

UNIVERZITA PARDUBICE

FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

DIPLOMOVÁ PRÁCE

2025

Bc. Jakub Mavrev

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Porovnání interface pro spojení kapilární elektroforézy s hmotnostní
spektrometrií v analýze derivatizovaných oligosacharidů
Diplomová práce

University of Pardubice
Faculty of Chemical Technology

Comparison of the interface for coupling capillary electrophoresis
with mass spectrometry in the analysis of derivatized oligosaccharides
Master Thesis

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2024/2025

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Jakub Mavrev**
Osobní číslo: **C23254**
Studijní program: **N0531A130028 Analytická chemie**
Téma práce: **Porovnání interface pro spojení kapilární elektroforézy s hmotnostní spektrometrií v analýze derivatizovaných oligosacharidů**
Téma práce anglicky: **Comparison of the interface for coupling capillary electrophoresis with mass spectrometry in the analysis of derivatized oligosaccharides**
Zadávací katedra: **Katedra analytické chemie**

Zásady pro vypracování

- V teoretické části diplomové práce podejte přiměřený úvod do problematiky kapilární elektroforézy a spojení s hmotnostní spektrometrií, dále popište problematiku analýz oligosacharidů a používané derivatizační postupy.
- Připravte deriváty vybraných oligosacharidů. Experimentálně ověřte možnosti separace připravených derivátů pomocí kapilární zónové elektroforézy. Realizujte separace také pomocí spojení s hmotnostní spektrometrií a porovnejte přínosy použití různých typů interface pro realizaci uvedeného on-line spojení.
- Získaná experimentální data kriticky zhodnoťte a diskutujte.

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

Seznam doporučené literatury:
Podle pokynů vedoucího práce.

Vedoucí diplomové práce: **doc. Ing. Petr Česla, Ph.D.**
Katedra analytické chemie
Konzultant diplomové práce: **Mgr. Jana Lavická, Ph.D.**
Ústav analytické chemie AV ČR, Brno
Datum zadání diplomové práce: **7. února 2025**
Termín odevzdání diplomové práce: **9. května 2025**

prof. Ing. Petr Němec, Ph.D. v.r.
děkan

L.S.

doc. Ing. Petr Česla, Ph.D. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2025

Prohlašuji:

Práci s názvem Porovnání interface pro spojení kapilární elektroforézy s hmotnostní spektrometrií v analýze derivatizovaných oligosacharidů 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., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

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

V Pardubicích dne 9. 5. 2025

Bc. Jakub Mavrev

PODĚKOVÁNÍ

Touto cestou bych chtěl poděkovat doc. Ing. Petru Česlovi, Ph.D., vedoucímu mé diplomové práce, za jeho klidný a přátelský přístup, a především za cenné rady a čas, který mi věnoval jak při zpracování této práce, tak při řešení experimentální části. Rád bych poděkoval Mgr. Janě Lavické, Ph.D. a Ing. Denise Smolkové, které mi na Ústavu analytické chemie AV ČR pomáhaly při řešení této práce. Velké poděkování směřuje mé přítelkyni Háně, která mě dokázala povzbudit, když se vše zdálo být beznadějně.

ANOTACE

Tato diplomová práce si klade za cíl seznámit čtenáře s možnostmi on-line spojení kapilární elektroforézy a hmotnostní spektrometrie. V teoretické části jsou také diskutovány derivatizační postupy pro analýzu oligosacharidů. Experimentálně byly měřeny elektromigrační charakteristiky vybrané maltózové řady značené ANTS pomocí kapilární zónové elektroforézy. Na základě výsledků byly vybrány optimální podmínky pro CE-MS analýzu. On-line spojení CE-MS bylo realizováno pomocí laboratorně sestaveného nanoCEasy a komerčně dostupného elektrospreje s trojitou trubicí. Obě spojení byla porovnána podle jejich vlivu na separaci derivatizovaného maltózového žebříčku.

