

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Elektroforetická analýza oligosacharidů po derivatizaci s využitím kapilárních
a mikročipových systémů

Bc. Martin Heinz

Diplomová práce

2017

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Martin Heinz**
Osobní číslo: **C15581**
Studijní program: **N1407 Chemie**
Studijní obor: **Analytická chemie**
Název tématu: **Elektroforetická analýza oligosacharidů po derivatizaci s využitím kapilárních a mikročipových systémů**
Zadávající katedra: **Katedra analytické chemie**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. V dostupné vědecké literatuře vyhledejte a rešeršně zpracujte práce zabývající se elektroforetickou separací oligosacharidů s využitím derivatizace redukční aminací. Porovnejte aplikace kapilárních a mikročipových separací.
2. Proměřte migrační charakteristiky vybraných oligosacharidů po derivatizaci. Určete charakteristiky popisující kvantitativní stanovení s využitím derivatizačního procesu. Porovnejte dosažené výsledky separací pro kapilární a mikročipový systém.
3. Získaná experimentální data kriticky zhodnoťte a diskutujte.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucího práce.

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

Katedra analytické chemie

Konzultant diplomové práce: **Ing. Jana Váňová**

Katedra analytické chemie

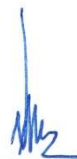
Datum zadání diplomové práce: **20. února 2017**

Termín odevzdání diplomové práce: **12. května 2017**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Karel Ventura, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2017

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, 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.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 12. 5. 2017

Martin Heinz

Poděkování

Děkuji svému vedoucímu práce doc. Ing. Petru Česlovi, PhD. za ochotu, věnovaný čas, odbornou pomoc, rady a náměty, které se týkaly této diplomové práce. Děkuji také konzultantce Ing. Janě Váňové za trpělivost a pomoc při vypracování mé práce. Dále děkuji Mgr. Janě Křenkové, Ph.D. a Mgr. Tomáši Václavkovi (Ústav analytické chemie AV ČR, v.v.i.) za výrobu mikročipu pro separace. V neposlední řadě bych chtěl poděkovat své přítelkyni a rodině za pevné nervy a psychickou podporu.

ANOTACE

Cílem této diplomové práce je snaha optimalizovat mikročipový elektroforetický separační systém, vytvořený pomocí 3D tisku z kyseliny polylaktické s borosilikátovým mikročipem. Rozměry separačního kanálu byly 50x65 μm o délce 65 mm. Detekce byla zprostředkována pomocí laserem indukované fluorescence. Tento separační systém je schopný separovat a detekovat vybrané oligosacharidy. S ohledem na chemické vlastnosti oligosacharidů (elektroneutrální sloučeniny, bez chromoforů a fluoroforů), bylo nutné připravit vybrané deriváty pomocí metody reduktivní aminace. Dále byly porovnány migrační charakteristiky vybraných derivátů oligosacharidů separovaných na mikročipové a kapilární zónové elektroforéze.

KLÍČOVÁ SLOVA

Kapilární zónová elektroforéza, mikročipová elektroforéza, derivatizace, reduktivní aminace, UV/VIS detekce, fluorescenční detekce, 3D tisk.

TITLE: Electrophoretic analysis of oligosaccharides after derivatization using capillary and microchip systems

ANNOTATION

The aim of this diploma thesis was the optimization of microchip electrophoretic system, fabricated by 3D printing from polylactic acid with borosilicate glass microchip. The dimensions of separation channel were 50x65 μm with length 65 mm. The detection was provided using laser induced fluorescence. This separation system is capable of separation and detection of selected oligosaccharides. Considering the chemical properties of oligosaccharides (electroneutral compounds, without chromophores and fluorophores), it was necessary to prepare selected derivatives by reductive amination. The migration characteristics of selected derivatized oligosaccharides separated on microchip and capillary zone electrophoresis were compared.

KEYWORDS:

Capillary zone electrophoresis, microchip electrophoresis, derivatization, reductive amination, UV/VIS detection, fluorescence detection, 3D printing.

Obsah

ÚVOD.....	13
1 TEORETICKÁ ČÁST	14
1.1 Kapilární elektroforéza	14
1.1.1 Princip metody.....	14
1.1.2 Instrumentální uspořádání	15
1.1.3 Jevy doprovázející elektroforézu.....	16
1.1.4 Metody.....	18
1.1.5 Detekce v elektromigračních technikách.....	19
1.2 Mikročipové uspořádání elektroforetické separace	20
1.2.1 Výhody separací na mikročipech	21
1.2.2 Nevýhody separací na mikročipech.....	21
1.2.3 Aplikace mikročipových separací	22
1.2.4 Výroba mikročipu.....	23
1.3 Oligosacharidy	31
1.4 Derivatizace	32
1.4.1 Princip.....	32
1.4.2 Derivatizace oligosacharidů	32
1.5 Kapilární zónová elektroforéza derivatizovaných oligosacharidů.....	34
2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	37
2.1 Chemikálie	37
2.2 Použitá instrumentace	37
2.3 Instrumentace mikročipového elektroforetického systému	38
2.3.1 Rámeček mikročipu	38
2.3.2 Mikročip	39
2.3.3 Zásobníky na elektrolyt	40
2.3.4 Detekční systém pro test s methylenovou modří.....	41

2.3.5	Zdroj záření.....	43
2.3.6	Vstupní štěrbina.....	44
2.3.7	Elektrody	46
2.3.8	Fluorescenční detekce.....	48
2.4	Pracovní postup.....	52
2.4.1	Příprava roztoku methylenové modři	52
2.4.2	Příprava základních elektrolytů	52
2.4.3	Příprava kalibrační řady.....	52
2.4.4	Derivatizace	53
2.4.5	Úprava vzorků před elektroforetickou analýzou	53
2.4.6	Charakterizace elektroforetických systémů.....	53
3	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	55
3.1	Separace za pomoci kapilárního systému	55
3.1.1	Elektroosmotický tok.....	55
3.1.2	Kalibrační grafy derivátů maltózy a maltotriózy.....	56
3.1.3	Mez detekce, mez stanovitelnosti	59
3.1.4	Separace vybrané směsi oligosacharidů	60
3.2	Separace za pomoci mikročipového systému	61
3.2.1	Test separačního systému za pomoci methylenové modři	61
3.2.2	Test separačního systému za pomoci ANTS činidla	65
3.2.3	Separace jednoduché směsi derivatizovaných oligosacharidů	65
4	ZÁVĚR.....	68
5	POUŽITÁ LITERATURA	70
6	PŘÍLOHY	75

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK:

Obrázek 1 Schéma kapilární elektroforézy	16
Obrázek 2 Disociace silanolových skupin.....	17
Obrázek 3 Schéma vzniku elektroosmotického toku v křemenné kapiláře.....	17
Obrázek 4 Schéma výroby skleněného mikročipu metodou UV fotolitografie a mokrého leptání	25
Obrázek 5 Zobrazení rozdílu pozitivního (a) a negativního (b) fotorezistu.....	27
Obrázek 6 Ilustrační obrázek mikročipu se zásobníky umístěnými přímo na čipu.....	29
Obrázek 7 Schéma elektrokinetického nástřiku vzorku na mikročipech	30
Obrázek 8 Reakční schéma derivatizace redukujících sacharidů činidlem s následnou reductivní aminací	33
Obrázek 9 3D návrh rámečku.....	38
Obrázek 10 Vytištěný návrh rámečku z kyseliny polymléčné	39
Obrázek 11 Schéma borosilikátového mikročipu.....	39
Obrázek 12 Schématické vyobrazení borosilikátové mikročipu	40
Obrázek 13 Použitý borosilikátový mikročip.....	40
Obrázek 14 Návrh zásobníku elektrolytu	41
Obrázek 15 Zásobníky elektrolytů opatřené teflonovu páskou	41
Obrázek 16 3D návrh držáku detektoru.....	42
Obrázek 17 A - držák detekčního hříbu, B - detekční hřib	42
Obrázek 18 Sestavený detektor	43
Obrázek 19 Připojení detekčního hříbu k základní desce detektoru	43
Obrázek 20 Zdroj monochromatického záření	44
Obrázek 21 Zdroj stejnosměrného napětí pro napájení LED diody	44
Obrázek 22 Finální štěrbina 50x50 μ m při zapnutém zdroji, zvětšeno 10x	45
Obrázek 23 Příprava vstupní štěrby z žilettek.....	45
Obrázek 24 1. Část štěrby na mikročipu ve středu se separačním kanálem, zvětšeno 10x	45
Obrázek 25 1. část vstupní štěrby na mikročipu.....	46
Obrázek 26 2. část vstupní štěrby umístěná na rámečku.....	46
Obrázek 27 Platinová elektroda v zásobníku elektrolytu	47
Obrázek 28 Zdroj vysokého stejnosměrného napětí.....	47
Obrázek 29 Schéma fluorescenčního detektoru	49

Obrázek 30 Návrh těla detektoru. (A) samotné tělo detektoru pro uchycení optických filtrů a excitačního zdroje. (B) úchyt pro objektiv	50
Obrázek 31 Části fluorescenčního detektoru	50
Obrázek 32 Reálné uspořádání fluorescenční detekce	51
Obrázek 33 Reálné uspořádání mikročipové elektroforézy s laserem indukovanou fluorescenční detekcí	51
Obrázek 34 Kalibrační graf pro 2-AA derivát maltózy	56
Obrázek 35 Kalibrační graf pro 2-AB derivát maltózy	56
Obrázek 36 Kalibrační graf pro 2-AP derivát maltózy	57
Obrázek 37 Kalibrační graf pro ANTS derivát maltózy	57
Obrázek 38 Kalibrační graf pro 2-AA derivát maltotriózy	58
Obrázek 39 Kalibrační graf pro 2-AB derivát maltotriózy	58
Obrázek 40 Kalibrační graf pro 2-AP derivát maltotriózy	59
Obrázek 41 Kalibrační graf pro ANTS derivát maltotriózy	59
Obrázek 42 Elektroforegram seprace směsi derivatizovaných oligosacharidů kapilární elektroforézou, UV detekce (214 nm)	60
Obrázek 43 Uspořádání separačního systému pro test s methylenovou modří	62
Obrázek 44 Dávkovací kanál pod mikroskopem, zvětšení 10x, dávkování methylenové modří po dobu 10s při napětí 3 kV	63
Obrázek 45 Šum nulové linie před optimalizací	63
Obrázek 46 Šum nulové linie po optimalizaci	64
Obrázek 47 Elektroforegram pro test separace methylenové modří	64
Obrázek 48 Elektroforegram ANTS činidla při testu mikročipového systému	65
Obrázek 49 Elektroforegram č. 1 mikročipové separace směsi derivatizovaných oligosacharidů, laserem indukovaná fluorescenční detekce	66
Obrázek 50 Elektroforegram č. 2 mikročipové separace směsi derivatizovaných oligosacharidů, laserem indukovaná fluorescenční detekce	66
Obrázek 51 Elektroforegram č. 3 mikročipové separace směsi derivatizovaných oligosacharidů, laserem indukovaná fluorescenční detekce	67
Tabulka 1 Optické vlastnosti vybraných derivatizačních činidel	34
Tabulka 2 Technické specifikace dichroického zrcadla	48
Tabulka 3 Technické specifikace excitačního filtru	48

Tabulka 4 Technické specifikace emisního filtru.....	48
Tabulka 5 Technické specifikace laserového modulu.....	49
Tabulka 6 Technické specifikace objektivu	49
Tabulka 7 Pipetované objemy zásobních roztoků sacharidů.....	52
Tabulka 8 Podmínky pro elektroforetické měření kalibračních řad	55
Tabulka 9 Migrační charakteristiky pro thiomocovinu	55
Tabulka 10 Meze detekce a meze stanovení pro maltózu	60
Tabulka 11 Meze detekce a meze stanovení pro maltotriózu.....	60
Tabulka 12 Migrační charakteristiky, účinnost a výška teoretického patra pro separaci směsi oligosacharidů na kapilární elektroforéze	61
Tabulka 13 Migrační charakteristiky, účinnost separace, výška teoretického patra pro elektroforegram č. 3.....	67

SEZNAM ZKRATEK:

2-AA	2-aminobenzoová kyselina
2-AB	2-aminobenzamid
2-AP	2-aminopyridin
ABS	akrylonitrilbutadienstyren
ANTS	8-aminonaftalen-1,3,6-trisulfonová kyselina
c_{CMC}	Kritická micelární koncentrace
CE	Kapilární elektroforéza
CEC	Kapilární elektrochromatografie
CGE	Kapilární gelová chromatografie
CIEF	Kapilární izoelektrická fokusace
CZE	Kapilární zónová elektroforéza
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deribonukleová kyselina
DNF	Dinitrofenyl
EOF	Elektro osmotický tok
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
LED	Dioda emitující světlo
MEKC	Micelární elektrokinetická chromatografie
NMR	Nukleární magnetická rezonance
PC	Polykarbonát
PET	Polyethylentereftalát
pI	Izoelektrický bod
PMMA	Polymethylmethakrylát
PMP	1-fenyl-3-metyl-5-pyrazolon
UV/VIS	Ultrafialové/viditelné světlo
μ -TAS	Micro total analytical systém

ÚVOD

Sacharidy jsou po vodě druhou největší skupinou látek vyskytující se ve všech živých organismech, kde plní mnoho důležitých funkcí, jako zdroj a zásobárna energie, strukturní funkci, přenosy informací a mnoho dalších. Tyto organické látky je možné řadit do několika různých skupin, podle počtu uhlíků (triózy, pentózy), odlišných funkčních skupin (aldózy, ketózy), podle množství základních stavebních jednotek ze kterých jsou tvořeny (monosacharidy, oligosacharidy a polysacharidy) [1].

Vzhledem k jejich rozsáhlému zastoupení, je snaha separovat a detekovat tyto látky i pomocí elektromigračních separačních metod jelikož disponují velkou účinností, rozlišením, nízkými detekčními limity a jsou relativně cenově dostupné. V porovnání s plynovou a vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií odpadá spotřeba drahých mobilních fází. Ve většině případů se nevyužívá jen samotné elektromigrační metody, ale spojení několika analytických metod za sebou. Příkladem může být spojení elektroforézy s hmotnostním spektrometrem, spojení elektroforézy s NMR spektrometrem, jenž umožňují poskytnutí informací o struktuře a elementárním složení látek [2].

V rámci stále stoupajícího trendu miniaturizace ve všech oblastech lidské činnosti se proces zmenšování dostává také do oblasti analytické chemie. Mikročipové separační systémy nabízejí řadu velkých výhod oproti klasickému uspořádání. Především je to jejich velikost, nízká spotřeba všech reagensů včetně vzorků, umožňující použití i speciálních a dražších chemikálií, jejichž použití by se při klasické analýze prodražilo. Dále toto uspořádání nabízí vyšší účinnost, lepší rozlišení a zkrátí celkový čas analýzy na minimum oproti klasickým metodám. Mezi nevýhody těchto metod se řadí vyšší pořizovací náklady spojené především s výrobou miniaturizovaných součástí systému. Dále při výrobě mikročipů požadovaných kvalit je nutné dbát na preciznost, vysokou přesnost a čistotu [3, 4].

Cílem této diplomové práce je snaha optimalizovat mikročipový elektroforetický separační systém s detektorem pracujícím na principu laserem indukované fluorescence. Dále porovnat migrační charakteristiky čtyř derivátů vybraných oligosacharidů derivatizovaných metodou reduktivní aminace s různými činidly (2-aminobenzoová kyselina, 2-aminobenzamid, 2-aminopyridin, 8-aminonaftalen-1,3,6-trisulfonová kyselina), separované kapilární zónovou elektroforézou s UV/VIS detekcí a pomocí mikročipového separačního systému.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Kapilární elektroforéza

Kapilární elektroforéza je metoda spadající do kategorie elektromigračních separačních metod založených na dělení elektricky nabitých částic ve stejnosměrném elektrickém poli na základě jejich rozdílné mobility. V systému obsahujícím roztok s elektricky nabitými částicemi a tuhé povrchy schopné nést náboj (stěny kapilár) dochází k tvorbě elektrických dvojvrstev. Po určitém čase dochází k rovnovážné distribuci nábojů mezi elektrickou dvojvrstvou a roztokem. Po připojení stejnosměrného vysokého napětí dochází k porušení rovnováhy a tvorbě nuceného pohybu elektricky nabitých částic [5, 6].

1.1.1 Princip metody

V případě kapilární elektroforézy dochází k dělení a následné detekci elektricky nabitých částic v prostoru kapiláry (nejčastěji křemenné) obsahující základní elektrolyt (zajišťující dostatečnou elektrickou vodivost v celém systému), po aplikaci stejnosměrného vysokého napětí [5, 6].

V elektrickém poli se elektricky nabitě částice začnou pohybovat směrem k elektrodám s opačným nábojem, anionty se pohybují k anodě, kationty ke katodě a neutrální částice se nepohybují. Rychlost, kterou se daná částice bude po aplikaci stejnosměrného vysokého napětí pohybovat, je dána elektroforetickou mobilitou (pohyblivostí) [5, 6]:

- Elektroforetická mobilita:

Charakteristická veličina pro elektromigrační metody, popisující rychlost pohybu nabitě částice v daném prostředí po aplikaci stejnosměrného elektrického pole o jednotkové intenzitě:

$$\mu_i = \frac{v}{E} \quad (1)$$

Intenzita elektrického pole E je vyjádřena jako podíl vkládaného stejnosměrného napětí U a celkové délky separační kapiláry l :

$$E = \frac{U}{l} \quad (2)$$

Výsledný pohyb částice prostředím je výsledkem působení dvou sil. První je elektrická síla F_e elektrického pole působící na částici s nábojem (rovnice 3) a druhá, opačného směru, síla odporu prostředí F_f dána Stokesovým vztahem (rovnice 4).

$$F_e = q \times E \quad (3)$$

$$F_f = -6 \times \pi \times \eta \times r \times v \quad (4)$$

Z rovnosti těchto dvou sil v ustáleném stavu lze odvodit výslednou rovnici (5) pro elektroforetickou mobilitu částice. Z rovnice vyplývá, že mobilita částice je přímo úměrná velikosti náboje a nepřímo úměrná poloměru částice a viskozitě prostředí.

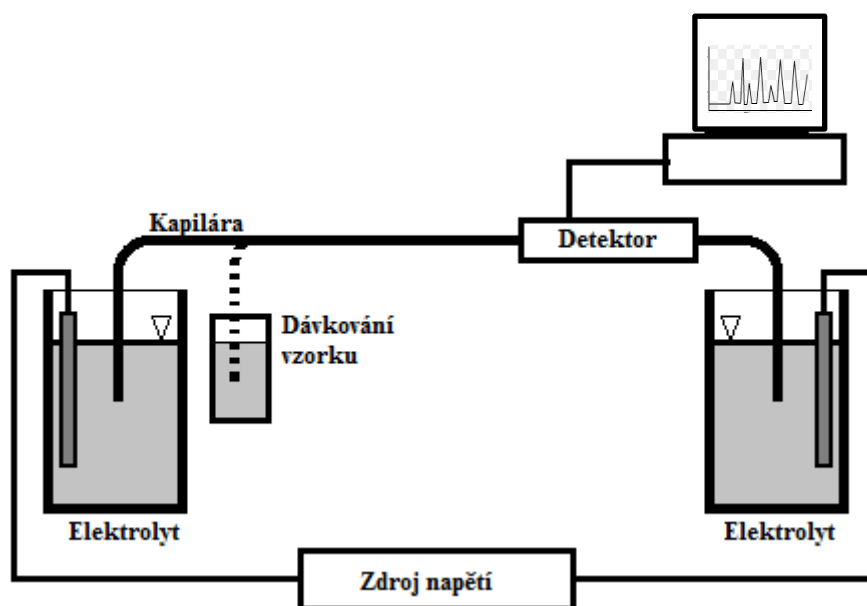
$$\mu_i = \frac{q}{-6 \times \pi \times r \times \eta} \quad (5)$$

Kde:

μ_i	elektroforetická mobilita ($\text{m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)
v	rychlost pohybu částice ($\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$)
E	intenzita elektrického pole ($\text{V} \cdot \text{m}^{-1}$)
U	vkládané napětí (V)
l	celková délka kapiláry (m)
F_e	elektrická síla (N)
F_f	odporová síla prostředí (N)
q	velikost náboje
η	dynamická viskozita prostředí ($\text{Pa} \cdot \text{s}^{-1}$)
r	poloměr částice (m)

1.1.2 Instrumentální uspořádání

V kapilární elektroforéze dochází k migraci a následné separaci elektricky nabitých částic v prostředí základního elektrolytu (zajišťující dostatečnou vodivost v celém systému), naplněného v kapiláře. Oba konce separační kapiláry jsou ponořeny v nádobkách s roztokem základního elektrolytu. V těchto nádobkách jsou také ponořeny elektrody z inertního materiálu (Pt, Rh, Au a další) na které se vkládá vysoké stejnosměrné napětí. Kapilára je vedena přes detektor a jeho odezva je zaznamenávána v počítači (obrázek 1). Výsledný záznam je elektroforegram, závislost intenzity odezvy detektoru na čase, má tvar píků, jejichž poloha charakterizuje kvalitativní složení směsi a plocha píku charakterizuje kvantitativní složení [5, 6].



Obrázek 1 Schéma kapilární elektroforézy, převzato z [7]

1.1.3 Jevy doprovázející elektroforézu

Jouleovo teplo:

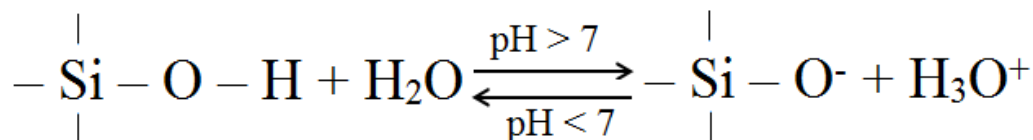
Připojením systému k vysokému stejnosměrnému napětí začne elektrolytem proudit elektrický proud a dochází k zahřívání, k tvorbě tzv. Jouleova tepla, které negativním způsobem ovlivňuje průběh separace. Teplota elektrolytu se zvyšuje směrem do středu kapiláry, vzniká teplotní gradient. S rostoucí teplotou klesá viskozita prostředí a tím se zvyšuje mobilita iontů, tudíž dva stejné ionty budou mít podél průřezu rozdílnou pohyblivost u kraje kapiláry a v jejím středu. Dochází k rozmývání zón, rozšiřování píků a snižování celkové účinnosti separace. Generované teplo může být natolik velké, že dochází k lokálnímu varu elektrolytu, vzniku bublinek a nakonec k přerušení elektrického obvodu. Z těchto důvodů je výhodné vliv Jouleova tepla potlačit. Kapilára bývá chlazená temperovaným vzduchem nebo vhodnou chladicí kapalinou. Dále je možné využití elektrolytu s nižší vodivostí, snížení aplikovaného stejnosměrného napětí, zvýšení průměru kapiláry nebo využití mikročipových separačních systémů lépe odvádějící Jouleovo teplo [5, 6].

Elektroosmotický tok (EOF):

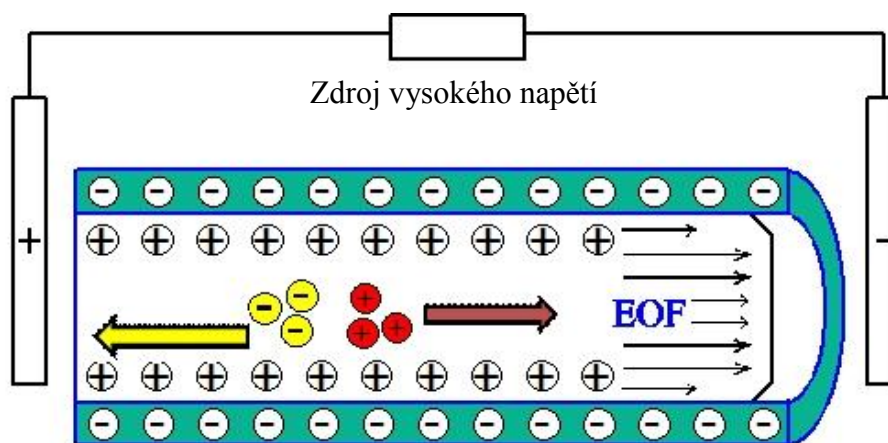
Jedná se o transportní jev u elektromigračních separačních metod. Vzniká na rozhraní pevná látka/kapalina na vnitřní stěně kapiláry po aplikaci stejnosměrného vysokého napětí.

Vlivem selektivní adsorpce jednoho druhu iontů na povrch kapiláry, nebo disociací povrchových skupin vzniká elektrická dvojvrstva. V případě křemenné kapiláry se jedná

o středně kyselé silanolové skupiny, které v bazickém prostředí disociují a nabíjí se záporně (obrázek 2). Kladné ionty vyskytující se v roztoku jsou adsorbovány na povrch. V difuzní části roztoku směrem do středu kapiláry je přebytek volného náboje, vzniká elektrokinetický potenciál v blízkosti stěny – zeta potenciál ζ (velikost je závislá na povrchové hustotě náboje na stěně kapiláry). Působením stejnosměrného elektrického pole na difuzní část elektrické dvojvrstvy dochází k pohybu a unášení celého objemu kapiláry (elektricky nabitě i neutrální částice) ve směru elektroosmotického toku (obrázek 3), vlivem vnitřního tření kapaliny. Jelikož disociace silanolových skupin je závislá na pH elektrolytu, je také velikost EOF závislá na pH. EOF ovlivňuje průběh separace, má vliv na rozmývání zón, tím deformuje píky a snižuje rozlišení. Eliminovat jej lze složením základního elektrolytu, zvolením vhodného materiálu kapiláry, popřípadě úpravou vnitřního povrchu kapiláry [5, 6].



Obrázek 2 Disociace silanolových skupin, převzato z [8]



Obrázek 3 Schéma vzniku elektroosmotického toku v křemenné kapiláře [8]

1.1.4 Metody

Kapilární elektroforéza má spoustu dceřiných metod, které jsou založeny na stejném principu lišící se mechanismem separace jednotlivých složek vzorku.

1.1.4.1 Kapilární zónová elektroforéza

Kapilární zónová elektroforéza (CZE) je jednoduchá a velmi často využívaná metoda kapilární elektroforézy. Separace probíhá nejčastěji v křemenné kapiláře délky od 20 do 100 cm, o vnitřním průměru 50 – 75 μm . Kapilára je naplněna základním elektrolytem (pufrem), dávkování vzorku se provádí do jednoho konce kapiláry vzdálenějšího od detektoru a to zvýšeným tlakem, rozdílem výšky hladin nebo elektrokineticky. Po připojení k vysokému stejnosměrnému napětí dochází k migraci nabitých částic, jejich dělení do zón podle rozdílných mobilit a následné detekci. CZE je použitelná pro analýzy nabitých částic (anionty nebo kationty), neutrální molekuly nejsou separovány. Detekce je prováděna ve většině případů UV-VIS detektorem (omezeno na látky absorbující záření v této oblasti) nebo vodivostním detektorem, možné je i spojení s hmotnostním spektrometrem [6, 9].

1.1.4.2 Micelární elektrokinetická kapilární chromatografie

Micelární elektrokinetická kapilární chromatografie (MEKC) je metoda vyvinutá především pro separace elektroneutrálních sloučenin jenž nebylo možné dělit metodou CZE. Jako homogenní separační prostředí se využívá vodivý roztok pufru o vysokém pH s přísávkem povrchově aktivních látek (dodecyl síran sodný, cetyltrimethylamonium-bromid nebo žlučové soli). Aby docházelo k tvorbě micel a následné separaci, je nutné přidávat povrchově aktivní látky nad hodnotou kritické micelární koncentrace (c_{CMC}). Při této koncentraci začne docházet k agregaci povrchově aktivních látek, nepolární část molekuly je koordinována do středu micely (tvoří tzv. pseudostacionární fázi) a polární část směrem ven. Neutrální látka se rozděluje mezi pufrem a pseudostacionární fázi. Po připojení vysokého napětí dochází k unášení elektricky nabitých micel i s neutrálními složkami vzorku směrem k detektoru. Detekce je obdobná jako u CZE [6, 10].

1.1.4.3 Kapilární gelová chromatografie

Kapilární gelová chromatografie (CGE) je metoda vyvinutá pro velké biomolekuly, pro které se mobilita jednotlivých nabitých částic příliš neliší (kvůli podobnému poměru mezi nábojem a hmotností) a nedochází k dokonalé separaci. Do kapiláry se přidává roztok gelu, který je zesíťovaný a vykonává zde funkci molekulového síta. Nabité částice jsou unášeny směrem k elektrodě a dělí se na základě rozdílné velikosti [3, 6].

