxymelatoninu, $c = 10^{-3}$ mol/l, vodný roztok.

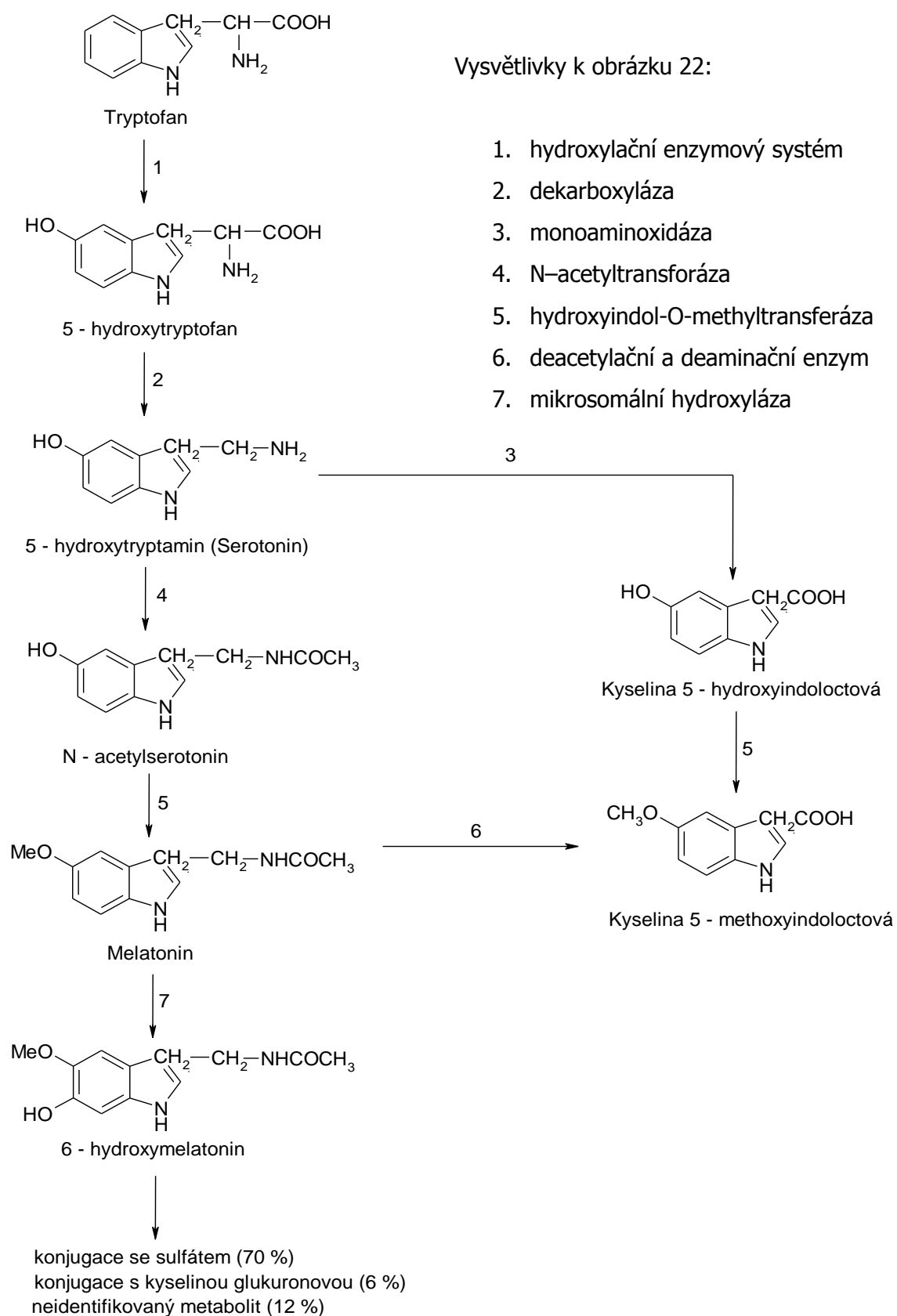
4.1. Biochemie a klinický význam

Sulfatoxymelatonin je součástí metabolické dráhy melatoninu – je konečným katabolickým produktem. Vzhledem k této skutečnosti je o tomto metabolitu známo jen málo klinických souvislostí s metabolickými pochody. Avšak velmi dobře je prozkoumána funkce melatoninu v lidském organismu, jehož hladiny velmi úzce korelují s hladinami sulfatoxymelatoninu.

Melatonin (N-acetyl-5-methoxytryptamin) je hormon produkovaný epifýzou a v organismu má především roli látky řídící biorytmy. Je používán především jako chronobiotikum k synchronizaci cirkadiánních rytmů u slepců nebo při přeletech přes časová pásma¹⁷. Dále pozitivně ovlivňuje proces stárnutí svou schopností zbavovat organismus volných radikálů, stimulací imunitního systému, kardioprotektivními vlastnostmi, podporou reparačních procesů a stabilizací biologických rytmů. Onkostatické účinky jsou důsledkem antioxidačního a imunostimulačního působení a útlumem hormonů podporující nádorový růst¹⁸. Melatonin byl zkoušen i v léčbě nespavosti. Melatonin také nepřímo ovlivňuje reprodukci svým antigonádotropním efektem, tedy inhibicí produkce testosteronu¹⁹.

Melatonin vzniká biosyntetickou cestou z tryptofanu přes 5-hydroxytryptofan a serotonin, který je acetylován enzymem N-acetyltransferázou na N-acetylserotonin, prekursor melatoninu. Sekrece melatoninu je mnohonásobně vyšší v noci než ve dne a vykazuje cirkadiánní rytmus, který je dán rytmem v aktivitě enzymu arylalkylamin N-acetyltransferázy. Celý tento proces je řízen biologickými hodinami uloženými v mozku v suprachiasmatických jádrech. Melatonin může prostřednictvím melatoninových receptorů zpětně ovlivňovat chod biologických hodin. Melatonin, jehož denní produkce je 25 – 30 μm , je téměř z 90 % metabolizován v játrech na hlavní metabolit 6-hydroxymelatonin a částečně na N-acetylserotonin. Oba metabolity jsou z organismu vylučovány močí v podobě sulfátového nebo glukuronidového konjugátu.

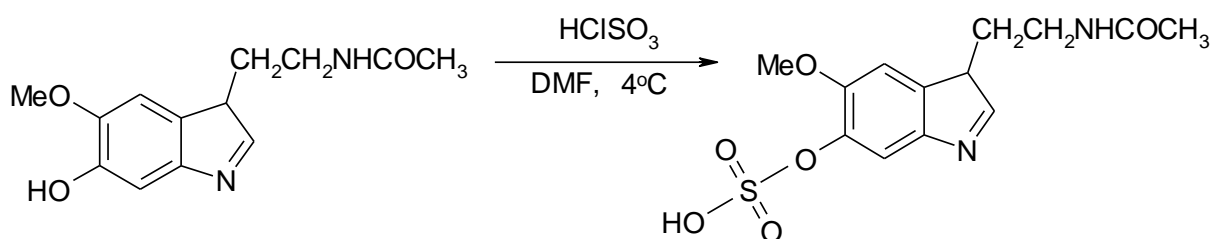
6-hydroxymelatonin vzniká v játrech a je vylučován močí ve formě svých konjugátů – majoritního sulfátu (6-sulfatoxymelatonin) a minoritního glukuronidu. Bylo prokázáno²⁰, že množství 6-sulfatoxymelatoninu (SaMT) v ranní moči dobře koreluje s celkovým množstvím melatoninu vyloučeného za noc epifýzou. Hodnoty stanoveného SaMT tedy lze využít k porovnání vzorků získaných od různých jedinců.



