

**UNIVERZITA PARDUBICE**  
**FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ**

**Analýza pyrrolizidinových alkaloidů pomocí kapilární zónové  
elektroforézy s prekoncentrací v pokrytých kapilárách**

**Bc. Nikola Kratochvílová**

**Diplomová práce**  
**2023**

**UNIVERSITY OF PARDUBICE  
FACULTY OF CHEMICAL TECHNOLOGY**

**Analysis of pyrrolizidine alkaloids using capillary  
electrophoresis with preconcentration step in coated  
capillaries**

**Bc. Nikola Kratochvílová**

**Thesis**

**2023**

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2022/2023

# ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Bc. Nikola Kratochvílová  
Osobní číslo: C21412  
Studijní program: N0531A130028 Analytická chemie  
Téma práce: Analýza pyrrolizidinových alkaloidů pomocí kapilární elektroforézy s prekoncentrací v pokrytých kapilárách  
Téma práce anglicky: Analysis of pyrrolizidine alkaloids using capillary electrophoresis with pre-concentration step in coated capillaries  
Zadávací katedra: Katedra analytické chemie

## Zásady pro vypracování

1. V literatuře vyhledejte a rešeršně zpracujte publikace týkající se analýzy pyrrolizidinových alkaloidů kapilární elektroforézou.
2. Připravte separační kapiláry chemicky modifikované separační kapiláry s eliminovaným elektroosmotickým tokem, u takto připravených kapilár stanovte reziduální elektroosmózu.
3. Proměřte migrační charakteristiky dostupných pyrrolizidinových alkaloidů v základních elektrolytech bez a s přísádky dodecylsírany sodného, acetonitrilu a metanolu.
4. Experimentálně prostudujte možnosti prekoncentrace ředěných roztoků pyrrolizidinových alkaloidů.
5. Získané výsledky kriticky zhodnoťte a diskutujte.

Rozsah pracovní zprávy:  
Rozsah grafických prací:  
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucího práce.

Vedoucí diplomové práce: **doc. Ing. Petr Česla, Ph.D.**  
Katedra analytické chemie

Konzultant diplomové práce: **Ing. Jana Váňová, Ph.D.**  
Katedra analytické chemie

Datum zadání diplomové práce: **7. února 2023**

Termín odevzdání diplomové práce: **5. května 2023**

Prohlašuji:

Práci s názvem Analýza pyrrolizidinových alkaloidů pomocí kapilární zónové elektroforézy s prekoncentrací v pokrytých kapilárách jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 2. 5. 2023

Bc. Nikola Kratochvílová v. r.

## **Poděkování**

Tímto bych chtěla bych vyjádřit velké poděkování vedoucímu mé diplomové práce, doc. Ing. Petru Česlovi, Ph.D., za jeho cenné rady, odbornou pomoc a ochotu během celého průběhu práce. Dále bych ráda poděkovala své konzultantce, Ing. Janě Váňové, Ph.D., za vstřícnost, trpělivost a užitečné připomínky k experimentálnímu měření.

Ráda bych také poděkovala mým přátelům, spolužákům a rodině za podporu v průběhu celého mého studia.

## **Anotace**

V první části diplomové práce byly připraveny chemicky modifikované separační kapiláry s eliminovaným elektroosmotickým tokem a byla v nich stanovena reziduální elektroosmóza v kyselém i alkalickém elektrolytu. Následně byly experimentálně proměřeny migrační charakteristiky dostupných pyrrolizidinových alkaloidů v základních elektrolytech bez a s přísávkou dodecyl síranu sodného, acetonitrilu a methanolu. Druhá část práce byla zaměřena na možnosti prekoncentrace ředěných pyrrolizidinových alkaloidů v připravených pokrytých i nepokrytých kapilárách.

## **Klíčová slova**

Kapilární zónová elektroforéza, pyrrolizidinové alkaloidy, micelární elektrokinetická chromatografie, metoda nametení, dynamické pH rozhraní, on-line prekoncentrační techniky, pokryté kapiláry

## **Annotation**

In the first part of the thesis the chemically modified separation capillaries with eliminated electroosmotic flow were prepared and the residual electroosmosis in acidic and alkaline electrolyte was determined. Subsequently, the migration characteristics of the available pyrrolizidine alkaloids in background electrolytes without and with the addition of sodium dodecyl sulfate, acetonitrile and methanol were experimentally measured. The second part of the thesis was focused on possibilities of pre-concentration of diluted pyrrolizidine alkaloids in prepared in coated and uncoated capillaries.

## **Key words**

Capillary zone electrophoresis, pyrrolizidine alkaloids, micellar electrokinetic chromatography, sweeping method, dynamic pH junction, on-line pre-concentration techniques, coated capillaries

# Obsah

1	TEORETICKÁ ČÁST .....	21
1.1	Kapilární elektroforéza .....	21
1.2	Historie .....	21
1.2.1	Elektroosmotický tok .....	22
1.2.2	Základní vztahy .....	24
1.3	Instrumentace .....	26
1.3.1	Kapiláry .....	26
1.3.2	Detekce .....	27
1.4	Účinnost separace v kapilární elektroforéze .....	29
1.4.1	Počet teoretických pater .....	29
1.4.2	Rozlišení .....	30
1.4.3	Mez detekce, mez stanovitelnosti .....	30
1.5	Elektromigrační techniky .....	30
1.5.1	Kapilární zónová elektroforéza .....	30
1.5.2	Izoelektrická fokusace .....	31
1.5.3	Micelární elektrokinetická chromatografie .....	31
1.5.4	Izotachoforéza .....	33
1.5.5	Afinitní kapilární elektroforéza .....	34
1.5.6	Kapilární elektrochromatografie .....	34
1.6	Metody používané k zakoncentrování vzorku .....	35
1.6.1	Zakoncentrování vzorku zesílením pole .....	36
1.6.2	Zakoncentrování přechodným pH rozhraním .....	36
1.6.3	Zakoncentrování vzorku z velkého objemu .....	37
1.6.4	Technika nametení .....	37
1.7	Pyrrrolizidinové alkaloidy .....	38
1.7.1	Toxicita pyrrrolizidinových alkaloidů .....	39



1.7.2	Zdroje pyrrolizidinových alkaloidů.....	39
1.7.3	Analýza pyrrolizidinových alkaloidů.....	43
2	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	46
2.1	Chemikálie a pomůcky.....	46
2.2	Použité přístroje a vybavení.....	46
2.3	Příprava roztoků pro pokrytí kapiláry.....	47
2.4	Pokrývání křemenných kapilár polydimethylakrylamidem.....	47
2.5	Příprava základních elektrolytů a dalších roztoků.....	48
2.6	Příprava vzorků.....	48
2.7	Postup analýzy.....	49
3	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	50
3.1	Rychlé a přesné měření elektroosmotického toku v nepokryté a pokryté kapiláře....	50
3.2	Migrační charakteristiky senkirkinu a senecioninu v základních elektrolytech v pokryté kapiláře.....	53
3.3	Prekoncentrace pyrrolizidinových alkaloidů.....	63
3.3.1	Prekoncentrace pomocí micel.....	63
3.3.2	Prekoncentrace pomocí metody pH junction-sweeping.....	67
4	ZÁVĚR.....	70
5	POUŽITÁ LITERATURA.....	71
6	PŘÍLOHA 1.....	78

## Seznam zkratek

APS – peroxodisíran amonný (ammonium peroxodisulfate)

BGE – základní elektrolyt (background electrolyte)

CE – kapilární elektroforéza (capillary electrophoresis)

CMC – kritická micelární koncentrace (critical micelle concentration)

COT – výbor pro toxicitu (committee on toxicity)

CZE – kapilární zónová elektroforéza (capillary zone electrophoresis)

DMA – dimethylakrylamid (dimethylacrylamide)

DTAB – dodecyltrimethylamoniumbromid (dodecyltrimethylammonium bromide)

EDL – detektor elektronového záchytu (electron capture detector)

EOF – elektroosmotický tok (electroosmotic flow)

ESI – ionizace elektrosprejem (electrospray ionization)

FASS – zakoncentrování vzorku zesílením pole (field amplified sample stacking)

FSANZ – Úřad pro kontrolu potravin v Austrálii a na Novém Zélandu (Food Standards Australia New Zealand)

HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie (high performance liquid chromatography)

LC – kapalinová chromatografie (liquid chromatography)

LIF – laserem indukovaná fluorescence (laser-induced fluorescence)

LOD – mez detekce (limit of detection)

LOQ – mez stanovitelnosti (limit of quantification)

LVSS – zakoncentrování vzorku z velkého objemu (large volume sample stacking)

MEKC – micelární elektrokinetická chromatografie (micellar electrokinetic chromatography)

MS – hmotnostní spektrometrie (mass spectrometry)

PA – pyrrolizidinové alkaloidy (pyrrolizidine alkaloids)

PANO – N-oxidy pyrrolizidinových alkaloidů (N-oxides of pyrrolizidine alkaloids)

PTFE – polytetrafluoretylen (polytetrafluoroethylene)

SDS – dodecylsírán sodný (sodium dodecyl sulfate)

SZPI – Státní zemědělská a potravinářská inspekce

TEMED – tetrametyletylendiamin (tetramethylethylenediamine)

tITP – přechodná izotachoforéza (transient isotachopheresis)

UV – ultrafialové záření (ultraviolet light)

VIS – viditelné světlo (visible light)

## Seznam obrázků

Obrázek 1 - Vznik EOF v křemenné kapiláře, převzato a upraveno z [10].	22
Obrázek 2 - Rozdíl mezi laminárním tokem a pístovým tokem EOF a jejich vlivem na tvar píku, nahoře: parabolický profil toku, dole: pístový profil toku, převzato a upraveno z [10].	23
Obrázek 3 - Disociace silanolových skupin, převzato a upraveno z [12].	24
Obrázek 4 - Nákres zařízení pro CE, převzato a upraveno z [14].	26
Obrázek 5 - Micely, převzato z [19].	31
Obrázek 6 - Fyzikální vlastnosti a jejich změna při dosažení kritické micelární koncentrace, převzato a upraveno z [21].	32
Obrázek 7 - Schématický princip MEKC, převzato a upraveno z [25].	33
Obrázek 8 - Možnosti prekoncentrací v kapilární elektroforéze, převzato a upraveno z [30].	35
Obrázek 9 - Chemická struktura pyrrolizidinových alkaloidů, převzato z [41].	38
Obrázek 10 – Senkirkin, převzato z [54].	41
Obrázek 11 – Senecionin, převzato z [58].	42
Obrázek 12 - Princip metody pro rychlé stanovení EOF, převzato a upraveno z [73].	51

## Seznam grafů

Graf 1 – Závislost zdánlivé pohyblivosti senkirkinu na koncentraci SDS v pokryté kapiláře ve 20 mM boritanovém pufru, napětí 25 kV, teplota 25 °C, dávkování tlakem 50 mbar (~5 kPa)/10 s	55
Graf 2 – Ukázka záznamu stanovení pohyblivosti senkirkinu ve 20 mM boritanovém pufru s přídavkem 10 mM SDS a 20 % v/v acetonitrilu v pokryté kapiláře, napětí 25 kV, teplota 25 °C, dávkování tlakem 50 mbar (~5 kPa)/10 s	56
Graf 3 – Ukázka záznamu stanovení pohyblivosti senkirkinu ve 20 mM boritanovém pufru s přídavkem 20 mM SDS a 15 % v/v acetonitrilu v pokryté kapiláře, napětí 25 kV, teplota 25 °C, dávkování tlakem 50 mbar (~5 kPa)/10 s	56
Graf 4 – Závislost zdánlivé pohyblivosti senkirkinu na koncentraci SDS s přídavkem aditiva (acetonitrilu) v pokryté kapiláře ve 20 mM boritanovém pufru, napětí 25 kV, teplota 25 °C, dávkování tlakem 50 mbar (~5 kPa)/10 s	57
Graf 5 – Závislost zdánlivé pohyblivosti senkirkinu na koncentraci SDS s přídavkem aditiva (methanolu) v pokryté kapiláře ve 20 mM boritanovém pufru, napětí 25 kV, teplota 25 °C, dávkování tlakem 50 mbar (~5 kPa)/10 s	58

Graf 6 – Závislost zdánlivé pohyblivosti senecioninu na koncentraci SDS v pokryté kapiláře ve 20 mM boritanovém pufru, napětí 25 kV, teplota 25 °C, dávkování tlakem 50 mbar (~5 kPa)/10 s.....	59
Graf 7 – Ukázka záznamu stanovení pohyblivosti senecioninu ve 20 mM boritanovém pufru s přídatkem 20 mM SDS a 10 % v/v methanolu v pokryté kapiláře, napětí 25 kV, teplota 25 °C, dávkování tlakem 50 mbar (~5 kPa)/10 s .....	60
Graf 8 – Ukázka záznamu stanovení pohyblivosti senecioninu ve 20 mM boritanovém pufru s přídatkem 30 mM SDS a 10 % v/v acetonitrilu v pokryté kapiláře, napětí 25 kV, teplota 25 °C, dávkování tlakem 50 mbar (~5 kPa)/10 s .....	60
Graf 9 – Závislost zdánlivé pohyblivosti senecioninu na koncentraci SDS s přídatkem aditiva (acetonitrilu) v pokryté kapiláře ve 20 mM boritanovém pufru, napětí 25 kV, teplota 25 °C, dávkování tlakem 50 mbar (~5 kPa)/10 s .....	61
Graf 10 – Závislost zdánlivé pohyblivosti senecioninu na koncentraci SDS s přídatkem aditiva (methanolu) v pokryté kapiláře ve 20 mM boritanovém pufru, napětí 25 kV, teplota 25 °C, dávkování tlakem 50 mbar (~5 kPa)/10 s .....	62
Graf 11 – Závislost plochy píku 10x zředěného senkirkinu na čase dávkování v pokryté kapiláře ve 20 mM boritanovém pufru s přídatky SDS a acetonitrilu, napětí -25 kV, teplota 25 °C, dávkování tlakem 50 mbar (~5 kPa)/10 s až 720 s .....	63
Graf 12 – Závislost plochy píku 100x zředěného senkirkinu na čase dávkování v pokryté kapiláře ve 20 mM boritanovém pufru s přídatky SDS a acetonitrilu, napětí -25 kV, teplota 25 °C, dávkování tlakem 50 mbar (~5 kPa)/ 10 s až 720 s .....	64
Graf 13 – Závislost šířky píku 10x zředěného senkirkinu na čase dávkování v pokryté kapiláře ve 20 mM boritanovém pufru s přídatky SDS a acetonitrilu, napětí -25 kV, teplota 25 °C, dávkování tlakem 50 mbar (~5 kPa)/10 s až 720 s .....	65
Graf 14 – Závislost šířky píku 100x zředěného senkirkinu na čase dávkování v pokryté kapiláře ve 20 mM boritanovém pufru s přídatky SDS a acetonitrilu, napětí -25 kV, teplota 25 °C dávkování tlakem 50 mbar (~5 kPa)/10 s až 720 s .....	66
Graf 15 – Závislost plochy píku na koncentraci ředěného senkirkinu v pokryté kapiláře ve 20 mM boritanovém pufru s přídatkem 30 mM SDS, napětí -25 kV, teplota 25 °C, dávkování tlakem 50 mbar (~5 kPa)/5 min .....	67
Graf 16 – Ukázka záznamu z prekoncentrační metody pH junction-sweeping v nepokryté kapiláře, základní elektrolyt boritanový pufr (pH 9,38) s přídatkem 30 mM SDS, standardy (senkirkin a senecionin) rozpuštěné ve fosforečnanovém pufru (pH 4,71), napětí 25 kV, teplota 25 °C, dávkování tlakem 50 mbar (~5 kPa)/10 s .....	68

## Seznam tabulek

Tabulka 1 - Stanovení EOF na nepokryté kapiláře v 10 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pufru (pH 4,71), napětí 25 kV, teplota 25 °C, dávkování tlakem 50 mbar (~5 kPa)/10 s .....	52
Tabulka 2 - Stanovení EOF na nepokryté kapiláře v 10 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pufru (pH 4,71).....	78
Tabulka 3 - Stanovení EOF na nepokryté kapiláře v 20 mM Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> pufru (pH 9,38).....	78
Tabulka 4 - Stanovení EOF na pokryté kapiláře v 20 mM Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> pufru (pH 9,38).....	78
Tabulka 5 - Stanovení EOF na pokryté kapiláře v 10 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pufru (pH 4,71).....	78
Tabulka 6 - Migrační charakteristiky senkirkinu na pokryté kapiláře v 10 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pufru (pH 4,71).....	79
Tabulka 7 - Migrační charakteristiky senkirkinu na pokryté kapiláře v 20 mM Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> pufru (pH 9,38).....	79
Tabulka 8 - Migrační charakteristiky senkirkinu na pokryté kapiláře v 20 mM Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> pufru (pH 9,38) + 10 mM SDS.....	79
Tabulka 9 - Migrační charakteristiky senkirkinu na pokryté kapiláře v 20 mM Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> pufru (pH 9,38) + 20 mM SDS.....	79
Tabulka 10 - Migrační charakteristiky senkirkinu na pokryté kapiláře v 20 mM Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> pufru (pH 9,38) + 30 mM SDS.....	80
Tabulka 11 - Migrační charakteristiky senkirkinu na pokryté kapiláře v 20 mM Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> pufru (pH 9,38) + 40 mM SDS.....	80
Tabulka 12 - Migrační charakteristiky senkirkinu na pokryté kapiláře v 20 mM Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> pufru (pH 9,38) + 50 mM SDS.....	80
Tabulka 13 - Migrační charakteristiky senkirkinu na pokryté kapiláře v 20 mM Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> pufru (pH 9,38) + 10 mM SDS + 5 % v/v ACN .....	80
Tabulka 14 - Migrační charakteristiky senkirkinu na pokryté kapiláře v 20 mM Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> pufru (pH 9,38) + 20 mM SDS + 5 % v/v ACN .....	81
Tabulka 15 - Migrační charakteristiky senkirkinu na pokryté kapiláře v 20 mM Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> pufru (pH 9,38) + 30 mM SDS + 5 % v/v ACN .....	81
Tabulka 16 - Migrační charakteristiky senkirkinu na pokryté kapiláře v 20 mM Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> pufru (pH 9,38) + 40 mM SDS + 5 % v/v ACN .....	81
Tabulka 17 - Migrační charakteristiky senkirkinu na pokryté kapiláře v 20 mM Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> pufru (pH 9,38) + 50 mM SDS + 5 % v/v ACN .....	81
Tabulka 18 - Migrační charakteristiky senkirkinu na pokryté kapiláře v 20 mM Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> pufru (pH 9,38) + 10 mM SDS + 10 % v/v ACN .....	82

Tabulka 19 - Migrační charakteristiky senkirkinu na pokryté kapiláře v 20 mM Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> pufru (pH 9,38) + 20 mM SDS + 10 % v/v ACN .....	82
Tabulka 20 - Migrační charakteristiky senkirkinu na pokryté kapiláře v 20 mM Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> pufru (pH 9,38) + 30 mM SDS + 10 % v/v ACN .....	82
Tabulka 21 - Migrační charakteristiky senkirkinu na pokryté kapiláře v 20 mM Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> pufru (pH 9,38) + 40 mM SDS + 10 % v/v ACN .....	82
Tabulka 22 - Migrační charakteristiky senkirkinu na pokryté kapiláře v 20 mM Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> pufru (pH 9,38) + 50 mM SDS + 10 % v/v ACN .....	83
Tabulka 23 - Migrační charakteristiky senkirkinu na pokryté kapiláře v 20 mM Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> pufru (pH 9,38) + 10 mM SDS + 15 % v/v ACN .....	83
Tabulka 24 - Migrační charakteristiky senkirkinu na pokryté kapiláře v 20 mM Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> pufru (pH 9,38) + 20 mM SDS + 15 % v/v ACN .....	83
Tabulka 25 - Migrační charakteristiky senkirkinu na pokryté kapiláře v 20 mM Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> pufru (pH 9,38) + 30 mM SDS + 15 % v/v ACN .....	83
Tabulka 26 - Migrační charakteristiky senkirkinu na pokryté kapiláře v 20 mM Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> pufru (pH 9,38) + 40 mM SDS + 15 % v/v ACN .....	84
Tabulka 27 - Migrační charakteristiky senkirkinu na pokryté kapiláře v 20 mM Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> pufru (pH 9,38) + 50 mM SDS + 15 % v/v ACN .....	84
Tabulka 28 - Migrační charakteristiky senkirkinu na pokryté kapiláře v 20 mM Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> pufru (pH 9,38) + 10 mM SDS + 20 % v/v ACN .....	84
Tabulka 29 - Migrační charakteristiky senkirkinu na pokryté kapiláře v 20 mM Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> pufru (pH 9,38) + 20 mM SDS + 20 % v/v ACN .....	84
Tabulka 30 - Migrační charakteristiky senkirkinu na pokryté kapiláře v 20 mM Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> pufru (pH 9,38) + 30 mM SDS + 20 % v/v ACN .....	85
Tabulka 31 - Migrační charakteristiky senkirkinu na pokryté kapiláře v 20 mM Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> pufru (pH 9,38) + 40 mM SDS + 20 % v/v ACN .....	85
Tabulka 32 - Migrační charakteristiky senkirkinu na pokryté kapiláře v 20 mM Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> pufru (pH 9,38) + 50 mM SDS + 20 % v/v ACN .....	85
Tabulka 33 - Migrační charakteristiky senkirkinu na pokryté kapiláře v 20 mM Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> pufru (pH 9,38) + 10 mM SDS + 5 % v/v MeOH.....	85
Tabulka 34 - Migrační charakteristiky senkirkinu na pokryté kapiláře v 20 mM Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> pufru (pH 9,38) + 20 mM SDS + 5 % v/v MeOH.....	86
Tabulka 35 - Migrační charakteristiky senkirkinu na pokryté kapiláře v 20 mM Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> pufru (pH 9,38) + 30 mM SDS + 5 % v/v MeOH.....	86

Tabulka 36 - Migrační charakteristiky senkirkinu na pokryté kapiláře v 20 mM Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> pufru (pH 9,38) + 40 mM SDS + 5 % v/v MeOH.....	86
Tabulka 37 - Migrační charakteristiky senkirkinu na pokryté kapiláře v 20 mM Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> pufru (pH 9,38) + 50 mM SDS + 5 % v/v MeOH.....	86
Tabulka 38 - Migrační charakteristiky senkirkinu na pokryté kapiláře v 20 mM Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> pufru (pH 9,38) + 10 mM SDS + 10 % v/v MeOH.....	87
Tabulka 39 - Migrační charakteristiky senkirkinu na pokryté kapiláře v 20 mM Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> pufru (pH 9,38) + 20 mM SDS + 10 % v/v MeOH.....	87
Tabulka 40 - Migrační charakteristiky senkirkinu na pokryté kapiláře v 20 mM Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> pufru (pH 9,38) + 30 mM SDS + 10 % v/v MeOH.....	87
Tabulka 41 - Migrační charakteristiky senkirkinu na pokryté kapiláře v 20 mM Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> pufru (pH 9,38) + 40 mM SDS + 10 % v/v MeOH.....	87
Tabulka 42 - Migrační charakteristiky senkirkinu na pokryté kapiláře v 20 mM Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> pufru (pH 9,38) + 50 mM SDS + 10 % v/v MeOH.....	88
Tabulka 43 - Migrační charakteristiky senkirkinu na pokryté kapiláře v 20 mM Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> pufru (pH 9,38) + 10 mM SDS + 15 % v/v MeOH.....	88
Tabulka 44 - Migrační charakteristiky senkirkinu na pokryté kapiláře v 20 mM Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> pufru (pH 9,38) + 20 mM SDS + 15 % v/v MeOH.....	88
Tabulka 45 - Migrační charakteristiky senkirkinu na pokryté kapiláře v 20 mM Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> pufru (pH 9,38) + 30 mM SDS + 15 % v/v MeOH.....	88
Tabulka 46 - Migrační charakteristiky senkirkinu na pokryté kapiláře v 20 mM Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> pufru (pH 9,38) + 40 mM SDS + 15 % v/v MeOH.....	89
Tabulka 47 - Migrační charakteristiky senkirkinu na pokryté kapiláře v 20 mM Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> pufru (pH 9,38) + 50 mM SDS + 15 % v/v MeOH.....	89
Tabulka 48 - Migrační charakteristiky senkirkinu na pokryté kapiláře v 20 mM Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> pufru (pH 9,38) + 10 mM SDS + 20 % v/v MeOH.....	89
Tabulka 49 – Migrační charakteristiky senkirkinu na pokryté kapiláře v 20 mM Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> pufru (pH 9,38) + 20 mM SDS + 20 % v/v MeOH.....	89
Tabulka 50 - Migrační charakteristiky senkirkinu na pokryté kapiláře v 20 mM Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> pufru (pH 9,38) + 30 mM SDS + 20 % v/v MeOH.....	90
Tabulka 51 - Migrační charakteristiky senkirkinu na pokryté kapiláře v 20 mM Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> pufru (pH 9,38) + 40 mM SDS + 20 % v/v MeOH.....	90
Tabulka 52 - Migrační charakteristiky senkirkinu na pokryté kapiláře v 20 mM Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> pufru (pH 9,38) + 50 mM SDS + 20 % v/v MeOH.....	90



Tabulka 53 - Prekoncentrace 10x zředěného senkirkinu .....	91
Tabulka 54 - Prekoncentrace 100x zředěného senkirkinu .....	91
Tabulka 55 - Migrační charakteristiky senecioninu na pokryté kapiláře v 10 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pufu (pH 4,71) .....	91
Tabulka 56 - Migrační charakteristiky senecioninu na pokryté kapiláře v 20 mM Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> pufu (pH 9,38).....	92
Tabulka 57 - Migrační charakteristiky senecioninu na pokryté kapiláře v 20 mM Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> pufu (pH 9,38) + 10 mM SDS .....	92
Tabulka 58 - Migrační charakteristiky senecioninu na pokryté kapiláře v 20 mM Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> pufu (pH 9,38) + 20 mM SDS .....	92
Tabulka 59 - Migrační charakteristiky senecioninu na pokryté kapiláře v 20 mM Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> pufu (pH 9,38) + 30 mM SDS .....	92
Tabulka 60 - Migrační charakteristiky senecioninu na pokryté kapiláře v 20 mM Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> pufu (pH 9,38) + 40 mM SDS .....	93
Tabulka 61 - Migrační charakteristiky senecioninu na pokryté kapiláře v 20 mM Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> pufu (pH 9,38) + 50 mM SDS .....	93
Tabulka 62 - Migrační charakteristiky senecioninu na pokryté kapiláře v 20 mM Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> pufu (pH 9,38) + 10 mM SDS + 5 % v/v ACN.....	93
Tabulka 63 - Migrační charakteristiky senecioninu na pokryté kapiláře v 20 mM Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> pufu (pH 9,38) + 20 mM SDS + 5 % v/v ACN.....	93
Tabulka 64 - Migrační charakteristiky senecioninu na pokryté kapiláře v 20 mM Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> pufu (pH 9,38) + 30 mM SDS + 5 % v/v ACN.....	94
Tabulka 65 - Migrační charakteristiky senecioninu na pokryté kapiláře v 20 mM Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> pufu (pH 9,38) + 40 mM SDS + 5 % v/v ACN.....	94
Tabulka 66 - Migrační charakteristiky senecioninu na pokryté kapiláře v 20 mM Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> pufu (pH 9,38) + 50 mM SDS + 5 % v/v ACN.....	94
Tabulka 67 - Migrační charakteristiky senecioninu na pokryté kapiláře v 20 mM Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> pufu (pH 9,38) + 10 mM SDS + 10 % v/v ACN.....	94
Tabulka 68 - Migrační charakteristiky senecioninu na pokryté kapiláře v 20 mM Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> pufu (pH 9,38) + 20 mM SDS + 10 % v/v ACN.....	95
Tabulka 69 - Migrační charakteristiky senecioninu na pokryté kapiláře v 20 mM Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> pufu (pH 9,38) + 30 mM SDS + 10 % v/v ACN.....	95

Tabulka 70 - Migrační charakteristiky senecioninu na pokryté kapiláře v 20 mM Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> pufro (pH 9,38) + 40 mM SDS + 10 % v/v ACN.....	95
Tabulka 71 - Migrační charakteristiky senecioninu na pokryté kapiláře v 20 mM Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> pufro (pH 9,38) + 50 mM SDS + 10 % v/v ACN.....	95
Tabulka 72 - Migrační charakteristiky senecioninu na pokryté kapiláře v 20 mM Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> pufro (pH 9,38) + 10 mM SDS + 15 % v/v ACN.....	96
Tabulka 73 - Migrační charakteristiky senecioninu na pokryté kapiláře v 20 mM Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> pufro (pH 9,38) + 20 mM SDS + 15 % v/v ACN.....	96
Tabulka 74 - Migrační charakteristiky senecioninu na pokryté kapiláře v 20 mM Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> pufro (pH 9,38) + 30 mM SDS + 15 % v/v ACN.....	96
Tabulka 75 - Migrační charakteristiky senecioninu na pokryté kapiláře v 20 mM Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> pufro (pH 9,38) + 40 mM SDS + 15 % v/v ACN.....	96
Tabulka 76 - Migrační charakteristiky senecioninu na pokryté kapiláře v 20 mM Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> pufro (pH 9,38) + 50 mM SDS + 15 % v/v ACN.....	97
Tabulka 77 - Migrační charakteristiky senecioninu na pokryté kapiláře v 20 mM Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> pufro (pH 9,38) + 10 mM SDS + 20 % v/v ACN.....	97
Tabulka 78 - Migrační charakteristiky senecioninu na pokryté kapiláře v 20 mM Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> pufro (pH 9,38) + 20 mM SDS + 20 % v/v ACN.....	97
Tabulka 79 - Migrační charakteristiky senecioninu na pokryté kapiláře v 20 mM Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> pufro (pH 9,38) + 30 mM SDS + 20 % v/v ACN.....	97
Tabulka 80 - Migrační charakteristiky senecioninu na pokryté kapiláře v 20 mM Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> pufro (pH 9,38) + 40 mM SDS + 20 % v/v ACN.....	98
Tabulka 81 - Migrační charakteristiky senecioninu na pokryté kapiláře v 20 mM Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> pufro (pH 9,38) + 50 mM SDS + 20 % v/v ACN.....	98
Tabulka 82 - Migrační charakteristiky senecioninu na pokryté kapiláře v 20 mM Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> pufro (pH 9,38) + 10 mM SDS + 5 % v/v MeOH.....	98
Tabulka 83 - Migrační charakteristiky senecioninu na pokryté kapiláře v 20 mM Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> pufro (pH 9,38) + 20 mM SDS + 5 % v/v MeOH.....	98
Tabulka 84 - Migrační charakteristiky senecioninu na pokryté kapiláře v 20 mM Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> pufro (pH 9,38) + 30 mM SDS + 5 % v/v MeOH.....	99
Tabulka 85 - Migrační charakteristiky senecioninu na pokryté kapiláře v 20 mM Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> pufro (pH 9,38) + 40 mM SDS + 5 % v/v MeOH.....	99
Tabulka 86 - Migrační charakteristiky senecioninu na pokryté kapiláře v 20 mM Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> pufro (pH 9,38) + 50 mM SDS + 5 % v/v MeOH.....	99

Tabulka 87 - Migrační charakteristiky senecioninu na pokryté kapiláře v 20 mM Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> pufro (pH 9,38) + 10 mM SDS + 10 % v/v MeOH .....	99
Tabulka 88 - Migrační charakteristiky senecioninu na pokryté kapiláře v 20 mM Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> pufro (pH 9,38) + 20 mM SDS + 10 % v/v MeOH .....	100
Tabulka 89 - Migrační charakteristiky senecioninu na pokryté kapiláře v 20 mM Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> pufro (pH 9,38) + 30 mM SDS + 10 % v/v MeOH .....	100
Tabulka 90 - Migrační charakteristiky senecioninu na pokryté kapiláře v 20 mM Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> pufro (pH 9,38) + 40 mM SDS + 10 % v/v MeOH .....	100
Tabulka 91 - Migrační charakteristiky senecioninu na pokryté kapiláře v 20 mM Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> pufro (pH 9,38) + 50 mM SDS + 10 % v/v MeOH .....	100
Tabulka 92 - Migrační charakteristiky senecioninu na pokryté kapiláře v 20 mM Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> pufro (pH 9,38) + 10 mM SDS + 15 % v/v MeOH .....	101
Tabulka 93 - Migrační charakteristiky senecioninu na pokryté kapiláře v 20 mM Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> pufro (pH 9,38) + 20 mM SDS + 15 % v/v MeOH .....	101
Tabulka 94 - Migrační charakteristiky senecioninu na pokryté kapiláře v 20 mM Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> pufro (pH 9,38) + 30 mM SDS + 15 % v/v MeOH .....	101
Tabulka 95 - Migrační charakteristiky senecioninu na pokryté kapiláře v 20 mM Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> pufro (pH 9,38) + 40 mM SDS + 15 % v/v MeOH .....	101
Tabulka 96 - Migrační charakteristiky senecioninu na pokryté kapiláře v 20 mM Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> pufro (pH 9,38) + 50 mM SDS + 15 % v/v MeOH .....	102
Tabulka 97 - Migrační charakteristiky senecioninu na pokryté kapiláře v 20 mM Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> pufro (pH 9,38) + 10 mM SDS + 20 % v/v MeOH .....	102
Tabulka 98 - Migrační charakteristiky senecioninu na pokryté kapiláře v 20 mM Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> pufro (pH 9,38) + 20 mM SDS + 20 % v/v MeOH .....	102
Tabulka 99 - Migrační charakteristiky senecioninu na pokryté kapiláře v 20 mM Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> pufro (pH 9,38) + 30 mM SDS + 20 % v/v MeOH .....	102
Tabulka 100 - Migrační charakteristiky senecioninu na pokryté kapiláře v 20 mM Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> pufro (pH 9,38) + 40 mM SDS + 20 % v/v MeOH .....	103
Tabulka 101 - Migrační charakteristiky senecioninu na pokryté kapiláře v 20 mM Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> pufro (pH 9,38) + 50 mM SDS + 20 % v/v MeOH .....	103
Tabulka 102 – Stanovení meze detekce senkirkinu .....	103

## ÚVOD

Pyrrolizidinové alkaloidy jsou látky přirozeně se vyskytující v řadě rostlin z různých čeledí. Tyto alkaloidy vykazují po metabolické aktivaci jak aktivní, tak chronickou toxicitu, kterou způsobují pyrrolové struktury, a jejich primárním působištěm jsou játra. Tyto alkaloidy se nachází převážně v rostlinných zdrojích, které mohou kontaminovat zdroje, následně používané jako krmivo pro hospodářská zvířata, tudíž je popsán výskyt pyrrolizidinových alkaloidů i ve zdrojích živočišných. Pyrrolizidinové alkaloidy se povětšinou vyskytují v rostlinách ve formě karboxylových solí a po jejich disociaci je lze separovat elektromigračními metodami.