1.1.4.4 Kapilární izoelektrická fokusace

Kapilární izoelektrická fokusace (CIEF) je metoda vyvinutá pro separaci amfolytů, tedy látek, které obsahují jak zápornou skupinu tak kladnou a mohou proto existovat jako aniont, kationt či neutrální částice v závislosti na pH prostředí ve kterém se vyskytují. Mohou to být aminokyseliny, proteiny nebo peptidy. Základní elektrolyt je tvořen směsí komplexních amfolytů. Po připojení k elektrickému poli dochází ke vzniku gradientu pH a migraci elektricky nabitých částic do prostoru kde se pH rovná jejich izoelektrickému bodu, pI, pH při kterém je částice neutrální. Částice se rozdělí do zón a zastaví, poté je aplikován tlak a dojde k posunu celého objemu kapiláry směrem k detektoru (posun může být také zprostředkován elektroosmotickým tokem) [11, 12].

1.1.4.5 Kapilární elektrochromatografie

Kapilární elektrochromatografie (CEC) je metoda využívající výhody elektroforézy a vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Jako separační prostředí je zde použito kapiláry plněné mikročásticemi stacionární fáze, monolitické kapiláry, nebo může být stacionární fáze umístěna na vnitřním povrchu kapiláry. K vyvolání toku mobilní fáze je zde využito elektroosmotického toku vznikajícího po připojení vysokého stejnosměrného napětí. Velkou výhodou je píستový profil EOF a dále nevzniká zpětný tlak. Výhodou této metody je dosažení lepšího rozlišení, vyšší účinnosti a možnost použití malých množství vzorků [13].

1.1.5 Detekce v elektromigračních technikách

Pro kapilární elektroforézu se využívá celá řada detekčních systémů. Výběr takového detekčního systému závisí převážně na struktuře a povaze separovaných sloučenin, dále jsou kladeny nároky na citlivost, požadovanou informaci, která se z detektoru získá, a na cenu detektoru. Nejpoužívanějšími typy detektorů v kapilární elektroforéze jsou spektrofotometrický v UV a viditelné oblasti, pro látky absorbující záření v této oblasti, vodivostní detektory, detektor s laserem indukovanou fluorescencí a hmotnostní spektrometr [5, 6].

1.1.5.1 UV-VIS detekce

Spektrofotometrický detektor, který je založen na měření absorbance, pracuje v oblasti vlnových délek 190 – 800 nm a zaznamenává absorbanci analytu procházejícího kapilárou. Detektor je složen ze zdroje záření, kterým je wolframová žárovka pro viditelnou oblast, deuteriová nebo vodíková výbojka pro UV oblast, vstupní a výstupní štěrby, detekční

ceľy (detekční okénko na kapiláře), disperzního prvku pro izolaci vlnové délky (optický hranol, mřížka) a zařízení pro detekci záření – fotodiody, fotonásobiče [13, 14].

1.1.5.2 Vodivostní detekce

Vodivostní detektor je univerzální detektor měřící vodivost roztoku procházejícího detekční celou. Dvě elektrody z inertního materiálu (Pt) jsou umístěny naproti sobě, na elektrody je vloženo střídavé napětí, aby se zabránilo polarizaci elektrod. Je možné také používat bezkontaktní uspořádání (nejčastěji používaný pro CE) kde se využívá vysokofrekvenčního signálu procházejícího i nevodivým materiálem. Na první (pracovní) elektrodu je vložen vysokofrekvenční střídavý signál, který je registrován pracovní elektrodou jako střídavý proud úměrný vodivosti roztoku v detekční cele [15, 16].

1.1.5.3 Fluorescenční detekce

Jedná se o vysoce selektivní a citlivý detektor pro látky schopné fotoluminiscence. Fotoluminiscence je jev, kdy látka absorbuje primární, budící záření, dojde k excitaci valenčních elektronů na vyšší energetické hladiny a při návratu elektronů do základního stavu je přebytečná energie vyzářena. Existují dva typy fotoluminiscence, fluorescence a fosforescence, lišící se dobou dosvitu sekundárního záření (fluorescence $10^{-9} - 10^{-6}$ sekund a fosforescence $10^{-6} - 10^2$ sekund). Pro elektromigrační separační metody se nejčastěji používá laserem indukovaná fluorescence, kde je jako zdroj budícího záření využit laser o vhodné vlnové délce v tzv. konfokálním uspořádání. Svazek záření vychází z laseru, prochází excitačním filtrem na dichroické zrcadlo, odráží se a prochází objektivem, fokusuje se na kapiláru. Fluorescenční záření prochází objektivem, přes emisní filtr a dopadá na detektor [14, 17].

1.2 Mikročipové uspořádání elektroforetické separace

Trend miniaturizace se objevuje ve všech odvětvích lidské činnosti. Zmenšovat celkové rozměry zařízení, snižovat náklady na provoz, uspořit čas, zvýšit výkon a účinnost, to jsou předpoklady, které je vhodné aplikovat i v analytické chemii [18]. Miniaturizace se v analytické chemii objevila více než před 40 lety, kdy byl sestaven první miniaturizovaný plynový chromatograf z křemíku, schopný separovat jednoduché směsi sloučenin řádově v desítkách sekund. 1,5 metru dlouhá kolona i s vstřikovacím ventilem byly umístěny na jedné křemíkové desce, na druhé desce byl umístěn teplotně vodivostní detektor [19]. Zařízení nezpůsobilo veliký ohlas i přes zkrácený čas a účinnost separace, pravděpodobně

kvůli chybějícím technologickým znalostem práce s těmito miniaturizovanými systémy [4, 19].

Roku 1990 byl vytvořen další chromatografický systém na křemíkové bázi. Tentokrát se jednalo o kapalinový chromatograf s vysokotlakým čerpadlem. Otevřená kapilární kolona byla vytvořena v křemíkovém čipu o rozměrech 5x5 mm s vodivostní detekcí. Tento separační systém byl sestaven a pojmenován Andreasem Manzem jako "lab on chip" nebo také μ -TAS (micro total analytic system) [19, 20].

1.2.1 Výhody separací na mikročipech

Miniaturizované separační systémy disponují hned několika výhodami oproti klasickému konvenčnímu uspořádání, jako jsou úsporné rozměry, relativně jednoduchá konstrukce, nižší spotřeba chemikálií včetně vzorku, možnost využití speciálních činidel, jejichž spotřeba by byla při klasických analytických metodách finančně náročná. Díky celkovému uspořádání a lokalizaci všech operací na jednom místě, čipu, dochází k minimalizaci pravděpodobnosti kontaminace vzorku vnějšími vlivy. K jejich hlavním přednostem patří především vysoká účinnost, rychlost separací, nízké detekční limity a možnost plné automatizace. Dále odpadá problematika týkající se využití vysokotlakých čerpadel a ventilů, jelikož je možné generovat elektroosmotický tok, jedná-li se o materiály mikročipů schopné tvořit elektrické dvojvrstvy [4, 18].

1.2.2 Nevýhody separací na mikročipech

Převážná část problémů týkající se mikrofluidních separačních systémů bývá spojována s výrobou mikročipů, kde je kladen důraz na vysokou přesnost geometrie kanálů a čistotu celého procesu výroby [18, 21].

U výroby mikročipu z polymerních materiálů se často objevují komplikace s poškozením kanálu při vytahování výrobku z formy, dále se u těchto materiálů vyskytuje problém se sníženou odolností vůči některým agresivnějším chemikáliím, je nutné tedy vhodně volit materiál pro konkrétní typy použití [21].

U skleněných mikročipů vyrobených metodou mokrého leptání nastává problém při kontrole geometrie vznikajícího kanálu. Je nutností aby leptání probíhalo na všech místech stejnou rychlostí. Tento proces je také časově velmi náročný [21].

U mikročipů pro elektroforetické separace podobně jako u kapilárních systémů ovlivňuje negativně celkový proces separace generování Jouleova tepla. Při špatném odvodu tepla

dochází ke kolísání napětí, proudu, snižování účinnosti a nižšímu rozlišení separace [13, 21].

1.2.3 Aplikace mikročipových separací

Převážná část publikací týkající se problematiky mikrofluidních systémů je orientována do oblasti biologických věd. V tomto odvětví byla vypracována celá řada metodologií zabývajících se manipulací, separací a detekcí sloučenin biologického původu na čipu. Při vývoji aplikací mikročipových separačních systémů byly nejvíce analyzovanými sloučeninami drogy, zbytky výbušnin, enzymy, protilátky, peptidy, DNA, oligosacharidy a další [2].

Imunologické testy:

Yang a kolektiv představili imunologický test na mikročipech. Kanály mikročipu byly potaženy lipidovými dvojvrstvami. Tyto vrstvy obsahovaly dinitrofenyl (DNF) konjugovaný s bivalentní anti-DNP protilátkou. Následný postup biopasivace umožnil imobilizaci protilátky a studovanou imunoreakci [22].

Studium buněčných kultur:

Na mikročipovém zařízení vyrobeného z PDMS (polydimethylsiloxan) bylo inkubováno několik kolonií bakterií *Escherichia coli* (*E. coli*) za přesně definovaných podmínek. *E. coli* produkují zelený fluorescentní protein, umožňující monitorování pomocí fluorescenčního detektoru každých 5 hodin [23].

Separace proteinů:

Mikročipové systémy se díky svým rozměrům skvěle hodí pro analýzu potencionálního mimozemského života na vesmírných sondách. Jako příklad byly prováděny chirální separace aminokyselin extrahované z Murchisonova meteoritu. Dále byly separovány modelové proteiny (α -lactalbumin, β -lactoglobulin A, β -lactoglobulin B), jako detekce byl využit fluorescenční detektor s postkolonovým značením separovaných látek [2, 24].

Separace DNA:

První separace DNA byla provedena v 90. letech 20. století, kdy roku 1994 Wooley a Mathies připravili čip s rovným separačním kanálem, ve kterém během 10 minut separovali a sekvenovali řetězec DNA, obsahující 150 párů bází. Čip měl jeden separační kanál a k němu kolmý dávkovací kanál [2, 25, 26].

Separace oligosacharidů:

Jakožto velmi rozšířenou skupinu organických látek, které se vyskytují ve všech živých organismech a mají nepostradatelnou funkci pro život těchto organismů, byla snaha separovat a detekovat tyto látky i pomocí mikročipových systémů. Problém nastává při detekci těchto sloučenin, jelikož jsou bez náboje a neabsorbují záření ve viditelné ani UV oblasti elektromagnetického záření. Tento problém řeší derivatizace [2, 26, 27].

1.2.4 Výroba mikročipu

Všechna zařízení určená pro analytické procesy musí splňovat určité parametry, jako jsou selektivita, reprodukovatelnost, účinnost, co nejkratší čas analýzy a další. Hodnoty těchto parametrů závisí mimo jiné i na volbě příslušného materiálu [4].

Mezi prvními materiály používanými pro výrobu mikrofluidních zařízení byl křemík, je vhodný pro výrobu optických i polovodičových součástek a byl z něj vyroben první mikročipový chromatograf. Dále se začalo využívat skla a křemene pro jejich výhodné chemické a fyzikální vlastnosti. Tyto materiály disponují velkou chemickou odolností vůči řadě chemikálií, tím je možné použít rozmanité možnosti mobilních fází a základních elektrolytů. Je také odolné vůči relativně vysokým teplotám. Své zastoupení tu mají i polymerní materiály, které je možné velmi dobře tvarovat, ovšem nedisponují tak dobrou chemickou odolností jako sklo a křemen [21, 28].

Mikročipy z polymerních materiálů:

V dnešní době je dostupné široké spektrum nejrůznějších polymerních materiálů o různých vlastnostech, vhodných pro výrobu mikročipových separačních systémů. Chemická odolnost je u polymerních materiálů obecně horší než u skleněných mikročipů, ovšem dají se najít výjimky. Proto je nutné se předem zamyslet, pro jaký typ látek bude mikročip použit a dle toho následně volit vhodný materiál. K výhodám těchto materiálů patří především nízká cena, rychlá a relativně jednoduchá výroba v porovnání s výrobou skleněných mikročipů [20].

Polymery patří do skupiny makromolekulárních látek, které se dělí na tři základní podskupiny, těmi jsou elastomery, termoplasty a termosety [20, 29].

U elastomerů je struktura tvořena převážně dlouhými lineárními řetězci, které jsou mezi sebou slabě zesíťovány, daleko méně než u termosetů, tím tvoří struktury, které jsou ohebné a pružné. Jako příklad je možné uvést polydimethylsiloxan (PDMS), nejpoužívanější materiál pro výrobu polymerních mikročipových systémů k elektroforéze.

Výhodami jsou zde výrobní cena, výrobní čas (cca 20 hodin), mechanická odolnost, propustnost UV/VIS záření, hydrofobní vlastnosti [20, 29, 30].

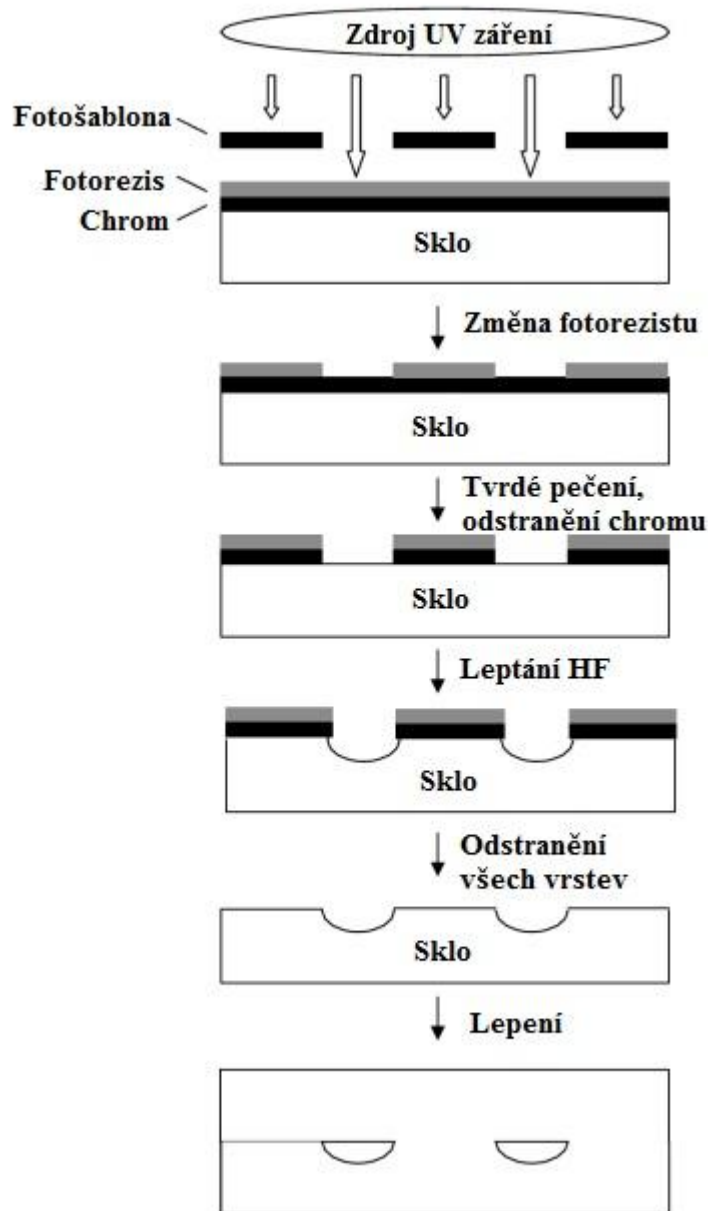
Struktura termoplastů je opět tvořena dlouhými převážně lineárními řetězci, v tomto případě nejsou mezi sebou zesíťovány. Jsou-li vystaveny zvýšené teplotě, měknou, jsou tvárné a po vychladnutí ztuhnou a zachovají si nový tvar. Nejpoužívanějšími materiály tohoto typu jsou polymethylmetakrylát (PMMA), polyethyltereftalát (PET) a polykarbonát (PC) [20, 29].

Termosety tvoří pevně zesíťovanou strukturu, která je činí velmi chemicky odolnými, ovšem pro mikročipové systémy nenašel tento typ materiálu uplatnění [20, 29].

Skleněné mikročipy:

Přesto, že je možné pro výrobu využívat celou řadu rozmanitých materiálů, sklo se jeví stále jako nepříznivější varianta. V porovnání s ostatními má relativně velkou mechanickou odolnost, je schopné odolávat vyšším teplotám než polymery, chemická odolnost a stálost je velmi vysoká. Díky své tepelné vodivosti odvádí v mikročipovém uspořádání dobře vznikající teplo a je možné aplikovat vyšší hodnoty napětí v porovnání s kapilární elektroforézou. Sklo má také velmi dobré optické vlastnosti, ovšem záleží jakou metodu je zpracováváno a poté je nutné dle vlastností volit vhodnou detekci. Skleněné mikročipy jsou nejčastěji vyráběny metodou fotolitografie a mokřím leptáním (obrázek 4) [20, 21].

Technologický postup výroby mikročipu procesem fotolitografie a mokrého leptání:



Obrázek 4 Schéma výroby skleněného mikročipu metodou UV fotolitografie a mokrého leptání, obrázek převzat z [20]

Celý proces výroby mikročipu je velmi náročný úkol. Aby vznikl dokonalý separační kanál, přesně definovaných parametrů schopný separovat vybrané typy látek v rozumném čase s přijatelnou účinností, je nutné při výrobě dbát na celkovou preciznost práce [20, 31].

Na počátku výroby je nutné se zamyslet, k jakému účelu bude mikročip sloužit. Dle této myšlenky se vytvoří návrh celého mikročipu včetně separačního kanálu, dávkovacích komor a zásobníků na elektrolyt, pomocí grafického editoru jako je například AutoCad, Google SketchUp a další [20, 31].

Z příslušného návrhu vznikne šablona, tím že se pomocí tiskárny s vysokým rozlišením přenesou předloha na skleněný substrát. Nanášená vrstva musí být z materiálu odolného vůči UV záření. Tiskárny poskytují kvalitní, levné a rychle dostupné šablony, přesně definovaných rozměrů, nevýhoda může být v poskytování kanálů minimální šířky 20 μm . Šablony je také možné vytvořit z kovu, který je velmi odolný a umožňuje opakované použití šablony, nicméně náklady na výrobu jsou o poznání vyšší [20].

Skleněná destička, do které se bude leptat příslušný návrh kanálu, se musí nejprve zbavit všech mechanických nečistot a odmastit. Následně se na ni nanášejí ochranné vrstvy, které chrání sklo před nepříznivými vlivy během celého procesu výroby a také umožňují vytvoření kanálu přesně definovaných rozměrů a tvarů. První vrstva o tloušťce menší než 1 μm je z chromu. Druhou vrstvou tvoří fotorezist umožňující přenesení návrhu kanálu [20, 32].

Po předchozích úkonech přichází na řadu UV fotolitografie. Na skleněnou destičku opatřenou ochrannými vrstvami se přiloží vytvořená šablona nesoucí návrh příslušného kanálu a je vystavena po určitou dobu působení UV záření. Během této doby je odhalena část fotocitlivé látky (fotorezistu) vystavena UV záření. Dochází k chemické změně a to buď vytvrzení fotorezistu, tím se stane odolný vůči rozpouštědlům, vznikne negativní fotorezist. Ve druhém případě se po vystavení UV záření odolnost vůči rozpouštědlům výrazně sníží a vznikne pozitivní fotorezist (obrázek 5) [20, 33].



Obrázek 5 Zobrazení rozdílu pozitivního (a) a negativního (b) fotorezistu, převzato z [20]

Pro zrychlení celkového procesu, jsou komerčně dostupné skleněné destičky s již nanesenými ochrannými vrstvami kovu a fotorezistu. Kvůli přesnosti je nutné, aby šablona byla v přímém kontaktu se skleněnou destičkou. Šablonu je možné používat tak dlouho, dokud není vzor deformovaný. Délka expozice a výkon UV záření musí být volen tak aby docházelo k dostatečné změně fotorezistu, závisí tedy na typu a tloušťce naneseného fotorezistu [20].

Jakmile je vzor přenesen, nastupuje takzvané tvrdé pečení. Opět dochází k určitým chemickým změnám fotorezistu vedoucím ke zvýšení odolnosti vůči rozpouštědlům. Průměrná doba pečení se pohybuje okolo 30 minut při průměrné teplotě 110 °C [20].

Další v pořadí je vytvoření samotného kanálu leptáním pomocí různých rozpouštědel (jedná-li se o proces mokrého leptání). Nejčastěji používané jsou kyselina fluorovodíková (HF) nebo směs kyseliny fluorovodíkové a fluoridu amonného. Při působení těchto sloučenin je nutné kontrolovat dobu, po kterou je leptání prováděno, z důvodu izotropního leptání (leptání probíhá ve všech směrech) [20, 34].

Skleněná destička je ponořena do roztoku HF. Okamžitě začne docházet k narušování struktury skla a leptání kanálu. Rychlost jakou bude probíhat leptání, závisí na mnoha faktorech, především to je na typu materiálu, z něhož je sklo vyrobeno a na koncentraci kyseliny fluorovodíkové. Pro příklad, rychlost leptání borosilikátového skla je o poznání

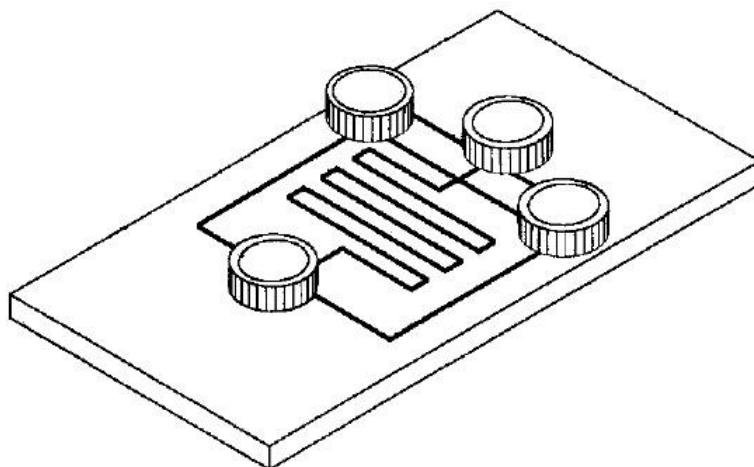
nižší než u sodnovápenatého skla a je zapotřebí použít koncentrovanějších roztoků kyselin. Celková doba leptání závisí na požadovaných parametrech (hloubce) tvořeného kanálu. Při delší expozici čipu nepříznivým vlivům koncentrovaných kyselin může docházet k poškození ochranných vrstev, to by zapříčinilo leptání v nežádoucích lokalitách a poškození geometrie a celkových vlastností kanálu. Na dalším místě je velmi důležité aby nevznikal nepravidelný povrch kanálu, jenž by výrazně snížil kvalitu mikročipu. Nepravidelný povrch může vznikat, je-li leptání příliš rychlé, tomu se zamezí přidáním 10% (v/v) kyseliny dusičné, nebo nejsou-li dostatečně rychle odváděny produkty leptání. Z tohoto důvodu je nutné, aby po celou dobu leptacího procesu byl povrch čistý. Leptání může probíhat ve speciálních acidorezistentních nádobách, popřípadě v levnějších verzích vyrobených z polypropylenu. Jelikož dochází k leptání ve všech směrech, získají se kanály, jejichž profil připomíná písmeno ‚U‘ [20, 30, 34].

Proces leptání je nutné sledovat a kontrolovat geometrii vznikajícího kanálu. Toto sledování je prováděno několika možnými metodami, z nichž nejvíce se využívají mikroskopy a profilometry. Profilometr je zařízení sloužící k mapování povrchů tuhých látek. Starší přístroje pracovaly na principu pohybu velmi ostrého hrotu jehly po povrchu zkoumaného materiálu a zobrazování jeho struktury s citlivostí řádově nanometrů. Dnešní profilometry pracují bezkontaktně a profilují povrch pomocí optických metod [20].

Po vyleptání kanálu požadovaných rozměrů, je mikročip vyjmut z kyselinové lázně, ponořen do čisté vody, kde se zbaví všech nečistot a kyselin. Dojde k proměření pomocí profilometrů a jsou-li rozměry vyhovující, čip putuje na další operaci [20].

Následují mechanické operace upravující jejich výsledný tvar a rozměry. Pro mikročipy jenž mají zásobníky přímo na čípech, se musí vyvrtat vstupní a výstupní otvory jako zásobníky základních elektrolytů, zásobníky na vzorek a podobně (obrázek 6) [20]. Vrtání otvorů může opět probíhat několika možnými způsoby avšak v praxi nejpoužívanější je pomocí diamantových a karbidových vrtáků. Při vrtání se uvolňuje velké množství tepla, které je nutné odvádět pomocí chladicí vody. Celý proces vrtání je počítačově řízen pro dosažení vysoké přesnosti vrtů [20, 32]. Jako alternativní způsob vrtání může být použit výkonný laser, schopný tvořit velmi malé otvory s vysokou přesností na místech a materiálech kde nemůže být využito klasického vrtáku, ovšem cenově je poněkud méně dostupný. Výsledný tvar je možné upravit na požadované rozměry, nebo rozdělit více mikročipů vyráběných současně z jedné skleněné desky pomocí rýhování a lámání, nebo diamantovou kotoučovou řezačkou. V prvním případě se diamantovým řezákem utvoří

rýha a za pomoci tlaku se provede lom v místě rýhy. Jedná se o rychlou variantu s malou přesností. Nedostatky vyplňuje diamantová kotoučová pila, provádějící velmi přesné řezy, cenově ovšem náročnější [20, 21, 32].



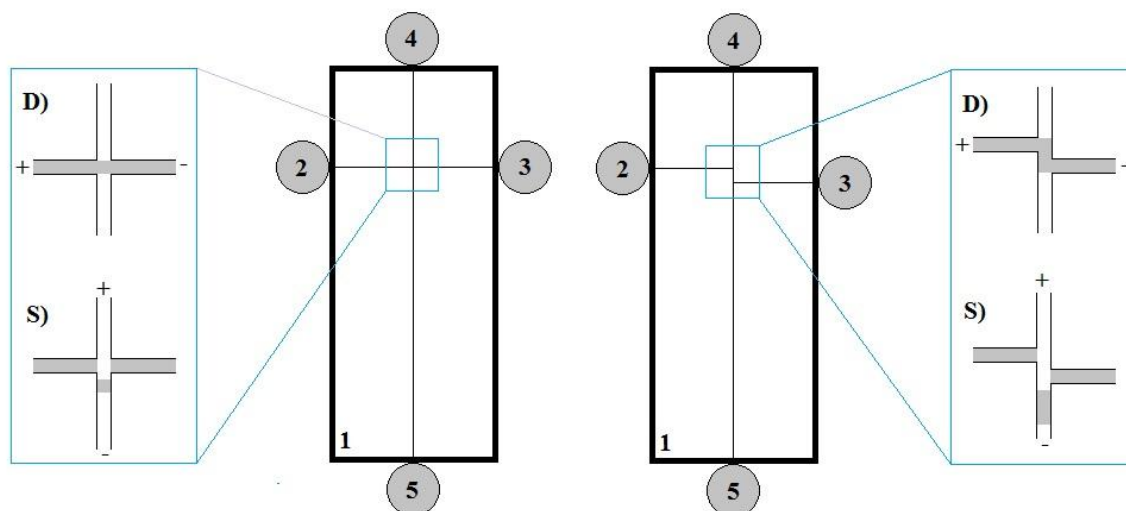
Obrázek 6 Ilustrační obrázek mikročipu se zásobníky umístěnými přímo na čipu, převzato z [35]

Jako předposlední operace v tomto procesu přichází na řadu lepení dvou protilehlých skleněných kusů dohromady. Zde se využívá tepelného lepení, jehož největší výhodou je spojování bez použití lepidel, která by mohla vtéct do kanálu a negativně ovlivnit vlastnosti čipu. Proces lepení probíhá v programovatelné vysokoteplotní peci a má několik po sobě jdoucích kroků. Oba lepené kusy, předem očištěné, odmaštěné a přesně vyrovnané se vloží do vysokoteplotní pece mezi dvě vyhřívané grafitové nebo keramické desky schopné vyvinout dostatečný tlak [4, 20]. V první fázi dochází k rychlému zahřátí na teplotu 550 °C, od tohoto bodu dochází k pomalému ohřevu na teplotu lepení, která se pohybuje v rozmezí 640 – 690 °C v závislosti na druhu skla. Při této teplotě zůstává mikročip za působení tlaku několik hodin, při kterých dojde k vytvoření spoje. Nakonec dochází k pomalému ochlazování na pokojovou teplotu, nenuceně aby se zabránilo vzniku prasklin a vnitřnímu pnutí. Celý proces lepení je velmi časově a technologicky náročný a je zde kladen velký důraz na čistotu [20]. Další využívanou metodou je takzvané anodické lepení. Dvě složené očištěné destičky se vloží mezi dvě elektrody, na které je vkládáno vysoké napětí v řádech kilovoltů. Při teplotě cca 400 °C dochází k reakci mezi sodíkovými atomy jedné desky a křemíkovými atomy desky druhé za vzniku pevné vazby. V neposlední řadě je možné použití epoxidových lepidel, aplikovaných do extra leptaných kanálů po obvodu mikročipu, následně expozici UV záření, při kterém dojde k vytvrzení lepidla a vzniku pevného spoje [20, 32].