KLÍČOVÁ SLOVA

kapilární elektroforéza, hmotnostní spektrometrie, oligosacharidy, interface, nanoCEasy, elektrosprej s trojitou trubicí

TITLE

Comparison of the interface for coupling capillary electrophoresis with mass spectrometry in the analysis of derivatized oligosaccharides

ANNOTATION

This master thesis is designed to assist the reader in acquiring the basic information about the on-line coupling of capillary electrophoresis with mass spectrometry. Suitable methods for the preparation of labelled oligosaccharides are also presented. Electrophoretic characteristics of selected malto-oligosaccharides labelled with ANTS were analysed by capillary zone electrophoresis, and optimal conditions for CE-MS setup were identified. Based on separations of labelled malto-oligosaccharide ladder, the performance of the in-house built nanoCEasy interface and the commercially available triple tube sprayer interface was evaluated.

KEYWORDS

capillary electrophoresis, mass spectrometry, oligosaccharides, interface, nanoCEasy, triple tube sprayer

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

| | |
|-------|--|
| ANTS | 8-aminonaftalen-1,3,6-trisulfonová kyselina |
| CE | kapilární elektroforéza (<i>capillary electrophoresis</i>) |
| CE-MS | spojení kapilární elektroforézy s hmotnostní spektrometrií |
| CZE | kapilární zónová elektroforéza (<i>capillary zone electrophoresis</i>) |
| DMSO | dimethylsulfoxid |
| EIE | extrahovaný iontový elektroforeogram |
| EOF | elektroosmotický tok (<i>electroosmotic flow</i>) |
| ESI | elektrosprejová ionizace |
| GC | plynová chromatografie (<i>gas chromatography</i>) |
| GU | glukózová jednotka (<i>glucose unit</i>) |
| IPA | isopropylalkohol |
| LC | kapalinová chromatografie (<i>liquid chromatography</i>) |
| LIF | laserem indukovaná fluorescence |
| LOD | mez detekce (<i>limit of detection</i>) |
| LOQ | mez stanovitelnosti (<i>limit of quantification</i>) |
| M | maltóza |
| M3 | maltotrióza |
| M4 | maltotetraóza |
| M5 | maltopentóza |
| M6 | maltohexóza |
| M7 | maltoheptóza |
| MS | hmotnostní spektrometrie (<i>mass spectrometry</i>) |
| RSD | relativní směrodatná odchylka (<i>relative standard deviation</i>) |
| TM | thiomočovina |
| TOF | analyzátor doby letu (<i>time of flight</i>) |
| TTS | elektrosprej s trojitou trubicí (<i>triple tube spray</i>) |