Elektromigrační metody jsou založené na pohybu nabitých částic v elektrickém poli po vložení stejnosměrného napětí. Jednou z těchto moderních separačních technik je kapilární zónová elektroforéza (CZE), ve které probíhá analýza v křemenných kapilárách. Výsledkem těchto analýz je elektroforegram, na němž je zaznamenána závislost signálu na čase. Nejvíce používaná je CZE s UV detekcí, která umožňuje separovat analyty absorbující při vlnové délce od 200 do 400 nm.

V této diplomové práci je popsána a experimentálně ověřena možnost analyzovat pyrrolizidinové alkaloidy pomocí CZE s UV detekcí v pokrytých kapilárách, byla také prostudována možnost on-line prekoncentrace ředěných vzorků pyrrolizidinových alkaloidů, jak v pokrytých, tak nepokrytých kapilárách.

# 1 TEORETICKÁ ČÁST

## 1.1 Kapilární elektroforéza

Kapilární elektroforéza (CE) se řadí mezi moderní analytické elektromigrační separační metody, která umožňuje rychlé a účinné separace nabitých částic přítomných v malém objemu vzorku. Separace je založená na základě rozdílné pohyblivosti nabitých částic ve stejnosměrném elektrickém poli, vytvořeném vkládáním konstantního stejnosměrného napětí mezi elektrody. Částice mohou nabývat různých velikostí, a to od jednoduchých iontů přes makromolekuly až po koloidní částice. Elektroforetická pohyblivost závisí na náboji, který analyt nese, kdy čím větší je poměr a velikosti, tím vyšší mobilita a díky tomu nižší migrační čas. Elektroforetická pohyblivost závisí také na viskozitě základního elektrolytu. Pohyb analytů je přímo úměrný aplikovanému potenciálu. Elektroforetický lze analyzovat i částice suspenzí či emulzí. Elektroforéza je využívanou metodou převážně k separaci vzorků biologického původu, jako jsou například proteiny a peptidy. Elektroforéza je vhodná i pro analýzy séra, stanovení organických i anorganických iontů, ale i chirální separace. Jedná se o techniku využívanou v mnoha analytických laboratořích, včetně průmyslového, farmaceutického a biochemického výzkumu. CE dosahuje vysoké rychlosti a nízkého limitu detekce s nízkými provozními náklady. Právě díky nízkým limitům detekce lze separovat i velmi malé množství vzorku. Podle použitého napětí se elektroforéza dělí na nízkonapěťovou (do 300 V), středně napěťovou (1500 V) a vysokonapěťovou (30 000 V) [1; 2; 3; 4].

## 1.2 Historie

V roce 1892 byl poprvé popsán pohyb anorganických částic v koloidním roztoku po připojení elektrického pole. Následně se ukázalo, že podobně se pohybují i proteiny v koloidním roztoku. V podobném uspořádání se elektroforéza proteinů krevního séra dodnes používá jako diagnostická metoda při klinickém vyšetření. Vedle kapilární elektroforézy vznikla v polovině šedesátých let také kapilární izotachoforéza a je využívána jako metoda pro analýzu směsi anorganických či organických malých iontů [3; 5].

V třicátých letech dvacátého století švédský elektrochemik Arne Tiselius zkonstruoval zařízení umožňující rozdělit proteiny krevního séra, a to albumin alfa, beta a gama globulin za použití elektroforézy. Za tuto průkopnickou práci dostal v roce 1948 Tiselius Nobelovu cenu [6].

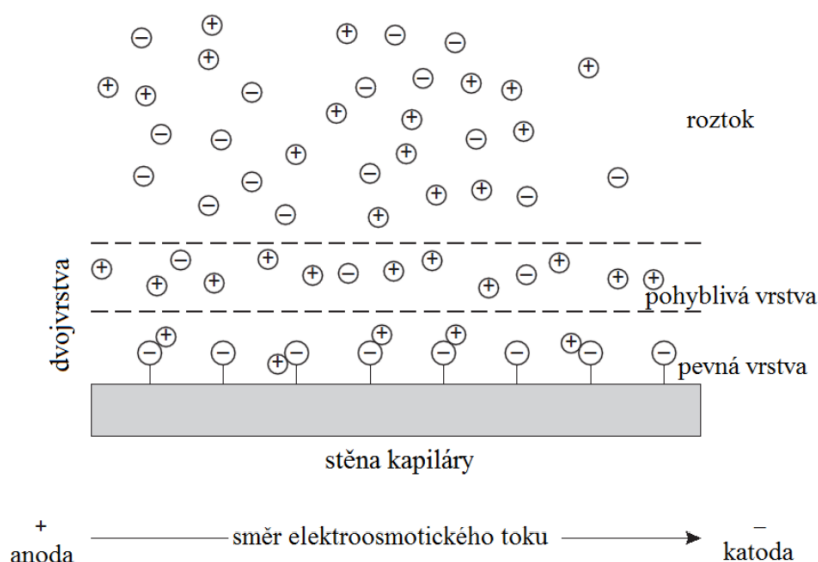
Zařízení pro kapilární elektroforézu jako první zhotovil v roce 1967 Hjertén. Hjertén prováděl elektroforézu v podélně rotující trubici [2; 7]. V roce 1974 Virtaen a poté Mikkers a Everaerts v roce 1979 provedli elektroforézu v kapilárách s vnitřním průměrem zhruba 200  $\mu\text{m}$  vyrobených z teflonu PTFE [1; 8].

V roce 1981 James Wallace Jorgenson a Kryn DeArman Lukacsová objasnili separaci různých iontů (aminokyselin, dipeptidů a aminů) zónovou elektroforézou ve velmi tenké skleněné kapiláře a demonstrovali tak vysokou účinnost separace v této úzké kapiláře v porovnání s velmi rozšířenou kapalinovou chromatografií. Publikace Jorgensona a Lukacsové o kapilární zónové elektroforéze se dočkala uznání až v roce 1989 [3; 5]. V roce 1989 se na trhu objevuje první komerční přístroj pro CE [1].

### 1.2.1 Elektroosmotický tok

Elektroosmotický tok (EOF) byl poprvé popsán v roce 1809 Ferdinandem Friedrichem Reusem, jehož experimenty prokázaly, že voda může prosakovat skrz porézní jílové diafragmy zásluhou aplikace elektrického pole [9].

Tento elektroosmotický tok někdy též elektroendoosmóza vzniká působením stejnosměrného elektrického pole na difuzní část elektrické dvojvrstvy u vnitřní stěny kapiláry, viz obr. 1.



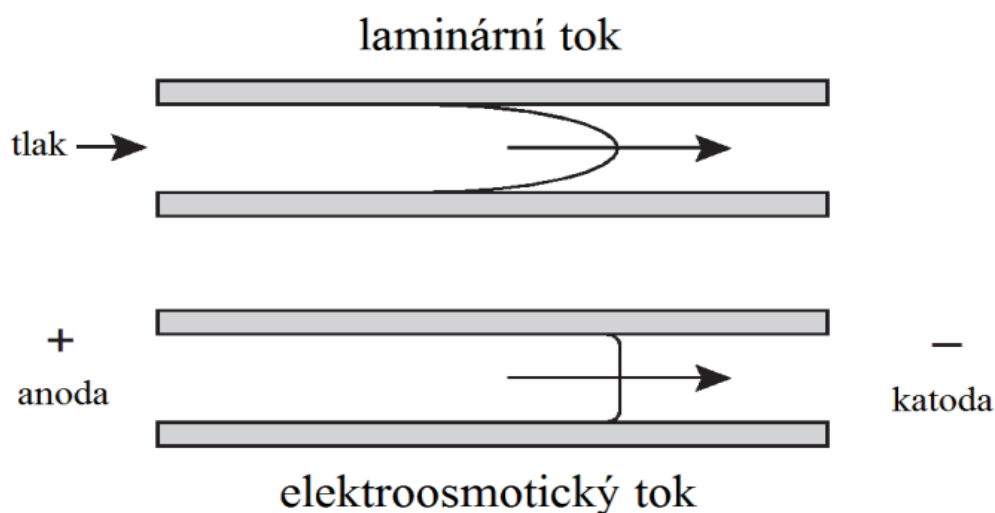
Obrázek 1 - Vznik EOF v křemenné kapiláře, převzato a upraveno z [10].

Tam se nachází rozhraní pevné a kapalně fáze a pohyblivost vody je způsobena ionizací silanolových skupin na povrchu kapiláry z křemičitého materiálu kapiláry, kdy tento

materiál získává při kontaktu s elektrolytem nehybný povrchový náboj. Tento náboj k sobě přitahuje ionty opačného znaménka, protože stěna kapiláry se chová, jako by měla náboj záporný. V difuzní části zůstává přebytek volného náboje a takto se vytvoří potenciálový rozdíl, tzv. zeta potenciál. EOF je jedním z hybných sil kapilární elektroforézy a je důsledkem fázového rozhraní mezi pohyblivou (kapalnou) částí a nepohyblivou (vnitřní stěna kapiláry) částí kapiláry. Při separaci v CE dochází současně jak k elektroosmóze, tak k elektroforéze. V nabitě vrstvě v přítomnosti vnějšího elektrického pole získává tekutina hybnost, která se přenáší do dalších vrstev tekutiny účinkem viskozity a je-li kapalná fáze v kapiláře pohyblivá, dojde k jejímu proudění [9; 11].

Pokud je rychlost elektroosmotického toku,  $v_{EOF}$  vyšší než rychlost elektroforézy,  $v_{ELFO}$ , pak se všechny ionty pohybují jedním směrem a lze je detekovat v jedné analýze. Je-li kapilára rovnoměrně nabitá a na obou koncích pod stejným tlakem, je proudění rovnoměrné v celém průřezu kapiláry s výjimkou tenké elektrické dvojvrstvy (EDL) u stěny kapiláry, kde proudění na fázovém rozhraní klesá na nulu. Samotná EOF nezpůsobuje žádnou axiální disperzi analytu a rozšíření zón je hlavně v důsledku podélné molekulární difuze [9].

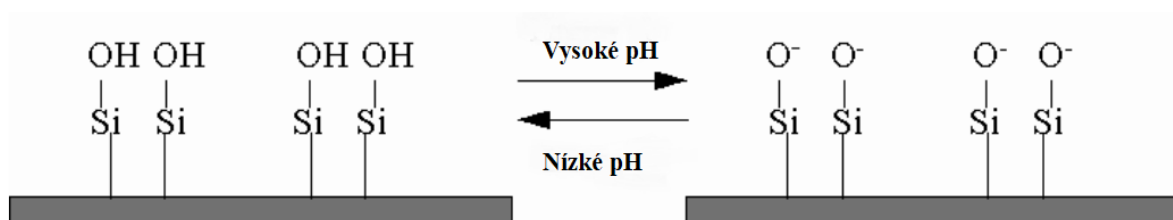
Hlavní výhodou EOF, ve srovnání s laminárním prouděním hydrodynamického toku, je jeho téměř pravoúhlý rychlostní profil v celém průřezu kapiláry, na rozdíl od parabolického profilu toku, zobrazený na obr. 2. Znamená to, že jeho příspěvek k celkové disperzi zón analytů je při elektromigrační separaci minimální [11].



Obrázek 2 - Rozdíl mezi laminárním tokem a pístovým tokem EOF a jejich vlivem na tvar píku, nahoře: parabolický profil toku, dole: pístový profil toku, převzato a upraveno z [10].

Další výhodou EOF je, že je to užitečný prostředek k transportu analytů a pufru v mikrofluidním systému. Také potřebné napětí je nezávislé na poloměru kapiláry, a proto je EOF výhodný pro transport nekonečně malých objemů tekutiny velmi úzkými kapilárami. EOF umožňuje detekci iontů s opačnými znaménky v jedné analýze, snižuje čas samotné analýzy a umožňuje provoz mikrozařízení v kontinuálním režimu. Nevýhodou EOF je, že jakékoli odchýlení od jeho klasického tvaru způsobuje rozšiřování zón [9].

Disociace silanolových skupin v křemenné kapiláře je silně závislá na pH nosného elektrolytu, kdy mezi pH 3–8 silně stoupá EOF a převyšuje elektroforetickou pohyblivost, viz obr. 3. Tato závislost znamená, že EOF lze jednoduše regulovat změnou pH elektrolytu, úpravou vnitřního povrchu kapiláry anebo vnějším elektrickým polem [11].



Obrázek 3 - Disociace silanolových skupin, převzato a upraveno z [12].

### 1.2.2 Základní vztahy

**Elektroforetická pohyblivost**  $\mu$  nabité částice je její rychlost pohybu v elektrickém poli o jednotkové intenzitě. Jestliže jsou na začátku separace částice na stejném místě, pak se během separace dostávají do popředí ty částice, které mají větší pohyblivost a částice s nižší pohyblivostí zůstávají opožděné a dochází k jejich oddělení. Elektrická síla  $F$  působí na nabitou částici s nábojem  $q$

$$F_1 = Q * E \quad (1)$$

a uvádí tak částici do pohybu. Elektrická síla je přímo úměrná síle elektrického pole  $E$ . Proti elektrické síle působí síla třecí, daná Stokesovým zákonem,

$$F_2 = -6 * \pi * \eta * r * v \quad (2)$$

kde  $v$  je rychlost pohybu iontu a  $\eta$  je viskozita prostředí. Při rovnosti těchto opačných sil lze psát

$$F_1 = -F_2 \quad (3)$$



a výsledný pohyb iontů v roztoku je dán působením těchto dvou sil. Během elektroforézy je dosaženo ustáleného stavu, kdy obě síly jsou si rovné, ale mají opačný směr [12].

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

Pro daný ion je v určitém prostředí jeho mobilita konstantní. Rychlost iontů v elektrickém poli je poté určena vztahem

$$v = \mu_{ep} * E \quad (5)$$

Vztah pro výpočet elektroforetické pohyblivosti  $\mu_{ep}$  lze vyjádřit kombinací vztahů (4 a 5)

$$\mu_{ep} = \frac{q}{6 * \pi * \eta * r} \quad (6)$$

Z této rovnice vyplývá, že elektroforetická pohyblivost je přímo úměrná svému náboji a nepřímo úměrná jeho velikosti a viskozitě prostředí. Separace kapilární elektroforézou se udává pomocí migračních časů  $t$ , elektroforetickou pohyblivostí  $\mu_{ep}$ , selektivitou separace  $\alpha$  a rozlišením  $R$  [3; 12].

Pohyblivost slabých elektrolytů je závislá na jejich disociaci a to znamená, že i na pH daného prostředí. Vztažením pohyblivosti slabých elektrolytů k danému pH, iontové síle a teplotě se dostane efektivní pohyblivost. Této závislosti pohyblivosti na pH se často využívá při separaci amfolytů.

Elektroosmotický tok lze určit z rovnice, kde

$$v_{eo} = m_{eo} * E \quad (7)$$

$v_{eo}$  je rychlost elektroosmotického toku,  $E$  je jednotková intenzita elektrického pole.

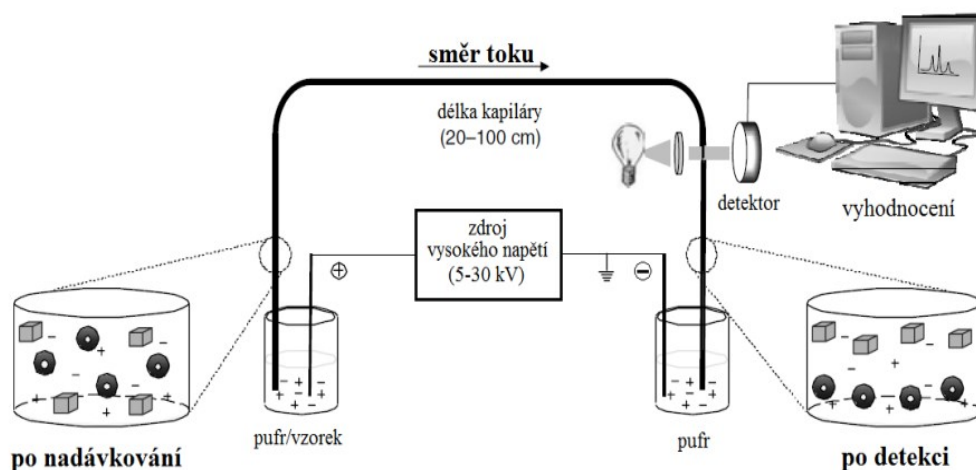
Elektroosmotická mobilita  $m_{eo}$  lze vyjádřit rovnicí,

$$m_{eo} = \varepsilon \zeta / \eta \quad (8)$$

kde  $\zeta$  je elektrokinetický potenciál,  $\eta$  je viskozita roztoku a  $\varepsilon$  je relativní permitivita (dielektrická konstanta) roztoku [11].

## 1.3 Instrumentace

Instrumentální systém kapilární elektroforézy (obrázek č. 4) se skládá z dávkovacího zařízení, kapiláry, elektrod, nádobky se základním pufrům a nádobky se vzorkem, zdroje vysokého napětí a detektoru na konci kapiláry, který zaznamenává migrující zóny vzorku [3].



Obrázek 4 - Nákres zařízení pro CE, převzato a upraveno z [14].

### 1.3.1 Kapiláry

Mezi nejvíce používané kapiláry v kapilární elektroforéze patří křemenné, které jsou velmi křehké, a proto se pokrývají tenkou vrstvou polyimidu. Jejich délka je většinou cca 30 až 80 cm a jejich vnitřní průměr bývá typicky 50 či 75  $\mu\text{m}$ . Kvůli malému vnitřnímu průměru kapilár je možné velmi dobře odvádět Jouleovo teplo, čímž je možné používat vysoké napětí v řádech kilovoltů a tím dosahovat rychlých separací a vysokých účinností. Miniaturizace kapilár je též základem vysoké citlivosti kapilární zónové elektroforézy [11].

Efektivní délka, je délka kapiláry od jejího začátku k detektoru. Celková délka kapiláry je tak o 5 až 10 cm větší než její efektivní délka. Detekční okno lze vytvořit opálením vrchní vrstvy polyimidu a očištěním ethanolem. U pokrytých kapilár není vhodné používat plamen z důvodu poškození vnitřního pokrytí a v takovém případě je vhodné použít vroucí  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , horký KOH anebo pokrytí mechanicky odstranit žiletkou [13].

Právě tyto odolné křemenné kapiláry jsou velkou výhodou CZE, protože je možné je promývat i značně agresivními činidly, například roztokem NaOH, což umožňuje i analýzy velmi znečištěných vzorků, jako jsou odpadní vody. Zmíněné Jouleovo teplo produkuje v kapiláře teplotní gradient, který má parabolický tvar s nejvyšší teplotou uprostřed a nejnižší

u chlazených stěn kapiláry. Se vzrůstem teploty o 1 K dochází ke vzrůstu mobility iontů cca o 2 %, tento teplotní gradient přispívá k rozšiřování zón během migrace, kdy u chlazených stěn kapiláry ionty migrují pomaleji než v jejím středu [2].

### 1.3.2 Detekce

Detekce v kapilární elektroforéze je stejně důležitá jako v jakémkoli jiném analytickém zařízení a je spojena s několika typy detektorů, jako je například elektrochemický, vodivostní, fotochemický, fluorescenční anebo hmotnostně spektrometrický detektor. V CE je možné dosáhnout meze detekce až  $10^{-9}$  mol/l [3].

Spektrofotometrické detektory musí být velmi citlivé z důvodu malého průměru kapiláry a jsou založeny na sledování absorpce ultrafialového (UV) nebo viditelného světla (VIS), které fungují na bázi diodového pole. Je možné využívat laserem indukovanou fluorescenci (LIF), nebo je také vhodné spojení kapilární elektroforézy s hmotnostním spektrometrem (MS), kde je možné získat kvantitu a současně analyt identifikovat [1].

#### 1.3.2.1 UV/VIS detektor

Spektrofotometrické detektory jsou založeny na absorpci UV nebo viditelného světla. Detekce může být provedena zpravidla off-line anebo on-line. Při off-line detekci zóny opouštějí celu, jednotlivé frakce jsou sbírány a měřeny pod fotometrem. První on-line detekci vyvinul Hjertén, kdy detekční cela pro měření absorpce světla je součástí kapiláry.

Zdrojem záření pro UV oblast bývají nejčastěji deuteriové (D2) výbojky, ale mohou být použity i například kadmiové (229, 326 nm) nebo rtuťové (254 nm) výbojky. Jako zdroj záření pro viditelnou oblast je vhodná wolframová lampa [3].

Detektory s fotodiodovým polem přináší řadu výhod oproti detekci s pevnou vlnovou délkou. Všechny sloučeniny jsou detekovány při pevné vlnové délce v běžných fotometrických detektorech, které mohou mít různou hodnotu  $\lambda_{\max}$ . Ve fotodiodovém poli jsou zaznamenána spektra všech sloučenin a stanoví se  $\lambda_{\max}$  pro každý jeden analyt. Díky tomu je dosažena maximální detekce všech analyzovaných látek. Záření z lampy je zaměřeno na okénko v separační kapiláře, a to šterbinou prochází do holografického mřížkového polychromátoru. Celé spektrum vlnových délek z UV i viditelné oblasti je snímáno řadou fotodiod a signál je zaznamenán do počítače [3].

### 1.3.2.2 Vodivostní detektor

Vodivostní detektory jsou založeny na měření vodivosti, respektive poklesu napětí v základním elektrolytu (BGE). Tyto detektory jsou neselektivní a umožňují detekovat zónu jakékoliv sloučeniny s odlišnou efektivní mobilitou od BGE. Vodivost zóny s analytem se liší od vodivosti elektrolytu, a právě tato změna je zaznamenána detektorem. Pokud dojde k tomu, že vodivost zóny analytu se liší minimálně nebo neliší od vodivosti iontů v BGE, nelze správně analyty detekovat [3].

### 1.3.2.3 Amperometrický detektor

Při amperometrické detekci je redoxní potenciál zaznamenán na povrchu elektrody. Ionty jsou oxidovány nebo redukovány po průchodu detekční celou. Rozsah potenciálu, který lze využít, závisí na použitém rozpouštědle a materiálu elektrod, ten může být například ze skelného uhlíku. Amperometrická detekce probíhá primárně off-line, protože v CE je použito vysokonapěťové pole a umístění amperometrického detektoru v kapiláře nebylo z tohoto důvodu možné. Později byly vyvinuty návrhy, kdy oddělné zóny analytu byly transportovány do detekční kapiláry, která je spojená se separační kapilárou speciálně vyvinutým elektricky vodivým spojem z porézního skla. Amperometrické detektory jsou výrazně citlivé, kdy lze detekovat nanomoly ( $10^{-9}$  mol/l) až attomoly ( $10^{-18}$  mol/l) [3].

### 1.3.2.4 Fluorescenční detektor

Fluorescence je jev, kdy molekulární systém absorbuje foton a tím dojde k vybuzení do excitovaného stavu. Systém se poté vrací do základního stavu emitováním fotonu. Toto emitované fluorescenční záření je měřeno detektorem. Molekuly, které přirozeně fluoreskují, se měří přímo a lze dosáhnout velmi nízkých hodnot mezí detekce. Fluorescenční detekce je citlivější než detekce absorbance, ale je selektivnější [3].

V nejjednodušším uspořádání je jako zdroj budícího záření použita rtuťová výbojka (365 nm), jako další může být použita xenonová výbojka, která poskytuje budící záření v celém spektru UV-VIS. Intenzita fluorescence je přímo úměrná právě intenzitě použitého budícího záření, proto je vhodné použití laserů. Nevýhodou ale je, že u laserů nelze posouvat vlnovou délku emise k absorpčnímu maximu dané sloučeniny a jen omezené množství sloučenin lze měřit přímo. Proto je zde vhodné provést derivatizaci sloučenin tak, aby se převedly na sloučeniny poskytující fluorescenci. Jako derivatizační činidla se používají například naftalen, dansylchlorid, nebo fluorescamin. Samotná derivatizační reakce by měla

probíhat rychle, s vysokým výtěžkem a poskytovat pouze jeden derivatizační produkt. Mez detekce fluorescenčních detektorů se pohybuje od  $10^{-8}$  do  $10^{-9}$  mol/l [3].

### 1.3.2.5 Hmotnostní detektor

Hmotnostní detektor funguje na principu bombardování analytu svazkem elektronů, až dojde k rozbití molekuly na iontové fragmenty. Výsledný soubor nabitých částic je rozdělen dle poměru hmotnosti k náboji. Získaný záznam se nazývá hmotnostní spektrum [3].

Spojení hmotnostní spektrometrie s kapilární elektroforézou představuje univerzální, selektivní a vysoce citlivou detekční metodu. Ve spojení kapilární elektroforézy s hmotnostním spektrometrem jsou potřebné velmi nízké průtoky, cca nanolitry za minutu, a udržení vysokého napětí na spojení kapilár. Největší průlom ve spojení CE-MS nastal při zavedení ionizace elektrosprejem (ESI) [14].

## 1.4 Účinnost separace v kapilární elektroforéze

V důsledku odporu proti převodu hmoty nastává v klasické HPLC rozšiřování píků, avšak při kapilární elektroforéze jsou píky úzké a nastává pouze minimální rozšiřování zóny. Důvodem je elektroosmotický tok, jehož pístový rychlostní profil zajišťuje nesení složek vzorku stejnou rychlostí po celé délce kapiláry [9].

Projevem jednotlivých zón procházejících kapilárou je odezva detektoru před koncem kapiláry, která má charakter píku. Kvalitativní charakteristikou je migrační čas látky a kvantitativní charakteristikou je plocha píku. Pokud je pík Gaussovského tvaru (není frontující ani chvostující), lze vyjádřit i další charakteristiky [15].

### 1.4.1 Počet teoretických pater

Separční účinnost ( $N$ ) v CZE se vyjadřuje stejným parametrem jako v HPLC, a to počtem teoretických pater,

$$N = \left(\frac{l}{\sigma}\right)^2 \quad (9)$$

$$N = 5,54 * \left(\frac{t}{w_{1/2}}\right)^2 \quad (10)$$

kde  $l$  je efektivní délka kapiláry,  $\sigma$  vyjadřuje směrodatnou odchylku a  $w_{1/2}$  je šířka píku v polovině jeho výšky [16].

Účinnost lze vyjádřit i z jiného vztahu, kde místo parametru šířky píku v polovině jeho výšky je využita šířka píku při základně,

$$N = 16 * \left(\frac{t_m}{w}\right)^2 \quad (11)$$

kde  $t_m$  je migrační čas látky a  $w$  vyjadřuje šířku píku při základně [12; 15; 17].

### 1.4.2 Rozlišení

Rozlišení ( $R_s$ ) je mírou separace dvou píků. Při  $R_s = 1,5$  lze považovat píky látek za kvantitativně oddělné. Vypočítá se ze vztahu, ve kterém

$$R_s = \frac{2*(t_{m2}-t_{m1})}{w_2+w_1} \quad (12)$$

jsou  $t_{m1}$ ,  $t_{m2}$  migrační časy látek 1 a 2, a  $w_1$ ,  $w_2$  jsou šířky píků látek 1 a 2 při jejich základně [15].

### 1.4.3 Mez detekce, mez stanovitelnosti

Další z důležitých charakteristik jakékoli analytické metody je určení meze detekce (LOD), respektive meze stanovitelnosti (LOQ). Jednou z metod, jak LOD určit, je metoda postupného zředování, kdy dávkovaný analyt postupně ředíme až do chvíle, kdy signál naměřený detektorem má 3x větší výšku než průměrný šum. Tento stav definuje nejnižší spolehlivě detekovatelnou koncentraci. Další možností je vypočítat statistický průměrný šum základní linie nejlépe ze slepého pokusu a z kalibrační křivky odečíst odpovídající koncentraci. LOQ odpovídá množství, které lze spolehlivě detekovat, ale i stanovit a je nejčastěji 3,3 násobkem meze detekce [15].

## 1.5 Elektromigrační techniky

### 1.5.1 Kapilární zónová elektroforéza

Principem kapilární zónové elektroforézy je migrace vzorku v prostředí základního elektrolytu, který vede veškerý elektrický proud. Složení základního elektrolytu je konstantní v celé délce migrační dráhy a neměnné v čase. Specifická vodivost v celé kapiláře je konstantní před i během analýzy, a při průchodu elektrického proudu tímto roztokem je intenzita elektrického pole jednotná v celé kapiláře. Pro separaci je nutné, aby efektivní mobility a migrační rychlosti byly různé, a takového stavu je možné docílit vhodnou volbou BGE. Samotná separace pak probíhá tak, že se do kapiláry naplněné pracovním elektrolytem nadávkuje vzorek a po vložení elektrického pole začne protékat elektrický proud. Jednotlivé složky vzorku začnou migrovat různými rychlostmi a dojde k jejich vzájemnému oddělení [2].

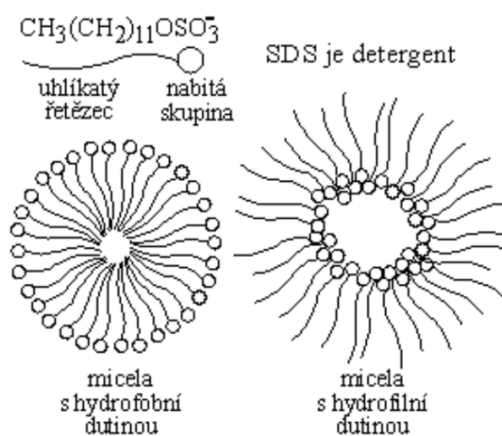
## 1.5.2 Izoelektrická fokusace

Při izoelektrické fokusaci jsou děleny amfoterní látky na základě jejich izoelektrických bodů (distribuce kladných a záporných nábojů v molekule). Mezi typické amfolyty se řadí aminokyseliny, peptidy a bílkoviny. Jestliže je pH prostředí vyšší než izoelektrický bod, amfolyt se nachází ve formě záporné částice. Pokud je pH nižší, převládá kladná forma amfolytu. Samotná elektromigrace probíhá v prostředí gradientu pH, který je vytvořen působením elektrického pole na směs amfolytů. Dělené látky pak ve směsi migrují do té doby, než doputují do té části, kde je pH rovno jejich izoelektrickému bodu. V tomto místě se molekula stává elektroneutrální. Každý amfolyt má předem vyhrazené konečné místo, kam doputuje, kde se zakoncentruje a poté detekuje. Po ustálení je třeba fokusované zóny mobilizovat buď hydrodynamickým tokem nebo elektroelucí. Detekce je poté provedena na jednom konci kapiláry za pomoci UV detektoru [1; 11].

## 1.5.3 Micelární elektrokinetická chromatografie

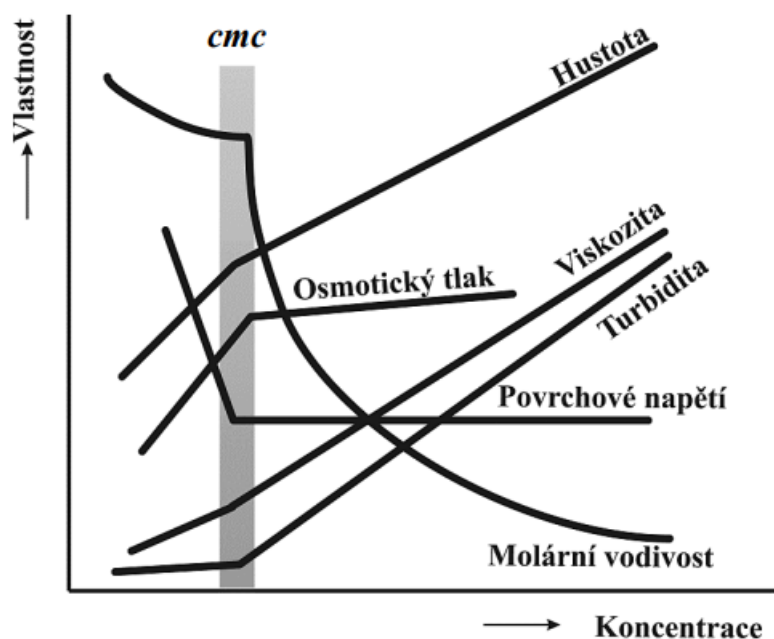
Micelární elektrokinetická separace (MEKC, obr. 7) je technika sloužící k dělení analytů a nenabitých částic. MEKC v sobě zahrnuje prvky chromatografie i elektroforézy. Ačkoli MEKC využívá elektrické pole jako hnací sílu pro migraci analytů způsobem podobným kapilární zónové elektroforéze (CZE), rozdíl mezi MEKC a CZE spočívá v jejich separačním mechanismu. Separace pomocí CZE je založena na rozdílu v elektroforetické pohyblivosti iontů, oproti tomu MEKC využívá rozdílu v rozdělovacím poměru sloučenin mezi vodnou a micelární fází (přesněji pseudostacionární fází) [18].

Micelární fáze je tvořená micelami (obr. 5), které vznikají v roztoku BGE po přidání tenzidu o koncentraci vyšší, než je jeho kritická micelární koncentrace (CMC) [3].