Nyní je mikročip již téměř připraven pro plánované využití, nicméně pokud byl mikročip během lepení vystaven vysoké teplotě, docházelo k dehydrataci skleněného povrchu stěn mikrokanálu. To může ve výsledku negativně ovlivnit vlastnosti plánovaných separací. Z tohoto důvodu se provádí rehydratace povrchu pomocí směsi etanolu s kyselinou chlorovodíkovou v poměru 1:1 (v/v). Směs se nechá působit po dobu 30 minut, po kterých následuje proplach vodou a kyselinou sírovou. Tato operace se opakuje několikrát po sobě. Na závěr se mikročip propláchně čistou vodou, osuší a je připraven k použití [20, 32].

Dávkování vzorku:

Použití miniaturizovaných systémů snižuje celkové objemy použitých reagentů včetně množství vzorku potřebnou pro analýzu. Volba dávkovacího mechanismu silně závisí na konstrukci a celkové uspořádání mikročipového separačního systému. Nejčastěji se využívá dávkování tlakem nebo elektrokineticky [20, 28]. U mikročipů kde dávkovací kanál protíná separační kanál je elektrokinetický nástřik tou nejlepší volbou. Na ilustračním obrázku 7 je možné vidět dva typy mikročipů s rozdílným dávkovacím objemem vzorku. Pro dávkování se aplikuje napětí na elektrody ponořené do zásobníků 2 a 3. Objem, který je při nástřiku dávkován závisí na parametrech kanálu. Pro separaci se aplikuje napětí na elektrody v zásobnících 4 a 5. Velkou výhodou tohoto způsobu dávkování je výborná reprodukovatelnost [28, 36, 37].



Obrázek 7 Schéma elektrokinetického nástřiku vzorku na mikročipech a) standardní T-tvar, b) posunutý T-tvar. 1) skleněný mikročip, 2) zásobník na vzorek - vstup, 3) zásobník na vzorek - výstup, 4) zásobník na základní elektrolyt - vstup, 5) zásobník na základní elektrolyt - výstup. D) dávkování vzorku, S) separace, převzato z [7]

Detekce při použití mikročipových systémů:

Při volbě detekce vzniká hlavní problém s velikostí mikročipů. Možnosti detekce jsou obdobné jako pro klasické uspořádání, nicméně prvky detektoru musí být miniaturizovány pro dané potřeby. U UV/VIS detektorů může nastat komplikace v nepropustnosti záření mikročipem například pro čipy z borosilikátového skla. Při použití hmotnostního spektrometru je největší problém technologické zvládnutí propojení těchto dvou technik [20, 38].

1.3 Oligosacharidy

Sacharidy jsou skupinou organických látek vyskytujících se všech živých organismech, jsou složeny z atomů uhlíku, vodíku a kyslíku. Tyto látky zastávají mnoho funkcí, na prvním místě slouží jako zdroj energie, zdroj uhlíku pro biosyntézu, u rostlinných organismů zastávají funkci strukturní (celulosa, chitin) a v neposlední řadě mají taky funkci signálních molekul. Podle počtu cukerných jednotek můžeme sacharidy dělit do tří skupin, na monosacharidy (jedna cukerná jednotka, glukóza), oligosacharidy (dvě až deset cukerných jednotek, maltóza) a polysacharidy (deset a více cukerných jednotek, celulóza) [1].

Oligosacharidy

U oligosacharidů (glykanů) stojí za zmínku jejich účast v postranslační syntéze glykoproteinů - glykosylaci. Glykoproteiny slouží jako signální molekuly pro přenos důležitých informací, mohou sloužit jako markery některých závažnějších onemocnění, jako příklad lze uvést změnu glykosylace proteinů spojená s cirhózou jater. Glykoproteiny je možné rozdělit do několika skupin a to například podle typu vazby, kterou je oligosacharid vázán na protein, na O-glykoproteiny, N-glykoproteiny, C-glykoproteiny, fosfo-glykoproteiny. Při syntéze většiny glykoproteinů jsou zapotřebí specifické enzymy, sacharidové přenašeče, glykosyltransferázy (při tvorbě O-glykoproteinů, není zapotřebí specifické transferázy) [26, 39].

Analýza oligosacharidů a jejich derivátů je relativně komplikovaný proces a to vzhledem k jejich strukturní rozmanitosti jako je izomerie a rozvětvené struktury, dále jsou to elektroneutrální sloučeniny, bez fluoroforů a chromoforů znemožňující UV/VIS detekci [40]. Vlivem těchto problémů se před samotné analýzy zařazují derivatizace, kdy dojde k navázání činidla na oligosacharid, tím se zvýší rozlišení separací, sníží se meze detekce a stanovení. Použitím laserem indukované fluorescence je možné tyto meze ještě snížit.

Jako účinné separační metody, vhodné pro analýzy oligosacharidů, se v praxi osvědčily vysokoúčinná kapalinová chromatografie, kapilární zónová elektroforéza. Princip detekce oligosacharidů spočívá ve srovnávání retenčních časů složek ve vzorku se standardy. Pokud se spojí některá separační metoda a hmotnostní spektrometrie je možné získat velmi kvalitní informace o struktuře látky, molekulové hmotnosti a další [41-43].

1.4 Derivatizace

1.4.1 Princip

Dle definice je derivatizace proces, kdy se cíleně mění chemická struktura analytu chemickou reakcí funkční skupiny s derivatizačním činidlem. Produktem této chemické přeměny je derivát, tedy látka definovaného složení s požadovanými fyzikálně chemickými vlastnostmi [44]. Derivatizace se provádí za účelem lepšího rozdělení separovaných sloučenin, popřípadě aby byla separace vůbec proveditelná, dále za účelem zlepšení detekce (vyšší citlivost, specifická, selektivní). Připravované deriváty by měly být snadno a rychle připravené, reakce by měla probíhat kvantitativně bez vedlejších reakcí, činidla by měla být běžně dostupná v požadované čistotě, levná a stabilní [44]. I přes řadu výhod derivatizačních reakcí není možné opomenout fakt, že může vlivem derivatizačních činidel docházet ke kontaminaci vzorku což může zvýšit cenu a čas celkové analýzy [43, 45]. Při derivatizacích je nutné vhodně volit optimální podmínky reakce pro získání kvalitního derivátu požadovaných vlastností. Obecně lze říct, že zvýšená teplota a delší čas derivatizace má pozitivní vliv, nicméně je nutné dávat pozor, aby nedocházelo k degradaci samotného analytu [44].

1.4.2 Derivatizace oligosacharidů

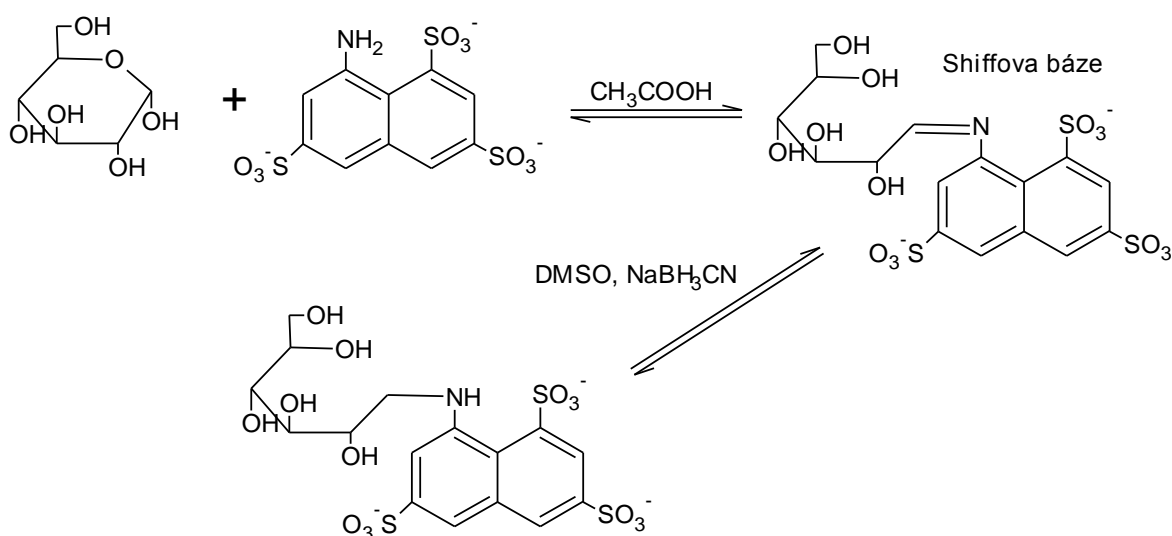
Jak již bylo zmíněno v úvodu této práce, oligosacharidy jsou elektroneutrální sloučeniny, bez fluoroforů a chromoforů. Vlivem těchto vlastností se komplikuje vlastní elektroforetická separace a následná detekce. Pomocí derivatizace se na oligosacharid váže sloučenina požadovaných vlastností (derivatizační činidlo), umožňující elektroforetickou analýzu a následnou spektrální detekci [41]. Pro derivatizace oligosacharidů je možné využít tři základní typy derivatizačních reakcí s širokým spektrem nejrůznějších derivatizačních činidel [44]. Jsou to redukční aminace, kondenzace s 1-fenyl-3-metyl-5-pyrazolonem (PMP) a kondenzace karboxylovaných (kyselých) sacharidů s aminy [46-48].

V praxi se pro kapilární zónovou elektroforézu nejčastěji využívá derivatizace redukční aminací s derivatizačními činidly: 2-aminobenzoová kyselina (2-AA), 2-aminobenzamid

(2-AB), 2-aminopyridin (2-AP) a 8-aminonaftalen-1,3,6-trisulfonová kyselina (ANTS) [49]. Vlastnosti těchto činidel jsou shrnuty v tabulce 1. Tuto reakci lze provést dvěma způsoby.

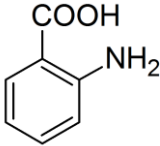
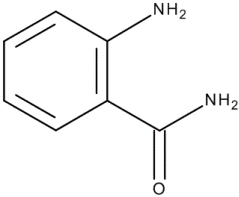
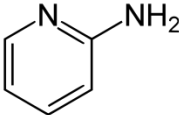
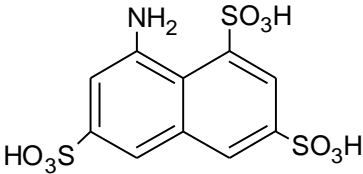
První možností je derivatizace redukujících sacharidů činidlem s následnou reductivní aminací (obrázek 8). V prvním kroku reaguje redukující konec sacharidu s primární aminskupinou činidla za vzniku Schiffovy báze. Ve druhém kroku je Schiffova báze redukována kyanoborohydridem sodným. Reakce probíhá kvantitativně, bez vedlejších produktů. Deriváty jsou stabilní v širokém rozmezí pH [50].

Druhou možností je derivatizace redukujících sacharidů po reductivní aminaci [50].



Obrázek 8 Reakční schéma derivatizace redukujících sacharidů činidlem s následnou reductivní aminací [49]

Tabulka 1 Optické vlastnosti vybraných derivatizačních činidel

Derivatizační činidlo	λ_{abs} (nm)	$\lambda_{\text{excitační}}$ (nm)	$\lambda_{\text{emisní}}$ (nm)	Zdroje
2-AA 	214	230	425	[51-53]
2-AB 	254	330	419	[54, 55]
2-AP 	240	315	375	[56]
ANTS 	214	353	535	[57, 58]

1.5 Kapilární zónová elektroforéza derivatizovaných oligosacharidů

Chiesa a Horváth použili kapilární zónovou elektroforézu pro separaci derivatizovaných malto-oligosacharidů reaktivní aminací s činidlem 8-aminonaphalen-1,3,6-trisulfonovou kyselinou. Značené oligosacharidy byly sledovány pomocí UV a fluorescenčního detektoru. Pomocí této řady oligosacharidů zkoumali vlivy pracovních podmínek na separaci a vztah mezi efektivní pohyblivostí derivátů a molekulovými hmotnostmi. Bylo zjištěno, že elektroforetická pohyblivost derivátů oligosacharidů je závislá na molekulové hmotnosti mocninou funkcí s exponentem $-2/3$. Dále ANTS deriváty obsahují tři negativní náboje v důsledku disociace tří sulfonových skupin v silně kyselém prostředí (pH 2,5).

Díky těmto vlastnostem je derivát schopen pohybu v elektrickém poli bez jakékoli interakce s elektroosmotickým tokem nebo adsorpce na stěny kapiláry. Separace byla tedy prováděna v silně kyselém prostředí základního elektrolytu, trietylamonium fosfátového pufru o pH 2,5. Tento elektrolyt poskytoval vysokou reprodukovatelnost a dostatečnou rychlost separací [57].

He a kolektiv kvantitativně derivatizovali metodou reduktivní aminace dvě skupiny sacharidů o stejné molekulové hmotnosti, aldohexózy (manóza, glukóza) a aldopentózy (ribóza, xylóza). Jejich deriváty byly separovány pomocí kapilární zónové elektroforézy s roztokem 50 mM fosfátového pufru jako základního elektrolytu. Separace byla provedena za účelem studia a potvrzení strukturních dat získaných pomocí ^1H a ^{13}C NMR. Byla připravena derivatizační směs, 0,35 M 2-AA činidla a 0,1 M kyanoborohydridu sodného bylo smícháno s roztokem kyseliny octové a sulfoxidu v poměru 3:7 (v/v). Směs byla v nadbytku pipetována k sacharidu a inkubována po dobu 2 hodin při teplotě 65 °C. Vzniklé deriváty byly separovány v prostředí základního elektrolytu 50 mM dihydrogefosforečnanu sodného (pH od 4,5 do 7,0) s vkládaným napětím 20 kV při teplotě 25 °C. Po separaci byla měřena ^1H a ^{13}C NMR spektra. Ze získaných dat bylo zjištěno, že rozdílná konfigurace hydroxylových skupin na druhém a třetím uhlíku (manóza, glukóza a ribóza, xylóza) způsobuje rozdíl ve Stokesově poloměru jejich molekul, který vede k rozdílné elektroforetické mobilitě a následnému dělení v elektrickém poli [59, 60].

Kratschmar a kolektiv prováděli výzkum týkající separace a detekce derivatizovaných oligosacharidů pomocí micelární elektrokinetické kapilární chromatografie. Oligomery glukózy a oligosacharidy získané hydrolýzou glykoproteinů byly fluorescenčně značeny pomocí 2-AB činidla. Byla připravena derivatizační směs, 0,25 M 2-AB činidla, 0,1 M kyanoborohydridu, bylo rozpuštěno v roztoku kyseliny octové a dimethylsulfoxidu (DMSO) v poměru 3:7 (v/v). Derivatizační směs byla v nadbytku pipetována ke vzorku oligosacharidů a inkubována při 65 °C po dobu 2 hodin. Separace probíhala v křemenné nepokryté kapiláře efektivní délky 80 cm s vkládaným napětím 20 kV při teplotě 25 °C. Detekce probíhala v UV oblasti při 254 nm. Jako základní elektrolyt byl použit 50 mM fosfátový pufr s 150 mM SDS [55].

Sato a kolektiv prováděli výzkum pro nalezení optimálních podmínek využívaných pro elektroforetickou separaci derivatizovaných monosacharidů. Směs oligosacharidů byla derivatizována metodou reduktivní aminace s činidlem 2-AA. Byla připravena derivatizační směs, 0,35 mol 2-AA činidla, 0,1 mol kyanoborohydridu sodného bylo

rozpuštěno ve směsi kyseliny octové a dimethylsulfoxidu v poměru 3:7 (v/v). Nadbytek derivatizačního činidla byl pipetován ke vzorku oligosacharidů a inkubován při 65 °C po dobu 2 hodin. Pro separaci byla použita křemenná kapilára o vnitřním průměru 75 μm, celkové délky 60 cm. Jako základní elektrolyt byl použit borát v 50 mM fosfátovém pufru. Koncentrace kyseliny borité byla měněna od 100 do 400 mM s použitým pH od 5,5 do 9,5. Separace probíhala s aplikovaným napětím 20 kV při 25 °C s UV detekci při 214 nm. Z výsledků bylo zjištěno, že nejlepších výsledků separací bylo dosaženo za použití 150 mM kyseliny borité v 50 mM fosfátovém pufru [53].

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Chemikálie

2-aminobenzamid (2-AB) – Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)

2-aminopyridin (2-AP) – Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)

8-aminonaftalen-1,3,6-trisulfonová kyselina (ANTS) – Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)

2-aminobenzoová kyselina (2-AA) – Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)

deionizovaná voda, připravena na zařízení Milli-Q Reference Water Purification
Systém Millipore SAS (Molsheim, Francie)

dihydrogenfosforečnan sodný - J. T. Baker (Deventer, Nizozemí)

dimethylsulfoxid – Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)

kyanoborohydrid sodný – Sigma - Aldrich (St. Louis, MO, USA)

kyselina boritá – Fluka (Buchs, Švýcarsko)

kyselina chlorovodíková, 37-38 % – J. T. Baker (Deventer, Nizozemí)

kyselina octová, čistota pro HPLC, >99,7% - Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)

kyselina trihydrogenfosforečná 85% - Lachner, Brno, ČR

thiomočovina - Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)

methylenová modř – Lachema N. P. (Brno, ČR)

hydroxid sodný p. a. – Penta (Praha, ČR)

maltóza hydrát – Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)

maltotrióza hydrát – Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)

2.2 Použitá instrumentace

3D tiskárna - K8200, Velleman, Gavere, Belgie

Zdroj vysokého stejnosměrného napětí - Spellman, Hhauppauge, NY, USA

Zdroj stejnosměrného napětí – Power Supply EA-PS 2384-03 B

LabJack U12 kontroler - Lakewood, CA, USA

Metalografický mikroskop MTM-407 - Intraco Micro, ČR

Stolní počítač – Dell optiplex 300MT

Optický detektor – Flash U 06 Single, ECOMAC v. 0.271

Kapilární elektroforéza – Agilent technologies, Capillary Electrophoresis 7100

Třepačka na zkumavky – Yellowline TTS2

Sušárna – Memmert UFE 400

Koncentrátor – Visible Sample LebEva

Analytické váhy – ED 1245

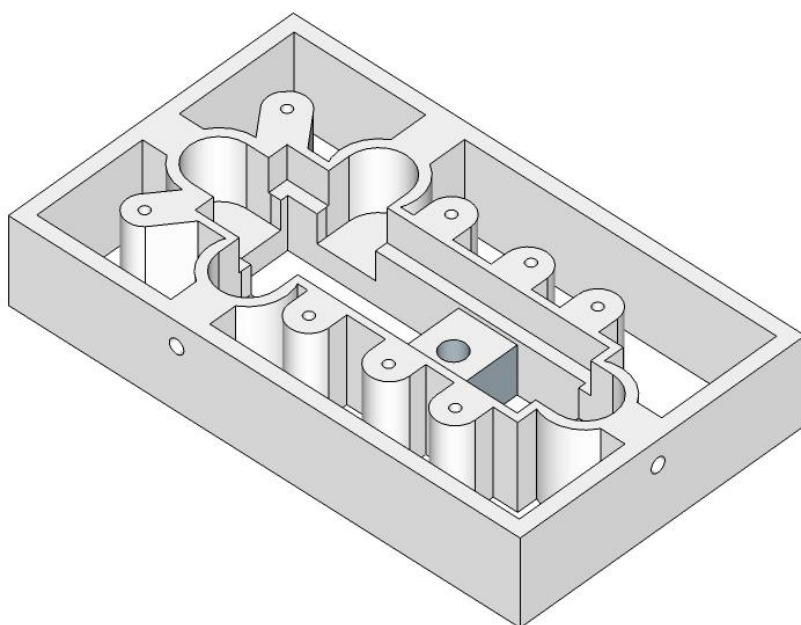
pH metr - Metrohm 827, Metrohm, Herisau, Švýcarsko

2.3 Instrumentace mikročipového elektroforetického systému

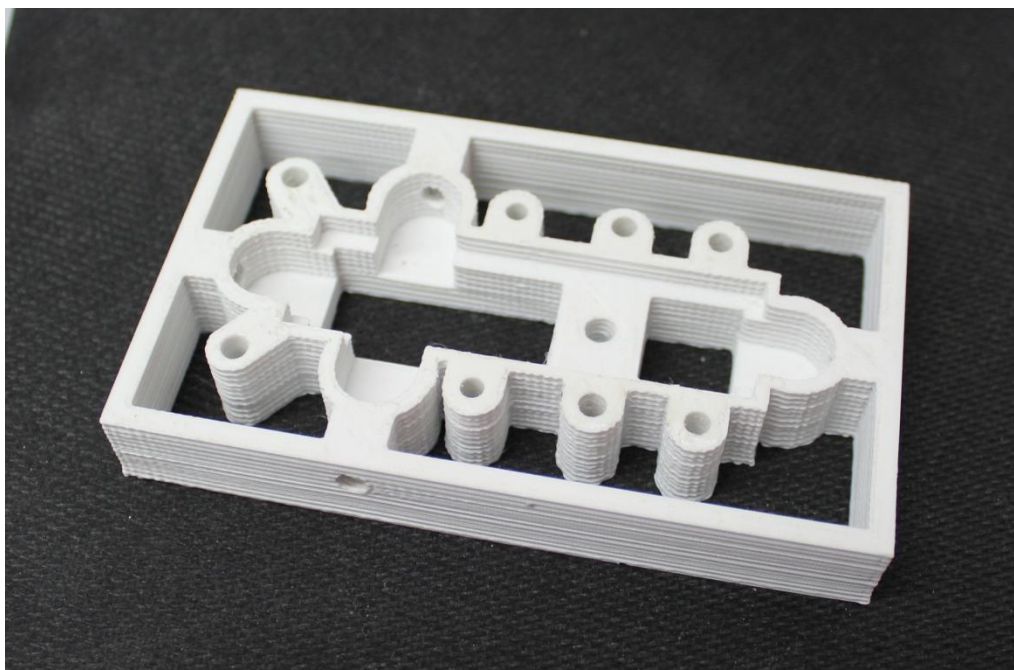
Instrumentace mikročipového separačního systému vychází z práce [7]. Tento separační systém je nyní navíc opatřen detekčním systémem pro detekci barviva a laserem indukovaným fluorescenčním detektorem.

2.3.1 Rámeček mikročipu

Jako základní kostra, která drží pohromadě všechny součásti separačního systému (mikročip, zásobníky elektrolytu, elektrody, vstupní a výstupní štěrby, zdroj záření, detektor) byl navrhnout v programu Google Sketchup rámeček na mikročip (obrázek 9). Tento rámeček byl následně vytisknut pomocí 3D tiskárny z kyseliny polymléčné (obrázek 10). Je možné jej umístit pod metalografický mikroskop a vizuálně kontrolovat migraci barviva.



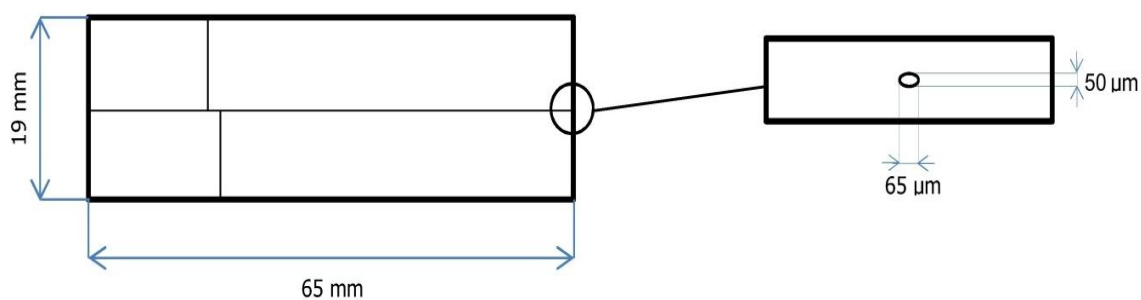
Obrázek 9 3D návrh rámečku



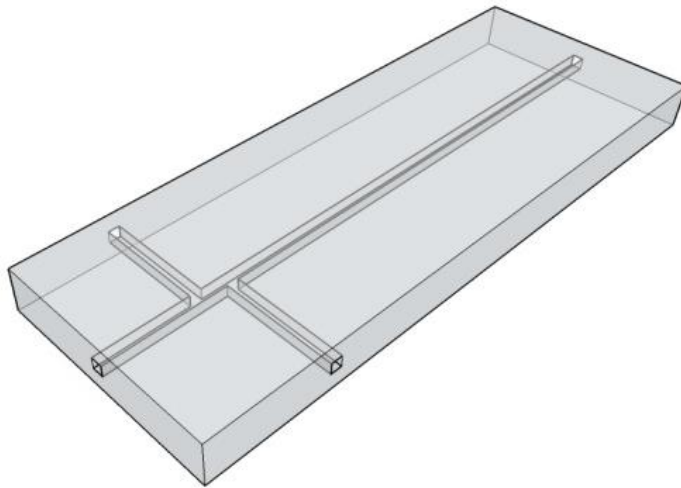
Obrázek 10 Vytisknutý návrh rámečku z kyseliny polymléčné

2.3.2 Mikročip

Mikročip byl vyrobený ve spolupráci s Akademií věd v Brně z borosilikátového skla metodou fotolitografie a mokrého leptání. Rozměry mikročipu byly 19 x 65 x 3,5 mm. Průřez separační kanálu byl eliptického tvaru s rozměry 65 x 50 μm . Dávkovací kanál protíná separační kanál v kolmém směru, pravá a levá větev jsou vzájemně posunuty pro zvýšení dávkovaného objemu vzorku. Plnění mikročipu probíhá v axiálním směru a nemá žádné interní zásobníky na elektrolyt viz. obrázek 11, 12 a 13.



Obrázek 11 Schéma borosilikátového mikročipu



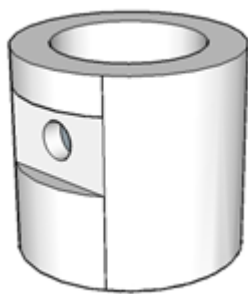
Obrázek 12 Schématické vyobrazení borosilikátové mikročipu



Obrázek 13 Použitý borosilikátový mikročip

2.3.3 Zásobníky na elektrolyt

Jelikož je separační a dávkovací kanál realizován v axiálním směru mikročipu, bylo nutné vytvořit externí zásobníky na elektrolyt a vzorky. Požadavky jsou inertní materiál, jednoduchá konstrukce umožňující snadné plnění, čištění, rychlou výměnu elektrolytů, dostatečnou těsnost v kontaktu s mikročipem. Byly navrhnuty zásobníky požadovaných rozměrů v grafickém editoru Google Sketchup (obrázek 14). Podle návrhu byly vysoustruženy z teflonových tyčí čtyři zásobníky válcového tvaru, výšky 15,6 mm, vnějšího průměru 11,4 mm a vnitřního průměru 5,1 mm. Objem zásobníku je 0,5 ml. Pro požadovanou těsnost byly zásobníky opatřeny instalatérskou teflonovou páskou viz. obrázek 15.