Obr. 22: Metabolická cesta syntézy a odbourávání melatoninu.

4.2. Syntéza 6-sulfatoxymelatoninu

Syntéza SaMT vychází z 6-hydroxymelatoninu^{21,22}, který reaguje v dimethylformamidu (DMF) při 0°C s kyselinou chlorsulfonovou. Vzniklý sulfát je okamžitě izolován sloupcovou chromatografií na florisilu. Při přípravě vlastního SaMT je největším problémem nestabilita produktu za podmínek izolace sloupcovou chromatografií. Byly proto zkoušeny jiné možnosti přípravy sulfátů za použití mírnějších činidel, např. komplexů oxidu sírového s pyridinem nebo triethylaminem²³.



Obr. 23: Syntéza 6-sulfatoxymelatoninu.

4.3. Metody stanovení

Stanovení SaMT v moči jsou popsána především metodami imunologickými (nejčastěji RIA, např.²⁴⁻²⁶, EIA²⁷), ve výjimečných případech chromatografickými (HPLC²⁸, GC-MS^{29,30}) po předchozí dekonjugaci. RIA je nejrychlejší a nejjednodušší, ale nejméně selektivní z důvodu zkřížené reaktivity s jinými strukturně podobnými látkami. Také finanční náročnost této techniky je nezanedbatelná. Jednoznačná přednost je jí přisuzována nespíš pro možnost přímého stanovení sulfátu bez enzymové hydrolýzy. Dosud není v literatuře popsáno přímé stanovení SaMT pomocí CE.

5. Experimentální část

5.1. Chemikálie

Standard 6-sulfatoxymelatoninu byl syntetizován na katedře biofyziky a fyzikální chemie (Faf UK, ČR).

Všechny ostatní chemikálie s analytickým stupněm čistoty byly zakoupeny od firmy Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA).

5.2. Přístrojové vybavení

Vlastní experimenty byly prováděny na přístroji P/ACE 5510 ve spojení s detektorem diodového pole DAD (Beckman Instruments, Fullerton, CA, USA). K elektroforetické separaci byla použita nepokrytá fused-silica kapilára (50 μm I.D. x 375 μm O.D.; Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, USA). Efektivní délka kapiláry byla 20 cm, z celkové délky 27 cm. Systém byl temperován na 25 °C.

Standard 6-sulfatoxymelatoninu byl detekován detektorem diodové pole v UV oblasti v rozmezí vlnových délek 190 – 300 nm (detekční okno 100 x 800 μm).

5.3. Podmínky separace

Základní elektrolyt se skládal ze 100 mmol/L fosfátu sodného, pH 2,2. Analýzy byly provedeny při konstantním napětí 10 kV, při intenzitě elektrického pole $E = 370$ V/cm. Nástřik vzorků byl 6 s, což odpovídá 1% délky kapiláry. Vzorky byly injektovány pod mírným tlakem (3,45 kPa).

Na začátku každého pracovního dne byla kapilára promyta deionizovanou vodou, 0,1 mol/L hydroxidem sodným, vodou a pufrem používaným k separaci vždy 5,0 min. Mezi analýzami byla kapilára promyta vodou 1,0 min a pufrem k separaci 2,0 min.

Pufry používané při separaci kapilární elektroforézou byly filtrovány membránovým filtrem s velikostí pórů 0,45 μm (Teknokroma, Barcelona, Spain) a následně 5,0 min sonifikovány v ultrazvukové lázni před analýzou.

5.4. Příprava vzorku

Vzorky byly pro analýzy připravovány rozpuštěním pevného standardu ve vodě. Během experimentální práce byl využíván i postup přípravy zásobního roztoku o určité koncentraci. Podle potřeby byl standard před nástřikem ředěn na příslušnou koncentraci.

6. Výsledky a diskuse

Ze struktury 6-sulfatoxymelatoninu je patrné, že se jedná o polární molekulu. To byl jeden z důvodů, proč byla vybrána kapilární elektroforéza jako separační technika. Hlavním záměrem této práce bylo tedy otestovat možnost stanovení SaMT pomocí kapilární elektroforézy. Snahou bylo optimalizovat podmínky tak, aby bylo možné potvrdit předpoklad způsobilosti metody a možnost aplikovat metodu na stanovení SaMT v biologickém materiálu. V současné době nejsou v literatuře popsány postupy pro přímé stanovení SaMT kapilární elektroforézou.

6.1. Efekt pH pufru

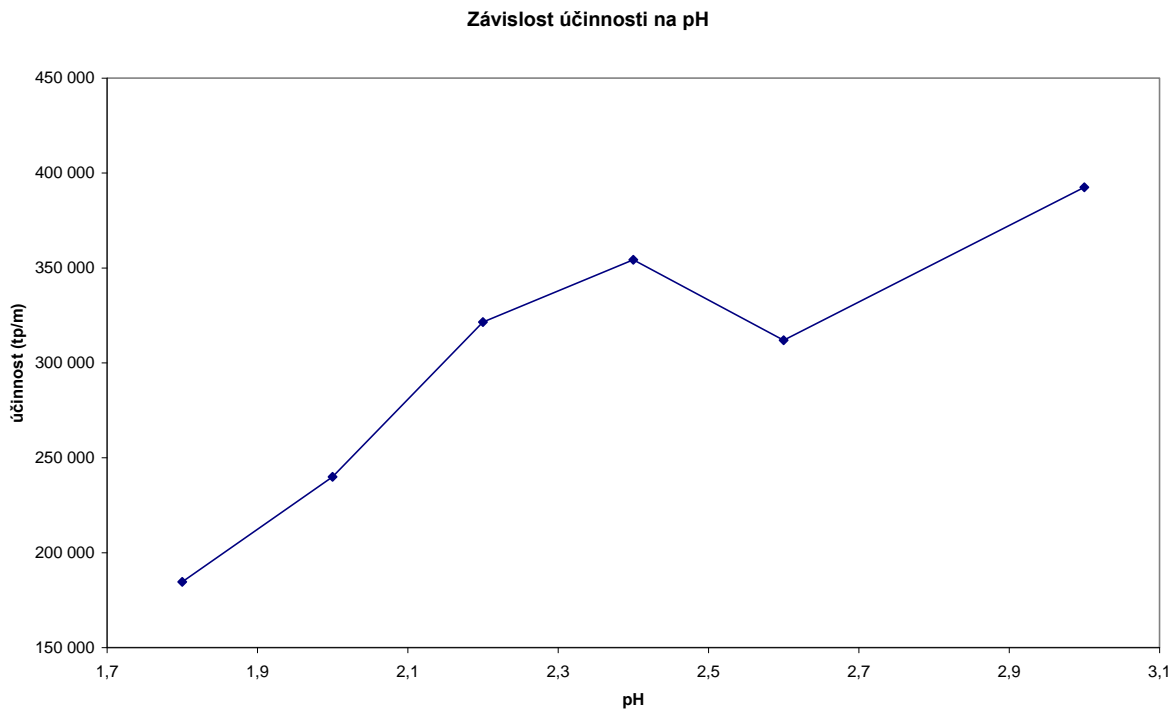
Prvním krokem byla volba vhodného základního elektrolytu pro optimální separaci. Důležitým parametrem při výběru je volba pH.