SEZNAM OBRÁZKŮ

| | | |
|---------------------|---|----|
| Obrázek 1.1 | – Přehled vazeb mezi aminokyselinami a sacharidy..... | 15 |
| Obrázek 1.2 | – Rozdělení a charakterizace elektromigračních technik..... | 18 |
| Obrázek 1.3 | – Migrační pořadí iontových a neutrálních molekul podle EOF | 22 |
| Obrázek 1.4 | – Otevření cyklu glukózové jednotky | 25 |
| Obrázek 1.5 | – Vznik nestabilní Schiffovy báze | 25 |
| Obrázek 1.6 | – Redukce Schiffovy báze na sekundární amin | 25 |
| Obrázek 1.7 | – Anionické a kationické značky pro CE-MS analýzu oligosacharidů..... | 26 |
| Obrázek 1.8 | – Schéma základních částí MS | 27 |
| Obrázek 1.9 | – Zjednodušené schéma TOF v lineárním uspořádání bez reflektoru | 29 |
| Obrázek 1.10 | – Uspořádání interface s koaxiální přídavnou kapalinou..... | 31 |
| Obrázek 1.11 | – Uspořádání nanoESI podle Hsieha | 32 |
| Obrázek 1.12 | – Interface s porézní špičkou podle Moiniho..... | 33 |
| Obrázek 1.13 | – Interface s vodivým kapalným spojením | 34 |
| Obrázek 2.1 | – Část konce separační kapiláry před leptáním a po leptání..... | 41 |
| Obrázek 2.2 | – Způsob vložení separační kapiláry do kazety pro CE-MS..... | 42 |
| Obrázek 2.3 | – Popis základní sestavy nanoCEasy interface | 43 |
| Obrázek 2.4 | – Zapojení nanoCEasy axiálně k TOF | 44 |
| Obrázek 2.5 | – Zapojení TTS ortogonálně k TOF..... | 45 |
| Obrázek 3.1 | – Elektroforeogram ANTS maltózového žebříčku, borát 25 mM | 49 |
| Obrázek 3.2 | – Porovnání separací s nejvyšší účinností v borátu 25 mM..... | 51 |
| Obrázek 3.3 | – Závislost proudu na separačním napětí, borát..... | 52 |
| Obrázek 3.4 | – Porovnání separací ve fosfátových puffech | 54 |
| Obrázek 3.5 | – Porovnání separací v NH_4HCO_3 pH 8,0 | 56 |
| Obrázek 3.6 | – Závislost proudu na separačním napětí, NH_4Ac | 57 |
| Obrázek 3.7 | – Porovnání separací v těkavých elektrolytech..... | 58 |
| Obrázek 3.8 | – Pozorované tvary spreje | 60 |
| Obrázek 3.9 | – EIE dvojnásobně nabitých aniontů ANTS žebříčku maltózy | 61 |
| Obrázek 3.10 | – Porovnání separací při zavedení přídavného tlaku a bez tlaku | 62 |
| Obrázek 3.11 | – Porovnání vlivu přídavného tlaku na rozlišení | 63 |
| Obrázek 3.12 | – Porovnání separací s použitím TTS a nanoCEasy interface | 66 |
| Obrázek 4.1 | – Závislost proudu na separačním napětí, fosfát pH 2,5..... | 88 |
| Obrázek 4.2 | – Závislost proudu na separačním napětí, fosfát pH 6,5..... | 88 |

SEZNAM TABULEK

| | |
|--|----|
| Tabulka 3.1 – Vliv napětí na separační charakteristiky, borát 25 mM, 25 °C | 50 |
| Tabulka 3.2 – Vliv napětí na separační charakteristiky, borát 25 mM, 20 °C | 51 |
| Tabulka 3.3 – Teoretické a experimentální hodnoty hmot ANTS žebříčku maltózy.... | 59 |
| Tabulka 3.4 – Měření opakovatelnosti u nanoCEasy | 63 |
| Tabulka 3.5 – Měření mezilehlé přesnosti u nanoCEasy | 64 |
| Tabulka 3.6 – Měření opakovatelnosti u TTS | 65 |
| Tabulka 3.7 – Poměry S/N a detekční limity pro nanoCEasy a TTS spojení | 67 |
| Tabulka 4.1 – Separační charakteristiky v borátovém pufru 25 mM, 25 °C..... | 78 |
| Tabulka 4.2 – Separační charakteristiky v borátovém pufru 25 mM, 20 °C..... | 79 |
| Tabulka 4.3 – Separační charakteristiky v borátovém pufru 50 mM..... | 80 |
| Tabulka 4.4 – Separační charakteristiky v borátovém pufru 75 mM..... | 81 |
| Tabulka 4.5 – Separační charakteristiky ve fosfátu 25 mM, pH 2,5..... | 82 |
| Tabulka 4.6 – Separační charakteristiky ve fosfátu 50 mM, pH 2,5..... | 83 |
| Tabulka 4.7 – Separační charakteristiky ve fosfátu 75 mM, pH 2,5..... | 84 |
| Tabulka 4.8 – Separační charakteristiky ve fosfátu 25 mM, pH 6,5..... | 85 |
| Tabulka 4.9 – Separační charakteristiky ve fosfátu 50 mM, pH 6,5..... | 86 |
| Tabulka 4.10 – Separační charakteristiky ve fosfátu 75 mM, pH 6,5..... | 87 |
| Tabulka 4.11 – Separační charakteristiky ve NH ₄ Fo 10 mM..... | 89 |
| Tabulka 4.12 – Separační charakteristiky ve NH ₄ Fo 30 mM..... | 90 |
| Tabulka 4.13 – Separační charakteristiky ve NH ₄ Fo 50 mM..... | 91 |
| Tabulka 4.14 – Separační charakteristiky ve NH ₄ HCO ₃ 10 mM..... | 92 |
| Tabulka 4.15 – Separační charakteristiky ve NH ₄ HCO ₃ 30 mM..... | 93 |
| Tabulka 4.16 – Separační charakteristiky ve NH ₄ HCO ₃ 50 mM..... | 94 |
| Tabulka 4.17 – Separační charakteristiky ve NH ₄ Ac 10 mM..... | 95 |
| Tabulka 4.18 – Separační charakteristiky ve NH ₄ Ac 30 mM..... | 96 |
| Tabulka 4.19 – Separační charakteristiky ve NH ₄ Ac 50 mM..... | 97 |