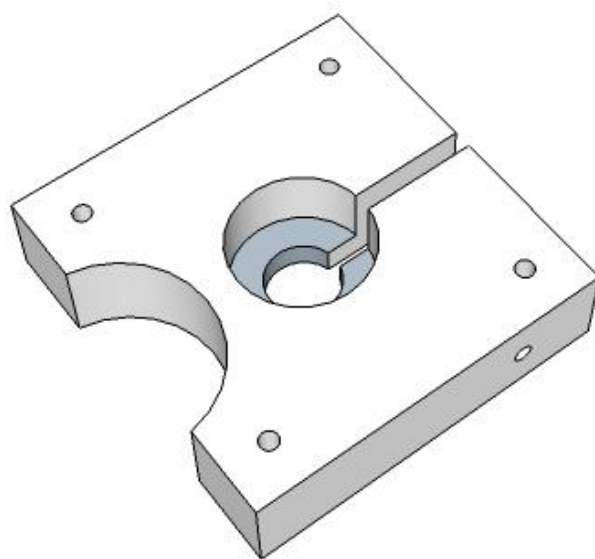
Obrázek 14 Návrh zásobníku elektrolytu



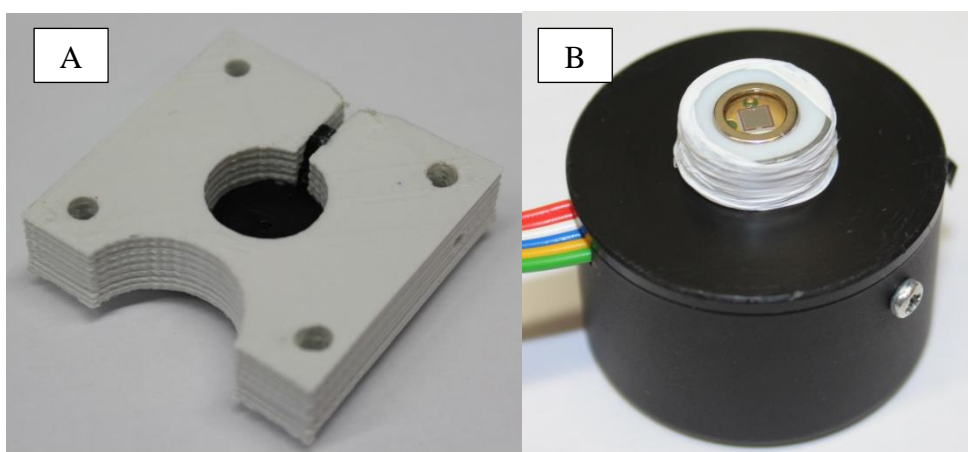
Obrázek 15 Zásobníky elektrolytů opatřené teflonovu páskou

2.3.4 Detekční systém pro test s methylenovou modří

Pro základní test separačního systému pomocí metylenové modři byl vytvořen držák „detekčního hříbu“ (obrázek 16 - 18). Tento držák byl umístěn v jedné ose nad zdrojem záření. Emitované záření tedy procházelo kanálem mikročipu a bylo zachyceno detekčním hříbem, který poskytoval příslušný signál. Detekční hřib byl připojen k řídicí základní desce detektoru a napojen k počítači (obrázek 19). Je možné tedy zaznamenávat absorbanci v závislosti na čase, popřípadě přímo napětí na detekčním hříbu v závislosti na čase.



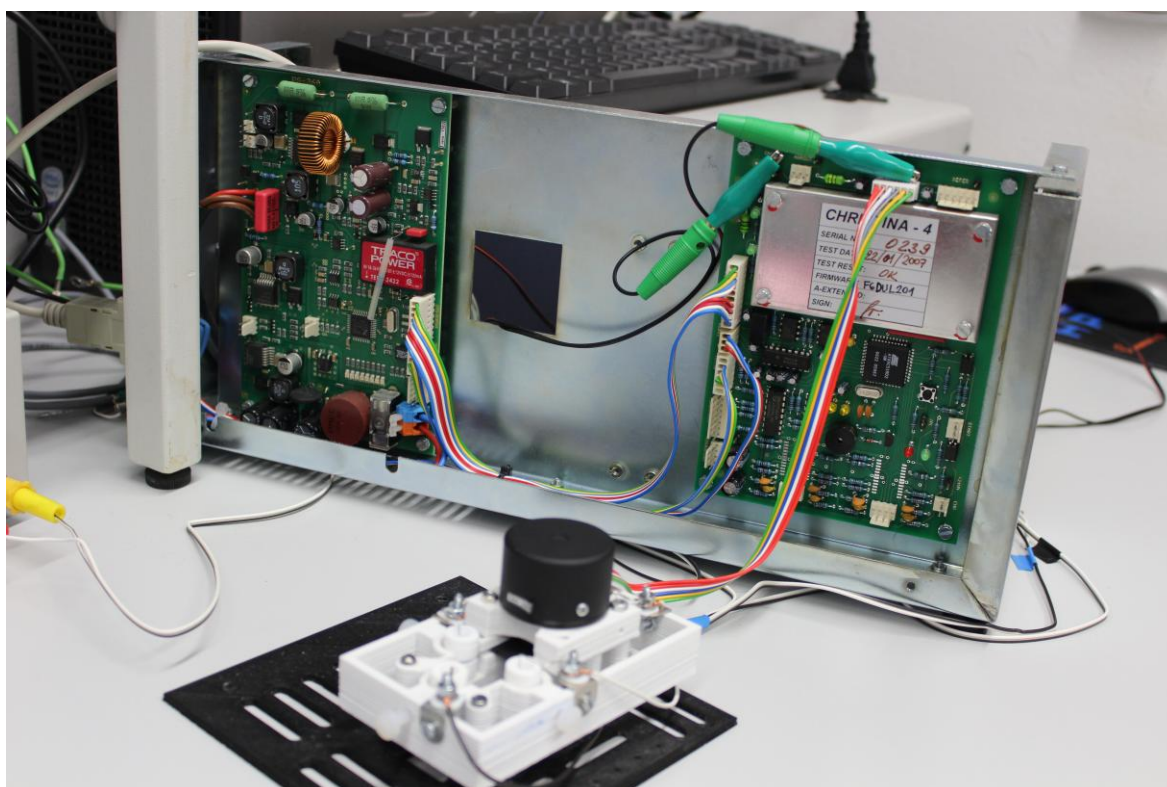
Obrázek 16 3D návrh držáku detektoru



Obrázek 17 A - držák detekčního hříbu, B - detekční hříb



Obrázek 18 Sestavený detektor



Obrázek 19 Připojení detekčního hříbu k základní desce detektoru

2.3.5 Zdroj záření

Pro test separačního systému byla jako zdroj záření použita rudá LED dioda, o průměru 5 mm, která poskytovala monochromatické záření o vlnové délce 640 nm (obrázek 20). LED dioda byla připojena k laboratornímu zdroji stejnosměrného napětí (obrázek 21).



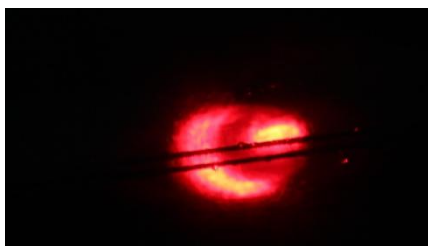
Obrázek 20 Zdroj monochromatického záření



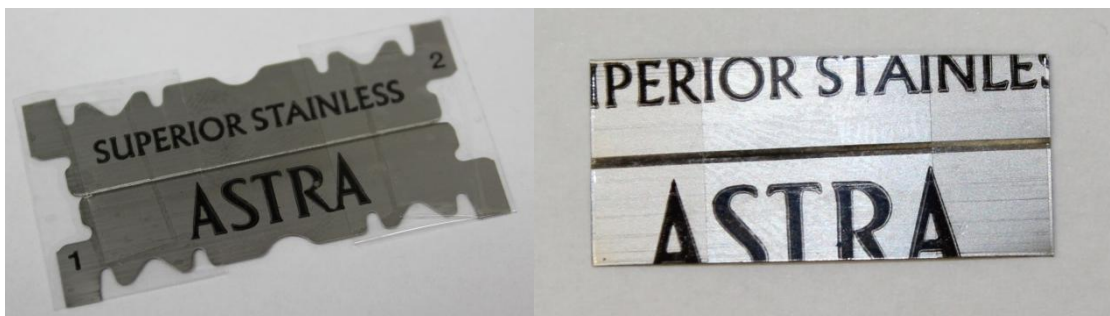
Obrázek 21 Zdroj stejnosměrného napětí pro napájení LED diody

2.3.6 Vstupní štěrbiná

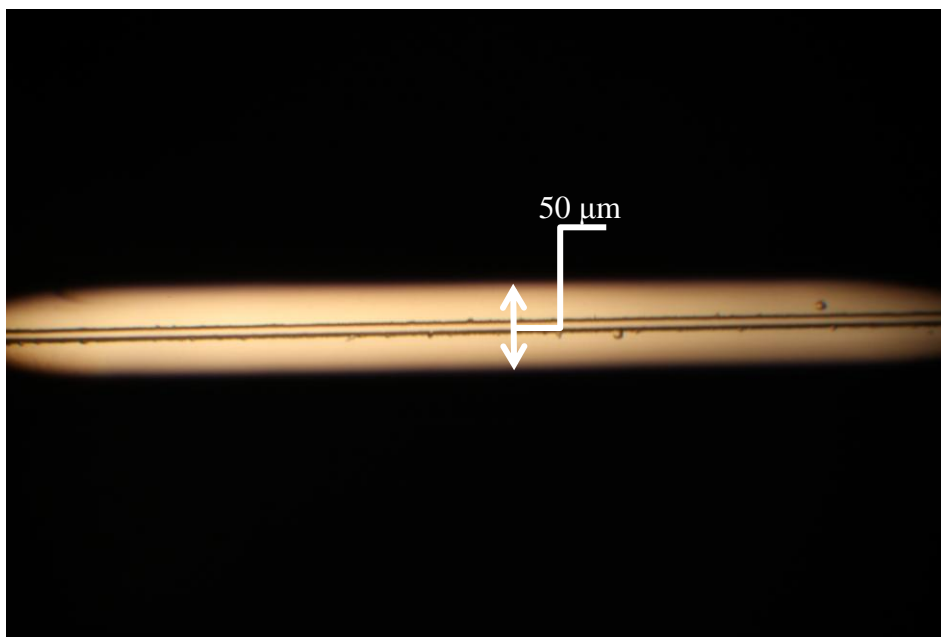
Pro usměrnění a fokusaci světelného toku na kanál mikročipu byla vytvořena vstupní štěrbiná o rozměrech $50 \times 50 \mu\text{m}$ (obrázek 22). Byly slepeny dva páry žiletok ostřím k sobě (obrázek 23), aby mezera mezi nimi byla vzdálena $50 \mu\text{m}$ (obrázek 24). Jeden pár byl pevně uchycen na mikročipu, štěrbiná orientována vodorovně se separačním kanálem (obrázek 25). Druhý pár byl pevně uchycen na rámečku mikročipu otočený o 90° vůči separačnímu kanálu (obrázek 26).



Obrázek 22 Finální štěrbina 50x50 μ m při zapnutém zdroji, zvětšeno 10x



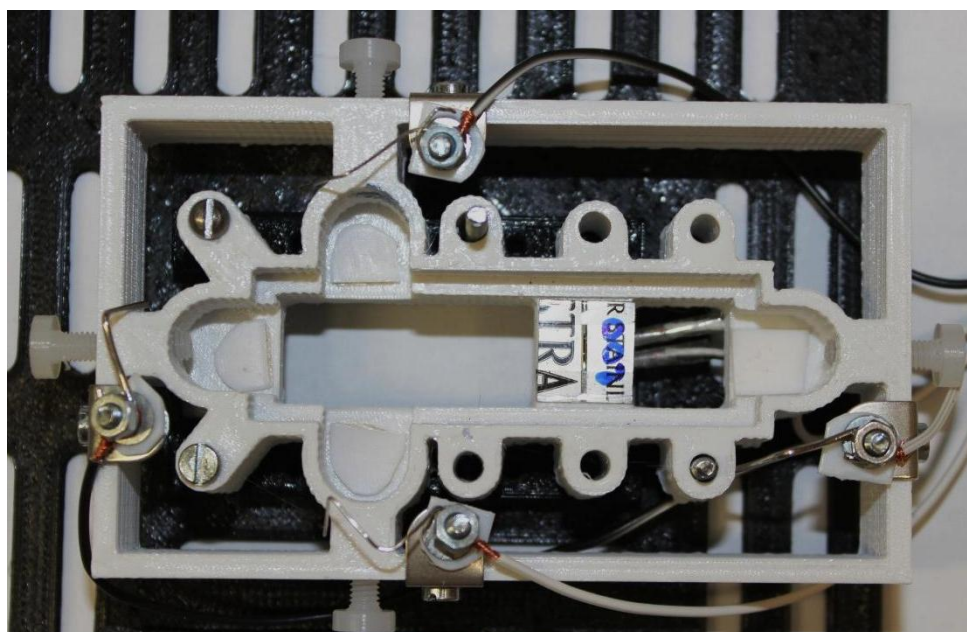
Obrázek 23 Příprava vstupní štěrbiny z žiletek



Obrázek 24 1. Část štěrbiny na mikročipu ve středu se separačním kanálem, zvětšeno 10x



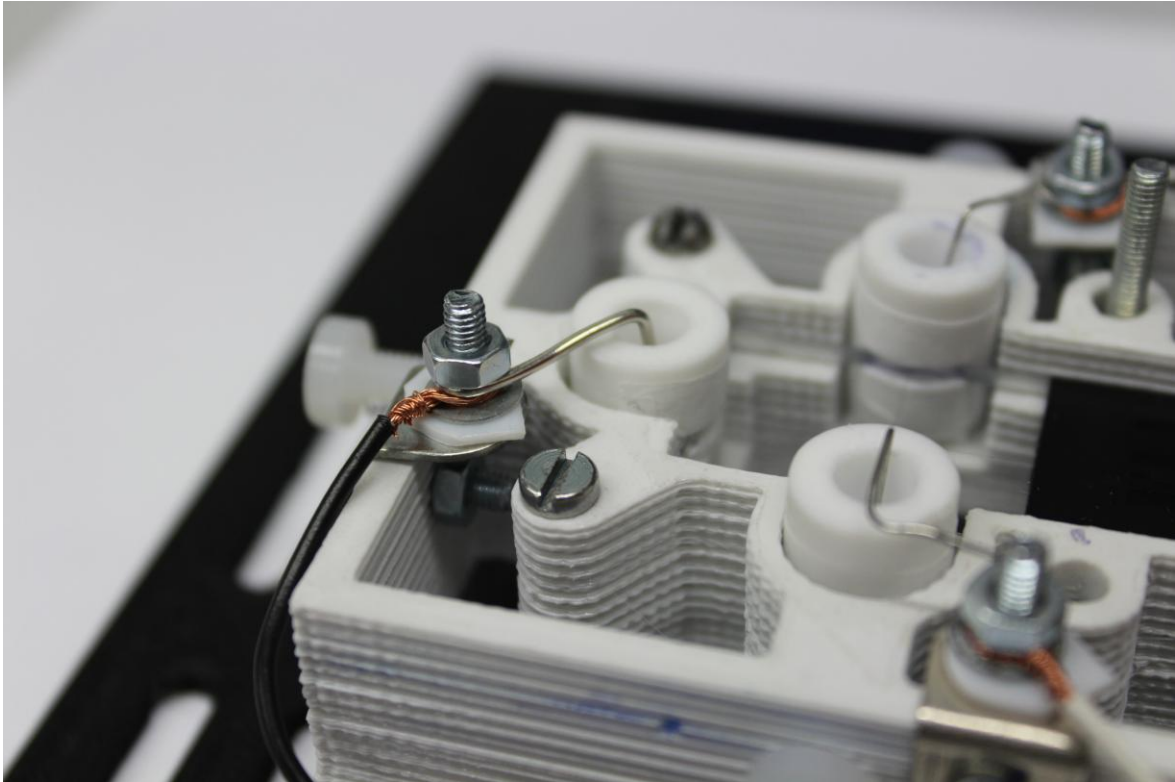
Obrázek 25 1. část vstupní štěrby na mikročipu



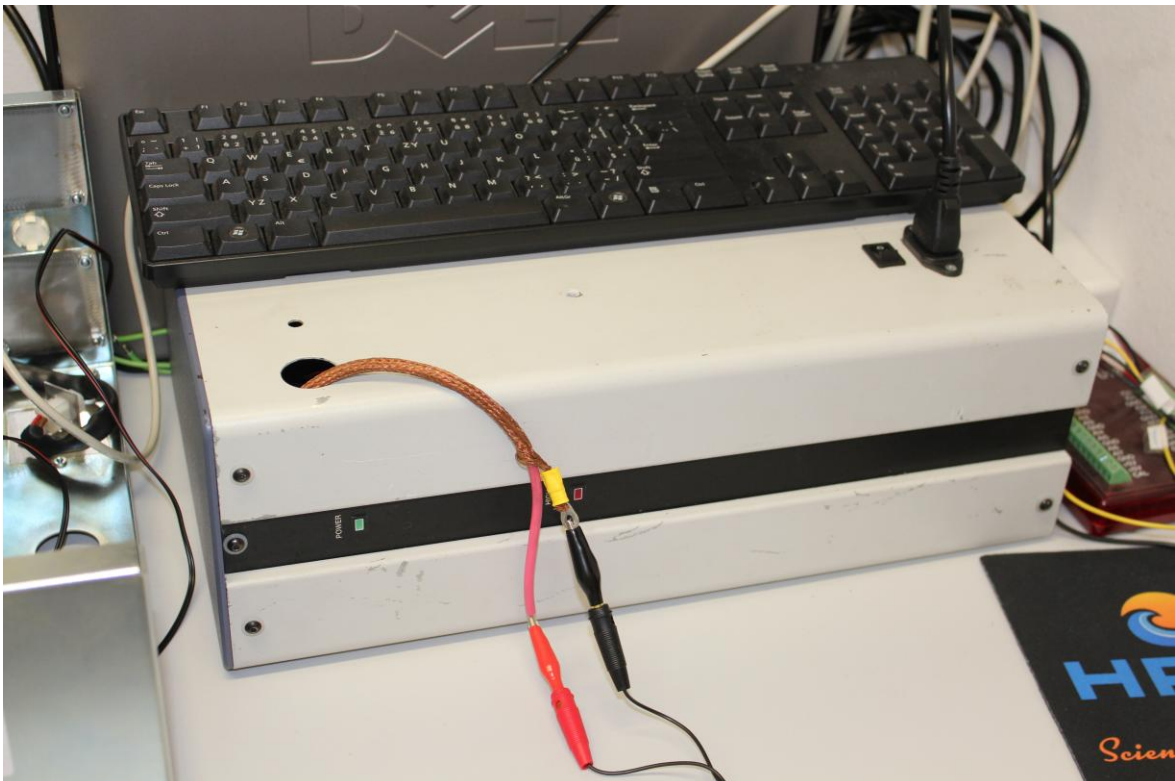
Obrázek 26 2. část vstupní štěrby umístěná na rámečku

2.3.7 Elektrody

Jako elektrody byl použit platinový drát, uchycený na rámečku mikročipu a vložený do zásobníků elektrolytu (obrázek 27). Elektrody byly napojeny na zdroj vysokého stejnosměrného napětí (obrázek 28). Velikost vkládaného napětí byla korigována pomocí rozhraní LabJack.



Obrázek 27 Platinová elektroda v zásobníku elektrolytu



Obrázek 28 Zdroj vysokého stejnosměrného napětí

2.3.8 Fluorescenční detekce

Návrh fluorescenčního detektoru vychází z článku [17] a byl upraven pro mikročipový separační systém (obrázek 29). Celý detekční systém se skládá z několika částí (tělo detektoru, zdroj excitačního záření, objektiv, dichroické zrcadlo, excitační a emisní filtr, detekční hřib). Tyto části jsou uchyceny na X-Y-Z pojezdu s mikrometrickými stavěcími šrouby pro přesnou fokusaci laserového paprsku na separační kanál. Laserový paprsek je fokusován na separační kanál ve vzdálenosti 50 mm od začátku mikročipu.

Tělo detektoru je navrženo za pomoci grafického softwaru Google Sketchup (obrázek 30) a vytištěno na 3D tiskárně z ABS (akrylonitrilbutadienstyren). Tělo detektoru slouží pro uchycení dichroického zrcadla (tabulka 2), excitačního (tabulka 3) a emisního (tabulka 4) filtru. Dále umožňuje propojení laserového modulu (tabulka 5), jako zdroje excitačního záření s objektivem (tabulka 6) a detekčním hřibem. Jednotlivé komponenty a celkové uspořádání detekčního systému je možné vidět na obrázcích 31 – 33.

Tabulka 2 Technické specifikace dichroického zrcadla

Průměr (mm)	12,5
Tloušťka (mm)	1,05
Úhel dopadu (°)	45
Rozmezí odrazu (nm)	350 - 480
Propustnost (nm)	520 - 1600

Tabulka 3 Technické specifikace excitačního filtru

Průměr (mm)	12,5
Tloušťka (mm)	1,5
Rozmezí odrazu (nm)	512 - 715
Propustnost (nm)	300 - 490

Tabulka 4 Technické specifikace emisního filtru

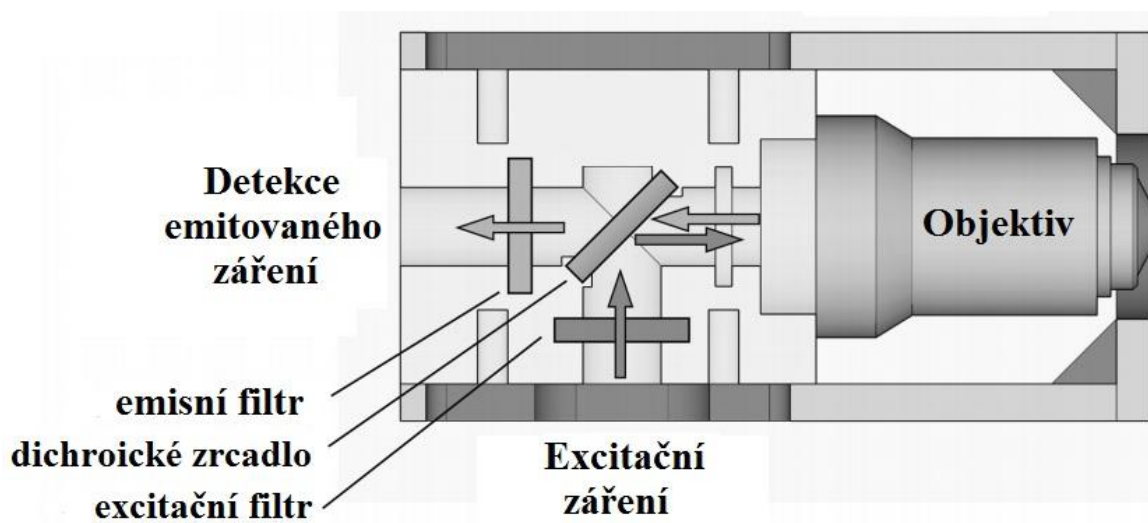
Průměr (mm)	12,5
Tloušťka (mm)	2
Rozmezí odrazu (nm)	200 - 490
Propustnost (nm)	508 - 1650

Tabulka 5 Technické specifikace laserového modulu

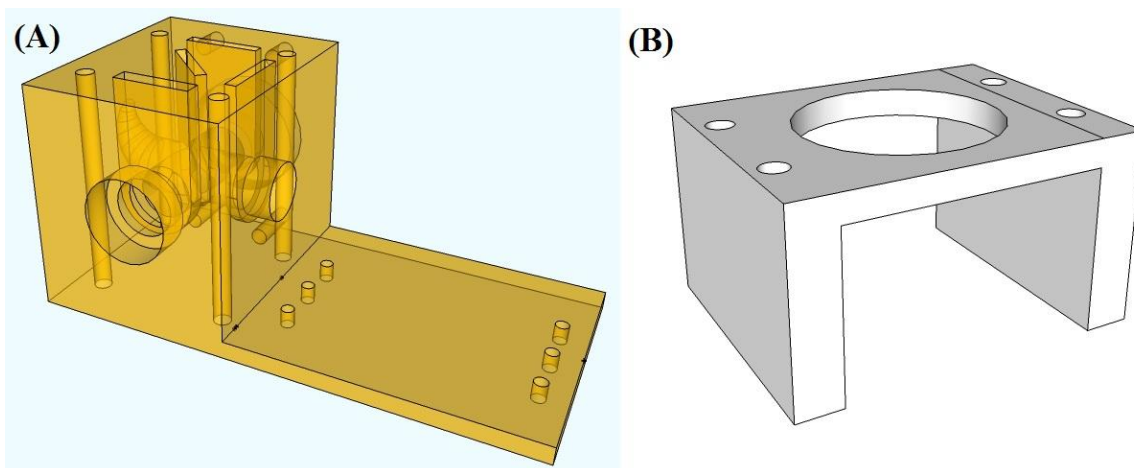
Vlnová délka (nm)	405
Výstupní výkon (mW)	80
Průměr paprsku (mm)	5
Divergence (mrad)	< 2,5
Zahřívací doba (min)	< 5
Provozní teplota (°)	10 ~ 35
Napájení (V)	AC/DC 12
Modulace	TTL

Tabulka 6 Technické specifikace objektivu

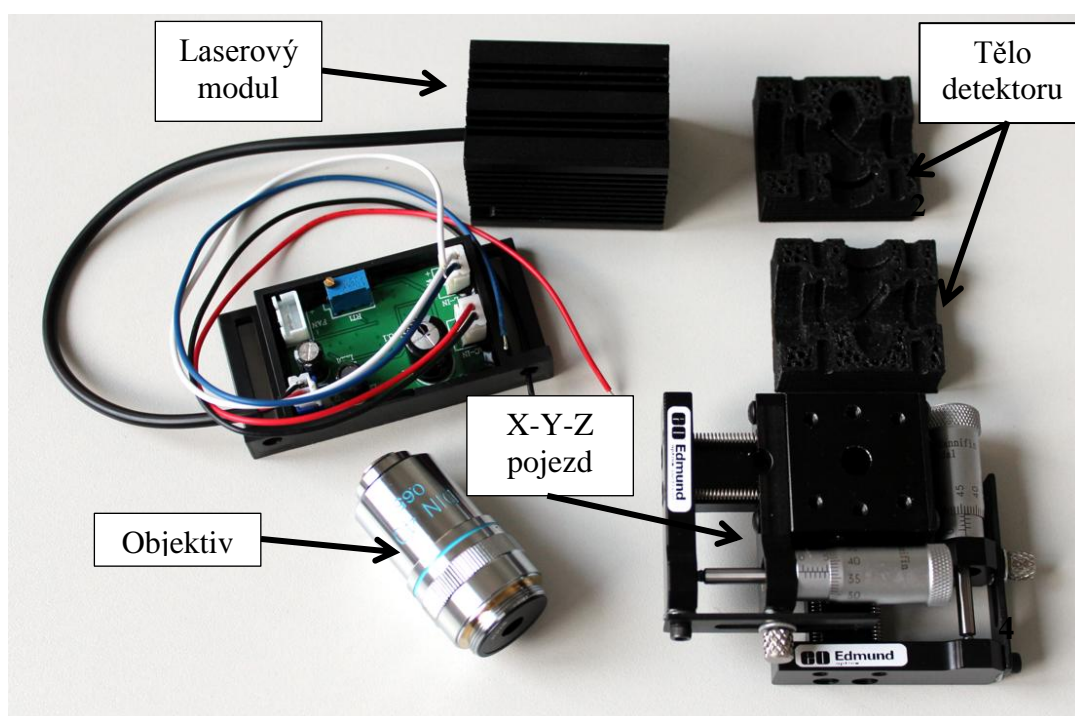
Efektivní ohnisková vzdálenost (mm)	4,35
Zvětšení	40x
Pracovní vzdálenost (mm)	0,6
Zorné pole (mm)	0,45
Typ	Achromatický
Délka (mm)	48,8
Průměr (mm)	24



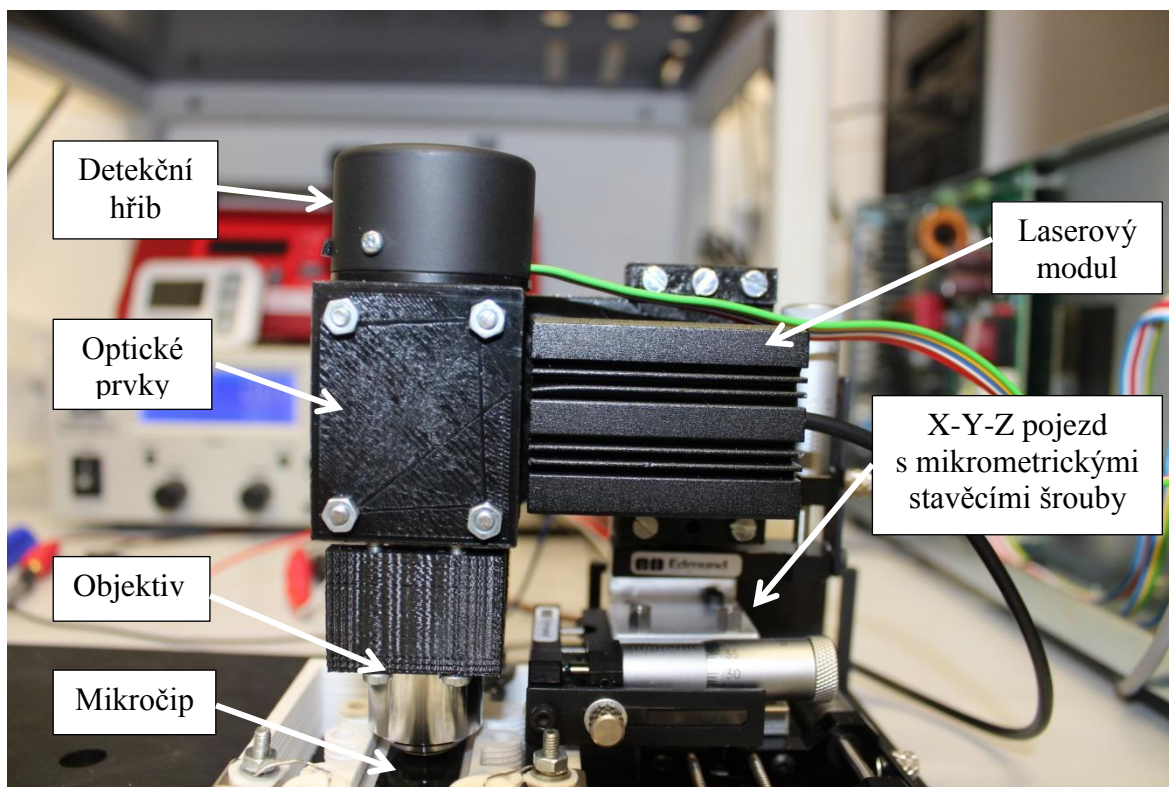
Obrázek 29 Schéma fluorescenčního detektoru, převzato z [17]



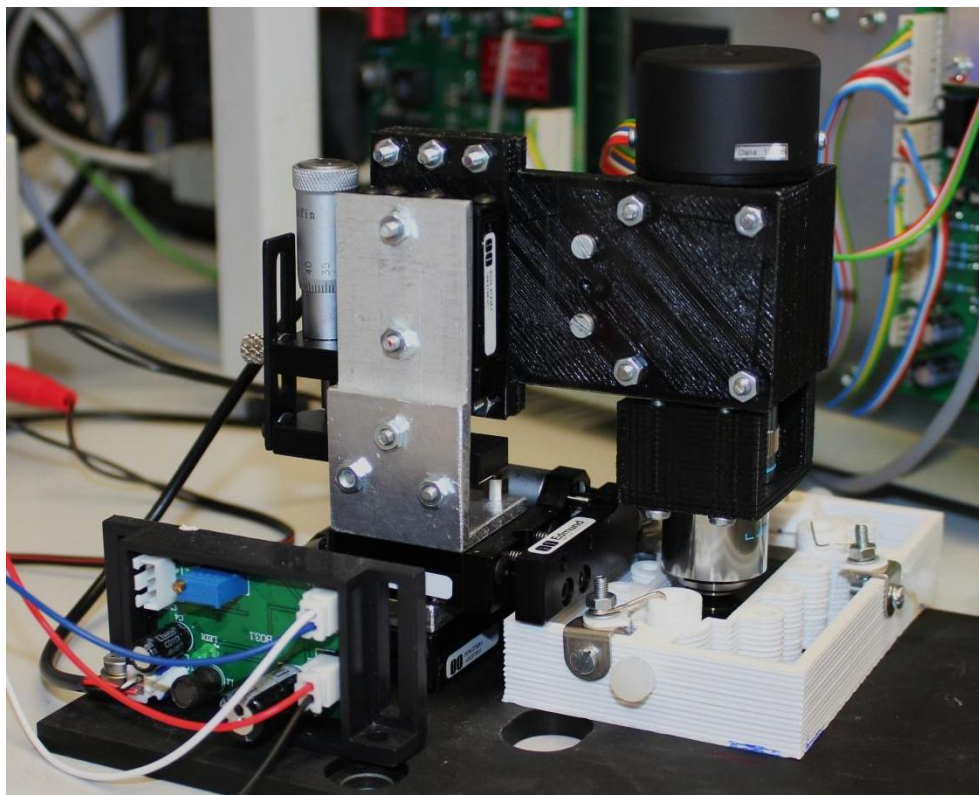
Obrázek 30 Návrh těla detektoru. (A) samotné tělo detektoru pro uchycení optických filtrů a excitačního zdroje. (B) úchyt pro objektiv, převzato z [7]



Obrázek 31 Části fluorescenčního detektoru



Obrázek 32 Reálné uspořádání fluorescenční detekce



Obrázek 33 Reálné uspořádání mikročipové elektroforézy s laserem indukovanou fluorescenční detekcí

2.4 Pracovní postup

2.4.1 Příprava roztoku methylenové modři

Pro charakterizaci a test mikročipového elektroforetického systému byl připraven 50 mM roztok methylenové modři ve vodném roztoku metanolu (1:1, v/v).