Obrázek 5 - Micely, převzato z [19].

Kritická micelární koncentrace (obr. 6) je mezní koncentrace povrchově aktivní látky, kdy se spolu začnou molekuly této povrchově aktivní látky shlukovat, a tak vytvářejí micely. Dynamický proces tvorby micel se nazývá micelizace, což je jedna z nejdůležitějších vlastností těchto povrchově aktivních látek. Micely jsou sloučeniny s charakteristickou amfipatickou molekulární strukturou, kdy ve vodném prostředí hydrofobní řetězce tvoří jádro micel a hydrofilní hlavičky směřují do roztoku [20].



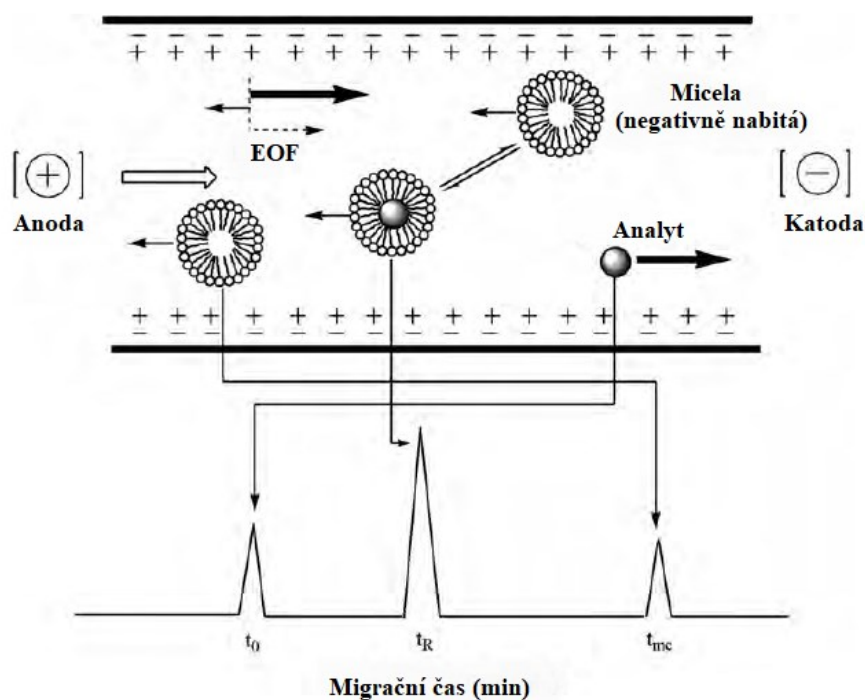
Obrázek 6 - Fyzikální vlastnosti a jejich změna při dosažení kritické micelární koncentrace, převzato a upraveno z [21].

Micely na svém povrchu nesou záporný náboj a přirozeně by migrovaly směrem k anodě, ale EOF, který je dostatečně silný a migruje ke katodě, je strhává s sebou a výsledný pohyb micel je v kapiláře ve stejném směru jako elektroosmotický tok (obr. 7). Micely mohou migrovat i opačným směrem, ke katodě, pokud by na svém povrchu nesly náboj kladný. V technice MEKC se nejčastěji používá aniontový tenzid dodecyl síran sodný (SDS), protože obsahuje vysokou hladinu surfaktantů [1; 22; 23].

MEKC dokáže oddělit nejen iontové sloučeniny, ale také neiontové sloučeniny současně. Separační mechanismus MEKC je více podobný mechanismu vysokoúčinné kapalinové chromatografie s reverzní fází (RP-HPLC) než elektroforéze. Technika MEKC dosahuje vyšší účinnosti, kdy důvodem je především rozdíl v profilu průtoku v kapilární trubici od HPLC [18].



Separace se provádí za použití BGE s vysokým pH, které zajišťuje dostatečný elektroosmotický tok. Retenční čas  $t$  pro neutrální složky se vždy nachází mezi retenčním časem neutrálního inertu, který pseudostacionární fáze nezadržuje ( $t_0$ ) a retenčním časem micel ( $t_{mc}$ ). Látky s vyššími hodnotami retenčních časů jsou více zadržované micelami. Extrémně hydrofobní složka může být zahrnuta do micel a detekována při čase  $t_{mc}$ . [22; 24].



Obrázek 7 - Schématický princip MEKC, převzato a upraveno z [25].

### 1.5.4 Izotachofórzeza

Izotachofórzeza je elektromigrační separační technika, kdy se vzorek dávkuje mezi vedoucí a koncový elektrolyt a látky se poté dělí dle jejich elektroforetických mobilit a ion migruje elektrickým polem. Směs se dělí při konstantním proudu v gradientu vysokého napětí. Zóny jsou sevřeny mezi vedoucím a koncovým elektrolytem a k místu detekce se pohybují stále stejnou rychlostí [3].

Při izotachofórzeze lze v jedné analýze separovat buď pouze kationty, anebo pouze anionty, a právě kromě separovaných kationtů nebo aniontů jsou obsaženy i opačně nabitě ionty, tzv. protiionty, které zachovávají elektroneutralitu v zónách. Po nějaké době se ustálí stacionární stav, ve kterém se všechny zóny pohybují neměnnou a stejnou rychlostí, a v němž jsou kationty seřazeny podle klesající pohyblivosti. Jednotlivé zóny jsou v tomto stavu velmi ostré, protože zde působí samozaostřující efekt, tzn. pokud kation vlivem difuze opustí svou

zónu a dostane se do zóny s méně pohyblivými kationty, začne na něj působit větší gradient potenciálu, tím se kation urychlí a dostane se zpět do své zóny. Výsledný záznam izotachoforézy se nazývá izotachoforegram a má svůj charakteristický průběh, kdy informaci o kvalitě poskytuje výška zóny, o kvantitě její šířka [26].

Iontové sloučeniny migrují v disktrétních zónách stejnou rychlostí mezi dvěma iontovými roztoky, mezi vedoucím elektrolytem, ten má nejvyšší pohyblivost a koncovým elektrolytem, ten má pohyblivost nejnižší. Analyty migrují mezi těmito elektrolyty dle své individuální pohyblivosti. V tomto nespojitém systému se mění elektrické pole, čímž se udržuje rovnoměrná rychlost migrace látek, a brání se tak mísení zón. Izotachoretický princip lze využívat pro prekoncentraci vzorků před separací v kapilární elektroforéze. Je možné tak dosáhnout až stonásobného zvýšení citlivosti [27].

### **1.5.5 Afinitní kapilární elektroforéza**

Afinitní kapilární elektroforéza (ACE) se využívá převážně v biochemii pro dělení makromolekul prostřednictvím specifické reverzibilní interakce jako například vazba enzymu substrátem nebo protilátky s antigenem [3].

ACE je vhodná především pro studium různých nekovalentních interakcí a stanovení vazebných konstant a stechiometrií. Nekovalentní intermolekulární interakce jsou všudypřítomné v chemických a biochemických systémech. Vazebné konstanty poskytují základní měřítko afinity rozpuštěné látky k ligandu. Jejich stanovení je důležitý krok v popisu molekulárních interakcí [28].

### **1.5.6 Kapilární elektrochromatografie**

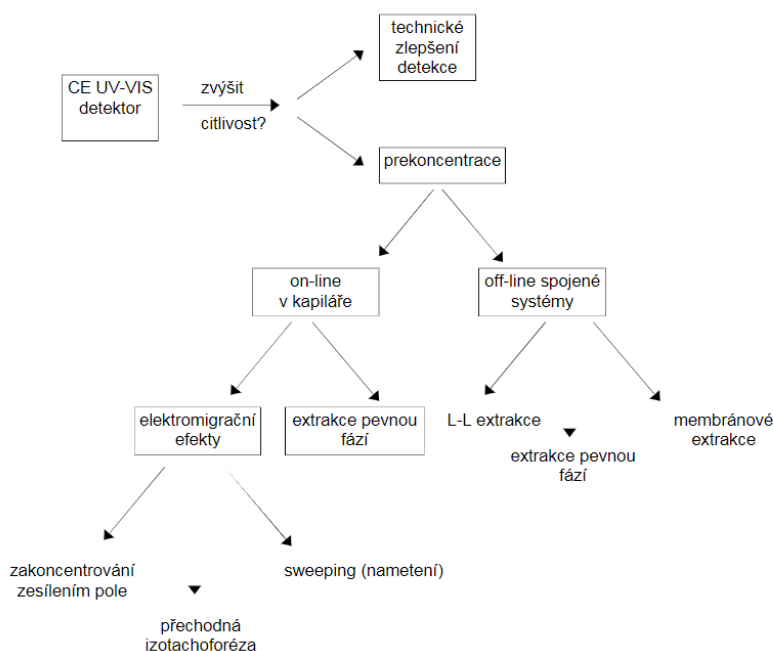
Kapilární elektrochromatografie (CEC) byla objevena v roce 1990. CEC je založená na spojení metod kapalinové chromatografie (HPLC) a kapilární elektroforézy (CE). Pohyb v CEC je způsoben elektroosmotickým tokem vzniklým díky připojení elektrického pole. Jsou zde zachovány výhody obou metod, ze kterých vzešla, a to vyšší účinnost a jednoduchost instrumentace z CE, vyšší kapacita a selektivita kolony způsobená interakcí se stacionární fází, tak jako v HPLC. V CEC dochází k separaci analytů dvojím mechanismem. Elektroneutrální i ionizované látky jsou rozseparovány na základě rozdílných interakcí se stacionární fází jako v klasické chromatografii, ale ionizované látky se navíc pohybují v elektrickém poli jejich efektivními pohyblivostmi, čímž je dosaženo právě větší selektivity separace [3].

CEC se podobá CE v tom, že se používají kolony s malým vnitřním průměrem (50–100  $\mu\text{m}$ ), aby se maximalizoval poměr povrchové plochy k objemu a mohlo být odváděno ohmicky generované teplo a tím se minimalizovaly teplotní gradienty, které by mohly způsobit rozšíření zóny. CEC je technika vhodná pro separace velmi složitých směsí přírodních produktů a biologických sloučenin, jako jsou směsi triglyceridů, karotenoidů a flavonoidů [29].

## 1.6 Metody používané k zakoncentrování vzorku

Kapilární zónová elektroforéza dosahuje nižší citlivosti nežli často používaná kapalinová chromatografie, a to z důvodu dávkování velmi malých objemů vzorku (cca nanolitřů). Jako další důvod lze uvést krátkou absorpční dráhu detekčního paprsku využívaného při měření spektrálním detektorem. Tyto citlivostní nedostatky lze eliminovat technikami realizovanými pomocí změn elektrického či chemického pole v kapiláře. Těmito technikami lze v CE zvýšit citlivost detekce, protože složky analytu je takto možné zakoncentrovat do velmi úzkých zón a zvýšit tak jejich koncentraci před provedením samotné detekce [30; 31].

Citlivost detekce lze zvýšit úpravami konstrukce detektorů nebo lze využít technik, jako je například laserem indukovaná fluorescence (LIF) nebo hmotnostní spektrometrie (MS). Tyto možnosti však jsou technicky i ekonomicky mnohem náročnější než využití on-line prekoncentrace [30; 31].



Obrázek 8 - Možnosti prekoncentrací v kapilární elektroforéze, převzato a upraveno z [30].

Mezi off-line techniky prekoncentrace vzorku lze zařadit extrakci kapalina-kapalina, extrakci pevnou fází nebo elektrokinetickou membránovou extrakci (EME). Tyto prekoncentrační techniky (obr. 8), ve srovnání s těmi on-line však nejsou dostatečně příznivé, z důvodu dlouhého zpracování a časové náročnosti. Mezi hlavní on-line techniky prekoncentrace vzorku lze řadit zakoncentrování vzorku zesílením pole (FASS), zakoncentrování přechodným pH rozhraním, zakoncentrování vzorku z velkého objemu (LVSS), techniku sweepingu a další [30; 31].

### **1.6.1 Zakoncentrování vzorku zesílením pole**

Z několika on-line prekoncentračních technik je zakoncentrování vzorku zesílením pole nejjednodušší a nejběžnější. Při FASS je hydrodynamicky dávkován vzorek s nízkou vodivostí do kapiláry naplněné vysokovodivostním základním elektrolytem. Protože intenzita elektrického pole je nepřímo úměrná vodivosti, je na vzorkovou zónu aplikováno vyšší pole než na zónu s BGE. Elektroforetická migrace iontových analytů je tedy ve vzorku rychlejší než v BGE, což způsobuje zakoncentrování analytů na hranici vzorku a elektrolytu. Následná separace probíhá s užší zónou vzorku. I když je vodivost vzorku omezena, lze dosáhnout až stonásobného zvýšení citlivosti detekce nadávkováním dlouhé zóny vzorku [30; 31].

### **1.6.2 Zakoncentrování přechodným pH rozhraním**

Metoda přechodného pH rozhraní (dynamic pH junction) je založena na rozdílné ionizaci, přesněji efektivní mobilitě slabě zásaditých a slabě kyselých vzorků (každý elektrolyt má jiné pH) ve více segmentovém systému elektrolytu. Základním předpokladem je, že například slabá kyselina je protonována při nízkém pH a ionizována při vysokém pH. Proto je pomocí kyselé matrice vzorku možné koncentrovat slabé kyseliny na hranici pH, která se pohybuje vzorkem. Tato technika se v některých ohledech velmi podobá izoelektrické fokusaci, s tím rozdílem, že v metodě přechodného pH rozhraní se používá stupňovitý gradient ke koncentraci slabých kyselin, zásad a amfolytů [32].

Obecně má matrice vzorku nižší hodnotu pH, nežli je pKa analytu a základní elektrolyt má pH naopak vyšší, než je právě pKa tohoto analytu. Kapilára se nejprve naplní elektrolytem a poté se dávkuje zóna delší než obvyklá zóna vzorku. Po aplikování napětí vstupuje matrice do oblasti základního elektrolytu. Na rozhraní se tímto vytvoří přechodný pH gradient, který uděluje molekulám analytu náboj a zvyšuje tak jejich efektivní pohyblivost a analyt fokusuje do úzké zóny [30; 33].

Pokud však nadávkujeme velký objem vzorku, může dojít k výraznému poklesu efektivity. Tato metoda nachází uplatnění v sekvenování DNA a analýze léčiv [34].

### **1.6.3 Zakoncentrování vzorku z velkého objemu**

Zakoncentrování vzorku z velkého objemu (LVSS) je další prekoncentrační metodou, při které se dávkuje velký objem vzorku s nízkou vodivostí do celého objemu kapiláry. Je zde nutné, aby matrice migrovala z kapiláry ven jejím nástřikovým koncem, což je zajištěno buď elektroosmotickým tokem anebo použitím vnějšího tlaku. Tento zbytek vzorku kromě analytu migruje z kapiláry ven v opačném směru, než migrují analyty. Analyty musí migrovat rychleji než matrice, aby došlo k jejímu odstranění. Z tohoto principu vychází, že v jedné analýze lze zakoncentrovat buď pouze kationty anebo anionty [30].

### **1.6.4 Technika nametení**

Technika nametení (sweeping) je on-line technika prekoncentrace vzorků, která zlepšuje citlivost kapilární elektroforézy. Sweeping je definován jako jev, kdy jsou analyty zachycovány a koncentrovány pseudostacionární fází, která proniká do zóny vzorku bez této fáze. Analyt je touto technikou zaostřen do úzkých pásů v kapiláře a je zvýšen objem vzorku, který lze dávkovat bez ztráty účinnosti. Při této technice lze nečistoty z matrice velmi účinně odstranit [35; 36].

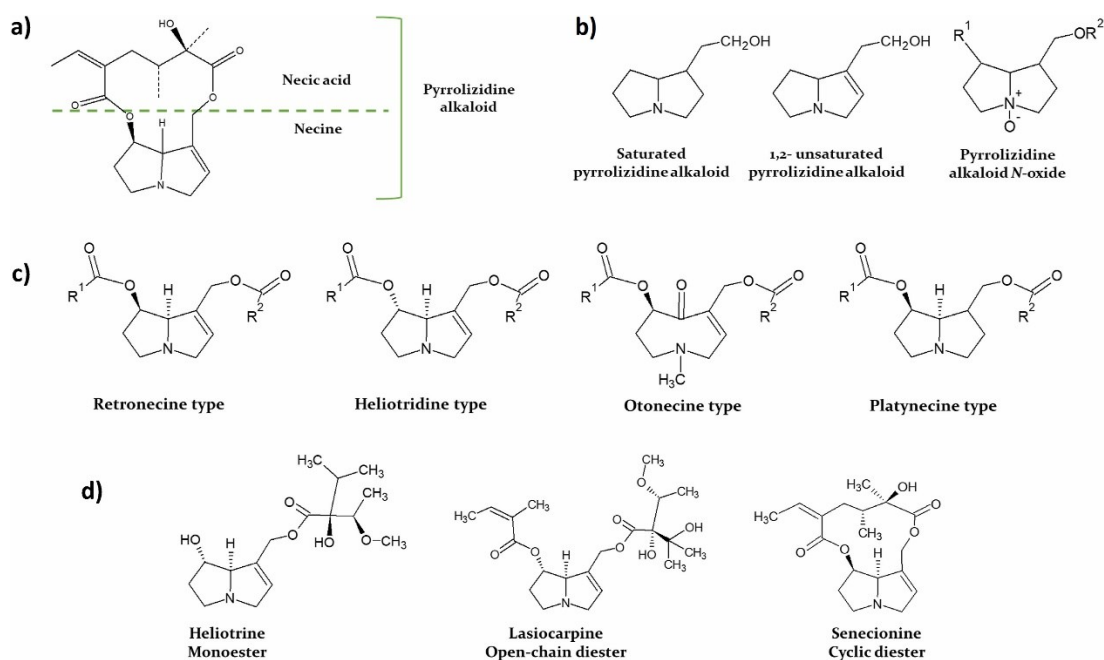
Provedení sweepingu spočívá v přidání micelotvorných látek do základního elektrolytu, ale kapilára ani vzorek toto činidlo neobsahují. Poté dochází k interakci mezi analytem (ion, neutrální látka) a pseudostacionární fází (aditivum), která proniká do široké oblasti vzorku, a právě na tomto rozhraní dochází k zakoncentrování neboli nametení vzorku do úzkého pásma. Sweeping je nezávislý na elektroosmotickém toku a probíhá optimálně, pokud je vodivost vzorku podobná vodivosti základního elektrolytu. Sweeping je účinný pro neutrální i nabitě analyty, které mají silnou afinitu k pseudostacionární fází [35].

Všeobecně se jako aditiva používají aniontové micely jako je dodecylsulfát sodný (SDS) a žlučové soli. Pro separace aniontových analytů se používají tenzidy kationtové nebo neiontové, jako je dodecyltrimethylamoniumbromid (DTAB), cetyltrimethylamoniumbromid (CTAB), nebo mikroemulze a sulfatované cyklodextriny [30; 33; 35].

## 1.7 Pyrrolizidinové alkaloidy

Alkaloidy jsou skupinou sloučenin obsahující dusík a mohou být složeny z jednoho či více atomů dusíku v rámci heterocyklického kruhu. Termín alkaloid je odvozen ze slova *alkali-like* neboli podobný alkáliím, a to proto, že zde není přesně definována hranice mezi alkaloidy a přirozeně se vyskytující komplexní aminy [37].

Pyrrolizidinové alkaloidy (PA) jsou přirozeně se vyskytující fytotoxiny jako sekundární metabolity velkého množství rostlin po celém světě, kdy cca 3 % kvetoucích rostlin je schopno vytvářet PA jako obranný mechanismus proti hmyzím škůdcům. Pyrrolizidinové alkaloidy jsou velkou skupinou cca 25 alkaloidů produkovaných asi 6000 rostlinnými druhy, spadajících do 13 různých čeledí. Až 95 % známých PA se nachází v pouze pěti čeledích rostlin a to, *Asteraceae*, *Boraginaceae*, *Fabaceae*, *Orchidaceae* a *Apocynaceae*. Celkový obsah PA v rostlinách závisí na celé řadě faktorů (druh, roční období, umístění atd.) [38; 39; 40].



Obrázek 9 - Chemická struktura pyrrolizidinových alkaloidů, převzato z [41].

Chemická struktura, která je znázorněna na obrázku 9, ve všech PA zahrnuje dva kondenzované pyrolové kruhy s dusíkovým heteroatomem, skládající se ze dvou strukturních složek, a to necinové báze (aminoalkohol odvozený od pyrrolizidinu) a necinové kyseliny odvozené od větvených aminokyselin, jako je například valin, threonin, leucin, izoleucin. Existují dvě hlavní skupiny PA, 1,2-nenasycené PA a nasycené PA. 1,2-nenasycené PA lze třídit na retronecinový, heliotridinový a otonecinový typ, zatímco platynecinový typ odpovídá

nasyčeným PA. Retronecinový a heliotridinový typ vykazuje bicyklický kruh a mají diastereoisomery v poloze 7, otonecinový typ je oxidován v poloze 8 s monocyklickým kruhem [41].

### 1.7.1 Toxicita pyrrolizidinových alkaloidů

K toxicitě pyrrolizidinových alkaloidů dochází po jejich metabolické aktivaci. Různé konkurenční metabolické cesty mohou vést buďto k detoxikaci nebo otravě. Experimentální toxikologie dokazuje, že PA mají jak akutní, tak chronickou toxicitu, kdy primárním místem metabolické aktivace jsou játra [42].

Toxicitu PA definuje již výše zmíněná chemická struktura (obr. 9), kdy pro toxické účinky jsou relevantní pouze 1,2-dehydropyrrolizidinové alkaloidy, jinak jsou považovány za netoxické. Toxicita vyžaduje metabolickou aktivaci reaktivních sloučenin a tyto metabolity vznikají působením enzymů CYP 3A4 a poté se vážou na makromolekuly, včetně DNA. Pouze relativně malá část je v nezměněné formě a většina metabolitů je navázána na tkáňové složky [42].

Bylo popsáno několik případů intoxikace s poškozením jater a následným rozvojem jaterní cirhózy. Syndromem intoxikace organismu je veno-okluzivní onemocnění nazývané senecióza. Nejzávažnější případ byl zaznamenán v roce 1988 u novorozence, příčinou intoxikace byla pravidelná konzumace léčivého čaje z podbělu a devětsilu matkou v těhotenství. Tento čaj obsahuje vysoké hladiny PA, které mohou způsobit toxické poškození jater plodu. Novorozenec po porodu zemřel na otravu těmito PA z čaje [43].

Další případ nálezů PA v čajích odhalila Státní zemědělská a potravinářská inspekce (SZPI), která kontrolovala bylinný čaj s názvem Energie (výrobce Byliny Mikeš). V tomto čaji byla odhalena asi 15x vyšší přítomnost PA, než je povoleno. Bylinná čajová směs obsahovala 2929  $\mu\text{g}/\text{kg}$  PA, přičemž nejvyšší doložené množství je stanoveno na 200  $\mu\text{g}/\text{kg}$  [44]. Smrtelná dávka pyrrolizidinových alkaloidů se pohybuje v rozmezí od 0,5 mg/kg do 3,3 mg/kg denního příjmu [45].

### 1.7.2 Zdroje pyrrolizidinových alkaloidů

Pyrrolizidinové alkaloidy a N-oxidy pyrrolizidinových alkaloidů (PA a PANO) jsou kontaminanty v mnoha potravinách, včetně mléka, masa, medu, čaje a výše zmíněných bylinných nálevů. Společná sklizeň plevelů obsahujících PA je považována za hlavní zdroj kontaminace těchto produktů na rostlinné bázi. Byla však také hlášena přirozená kontaminace

PA/PANO z půdy. Pyrrolizidinové alkaloidy mohou být také přítomny v mléce zvířat krmených plevelem ze sklizní, ale dostupné důkazy naznačují, že PA v mléce nepředstavují pro spotřebitele riziko [40; 41; 42].

Obsah PA v rostlinách se pohybuje od 100 do 40 000 mg/kg, kdy nejvyšší koncentrace, až 180 000 mg/kg, byly zjištěny u byliny *Senecio rideri* z čeledi *Asteraceae* [46].

V rostlinách jsou PA produkovány hlavně ve velmi mladých buňkách, ale jsou uloženy v různých částech rostliny, jako jsou listy a kořeny. Tvorbu pyrrolizidinových alkaloidů v rostlinách ovlivňují vnější podmínky, jako je kvalita půdy, obsah dusíku, pH půdy, světlo nebo vlhkost. PA jsou v rostlinách částečně volně, ale většinou se vyskytují ve formě solí s organickými kyselinami [47].

### 1.7.2.1 Rostlinné zdroje

#### **Třapatkovka nachová (*Echinacea purpurea*)**

Mezi léčivými rostlinami zaujímá rod *Echinacea* významné místo, třapatkovka pocházející ze Severní Ameriky je řazena do čeledi *Asteraceae*. *Echinacea* pochází z devíti různých druhů, ale pouze tři se používají jako bylinky s mnoha terapeutickými účinky. Třapatkovka nachová zvyšuje odolnost proti infekcím, zejména chřipce, a doporučuje se při snížené obranyschopnosti organismu. Používá se zejména při infekcích dýchacích a močových cest. Lze ji použít i na drobné řezné rány a popáleniny, kožní vyrážky a další kožní onemocnění. *Echinacea purpurea* tlumí bolest, čistí krev a lymfatický systém. Nadzemní část rostliny obsahuje těkavý olej a malé množství pyrrolizidinových alkaloidů, jako je tussilagin a isotussilagin [48; 49].

#### **Kostival (*Symphytum officinale*)**

Kostival lékařský je využíván jako běžný lék, který se používá v mnoha zemích světa již od 15. století. Kostival je významný zejména pro svou schopnost hojit rány, ale má i další účinky, včetně sedativních, analgetických a protikrvácivých.

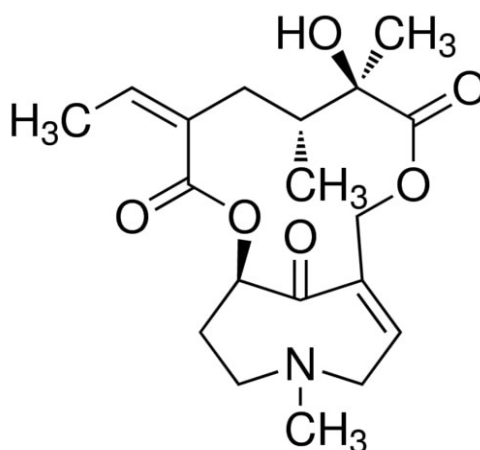
Dosud bylo identifikováno 180 různých pyrrolizidinových alkaloidů, z nichž 19 bylo izolováno z rostliny kostivalu. Bylo zjištěno, že rostlina obsahuje 14 netoxických a 5 toxických PA s hepatogenními, mutagenními a karcinogenními účinky. Toxické PA se nacházejí v různých koncentracích v celé rostlině kostivalu, ale většinou v kořenech. Mezi další chemikálie z kostivalu s významnými farmakologickými a toxickými účinky patří: alantoin, kyselina kávová, karoten, trísloviny a další [50].



### Podběl lékařský (*Tussilago farfara*)

*Tussilago farfara* je čínská bylina se žlutými květy z čeledi *Asteraceae*, jejíž listy se sklízí v květnu a červnu. Listy obsahují látky jako třísloviny, pentacyklické triterpeny, steroly, flavonoidy, kyselinu skořicovou a pyrrolizidinové alkaloidy jako jsou senkirkin (obr. 10), senecionin (obr. 11), tussilagin a isotussilagin. Množství těchto látek je dáno geneticky [51].

Podběl se běžně používá pro úlevu od kašle, jelikož má protizánětlivé účinky, ale toxické PA, které obsahuje, mohou způsobit vážné poškození jater. Z tohoto důvodu některé země zavedly předpisy omezující denní příjem PA nebo jejich N-oxidů z rostlinných přípravků. Stanovení PA v *T. farfara* je zásadní pro kontrolu kvality této rostliny a příbuzných preparátů. Z těchto důvodů bylo také navrhováno odstranit podběl z oficiálního seznamu léků [52; 53].



Obrázek 10 – Senkirkin, převzato z [54].

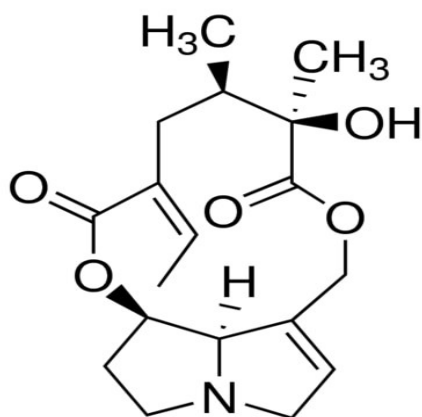
### Starček přímětník (*Senecio jacobaea*)

Starček přímětník je nebezpečný plevel, jehož rostlina obsahuje pyrrolizidinové alkaloidy, jimiž jsou senecionin (obr. 11), seneciphyllin a jejich N-oxidy. V malých dávkách může způsobit rakovinu jater, ale ve velkých dávkách může být až smrtelný. Tato bylina se do čajových směsí nepoužívá. V Evropě je starček zvláště odpovědný za otravu koní a skotu a jeho konzumace za čerstva nebo jako součást sena může být pro tato zvířata smrtelná. Mezi příznaky otravy u koní, kteří jsou zvláště citliví na otravu senecioninem ze starčeku, patří nervozita, zívání, letargie a podivná chůze. Zvířata umírají, když zkonzumují 4–8 % hmotnosti rostliny [55; 56].

Alkaloid senecionin lze izolovat z různých rostlinných zdrojů, kromě dalších alkaloidů se nachází v rostlině *Senecio vulgaris* neboli starčeku obecném, dále pak *S. paludosus* neboli

starčeku bažinném a *S.silvaticus* neboli starčeku lesním. Tyto byliny se často používají jako lidový lék na diabetes mellitus, krvácení, vysoký krevní tlak a křeče [37; 57].

U lidí z Jižní Afriky byla hlášena otrava z kontaminovaného chleba a v Západní Indii byla zase hlášena otrava bylinným čajem z chřestnatce z čeledi *Fabaceae* [56].



Obrázek 11 – Senecionin, převzato z [58].

### 1.7.2.2 Živočišné zdroje

Pyrrolizidinové alkaloidy se mohou dostat do stravy přenosem semen nebo jiných částí bylinných rostlin, lze je ale také nalézt v medu, kam se dostávají přenosem pylu, nebo v mléce, kam se dostanou přenosem z krmiva. Bezpečná hladina příjmu PA byla předběžně stanovena na 1 mg alkaloidu na kg tělesné hmotnosti [59; 60].

#### Med

Úřad pro bezpečnost potravin Austrálie a Nového Zélandu (FSANZ) uvádí, že med produkovaný včelami, které se živí květy druhů *Echium*, může obsahovat vysoké hladiny PA. Množství PA v různých druzích medu se velmi liší, přičemž největší riziko je u medu produkovaného z jednoho druhu. Dlouhodobé vystavení velkému množství může poškodit játra a ohrožení jsou lidé, kteří konzumují více než dvě polévkové lžíce medu denně. Je ale nepravděpodobné, že by med z jiných zdrojů obsahoval nebezpečné hladiny těchto alkaloidů a neexistují žádné zprávy o nemoci spojené s konzumací medu [61; 62].

#### Mléko

PA se do mléka dostávají krmivem, ale pouze v malých množstvích, cca 0,04–0,08 % z příjmu tohoto krmiva. Prasata, skot a koně jsou vysoce citlivé druhy zvířat na PA, zatímco

ovce, kozy a králíci nikoli. Mutagenní účinky byly prokázány v mléce kojících potkanů krmených PA. Bylo také prokázáno, že poškození jater může nastat u myši krmených kozím mlékem kontaminovaným *Senecio jacobaea* [63; 64].

Nezávislý vědecký orgán, který přezkoumává chemické látky v potravinách, spotřebních výrobcích a životním prostředí (COT), na základě dostupných informací dospěl k závěru, že PA v mléce nepředstavují riziko pro lidské zdraví [43].

## **Maso a vejce**

*Senecio jacobaea* je druh, který obsahuje toxické PA, které mohou zabít i pasoucí se zvířata. Alkaloidy se dostávají do těla zvířete po požití pastevní trávy a později se nacházejí v mléce nebo mase hospodářských zvířat. [65].

Otravy PA v mase kuřat jsou monitorovány kontrolou kvality zrna v krmivu, ale existují také důkazy, že PA mohou být přeneseny i do vajec. Pyrrolizidinové alkaloidy, které byly zjištěny ve vejcích, překročily maximální povolenou koncentraci stanovenou na 0,1 µg. I přesto, že neexistují žádné důkazy o chronických zdravotních problémech způsobených konzumací těchto produktů, jsou i další potraviny, včetně obilí a masa, které vyžadují sledování pro zajištění jejich bezpečného příjmu [66; 67].

### **1.7.3 Analýza pyrrolizidinových alkaloidů**

Roxana Lebeda, Andrea Schreier a kolektiv, na Univerzitě ve Vídni, Ústav farmakognozie, prováděli kvantifikační metodu pro analýzu PA v podbělu lékařském pomocí kapilární elektroforézy s vnitřní a externí standardizací. Jejich vyvinutá metoda je velmi citlivá, umožňuje kvantifikaci méně než 0,5 ppm senkirkinu a senecioninu ve vzorku [68].

Při přípravě vzorků byly testovány různé extrakční postupy, kdy nejlépe vyšla metoda, při které byl vzorek zahříván pod zpětným chladičem 15 minut s 50% methanolem okyseleným kyselinou citronovou na pH 2-3. Na závěr bylo provedeno čištění extraktů za pomoci extrakce na pevné fázi na patronách s diolovou fází. Tento postup extrakce alkaloidů je největší výhodou metody, která nahrazuje zdlouhavou Soxhletovu extrakci a vzhledem k vysoké citlivosti a krátké době analýzy je kapilární elektroforéza doplňkovou metodou při kvantifikaci pyrrolizidinových alkaloidů [68].