pH ovlivňuje elektroosmotický tok změnou zeta-potenciálu. Zeta-potenciál roste úměrně s nábojem na povrchu kapiláry. Při vyšších hodnotách pH je většina silanolových skupin vnitřní stěny kapiláry disociována z Si-OH na Si-O⁻, zeta-potenciál roste a tím také elektroosmotický tok. S rostoucím EOF roste i elektroosmotická rychlost. Při nízkých hodnotách pH skupiny Si-OH na povrchu kapiláry z taveného křemene jsou nenabitě a EOF je minimální.

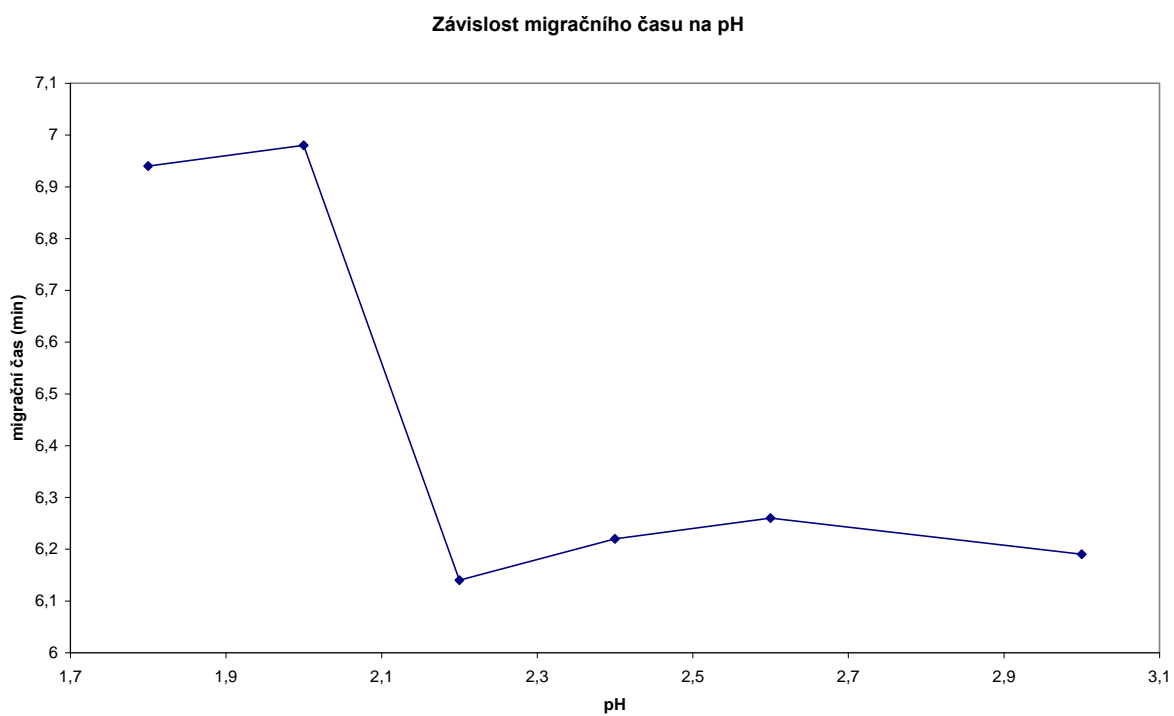
Volbou pH pufru se může také ovlivnit stupeň ionizace rozpuštěných látek a jejich elektroforetická mobilita. Obvykle však vhodnou volbou pH dosáhneme optimální separace.

Byl připraven zásobní roztok kyseliny fosforečné o koncentraci 100 mM. Ze zásobního roztoku byla připravena sestava pufrů v rozmezí pH 1,8 – 3,0. Na požadované hodnoty pH byl zásobní roztok titrován koncentrovaným roztokem hydroxidu sodného. Byl testován vliv pH na separační účinnost a dobu analýzy.

Z obrázku 24 je patrné, že s rostoucím pH rostla účinnost separace. Jelikož hodnoty pH zároveň ovlivňují délku analýzy (obr. 25), byl při výběru pufru zohledněn i tento parametr.



Obr. 24: Vliv pH na separační účinnost.



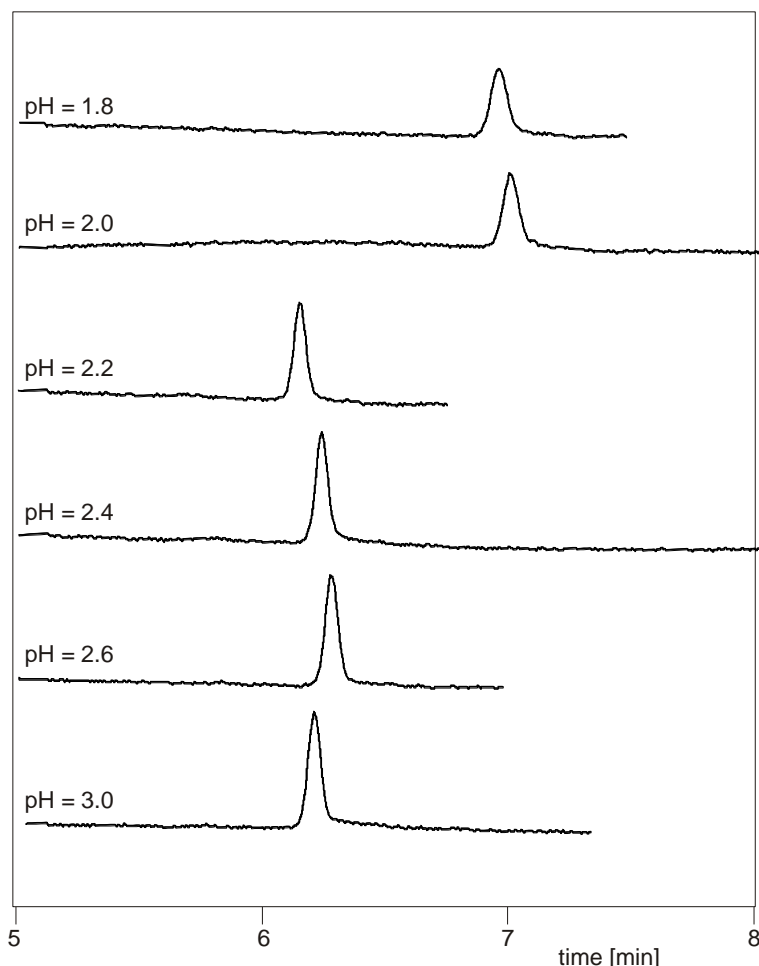
Obr. 25: Vliv pH na délku analýzy.