2.4.2 Příprava základních elektrolytů

Pro separace ANTS derivátů byl připraven 50 mM fosfátový elektrolyt o pH 2,5. Vypočtené množství $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ bylo naváženo a poté rozpuštěno v redestilované vodě na celkový objem 250 ml. pH bylo pomocí roztoku H_3PO_4 (85%; v/v) upraveno na hodnotu 2,5. Roztok byl před převedením do elektroforetických nádobek filtrován pomocí mikrofiltrů (velikost pórů 0,22 μm).

Pro separace 2-AA, 2-AB, 2-AP derivátů byl připraven 150 mM roztok H_3BO_3 v 50 mM roztoku NaH_2PO_4 o celkovém pH 7,5. Do 100 ml odměrné baňky bylo naváženo požadované množství H_3BO_3 a $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ a doplněno redestilovanou vodou po rysku. pH roztoku bylo upraveno pomocí roztoku NaOH (1 M) na hodnotu 7,5.

2.4.3 Příprava kalibrační řady

Nejprve byly připraveny zásobní roztoky maltózy a maltotriózy o koncentraci 200 mg/l, rozpuštěním požadovaného množství sacharidu v redestilované vodě. Z těchto zásobních roztoků bylo pipetováno požadované množství do skleněných elektroforetických nádobek dle tabulky 7. Nádobky byly vloženy do koncentrátoru, kde bylo odpařeno rozpouštědlo odfoukáváním dusíkem při teplotě 40 °C.

Tabulka 7 Pipetované objemy zásobních roztoků sacharidů

$m_{\text{sacharid}} (\mu\text{g})$	$V_{\text{ZR}} (\mu\text{l})$
1	5
1,5	7,5
2,5	12,5
5	25
7,5	37,5
10	50
25	125
50	250
75	375
100	500

2.4.4 Derivatizace

Byly připraveny 24 mM roztoky derivatizačních činidel (ANTS, 2-AB, 2-AP, 2-AA) rozpuštěním požadovaného množství derivatizačního činidla v roztoku kyseliny octové (3:17; voda:kyselina; v/v). Dále byl připraven 30 mM roztok redukčního činidla (kyanoborohydridu sodného) rozpuštěním požadovaného množství v 0,8 M roztoku dimethylsulfoxidu (DMSO).

K odparku sacharidu bylo postupně pipetováno 25 μ l derivatizačního roztoku a 25 μ l roztoku redukčního činidla.

Vzhledem k nerozpustnosti činidla 2-AA v roztoku kyseliny octové, bylo k této směsi pipetováno redukční činidlo v poměru 1:1 (v/v) a výsledný roztok byl pipetován v objemu 50 μ l k odparku sacharidu .

Dále byla připravena směs oligosacharidů (maltóza – hexóza) navážením cca 1 mg od každého sacharidu do mikrozkušavky. K této směsi bylo pipetováno 25 μ l derivatizačního roztoku a 25 μ l roztoku redukčního činidla.

Derivatizace probíhala 20 hodin při teplotě 40 °C. Před dalším použitím byly deriváty uchovávány v lednici při teplotě 4 °C.

2.4.5 Úprava vzorků před elektroforetickou analýzou

Do elektroforetických nádobek bylo pipetováno 15 μ l roztoku derivátu s 15 μ l redestilované vody (ředění 1:1, v/v), promícháno a vloženo do autosampleru.

2.4.6 Charakterizace elektroforetických systémů

Pro separované složky byly vypočteny migrační charakteristiky. Z průměrných migračních časů t_m ze tří analýz byly vypočteny efektivní mobility μ dle rovnice:

$$\mu = \frac{d_d \times d_c}{U} \times \left(\frac{1}{t_m} \times \frac{1}{t_{EOF}} \right) \quad (6)$$

kde d_l je délka separační kapiláry po detektor, d_c je celková délka kapiláry, U je vkládané napětí, t_{EOF} je migrační čas elektroosmotického toku. Člen elektroosmotického toku je možné zanedbat při podmínkách kdy je elektroosmotický tok redukován, tedy při kyselém pH pro ANTS deriváty. Pro deriváty 2-AA, 2-AB, 2-AP tento člen není možné zanedbat. Jako marker elektroosmotického toku byla zvolena thiomčovina o koncentraci 0,05 M a měřena za stejných podmínek jako deriváty.

Pro směs oligosacharidů byla vypočítána účinnost separace:

$$n = 5,54 \times \left(\frac{t_m}{w} \right)^2 \quad (7)$$

kde t_m je migrační čas složky a w je šířka píku v polovině jeho výšky.

Dále byla vypočítána výška teoretického patra podle rovnice:

$$H = \frac{l}{n} \quad (8)$$

kde l je délka separační kapiláry nebo mikročipu.

Z naměřených dat byly sestrojeny kalibrační grafy. Grafy závislosti koncentrace na průměrné výšce píku ze tří měření. Ze směrnice přímek k , byly vypočteny meze detekce dle rovnice:

$$LOD = \frac{3 \times h_n}{k} \quad (9)$$

a mez stanovení dle rovnice:

$$LOQ = \frac{10 \times h_n}{k} \quad (10)$$

kde h_n je výška šumu nulové linie.

3 VÝSLEDKY A DISKUZE

3.1 Separace za pomoci kapilárního systému

Měření probíhalo na elektroforéze Agilent při teplotě 25 °C, křemenná kapilára pokrytá polyamidem, celková délka 60 cm, délka k detekčnímu okénku 52 cm, průměr kapiláry 50 μm , UV detekce. Složení základního elektrolytu, vlnová délka detekce a aplikované napětí viz tabulka 8.

Před měřením byla kapilára proplachována 5 min 0,1 M roztokem NaOH, následně byla proplachována 5 min redestilovanou vodou. Před samotnou analýzou je kapilára 120 s promývána základním elektrolytem. Dávkování probíhá tlakem 25 mbar po dobu 5 s. doba analýzy 12 min.

Tabulka 8 Podmínky pro elektroforetické měření kalibračních řad

Sacharid	Derivát	Základní elektrolyt	Napětí (kV)	λ_{detekce} (nm)
Maltóza Maltotrióza	2-AA	150mM H_3BO_3 ; 20mM NaH_2PO_4 pH = 7,5	+ 20	214
	2-AB	150mM H_3BO_3 ; 20mM NaH_2PO_4 pH = 7,5	+ 20	254
	2-AP	150mM H_3BO_3 ; 20mM NaH_2PO_4 pH = 7,5	+ 20	240
	ANTS	50 mM NaH_2PO_4 pH = 2,5	- 20	214

3.1.1 Elektroosmotický tok

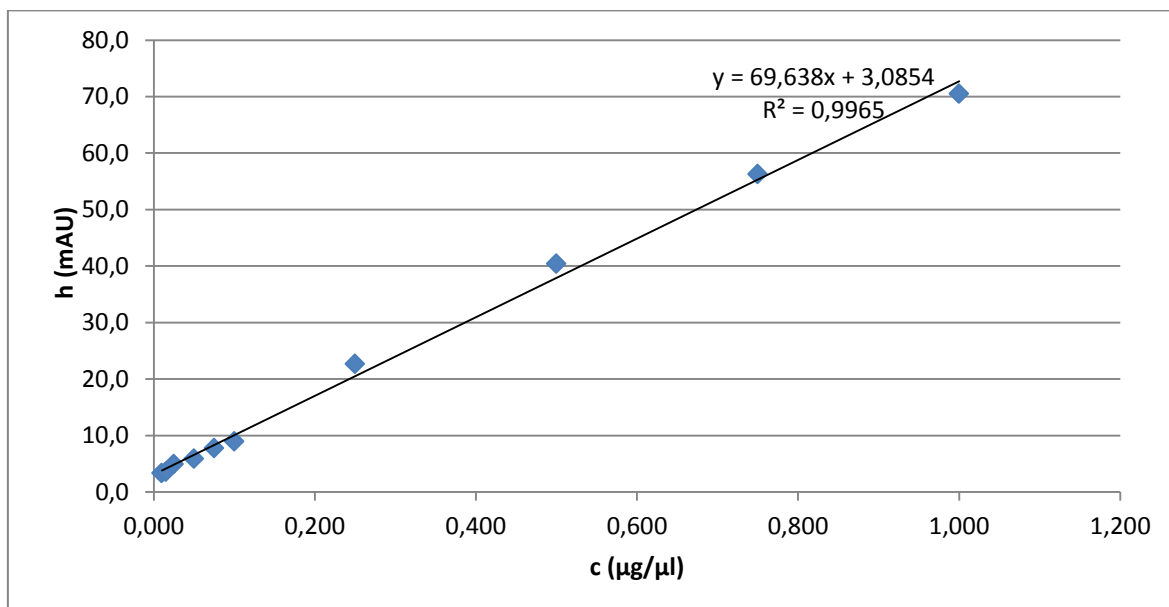
Deriváty 2-AA, 2-AB, 2-AP jsou analyzovány v prostředí mírně zásaditého pufru o pH 7,5. Při této hodnotě pH není možné zanedbat příspěvek elektroosmotického toku. Migrační charakteristiky EOF byly proměřeny za pomoci thiomochoviny a jsou uvedeny v tabulce 9.

Tabulka 9 Migrační charakteristiky pro thiomochovinu

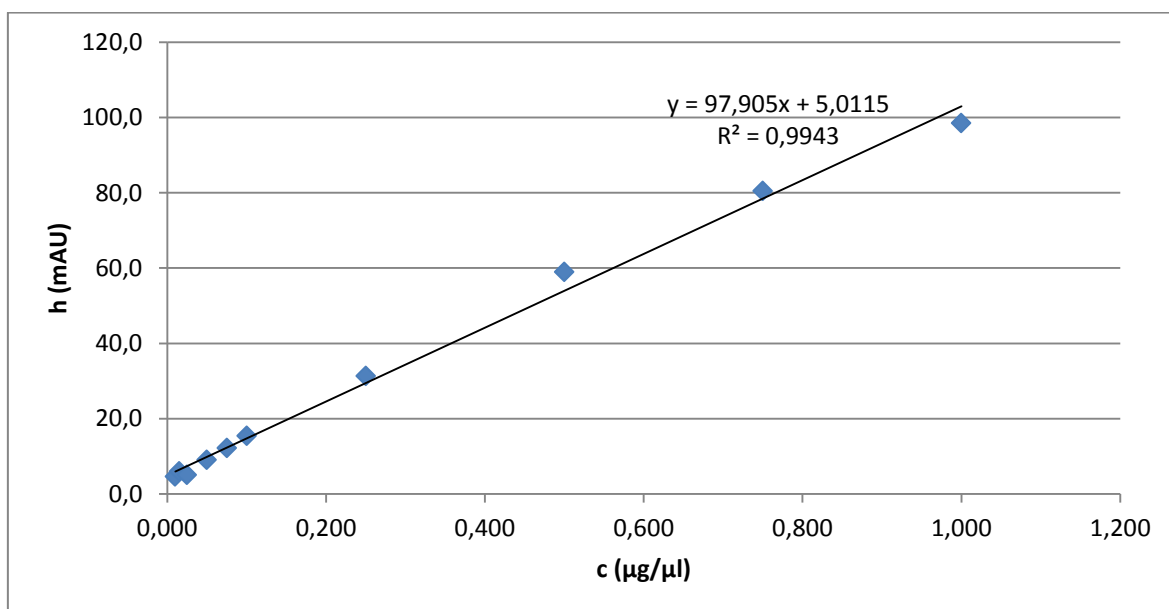
Analyt	t_m (min)	σt_m (min)	μ ($\text{m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$)
Thiomochovina	6,243	6,292	4,132E-08
	6,256		
	6,343		
	6,331		
	6,286		

3.1.2 Kalibrační grafy derivátů maltózy a maltotriózy

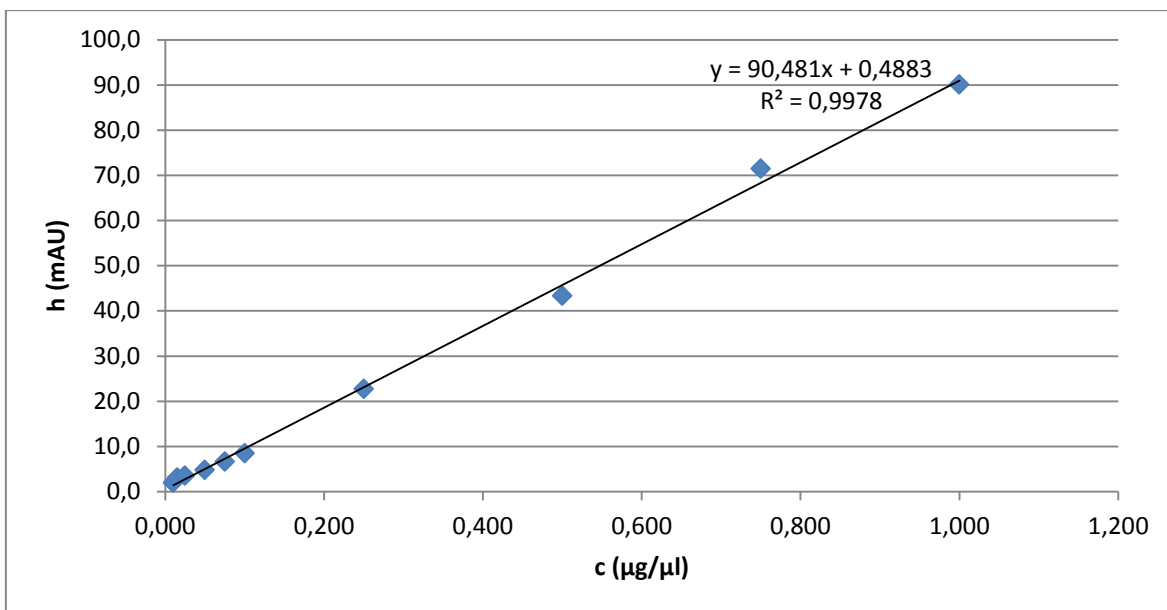
Z naměřených dat (příloha A – H) byly vytvořeny kalibrační grafy (obrázky 34 – 41), grafy závislosti výšky píku analytu na hmotnostní koncentraci derivatizovaného sacharidu.



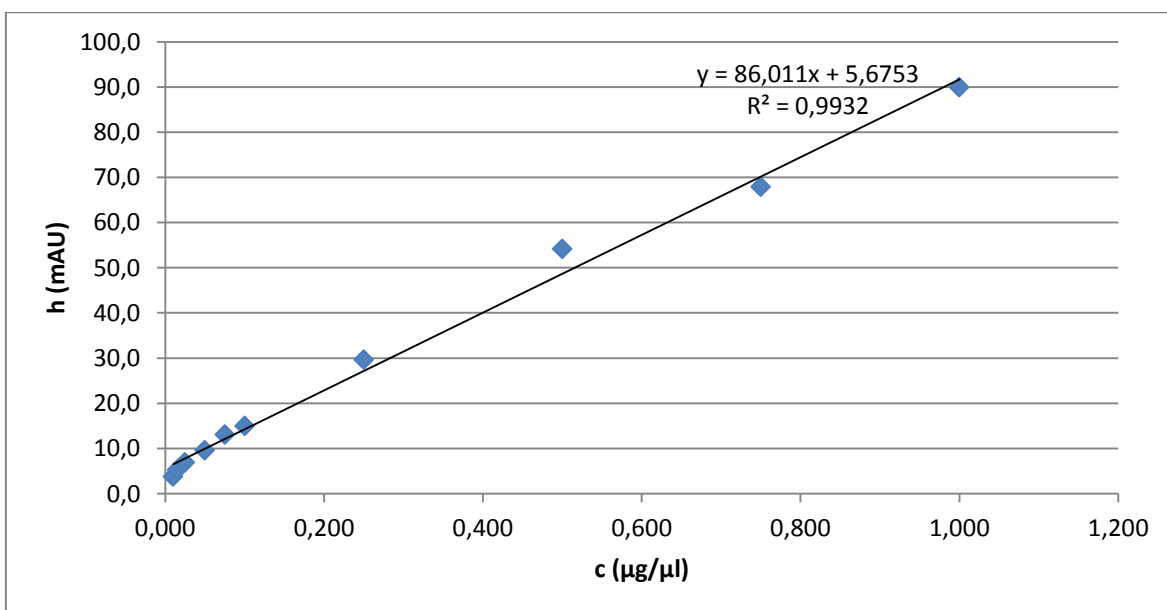
Obrázek 34 Kalibrační graf pro 2-AA derivát maltózy



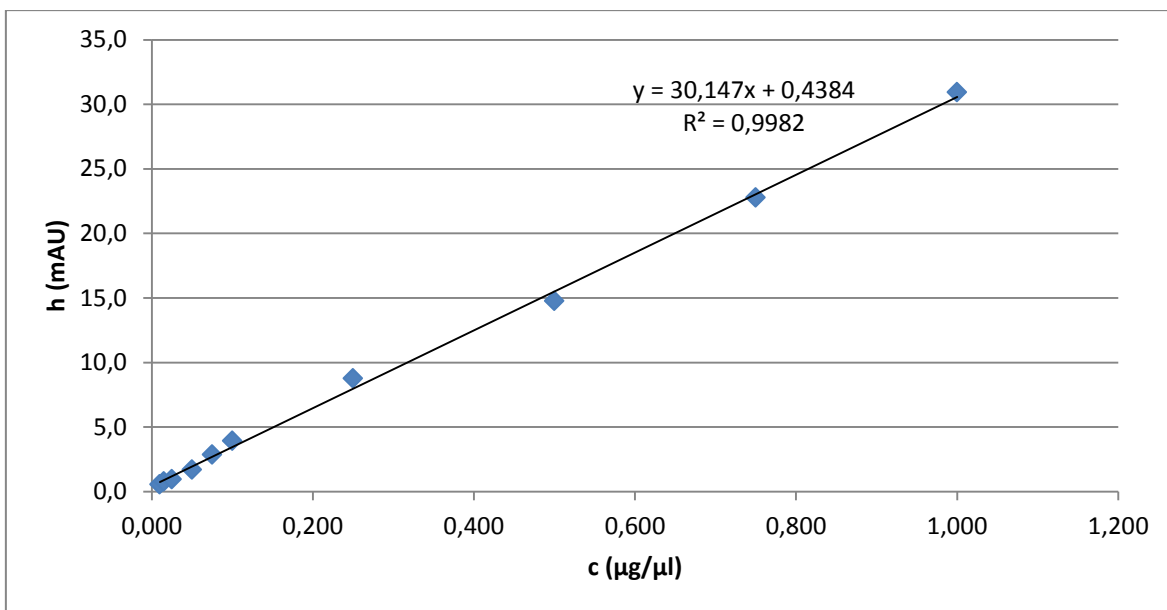
Obrázek 35 Kalibrační graf pro 2-AB derivát maltózy



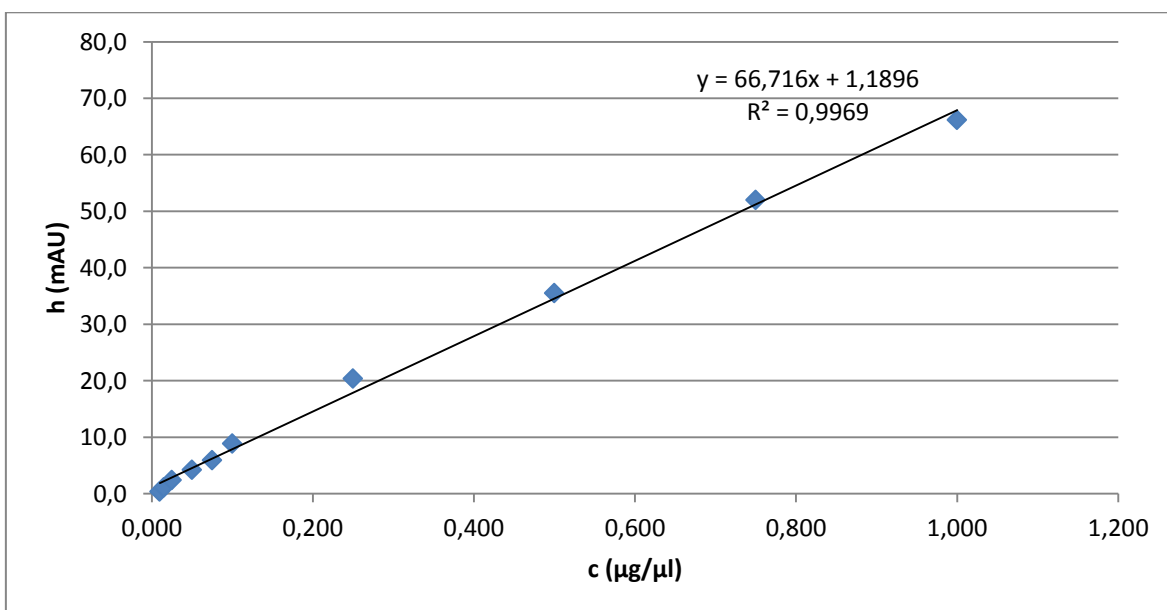
Obrázek 36 Kalibrační graf pro 2-AP derivát maltózy



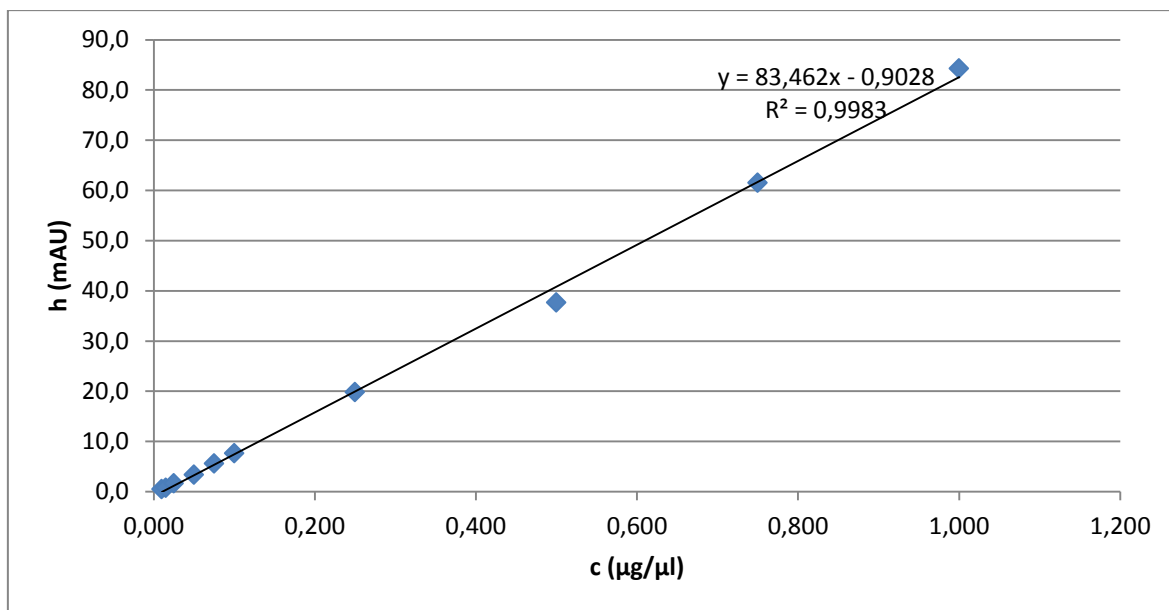
Obrázek 37 Kalibrační graf pro ANTS derivát maltózy



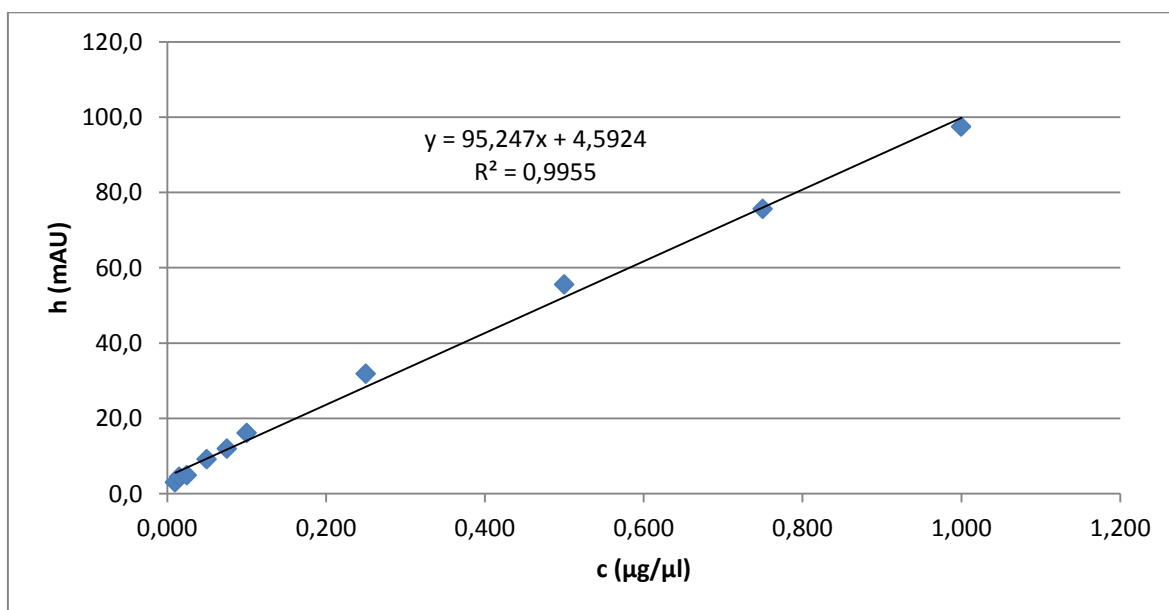
Obrázek 38 Kalibrační graf pro 2-AA derivát maltotriózy



Obrázek 39 Kalibrační graf pro 2-AB derivát maltotriózy



Obrázek 40 Kalibrační graf pro 2-AP derivát maltotriózy



Obrázek 41 Kalibrační graf pro ANTS derivát maltotriózy

3.1.3 Mez detekce, mez stanovitelnosti

Z kalibračních závislostí jednotlivých derivátů maltózy a maltotriózy byly odečteny směrnice přímek pomocí kterých byly vypočítány příslušné meze detekce a meze stanovitelnosti z rovnice 9 a 10 (tabulka 10 a 11). Z experimentálních dat vyplývá, že nejcitlivější metodu poskytuje derivatizace ANTS pro maltotriózu a 2-AB pro maltózu. Meze detekce a stanovení jsou pro všechny typy derivátů relativně srovnatelné.