Samotná separace byla provedena na modelu SpectraPHORESIS2 1000 (San José, CA, USA) s kapilárou o vnitřním průměru 75 µm z křemenného skla, detekce byla uskutečněna pomocí UV detektoru. Jako elektrolyt byl použit fosforečnanový pufr

(20 mM, pH 4) s přidavkem kyseliny citronové. Všechny analýzy byly prováděny při teplotě 25 °C s konstantním napětím 30 kV. Bylo použito hydrodynamické dávkování po dobu jedné sekundy pro PA s koncentrací 50 ppm a vyšší, pro nižší koncentrace bylo dávkování prodlouženo na dvě sekundy. Vlnová délka detekce byla zvolena 220 nm. Separace alkaloidů bylo dosaženo za méně než 10 minut a to tak, že doba migrace senecioninu byla 7,2 minut a doba migrace senkirkinu byla 7,4 minut [68].

Lijun Yu Sam Fong Yau Li, (Katedra chemie, Singapurská republika) vyvinuli on-line prekoncentrační metodu kombinující zakoncentrování přechodným pH rozhraním a nametením (dynamic pH junction-sweeping). Tato technika byla použita pro analýzu čtyř toxických pyrrolizidinových alkaloidů, a to senkirkinu, senecioninu, retrorsinu a seneciphylinu v čínské bylině *Kuan donghua* [69].

Přímá elektrokinetická prekoncentrace nástřiku velkého objemu (až 20 % délky kapiláry) na kapiláře byla provedena pomocí dynamické pH junction-sweeping metody. Vzorek matrice byl složen z 10 mM fosfátu s 20 % v/v methanolu, pracovní elektrolyt obsahoval 20 mM boritan, 30 mM SDS a 20 % v/v methanolu, hodnota pH byla 9,1. Všechny separace byly provedeny na CE-P2 Autosampler (CE Resources Singapur) s UV/VIS detektorem (SPD-10AVP, Shimadzu, Japonsko). Délka kapiláry z křemenného skla (Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, USA) byla 60 cm a její efektivní délka byla 50 cm. Vnitřní průměr činil 50  $\mu\text{m}$  a vnější průměr 368  $\mu\text{m}$ . Elektroforetická separace byla provedena při vložení napětí 20 kV a teplotou 22 °C. Data byla shromážděna softwarem CSW (DataApex, Česká republika) [69].

Příprava vzorku spočívala v navážení jednoho gramu prášku z byliny, který byl zahříván pod zpětným chladičem po dobu 30 minut s 60 ml 50% methanolem okyseleným kyselinou citronovou na pH 2-3. Po vychladnutí byl roztok zfiltrován a vyextrahován dvojnásobnou extrakcí pomocí 30 ml dichlormethanu a dvakrát pomocí 30 ml etheru za účelem odstranění lipofilních látek ze vzorku. Vodný roztok byl poté alkalizován 25% hydroxidem amonným o pH 9-10 a PA jako volné báze byly extrahovány trojnásobnou extrakcí 30 ml dichlormethanu. Všechny tři organické vrstvy byly spojeny a odpařeny do sucha a poté byl zbytek znovu rozpuštěn v 1 ml methanolu pro CE analýzu. Tato prekoncentrační metoda vedla k účinné identifikaci a stanovení stopových hladin toxických PA (30 ppb) v reálných vzorcích.

Výše zmíněná metoda [68] umožňovala kvantifikaci přibližně 0,5 ppm senkirkinu a senecioninu za 10 minut, avšak metoda funguje pro relativně vysoké množství PA v bylinách. Není tolik vhodná pro detekci nižších koncentrací PA, které mohou být v bylině přítomny,

proto byla vyvinuta metoda s vysokou citlivostí a selektivitou pro analýzu toxických PA a snížilo se tak riziko pro spotřebitele [69].

Kun Cao a kolektiv (Chemická škola a Chemické inženýrství, Univerzita Chongqing, Chongqing, P. R. Čína) použili on-line prekoncentraci za cílem zlepšit citlivost PA u *Tussilago farfara*. Metoda spočívala v zakoncentrování vzorku zesílením pole a sweepingu v micelární elektrokinetické chromatografii. Limity detekce senkirkinu a senecioninu byly 2-5 µg/l [53].

Všechny experimenty byly provedeny s použitím CL1020 CE (Cailu, Peking, Čína) s UV detektorem. Kapilára z taveného oxidu křemičitého (Yongnian Ruifeng Chromatography Devices Company, Hebei, Čína) s vnitřním průměrem 50 µm, celková délka kapiláry činila 58 cm a její efektivní délka byla 50 cm. Separace byly prováděny při 25 °C. Separace byly provedeny při vkládaném napětí s normální polaritou (15 kV), UV detekce byla měřena při 220 nm. Pro FASS-sweeping MEKC byly analyty rozpuštěny ve 40 mM boritanovém elektrolytu (pH 4,8), pracovním elektrolytem byl 40 mM boritanový elektrolyt (pH 9,5) s přídavkem 10 mM SDS a 5 % v/v methanolu. Roztok vzorku byl hydrodynamicky dávkován do kapiláry do délky 20 cm po dobu 90 s. V této studii byla vyvinuta citlivá, jednoduchá a rychlá metoda FASS-sweeping MEKC pro analýzu toxických PA v rostlině *Tussilago farfara*. Tato metoda byla ukázána jako užitečný nástroj pro rychlé a citlivé stanovení PA v tradičních čínských bylinných vzorcích. Tyto výsledky by mohly přispět k vhodnému využití zdroje *Tussilago farfara* potravinách, farmaceutickém průmyslu a dalších oblastech [53].

## 2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 2.1 Chemikálie a pomůcky

Aceton	Sigma – Aldrich, Německo
Acetonitril	Sigma – Aldrich, Německo
Deionizovaná voda – připravená na přístroji Milli-Q <sup>®</sup> Reference Water Purification System (Merck, Billerica, MA, USA)	
Dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát p. a.	Sigma – Aldrich, Německo
Dimethylakrylamid	Sigma – Aldrich, Německo
Dodecylsíran sodný	Sigma – Aldrich, Německo
Hydroxid sodný	Sigma – Aldrich, Německo
Izopropylalkohol	Sigma – Aldrich, Německo
Kyselina chlorovodíková 35%	Sigma – Aldrich, Německo
Kyselina octová	Sigma – Aldrich, Německo
Metanol	Sigma – Aldrich, Německo
Peroxodisíran amonný	Sigma – Aldrich, Německo
Senecionin	Sigma – Aldrich, Německo
Senkirkin	Sigma – Aldrich, Německo
Tetraboritan sodný dekahydrát p. a.	Sigma – Aldrich, Německo
Tetramethylethylendiamin	Sigma – Aldrich, Německo
Thiomočovina	Sigma – Aldrich, Německo
$\gamma$ -metakrylopropyltrimethoxysilan	Sigma – Aldrich, Německo

### 2.2 Použité přístroje a vybavení

Kapilární elektroforetický systém Agilent 7100 (Agilent, Palo Alto, CA, USA) vybavený autosamplerem a detektorem diodového pole

Kapilární elektroforetický systém Agilent 1600 (Agilent, Palo Alto, CA, USA) vybavený autosamplerem a detektorem diodového pole

pH-metr ORION STAR A21 (Thermo Scientific, Finsko)

Křemenná separační kapilára (Polymicro Technologies, USA) pokrytá o vnitřním průměru 50  $\mu$ m a délce 60 cm, efektivní délka 52 cm

Křemenná separační kapilára (Polymicro Technologies, USA) pokrytá o vnitřním průměru 50  $\mu$ m a délce 50 cm, efektivní délka 42 cm

Křemenná separační kapilára (Polymicro Technologies, USA) nepokrytá o vnitřním průměru 50  $\mu\text{m}$  a délce 60 cm, efektivní délka 52 cm  
Analytické váhy AB204 (Mettler Toledo, Švýcarsko)  
Automatické pipety (Thermo Scientific, Finsko)  
Mikrozkumavky (Eppendorf, Hamburg, Německo)  
Centrifuga Micro High Speed Jet (Heathrow Scientific, USA)  
Vortex (BioTech a.s., Praha, Česká republika)  
Ultrazvuková lázeň Bandelin (Bandelin GmbH, Berlín, Německo)

### 2.3 Příprava roztoků pro pokrytí kapiláry

Pro pokrytí kapilár byly připraveny následující roztoky:

Roztok 10% MPT: 100  $\mu\text{l}$   $\gamma$ -metakrylopropyltrimethoxysilanu  
450  $\mu\text{l}$  kyseliny octové  
450  $\mu\text{l}$  acetonu

Roztok 10% DMA: 35 ml destilované vody  
4 ml dimethylakrylamidu  
odvzdušnění v ultrazvuku 20 minut při 45 °C pod vakuem

Roztok 10% TEMED: 0,1 ml TEMEDu (tetramethylethyldiamin)  
0,9 ml destilované vody

Roztok 10% APS: 0,1 g peroxodisíranu amonného  
1 ml destilované vody

Roztok 1% DMA: 100  $\mu\text{l}$  10% dimethylakrylamidu  
865  $\mu\text{l}$  destilované vody  
35  $\mu\text{l}$  isopropylalkoholu  
5  $\mu\text{l}$  10% TEMEDu  
5  $\mu\text{l}$  10% APS

### 2.4 Pokrývání křemenných kapilár polydimethylakrylamidem

Příprava vnitřního povrchu kapiláry spočívala v promývání acetonem po dobu 10 minut, 1 M NaOH po dobu 30 minut, 0,1 M HCl po dobu 10 minut, destilovanou vodou 10 minut a nakonec 10% roztokem MPT 30 minut. Následně byly konce kapilár uzavřeny septy a ponechány 20 hodin při laboratorní teplotě. Potom byly profouknuty dusíkem a propláchnuty acetonem a naplněny 1% roztokem DMA a promývány po dobu 15 minut. Konce kapilár byly

znovu uzavřeny septy a kapiláry byly ponechány na usušení při 50 °C celkem 3 hodiny. Následně byly zchlazeny, profouknuty dusíkem, proplachovány vodou po dobu 10 minut a na závěr vysušeny dusíkem. Takto pokrytá kapilára byla připravena dle postupu popsaného Wanem a kol [70].

## 2.5 Příprava základních elektrolytů a dalších roztoků

Pro přípravu fosforečnanového pufru o koncentraci 10 mmol/l byl navážen dihydrát dihydrogenfosforečnan sodný a připraven tak roztok o dané koncentraci. Pomocí pH metru bylo stanoveno jeho pH na 4,71. Dále byl připravován boritanový pufr o koncentraci 20 mmol/l, pro který byl navážen dekahydrát tetraboritanu disodného a připraven tak roztok o požadované koncentraci. Pomocí pH metru bylo stanoveno pH tohoto roztoku na 9,38.

Dále byly připraveny roztoky thiomočoviny a to tak, že krystal thiomočoviny byl rozpuštěn v 600  $\mu$ l připraveném fosforečnanovém pufru a jeden krystal v pufru boritanovém.

Pro přípravu roztoku dodecyl síranu sodného (SDS) o koncentraci 10 mmol/l bylo naváženo potřebné množství SDS, po zahřátí rozpuštěno v boritanovém pufru a doplněno po rysku. Při přípravě vyšších koncentrací SDS bylo postupováno totožně, pouze s odpovídající vyšší navázkou chemikálie. Pufry s přísadkami jako byl acetonitril a methanol byly připravovány pipetováním potřebného procentuálního podílu rovnou do odměrné baňky s potřebným pufrům, ze kterého byly doplněny i roztoky s potřebnou koncentrací SDS.

## 2.6 Příprava vzorků

Standards alkaloidů, ze kterých byly připravovány roztoky, byly skladovány v lednici při teplotě 2-8 °C. Vzorek senkirkinu byl připraven jako zásobní roztok rozpuštěný ve vodě a methanolu v poměru 1:1 s výslednou koncentrací 0,22 mg/ml, ze kterého byla dále připravována kalibrační řada. Pro změření migračních charakteristik byl standard odpipetován 600  $\mu$ l do elektroforetické vialky, následně byl pro prekoncentraci připraven jako vzorek 10x vodou ředěný a 100x vodou ředěný.

Pro změření migračních charakteristik senecioninu byl krystal tohoto standardu rozpuštěn ve vodě a methanolu do 600  $\mu$ l do elektroforetické vialky. Pro prekoncentraci byl připraven tak, že 5 mg bylo rozpuštěno ve vodě a methanolu v poměru 1:1. Část tohoto roztoku byla odebrána a přidána do fosforečnanového pufru s pH 4,71. Takto připravený roztok pro analýzu byl napipetován do elektroforetické vialky. Jako základní elektrolyt byl



použit borátový pufr o pH 9,38. Dalším používaným elektrolytem byl borátový pufr s přídavkem 30 mM SDS a další s přídavkem 30 mM SDS a 5 % v/v acetonitrilu. Stejným způsobem byl připraven vzorek senkirkinu a také směs senkirkinu a senecioninu.

## 2.7 Postup analýzy

Kapilára byla vložena do elektroforetického analyzátoru v kazetě (cartridge), která je uzpůsobená UV-VIS detekci, před jejím uvedením do provozu byla předkondicionována proplachem po dobu 15 minut NaOH (0,1 M), po dobu 15 minut s vodou Milli-Q a po dobu 15 minut s daným elektrolytem před prvním spuštěním. Pro zbavení se bublin na elektroforetickém záznamu byly připravené elektrolyty a standardy alkaloidů odstředěny v mikrozkuhavce Eppendorf o objemu 1,5 ml při 10 000 otáčkách za minutu na centrifuze Micro High Speed Jet po dobu 5 minut. Do elektroforetické vialky bylo odpipetováno 600  $\mu$ l roztoku z vrchní části mikrozkuhavky.

Analýzy migračních časů senkirkinu a senecioninu byly prováděny pomocí 10 mM fosforečnanového pufru nebo 20 mM boritanového pufru. Dále byl experiment měřen v 10 mM, 20 mM, 30 mM, 40 mM, 50 mM roztocích SDS doplněných 20 mM boritanovým pufrům. Poté v celé řadě (10 až 50 mM SDS) s přídavkem aditiv, a to s 5, 10, 15, 20 % v/v acetonitrilu a 5, 10, 15, 20 % v/v methanolu, prekoncentrace byla provedena v různých kombinacích SDS a aditiv viz příloha 1.

Všechny analýzy probíhaly při 25 °C, dávkování tlakem 50 mbar (~5 kPa) a vlnová délka pro detekci byla volena 214 až 280 nm. Doba dávkování vzorků se různě měnila (zvyšoval se čas). Některá měření byla provedena při kladném napětí (25 kV) a některá zase při napětí záporném (-25 kV). Každý den před a po měření byla kapilára promyta 0,1 M NaOH po dobu 10 minut a následně ještě deionizovanou vodou Milli-Q po dobu 5 minut.

### 3 VÝSLEDKY A DISKUZE

Při zpracování experimentální části diplomové práce byla nejprve připravena pokrytá kapilára a následně testována rychlost elektroosmotického toku v nepokryté a pokryté kapiláře pro potvrzení účinnosti pokrytí. Dále byly měřeny migrační charakteristiky vybraných standardů pyrrolizidinových alkaloidů ve zvolených elektrolytech. Byly sledovány jejich zdánlivé pohyblivosti v boritanovém pufru s přidavkem SDS a dalších aditiv. Poté byly aplikovány prekoncentrační kroky jak v pokrytých, tak v nepokrytých kapilárách. Všechny analýzy byly měřeny při 25 °C.

#### 3.1 Rychlé a přesné měření elektroosmotického toku v nepokryté a pokryté kapiláře

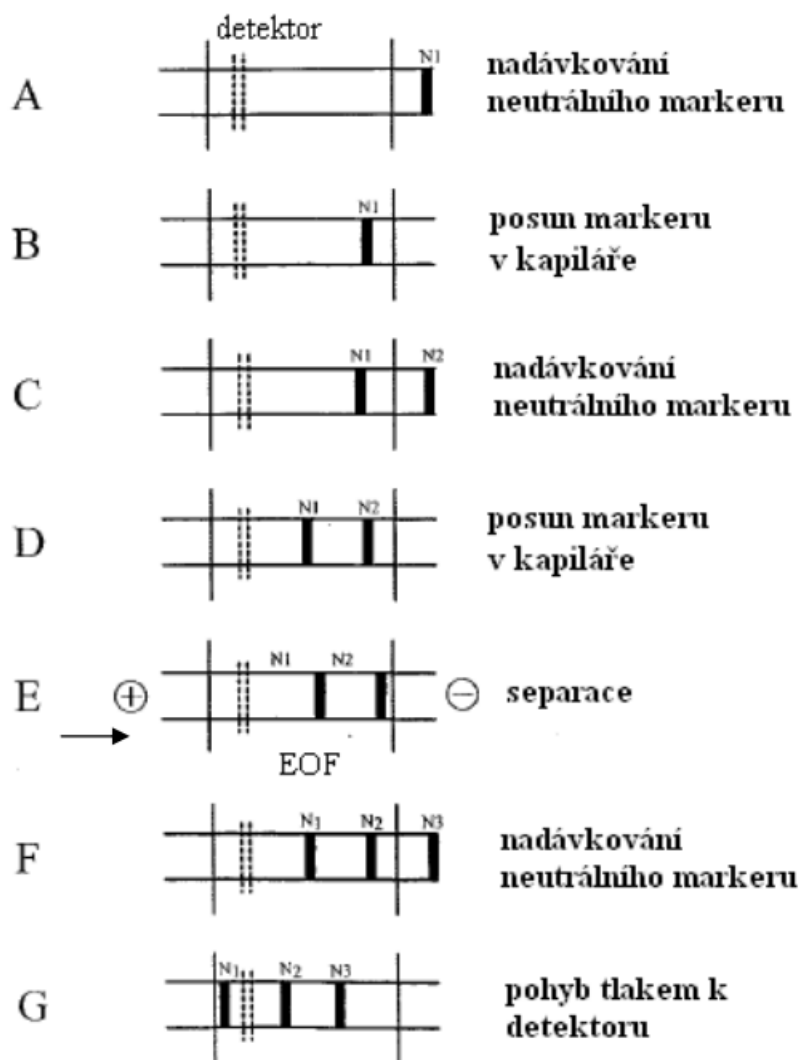
Permanentní pokrytí kapiláry je založeno na kovalentní vazbě nebo fyzikální adsorpci mezi činidlem a stěnou kapiláry, čímž lze eliminovat EOF a interakce analytu s kapilárou. Pokrytí, kdy je vrstva fyzikálně adsorbovaná – elektrostaticky, hydrofobními interakcemi či vodíkovými vazbami – se upřednostňuje před kovalentním pokrytím pro jednoduchost regenerace kapiláry. Příprava kovalentně vázané vrstvy, jíž se dosáhne celistvého odolného pokrytí kapiláry polymerem, má několik kroků: Předúprava, zavedení dvojných vazeb na stěnu kapiláry, a nakonec navázání polymeru na připravenou mezivrstvu. Postup jako první popsal Hjertén. Pro statické pokrytí se z neutrálních polymerů vytvářejících hydrofilní povrch v této diplomové práci využívá polydimethylakrylamid [71; 72]. U kapilár pokrytých dimethylakrylamidem je díky hydrofobnějšímu povrchu v porovnání s polyakrylamidem zajištěna vyšší stabilita při alkalickém pH [70].

Jelikož elektroosmotický tok výrazně ovlivňuje separaci analytů, je potřeba změřit jeho rychlost. Nejjednodušší způsob provedení je nastříknutí nenabitě sloučeniny, tzv. elektroneutrálního markeru, v tomto případě thiomočoviny do kapiláry. V připravené pokryté kapiláře bylo předpokládáno potlačení EOF, a proto byla použita metoda dle Williamse [73] znázorněná níže na obrázku s číslem 12.

Elektroosmotický tok byl proměřen v pokryté i nepokryté kapiláře pro porovnání jeho potlačení za pomoci thiomočoviny jak ve fosforečnanovém, tak i v boritanovém pufru. Analýzy elektroneutrálního markeru byly provedeny při napětí 25 kV a vlnové délce 230 nm. Výpočet elektroosmotického toku je znázorněn v tabulce 1 níže v textu, v nepokryté kapiláře byly analýzy v obou pufrech opakovány 2x, jak je uvedeno v tabulkách 2 a 3 v příloze 1,

v kapiláře pokryté byly analýzy opakovány celkem 5x, jak je uvedeno v tabulkách 4 a 5 v příloze 1.

Před samotnou analýzou bylo provedeno promytí kapiláry elektrolytem po dobu 90 s, poté bylo provedeno plnění kapiláry thiomocovinou jako markeru elektroosmózy při podmínkách 50 mbar (~5 kPa) po dobu 10 s, nadávkování elektrolytu při 50 mbar (~5 kPa) 30 s, dále znovu thiomocovinou 10 s, elektrolytem 30 s a thiomocovinou 10 s. Napětí 25 kV bylo aplikováno v kroku E, uvedeném na obrázku 12, a to po dobu 60 s.



Obrázek 12 - Princip metody pro rychlé stanovení EOF, převzato a upraveno z [73].

Po změření migračních časů thiomocoviny v pokryté i nepokryté kapiláře byla vypočtena mobilita elektroosmotického toku, pro výpočet byly použity následující upravené vztahy [73]:

$$v_m = \frac{l_d}{t_{N_3} + \frac{t_{inj}}{2}} \quad (13)$$

$$l_{eof} = \left( (t_{N_3} - t_{N_2}) - (t_{N_2} - t_{N_1}) \right) * v_m \quad (14)$$

$$\mu_{eof} = \frac{l_{eof} * l_t}{t_m * V} \quad (15)$$

Kde  $v_m$  je rychlost migrace, kterou se pohybují jednotlivé zóny markeru (zde thiomocoviny  $N_1, N_2, N_3$ ),  $\frac{t_{inj}}{2}$  vyjadřuje korekci pohybu poslední zóny neutrálního markeru (zde  $\frac{10}{2}$  s),  $t_{N_1}, t_{N_2}, t_{N_3}$  jsou migrační časy jednotlivých zón markeru,  $l_{eof}$  je vzdálenost, kterou urazí zóny elektroneutrálního markeru během elektroforézy a  $t_m$  je čas, po který je aplikováno napětí (zde 60 s).

Tabulka 1 - Stanovení EOF na nepokryté kapiláře v 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pufru (pH 4,71), napětí 25 kV, teplota 25 °C, dávkování tlakem 50 mbar (~5 kPa)/10 s

	1. měření	2. měření
$t_{N1}$ (min)	8,788	8,459
$t_{N2}$ (min)	9,498	9,135
$t_{N3}$ (min)	12,561	12,006
$v_m$ (ms <sup>-1</sup> )	6,85*10 <sup>-4</sup>	7,169*10 <sup>-4</sup>
$l_{eof}$ (m)	9,677*10 <sup>-2</sup>	9,441*10 <sup>-2</sup>
$\mu_{eof}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	3,871 *10 <sup>-8</sup>	3,777 *10 <sup>-8</sup>

Ukázka výpočtu z prvního měření:

$$v_m = \frac{l_d}{t_{N_3} + \frac{t_{inj}}{2}} = \frac{0,52}{12,561 * 60 + \frac{10}{2}} = 6,85 * 10^{-4} \text{ s}$$

$$\begin{aligned} l_{eof} &= \left( (t_{N_3} - t_{N_2}) - (t_{N_2} - t_{N_1}) \right) * v_m \\ &= \left( (12,561 * 60 - 9,498 * 60) - (9,498 * 60 - 7,88 * 60) \right) * 6,85 * 10^{-4} \\ &= 9,677 * 10^{-2} \text{ m} \end{aligned}$$

$$u_{eof} = \frac{l_{eof} * l_t}{t_m * V} = \frac{9,677 * 10^{-2} * 0,6}{60 * 25 * 10^3} = 3,871 * 10^{-8} \text{ m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$$

Potlačení EOF v pokryté kapiláře bylo potvrzeno, jelikož v připravené pokryté kapiláře ve 20 mM Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> pufru měl EOF hodnotu 8,8\*10<sup>-10</sup> m<sup>2</sup>V<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> a ve 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pufru měl EOF hodnotu 1,255\*10<sup>-9</sup> m<sup>2</sup>V<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>. Kdežto v nepokrytých kapilárách měl EOF hodnotu 3,823\*10<sup>-8</sup> m<sup>2</sup>V<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>, v 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pufru a v pufru 20 mM Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> byla jeho hodnota 6,078\*10<sup>-8</sup> m<sup>2</sup>V<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>. Z těchto dat je i potvrzeno, že EOF dosahuje vyšších hodnot v pufru s vyšším pH. Hodnoty jsou uvedeny v tabulkách 2, 3, 4 a 5 v příloze 1.

## 3.2 Migrační charakteristiky senkirkinu a senecioninu v základních elektrolytech v pokryté kapiláře

Migrační charakteristiky standardů senkirkinu a senecioninu byly proměřeny ve fosforečnanovém (pH 4,71) a boritanovém pufru (pH 9,38). Postupně byly prováděny analýzy standardů v boritanovém pufru (pH 9,38) s přidavkem dodecyl síranu sodného (SDS) o koncentracích 10 mM, 20 mM, 30 mM, 40 mM, 50 mM SDS. Poté byly pohyblivosti proměřovány s přidavkem dalších aditiv, a to konkrétně acetonitrilu (ACN) a methanolu (MeOH). Byla zde použita totožná metoda jako ke stanovení EOF, s tím rozdílem, že pro měření a výpočet byla použita kratší pokrytá kapilára. Změřené závislosti jsou promítnuty do grafů 1, 4, 5, 6, 9 a 10.

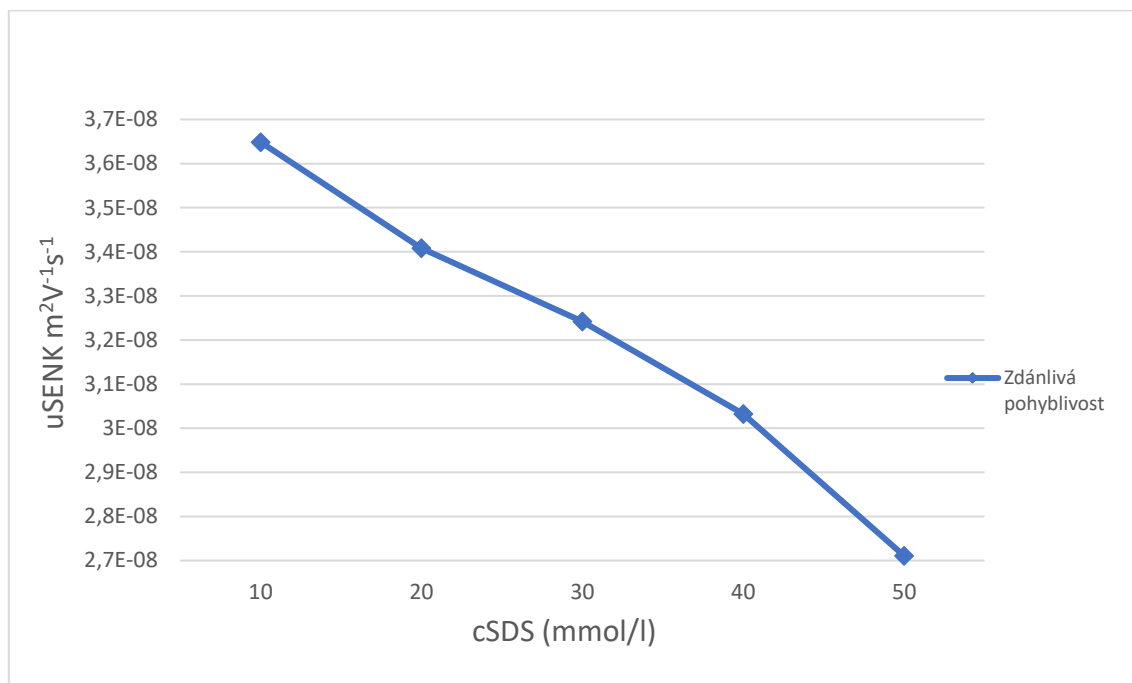
V případě pokrytí vnitřního povrchu křemenné kapiláry dojde k potlačení elektroosmotického toku a molekuly analytu se pohybují jen svou vlastní elektroforetickou pohyblivostí, případně spolu s micelami SDS. Jelikož bylo ale zjištěno, že se EOF v průběhu analýz postupně zvyšoval kvůli postupnému vymývání pokrytí z kapiláry, byly zde dopočítány pouze zdánlivé pohyblivosti pyrrolizidinových alkaloidů. Na základě tohoto zjištění se dále pokračovalo s prekoncentrací senecioninu s nepokrytou kapilárou.

V normálním uspořádání elektroforetických separací je detektor na straně katody (záporně nabitá elektroda), micely SDS mají na svém povrchu záporný náboj a migrují směrem k anodě, tzn. v opačném směru než EOF, který migruje směrem ke katodě. Skutečné (efektivní) elektroforetické pohyblivosti jsou u většiny iontů menší než elektroosmotická pohyblivost. V případě negativně nabitých micel SDS jsou kationty silně přitahovány k negativně nabitým micelám za vzniku iontových párů, a proto migrují pomaleji, někdy i za neutrálními látkami.

Migrace senkirkinu a senecioninu ve fosforečnanovém pufru (pH 4,71) v pokryté kapiláře závisí na několika faktorech, včetně náboje, velikosti a účinnosti pokrytí kapiláry. Senkirkin i senecionin jsou PA s podobnou chemickou strukturou, ale mají různé funkční skupiny a molekulové hmotnosti, a proto se jejich migrační charakteristiky i za stejných experimentálních mohou mírně lišit. Jsou to bazické sloučeniny, které protonací za kyselých podmínek získávají kladný náboj, což vede k migraci směrem ke katodě. Jejich hodnoty pKa jsou následující: senkirkin  $6,77 \pm 0,6 / 12,67 \pm 0,4$ ; senecionin  $5,86 \pm 0,6 / 12,81 \pm 0,4$ . Tyto hodnoty byly vypočtené pomocí software Advanced Chemistry Development (ACD/Labs) Software V11.02 (© 1994-2023 ACD/Labs). Výsledné migrační charakteristiky těchto alkaloidů v pufru fosforečnanovém jsou uvedeny v tabulkách 6 a 55 v příloze 1.

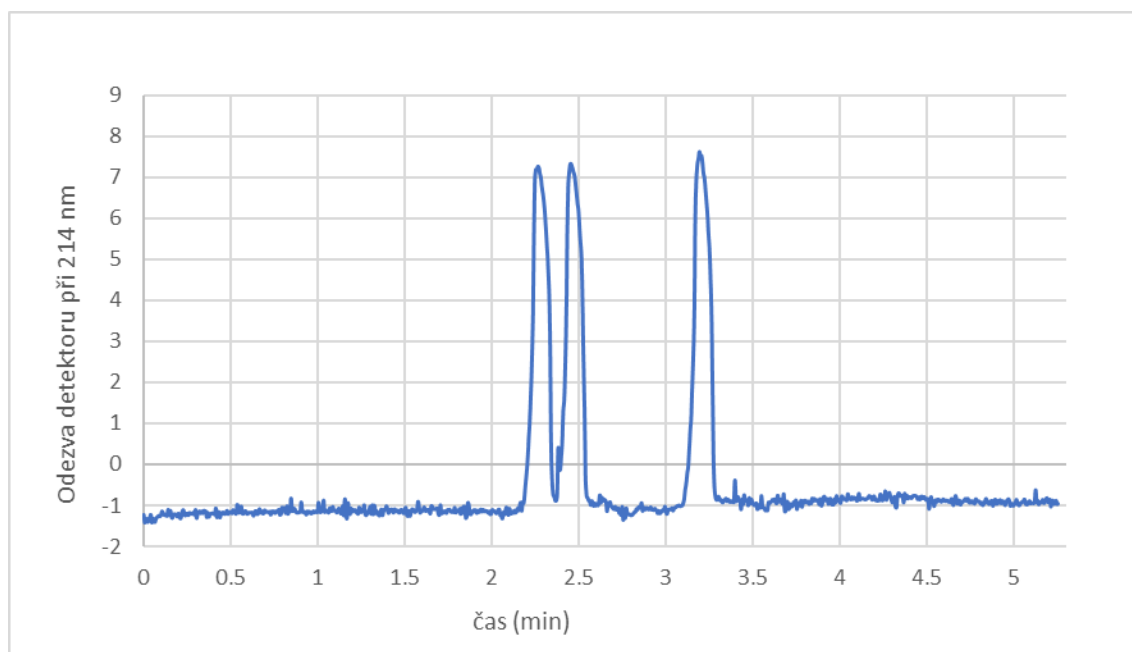
V boritanovém pufru (pH 9,38) závisí migrace alkaloidů senkirkinu a senecioninu také na více faktorech. Jelikož má boritanový pufr zásaditý charakter, alkaloidy budou pravděpodobně záporně nabitě v důsledku deprotonace jejich amino a hydroxylových skupin. Přidáním SDS do pufru dochází k vytvoření micel, které mohou interagovat s analyty a tím ovlivňovat rychlost jejich migrace. Při nízkých koncentracích SDS je celková migrace rychlejší (vyšší efektivní pohyblivosti), a tím nižší je čas analýzy. Při vysokých koncentracích SDS může být migrace zpomalena v důsledku interakce micel s analyty, jejich zdánlivá pohyblivost je nižší, a tím docházelo k prodloužení času analýz. Ukázky záznamů stanovení pohyblivosti senkirkinu a senecioninu jsou vyobrazeny níže v textu v grafech 2, 3, 7 a 8. Migrační časy těchto alkaloidů a jejich zdánlivé elektroforetické pohyblivosti jsou uvedeny v tabulkách 7–52, 56–101 v příloze 1.