Optimální hodnota pH byla 2,2. Při tomto pH měl zvolený pufr největší pufrační schopnost (pK_a fosfátu je 2,12). Účinnost separace se pohybovala kolem 300 000 tp/m a délka analýzy byla nejkratší.

Použitím základního elektrolytu v kyselé oblasti pH (<3,0) lze také přispět k vyšší selektivitě analýz, protože většina látek za těchto podmínek je ve formě kationtů a migruje k opačné elektrodě, EOF je minimální a jen málo anionických sloučenin může interferovat se SaMT. V moči je méně silných kyselin, které v tak kyselém pH disociují.

Mobilita se v závislosti na pH neměnila díky přítomnosti silně záporně nabitě sulfatoxy- skupině.

Následující obrázek ukazuje separaci standardu SaMT za různých pH.

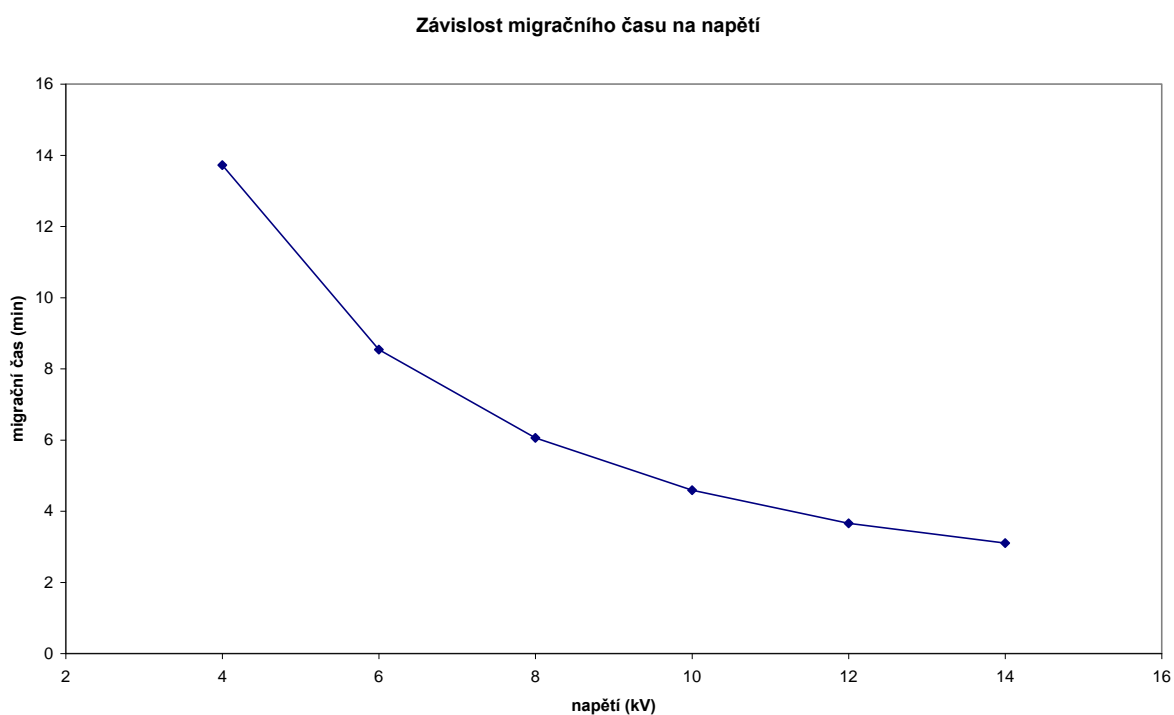


Obr. 26: Elektroforetický záznam separací standardu SaMT při různém pH.

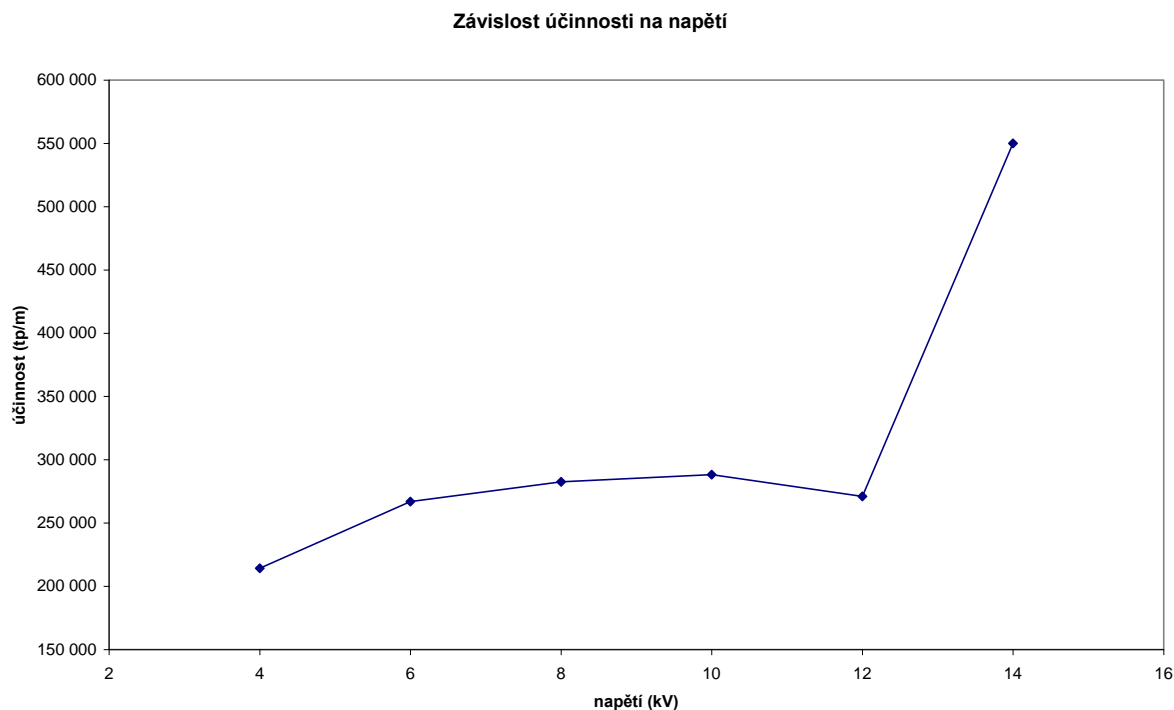
6.2. Volba vhodného napětí

Dalším optimalizačním krokem bylo zkoumání vlivu napětí na separaci SaMT. Změnou napětí lze snadno modifikovat EOF. EOF roste s rostoucím napětím a současně se zkracuje délka analýzy. Při vyšším napětí lze dosáhnout i větší účinnosti.

Napětí bylo testováno v rozmezí 4 – 14 kV. Naměřená data potvrdila uvedené skutečnosti z teorie (obr. 27 a 28).



Obr. 27: Závislost migračního času na napětí.