Výška šumu nulové linie kapilární elektroforézy (h_n) je 0,225 mAU.

Tabulka 10 Meze detekce a meze stanovení pro maltózu

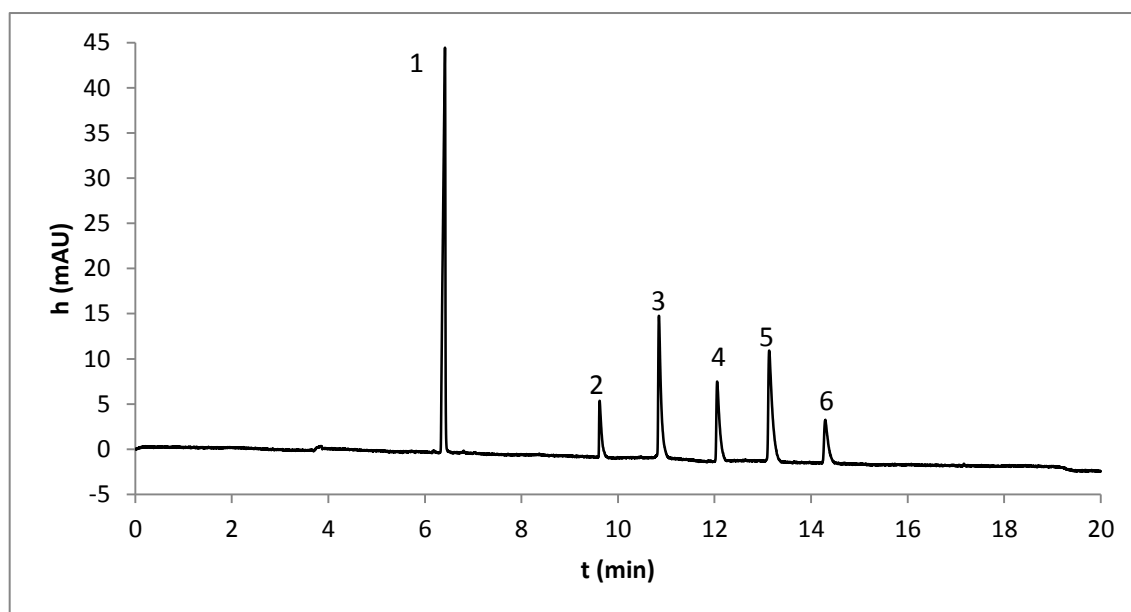
Derivát	Směrnice	Mez detekce ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	Mez stanovení ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
2-AA	69,638	9,69E-03	3,23E-02
2-AB	97,905	6,89E-03	2,30E-02
2-AP	90,481	7,46E-03	2,49E-02
ANTS	86,011	7,85E-03	2,62E-02

Tabulka 11 Meze detekce a meze stanovení pro maltotriózu

Derivát	Směrnice	Mez detekce ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	Mez stanovení ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
2-AA	30,163	2,24E-02	7,46E-02
2-AB	66,716	1,01E-02	3,37E-02
2-AP	83,462	8,09E-03	2,70E-02
ANTS	95,247	7,09E-03	2,36E-02

3.1.4 Separace vybrané směsi oligosacharidů

Pro porovnání separace mezi kapilárním a mikročipovým systémem byla směs separována na kapilární elektroforéze Agilent s UV detekcí (214 nm), výsledný elektroforegram je možné vidět na obrázku 42.



Obrázek 42 Elektroforegram separace směsi derivatizovaných oligosacharidů kapilární elektroforézou, UV detekce (214 nm), 1 – ANTS, 2 – maltóza, 3 – maltotrióza, 4 – maltotetrióza, 5 – maltopentóza, 6- maltohexóza

Pro separovanou směs byly dopočítány migrační charakteristiky jednotlivých složek vzorku (rovnice 6), účinnost separace n (rovnice 7) a výška teoretického patra H (rovnice 8) viz. tabulka 12.

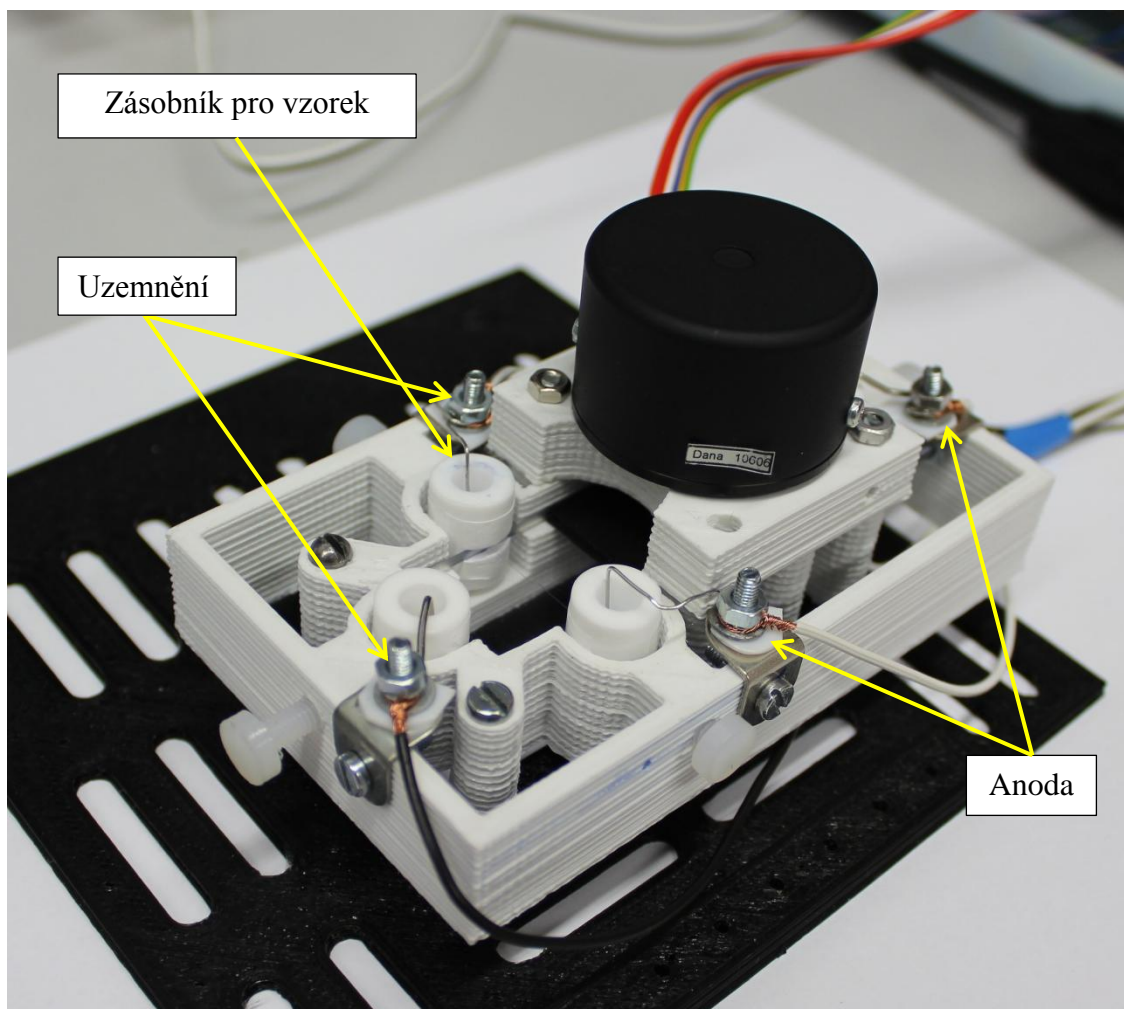
Tabulka 12 Migrační charakteristiky, účinnost a výška teoretického patra pro separaci směsi oligosacharidů na kapilární elektroforéze

Analyt	t_m (min)	σt_m (min)	M ($m^2V^{-1}s^{-1}$)	w (min)	σw (min)	n	H (μm)
ANTS	6,414	6,274	-4,144E-08	0,0455	0,0445	109947	5,5
	6,152			0,0435			
	6,255			0,0446			
Maltotrióza	9,620	9,350	-2,781E-08	0,0482	0,0434	256718	2,3
	9,123			0,0398			
	9,306			0,0423			
Maltotetróza	10,849	10,501	-2,476E-08	0,0574	0,0498	246013	2,4
	10,229			0,0425			
	10,426			0,0496			
Maltopentóza	12,054	11,664	-2,229E-08	0,0666	0,0583	221739	2,7
	11,285			0,0515			
	11,652			0,0568			
Maltohexóza	13,133	12,693	-2,048E-08	0,0781	0,0661	204284	2,9
	12,227			0,0571			
	12,719			0,0631			
Maltoheptóza	14,294	13,662	-1,903E-08	0,0832	0,0754	181884	3,3
	13,193			0,0631			
	13,499			0,0799			
\emptyset	-	-	-	-	-	203431	3,2

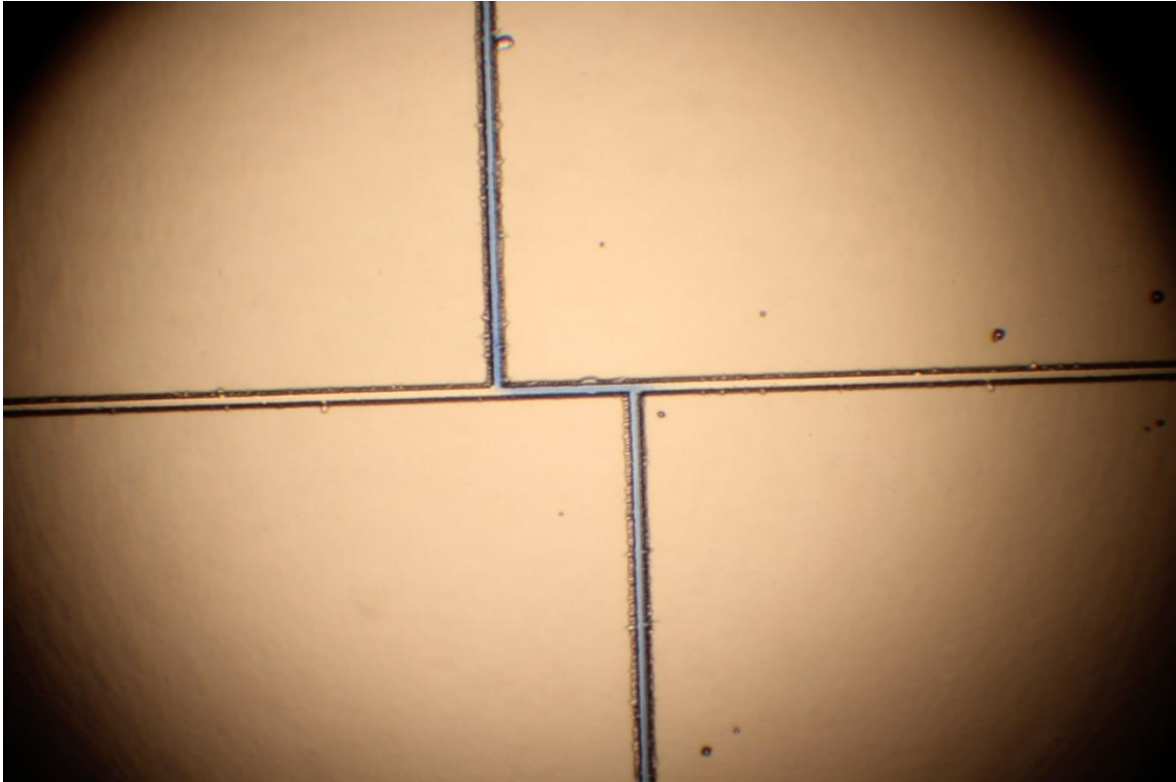
3.2 Separace za pomoci mikročipového systému

3.2.1 Test separačního systému za pomoci methylenové modři

První test separačního systému byl proveden za použití ethanického roztoku methylenové modři jako vzorku. Jako základní elektrolyt byl použit roztok 150 mM kyseliny borité a 50 mM dihydrogenfosforečnanu sodného v pH 7,5. Základní elektrolyt byl volen tak aby se podmínky blížili podmínkám pro separace derivátů. Dávkování bylo provedeno elektrokinetickým nástřikem při aplikovaném stejnosměrném napětí 3 kV po dobu 10 s. Následná separace byla prováděna při vloženém napětí 3 kV. Uspořádání mikročipového elektroforetického systému je možné vidět na obrázku 43.

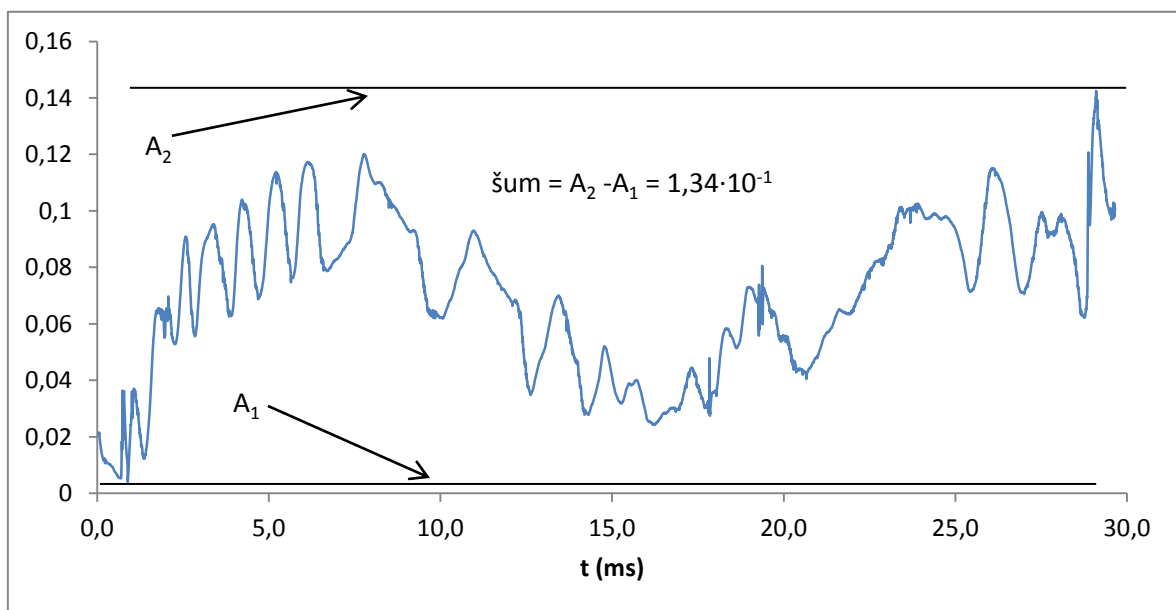


Obrázek 43 Uspořádání separačního systému pro test s methylenovou modří

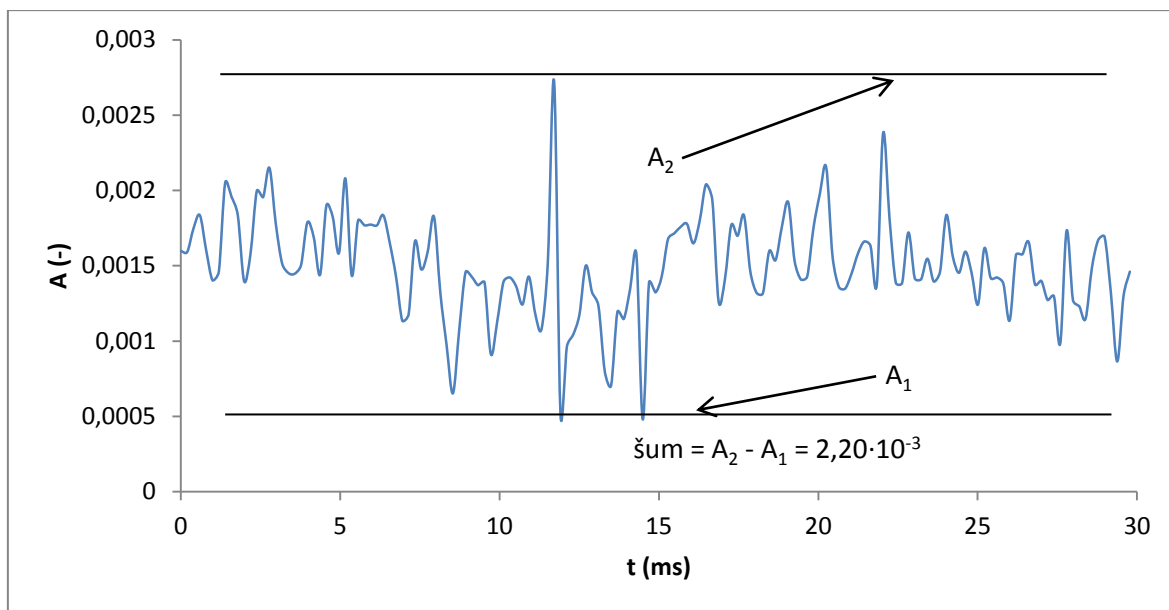


Obrázek 44 Dávkovací kanál pod mikroskopem, zvětšení 10x, dávkování methylenové modři po dobu 10 s při napětí 3 kV

Po spuštění detektoru byla měřena výška šumu nulové linie (obrázek 45), která činila 0,1355, tato hodnota byla nepříjemná a nebylo by možné rozeznat pík analytu od šumu. Proto byla provedena optimalizace elektrických spojů základní desky s detektorem a s počítačem. Po optimalizaci byla výška šumu snížena přibližně o dva řády (obrázek 46).

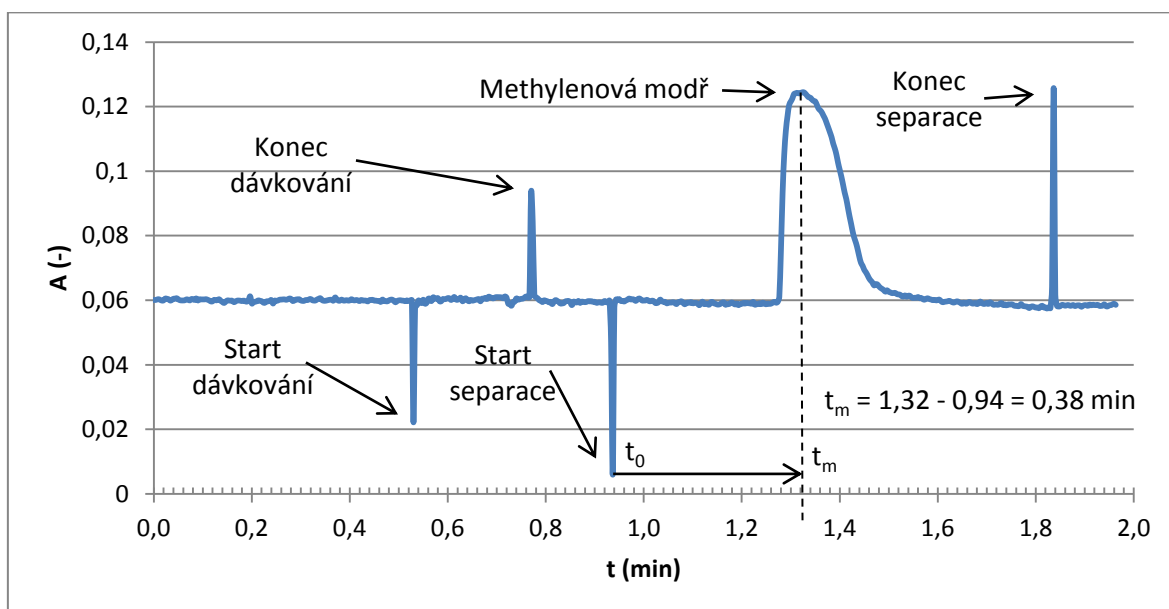


Obrázek 45 Šum nulové linie před optimalizací



Obrázek 46 Šum nulové linie po optimalizaci

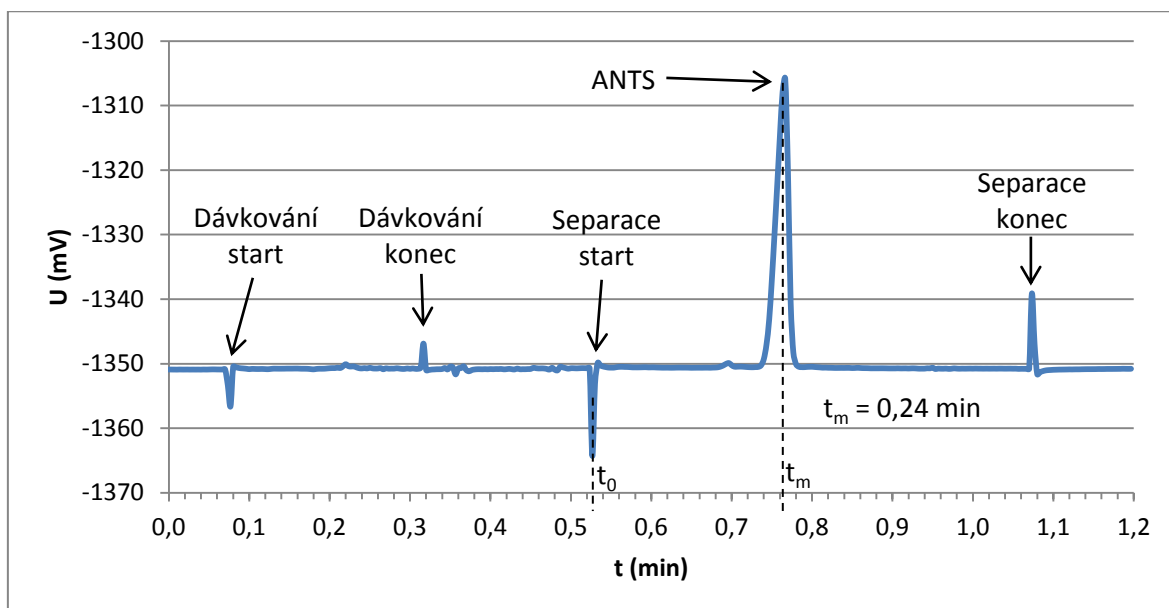
Byla měřena absorbance v závislosti na čase. Při vkládání vysokého napětí vzniká mezi protilehlými elektrodami stejnosměrné elektrické pole, které ovlivňuje detektor. Tato interakce je vidět na výsledném záznamu (obrázek 47), jsou to píky označené jako start a konec separace, start a konec dávkování. Tato interakce je nežádoucí a v budoucnu by mohla mít vliv na vlastnosti detekce, jako je zvýšení výšky šumu a tím snížení citlivosti. Nic méně vlivem této interakce je možné odečíst přesný migrační čas analytu.



Obrázek 47 Elektroforegram pro test separace methylenové modři

3.2.2 Test separačního systému za pomoci ANTS činidla

Po úspěšné detekci methylenové modři byl proveden test pomocí samotného derivatizačního činidla rozpuštěného v základním elektrolytu (fosfátový pufr, pH = 2,5, c = 1 mM). Tento test byl proveden s fluorescenčním detektorem (obrázek 32). Dávkování vzorku probíhalo po dobu 15 s při vloženém napětí 3 kV. Separace byla provedena při vloženém napětí 6 kV. Jak je patrné z elektroforegramu, opět dochází k ovlivňování detektoru elektrostatickým polem.

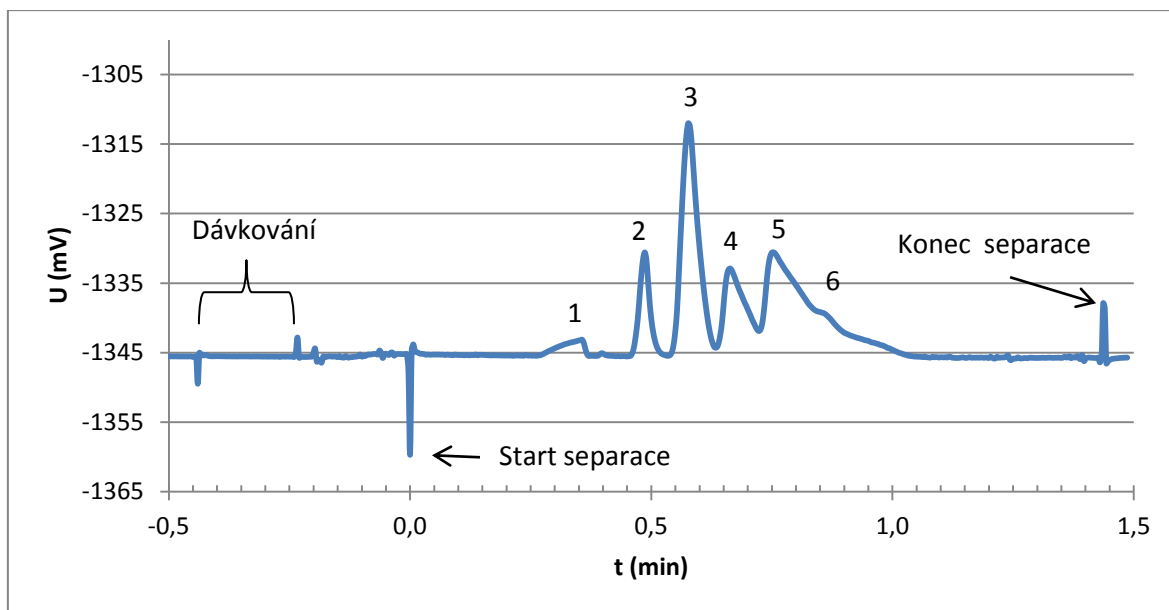


Obrázek 48 Elektroforegram ANTS činidla při testu mikročipového systému

Při stejných podmínkách separace nebylo dosaženo opakovatelných výsledků, výšky a plochy píků se značně lišily, popřípadě pík v elektroforegramu zcela chyběl. Byla snaha postupně ředit koncentraci derivatizačního činidla za účelem stabilizace kvantitativních hodnot, nicméně tento postup byl neúspěšný a při více jak stonásobném ředění nebyl v elektroforegramu pozorován již žádný pík.