OBSAH

| | |
|--|-----------|
| ÚVOD | 13 |
| 1 TEORETICKÁ ČÁST | 14 |
| 1.1 Oligosacharidy | 14 |
| 1.1.1 Volné oligosacharidy | 14 |
| 1.1.2 Vázané oligosacharidy | 14 |
| 1.1.3 Uvolnění oligosacharidů a metody analýzy | 16 |
| 1.2 Kapilární elektroforéza | 17 |
| 1.2.1 Princip kapilární zónové elektroforézy | 18 |
| 1.2.2 Faktory ovlivňující rozlišení | 23 |
| 1.2.3 Detekce a derivatizace oligosacharidů | 23 |
| 1.3 Hmotnostní spektrometrie | 27 |
| 1.3.1 Ionizace elektrosprejem | 27 |
| 1.3.2 Analyzátor doby letu | 28 |
| 1.4 Možnosti spojení v CE-MS | 30 |
| 1.4.1 Interface s přídavným tokem kapaliny | 31 |
| 1.4.2 Interface bez přídavného toku kapaliny | 32 |
| 1.4.3 Interface s vodivým kapalným spojením | 33 |
| 2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST | 35 |
| 2.1 Použité chemikálie | 35 |
| 2.2 Použité přístroje a vyhodnocovací programy | 36 |
| 2.3 Příprava vzorků | 36 |
| 2.4 Příprava elektrolytů | 37 |
| 2.5 Kapilární elektroforéza s UV-VIS detekcí | 39 |
| 2.5.1 Příprava kapiláry | 39 |
| 2.5.2 Podmínky separace | 39 |
| 2.6 Kapilární elektroforéza s MS detekcí | 40 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 2.6.1 | Příprava kapilár..... | 40 |
| 2.6.2 | Uspořádání nanoCEasy..... | 42 |
| 2.6.3 | Uspořádání elektrospreje s trojitou trubicí..... | 44 |
| 2.6.4 | Separáčn  a detekční podmínky | 46 |
| 3 | VÝSLEDKY A DISKUZE..... | 47 |
| 3.1 | Elektromigrační charakteristiky derivatizovaných oligosacharidů..... | 47 |
| 3.1.1 | Tetraboritanový elektrolyt | 48 |
| 3.1.2 | Fosfátov  elektrolyt | 53 |
| 3.1.3 | Těkav  elektrolyty pro MS | 55 |
| 3.2 | Porovnání CE-MS spojení | 58 |
| 3.2.1 | Identifikace značených oligosacharidů..... | 58 |
| 3.2.2 | Separace s nanoCEasy | 59 |
| 3.2.3 | Separace s TTS | 65 |
| 3.2.4 | Mez detekce a stanovitelnosti | 66 |
| | ZÁVĚR | 68 |
| | ZDROJE | 70 |
| | PŘÍLOHY..... | 77 |

ÚVOD

Vzhledem k potenciálně široké škále využití je kapilární elektroforéza spojená s hmotnostní spektrometrií vnímána jako silný analytický nástroj. Tato technika však v současné době postrádá širší komerční podporu. On-line rozhraní totiž z praktického hlediska přináší řadu úskalí, které vyžadují pokročilou optimalizaci, aby bylo možné najít dostatečnou rovnováhu mezi robustní separací a citlivou detekcí. Mezi taková úskalí patří například konstrukční řešení elektrického propojení separačního napětí s napětím pro ionizaci. V on-line uspořádání se nejčastěji užívá elektrosprejová. Další výzvu představuje optimalizace separačních podmínek s podmínkami detekce, především pokud jde o složení elektrolytu, který by měl být kompatibilní s hmotnostní spektrometrií.