Obr. 28: Vliv napětí na účinnost.

Z provedených měření bylo patrné, že s rostoucím napětím se zkracovala doba analýzy a zvyšovala se účinnost separace. Při vyšší účinnosti byla stanovena vyšší hodnota detekčního limitu. Tato skutečnost přispívala k dosažení větší citlivosti metody.

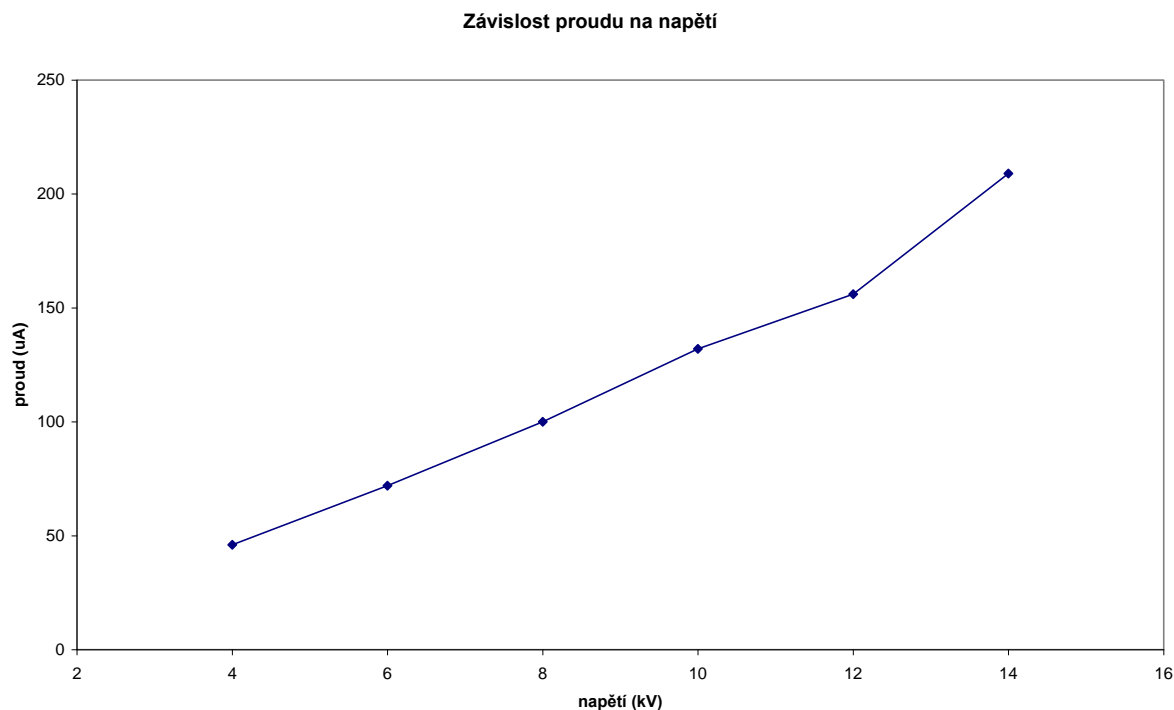
Aplikací vyššího napětí roste protékající proud v systému a roste také zároveň produkce Jouleova tepla. Jestliže není teplo účinně rozptýleno, vzrůstá teplota uvnitř kapiláry, viskozita pufru klesá a tím větší proud systémem protéká. Vzrůst tepla v kapiláře může vést k rozšíření píků, nereprodukovatelným migračním časům a rozkladu vzorku. Nebo také může dojít k varu pufru a tímto k elektrické diskontinuitě a k přerušení elektroforézy.

Abychom dosáhli kratších migračních časů a užších píků, museli jsme provádět analýzy při vyšším napětí. Jak je z obr. 29 patrné, do hodnoty 12 kV je teplo dostatečně odváděno a proud úměrně roste s napětím. Závislost je graficky reprezentována Ohmovým zákonem:

$$U = R \cdot I$$

R je odpor, I je proud a U je napětí.

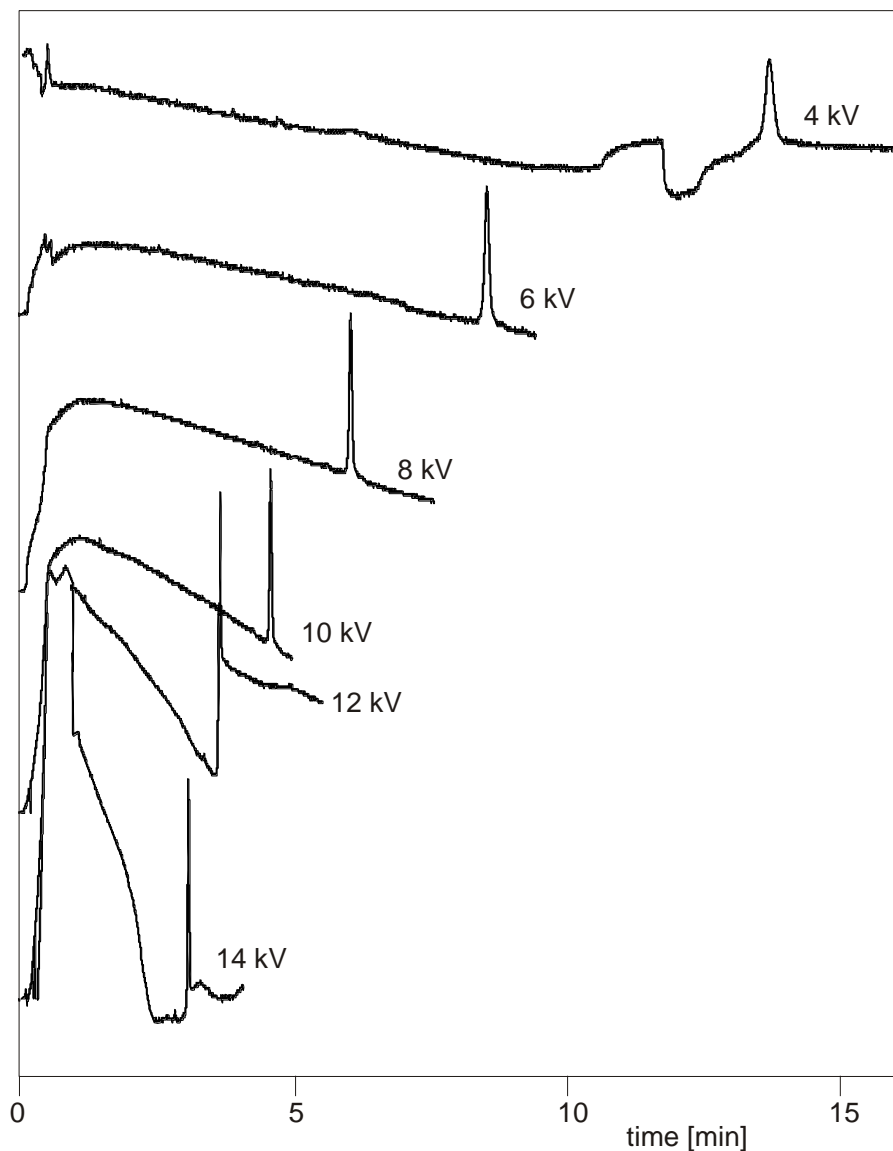
Při aplikaci 14 kV a více kV roste tvorba tepla, v systému klesá odpor a proud začíná nepřímo úměrně vzrůstat. Maximální napětí, které by mělo být zvoleno pro separaci, je v bodě, kdy právě začíná nelineární závislost proudu na napětí.