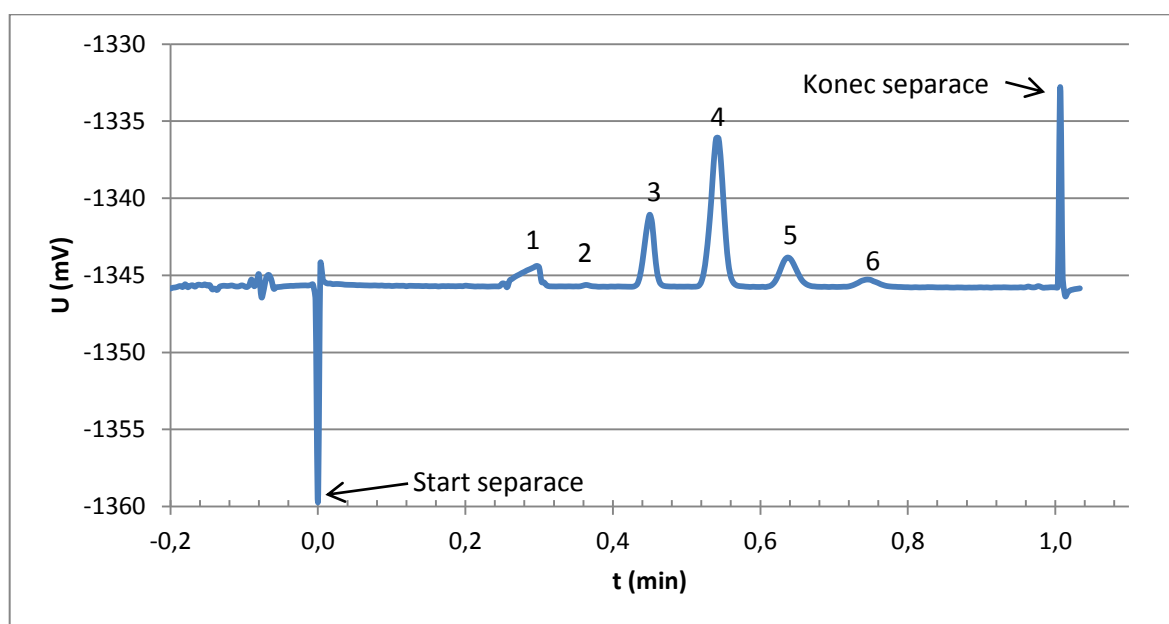
3.2.3 Separace jednoduché směsi derivatizovaných oligosacharidů

Separace byla uskutečněna v 50 mM fosfátovém pufru (pH = 2,5). Dávkování probíhalo elektrokineticky při vloženém napětí 3 kV po dobu 10 sekund. Separace následně probíhala při vkládaném napětí 6 kV. Detekce byla zprostředkována laserem indukovanou fluorescencí, jejíž intenzita byla zaznamenávána jako velikost napětí na detektoru v závislosti na čase. Výsledný záznam je možné vidět na obrázku 49, ze kterého je možné vidět, že nedochází k dokonalé separaci složek analytu.

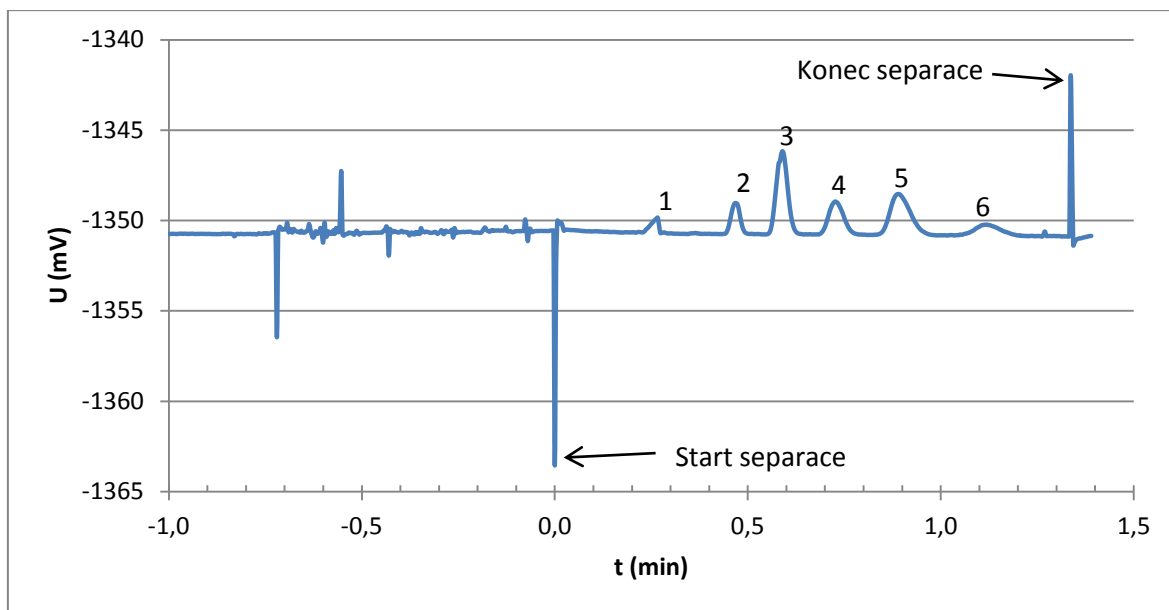


Obrázek 49 Elektroforegram č. 1 mikročipové separace směsi derivatizovaných oligosacharidů, laserem indukovaná fluorescenční detekce, 1 – ANTS, 2 – maltóza, 3 – maltotrióza, 4 – maltotetróza, 5 – maltopentóza, 6- maltohexóza

Separace byla uskutečněna několikrát za sebou za stejných podmínek (doba a velikost napětí při dávkování, velikost napětí při separaci, složení základního elektrolytu). Výsledné záznamy je možné vidět na obrázcích 50 a 51.



Obrázek 50 Elektroforegram č. 2 mikročipové separace směsi derivatizovaných oligosacharidů, laserem indukovaná fluorescenční detekce, 1 – ANTS, 2 – maltóza, 3 – maltotrióza, 4 – maltotetróza, 5 – maltopentóza, 6- maltohexóza



Obrázek 51 Elektroforegram č. 3 mikročipové separace směsi derivatizovaných oligosacharidů, laserem indukovaná fluorescenční detekce, 1 – ANTS, 2 – maltóza, 3 – maltotrióza, 4 – maltotetróza, 5 – maltopentóza, 6- maltohexóza

Z uvedených elektroforegramů je patrné, že nebylo dosaženo stejných výsledků separací za stejných podmínek. Opakovatelnost separací je velmi nízká, není možné ověření, zda dochází k reprezentativnímu dávkování složek analytu. Při více jak sto násobném zředění vzorku již není možné v elektroforegramu pozorovat žádné píky. Nic méně celková doba analýzy je cca 1,5 min.

Pro elektroforegram č. 3 byly dopočítány migrační charakteristiky jednotlivých složek vzorku, účinnost separace n podle rovnice 7 a výška teoretického patra H dle rovnice 8 viz. tabulka č. 13.

Tabulka 13 Migrační charakteristiky, účinnost separace, výška teoretického patra pro elektroforegram č. 3

Látka	t_m (s)	μ ($m^2V^{-1}s^{-1}$)	$w_{0,5}$ (s)	n	H (μm)
ANTS	16,20	-3,344E-08	1,60	567	114,74
Maltóza	28,44	-1,905E-08	1,80	1383	47,00
Maltotrióza	35,64	-1,520E-08	2,20	1451	44,79
Maltotetróza	43,80	-1,237E-08	2,80	1354	48,02
Maltopentóza	53,64	-1,010E-08	3,80	1105	58,82
Maltohexóza	67,44	-8,032E-09	4,40	1303	49,90
\emptyset	-	-	-	1194	60,54

4 ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo porovnání separací a detekčních limitů vybraných derivatizovaných oligosacharidů za pomoci klasické kapilární elektroforézy s UV detekcí a za pomoci mikročipového elektroforetického systému s laserem indukovanou fluorescencí.

Byly připraveny čtyři deriváty (2-AA, 2-AB, 2-AP, ANTS) maltózy a maltotriózy reduktivní aminací. Dále byla připravena směs jednoduchých oligosacharidů (maltóza až maltohexóza), která byla derivatizována pouze ANTS činidlem.

Ty deriváty byly proměřovány na kapilární elektroforéze s UV detekcí. Z naměřených hodnot byly dopočítány migrační charakteristiky a vytvořeny kalibrační grafy. Ze získaných směrníc kalibračních grafů byly vypočítány detekční limity pro jednotlivé deriváty maltózy a maltotriózy. Pro směs ANTS derivátů byly dopočítány migrační charakteristiky jednotlivých složek, účinnost separace a výška teoretického patra.

Mikročipový elektroforetický systém s laserem indukovanou fluorescencí byl vytvořen technologií 3D tisku se separačním borosilikátovým mikročipem. Tento systém byl nejprve úspěšně testován za pomoci roztoku methylenové modři, kdy bylo dávkováno barvivo při vloženém napětí 3 kV a následné migraci při napětí 3 kV. Pohybující se zóna byla detekována měřením absorbance. Dále byl tento systém testován pomocí ANTS činidla rozpuštěného ve fosfátovém pufru ($c = 1 \text{ mM}$). Dávkování probíhalo při vloženém napětí 3 kV a následná migrace při napětí 6 kV. Migrující analyt byl detekován za pomoci fluorescence.

Dalším krokem byla snaha proměřit závislost intenzity fluorescence na koncentraci derivatizačního činidla ANTS. Tento krok byl neúspěšný, nepodařilo se získat kalibrační závislost. Jako hlavní důvod se jeví velmi vysoká koncentrace derivatizačního činidla, při které intenzita fluorescence není přímo úměrná koncentraci. Při snižování koncentrace činidla ($<0,01 \text{ mM}$) je intenzita fluorescence natolik nízká, že není zaznamenána fotodiodou na detektoru, bylo by nutné použít detektor s větší citlivostí, který nebyl k dispozici.

Následně byla na tomto mikročipovém elektroforetickém systému provedena separace jednoduché směsi ANTS derivátů. Dávkování bylo při vloženém napětí 3 kV a následná separace při vloženém napětí 6 kV. Stejně jako při testu s čistým derivatizačním činidlem nebylo dosaženo reprodukovatelných výsledků, vlivem vysoké koncentrace složek. Při

nižší koncentraci již nebylo možné v záznamu pozorovat žádné píky, kvůli nízké citlivosti fotodiody na detektoru.

Nicméně i přes tyto problémy byla separace na mikročipovém separačním systému vytvořeného za pomoci 3D tisku úspěšná, látky bylo možné dělit a detekovat. Celková doba analýzy byla zkrácena na 1,5 minuty za výrazně nižšího vkládaného separačního napětí. Dosažená účinnost separace je nižší než pro kapilární systém. Výška teoretického patra je v porovnání s kapilárním systémem cca 20x vyšší. Tento rozdíl je pravděpodobně způsoben vysokou koncentrací látek detekovaných pomocí fluorescenčního detektoru. Pokud by bylo možné detekovat intenzitu fluorescence pro koncentrace o několik řádů nižší, výsledkem by byly užší, dobře separované píky a tím i vyšší účinnost.

I přes uvedená úskalí prokazuje testovaný mikročipový systém vhodnou alternativu pro komerční kapilární elektroforézu.

5 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] ČEGAN, A. and KORECKÁ L. Biochemie pro bakalářské studium chemie a technické chemie. Univerzita Pardubice, fakulta chemicko–technologická, 2008
- [2] AUROUX, P.-A., et al., Micro total analysis systems. 2. Analytical standard operations and applications. Analytical chemistry, 2002. 74(12): p. 2637-2652
- [3] DOLNÍK, V., Capillary gel electrophoresis. Journal of Microcolumn Separations, 1994. 6(4): p. 315-330
- [4] PUMERA, M., Microchip-based electrochromatography: designs and applications. Talanta, 2005. 66(4): p. 1048-1062
- [5] KASIČKA, V., Teoretické základy a separační principy kapilárních elektromigračních metod. Chem. Listy, 1997. 91: p. 320-329
- [6] GROSSMAN, P.D. and J.C. COLBURN, Capillary electrophoresis: Theory and practice. 2012: Academic Press
- [7] HEINZ, M., Instrumentální aspekty elektroforetické separace v mikročipovém formátu, Bakalářská práce, Univerzita Pardubice, 2015
- [8] PAZOUREK, J., Moderní elektroforetické analytické metody. 2003, Brno
- [10] JORGENSON, J.W. and K. LUKACS, Capillary zone electrophoresis. Science (Washington, DC);(United States), 1983. 222(4621)
- [11] SCHMITT, P., et al., Capillary isoelectric focusing (CIEF) for the characterization of humic substances. Water Research, 1997. 31(8): p. 2037-2049
- [12] RODRIGUEZ-DIAZ, R., T. Wehr, and M. Zhu, Capillary isoelectric focusing. Electrophoresis, 1997. 18(12-13): p. 2134-2144
- [13] DITTMANN, M.M. and G.P. ROZING, Capillary electrochromatography—a high-efficiency micro-separation technique. Journal of Chromatography A, 1996. 744(1): p. 63-74
- [14] JANDERA, P. and T. ČERNOHORSKÝ, Atomová a molekulová spektroskopie se zaměřením na stopovou analýzu kontaminantů. Díl B–Molekulová spektroskopie v organické analýze, skriptum, Univerzita Pardubice, 2006
- [15] TŮMA, P., F. OPEKAR, and I. JELÍNEK, Vodivostní vláknový detektor pro kapilární elektroforézu. Chem. listy, 1999. 93: p. 533-535
- [16] ZEMANN, Andreas J. Conductivity detection in capillary electrophoresis. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2001, 20.6: 346-354

- [17] PRIKRYL, J. and F. FORET, Fluorescence Detector for Capillary Separations Fabricated by 3D Printing. *Analytical chemistry*, 2014. 86(24): p. 11951-11956
- [18] DOLNÍK, V. and S. LIU, Applications of capillary electrophoresis on microchip. *Journal of separation science*, 2005. 28(15): p. 1994-2009
- [19] REYES, D.R., et al., Micro total analysis systems. 1. Introduction, theory, and technology. *Analytical chemistry*, 2002. 74(12): p. 2623-2636
- [20] LANDERS, J.P., *Handbook of capillary and microchip electrophoresis and associated microtechniques*. 2007: CRC press
- [21] LEGENDRE, L.A., J.P. FERRANCE, and J.P. LANDERS, *Microfluidic Devices for Electrophoretic Separations: Fabrication and Use. Handbook of Capillary and Microchip Electrophoresis and Associated Microtechniques*, 2007: p. 335-355
- [22] YANG, T., et al., Fabrication of phospholipid bilayer-coated microchannels for on-chip immunoassays. *Analytical Chemistry*, 2001. 73(2): p. 165-169
- [23] GUSCHIN, D.Y., et al., Oligonucleotide microchips as genosensors for determinative and environmental studies in microbiology. *Applied and environmental microbiology*, 1997. 63(6): p. 2397-2402
- [24] LIU, Y., et al., Electrophoretic separation of proteins on a microchip with noncovalent, postcolumn labeling. *Analytical chemistry*, 2000. 72(19): p. 4608-4613
- [25] BREADMORE, M.C., et al., Microchip-based purification of DNA from biological samples. *Analytical chemistry*, 2003. 75(8): p. 1880-1886
- [26] SMEJKAL, P. and F. FORET, *Mikrofluidika v bioanalytické instrumentaci. Chemické listy*, 2012. 106: p. 104-112
- [27] DANG, F., et al., Ultrafast analysis of oligosaccharides on microchip with light-emitting diode confocal fluorescence detection. *Electrophoresis*, 2003. 24(4): p. 714-721
- [28] ALI, I., H.Y. ABOUL-ENEIN, and V.K. GRUPTA, *Nanochromatography and nanocapillary electrophoresis: pharmaceutical and environmental analyses*. 2009: John Wiley & Sons
- [29] ŠŇUPÁREK, J., *Makromolekulární chemie: úvod do chemie a technologie polymerů*. 2009: Univerzita Pardubice
- [30] IONESCU, R.E., R.S. MARKS, and L.A. GHEBER, Nanolithography using protease etching of protein surfaces. *Nano Letters*, 2003. 3(12): p. 1639-1642
- [31] SOANE, D.S. and Z.M. SOANE, *Electrophoresis and photolithography*. 1998, Google Patents.

- [32] HUANG, Z., et al., A method for UV-bonding in the fabrication of glass electrophoretic microchips. *Electrophoresis*, 2001. 22(18): p. 3924-3929
- [33] XIA, Y. and G.M. WHITESIDES, Soft lithography. *Annual review of materials science*, 1998. 28(1): p. 153-184
- [34] JACOBSON, S.C., A.W. MOORE, and J.M. Ramsey, Fused quartz substrates for microchip electrophoresis. *Analytical Chemistry*, 1995. 67(13): p. 2059-2063
- [35] JACOBSON, S.C. and J.M. RAMSEY, Microchip electrophoresis with sample stacking. *Electrophoresis*, 1995. 16(1): p. 481-486
- [36] MCENERY, M., et al., Liquid chromatography on-chip: progression towards a μ -total analysis system Presented at the SAC 99 Meeting Dublin, Ireland, July 25–30, 1999. *Analyst*, 2000. 125(1): p. 25-27
- [37] SCHLUND, M., et al., Continuous sampling and analysis by on-chip liquid/solid chromatography. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2007. 123(2): p. 1133-1141
- [38] HULVEY, M.K., C.N. FRANKENFELD, and S.M. LUNTE, Separation and detection of peroxyxynitrite using microchip electrophoresis with amperometric detection. *Analytical chemistry*, 2010. 82(5): p. 1608-1611
- [39] WEERAPANA, E. and B. IMPERIALI, Asparagine-linked protein glycosylation: from eukaryotic to prokaryotic systems. *Glycobiology*, 2006. 16(6): p. 91R-101R
- [40] HARVEY, D.J., Derivatization of carbohydrates for analysis by chromatography; electrophoresis and mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 2011. 879(17): p. 1196-1225
- [41] DE LA MATA, A.P. and J.J. HARYNUK, Limits of detection and quantification in comprehensive multidimensional separations. 1. a theoretical look. *Analytical chemistry*, 2012. 84(15): p. 6646-6653
- [42] LAGANE, B., M. TREILHOU, and F. COUDERC, Capillary electrophoresis: theory, teaching approach and separation of oligosaccharides using indirect UV detection. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 2000. 28(5): p. 251-255
- [43] PFAFF, P., F. WEIDE, and R. KUHN, Investigation of derivatization of oligosaccharides by means of reductive amination for separation in capillary electrophoresis. *Chromatographia*, 1999. 49(11-12): p. 666-670
- [44] KANPP, D.R., *Handbook of analytical derivatization reactions*. 1979: John Wiley & Sons

- [45] KLOCKOW, A., et al., Capillary electrophoresis of ANTS labelled oligosaccharide ladders and complex carbohydrates. *Fresenius' journal of analytical chemistry*, 1994. 350(7-9): p. 415-425
- [46] HONDA, S., et al., Simultaneous determination of reducing monosaccharides by capillary zone electrophoresis as the borate complexes of N-2-pyridylglycamines. *Analytical biochemistry*, 1989. 176(1): p. 72-77
- [47] HONDA, S., et al., Capillary zone electrophoresis of reducing mono- and oligosaccharides as the borate complexes of their 3-methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one derivatives. *Carbohydrate research*, 1991. 215(1): p. 193-198
- [48] MECHREFF, Y. and Z. EL RASSI, Capillary zone electrophoresis of derivatized acidic monosaccharides. *Electrophoresis*, 1994. 15(1): p. 627-634
- [49] ZIDKOVA, J. and J. CHMELIK, Electrophoresis of carbohydrates. *Feedback*, 1997. 91
- [50] HASE, S., Precolumn derivatization for chromatographic and electrophoretic analyses of carbohydrates. *Journal of Chromatography A*, 1996. 720(1-2): p. 173-182
- [51] NEVILLE, D.C., et al., Analysis of fluorescently labeled glycosphingolipid-derived oligosaccharides following ceramide glycanase digestion and anthranilic acid labeling. *Analytical biochemistry*, 2004. 331(2): p. 275-282
- [52] ANUMULA, K.R. and S.T. DHUME, High resolution and high sensitivity methods for oligosaccharide mapping and characterization by normal phase high performance liquid chromatography following derivatization with highly fluorescent anthranilic acid. *Glycobiology*, 1998. 8(7): p. 685-694
- [53] SATO, K., et al., Determination of monosaccharides derivatized with 2-aminobenzoic acid by capillary electrophoresis. *Analytical biochemistry*, 1997. 251(1): p. 119-121
- [54] BIGGE, J., et al., Nonselective and efficient fluorescent labeling of glycans using 2-amino benzamide and anthranilic acid. *Analytical biochemistry*, 1995. 230(2): p. 229-238
- [55] TRAN, N.T., et al., Investigation of micelles and anionic cyclodextrins as pseudostationary phases for the capillary electrophoresis separation of oligosaccharides derivatized with 2-aminobenzamide. *Electrophoresis*, 1998. 19(15): p. 2630-2638
- [56] RUSTIGHI, I., et al., Analysis of N-acetylaminosugars by CE: A comparative derivatization study. *Electrophoresis*, 2009. 30(15): p. 2632-2639
- [57] CHIESA, C. and C. HORVÁT, Capillary zone electrophoresis of malto-oligosaccharides derivatized with 8-aminonaphthalene-1, 3, 6-trisulfonic acid. *Journal of Chromatography A*, 1993. 645(2): p. 337-352

- [58] LARSSON, M., R. SUNDBERG, and S. FOLESTAD, On-line capillary electrophoresis with mass spectrometry detection for the analysis of carbohydrates after derivatization with 8-aminonaphthalene-1, 3, 6-trisulfonic acid. *Journal of Chromatography A*, 2001. 934(1): p. 75-85
- [59] HE, L., et al., Separation of saccharides derivatized with 2-aminobenzoic acid by capillary electrophoresis and their structural consideration by nuclear magnetic resonance. *Analytical biochemistry*, 2003. 314(1): p. 128-134
- [60] SATO, K., et al., Optimization of derivatization with 2-aminobenzoic acid for determination of monosaccharide composition by capillary electrophoresis. *Analytical biochemistry*, 1998. 262(2): p. 195-197

6 PŘÍLOHY

Příloha A <i>Data pro kalibrační graf 2-AA derivátu maltózy</i>	76
Příloha B <i>Data pro kalibrační graf 2-AB derivátu maltózy</i>	77
Příloha C <i>Data pro kalibrační graf 2-AP derivátu maltózy</i>	78
Příloha D <i>Data pro kalibrační graf ANTS derivátu maltózy</i>	79
Příloha E <i>Data pro kalibrační graf 2-AA derivátu maltotriózy</i>	80
Příloha F <i>Data pro kalibrační graf 2-AB derivátu maltotriózy</i>	81
Příloha G <i>Data pro kalibrační graf 2-AP derivátu maltotriózy</i>	82
Příloha H <i>Data pro kalibrační graf ANTS derivátu maltotriózy</i>	83
Příloha I <i>Záznam separace při proměření kalibračního bodu ($c = 0,5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) pro 2-AA derivát maltózy</i>	84
Příloha J <i>Záznam separace při proměření kalibračního bodu ($c = 0,5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) pro 2-AA derivát maltotriózy</i>	84
Příloha K <i>Záznam separace při proměření kalibračního bodu ($c = 0,5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) pro 2-AB derivát maltózy</i>	85
Příloha L <i>Záznam separace při proměření kalibračního bodu ($c = 0,5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) pro 2-AB derivát maltotriózy</i>	85
Příloha M <i>Záznam separace při proměření kalibračního bodu ($c = 0,5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) pro 2-AP derivát maltózy</i>	86
Příloha N <i>Záznam separace při proměření kalibračního bodu ($c = 0,5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) pro 2-AP derivát maltotriózy</i>	86
Příloha O <i>Záznam separace při proměření kalibračního bodu ($c = 0,5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) pro ANTS derivát maltózy</i>	87
Příloha P <i>Záznam separace při proměření kalibračního bodu ($c = 0,5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) pro ANTS derivát maltotriózy</i>	87

Příloha A *Data pro kalibrační graf 2-AA derivátu maltózy*

Podmínky separace: BGE – 150 mM H₃BO₃ + 20 mM NaH₂PO₄; pH = 7,5; křemenná kapilára pokrytá polyamidem (l = 60 cm, l_d = 52 cm, vnitřní průměr = 50 μm); dávkování tlakem 25 mbar po dobu 5 s; napětí +20 kV, UV detekce (214 nm), doba analýzy 12 minut, teplota 25 °C

c (μg/μl)	t_m (min)	øt_m (min)	μ (m²V⁻¹s⁻¹)	h (mAU)	h_ø (mAU)
0,010	9,596	9,592	-1,422E-08	4,0	3,3
	9,639			3,6	
	9,540			2,4	
0,015	9,605	9,643	-1,436E-08	3,2	3,6
	9,637			4,2	
	9,688			3,3	
0,025	9,617	9,669	-1,443E-08	4,5	4,9
	9,674			5,7	
	9,717			4,6	
0,050	9,624	9,621	-1,430E-08	5,7	5,9
	9,629			7,1	
	9,610			4,9	
0,075	9,763	9,682	-1,447E-08	8,2	7,7
	9,672			8,3	
	9,610			6,7	
0,100	9,687	9,691	-1,449E-08	10,5	8,9
	9,678			7,4	
	9,707			8,9	
0,250	9,923	9,885	-1,502E-08	22,8	22,6
	9,731			21,6	
	10,000			23,5	
0,500	9,419	9,595	-1,423E-08	39,8	40,4
	9,937			40,5	
	9,430			40,8	
0,750	9,847	9,716	-1,456E-08	49,6	56,2
	9,823			55,3	
	9,477			63,8	
1,000	9,892	9,759	-1,468E-08	70,9	70,5
	9,480			70,5	
	9,905			70,0	

Příloha B *Data pro kalibrační graf 2-AB derivátu maltózy*

Podmínky separace: BGE – 150 mM H₃BO₃ + 20 mM NaH₂PO₄; pH = 7,5; křemenná kapilára pokrytá polyamidem (l = 60 cm, l_d = 52 cm, vnitřní průměr = 50 μm); dávkování tlakem 25 mbar po dobu 5 s; napětí +20 kV, UV detekce (254 nm), doba analýzy 12 minut, teplota 25 °C

c (μg/μl)	t_m (min)	σt_m (min)	μ (m²V⁻¹s⁻¹)	h (mAU)	h_σ (mAU)
0,010	6,835	6,872	-3,486E-09	4,5	4,7
	6,864			4,8	
	6,916			4,7	
0,015	6,743	6,734	-2,714E-09	7,7	6,0
	6,736			6,2	
	6,724			4,2	
0,025	6,745	6,728	-2,676E-09	4,2	5,1
	6,714			7,0	
	6,724			4,1	
0,050	6,702	6,717	-2,615E-09	9,0	9,1
	6,732			9,5	
	6,717			8,8	
0,075	6,732	6,735	-2,718E-09	10,7	12,2
	6,747			10,8	
	6,726			15,0	
0,100	6,727	6,738	-2,737E-09	15,0	15,5
	6,746			15,1	
	6,742			16,3	
0,250	6,724	6,728	-2,676E-09	32,1	31,3
	6,745			31,3	
	6,714			30,5	
0,500	6,917	6,822	-3,212E-09	59,1	59,0
	6,866			59,7	
	6,684			58,2	
0,750	6,748	6,764	-2,884E-09	79,5	80,5
	6,812			80,5	
	6,732			81,5	
1,000	6,914	6,818	-3,186E-09	97,5	98,5
	6,727			99,3	
	6,812			98,6	

Příloha C *Data pro kalibrační graf 2-AP derivátu maltózy*

Podmínky separace: BGE – 150 mM H₃BO₃ + 20 mM NaH₂PO₄; pH = 7,5; křemenná kapilára pokrytá polyamidem (l = 60 cm, l_d = 52 cm, vnitřní průměr = 50 μm); dávkování tlakem 25 mbar po dobu 5 s; napětí +20 kV, UV detekce (240 nm), doba analýzy 12 minut, teplota 25 °C

c (μg/μl)	t_m (min)	σ_{t_m} (min)	μ (m²V⁻¹s⁻¹)	h (mAU)	h₀ (mAU)
0,010	5,138	5,128	9,380E-09	2,0	1,9
	5,114			1,8	
	5,132			2,0	
0,015	5,139	5,134	9,317E-09	3,1	3,1
	5,130			3,3	
	5,134			2,8	
0,025	5,142	5,135	9,314E-09	3,6	3,5
	5,127			3,5	
	5,135			3,4	
0,050	5,135	5,134	9,320E-09	4,9	4,8
	5,140			4,8	
	5,127			4,7	
0,075	5,131	5,136	9,297E-09	6,8	6,6
	5,132			7,0	
	5,146			6,1	
0,100	5,124	5,135	9,307E-09	8,8	8,5
	5,140			7,8	
	5,142			8,9	
0,250	5,145	5,119	9,469E-09	22,7	22,7
	5,069			23,1	
	5,143			22,3	
0,500	5,147	5,153	9,134E-09	45,5	43,3
	5,141			45,0	
	5,171			39,4	
0,750	5,135	5,159	9,078E-09	71,2	71,5
	5,134			72,3	
	5,207			70,9	
1,000	5,147	5,160	9,065E-09	92,1	90,1
	5,149			91,9	
	5,184			86,2	