Graf 1 – Závislost zdánlivé pohyblivosti senkirkinu na koncentraci SDS v pokryté kapiláře ve 20 mM boritanovém pufru, napětí 25 kV, teplota 25 °C, dávkování tlakem 50 mbar (~5 kPa)/10 s

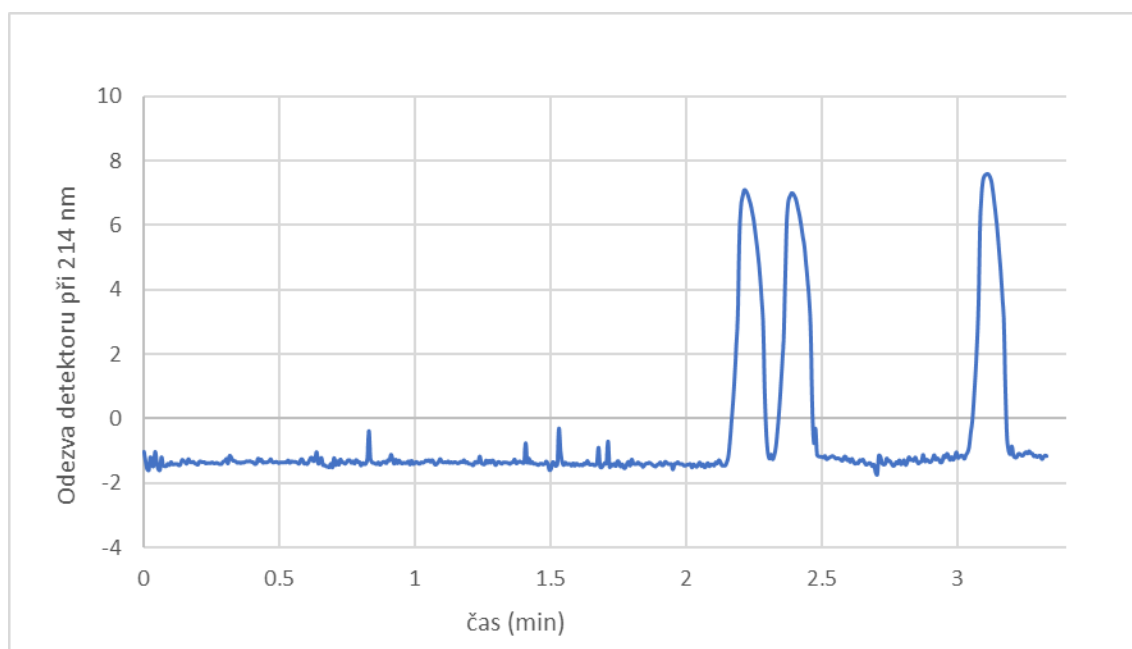


Zdánlivá pohyblivost senkirkinu se vzrůstající koncentrací SDS klesá, protože vyšší koncentrace micel brzdí pohyb alkaloidu, který při normálním napětí migruje ke katodě a micely k anodě. Na grafu 1 lze vidět, že jak se koncentrace SDS zvyšuje, zdánlivá elektroforetická pohyblivost senkirkinu klesá. Při nižších koncentracích SDS bude pokles zdánlivé pohyblivosti alkaloidu relativně pomalý díky nízké koncentraci micel (rozdíl koncentrace SDS a kritické micelární koncentrace), avšak při vyšších koncentracích SDS bude pokles zdánlivé pohyblivosti vykazovat strmější trend. Hodnoty z grafu 1 jsou uvedeny v tabulkách 8 až 12 v příloze 1.

Graf 2 – Ukázka záznamu stanovení pohyblivosti senkirkinu ve 20 mM boritanovém pufru s přidavkem 10 mM SDS a 20 % v/v acetonitrilu v pokryté kapiláře, napětí 25 kV, teplota 25 °C, dávkování tlakem 50 mbar (~5 kPa)/10 s

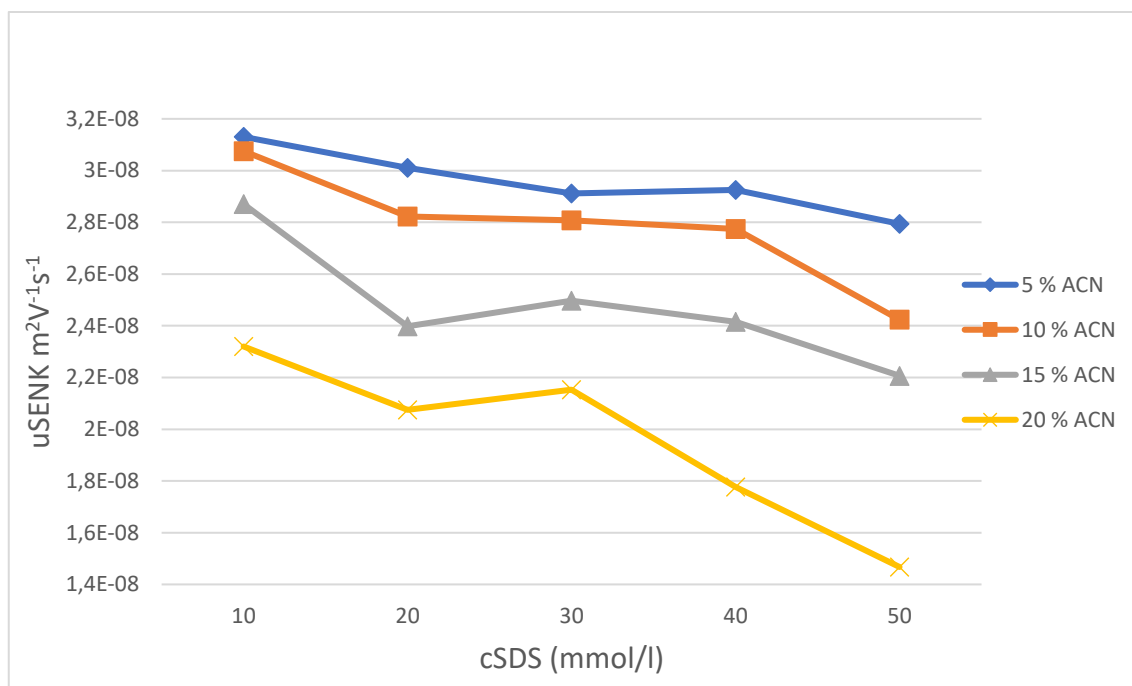


Graf 3 – Ukázka záznamu stanovení pohyblivosti senkirkinu ve 20 mM boritanovém pufru s přidavkem 20 mM SDS a 15 % v/v acetonitrilu v pokryté kapiláře, napětí 25 kV, teplota 25 °C, dávkování tlakem 50 mbar (~5 kPa)/10 s



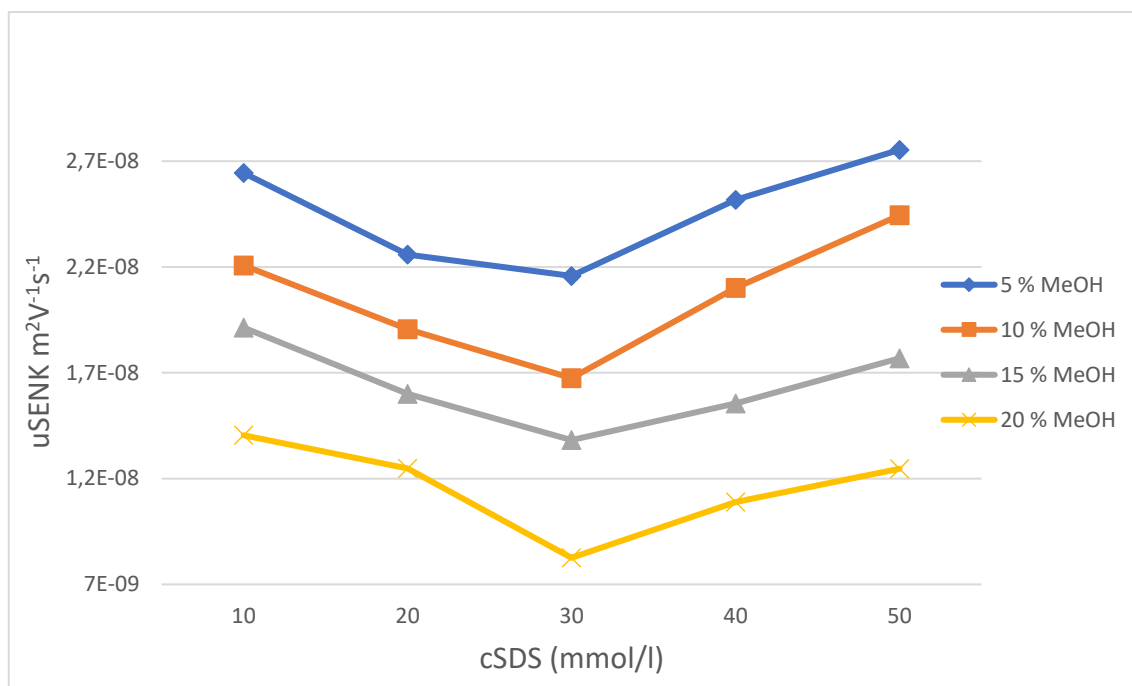


Graf 4 – Závislost zdánlivé pohyblivosti senkirkinu na koncentraci SDS s přidavkem aditiva (acetonitrilu) v pokryté kapiláře ve 20 mM boritanovém pufru, napětí 25 kV, teplota 25 °C, dávkování tlakem 50 mbar (~5 kPa)/10 s



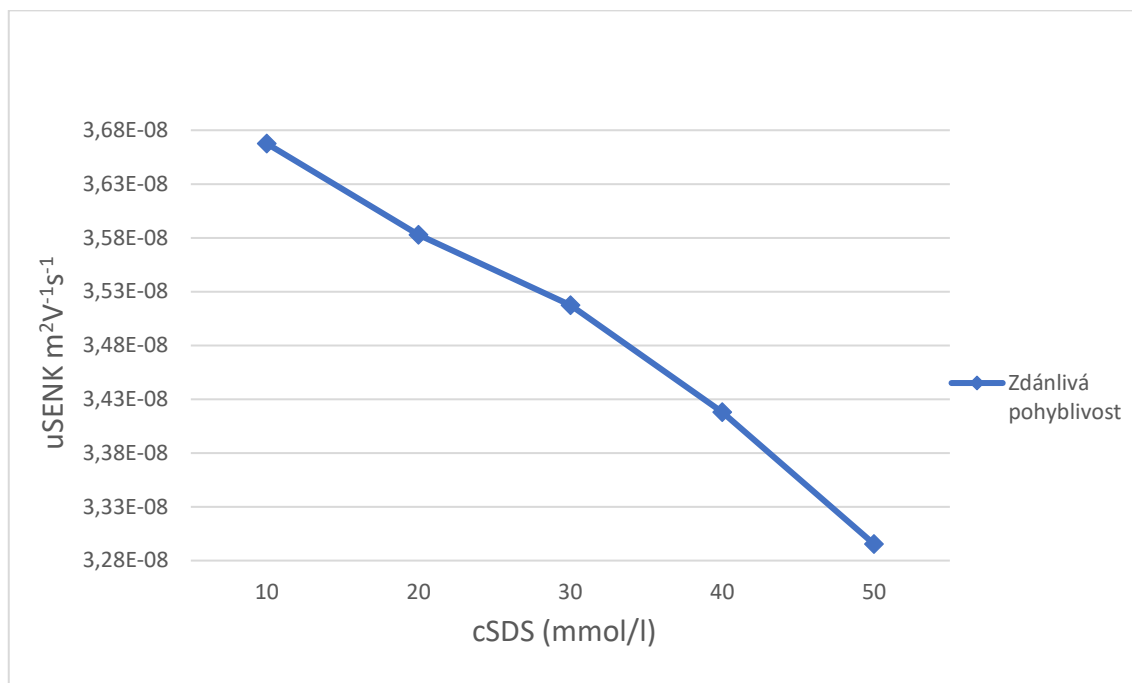
Přidáním organického rozpouštědla, v tomto případě acetonitrilu (graf 4), dochází ke změně selektivity na základě ovlivnění distribuce analytu mezi micelární fází a elektrolytem. Organická rozpouštědla ovlivňují jak viskozitu, tak i relativní permitivitu (dielektrickou konstantu) elektrolytu, tím snižují elektroosmotický tok a mohou také měnit adsorpci analytů na pokrytou kapiláru. Výsledný efekt tedy závisí na druhu a množství přidaného organického aditiva a migrace analytu je zde určena experimentálně dále v grafech 5, 10 a 11. Výsledné hodnoty migračních charakteristik jsou uvedeny v tabulkách 13 až 32 v příloze 1.

Graf 5 – Závislost zdánlivé pohyblivosti senkirkinu na koncentraci SDS s přidavkem aditiva (methanolu) v pokryté kapiláře ve 20 mM boritanovém pufru, napětí 25 kV, teplota 25 °C, dávkování tlakem 50 mbar (~5 kPa)/10 s



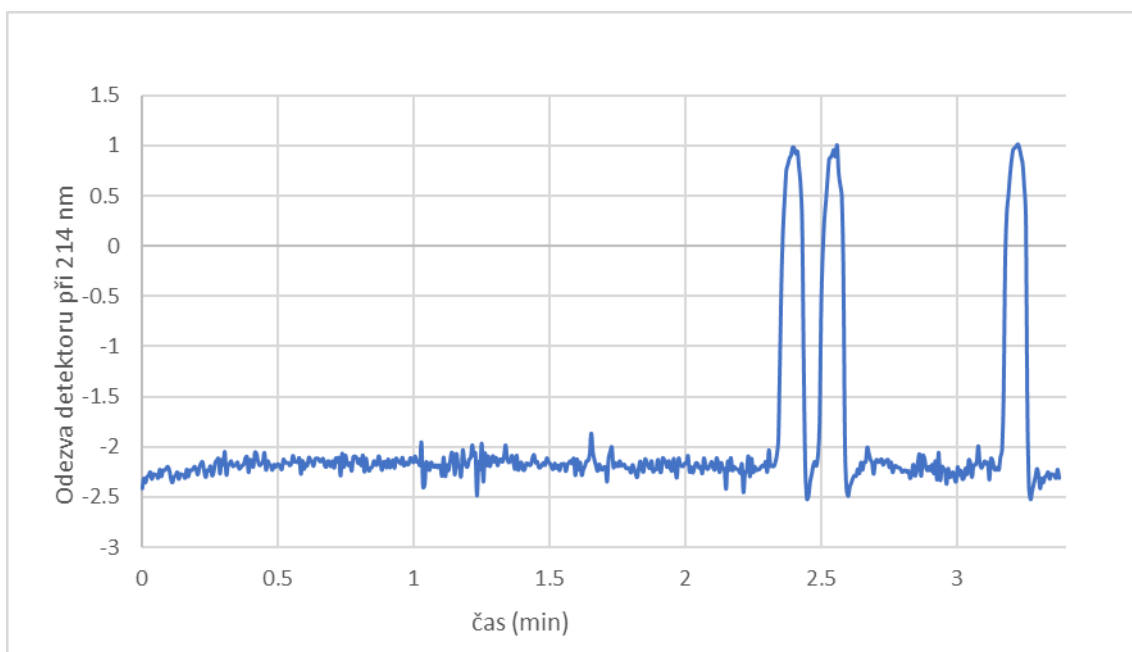
Na grafu 5 je zaznamenána zdánlivá pohyblivost senkirkinu na koncentraci SDS s procentuálním přidavkem methanolu. Methanol jako organické rozpouštědlo může snižovat EOF, což může vést ke zvýšení doby migrace analytu. Na druhou stranu může methanol ovlivnit distribuční rovnováhu alkaloidu mezi vodnou a micelární fází, což může vést zase ke zvýšení rychlosti jeho migrace kapilárou. Přesný účinek methanolu v kombinaci přidavku SDS bude tedy záviset na koncentraci přidaného rozpouštědla, s tím, že závisí také na vlastnostech pokrytí kapiláry. Na grafu 5 lze pozorovat klesající zdánlivé pohyblivosti senkirkinu, který je méně vázaný do micel, se zvyšujícím se procentuálním přidavkem methanolu. Hodnoty, ze kterých je graf vytvořen, jsou zaznamenány v tabulkách 33 až 52 v příloze 1.

Graf 6 – Závislost zdánlivé pohyblivosti senecioninu na koncentraci SDS v pokryté kapiláře ve 20 mM boritanovém pufru, napětí 25 kV, teplota 25 °C, dávkování tlakem 50 mbar (~5 kPa)/10 s

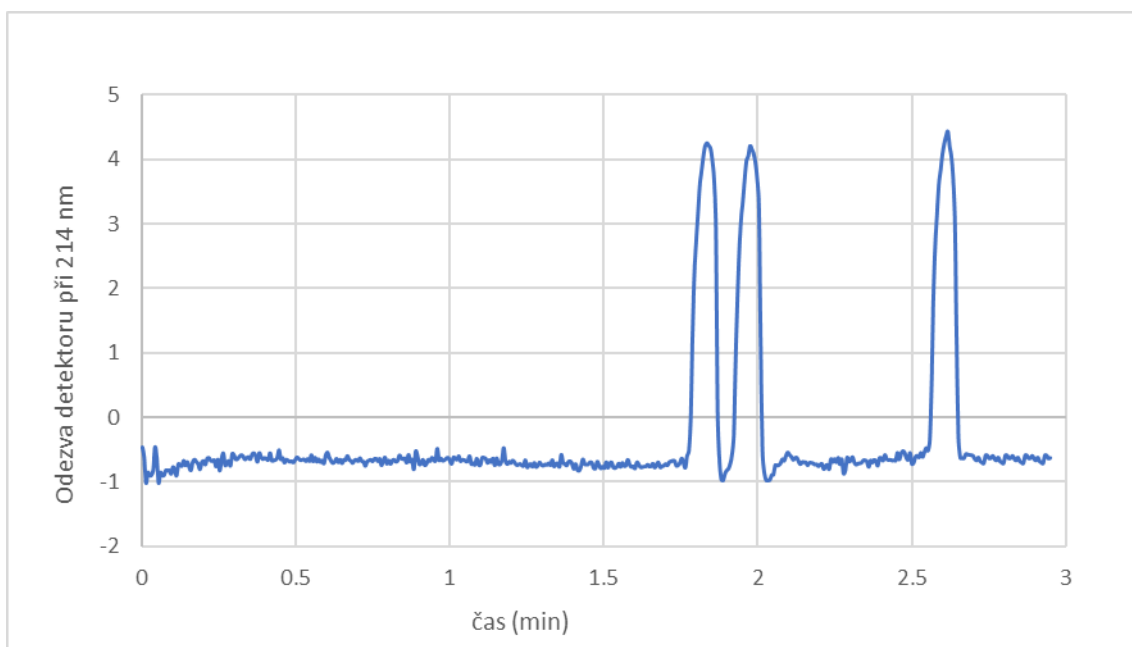


Zde na grafu 6 je zaznamenán klesající trend zdánlivé pohyblivosti senecioninu se vzrůstající koncentrací SDS. Vysvětlení tohoto trendu bylo již zmíněno u alkaloidu senkirkinu výše na grafu 1. Migrační časy senecioninu se s přidavkem SDS prodlužovaly, jejich hodnoty jsou uvedeny v tabulkách 57 až 61 v příloze 1.

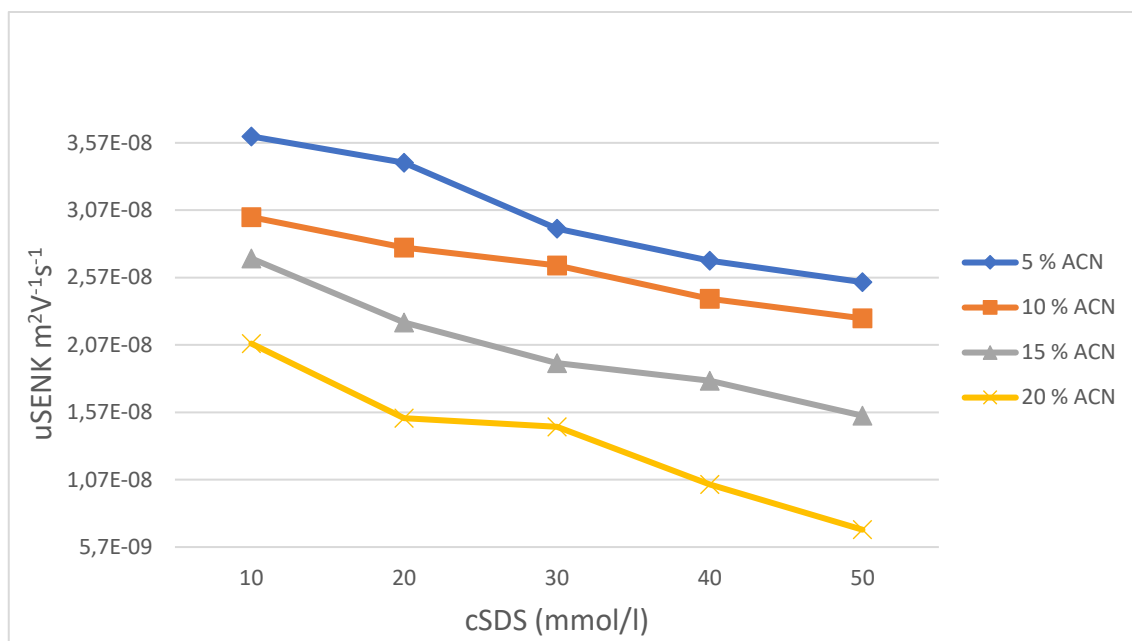
Graf 7 – Ukázka záznamu stanovení pohyblivosti senecioninu ve 20 mM boritanovém pufru s přidavkem 20 mM SDS a 10 % v/v methanolu v pokryté kapiláře, napětí 25 kV, teplota 25 °C, dávkování tlakem 50 mbar (~5 kPa)/10 s



Graf 8 – Ukázka záznamu stanovení pohyblivosti senecioninu ve 20 mM boritanovém pufru s přidavkem 30 mM SDS a 10 % v/v acetonitrilu v pokryté kapiláře, napětí 25 kV, teplota 25 °C, dávkování tlakem 50 mbar (~5 kPa)/10 s

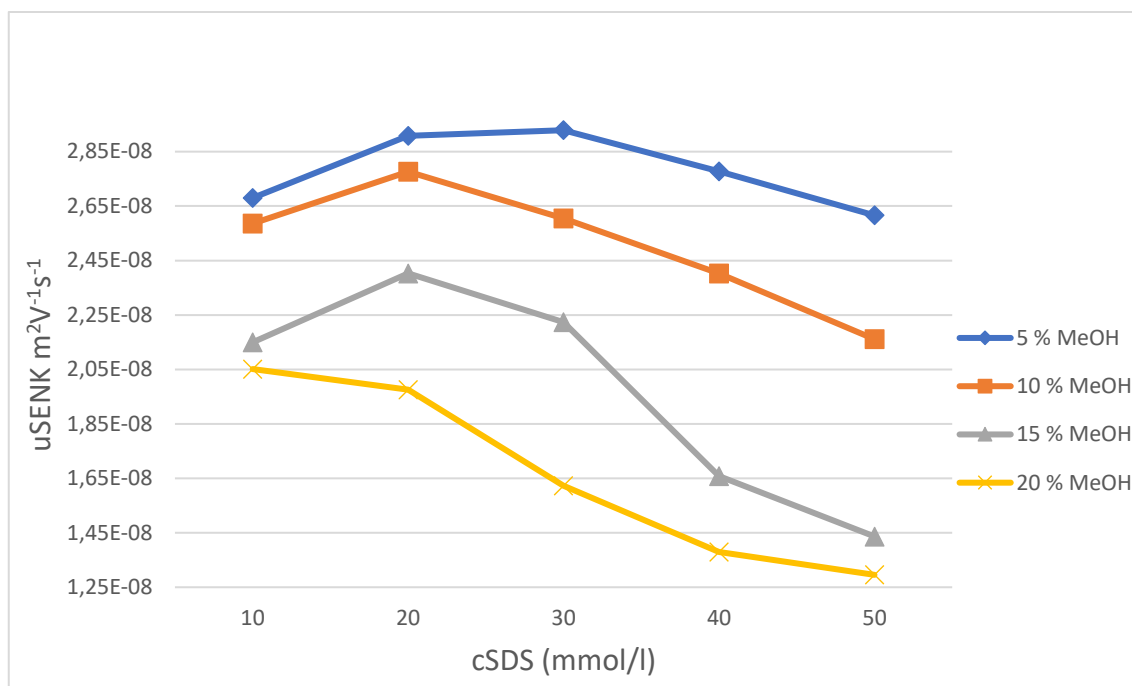


Graf 9 – Závislost zdánlivé pohyblivosti senecioninu na koncentraci SDS s přidavkem aditiva (acetonitrilu) v pokryté kapiláře ve 20 mM boritanovém pufru, napětí 25 kV, teplota 25 °C, dávkování tlakem 50 mbar (~5 kPa)/10 s



Na grafu 9 lze pozorovat monotónní klesající trend pohyblivosti standardu senecioninu, kdy s vyšším přidavkem aditiva, zde konkrétně acetonitrilu, pohyblivost klesá. Při vysokých hodnotách pH v boritanovém pufru u nepokrytých kapilár a v menší míře také u kapilár pokrytých je EOF obvykle vyšší, ovšem s přidáním organických rozpouštědel dochází k jeho mírnému poklesu, což má za následek pomalejší migraci analytů a prodloužení časů analýz v elektrolytech s rostoucí koncentrací organického rozpouštědla, viz tabulky 62 až 81 v příloze 1.

Graf 10 – Závislost zdánlivé pohyblivosti senecioninu na koncentraci SDS s přidavkem aditiva (methanolu) v pokryté kapiláře ve 20 mM boritanovém pufru, napětí 25 kV, teplota 25 °C, dávkování tlakem 50 mbar (~5 kPa)/10 s



Zde na grafu 10 lze pozorovat nelineární závislosti pohyblivostí senecioninu, kdy při přidavku 5, 10 a 15 % v/v methanolu pozorujeme, že při koncentraci 20 mM SDS pohyblivost dosahuje maxima a poté klesá. S přidavkem 20 % v/v metanolu již maximum nepozorujeme a pohyblivost standardu senecioninu postupně klesá do nižších hodnot.

Methanol v BGE změní relativní permitivitu (dielektrickou konstantu) pufru a upraví elektrické náboje na analytech, což vede ke změně elektroforetické mobility. Obecně se přidáním organického rozpouštědla do určité koncentrace snižuje EOF a prodlužuje se doba analýzy bez narušení micelární struktury. Hodnoty, ze kterých je graf 10 vytvořen jsou zaznamenány v tabulkách 82 až 101 v příloze 1.

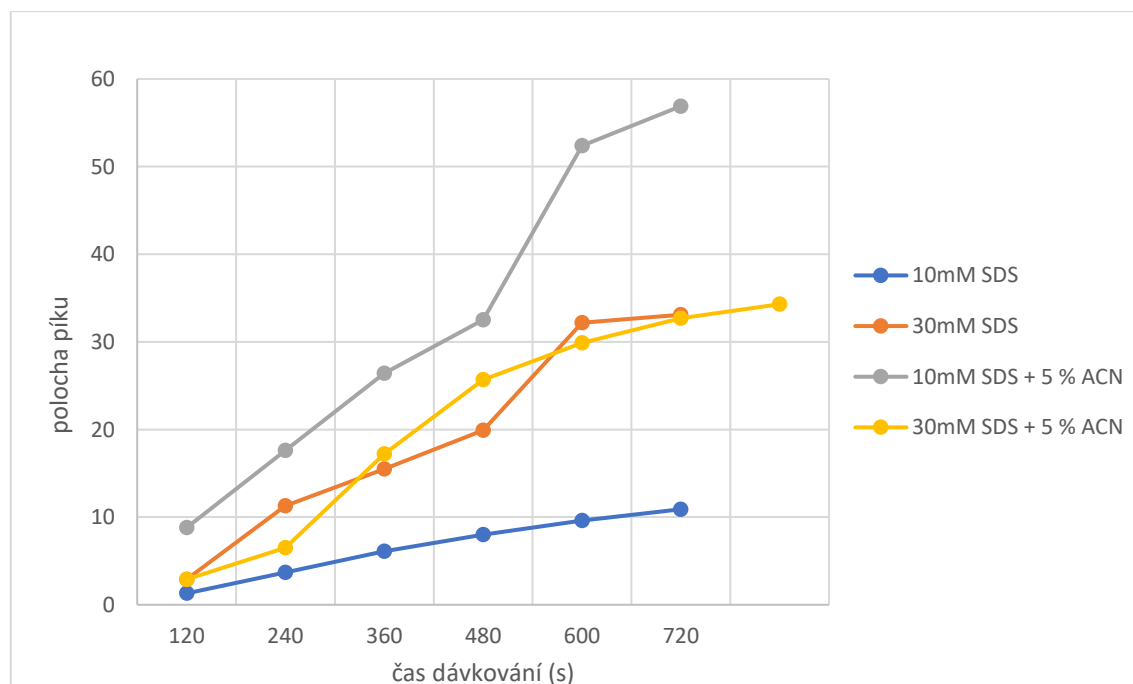
Rozdíly mezi průběhem zdánlivých pohyblivostí pyrrolizidinových alkaloidů pro elektrolyty s acetonitrilem a methanolem mohou být způsobeny také rozdílným ovlivněním kritické micelární koncentrace pro obě rozpouštědla [74].

### 3.3 Prekoncentrace pyrrolizidinových alkaloidů

#### 3.3.1 Prekoncentrace pomocí micel

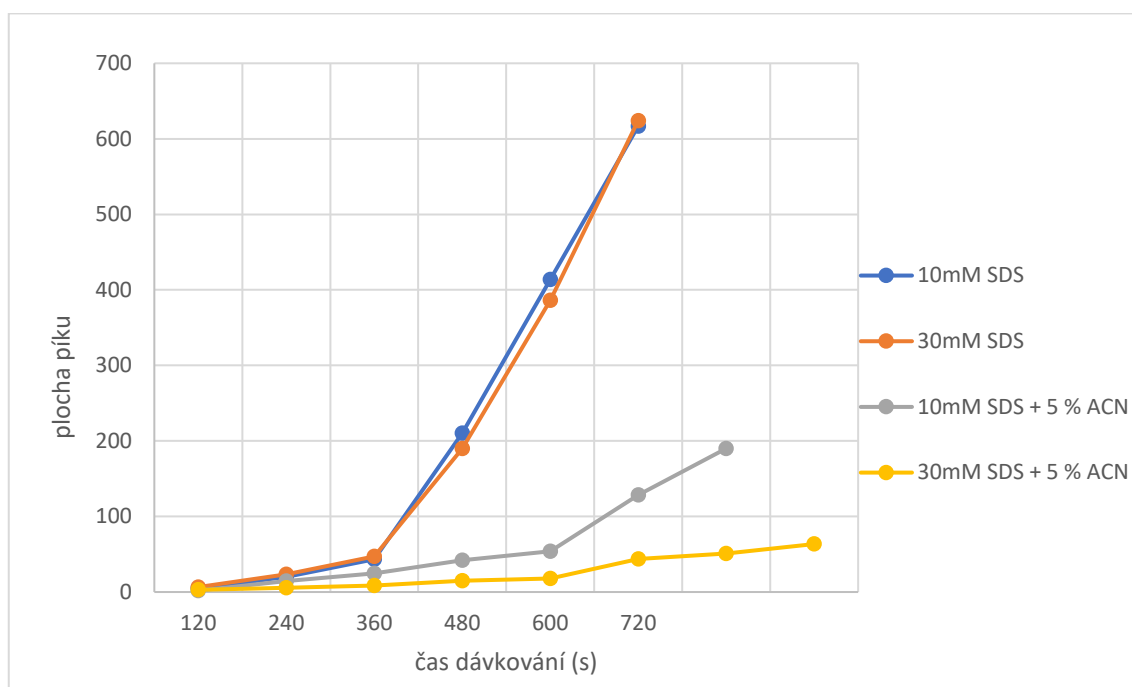
Vzorek senkirkinu pro prekoncentraci byl měřen v boritanovém pufru s přidavkem 10 mM a 30 mM SDS a poté i s přidavkem 5 a 15 % v/v ACN. Byl nejprve nadávkován tlakem 50 mbar (~5 kPa) a poté bylo aplikováno záporné napětí o hodnotě -25 kV. V grafech 11 a 12 jsou uvedeny závislosti ploch píků a čase dávkování a v grafech 13 a 14 jsou uvedeny závislosti šířky píku na čase dávkování. Prekoncentrace byla prováděna postupně s prodlužováním času dávkování. Čas dávkování byl nastaven na 10 s, 30 s, 60 s, 120 s, 240 s, 360 s, 480 s, 600 s a 720 s. Při dávkování 10 s, 30 s a 60 s nebyl zaznamenán na elektroforegramu žádný pík z důvodu nepřesáhnutí meze detekce. Až od času 120 s byl elektroforetický pík zaznamenán, protože už mez detekce přesahoval. Čas dávkování byl postupně prodlužován po 2 minutách a plochy píků se postupně zvětšovaly. Takto byla provedena prekoncentrace připraveného standardu senkirkinu, který byl 10x zředěný a vzorku, který byl zředěný 100x. Všechny naměřené hodnoty jsou uvedeny v tabulkách s číslem 53 a 54 v příloze 1.

Graf 11 – Závislost plochy píku 10x zředěného senkirkinu na čase dávkování v pokryté kapiláře ve 20 mM boritanovém pufru s přidavky SDS a acetonitrilu, napětí -25 kV, teplota 25 °C, dávkování tlakem 50 mbar (~5 kPa)/10 s až 720 s



Zde na grafu 11 je znázorněno, že pokud se prodlouží doba dávkování, množství analytu vstříkovaného do kapiláry se také zvýší, což vede ke zvětšení plochy píku. Přítomností SDS a acetonitrilu v základním elektrolytu může docházet ke zlepšení symetrie píku a celkového rozlišení.