Obr. 29: Závislost proudu na napětí.

Výsledná hodnota napětí byla nakonec stanovena na 10 kV. Při napětí větším než 10 kV byl systém nestabilní z důvodu už uvedené vysoké generace Jouleova tepla, které již bylo za hranicí schopností stěny kapiláry odvádět teplo. Toto se projevovalo v elektroforeogramu nestabilní základní linií (obr. 30).

Napětí je ovlivňováno také složením pufru, pH a koncentrací. Napětí lze ovlivnit i změnou délky kapiláry nebo jejího vnitřního průměru.

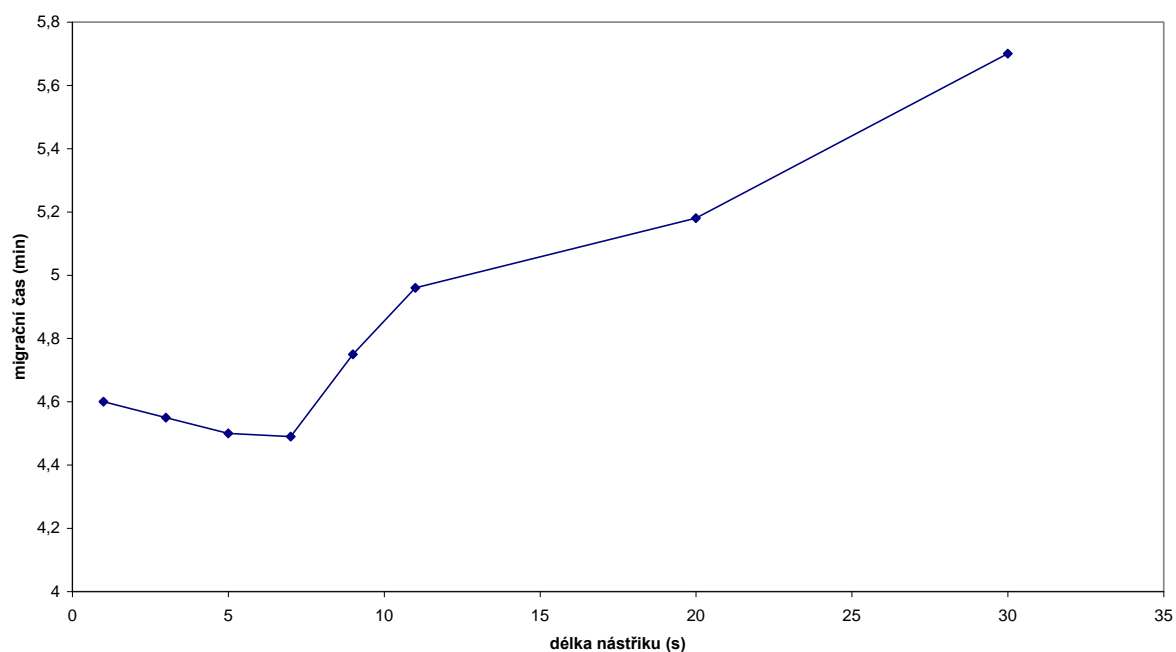


Obr. 30: Elektroforetický záznam vlivu napětí na analýzu SaMT.

6.3. Injekce vzorku

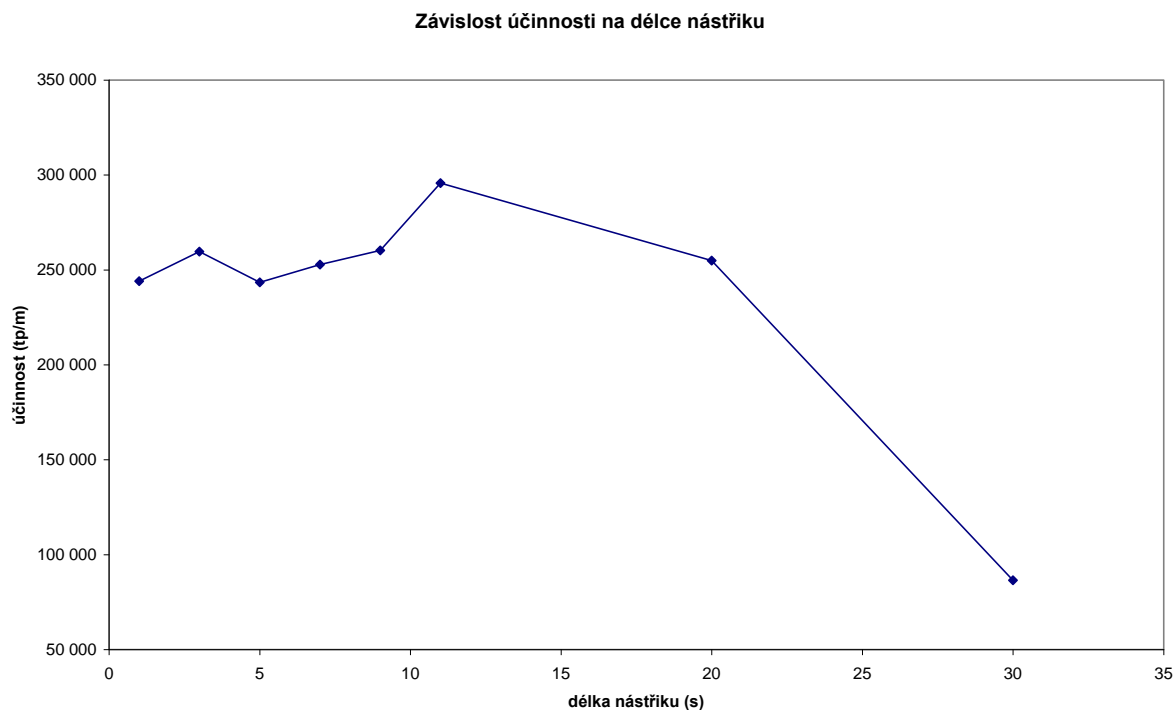
Pro vyvinutí nové metody je důležitým aspektem také optimalizace množství dávkovaného vzorku. Při pH 2,2 a napětí 10 kV byla testována injekce v rozmezí 1 – 30 s, přesněji v 1, 3, 5, 7, 9, 11, 20 a 30 s. Výsledný efekt různé délky nástřiku je zobrazen na obrázku 31 a 32.