Příloha D *Data pro kalibrační graf ANTS derivátu maltózy*

Podmínky separace: BGE – 50 mM NaH₂PO₄; pH = 2,5; křemenná kapilára pokrytá polyamidem (l = 60 cm, l_d = 52 cm, vnitřní průměr = 50 μm); dávkování tlakem 25 mbar po dobu 5 s; napětí -20 kV, UV detekce (214 nm), doba analýzy 12 minut, teplota 25 °C

c (μg/μl)	t_m (min)	σt_m (min)	μ (m²V⁻¹s⁻¹)	h (mAU)	h_σ (mAU)
0,010	9,475	9,122	-2,850E-08	4,1	3,8
	8,990			3,8	
	8,900			3,5	
0,015	8,834	8,752	-2,971E-08	4,8	5,3
	8,727			5,9	
	8,695			5,2	
0,025	8,647	8,601	-3,023E-08	6,7	6,9
	8,607			6,8	
	8,550			7,3	
0,050	8,571	8,548	-3,042E-08	8,6	9,6
	8,548			10,5	
	8,525			9,8	
0,075	8,501	8,479	-3,066E-08	12,7	13,1
	8,484			13,7	
	8,453			12,9	
0,100	8,411	8,381	-3,102E-08	15,4	15,0
	8,439			14,6	
	8,293			14,9	
0,250	8,361	8,392	-3,098E-08	31,5	29,6
	8,416			29,8	
	8,398			27,6	
0,500	8,424	8,411	-3,091E-08	53,2	54,2
	8,421			55,4	
	8,388			53,9	
0,750	9,344	9,662	-2,691E-08	69,0	67,9
	9,826			65,1	
	9,817			69,7	
1,000	9,191	9,387	-2,770E-08	89,5	90,0
	9,630			91,8	
	9,341			88,6	

Příloha E *Data pro kalibrační graf 2-AA derivátu maltotriózy*

Podmínky separace: BGE – 150 mM H₃BO₃ + 20 mM NaH₂PO₄; pH = 7,5; křemenná kapilára pokrytá polyamidem (l = 60 cm, l_d = 52 cm, vnitřní průměr = 50 μm); dávkování tlakem 25 mbar po dobu 5 s; napětí +20 kV, UV detekce (214 nm), doba analýzy 12 minut, teplota 25 °C

c (μg/μl)	t_m (min)	σt_m (min)	μ (m²V⁻¹s⁻¹)	h (mAU)	h_σ (mAU)
0,010	11,282	11,553	-1,882E-08	0,5	0,6
	11,735			0,8	
	11,641			0,4	
0,015	11,715	11,561	-1,883E-08	0,8	0,8
	11,669			0,7	
	11,298			0,9	
0,025	11,278	11,202	-1,811E-08	1,0	1,0
	11,185			0,9	
	11,144			1,0	
0,050	11,009	10,983	-1,765E-08	1,9	1,7
	11,049			1,5	
	10,890			1,7	
0,075	10,940	10,848	-1,736E-08	2,5	2,9
	10,892			3,0	
	10,713			3,1	
0,100	10,785	10,709	-1,704E-08	2,5	3,9
	10,670			3,6	
	10,673			5,7	
0,250	10,599	10,516	-1,660E-08	8,1	8,8
	10,656			9,9	
	10,293			8,3	
0,500	10,704	10,396	-1,631E-08	14,3	14,8
	10,273			15,2	
	10,210			14,8	
0,750	10,210	10,172	-1,576E-08	22,5	22,8
	10,181			22,2	
	10,125			23,6	
1,000	10,150	10,197	-1,583E-08	30,2	30,9
	10,120			24,2	
	10,322			38,4	

Příloha F *Data pro kalibrační graf 2-AB derivátu maltotriózy*

Podmínky separace: BGE – 150 mM H₃BO₃ + 20 mM NaH₂PO₄; pH = 7,5; křemenná kapilára pokrytá polyamidem (l = 60 cm, l_d = 52 cm, vnitřní průměr = 50 μm); dávkování tlakem 25 mbar po dobu 5 s; napětí +20 kV, UV detekce (254 nm), doba analýzy 12 minut, teplota 25 °C

c (μg/μl)	t_m (min)	σt_m (min)	μ (m²V⁻¹s⁻¹)	h (mAU)	h₀ (mAU)
0,010	7,322	7,312	-5,763E-09	0,4	0,4
	7,313			0,3	
	7,300			0,4	
0,015	7,296	7,287	-5,641E-09	1,0	1,1
	7,282			1,7	
	7,282			0,7	
0,025	7,275	7,269	-5,552E-09	2,8	2,4
	7,271			1,8	
	7,260			2,7	
0,050	7,262	7,256	-5,490E-09	3,8	4,2
	7,244			4,8	
	7,262			4,1	
0,075	7,255	7,255	-5,485E-09	5,7	5,9
	7,258			6,2	
	7,252			5,9	
0,100	7,233	7,239	-5,407E-09	9,8	8,9
	7,249			6,5	
	7,236			10,3	
0,250	7,260	7,255	-5,487E-09	20,7	20,4
	7,259			20,6	
	7,247			19,8	
0,500	7,288	7,281	-5,611E-09	34,2	35,5
	7,286			35,8	
	7,268			36,5	
0,750	7,302	7,293	-5,670E-09	48,9	52,0
	7,293			51,2	
	7,283			55,9	
1,000	7,306	7,299	-5,703E-09	67,9	66,2
	7,300			63,5	
	7,292			67,2	

Příloha G *Data pro kalibrační graf 2-AP derivátu maltotriózy*

Podmínky separace: BGE – 150 mM H₃BO₃ + 20 mM NaH₂PO₄; pH = 7,5; křemenná kapilára pokrytá polyamidem (l = 60 cm, l_d = 52 cm, vnitřní průměr = 50 μm); dávkování tlakem 25 mbar po dobu 5 s; napětí +20 kV, UV detekce (240 nm), doba analýzy 12 minut, teplota 25 °C

c (μg/μl)	t_m (min)	σt_m (min)	μ (m²V⁻¹s⁻¹)	h (mAU)	h₀ (mAU)
0,010	5,622	5,603	5,084E-09	0,5	0,5
	5,607			0,4	
	5,579			0,5	
0,015	5,585	5,589	5,200E-09	0,7	0,7
	5,586			0,7	
	5,595			0,8	
0,025	5,592	5,592	5,175E-09	1,6	1,6
	5,589			1,6	
	5,594			1,7	
0,050	5,599	5,590	5,187E-09	3,4	3,3
	5,592			3,3	
	5,580			3,3	
0,075	5,578	5,586	5,225E-09	5,7	5,6
	5,589			5,3	
	5,590			5,7	
0,100	5,586	5,581	5,262E-09	7,8	7,6
	5,580			7,6	
	5,578			7,5	
0,250	5,590	5,588	5,203E-09	19,6	19,8
	5,593			19,9	
	5,582			19,9	
0,500	5,591	5,591	5,178E-09	33,0	37,7
	5,588			41,3	
	5,595			38,7	
0,750	5,594	5,589	5,200E-09	60,5	61,5
	5,586			62,7	
	5,586			61,3	
1,000	5,646	6,211	5,389E-10	84,4	84,3
	5,998			84,2	
	6,989			84,2	

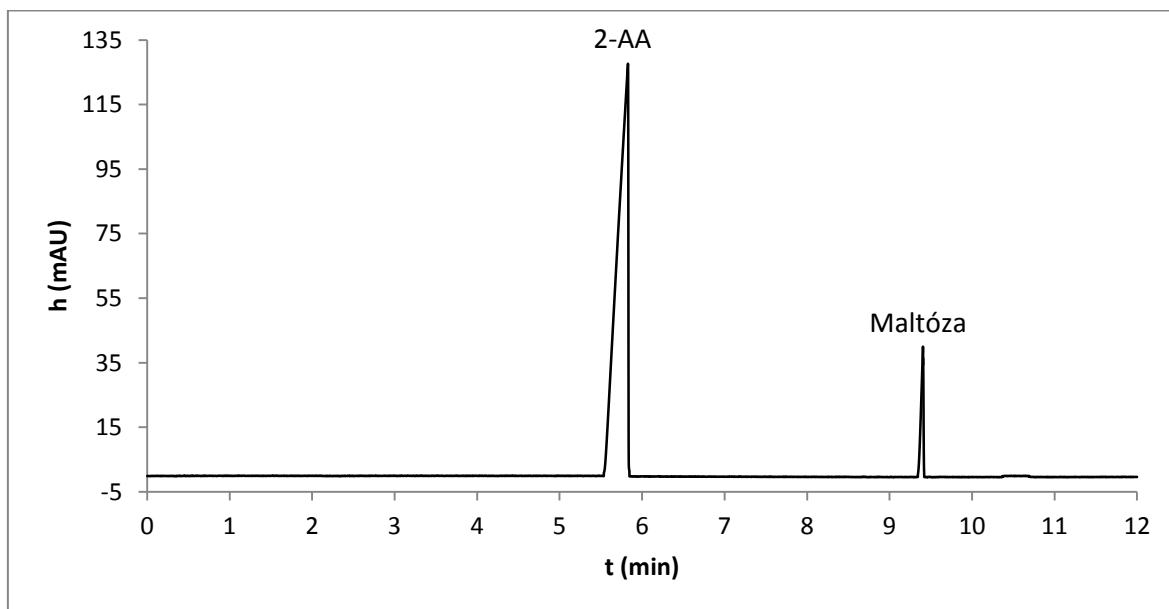
Příloha H *Data pro kalibrační graf ANTS derivátu maltotriózy*

Podmínky separace: BGE – 50 mM NaH₂PO₄; pH = 2,5; křemenná kapilára pokrytá polyamidem (l = 60 cm, l_d = 52 cm, vnitřní průměr = 50 μm); dávkování tlakem 25 mbar po dobu 5 s; napětí -20 kV, UV detekce (214 nm), doba analýzy 12 minut, teplota 25 °C

c (μg/μl)	t_m (min)	σt_m (min)	μ (m²V⁻¹s⁻¹)	h (mAU)	h_σ (mAU)
0,010	11,545	11,722	-2,218E-08	3,0	3,0
	11,937			3,2	
	11,685			2,9	
0,015	11,456	11,201	-2,321E-08	3,9	4,5
	11,189			5,0	
	10,959			4,5	
0,025	11,050	10,965	-2,371E-08	4,6	4,9
	10,970			5,2	
	10,874			5,0	
0,050	10,789	10,609	-2,451E-08	8,9	9,2
	10,415			9,4	
	10,624			9,2	
0,075	10,581	10,581	-2,457E-08	12,4	12,0
	10,560			11,8	
	10,601			11,7	
0,100	10,480	10,436	-2,491E-08	16,3	16,1
	10,433			15,6	
	10,394			16,5	
0,250	10,392	10,378	-2,505E-08	30,5	31,8
	10,396			32,1	
	10,347			32,9	
0,500	10,381	10,330	-2,517E-08	54,9	55,6
	10,302			56,3	
	10,307			55,6	
0,750	10,437	10,458	-2,486E-08	76,6	75,6
	10,476			75,8	
	10,462			74,4	
1,000	9,995	9,996	-2,601E-08	98,9	97,5
	10,029			95,6	
	9,965			98,0	

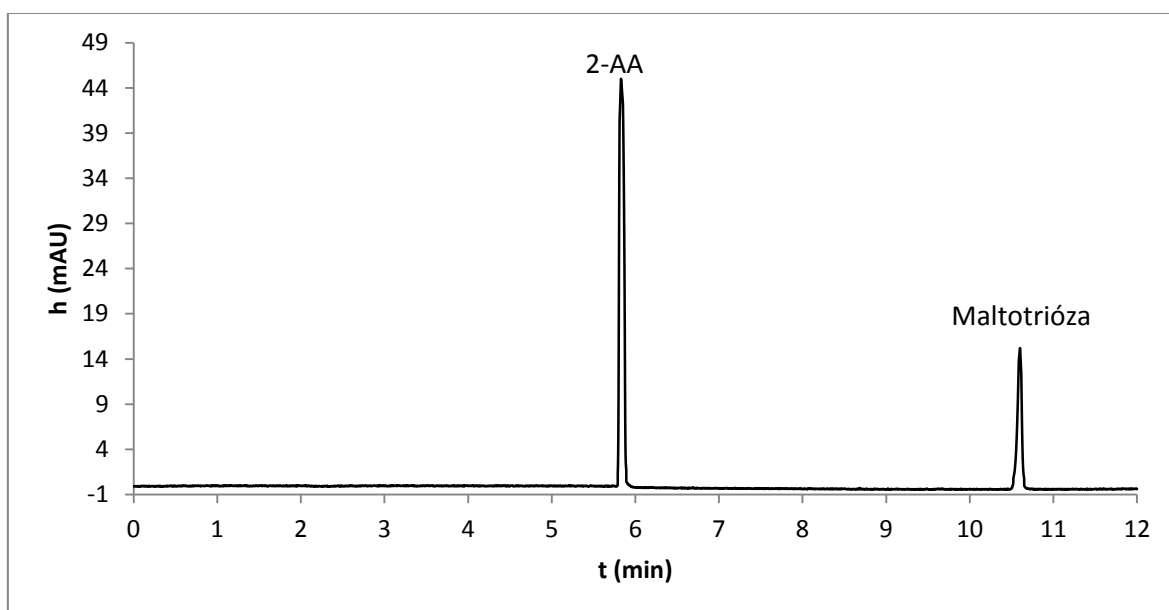
Příloha I Záznam separace při proměření kalibračního bodu ($c = 0,5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) pro 2-AA derivát maltózy

Podmínky separace: BGE – 150 mM H_3BO_3 + 20 mM NaH_2PO_4 ; pH = 7,5; křemenná kapilára pokrytá polyamidem ($l = 60$ cm, $l_d = 52$ cm, vnitřní průměr = 50 μm); dávkování tlakem 25 mbar po dobu 5 s; napětí +20 kV, UV detekce (214 nm), doba analýzy 12 minut, teplota 25 °C



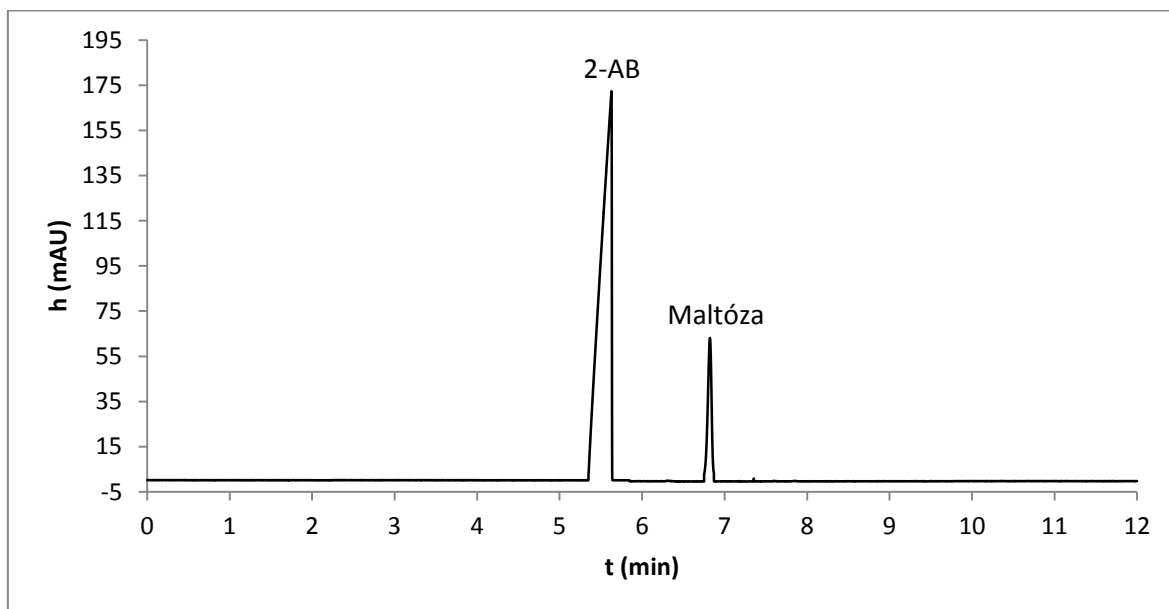
Příloha J Záznam separace při proměření kalibračního bodu ($c = 0,5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) pro 2-AA derivát maltotriózy

Podmínky separace: BGE – 150 mM H_3BO_3 + 20 mM NaH_2PO_4 ; pH = 7,5; křemenná kapilára pokrytá polyamidem ($l = 60$ cm, $l_d = 52$ cm, vnitřní průměr = 50 μm); dávkování tlakem 25 mbar po dobu 5 s; napětí +20 kV, UV detekce (214 nm), doba analýzy 12 minut, teplota 25 °C



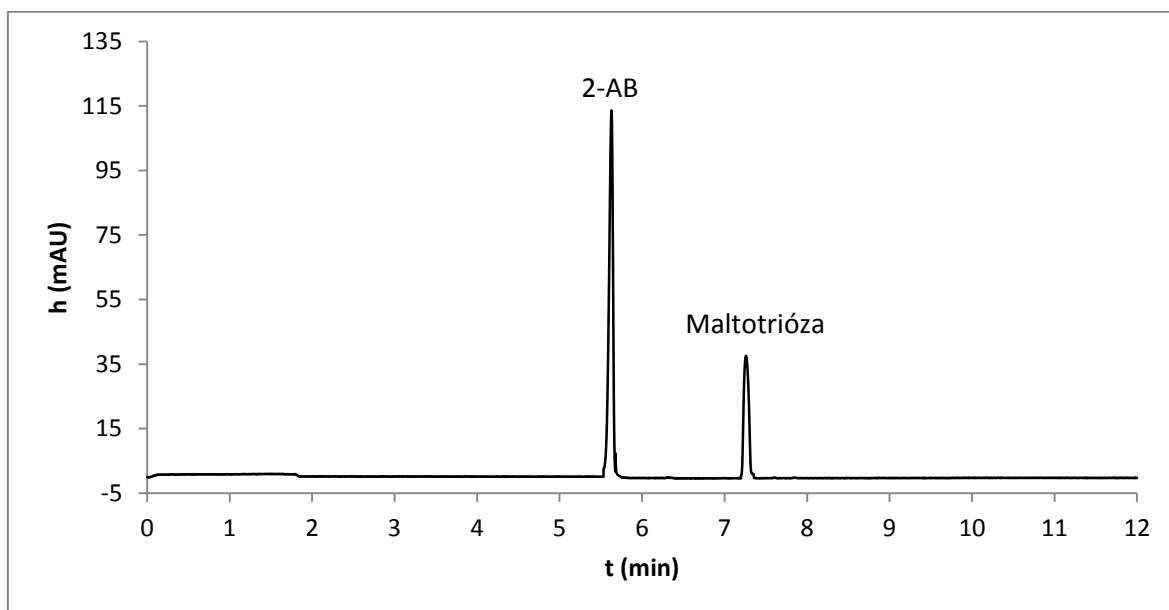
Příloha K Záznam separace při proměření kalibračního bodu ($c = 0,5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) pro 2-AB derivát maltózy

Podmínky separace: BGE – 150 mM H_3BO_3 + 20 mM NaH_2PO_4 ; pH = 7,5; křemenná kapilára pokrytá polyamidem ($l = 60$ cm, $l_d = 52$ cm, vnitřní průměr = 50 μm); dávkování tlakem 25 mbar po dobu 5 s; napětí +20 kV, UV detekce (254 nm), doba analýzy 12 minut, teplota 25 °C



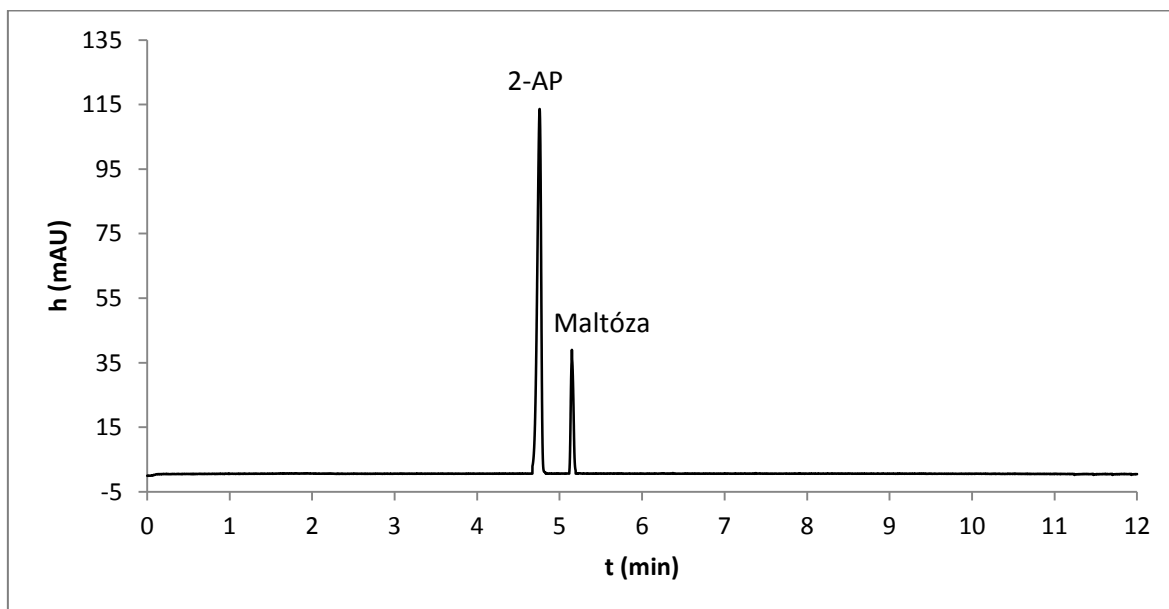
Příloha L Záznam separace při proměření kalibračního bodu ($c = 0,5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) pro 2-AB derivát maltotriózy

Podmínky separace: BGE – 150 mM H_3BO_3 + 20 mM NaH_2PO_4 ; pH = 7,5; křemenná kapilára pokrytá polyamidem ($l = 60$ cm, $l_d = 52$ cm, vnitřní průměr = 50 μm); dávkování tlakem 25 mbar po dobu 5 s; napětí +20 kV, UV detekce (254 nm), doba analýzy 12 minut, teplota 25 °C



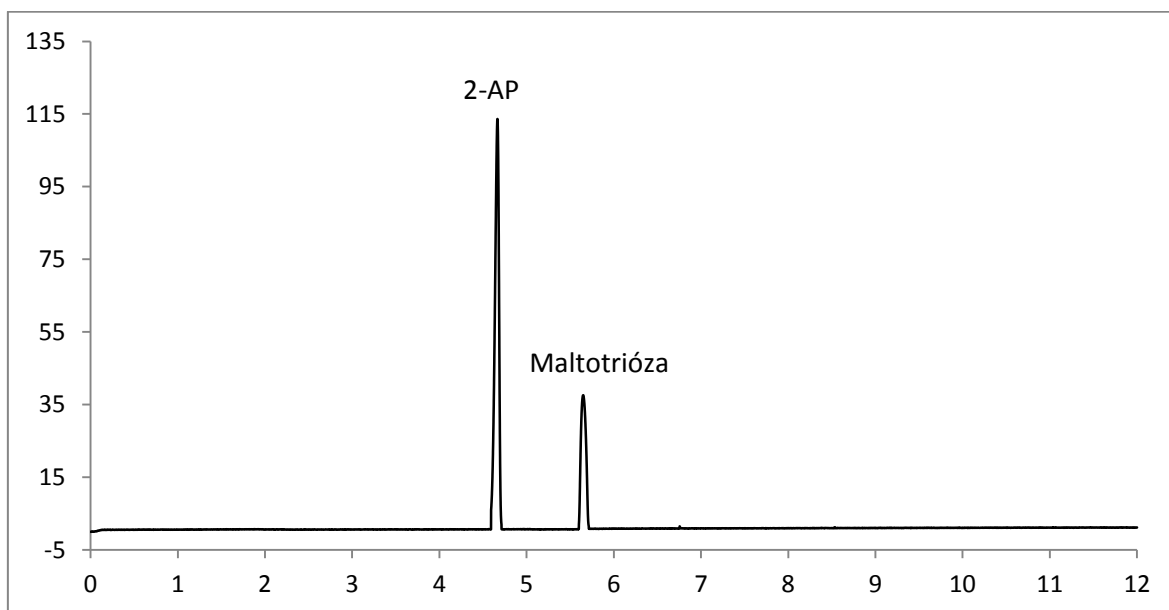
Příloha M *Záznam separace při proměření kalibračního bodu ($c = 0,5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) pro 2-AP derivát maltózy*

Podmínky separace: BGE – 150 mM H_3BO_3 + 20 mM NaH_2PO_4 ; pH = 7,5; křemenná kapilára pokrytá polyamidem ($l = 60$ cm, $l_d = 52$ cm, vnitřní průměr = 50 μm); dávkování tlakem 25 mbar po dobu 5 s; napětí +20 kV, UV detekce (240 nm), doba analýzy 12 minut, teplota 25 °C



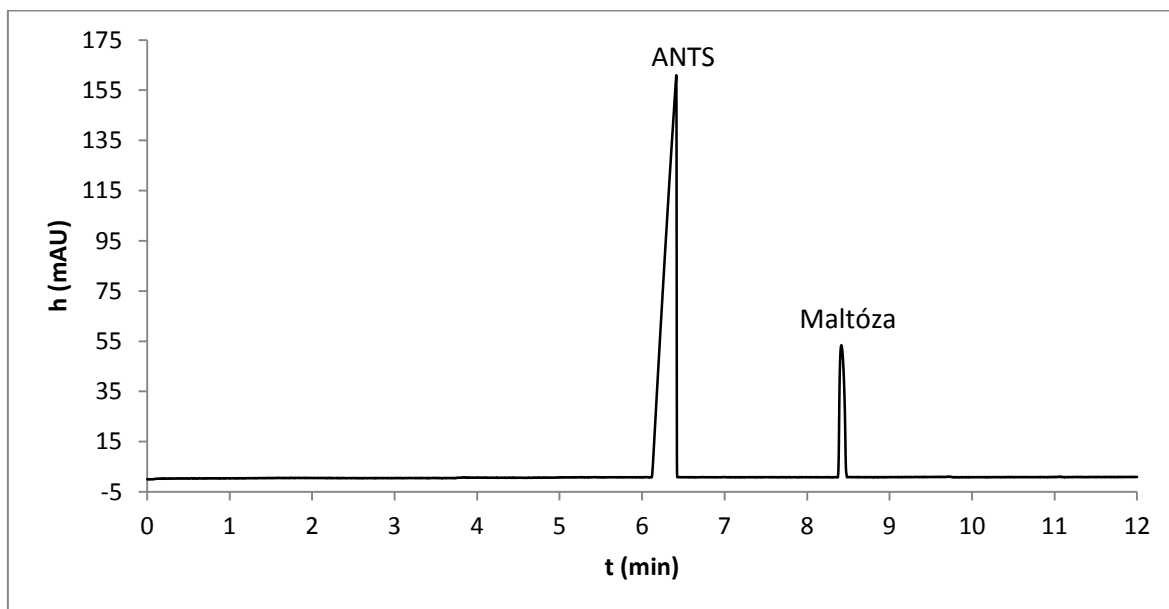
Příloha N *Záznam separace při proměření kalibračního bodu ($c = 0,5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) pro 2-AP derivát maltotriózy*

Podmínky separace: BGE – 150 mM H_3BO_3 + 20 mM NaH_2PO_4 ; pH = 7,5; křemenná kapilára pokrytá polyamidem ($l = 60$ cm, $l_d = 52$ cm, vnitřní průměr = 50 μm); dávkování tlakem 25 mbar po dobu 5 s; napětí +20 kV, UV detekce (240 nm), doba analýzy 12 minut, teplota 25 °C



Příloha O *Záznam separace při proměření kalibračního bodu ($c = 0,5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) pro ANTS derivát maltózy*

Podmínky separace: BGE – 50 mM NaH_2PO_4 ; pH = 2,5; křemenná kapilára pokrytá polyamidem ($l = 60$ cm, $l_d = 52$ cm, vnitřní průměr = 50 μm); dávkování tlakem 25 mbar po dobu 5 s; napětí -20 kV, UV detekce (214 nm), doba analýzy 12 minut, teplota 25 °C



Příloha P *Záznam separace při proměření kalibračního bodu ($c = 0,5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) pro ANTS derivát maltotriózy*

Podmínky separace: BGE – 50 mM NaH_2PO_4 ; pH = 2,5; křemenná kapilára pokrytá polyamidem ($l = 60$ cm, $l_d = 52$ cm, vnitřní průměr = 50 μm); dávkování tlakem 25 mbar po dobu 5 s; napětí -20 kV, UV detekce (214 nm), doba analýzy 12 minut, teplota 25 °C