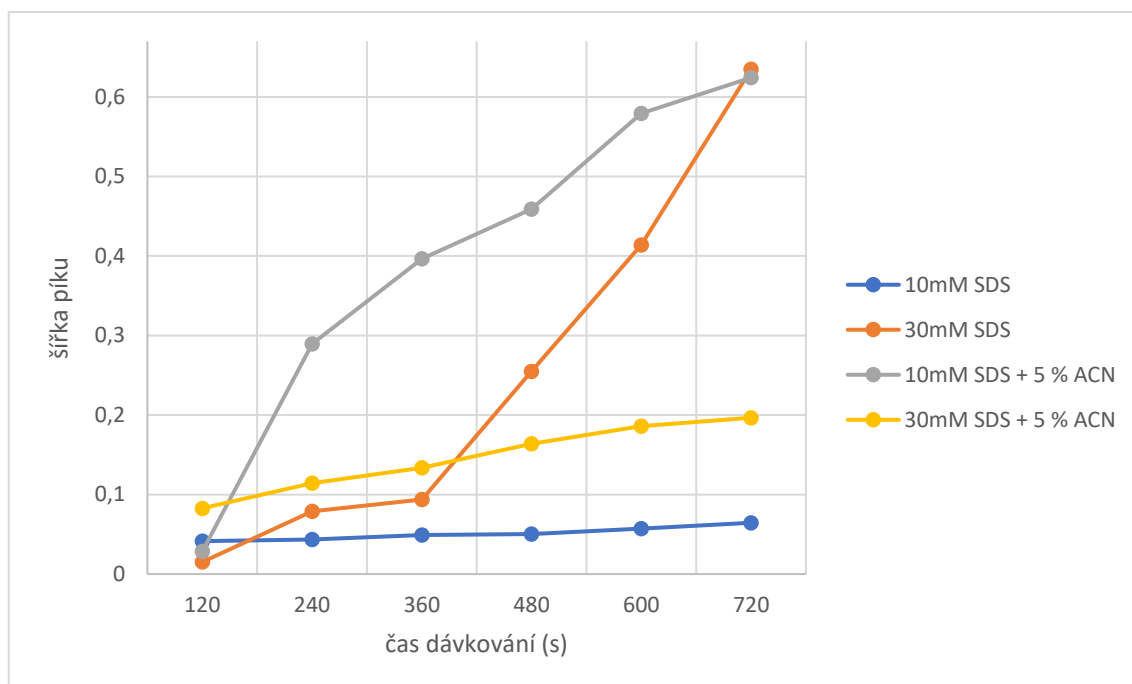
Graf 12 – Závislost plochy píku 100x zředěného senkirkinu na čase dávkování v pokryté kapiláře ve 20 mM boritanovém pufru s přísady SDS a acetonitrilu, napětí -25 kV, teplota 25°C, dávkování tlakem 50 mbar (~5 kPa)/ 10 s až 720 s



Při porovnání grafů 11 a 12 lze pozorovat, že v případě prekoncentrace pomocí micel je plocha píku senkirkinu 100x zředěného větší, nežli je tomu v případě senkirkinu ředěného pouze 10x, a tento rozdíl je z těchto grafů velmi zřetelný. Koncentrace SDS a přidání acetonitrilu má také vliv na velikost plochy ředěného senkirkinu.

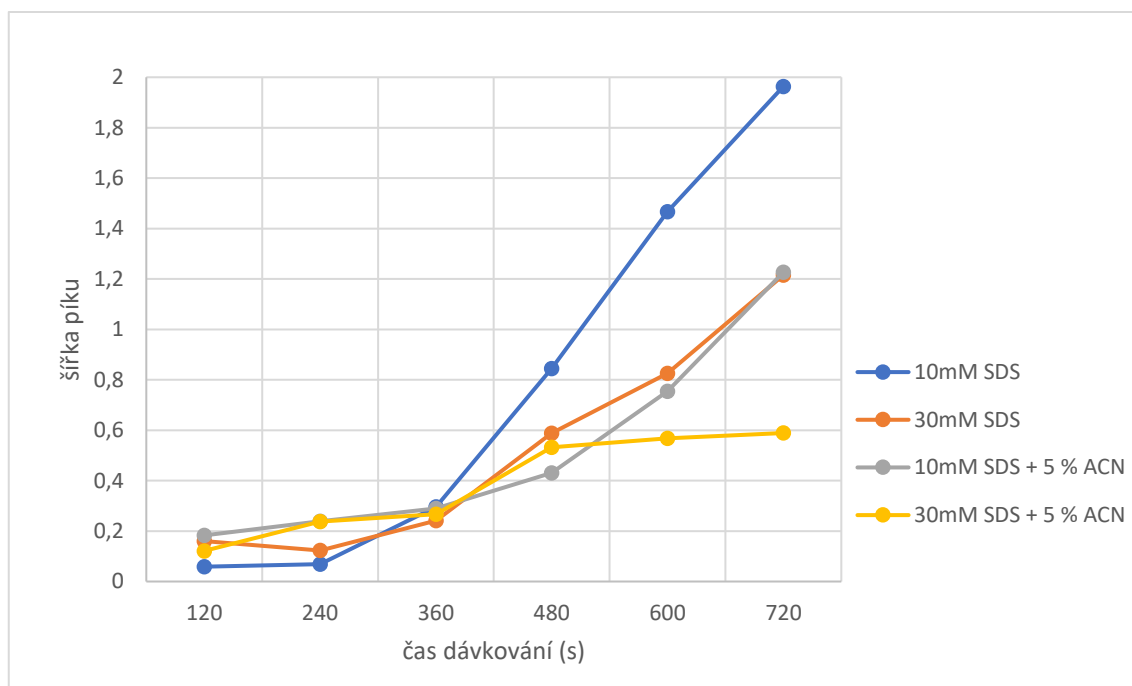


Graf 13 – Závislost šířky píku 10x zředěného senkirkinu na čase dávkování v pokryté kapiláře ve 20 mM boritanovém pufru s přidavky SDS a acetonitrilu, napětí -25 kV, teplota 25 °C, dávkování tlakem 50 mbar (~5 kPa)/10 s až 720 s



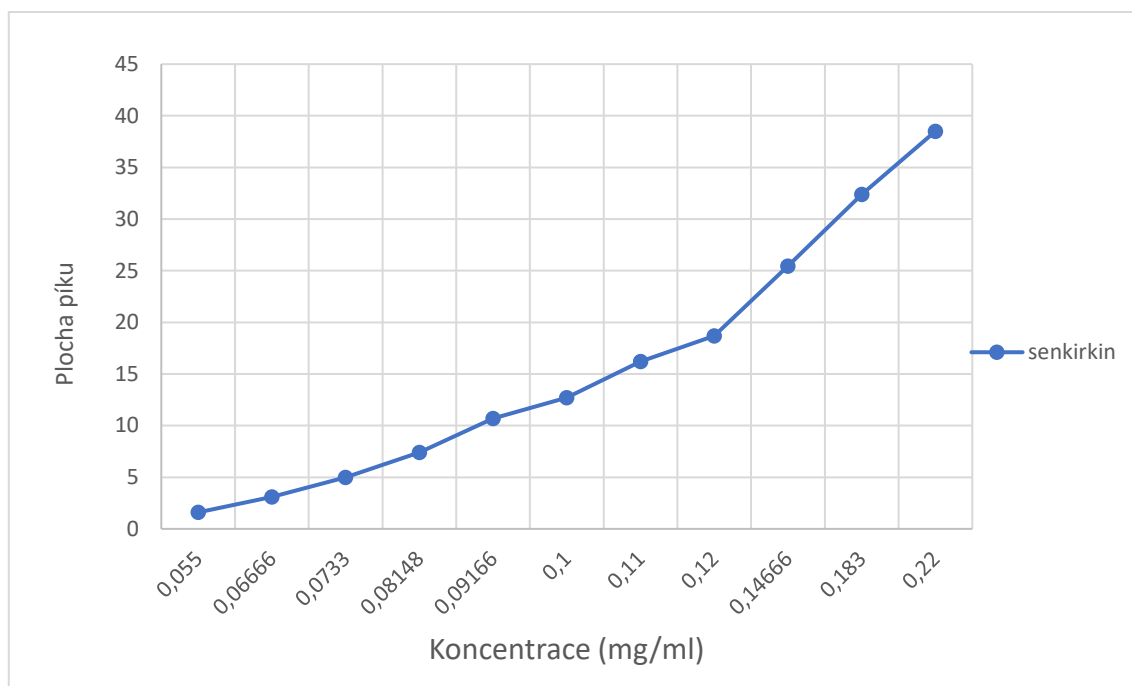
Průběh závislosti křivky šířky píku na grafu 13 je ovlivněn několika faktory, jako je procentuální přídavek acetonitrilu a koncentrace SDS. Zde lze například pozorovat, že při koncentraci 10 mM SDS je šířka píku senkirkinu menší od dávkování 240 s, než při koncentraci 30 mM SDS, která může způsobit větší zesílení elektroforetické pohyblivosti senkirkinu. Jelikož acetonitril přidaný v pufru ovlivňuje jeho vlastnosti, může následně ovlivnit i výslednou šířku elektroforetického píku.

Graf 14 – Závislost šířky píku 100x zředěného senkirkinu na čase dávkování v pokryté kapiláře ve 20 mM boritanovém pufru s přidavky SDS a acetonitrilu, napětí -25 kV, teplota 25 °C dávkování tlakem 50 mbar (~5 kPa)/10 s až 720 s



Při použití 100x zředěného senkirkinu (graf 14) jsou rozdíly mezi koncentracemi SDS a přidavku acetonitrilu menší než u 10x zředěného senkirkinu (graf 13). Lze tedy konstatovat, že závislost šířky píku 100x zředěného senkirkinu na čase dávkování bude méně citlivá na změny podmínek než v senkirkinu zředěného pouze 10x.

Graf 15 – Závislost plochy píku na koncentraci ředěného senkirkinu v pokryté kapiláře ve 20 mM boritanovém pufru s přidavkem 30 mM SDS, napětí -25 kV, teplota 25 °C, dávkování tlakem 50 mbar (~5 kPa)/5 min



Standard senkirkinu o známé koncentraci 0,22 mg/ml byl postupně ředěn destilovanou vodou, pro analýzu byla použita pokrytá kapilára, podmínky měření byly nastaveny na dávkování 50 mbar (~5 kPa) po dobu 5 minut, napětí na kapiláře -25 kV. Jako BGE byl použit 20 mM boritanový pufr s přidavkem 30 mM SDS. Před každým měřením byla kapilára předkondicionována pufrům po dobu 2 minut. Postupně byla proměřována kalibrační řada, plochy píků se postupně zmenšovaly a výsledná mez detekce při uvedených podmínkách byla stanovena na 0,055 mg/ml senkirkinu ve vzorku. Hodnoty, ze kterých je graf 15 vytvořen jsou uvedeny v tabulce 102 v příloze 1.

Bohužel touto metodou nebylo dosaženo lepších výsledků než metodami předchozími [53; 68; 69] a to i přes pokus prodloužení doby dávkování vzorku, nedošlo k výraznému zlepšení citlivosti detekce.

### 3.3.2 Prekoncentrace pomocí metody pH junction-sweeping

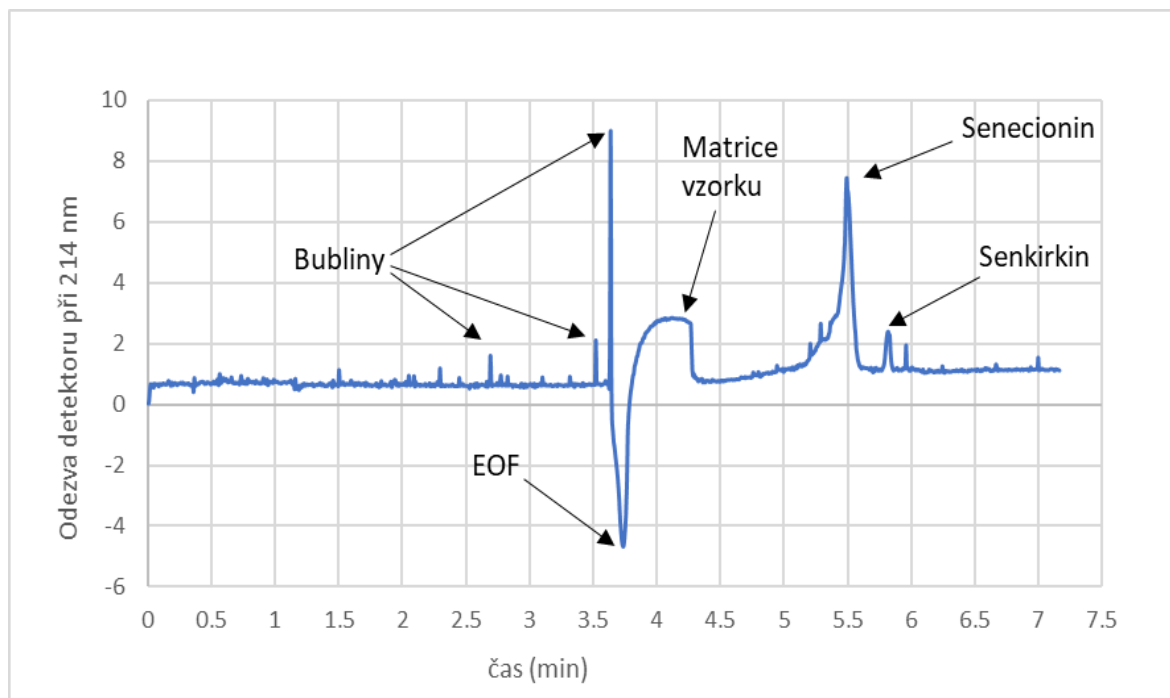
Pro metodu junction-sweeping byla použita křemenná nepokrytá kapilára a jako základní elektrolyt použit boritanový pufr (pH 9,38) a vzorek senkirkinu, senecioninu a poté směsi byl připraven rozpuštěním ve fosforečnanovém pufru (pH 4,71). Bylo aplikováno kladné napětí 25 kV a dávkování bylo nastaveno na hodnotu 50 mbar (~5 kPa) po dobu 10 s, 60 s, 120 s

a 240 s. Poté byla metoda zopakována při stejných podmínkách s rozdílem přidání SDS do borátového pufru (30 mM SDS a 30 mM SDS s přidavkem 5 % v/v acetonitrilu).

Boritanový pufr s vysokým pH sloužil k vytvoření EOF, který se v tomto uspořádání pohyboval ke katodě a vzorek se pohyboval k anodě. Přidáním SDS do základního elektrolytu může zvýšit selektivitu a rozlišení separace a přidavek acetonitrilu může ovlivnit separaci alkaloidů tím, že ovlivní povrchové napětí nepokryté kapiláry.

Při použití této prekoncentrační metody bude rychleji migrovat alkaloid senecionin (zobrazeno na grafu 16), z toho důvodu, že senecionin je silnější kyselinou než alkaloid senkirkin, protože má v boritanovém pufru (pH 9,38) nižší hodnotu pKa a tím bude více záporně nabitý. V tomto důsledku bude senecionin silněji ovlivněn EOF a migrovat ke katodě rychleji než senkirkin, který má v boritanovém pufru (pH 9,38) pKa vyšší a bude mít menší záporný náboj než senecionin. V tomto důsledku bude senkirkin méně ovlivněn EOF a bude migrovat pomaleji než senecionin.

*Graf 16 – Ukázka záznamu z prekoncentrační metody pH junction-sweeping v nepokryté kapiláře, základní elektrolyt boritanový pufr (pH 9,38) s přidavkem 30 mM SDS, standardy (senkirkin a senecionin) rozpuštěné ve fosforečnanovém pufru (pH 4,71), napětí 25 kV, teplota 25 °C, dávkování tlakem 50 mbar (~5 kPa)/10 s*



Výsledky při této metodě ale nebyly optimální z důvodu přítomnosti bublin rozpuštěných plynů v základních elektrolytech na elektroforegramu. Tyto bubliny zkomplikovaly analýzu,

ale odstředěním pufrů na centrifuze byl nakonec problém částečně potlačen a tím byl snížen jejich vliv na signál detektoru. Rozdělené pyrrolizidinové alkaloidy byly ale stále detekovány pouze na některých záznamech při různých podmínkách. Zde na grafu 16 je přiložena ukázka vybraného reprezentativního záznamu.

## 4 ZÁVĚR

Cílem diplomové práce bylo potvrdit potenciál kapilární zónové elektroforézy pro citlivou a účinnou detekci pyrrolizidinových alkaloidů, což jsou toxické sloučeniny běžně se vyskytující v bylinných přípravcích, čajích a dalších potravinářských přípravcích, ať už rostlinných nebo živočišných.

V teoretické části práce byly popsány principy a mechanismy, které jsou součástí kapilární elektroforézy včetně elektroosmotického toku, elektroforetické migrace nabitých analytů kapilárou naplněnou základním elektrolytem a separace analytů na základě jejich elektroforetické mobility a velikosti. Byly zde diskutovány také další techniky kapilární elektroforézy jako je micelární elektrokinetická chromatografie, izoelektrická fokusace či izotachofórze.

V experimentální části této diplomové práce byly připraveny pokryté kapiláry pomocí polydimethylakrylamidu, byla v nich stanovena reziduální elektroosmóza a proměřeny migrační charakteristiky alkaloidů senkirkinu a senecioninu v připravených pufrech s přísadkou dalších aditiv. Dále byly testovány možnosti prekoncentrace ředěných pyrrolizidinových alkaloidů v pokryté i nepokryté kapiláře.

Použití pokrytých kapilár a prekoncentračních kroků pomohlo zvýšit citlivost a selektivitu analýzy a umožnilo detekci těchto sloučenin i v nízkých koncentračních hladinách. Detekce nízkých koncentrací, až stopového množství těchto alkaloidů v rostlinných a potravinářských produktech, by v konečném důsledku mohly chránit spotřebitele před jejich škodlivými účinky na lidský organismus.

Při provedení prekoncentrace v nepokryté kapiláře se vyskytovaly problémy s rušením signálu detektoru rozpuštěnými plyny v základních elektrolytech i po odstředění na centrifuze. Při nízkých koncentracích analytů bylo někdy obtížné správně identifikovat daný standard a analýzy nebyly reprodukovatelné. V nepokryté kapiláře se výsledky analýz pomocí metody pH junction-sweeping tedy ukázaly být méně optimální než při prekoncentraci pomocí micel v kapilárách pokrytých.

Závěrem lze konstatovat, že kapilární zónová elektroforéza je výkonná moderní analytická technika, která od svého vzniku prošla významným pokrokem, jejíž aplikace s prekoncentrací v pokrytých i nepokrytých kapilárách by také mohla získat širší uplatnění při analýze dalších komplexních směsí, nejenom pyrrolizidinových alkaloidů senkirkinu a senecioninu.

## 5 POUŽITÁ LITERATURA

1. LI SAM F. Y. Capillary Electrophoresis: Principles, Practice and Applications. (1992). Journal of chromatography library – volume 52, Amsterdam: Elsevier, 1992. 582 p, ISBN 0-444-89433-0.
2. MICHAL PAVONIČ. Možnosti využití metod kapilární elektroforézy pro analýzu malých iontů ve vodách. Vyd. 1. Praha: Výzkumný ústav vodohospodářský T.G. Masaryka, 2002. Výzkum pro praxi. ISBN 8085900459.
3. SUVARDHAN KANCHI, SALVADOR SAGRADO, MYALOWENKOSI SABELA KRISHNA BISETTY. Capillary Electrophoresis [online]. Jenny Stanford Publishing, 2017, ISBN 9781315225388. Dostupné z: doi:10.1201/9781315225388.
4. KATARIINA MARIE HUTTERER, JAMES JORGENSON. Ultrahigh-Voltage Capillary Zone Electrophoresis. Analytical Chemistry [online]. 1999, 71(7), 1293-1297. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/ac981221e.
5. BOHUSLAV GAŠ. Kapilární elektroforéza: Separační analytická metoda pro věk mikročipů. Dostupné z: <https://vesmir.cz/cz/casopis/archiv-casopisu/2001/cislo-7/kapilarni-elektroforeza.html>.
6. H J ISSAQ. A decade of capillary electrophoresis [online]. Dostupné z: 10.1002/1522-2683(20000601)21:10<1921::AID-ELPS1921>3.0.CO;2-Y.
7. STELLAN HJERTÉN. Free zone electrophoresis. Chromatographic Reviews [online]. 1967, 9(2), 122-219, ISSN 00095907. Dostupné z: doi:10.1016/0009-5907(67)80003-6.
8. MIKKERS, F.E.P., F.M. EVERAERTS a TH.P.E.M. VERHEGGEN. High-performance zone electrophoresis. Journal of Chromatography A [online]. 1979, 169, 11-20, ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/0021-9673(75)85029-1.
9. SANDIP GHOSAL. Fluid mechanics of electroosmotic flow and its effect on band broadening in capillary electrophoresis. ELECTROPHORESIS [online]. 2004, 25(2), 214-228, ISSN 0173-0835. Dostupné z: doi:10.1002/elps.200305745.
10. HARVEY D. Modern Analytical Chemistry, 1. vydání editor, McGraw-Hill, 2000, p. 816. ISBN 0-07-237547-7.
11. VÁCLAV KAŠIČKA. Teoretické základy a separační principy kapilárních elektromigračních metod: Chemické listy [online]. Dostupné z [http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/1997\\_05\\_320-329.pdf](http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/1997_05_320-329.pdf).

12. HEIGER, D. N. High performance capillary electrophoresis-an introduction, third edition. Francie: Hewlett Packard Company, 1997. 136 p.
13. ALTRIA KEVIN D. Capillary Electrophoresis Guidebook: Principles, Operation, and Applications. Totowa: Humana Press, 1996. ISBN isbn0-89603-315-5.
14. OLIVARES JOSE A., NHUNG T. NGUYEN, CLEMENT R. YONKER a RIHARD D. SMITH. On-line mass spectrometric detection for capillary zone electrophoresis. Analytical Chemistry [online]. 1987, 59(8), 1230-1232, ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/ac00135a034.
15. JIŘÍ PAZOUREK. Moderní elektroforetické analytické metody: Přednášky pro magisterské studium [online]. Dostupné z: <https://adoc.pub/jii-pazourek-moderni-elektroforeticke-analyticke-metody-pedn.html>.
16. LAUER HENK H., GERARD P. ROZING. High Performance Capillary Electrophoresis: A primer. Second completely revised edition. Germany. 2009: Agilent Technologies, Č. publikace 5990-3777EN.
17. WÄTZIG, H.; GÜNTER, S. Capillary electrophoresis – a high performance analytical separation technique. Clinical chemistry and laboratory medicine, 2003, vol. 41, p. 724-738.
18. MATSUBARA NORIO a TERABE SHIGERU. Micellar electrokinetic chromatography. In: High Resolution Separation and Analysis of Biological Macromolecules Part A: Fundamentals [online]. Elsevier, 1996, s. 319-341 [cit. 2023-03-29]. Methods in Enzymology. ISBN 9780121821715. Dostupné z: doi:10.1016/S0076-6879(96)70016-2.
19. PAVEL COUFAL. Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography, MECC, dostupné z <https://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/mecc.html>.
20. MABROUK MOKHTAR M., NORAN A. HAMED a FOTOUH R. MANSOUR. Physicochemical and electrochemical methods for determination of critical micelle concentrations of surfactants: a comprehensive review. Monatshefte für Chemie – Chemical Monthly [online]. 2022, 153(2), 125-138 [cit. 2023-03-30]. ISSN 0026-9247. Dostupné z: doi:10.1007/s00706-022-02891-2.
21. Kritická micelární koncentrace, dostupné z [https://e-learning.vscht.cz/knihy/uid\\_es-001/hesla/kriticka\\_micelarni\\_koncentrace.html](https://e-learning.vscht.cz/knihy/uid_es-001/hesla/kriticka_micelarni_koncentrace.html).
22. TERABE, S., OTSUKA, K., ICHIKAWA, K., TSUCHIYA, A., ANDO, T. Electrokinetic separations with micellar solutions and open-tubular capillaries. Analytical chemistry. 1984, 56, 111-113 s.



23. ROBERT WEINBERGER. Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography of Illicit Drug Substances. *Analytical chemistry*. 1991, (63), 823-827.
24. HANCU, G., SIMON B., RUSU A., MIRCIA E., GYÉRESI Á. Principles of Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography Applied in Pharmaceutical Analysis. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*. 2013;3,1-8 s. doi:10.5681/apb.2013.001.
25. Elekromigrační metody, dostupné z [https://is.muni.cz/el/1431/jaro2010/C6200/um/11509627/Elektromigracni\\_metody.pdf](https://is.muni.cz/el/1431/jaro2010/C6200/um/11509627/Elektromigracni_metody.pdf).
26. ASHWIN RAMACHANDRAN JUAN G. SANTIAGO. Isotachophoresis: Theory and Microfluidic Applications. *Chemical Reviews* [online]. 2022, 122(15), 12904-12976, ISSN 0009-2665. Dostupné z: doi:10.1021/acs.chemrev.1c00640.
27. TAGLIARO, F, G MANETTO, F CRIVELLENTI a F.P SMITH. A brief introduction to capillary electrophoresis. *Forensic Science International* [online]. 1998, 92(2-3), 75-88, ISSN 03790738. Dostupné z: doi:10.1016/S0379-0738(98)00010-3.
28. ZHI CHEN a STEPHEN G. WEBER. Determination of binding constants by affinity capillary electrophoresis, electrospray ionization mass spectrometry and phase-distribution methods. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2008, 27(9), 738-748, ISSN 01659936. Dostupné z: doi:10.1016/j.trac.2008.06.008.
29. KEITH BARTLE D a PETER MYERS. Theory of capillary electrochromatography. *Journal of Chromatography A* [online]. 2001, 916(1-2), 3-23. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/S0021-9673(01)00709-9.
30. JANA HORÁKOVÁ, VÍTĚZSLAV MAIER, JURAJ ŠEVČÍK. On-line prekoncentrační techniky v kapilární elektroforéze. *Chem. Listy* 100, 163–168 (2006). Webová stránka. Dostupné z: <http://www.chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemicke-listy/article/view/1939/1939>.
31. FUMIHIKO KITAGAWA a KOJI OTSUKA. Recent applications of on-line sample preconcentration techniques in capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A* [online]. 2014, 1335, 43-60. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2013.10.066.
32. ARTACHES A. KAZARIAN, EMILY F. HILDER a MICHAEL C. BREADMORE. Online sample pre-concentration via dynamic pH junction in capillary and microchip electrophoresis. *Journal of Separation Science* [online]. 2011, 34(20), 2800-2821 [cit. 2023-03-19]. ISSN 16159306. Dostupné z: doi:10.1002/jssc.201100414.

33. EVA TVARŮŽKOVÁ. On-line prekoncentrační techniky v kapilární elektroforéze. Pardubice, 2009. Bakalářská práce. Univerzita Pardubice.
34. OSBOURN, D.M.-WEISS, D.J.-LUNTE, a C.E. On-line preconcentration methods for capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 21, 2000, 2768-2779.
35. AGNES T. ARANAS, ARMANDO M. GUIDOTE a JOSELITO P. QUIRINO. Sweeping and new on-line sample preconcentration techniques in capillary electrophoresis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2009, 394(1), 175-185 [cit. 2023-03-19]. ISSN 1618-2642. Dostupné z: doi:10.1007/s00216-009-2646-7.
36. JONG-BOK KIM, a SHIGERU TERABE. On-line sample preconcentration techniques in micellar electrokinetic chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 2003, 30(6), 1625-1643 [cit. 2023-04-08]. ISSN 07317085. Dostupné z: doi:10.1016/S0731-7085(02)00509-5.
37. BIKASH DEBNATH, WAIKHOM SOMRAJ SINGH, MANIK DAS, SANCHARI GOSWAMI a kol. Role of plant alkaloids on human health: A review of biological activities. *Materials Today Chemistry* [online]. 2018, 9, 56-72. ISSN 24685194. Dostupné z: doi:10.1016/j.mtchem.2018.05.001.
38. CHUANHUI MA, YANG LIU, LIN ZHU a kol. Determination and regulation of hepatotoxic pyrrolizidine alkaloids in food: A critical review of recent research. *Food and Chemical Toxicology*. 2018, 119, 50-60, ISSN 02786915. Dostupné z: doi:10.1016/j.fct.2018.05.037.
39. DORINA BODI, STEFAN RONCZKA, CHRISTOPH GOTTSCHALK a kol. Determination of pyrrolizidine alkaloids in tea, herbal drugs and honey. *Food Additives & Contaminants: Part A*. 2014, 31(11), 1886-1895, ISSN 1944-0049. Dostupné z: doi:10.1080/19440049.2014.964337.
40. JAN VELÍŠEK, JANA HAJŠLOVÁ. *Chemie potravin. Rozš. a přeprec.* 3. vyd. Tábor: OSSIS, 2009. ISBN 978-80-86659-15-2.
41. NATALIA CASADO, SONIA MORANTE-ZARCERO a ISABEL SIERRA. The concerning food safety issue of pyrrolizidine alkaloids: An overview. *Trends in Food Science & Technology*. 2022, 120, 123-139, ISSN 09242244. Dostupné z: doi:10.1016/j.tifs.2022.01.007.
42. MICHAEL HABS, KARIN BINDER, STEFAN KRAUSS a kol. A Balanced Risk–Benefit Analysis to Determine Human Risks Associated with Pyrrolizidine Alkaloids (PA)—The Case of Tea and Herbal Infusions. *Nutrients*. 2017, 9(7), ISSN 2072-6643. Dostupné z: doi:10.3390/nu9070717.

43. JAHODÁŘ, KLEČÁKOVÁ. Toxicita hvězdicovitých s přehlednutím k farmaceuticky významným druhům, Chem. Listy, 93 1999, s. 320-326.
44. JAROSLAV SOUKUP. Inspekce varuje před čajovou směsí plnou pyrolizidinových alkaloidů [online]. Dostupné z: <https://www.novinky.cz/clanek/ekonomika-inspekce-varuje-pred-cajovou-smesi-plnou-pyrolizidinovych-alkaloidu-40427141>.
45. JANA ŘÍHOVÁ AMBROŽOVÁ. Encyklopedie hydrobiologie [online]. Praha: Vydavatelství VŠCHT, [2007], 1 elektronický optický disk [cit. 2023-04-01].
46. Ministerstvo zemědělství. Pyrrolizidinové alkaloidy v potravinách. [online] 5-12-2009. Dostupné na <https://bezpecnostpotravin.cz/pyrrolizidinove-alkaloidy-v-potravinach>. ©2009-2023. [cit. 2023-03-24].
47. JAROSLAV STANĚK. 1957. Alkaloidy. I. vydání. Praha: Československá akademie věd. Studie a prameny : Sekce chemická, Sv. 25.
48. CHRISTINA BURLOU-NAGY, FLORIN BĂNICĂ, TÜNDE JURCA, a kol. Echinacea purpurea (L.) Moench: Biological and Pharmacological Properties. A Review. Plants [online]. 2022, 11(9) [cit. 2023-04-02]. ISSN 2223-7747. Dostupné z: doi:10.3390/plants11091244.
49. JIŘÍ PANTŮČEK a kolektiv Topvet. Třapatka nachová ©2004–2023 Green idea s.r.o. Dostupné z <https://www.topvet.cz/herbar/trapatka-nachova-trapatkovka-echinacea-purpurea>.
50. Ministerstvo zemědělství. Pyrrolizidinové alkaloidy ve vyšších rostlinách: toxicita kostivalu. © 2009-2023 Dostupné z <https://bezpecnostpotravin.cz/pyrrolizidinove-alkaloidy-ve-vyssich-rostlinach-toxicita-kostivalu/>.
51. JIŘINA SPILKOVÁ. Farmakognozie. Praha: Univerzita Karlova v Praze, nakladatelství Karolinum, 2016. ISBN 978-80-246-3264-3.
52. JINDŘICH HOUSKA. Tussilago farfara L. – podběl lékařský/podběl léčivý [online]. Dostupné na < <https://botany.cz/cs/tussilago-farfara/> [cit. 2023-03-24].
53. KUN CAO, YI XU, XIUNI MU a kol. Sensitive determination of pyrrolizidine alkaloids in Tussilago farfara L. by field-amplified, sample-stacking, sweeping micellar electrokinetic chromatography. Journal of Separation Science. 2016, 39(21), 4243-4250, ISSN 16159306. Dostupné z: doi:10.1002/jssc.201600762.
54. Senkirkine, dostupné z: [https://www.sigmaaldrich.com/CZ/en/search/senkirkine?focus=products&page=1&perpage=30&sort=relevance&term=senkirkine&type=product\\_name](https://www.sigmaaldrich.com/CZ/en/search/senkirkine?focus=products&page=1&perpage=30&sort=relevance&term=senkirkine&type=product_name).