Závislost migračního času na délce nástřiku



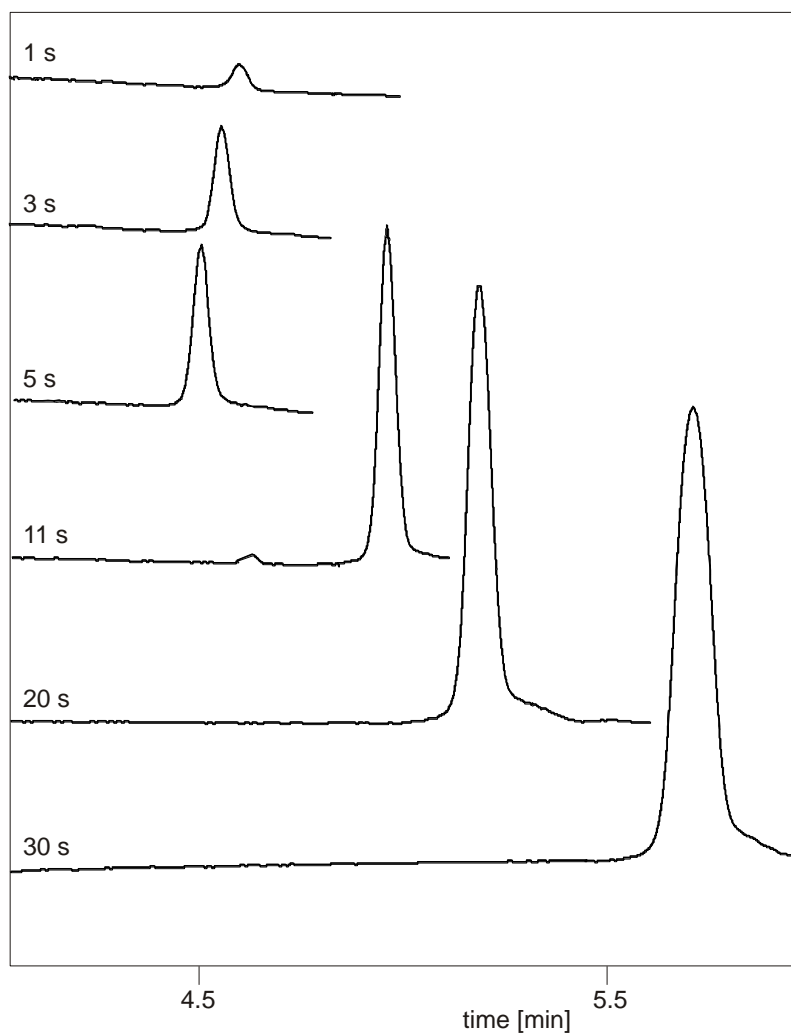
Obr. 31: Vliv injekce na migrační čas.

Při injekci 30 s byl získán limit detekce 100 nmol/L. Separační účinnost výrazně klesala při injekci větší než 20 s (obr. 32 a 33). Tyto výsledky platí pouze pro vodný roztok standardu. Pokud by se metoda aplikovala na reálné vzorky (př. krev, moč, plazma, buněčný obsah), délka injekce by se pohybovala v rozmezí 6 – 10 s.



Obr. 32: Závislost účinnosti na délce nástřiku.

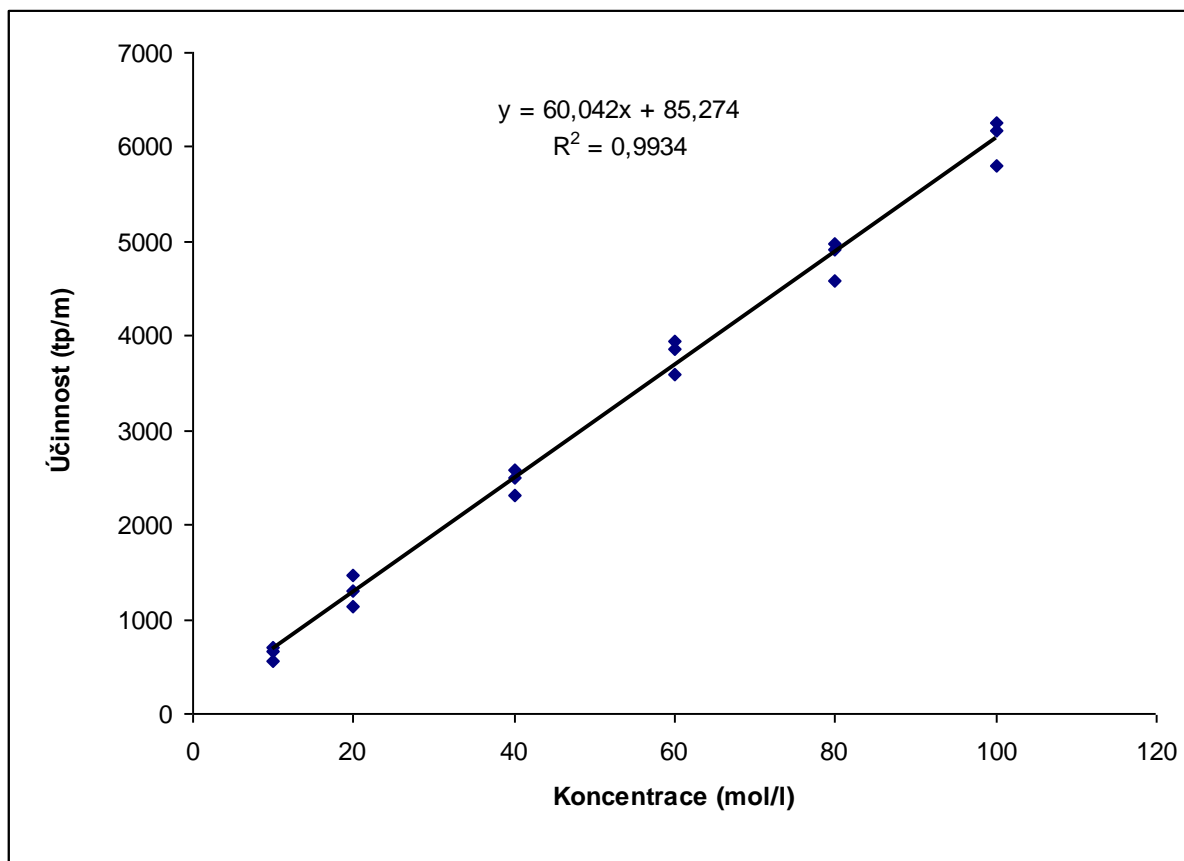
Pro typickou dobu injekce 6 s byl stanoven detekční limit 1,5 $\mu\text{mol/L}$. Při 6-ti sekundovém nástřiku separační účinnost nijak dramaticky neklesala, lze proto očekávat dobré rozlišení separovaných píků.



Obr. 33: Elektroforetický záznam vlivu délky nástřiku na separaci SaMT.

6.4. Kalibrace

Kalibrační závislost byla měřena na roztocích standardu o koncentracích 10^{-4} , $8 \cdot 10^{-5}$, $6 \cdot 10^{-5}$, $4 \cdot 10^{-5}$, $2 \cdot 10^{-5}$, 10^{-5} . Každý vzorek dané koncentrace byl proměřen třikrát. Analýza probíhala za podmínek optimalizovaných v předchozích krocích. Křivka je v dané oblasti lineární (obr. 34).