55. Výživa, trendy v potravinářství, legislativa. Potravinářské aktuality. 2001, 4, s. 11. [online]. [cit. 2023-03-24].
56. MARGARET VICKERY. Plant Poisons: Their Occurrence, Biochemistry and Physiological Properties. Science Progress [online]. 2010, 93(2), 181-221 [cit. 2023-04-08]. ISSN 0036-8504. Dostupné z: doi:10.3184/003685010X12729948220326.
57. WOLFGANG STEGLICH, BURKHARD FUGMANN, SUSANNE LANG-FUGMANN. Encyclopedia Natural Products [online]. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 2000. ISBN 9783131177117. Dostupné z: doi:10.1055/b-003-125715.
58. Senecionine, dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/CZ/en/product/sial/phl89789>.
59. SCHULZOVÁ, HAJŠLOVÁ. Přírodní zdraví.Chem.Listy.2008, 102,s. 658-666. [online]. [cit. 2023-03-24].
60. Health warming form FSANZ. Food Australia, 56. 2004, 4, s. 108. [online]. Webová stránka. [cit. 2023-03-24].
61. Ministerstvo zemědělství. Přírodní toxiny v medu. Webová stránka. © 2009-2023. Dostupné z: <https://bezpecnostpotravin.cz/prirodni-toxiny-v-medu/>.
62. European Food Safety Authority, © 2011. Scientific Opinion on Pyrrolizidine alkaloids in food and feed. EFSA Journal [online]. 2011, 9(11), 1-134. ISSN 18314732. Dostupné z: doi:10.2903/j.efsa.2011.2406.
63. EFSA varuje před pyrrolizidinovými alkaloidy. [online]. Dostupné z <https://bezpecnostpotravin.cz/efsa-varuje-pred-pyrrolizzidinovymi-alkaloidy-v-medu-a-mlece/>.
64. PRAKASH S. A., PEREIRA N. T., Pyrrolizidine alkaloids in human diet. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis. 1999,443, s. 53-67. [online]. [cit. 2023-03-25].
65. PŘIDAL. Toxické látky v medech. Moderní včelař PODLETÍ. 2009, 4, s. 116. [online]. [cit. 2023-03-25].
66. JOHN EDGAR, LESLIE W. SMITH. Transfer of Pyrrolizidine Alkaloids into Eggs: Food Safety Implications. In: TU, Anthony T. a William GAFFIELD, ed. Natural and Selected Synthetic Toxins [online]. Washington, DC: American Chemical Society, 1999, 1999-12-20, s. 118-128 [cit. 2023-04-06]. ACS Symposium Series. ISBN 9780841236301. Dostupné z: doi:10.1021/bk-2000-0745.ch008.
67. PATRICK P. J. MULDER, SUSANNAH L. DE WITTE, GEERT M. STOOPEN a kol. Transfer of pyrrolizidine alkaloids from various herbs to eggs and meat in laying

- hens. *Food Additives & Contaminants: Part A* [online]. 2016, 33(12), 1826-1839 [cit. 2023-04-06]. ISSN 1944-0049. Dostupné z: doi:10.1080/19440049.2016.1241430.
68. ROXANA LEBADA, ANDREA SCHREIER, SUSANNE SCHERZ a kol. Quantitative Analysis of the Pyrrolizidine Alkaloids Senkirkine and Senecionine in *Tussilago farfara* L. by Capillary Electrophoresis: Institute of Pharmacognosy, University of Vienna, Centre of Pharmacy, Althanstraße 14, A-1090 Vienna, Austria [online]. [cit. 2023-03-29]. Dostupné z: doi:10.1002/1099-1565(200011/12)11:6<366:aid-pca538>3.0.co;2-1.
69. LIJUN YU a SAM FONG YAU LI. Dynamic pH junction-sweeping capillary electrophoresis for online preconcentration of toxic pyrrolizidine alkaloids in Chinese herbal medicine. *ELECTROPHORESIS* [online]. 2005, 26(22), 4360-4367 [cit. 2023-03-29]. ISSN 0173-0835. Dostupné z: doi:10.1002/elps.200500267.
70. HONG WAN, MARCUS ÖHMAN a LARS G BLOMBERG. Bonded dimethylacrylamide as a permanent coating for capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A* [online]. 2001, 924(1-2), 59-70. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/S0021-9673(01)00715-4.
71. HORVATH a DOLNÍK. Polymer wall coatings for capillary electrophoresis. *Electrophoresis* vol. 22,4 (2001): 644-55. doi:10.1002/1522-2683(200102)22:4<644::AID-ELPS644>3.0.CO;2-3.
72. STELLAN HJERTÉN. High-performance electrophoresis: Elimination of electroendosmosis and solute adsorption. *Journal of Chromatography A* [online]. 1985, 347, 191-198 [cit. 2023-04-15]. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/S0021-9673(01)95485-8.
73. BILLY WILLIAMS, GYULA VIGH. Fast, Accurate Mobility Determination Method for Capillary Electrophoresis. *Analytical Chemistry*. 1996, 68(7), 1174-1180, ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/ac950968r.
74. JANA VÁŇOVÁ, MARTINA VAVŘÍKOVÁ, ZUZANA SMETANOVÁ a PETR ČESLA. Comparison of Electrophoretic Methods for Determination of Critical Micelle Concentration of Anionic Alkylsulfate Surfactants in Water/Organic Environment. *Chromatographia* [online]. 2019, 82(4), 733-739. ISSN 0009-5893. Dostupné z: doi:10.1007/s10337-018-3664-4.

## 6 PŘÍLOHA 1

Tabulka 2 - Stanovení EOF na nepokryté kapiláře v 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pufru (pH 4,71)

	1. měření	2. měření
$t_{N1}$ (min)	8,788	8,459
$t_{N2}$ (min)	9,498	9,135
$t_{N3}$ (min)	12,561	12,006
$v_m$ (ms <sup>-1</sup> )	6,85E-04	7,169E-04
$l_{eof}$ (m)	9,677E-02	9,441E-02
$\mu_{eof}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	3,871E-08	3,777E-08
$\bar{\mu}_{eof}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	3,823E-08	

Tabulka 3 - Stanovení EOF na nepokryté kapiláře v 20 mM Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> pufru (pH 9,38)

	1. měření	2. měření
$t_{N1}$ (min)	7,544	7,270
$t_{N2}$ (min)	8,242	7,966
$t_{N3}$ (min)	12,550	12,387
$v_m$ (ms <sup>-1</sup> )	6,860E-04	6,950E-04
$l_{eof}$ (m)	1,486E-01	1,553E-01
$\mu_{eof}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	5,944E-08	6,213E-08
$\bar{\mu}_{eof}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	6,078E-08	

Tabulka 4 - Stanovení EOF na pokryté kapiláře v 20 mM Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> pufru (pH 9,38)

	1. měření	2. měření	3. měření	4. měření	5. měření
$t_{N1}$ (min)	10,884	10,823	10,817	11,030	11,008
$t_{N2}$ (min)	11,557	11,495	11,488	11,693	11,678
$t_{N3}$ (min)	12,287	12,221	12,21	12,409	12,395
$v_m$ (ms <sup>-1</sup> )	7,006E-04	7,044E-04	7,050E-04	6,938E-04	6,945E-04
$l_{eof}$ (m)	2,396E-03	2,282E-03	2,157E-03	2,206E-03	1,959E-03
$\mu_{eof}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	9,584E-10	9,128E-10	8,629E-10	8,825E-10	7,834E-10
$\bar{\mu}_{eof}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	8,800E-10				

Tabulka 5 - Stanovení EOF na pokryté kapiláře v 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pufru (pH 4,71)

	1. měření	2. měření	3. měření	4. měření	5. měření
$t_{N1}$ (min)	10,814	10,773	10,712	10,983	10,717
$t_{N2}$ (min)	11,435	11,405	11,385	11,607	11,365
$t_{N3}$ (min)	12,148	12,119	12,100	12,285	12,112
$v_m$ (ms <sup>-1</sup> )	7,086E-04	7,102E-04	7,114E-04	7,007E-04	7,107E-04
$l_{eof}$ (m)	3,911E-03	3,494E-03	1,793E-03	2,270E-03	4,221E-03
$\mu_{eof}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	1,565E-09	1,398E-09	7,170E-09	9,081E-09	1,689E-09
$\bar{\mu}_{eof}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	1,255E-09				

Tabulka 6 - Migrační charakteristiky senkirkinu na pokryté kapiláře v 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pufru (pH 4,71)

	1. měření	2. měření
$t_{N1}$ (min)	1,272	1,328
$t_{N2}$ (min)	1,372	1,431
$t_{N3}$ (min)	2,178	2,24
$v_m$ (ms <sup>-1</sup> )	3,096E-03	3,096E-03
$l_{senk}$ (m)	1,311E-01	1,311E-01
$\mu_{senk}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	4,371E-08	4,371E-08
$\bar{\mu}_{senk}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	4,371E-08	

Tabulka 7 - Migrační charakteristiky senkirkinu na pokryté kapiláře v 20 mM Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> pufru (pH 9,38)

	1. měření	2. měření
$t_{N1}$ (min)	1,397	1,241
$t_{N2}$ (min)	1,542	1,372
$t_{N3}$ (min)	2,232	2,101
$v_m$ (ms <sup>-1</sup> )	3,023E-03	3,023E-03
$l_{senk}$ (m)	9,886E-02	9,886E-02
$\mu_{senk}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	3,295E-08	3,295E-08
$\bar{\mu}_{senk}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	3,295E-08	

Tabulka 8 - Migrační charakteristiky senkirkinu na pokryté kapiláře v 20 mM Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> pufru (pH 9,38) + 10 mM SDS

	1. měření	2. měření
$t_{N1}$ (min)	1,357	1,358
$t_{N2}$ (min)	1,49	1,492
$t_{N3}$ (min)	2,226	2,227
$v_m$ (ms <sup>-1</sup> )	3,031E-03	3,030E-03
$l_{senk}$ (m)	1,097E-01	1,093E-01
$\mu_{senk}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	3,656E-08	3,642E-08
$\bar{\mu}_{senk}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	3,649E-08	

Tabulka 9 - Migrační charakteristiky senkirkinu na pokryté kapiláře v 20 mM Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> pufru (pH 9,38) + 20 mM SDS

	1. měření	2. měření
$t_{N1}$ (min)	1,497	1,45
$t_{N2}$ (min)	1,6	1,599
$t_{N3}$ (min)	2,3	2,315
$v_m$ (ms <sup>-1</sup> )	2,937E-03	2,919E-03
$l_{senk}$ (m)	1,052E-01	9,929E-02
$\mu_{senk}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	3,507E-08	3,310E-08
$\bar{\mu}_{senk}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	3,408E-08	

Tabulka 10 - Migrační charakteristiky senkirkinu na pokryté kapiláře v 20 mM Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> pufru (pH 9,38) + 30 mM SDS

	1. měření	2. měření
$t_{N1}$ (min)	1,483	1,482
$t_{N2}$ (min)	1,632	1,627
$t_{N3}$ (min)	2,328	2,346
$v_m$ (ms <sup>-1</sup> )	2,903E-03	2,881E-03
$l_{senk}$ (m)	9,528E-02	9,924E-02
$\mu_{senk}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	3,176E-08	3,308E-08
$\bar{\mu}_{senk}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	3,242E-08	

Tabulka 11 - Migrační charakteristiky senkirkinu na pokryté kapiláře v 20 mM Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> pufru (pH 9,38) + 40 mM SDS

	1. měření	2. měření
$t_{N1}$ (min)	1,515	1,517
$t_{N2}$ (min)	1,666	1,669
$t_{N3}$ (min)	2,343	2,347
$v_m$ (ms <sup>-1</sup> )	2,885E-03	2,880E-03
$l_{senk}$ (m)	9,105E-02	9,090E-02
$\mu_{senk}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	3,035E-08	3,030E-08
$\bar{\mu}_{senk}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	3,033E-08	

Tabulka 12 - Migrační charakteristiky senkirkinu na pokryté kapiláře v 20 mM Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> pufru (pH 9,38) + 50 mM SDS

	1. měření	2. měření
$t_{N1}$ (min)	1,619	1,617
$t_{N2}$ (min)	1,726	1,725
$t_{N3}$ (min)	2,214	2,378
$v_m$ (ms <sup>-1</sup> )	3,047E-03	2,844E-03
$l_{senk}$ (m)	6,965E-02	9,300E-02
$\mu_{senk}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	2,322E-08	3,100E-08
$\bar{\mu}_{senk}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	2,711E-08	

Tabulka 13 - Migrační charakteristiky senkirkinu na pokryté kapiláře v 20 mM Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> pufru (pH 9,38) + 10 mM SDS + 5 % v/v ACN

	1. měření	2. měření
$t_{N1}$ (min)	1,6	1,601
$t_{N2}$ (min)	1,746	1,747
$t_{N3}$ (min)	2,461	2,462
$v_m$ (ms <sup>-1</sup> )	2,751E-03	2,750E-03
$l_{senk}$ (m)	9,393E-02	9,389E-02
$\mu_{senk}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	3,131E-08	3,130E-08
$\bar{\mu}_{senk}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	3,130E-08	



Tabulka 14 - Migrační charakteristiky senkirkinu na pokryté kapiláře v 20 mM Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> pufru (pH 9,38) + 20 mM SDS + 5 % v/v ACN

	1. měření	2. měření
$t_{N1}$ (min)	1,692	1,693
$t_{N2}$ (min)	1,848	1,849
$t_{N3}$ (min)	2,576	2,577
$v_m$ (ms <sup>-1</sup> )	2,632E-03	2,631E-03
$l_{senk}$ (m)	9,034E-02	9,030E-02
$\mu_{senk}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	3,011E-08	3,010E-08
$\bar{\mu}_{senk}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	3,011E-08	

Tabulka 15 - Migrační charakteristiky senkirkinu na pokryté kapiláře v 20 mM Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> pufru (pH 9,38) + 30 mM SDS + 5 % v/v ACN

	1. měření	2. měření
$t_{N1}$ (min)	1,598	1,597
$t_{N2}$ (min)	1,742	1,741
$t_{N3}$ (min)	2,403	2,402
$v_m$ (ms <sup>-1</sup> )	2,815E-03	2,817E-03
$l_{senk}$ (m)	8,733E-02	8,737E-02
$\mu_{senk}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	2,911E-08	2,912E-08
$\bar{\mu}_{senk}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	2,912E-08	

Tabulka 16 - Migrační charakteristiky senkirkinu na pokryté kapiláře v 20 mM Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> pufru (pH 9,38) + 40 mM SDS + 5 % v/v ACN

	1. měření	2. měření
$t_{N1}$ (min)	1,63	1,631
$t_{N2}$ (min)	1,769	1,765
$t_{N3}$ (min)	2,447	2,41
$v_m$ (ms <sup>-1</sup> )	2,766E-03	2,807E-03
$l_{senk}$ (m)	8,947E-02	8,608E-02
$\mu_{senk}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	2,982E-08	2,869E-08
$\bar{\mu}_{senk}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	2,926E-08	

Tabulka 17 - Migrační charakteristiky senkirkinu na pokryté kapiláře v 20 mM Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> pufru (pH 9,38) + 50 mM SDS + 5 % v/v ACN

	1. měření	2. měření
$t_{N1}$ (min)	1,79	1,791
$t_{N2}$ (min)	1,944	1,945
$t_{N3}$ (min)	2,642	2,643
$v_m$ (ms <sup>-1</sup> )	2,568E-03	2,568E-03
$l_{senk}$ (m)	8,384E-02	8,380E-02
$\mu_{senk}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	2,795E-08	2,793E-08
$\bar{\mu}_{senk}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	2,794E-08	

Tabulka 18 - Migrační charakteristiky senkirkinu na pokryté kapiláře v 20 mM Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> pufru (pH 9,38) + 10 mM SDS + 10 % v/v ACN

	1. měření	2. měření
$t_{N1}$ (min)	1,672	1,673
$t_{N2}$ (min)	1,807	1,807
$t_{N3}$ (min)	2,511	2,512
$v_m$ (ms <sup>-1</sup> )	2,698E-03	2,697E-03
$l_{senk}$ (m)	9,212E-02	9,240E-02
$\mu_{senk}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	3,071E-08	3,080E-08
$\bar{\mu}_{senk}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	3,075E-08	

Tabulka 19 - Migrační charakteristiky senkirkinu na pokryté kapiláře v 20 mM Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> pufru (pH 9,38) + 20 mM SDS + 10 % v/v ACN

	1. měření	2. měření
$t_{N1}$ (min)	1,76	1,845
$t_{N2}$ (min)	1,903	1,997
$t_{N3}$ (min)	2,633	2,663
$v_m$ (ms <sup>-1</sup> )	2,577E-03	2,549E-03
$l_{senk}$ (m)	9,076E-02	7,861E-02
$\mu_{senk}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	3,025E-08	2,620E-08
$\bar{\mu}_{senk}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	2,823E-08	

Tabulka 20 - Migrační charakteristiky senkirkinu na pokryté kapiláře v 20 mM Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> pufru (pH 9,38) + 30 mM SDS + 10 % v/v ACN

	1. měření	2. měření
$t_{N1}$ (min)	1,76	1,846
$t_{N2}$ (min)	1,903	1,999
$t_{N3}$ (min)	2,628	2,664
$v_m$ (ms <sup>-1</sup> )	2,582E-03	2,548E-03
$l_{senk}$ (m)	9,015E-02	7,827E-02
$\mu_{senk}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	3,005E-08	2,609E-08
$\bar{\mu}_{senk}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	2,807E-08	

Tabulka 21 - Migrační charakteristiky senkirkinu na pokryté kapiláře v 20 mM Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> pufru (pH 9,38) + 40 mM SDS + 10 % v/v ACN

	1. měření	2. měření
$t_{N1}$ (min)	1,799	1,8
$t_{N2}$ (min)	1,958	1,959
$t_{N3}$ (min)	2,654	2,669
$v_m$ (ms <sup>-1</sup> )	2,557E-03	2,543E-03
$l_{senk}$ (m)	8,239E-02	8,408E-02
$\mu_{senk}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	2,746E-08	2,803E-08
$\bar{\mu}_{senk}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	2,775E-08	

Tabulka 22 - Migrační charakteristiky senkirkinu na pokryté kapiláře v 20 mM Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> pufru (pH 9,38) + 50 mM SDS + 10 % v/v ACN

	1. měření	2. měření
$t_{N1}$ (min)	2,059	2,058
$t_{N2}$ (min)	2,254	2,253
$t_{N3}$ (min)	2,979	2,978
$v_m$ (ms <sup>-1</sup> )	2,286E-03	2,287E-03
$l_{senk}$ (m)	7,269E-02	7,271E-02
$\mu_{senk}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	2,423E-08	2,424E-08
$\bar{\mu}_{senk}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	2,423E-08	

Tabulka 23 - Migrační charakteristiky senkirkinu na pokryté kapiláře v 20 mM Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> pufru (pH 9,38) + 10 mM SDS + 15 % v/v ACN

	1. měření	2. měření
$t_{N1}$ (min)	1,947	1,946
$t_{N2}$ (min)	2,105	2,104
$t_{N3}$ (min)	2,868	2,867
$v_m$ (ms <sup>-1</sup> )	2,372E-03	2,373E-03
$l_{senk}$ (m)	8,610E-02	8,613E-02
$\mu_{senk}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	2,870E-08	2,871E-08
$\bar{\mu}_{senk}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	2,870E-08	

Tabulka 24 - Migrační charakteristiky senkirkinu na pokryté kapiláře v 20 mM Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> pufru (pH 9,38) + 20 mM SDS + 15 % v/v ACN

	1. měření	2. měření
$t_{N1}$ (min)	2,213	2,215
$t_{N2}$ (min)	2,384	2,386
$t_{N3}$ (min)	3,1	3,103
$v_m$ (ms <sup>-1</sup> )	2,199E-03	2,197E-03
$l_{senk}$ (m)	7,191E-02	7,197E-02
$\mu_{senk}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	2,397E-08	2,399E-08
$\bar{\mu}_{senk}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	2,398E-08	

Tabulka 25 - Migrační charakteristiky senkirkinu na pokryté kapiláře v 20 mM Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> pufru (pH 9,38) + 30 mM SDS + 15 % v/v ACN

	1. měření	2. měření
$t_{N1}$ (min)	2,133	2,134
$t_{N2}$ (min)	2,294	2,309
$t_{N3}$ (min)	3,022	3,025
$v_m$ (ms <sup>-1</sup> )	2,254E-03	2,252E-03
$l_{senk}$ (m)	7,669E-02	7,310E-02
$\mu_{senk}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	2,556E-08	2,437E-08
$\bar{\mu}_{senk}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	2,496E-08	

Tabulka 26 - Migrační charakteristiky senkirkinu na pokryté kapiláře v 20 mM Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> pufru (pH 9,38) + 40 mM SDS + 15 % v/v ACN

	1. měření	2. měření
$t_{N1}$ (min)	2,236	2,233
$t_{N2}$ (min)	2,399	2,395
$t_{N3}$ (min)	3,112	3,109
$v_m$ (ms <sup>-1</sup> )	2,191E-03	2,193E-03
$l_{senk}$ (m)	7,229E-02	7,262E-02
$\mu_{senk}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	2,410E-08	2,421E-08
$\bar{\mu}_{senk}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	2,415E-08	

Tabulka 27 - Migrační charakteristiky senkirkinu na pokryté kapiláře v 20 mM Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> pufru (pH 9,38) + 50 mM SDS + 15 % v/v ACN

	1. měření	2. měření
$t_{N1}$ (min)	2,301	2,3
$t_{N2}$ (min)	2,422	2,526
$t_{N3}$ (min)	3,159	3,158
$v_m$ (ms <sup>-1</sup> )	2,159E-03	2,160E-03
$l_{senk}$ (m)	7,979E-02	5,261E-02
$\mu_{senk}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	2,660E-08	1,754E-08
$\bar{\mu}_{senk}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	2,207E-08	

Tabulka 28 - Migrační charakteristiky senkirkinu na pokryté kapiláře v 20 mM Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> pufru (pH 9,38) + 10 mM SDS + 20 % v/v ACN

	1. měření	2. měření
$t_{N1}$ (min)	2,258	2,598
$t_{N2}$ (min)	2,448	2,796
$t_{N3}$ (min)	3,193	3,589
$v_m$ (ms <sup>-1</sup> )	2,137E-03	1,906E-03
$l_{senk}$ (m)	7,115E-02	6,805E-02
$\mu_{senk}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	2,372E-08	2,268E-08
$\bar{\mu}_{senk}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	2,320E-08	

Tabulka 29 - Migrační charakteristiky senkirkinu na pokryté kapiláře v 20 mM Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> pufru (pH 9,38) + 20 mM SDS + 20 % v/v ACN

	1. měření	2. měření
$t_{N1}$ (min)	2,127	2,213
$t_{N2}$ (min)	2,312	2,456
$t_{N3}$ (min)	3,298	2,875
$v_m$ (ms <sup>-1</sup> )	2,070E-03	2,366E-03
$l_{senk}$ (m)	9,949E-02	2,499E-02
$\mu_{senk}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	3,316E-08	8,329E-09
$\bar{\mu}_{senk}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	2,075E-08	

Tabulka 30 - Migrační charakteristiky senkirkinu na pokryté kapiláře v 20 mM Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> pufru (pH 9,38) + 30 mM SDS + 20 % v/v ACN

	1. měření	2. měření
$t_{N1}$ (min)	2,661	2,122
$t_{N2}$ (min)	2,885	2,281
$t_{N3}$ (min)	3,609	2,965
$v_m$ (ms <sup>-1</sup> )	1,896E-03	2,296E-03
$l_{senk}$ (m)	5,687E-02	7,233E-02
$\mu_{senk}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	1,896E-08	2,411E-08
$\bar{\mu}_{senk}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	2,153E-08	

Tabulka 31 - Migrační charakteristiky senkirkinu na pokryté kapiláře v 20 mM Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> pufru (pH 9,38) + 40 mM SDS + 20 % v/v ACN

	1. měření	2. měření
$t_{N1}$ (min)	2,903	2,904
$t_{N2}$ (min)	3,131	3,13
$t_{N3}$ (min)	3,857	3,858
$v_m$ (ms <sup>-1</sup> )	1,776E-03	1,776E-03
$l_{senk}$ (m)	5,308E-02	5,349E-02
$\mu_{senk}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	1,769E-08	1,783E-08
$\bar{\mu}_{senk}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	1,776E-08	

Tabulka 32 - Migrační charakteristiky senkirkinu na pokryté kapiláře v 20 mM Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> pufru (pH 9,38) + 50 mM SDS + 20 % v/v ACN

	1. měření	2. měření
$t_{N1}$ (min)	3,127	3,126
$t_{N2}$ (min)	3,368	3,369
$t_{N3}$ (min)	4,04	4,046
$v_m$ (ms <sup>-1</sup> )	1,698E-03	1,695E-03
$l_{senk}$ (m)	4,390E-02	4,414E-02
$\mu_{senk}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	1,463E-08	1,471E-08
$\bar{\mu}_{senk}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	1,467E-08	

Tabulka 33 - Migrační charakteristiky senkirkinu na pokryté kapiláře v 20 mM Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> pufru (pH 9,38) + 10 mM SDS + 5 % v/v MeOH

	1. měření	2. měření
$t_{N1}$ (min)	2,022	2,023
$t_{N2}$ (min)	2,167	2,169
$t_{N3}$ (min)	2,871	2,872
$v_m$ (ms <sup>-1</sup> )	2,369E-03	2,369E-03
$l_{senk}$ (m)	7,947E-02	7,916E-02
$\mu_{senk}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	2,649E-08	2,639E-08
$\bar{\mu}_{senk}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	2,644E-08	

Tabulka 34 - Migrační charakteristiky senkirkinu na pokryté kapiláře v 20 mM Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> pufru (pH 9,38) + 20 mM SDS + 5 % v/v MeOH

	1. měření	2. měření
$t_{N1}$ (min)	2,062	2,063
$t_{N2}$ (min)	2,223	2,225
$t_{N3}$ (min)	2,86	2,861
$v_m$ (ms <sup>-1</sup> )	2,378E-03	2,377E-03
$l_{senk}$ (m)	6,792E-02	6,761E-02
$\mu_{senk}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	2,264E-08	2,254E-08
$\bar{\mu}_{senk}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	2,259E-08	

Tabulka 35 - Migrační charakteristiky senkirkinu na pokryté kapiláře v 20 mM Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> pufru (pH 9,38) + 30 mM SDS + 5 % v/v MeOH

	1. měření	2. měření
$t_{N1}$ (min)	2,111	1,597
$t_{N2}$ (min)	2,356	1,741
$t_{N3}$ (min)	2,9	2,402
$v_m$ (ms <sup>-1</sup> )	2,346E-03	2,817E-03
$l_{senk}$ (m)	4,209E-02	8,737E-02
$\mu_{senk}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	1,403E-08	2,912E-08
$\bar{\mu}_{senk}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	2,158E-08	

Tabulka 36 - Migrační charakteristiky senkirkinu na pokryté kapiláře v 20 mM Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> pufru (pH 9,38) + 40 mM SDS + 5 % v/v MeOH

	1. měření	2. měření
$t_{N1}$ (min)	1,9	1,631
$t_{N2}$ (min)	2,128	1,765
$t_{N3}$ (min)	2,802	2,41
$v_m$ (ms <sup>-1</sup> )	2,426E-03	2,807E-03
$l_{senk}$ (m)	6,492E-02	8,608E-02
$\mu_{senk}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	2,164E-08	2,869E-08
$\bar{\mu}_{senk}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	2,517E-08	

Tabulka 37 - Migrační charakteristiky senkirkinu na pokryté kapiláře v 20 mM Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> pufru (pH 9,38) + 50 mM SDS + 5 % v/v MeOH

	1. měření	2. měření
$t_{N1}$ (min)	1,932	1,791
$t_{N2}$ (min)	2,076	1,945
$t_{N3}$ (min)	2,774	2,643
$v_m$ (ms <sup>-1</sup> )	2,450E-03	2,568E-03
$l_{senk}$ (m)	8,143E-02	8,380E-02
$\mu_{senk}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	2,714E-08	2,793E-08
$\bar{\mu}_{senk}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	2,754E-08	

Tabulka 38 - Migrační charakteristiky senkirkinu na pokryté kapiláře v 20 mM Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> pufru (pH 9,38) + 10 mM SDS + 10 % v/v MeOH

	1. měření	2. měření
$t_{N1}$ (min)	3,015	3,015
$t_{N2}$ (min)	3,102	3,105
$t_{N3}$ (min)	3,999	3,629
$v_m$ (ms <sup>-1</sup> )	1,715E-03	1,886E-03
$l_{senk}$ (m)	8,333E-02	4,910E-02
$\mu_{senk}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	2,778E-08	1,637E-08
$\bar{\mu}_{senk}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	2,207E-08	

Tabulka 39 - Migrační charakteristiky senkirkinu na pokryté kapiláře v 20 mM Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> pufru (pH 9,38) + 20 mM SDS + 10 % v/v MeOH

	1. měření	2. měření
$t_{N1}$ (min)	3,215	3,125
$t_{N2}$ (min)	3,221	3,119
$t_{N3}$ (min)	3,589	3,785
$v_m$ (ms <sup>-1</sup> )	1,906E-03	1,810E-03
$l_{senk}$ (m)	4,140E-02	7,296E-02
$\mu_{senk}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	1,380E-08	2,432E-08
$\bar{\mu}_{senk}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	1,906E-08	

Tabulka 40 - Migrační charakteristiky senkirkinu na pokryté kapiláře v 20 mM Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> pufru (pH 9,38) + 30 mM SDS + 10 % v/v MeOH

	1. měření	2. měření
$t_{N1}$ (min)	2,184	2,184
$t_{N2}$ (min)	2,199	2,198
$t_{N3}$ (min)	2,598	2,456
$v_m$ (ms <sup>-1</sup> )	2,611E-03	2,757E-03
$l_{senk}$ (m)	6,015E-02	4,036E-02
$\mu_{senk}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	2,005E-08	1,345E-08
$\bar{\mu}_{senk}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	1,675E-08	

Tabulka 41 - Migrační charakteristiky senkirkinu na pokryté kapiláře v 20 mM Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> pufru (pH 9,38) + 40 mM SDS + 10 % v/v MeOH

	1. měření	2. měření
$t_{N1}$ (min)	2,419	2,485
$t_{N2}$ (min)	2,511	2,636
$t_{N3}$ (min)	3,186	3,185
$v_m$ (ms <sup>-1</sup> )	2,141E-03	2,142E-03
$l_{senk}$ (m)	7,490E-02	5,115E-02
$\mu_{senk}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	2,497E-08	1,705E-08
$\bar{\mu}_{senk}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	2,101E-08	

Tabulka 42 - Migrační charakteristiky senkirkinu na pokryté kapiláře v 20 mM Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> pufru (pH 9,38) + 50 mM SDS + 10 % v/v MeOH

	1. měření	2. měření
$t_{N1}$ (min)	2,601	2,457
$t_{N2}$ (min)	2,603	2,604
$t_{N3}$ (min)	3,261	3,263
$v_m$ (ms <sup>-1</sup> )	2,093E-03	2,092E-03
$l_{senk}$ (m)	8,238E-02	6,426E-02
$\mu_{senk}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	2,746E-08	2,142E-08
$\bar{\mu}_{senk}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	2,444E-08	

Tabulka 43 - Migrační charakteristiky senkirkinu na pokryté kapiláře v 20 mM Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> pufru (pH 9,38) + 10 mM SDS + 15 % v/v MeOH

	1. měření	2. měření
$t_{N1}$ (min)	2,931	2,933
$t_{N2}$ (min)	3,101	3,105
$t_{N3}$ (min)	3,8	3,811
$v_m$ (ms <sup>-1</sup> )	1,803E-03	1,797E-03
$l_{senk}$ (m)	5,721E-02	5,759E-02
$\mu_{senk}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	1,907E-08	1,920E-08
$\bar{\mu}_{senk}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	1,913E-08	

Tabulka 44 - Migrační charakteristiky senkirkinu na pokryté kapiláře v 20 mM Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> pufru (pH 9,38) + 20 mM SDS + 15 % v/v MeOH

	1. měření	2. měření
$t_{N1}$ (min)	2,996	2,997
$t_{N2}$ (min)	3,19	3,241
$t_{N3}$ (min)	3,888	3,889
$v_m$ (ms <sup>-1</sup> )	1,763E-03	1,762E-03
$l_{senk}$ (m)	5,330E-02	4,272E-02
$\mu_{senk}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	1,777E-08	1,424E-08
$\bar{\mu}_{senk}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	1,600E-08	

Tabulka 45 - Migrační charakteristiky senkirkinu na pokryté kapiláře v 20 mM Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> pufru (pH 9,38) + 30 mM SDS + 15 % v/v MeOH

	1. měření	2. měření
$t_{N1}$ (min)	2,962	2,963
$t_{N2}$ (min)	3,232	3,235
$t_{N3}$ (min)	3,896	3,899
$v_m$ (ms <sup>-1</sup> )	1,759E-03	1,758E-03
$l_{senk}$ (m)	4,158E-02	4,134E-02
$\mu_{senk}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	1,386E-08	1,378E-08
$\bar{\mu}_{senk}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	1,382E-08	



Tabulka 46 - Migrační charakteristiky senkirkinu na pokryté kapiláře v 20 mM Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> pufru (pH 9,38) + 40 mM SDS + 15 % v/v MeOH

	1. měření	2. měření
$t_{N1}$ (min)	2,352	2,125
$t_{N2}$ (min)	2,631	2,395
$t_{N3}$ (min)	3,181	3,109
$v_m$ (ms <sup>-1</sup> )	2,144E-03	2,193E-03
$l_{senk}$ (m)	3,487E-02	5,841E-02
$\mu_{senk}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	1,162E-08	1,947E-08
$\bar{\mu}_{senk}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	1,555E-08	

Tabulka 47 - Migrační charakteristiky senkirkinu na pokryté kapiláře v 20 mM Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> pufru (pH 9,38) + 50 mM SDS + 15 % v/v MeOH

	1. měření	2. měření
$t_{N1}$ (min)	3,109	3,215
$t_{N2}$ (min)	3,279	3,279
$t_{N3}$ (min)	3,899	3,899
$v_m$ (ms <sup>-1</sup> )	1,758E-03	1,758E-03
$l_{senk}$ (m)	4,746E-02	5,864E-02
$\mu_{senk}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	1,582E-08	1,955E-08
$\bar{\mu}_{senk}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	1,768E-08	

Tabulka 48 - Migrační charakteristiky senkirkinu na pokryté kapiláře v 20 mM Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> pufru (pH 9,38) + 10 mM SDS + 20 % v/v MeOH

	1. měření	2. měření
$t_{N1}$ (min)	2,918	2,918
$t_{N2}$ (min)	3,114	3,119
$t_{N3}$ (min)	3,687	3,701
$v_m$ (ms <sup>-1</sup> )	1,857E-03	1,850E-03
$l_{senk}$ (m)	4,200E-02	4,228E-02
$\mu_{senk}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	1,400E-08	1,409E-08
$\bar{\mu}_{senk}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	1,405E-08	

Tabulka 49 – Migrační charakteristiky senkirkinu na pokryté kapiláře v 20 mM Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> pufru (pH 9,38) + 20 mM SDS + 20 % v/v MeOH

	1. měření	2. měření
$t_{N1}$ (min)	4,033	4,031
$t_{N2}$ (min)	4,232	4,311
$t_{N3}$ (min)	4,963	4,959
$v_m$ (ms <sup>-1</sup> )	1,387E-03	1,388E-03
$l_{senk}$ (m)	4,428E-02	3,065E-02
$\mu_{senk}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	1,476E-08	1,022E-08
$\bar{\mu}_{senk}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	1,249E-08	

Tabulka 50 - Migrační charakteristiky senkirkinu na pokryté kapiláře v 20 mM Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> pufri (pH 9,38) + 30 mM SDS + 20 % v/v MeOH

	1. měření	2. měření
$t_{N1}$ (min)	3,985	3,999
$t_{N2}$ (min)	4,258	4,389
$t_{N3}$ (min)	4,952	4,952
$v_m$ (ms <sup>-1</sup> )	1,390E-03	1,390E-03
$l_{senk}$ (m)	3,512E-02	1,443E-02
$\mu_{senk}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	1,171E-08	4,810E-09
$\bar{\mu}_{senk}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	8,258E-09	

Tabulka 51 - Migrační charakteristiky senkirkinu na pokryté kapiláře v 20 mM Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> pufri (pH 9,38) + 40 mM SDS + 20 % v/v MeOH

	1. měření	2. měření
$t_{N1}$ (min)	4,449	4,448
$t_{N2}$ (min)	4,929	4,927
$t_{N3}$ (min)	5,759	5,987
$v_m$ (ms <sup>-1</sup> )	1,198E-03	1,153E-03
$l_{senk}$ (m)	2,516E-02	4,020E-02
$\mu_{senk}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	8,387E-09	1,340E-08
$\bar{\mu}_{senk}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	1,089E-08	

Tabulka 52 - Migrační charakteristiky senkirkinu na pokryté kapiláře v 20 mM Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> pufri (pH 9,38) + 50 mM SDS + 20 % v/v MeOH

	1. měření	2. měření
$t_{N1}$ (min)	4,784	4,998
$t_{N2}$ (min)	5,018	5,019
$t_{N3}$ (min)	5,656	5,658
$v_m$ (ms <sup>-1</sup> )	1,220E-03	1,219E-03
$l_{senk}$ (m)	2,956E-02	4,521E-02
$\mu_{senk}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	9,855E-09	1,507E-08
$\bar{\mu}_{senk}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	1,246E-08	

Tabulka 53 - Prekoncentrace 10x zředěného senkirkinu

čas dávkování (s)	plocha píku	plocha píku	plocha píku	plocha píku
	10 mM SDS	30 mM SDS	10 mM SDS + 5 % v/v ACN	30 mM SDS + 5 % v/v ACN
10	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
30	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
60	< LOD	< LOD	< LOD	2,9
120	1,3	2,9	8,8	6,5
240	3,7	11,3	17,6	17,2
360	6,1	15,5	26,4	25,7
480	8	19,9	32,5	29,9
600	9,6	32,2	52,4	32,7
720	10,9	33,1	56,9	34,3

Tabulka 54 - Prekoncentrace 100x zředěného senkirkinu

čas dávkování (s)	plocha píku	plocha píku	plocha píku	plocha píku
	10 mM SDS	30 mM SDS	10 mM SDS + 5 % v/v ACN	30 mM SDS + 5 % v/v ACN
10	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
30	< LOD	< LOD	< LOD	2,9
60	< LOD	< LOD	1,9	5,4
120	4,6	6,6	14,4	8,6
240	20,02	23,5	24,6	15,1
360	43,4	47,2	42,1	17,9
480	210,3	190	54,1	43,7
600	413,9	386,4	128,4	51,1
720	616,8	624,1	190	63,5

Tabulka 55 - Migrační charakteristiky senecioninu na pokryté kapiláře v 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pufru (pH 4,71)

	1. měření	2. měření
$t_{N1}$ (min)	0,996	1,043
$t_{N2}$ (min)	1,109	1,133
$t_{N3}$ (min)	1,898	1,931
$v_m$ (ms <sup>-1</sup> )	3,533E-03	3,533E-03
$l_{senk}$ (m)	1,433E-01	1,433E-01
$\mu_{senec}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	4,777E-08	4,777E-08
$\bar{\mu}_{senec}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	4,777E-08	

Tabulka 56 - Migrační charakteristiky senecioninu na pokryté kapiláře v 20 mM Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> pufri (pH 9,38)

	1. měření	2. měření
$t_{N1}$ (min)	1,241	1,245
$t_{N2}$ (min)	1,372	1,377
$t_{N3}$ (min)	2,101	2,104
$v_m$ (ms <sup>-1</sup> )	3,205E-03	3,205E-03
$l_{senec}$ (m)	1,150E-01	1,150E-01
$\mu_{senec}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	3,833E-08	3,833E-08
$\bar{\mu}_{senec}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	3,833E-08	

Tabulka 57 - Migrační charakteristiky senecioninu na pokryté kapiláře v 20 mM Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> pufri (pH 9,38) + 10 mM SDS

	1. měření	2. měření
$t_{N1}$ (min)	1,617	1,522
$t_{N2}$ (min)	1,758	1,671
$t_{N3}$ (min)	2,495	2,608
$v_m$ (ms <sup>-1</sup> )	2,715E-03	2,601E-03
$l_{senec}$ (m)	9,709E-02	1,230E-01
$\mu_{senec}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	3,236E-08	4,099E-08
$\bar{\mu}_{senec}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	3,668E-08	

Tabulka 58 - Migrační charakteristiky senecioninu na pokryté kapiláře v 20 mM Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> pufri (pH 9,38) + 20 mM SDS

	1. měření	2. měření
$t_{N1}$ (min)	1,311	1,312
$t_{N2}$ (min)	1,524	1,568
$t_{N3}$ (min)	2,365	2,478
$v_m$ (ms <sup>-1</sup> )	2,859E-03	2,733E-03
$l_{senec}$ (m)	1,077E-01	1,072E-01
$\mu_{senec}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	3,591E-08	3,575E-08
$\bar{\mu}_{senec}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	3,583E-08	

Tabulka 59 - Migrační charakteristiky senecioninu na pokryté kapiláře v 20 mM Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> pufri (pH 9,38) + 30 mM SDS

	1. měření	2. měření
$t_{N1}$ (min)	1,421	1,42
$t_{N2}$ (min)	1,6	1,566
$t_{N3}$ (min)	2,369	2,349
$v_m$ (ms <sup>-1</sup> )	2,854E-03	2,878E-03
$l_{senec}$ (m)	1,010E-01	1,100E-01
$\mu_{senec}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	3,368E-08	3,666E-08
$\bar{\mu}_{senec}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	3,517E-08	

Tabulka 60 - Migrační charakteristiky senecioninu na pokryté kapiláře v 20 mM Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>pufru (pH 9,38) + 40 mM SDS

	1. měření	2. měření
$t_{N1}$ (min)	1,531	1,534
$t_{N2}$ (min)	1,657	1,659
$t_{N3}$ (min)	2,388	2,385
$v_m$ (ms <sup>-1</sup> )	2,832E-03	2,836E-03
$l_{senec}$ (m)	1,028E-01	1,023E-01
$\mu_{senec}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	3,427E-08	3,409E-08
$\bar{\mu}_{senec}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	3,418E-08	

Tabulka 61 - Migrační charakteristiky senecioninu na pokryté kapiláře v 20 mM Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>pufru (pH 9,38) + 50 mM SDS

	1. měření	2. měření
$t_{N1}$ (min)	1,57	1,482
$t_{N2}$ (min)	1,713	1,62
$t_{N3}$ (min)	2,345	2,437
$v_m$ (ms <sup>-1</sup> )	2,883E-03	2,777E-03
$l_{senec}$ (m)	8,458E-02	1,132E-01
$\mu_{senec}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	2,819E-08	3,772E-08
$\bar{\mu}_{senec}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	3,295E-08	

Tabulka 62 - Migrační charakteristiky senecioninu na pokryté kapiláře v 20 mM Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>pufru (pH 9,38) + 10 mM SDS + 5 % v/v ACN

	1. měření	2. měření
$t_{N1}$ (min)	1,521	1,611
$t_{N2}$ (min)	1,67	1,721
$t_{N3}$ (min)	2,481	2,499
$v_m$ (ms <sup>-1</sup> )	2,730E-03	2,711E-03
$l_{senec}$ (m)	1,084E-01	1,086E-01
$\mu_{senec}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	3,614E-08	3,622E-08
$\bar{\mu}_{senec}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	3,618E-08	

Tabulka 63 - Migrační charakteristiky senecioninu na pokryté kapiláře v 20 mM Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>pufru (pH 9,38) + 20 mM SDS + 5 % v/v ACN

	1. měření	2. měření
$t_{N1}$ (min)	1,66	1,489
$t_{N2}$ (min)	1,808	1,615
$t_{N3}$ (min)	2,61	2,337
$v_m$ (ms <sup>-1</sup> )	2,599E-03	2,892E-03
$l_{senec}$ (m)	1,020E-01	1,034E-01
$\mu_{senec}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	3,400E-08	3,447E-08
$\bar{\mu}_{senec}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	3,423E-08	

Tabulka 64 - Migrační charakteristiky senecioninu na pokryté kapiláře v 20 mM Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> pufru (pH 9,38) + 30 mM SDS + 5 % v/v ACN

	1. měření	2. měření
$t_{N1}$ (min)	1,735	1,688
$t_{N2}$ (min)	1,886	1,844
$t_{N3}$ (min)	2,595	2,556
$v_m$ (ms <sup>-1</sup> )	2,614E-03	2,652E-03
$l_{senec}$ (m)	8,750E-02	8,848E-02
$\mu_{senec}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	2,917E-08	2,949E-08
$\bar{\mu}_{senec}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	2,933E-08	

Tabulka 65 - Migrační charakteristiky senecioninu na pokryté kapiláře v 20 mM Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> pufru (pH 9,38) + 40 mM SDS + 5 % v/v ACN

	1. měření	2. měření
$t_{N1}$ (min)	1,718	1,795
$t_{N2}$ (min)	1,899	1,939
$t_{N3}$ (min)	2,594	2,602
$v_m$ (ms <sup>-1</sup> )	2,615E-03	2,607E-03
$l_{senec}$ (m)	8,063E-02	8,117E-02
$\mu_{senec}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	2,688E-08	2,706E-08
$\bar{\mu}_{senec}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	2,697E-08	

Tabulka 66 - Migrační charakteristiky senecioninu na pokryté kapiláře v 20 mM Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> pufru (pH 9,38) + 50 mM SDS + 5 % v/v ACN

	1. měření	2. měření
$t_{N1}$ (min)	1,831	1,923
$t_{N2}$ (min)	1,962	2,071
$t_{N3}$ (min)	2,57	2,733
$v_m$ (ms <sup>-1</sup> )	2,638E-03	2,486E-03
$l_{senec}$ (m)	7,551E-02	7,665E-02
$\mu_{senec}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	2,517E-08	2,555E-08
$\bar{\mu}_{senec}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	2,536E-08	

Tabulka 67 - Migrační charakteristiky senecioninu na pokryté kapiláře v 20 mM Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> pufru (pH 9,38) + 10 mM SDS + 10 % v/v ACN

	1. měření	2. měření
$t_{N1}$ (min)	1,75	1,751
$t_{N2}$ (min)	1,893	1,893
$t_{N3}$ (min)	2,581	2,656
$v_m$ (ms <sup>-1</sup> )	2,627E-03	2,555E-03
$l_{senec}$ (m)	8,591E-02	9,521E-02
$\mu_{senec}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	2,864E-08	3,174E-08
$\bar{\mu}_{senec}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	3,019E-08	

Tabulka 68 - Migrační charakteristiky senecioninu na pokryté kapiláře v 20 mM Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> pufru (pH 9,38) + 20 mM SDS + 10 % v/v ACN

	1. měření	2. měření
$t_{N1}$ (min)	1,712	1,7
$t_{N2}$ (min)	1,853	1,839
$t_{N3}$ (min)	2,578	2,429
$v_m$ (ms <sup>-1</sup> )	2,630E-03	2,786E-03
$l_{senec}$ (m)	9,216E-02	7,540E-02
$\mu_{senec}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	3,072E-08	2,513E-08
$\bar{\mu}_{senec}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	2,793E-08	

Tabulka 69 - Migrační charakteristiky senecioninu na pokryté kapiláře v 20 mM Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> pufru (pH 9,38) + 30 mM SDS + 10 % v/v ACN

	1. měření	2. měření
$t_{N1}$ (min)	1,838	2,083
$t_{N2}$ (min)	1,978	2,247
$t_{N3}$ (min)	2,615	3,019
$v_m$ (ms <sup>-1</sup> )	2,594E-03	2,256E-03
$l_{senec}$ (m)	7,736E-02	8,231E-02
$\mu_{senec}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	2,579E-08	2,744E-08
$\bar{\mu}_{senec}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	2,661E-08	

Tabulka 70 - Migrační charakteristiky senecioninu na pokryté kapiláře v 20 mM Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> pufru (pH 9,38) + 40 mM SDS + 10 % v/v ACN

	1. měření	2. měření
$t_{N1}$ (min)	1,615	1,719
$t_{N2}$ (min)	1,888	1,896
$t_{N3}$ (min)	2,577	2,573
$v_m$ (ms <sup>-1</sup> )	2,631E-03	2,635E-03
$l_{senec}$ (m)	6,568E-02	7,906E-02
$\mu_{senec}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	2,189E-08	2,635E-08
$\bar{\mu}_{senec}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	2,412E-08	

Tabulka 71 - Migrační charakteristiky senecioninu na pokryté kapiláře v 20 mM Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> pufru (pH 9,38) + 50 mM SDS + 10 % v/v ACN

	1. měření	2. měření
$t_{N1}$ (min)	2,023	1,973
$t_{N2}$ (min)	2,215	2,117
$t_{N3}$ (min)	2,807	2,795
$v_m$ (ms <sup>-1</sup> )	2,422E-03	2,432E-03
$l_{senec}$ (m)	5,812E-02	7,792E-02
$\mu_{senec}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	1,937E-08	2,597E-08
$\bar{\mu}_{senec}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	2,267E-08	

Tabulka 72 - Migrační charakteristiky senecioninu na pokryté kapiláře v 20 mM Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> pufru (pH 9,38) + 10 mM SDS + 15 % v/v ACN

	1. měření	2. měření
$t_{N1}$ (min)	1,996	1,995
$t_{N2}$ (min)	2,158	2,162
$t_{N3}$ (min)	2,903	2,903
$v_m$ (ms <sup>-1</sup> )	2,344E-03	2,344E-03
$l_{senec}$ (m)	8,199E-02	8,073E-02
$\mu_{senec}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	2,733E-08	2,691E-08
$\bar{\mu}_{senec}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	2,712E-08	

Tabulka 73 - Migrační charakteristiky senecioninu na pokryté kapiláře v 20 mM Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> pufru (pH 9,38) + 20 mM SDS + 15 % v/v ACN

	1. měření	2. měření
$t_{N1}$ (min)	2,526	2,564
$t_{N2}$ (min)	2,799	2,763
$t_{N3}$ (min)	3,675	3,538
$v_m$ (ms <sup>-1</sup> )	1,863E-03	1,933E-03
$l_{senec}$ (m)	6,739E-02	6,680E-02
$\mu_{senec}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	2,246E-08	2,227E-08
$\bar{\mu}_{senec}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	2,237E-08	

Tabulka 74 - Migrační charakteristiky senecioninu na pokryté kapiláře v 20 mM Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> pufru (pH 9,38) + 30 mM SDS + 15 % v/v ACN

	1. měření	2. měření
$t_{N1}$ (min)	2,091	2,344
$t_{N2}$ (min)	2,26	2,545
$t_{N3}$ (min)	2,635	3,457
$v_m$ (ms <sup>-1</sup> )	2,575E-03	1,977E-03
$l_{senec}$ (m)	3,183E-02	8,435E-02
$\mu_{senec}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	1,061E-08	2,812E-08
$\bar{\mu}_{senec}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	1,936E-08	

Tabulka 75 - Migrační charakteristiky senecioninu na pokryté kapiláře v 20 mM Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> pufru (pH 9,38) + 40 mM SDS + 15 % v/v ACN

	1. měření	2. měření
$t_{N1}$ (min)	2,149	2,147
$t_{N2}$ (min)	2,31	2,09
$t_{N3}$ (min)	2,598	2,597
$v_m$ (ms <sup>-1</sup> )	2,611E-03	2,612E-03
$l_{senec}$ (m)	1,989E-02	8,838E-02
$\mu_{senec}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	6,631E-09	2,946E-08
$\bar{\mu}_{senec}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	1,805E-08	



Tabulka 76 - Migrační charakteristiky senecioninu na pokryté kapiláře v 20 mM Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> pufru (pH 9,38) + 50 mM SDS + 15 % v/v ACN

	1. měření	2. měření
$t_{N1}$ (min)	2,374	2,532
$t_{N2}$ (min)	2,578	3,076
$t_{N3}$ (min)	3,213	3,986
$v_m$ (ms <sup>-1</sup> )	2,124E-03	1,720E-03
$l_{senec}$ (m)	5,492E-02	3,778E-02
$\mu_{senec}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	1,831E-08	1,259E-08
$\bar{\mu}_{senec}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	1,545E-08	

Tabulka 77 - Migrační charakteristiky senecioninu na pokryté kapiláře v 20 mM Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> pufru (pH 9,38) + 10 mM SDS + 20 % v/v ACN

	1. měření	2. měření
$t_{N1}$ (min)	2,82	2,598
$t_{N2}$ (min)	3,038	2,796
$t_{N3}$ (min)	3,778	3,589
$v_m$ (ms <sup>-1</sup> )	1,813E-03	1,906E-03
$l_{senec}$ (m)	5,678E-02	6,805E-02
$\mu_{senec}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	1,893E-08	2,268E-08
$\bar{\mu}_{senec}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	2,080E-08	

Tabulka 78 - Migrační charakteristiky senecioninu na pokryté kapiláře v 20 mM Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> pufru (pH 9,38) + 20 mM SDS + 20 % v/v ACN

	1. měření	2. měření
$t_{N1}$ (min)	2,222	2,112
$t_{N2}$ (min)	2,598	2,214
$t_{N3}$ (min)	2,986	2,97
$v_m$ (ms <sup>-1</sup> )	2,281E-03	2,293E-03
$l_{senec}$ (m)	1,642E-03	8,996E-02
$\mu_{senec}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	5,474E-10	2,999E-08
$\bar{\mu}_{senec}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	1,527E-08	

Tabulka 79 - Migrační charakteristiky senecioninu na pokryté kapiláře v 20 mM Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> pufru (pH 9,38) + 30 mM SDS + 20 % v/v ACN

	1. měření	2. měření
$t_{N1}$ (min)	2,183	2,122
$t_{N2}$ (min)	2,341	2,281
$t_{N3}$ (min)	2,597	2,965
$v_m$ (ms <sup>-1</sup> )	2,612E-03	2,296E-03
$l_{senec}$ (m)	1,536E-02	7,233E-02
$\mu_{senec}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	5,119E-09	2,411E-08
$\bar{\mu}_{senec}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	1,462E-08	

Tabulka 80 - Migrační charakteristiky senecioninu na pokryté kapiláře v 20 mM Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> pufru (pH 9,38) + 40 mM SDS + 20 % v/v ACN

	1. měření	2. měření
$t_{N1}$ (min)	2,283	2,284
$t_{N2}$ (min)	2,441	2,336
$t_{N3}$ (min)	2,697	2,702
$v_m$ (ms <sup>-1</sup> )	2,518E-03	2,513E-03
$l_{senec}$ (m)	1,480E-02	4,735E-02
$\mu_{senec}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	4,935E-09	1,578E-08
$\bar{\mu}_{senec}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	1,036E-08	

Tabulka 81 - Migrační charakteristiky senecioninu na pokryté kapiláře v 20 mM Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> pufru (pH 9,38) + 50 mM SDS + 20 % v/v ACN

	1. měření	2. měření
$t_{N1}$ (min)	2,305	2,321
$t_{N2}$ (min)	2,506	2,547
$t_{N3}$ (min)	2,8	2,98
$v_m$ (ms <sup>-1</sup> )	2,428E-03	2,285E-03
$l_{senec}$ (m)	1,355E-02	2,838E-02
$\mu_{senec}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	4,516E-09	9,460E-09
$\bar{\mu}_{senec}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	6,988E-09	

Tabulka 82 - Migrační charakteristiky senecioninu na pokryté kapiláře v 20 mM Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> pufru (pH 9,38) + 10 mM SDS + 5 % v/v MeOH

	1. měření	2. měření
$t_{N1}$ (min)	2,045	1,879
$t_{N2}$ (min)	2,214	2,034
$t_{N3}$ (min)	2,856	2,837
$v_m$ (ms <sup>-1</sup> )	2,381E-03	2,397E-03
$l_{senec}$ (m)	6,759E-02	9,319E-02
$\mu_{senec}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	2,253E-08	3,106E-08
$\bar{\mu}_{senec}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	2,680E-08	

Tabulka 83 - Migrační charakteristiky senecioninu na pokryté kapiláře v 20 mM Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> pufru (pH 9,38) + 20 mM SDS + 5 % v/v MeOH

	1. měření	2. měření
$t_{N1}$ (min)	1,928	1,924
$t_{N2}$ (min)	2,067	2,058
$t_{N3}$ (min)	2,802	2,793
$v_m$ (ms <sup>-1</sup> )	2,426E-03	2,434E-03
$l_{senec}$ (m)	8,676E-02	8,776E-02
$\mu_{senec}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	2,892E-08	2,925E-08
$\bar{\mu}_{senec}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	2,909E-08	

Tabulka 84 - Migrační charakteristiky senecioninu na pokryté kapiláře v 20 mM Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> pufru (pH 9,38) + 30 mM SDS + 5 % v/v MeOH

	1. měření	2. měření
$t_{N1}$ (min)	1,735	1,669
$t_{N2}$ (min)	1,886	1,829
$t_{N3}$ (min)	2,595	2,54
$v_m$ (ms <sup>-1</sup> )	2,614E-03	2,668E-03
$l_{senec}$ (m)	8,750E-02	8,822E-02
$\mu_{senec}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	2,917E-08	2,941E-08
$\bar{\mu}_{senec}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	2,929E-08	

Tabulka 85 - Migrační charakteristiky senecioninu na pokryté kapiláře v 20 mM Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> pufru (pH 9,38) + 40 mM SDS + 5 % v/v MeOH

	1. měření	2. měření
$t_{N1}$ (min)	1,828	1,848
$t_{N2}$ (min)	1,961	1,98
$t_{N3}$ (min)	2,671	2,618
$v_m$ (ms <sup>-1</sup> )	2,541E-03	2,591E-03
$l_{senec}$ (m)	8,798E-02	7,867E-02
$\mu_{senec}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	2,933E-08	2,622E-08
$\bar{\mu}_{senec}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	2,778E-08	

Tabulka 86 - Migrační charakteristiky senecioninu na pokryté kapiláře v 20 mM Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> pufru (pH 9,38) + 50 mM SDS + 5 % v/v MeOH

	1. měření	2. měření
$t_{N1}$ (min)	1,848	1,849
$t_{N2}$ (min)	1,977	1,988
$t_{N3}$ (min)	2,621	2,623
$v_m$ (ms <sup>-1</sup> )	2,588E-03	2,587E-03
$l_{senec}$ (m)	7,998E-02	7,697E-02
$\mu_{senec}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	2,666E-08	2,566E-08
$\bar{\mu}_{senec}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	2,616E-08	

Tabulka 87 - Migrační charakteristiky senecioninu na pokryté kapiláře v 20 mM Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> pufru (pH 9,38) + 10 mM SDS + 10 % v/v MeOH

	1. měření	2. měření
$t_{N1}$ (min)	2,215	2,082
$t_{N2}$ (min)	2,27	2,213
$t_{N3}$ (min)	2,958	2,811
$v_m$ (ms <sup>-1</sup> )	2,302E-03	2,419E-03
$l_{senec}$ (m)	8,742E-02	6,777E-02
$\mu_{senec}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	2,914E-08	2,259E-08
$\bar{\mu}_{senec}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	2,586E-08	

Tabulka 88 - Migrační charakteristiky senecioninu na pokryté kapiláře v 20 mM Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> pufru (pH 9,38) + 20 mM SDS + 10 % v/v MeOH

	1. měření	2. měření
$t_{N1}$ (min)	2,4	2,405
$t_{N2}$ (min)	2,55	2,415
$t_{N3}$ (min)	3,217	3,217
$v_m$ (ms <sup>-1</sup> )	2,121E-03	2,121E-03
$l_{senec}$ (m)	6,579E-02	1,008E-01
$\mu_{senec}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	2,193E-08	3,360E-08
$\bar{\mu}_{senec}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	2,776E-08	

Tabulka 89 - Migrační charakteristiky senecioninu na pokryté kapiláře v 20 mM Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> pufru (pH 9,38) + 30 mM SDS + 10 % v/v MeOH

	1. měření	2. měření
$t_{N1}$ (min)	2,127	2,223
$t_{N2}$ (min)	2,263	2,376
$t_{N3}$ (min)	2,983	3,109
$v_m$ (ms <sup>-1</sup> )	2,283E-03	2,193E-03
$l_{senec}$ (m)	7,999E-02	7,631E-02
$\mu_{senec}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	2,666E-08	2,544E-08
$\bar{\mu}_{senec}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	2,605E-08	

Tabulka 90 - Migrační charakteristiky senecioninu na pokryté kapiláře v 20 mM Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> pufru (pH 9,38) + 40 mM SDS + 10 % v/v MeOH

	1. měření	2. měření
$t_{N1}$ (min)	2,308	2,305
$t_{N2}$ (min)	2,45	2,447
$t_{N3}$ (min)	3,147	3,142
$v_m$ (ms <sup>-1</sup> )	2,167E-03	2,170E-03
$l_{senec}$ (m)	7,216E-02	7,201E-02
$\mu_{senec}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	2,405E-08	2,400E-08
$\bar{\mu}_{senec}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	2,403E-08	

Tabulka 91 - Migrační charakteristiky senecioninu na pokryté kapiláře v 20 mM Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> pufru (pH 9,38) + 50 mM SDS + 10 % v/v MeOH

	1. měření	2. měření
$t_{N1}$ (min)	2,29	2,301
$t_{N2}$ (min)	2,434	2,435
$t_{N3}$ (min)	3,063	3,054
$v_m$ (ms <sup>-1</sup> )	2,225E-03	2,231E-03
$l_{senec}$ (m)	6,474E-02	6,493E-02
$\mu_{senec}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	2,158E-08	2,164E-08
$\bar{\mu}_{senec}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	2,161E-08	

Tabulka 92 - Migrační charakteristiky senecioninu na pokryté kapiláře v 20 mM Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> pufru (pH 9,38) + 10 mM SDS + 15 % v/v MeOH

	1. měření	2. měření
$t_{N1}$ (min)	2,882	2,881
$t_{N2}$ (min)	3,048	3,047
$t_{N3}$ (min)	3,812	3,811
$v_m$ (ms <sup>-1</sup> )	1,797E-03	1,797E-03
$l_{senec}$ (m)	6,448E-02	6,449E-02
$\mu_{senec}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	2,149E-08	2,150E-08
$\bar{\mu}_{senec}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	2,150E-08	

Tabulka 93 - Migrační charakteristiky senecioninu na pokryté kapiláře v 20 mM Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> pufru (pH 9,38) + 20 mM SDS + 15 % v/v MeOH

	1. měření	2. měření
$t_{N1}$ (min)	2,911	3,714
$t_{N2}$ (min)	3,001	3,725
$t_{N3}$ (min)	3,754	4,521
$v_m$ (ms <sup>-1</sup> )	1,824E-03	1,520E-03
$l_{senec}$ (m)	7,257E-02	7,161E-02
$\mu_{senec}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	2,419E-08	2,387E-08
$\bar{\mu}_{senec}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	2,403E-08	

Tabulka 94 - Migrační charakteristiky senecioninu na pokryté kapiláře v 20 mM Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> pufru (pH 9,38) + 30 mM SDS + 15 % v/v MeOH

	1. měření	2. měření
$t_{N1}$ (min)	2,857	2,997
$t_{N2}$ (min)	3,012	3,009
$t_{N3}$ (min)	3,689	3,699
$v_m$ (ms <sup>-1</sup> )	1,856E-03	1,851E-03
$l_{senec}$ (m)	5,812E-02	7,529E-02
$\mu_{senec}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	1,937E-08	2,510E-08
$\bar{\mu}_{senec}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	2,223E-08	

Tabulka 95 - Migrační charakteristiky senecioninu na pokryté kapiláře v 20 mM Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> pufru (pH 9,38) + 40 mM SDS + 15 % v/v MeOH

	1. měření	2. měření
$t_{N1}$ (min)	3,007	2,999
$t_{N2}$ (min)	3,315	3,005
$t_{N3}$ (min)	3,828	3,711
$v_m$ (ms <sup>-1</sup> )	1,790E-03	1,845E-03
$l_{senec}$ (m)	2,201E-02	7,748E-02
$\mu_{senec}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	7,338E-09	2,583E-08
$\bar{\mu}_{senec}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	1,658E-08	

Tabulka 96 - Migrační charakteristiky senecioninu na pokryté kapiláře v 20 mM Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> pufru (pH 9,38) + 50 mM SDS + 15 % v/v MeOH

	1. měření	2. měření
$t_{N1}$ (min)	2,876	3,01
$t_{N2}$ (min)	3,026	3,335
$t_{N3}$ (min)	3,736	3,893
$v_m$ (ms <sup>-1</sup> )	1,833E-03	1,760E-03
$l_{senec}$ (m)	6,158E-02	2,461E-02
$\mu_{senec}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	2,053E-08	8,204E-09
$\bar{\mu}_{senec}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	1,437E-08	

Tabulka 97 - Migrační charakteristiky senecioninu na pokryté kapiláře v 20 mM Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> pufru (pH 9,38) + 10 mM SDS + 20 % v/v MeOH

	1. měření	2. měření
$t_{N1}$ (min)	3,5	3,412
$t_{N2}$ (min)	3,686	3,501
$t_{N3}$ (min)	4,413	4,357
$v_m$ (ms <sup>-1</sup> )	1,557E-03	1,576E-03
$l_{senec}$ (m)	5,053E-02	7,255E-02
$\mu_{senec}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	1,684E-08	2,418E-08
$\bar{\mu}_{senec}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	2,051E-08	

Tabulka 98 - Migrační charakteristiky senecioninu na pokryté kapiláře v 20 mM Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> pufru (pH 9,38) + 20 mM SDS + 20 % v/v MeOH

	1. měření	2. měření
$t_{N1}$ (min)	3,818	3,915
$t_{N2}$ (min)	3,978	3,985
$t_{N3}$ (min)	4,71	4,86
$v_m$ (ms <sup>-1</sup> )	1,460E-03	1,416E-03
$l_{senec}$ (m)	5,012E-02	6,840E-02
$\mu_{senec}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	1,671E-08	2,280E-08
$\bar{\mu}_{senec}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	1,975E-08	

Tabulka 99 - Migrační charakteristiky senecioninu na pokryté kapiláře v 20 mM Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> pufru (pH 9,38) + 30 mM SDS + 20 % v/v MeOH

	1. měření	2. měření
$t_{N1}$ (min)	3,724	3,707
$t_{N2}$ (min)	3,893	3,875
$t_{N3}$ (min)	4,6	4,59
$v_m$ (ms <sup>-1</sup> )	1,495E-03	1,498E-03
$l_{senec}$ (m)	4,825E-02	4,916E-02
$\mu_{senec}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	1,608E-08	1,639E-08
$\bar{\mu}_{senec}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	1,623E-08	

Tabulka 100 - Migrační charakteristiky senecioninu na pokryté kapiláře v 20 mM Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> pufru (pH 9,38) + 40 mM SDS + 20 % v/v MeOH

	1. měření	2. měření
$t_{N1}$ (min)	3,959	3,95
$t_{N2}$ (min)	4,124	4,126
$t_{N3}$ (min)	4,775	4,773
$v_m$ (ms <sup>-1</sup> )	1,441E-03	1,441E-03
$l_{senec}$ (m)	4,201E-02	4,073E-02
$\mu_{senec}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	1,400E-08	1,358E-08
$\bar{\mu}_{senec}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	1,379E-08	

Tabulka 101 - Migrační charakteristiky senecioninu na pokryté kapiláře v 20 mM Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> pufru (pH 9,38) + 50 mM SDS + 20 % v/v MeOH

	1. měření	2. měření
$t_{N1}$ (min)	3,98	3,993
$t_{N2}$ (min)	4,155	4,151
$t_{N3}$ (min)	4,766	4,771
$v_m$ (ms <sup>-1</sup> )	1,443E-03	1,442E-03
$l_{senec}$ (m)	3,776E-02	3,997E-02
$\mu_{senec}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	1,259E-08	1,332E-08
$\bar{\mu}_{senec}$ (m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	1,296E-08	

Tabulka 102 – Stanovení meze detekce senkirkinu

Koncentrace [mg/ml]	Plocha píku
0,055	1,6
0,06666	3,1
0,0733	5
0,08148	7,4
0,09166	10,7
0,1	12,7
0,11	16,2
0,12	18,7
0,14666	25,43
0,183	32,4
0,22	38,5