Obr. 34: Kalibrační křivka.

6.5. Opakovatelnost

Opakovatelnost metody (tab. 6) a reprodukovatelnost migračních časů (tab. 7) byly stanoveny na vzorku spikované moči, desetkrát měřeného v jednom dni (within-day) a dále v následujících deseti dnech (between-day). Byla stanovena reprodukovatelnost migračních časů mezi šesti různými vzorky moči (sample-to-sample). Moč byla spikovaná standardem o koncentraci $3 \cdot 10^{-4}$ mol/L.

	v jednom dni	mezi dny
průměr	2,651	2,718
směrodatná odchylka	0,127	0,157
relativní směrodatná odchylka (%)	4,805	5,767

Tab. 6: Opakovatelnost nástřiku.

	v jednom dni	mezi dny	mezi vzorky
průměr	6,63	6,47	6,46
směrodatná odchylka	0,03	0,18	0,16
relativní směrodatná odchylka (%)	0,39	2,73	2,47

Tab. 7: Reprodukovatelnost migračních časů.

7. Závěr

V předložené práci bylo snahou zjistit možnost stanovení SaMT pomocí elektromigrační techniky...

Experimentálně bylo zjišťováno optimální složení základního elektrolytu, napětí, injekce a ostatní parametry mající vliv na účinnou separaci. Základním elektrolytem byl zvolen fosforečnan sodný o koncentraci 100 mmol/L. Byl zkoumán vliv pH na separační účinnost a délku analýzy v rozmezí od 1,8 do 3,0. Optimální separace bylo dosaženo při hodnotě pH 2,2. Pufř měl při tomto pH nejvyšší pufrační kapacitu (pK_a fosfátu je 2,12). Jelikož molekula SaMT je negativně nabitá díky sulfatoxy- skupině, mobilita SaMT se pak v závislosti na pH nemění a je konstantní. Nízké pH základního elektrolytu přispívá také k vyšší selektivě analýz, většina kationů migruje opačným směrem a je méně anionických sloučenin, které jsou schopny interferovat se SaMT. Napětí bylo testováno v rozmezí od 4 do 14 kV, přičemž optimální hodnota byla 10 kV. Tato hodnota napětí se vyznačovala nejkratším časem analýz a stabilní základní linií. Bylo ověřeno, že doba injekce pro testované vodné roztoky standardu může být až 30 s, při více než 20 s však významně klesá separační účinnost. Limit detekce při nástřiku 30 s byl na hladině 100 nmol/L. Pro reálné vzorky je vhodné rozmezí doby injekce 6 – 10 s. Pro injekci 6 s u reálných vzorků byl stanoven limit detekce 1,5 $\mu\text{mol/L}$.

Cílem dalších experimentů je vyvinout účinnou SPE metodu umožňující prekoncentraci a předčištění vzorků za účelem stanovení submikromolárních hladin SaMT v moči.

V návaznosti na literaturu doposud nejsou popsány účinné postupy pro prekoncentraci a předčištění podobných látek jako je SaMT metodou extrakce na pevných fázích.

8. Literatura

1. B. Gaš, *Vesmír* **80**, (2001/7); 370.
URL: <http://www.vesmir.cz/clanek.php3?CID=4641>
(02/2006)
2. Hjertén, *Chromatogr. Rev.* **9**, (1967); 122.
3. Mikkers, *J. Chromatogr. A* **169**, (1979); 11.
4. J. W. Jorgenson, K. D. Lukacs, *Clin. Chem.* **27**, (1981); 1551.
5. T. Dixon, *Capillary Electrophoresis*, (2003).
URL: http://www.chemsoc.org/exemplarchem/entries/2003/leeds_chromatography/chromatography/home.htm
(01/2006)
6. D. Heiger, *High performance capillary electrophoresis*, Agilent Technologies, ISBN 5968-9963E, (2000).
7. A. Lázníčková, S. Ďoubal, J. Gasparič, M. Dittrich, *Fyzikální chemie pro posluchače farmacie II. díl*, Karolinum, ISBN 80-7184-447-0, (2000).
8. URL: <http://www.ce-resources.com/cecon.html>
(03/2006)
9. S. A. Swedberg, *Anal. Biochem.* **185**, (1990); 51–56.
10. R. Weinberger, I.S. Lurie, *Anal. Chem.* **63**, (1991); 823–827.
11. S. A. Swedberg, *J. Chromatogr.* **503** (1990); 449–452.
12. L. Bartovská, M. Šišková, *Elektronická publikace „Co je co v povrchové a koloidní chemii“*, verze 1.0, (2005).
URL: http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-001/motor/main.obsah.html
(02/2006)
13. URL: <http://www.ceandcec.com/meekc.htm>
(02/2006)
14. URL: <http://www.bergen.org/AAST/projects/Gel/index.html>
(03/2006)
15. T. Wehr, M. Zhu, R. Rodriguez, D. Burke, K. Duncan, *Am. Biotechnol. Lab.* **8** (1990); 22.

16. URL: <http://chemi.muni.cz/~preisler/courses/Lab%20Cv%20CELIF.pdf>
(03/2006)
17. F. Iinuma, K. Hamase, S. Matsubayashi, M. Takahashi, M. Watanabe, K. Zaitso, *J. Chromatogr. A* **835** (1999); 67.
18. R. J. Reiter, Acuna-Castroviejo, D. X. Tan, S. Burkhardt, N. Y. *Ann Acad. Sci.* **939** (2001); 200.
19. J. Lu, Ch. Lau, M. K. Lee, M. Kai, *Anal. Chim. Acta* **455** (2002); 193.
20. C. Bojkowski, J. Arendt, M. C. Shih, S. P. Markey, *Clin. Chem.* **33** (1987); 1343.
21. A. M. Leone, P. L. Francis, B. McKenzie-Gray, *J. Pineal. Res.* **5** (1988); 367.
22. C. A. Street, W. L. Di, J. F. Peniston-Bird, S. Patel, P. Sadler, R. E. Silman, *J. Pineal. Res.* **20** (1996); 98.
23. M. Hamerníková, R. Čáp, H. Staňková, M. Theisinger, O. Koubská, *Chem. Listy* **98** (2004); 668.
24. J. Arendt, *J. Neural. Trans. Suppl.* **21** (1986); 11.
25. R. C. Zimmermann, S. Schroder, S. Baars, M. Schumacher, H. C. Weise, *Fertil. Steril.* **54** (1990); 612.
26. B. Manz, A. Seidel, H. Alexander, L. Vollrath, B. Wagner, G. Zimmermann, *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* **27** (1989); 797.
27. B. Ferrua, R. Massay, *J. Immunoassay.* **6** (1985); 79.
28. S. Harter, S. Morita, K. Bodin, C. Ursing, G. Tybring, L. Bertilsson, *Ther. Drug Monit.* **23** (2001); 282.
29. A. J. Fellenberg, G. Phillipou, R. F. Seamark, *Biomed. Mass. Spectrom.* **7** (1980); 84.
30. I. M. Young, R. M. Leone, R. E. Silman, *Biomed. Mass. Spectrom.* **12** (1985); 319.