Cílem této diplomové práce bylo porovnat komerčně dostupné a laboratorně sestavené spojení kapilární elektroforézy s hmotnostní spektrometrií. Jejich srovnání bylo provedeno podle jejich vlivu na separaci vybraných oligosacharidů, které byly derivatizovány pomocí 8-aminonafalen-1,3,6-trisulfonové kyseliny (ANTS).

V teoretické části jsou uvedeny možnosti značení oligosacharidů se zaměřením na redukční aminaci. Dále jsou představeny možnosti spojení kapilární elektroforézy s hmotnostní spektrometrií a jejich rozdělení do základních tří skupin.

V experimentální části byly hledány optimální separační podmínky pro derivatizované oligosacharidy maltózového žebříčku. Ve druhé části jsou tyto poznatky aplikovány na spojení kapilární zónové elektroforézy a hmotnostního analyzátoru doby letu a dále optimalizovány v závislosti na typu daného spojení. Ta byla porovnána nejen podle výsledků měření (opakovatelnost a detekční limity), ale také z pohledu práce uživatele.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Oligosacharidy

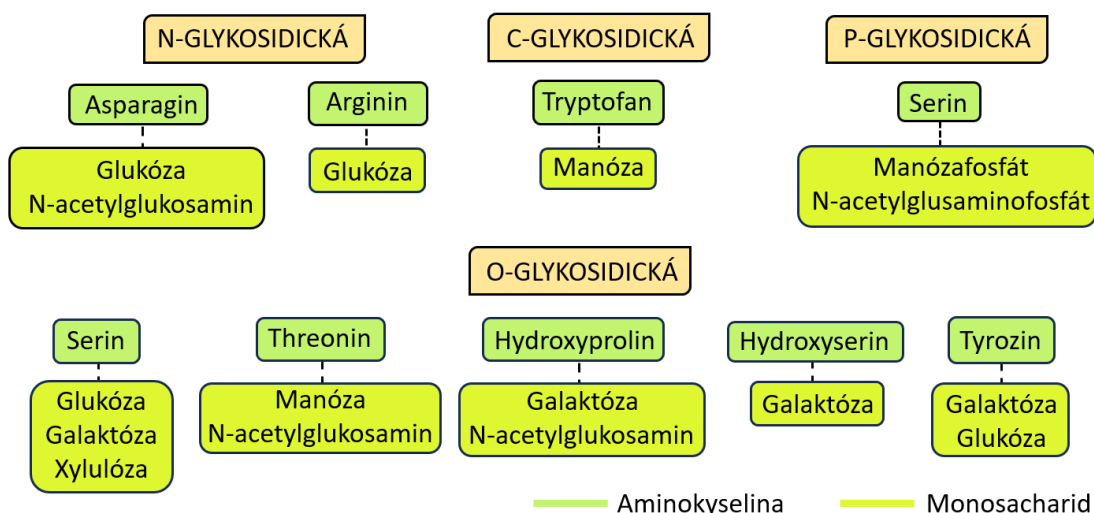
Monosacharidy představují základní stavební kameny pro sacharidy jako takové, neboť nemohou být jednoduše hydrolyzovány na menší jednotky. Jsou klasifikovány podle počtu uhlíků, pozice karbonylových a hydroxylových substituentů a prostorového uspořádání. Dále mohou být modifikovány enzymaticky, nejčastěji zavedením jiné funkční skupiny. Tyto změny přispívají k tomu, že si výsledná molekula zachová svou základní podobu, nicméně vykazuje různé chemické a biologické vlastnosti, což se promítá i do oligosacharidů. Ty vznikají kondenzací dvou až deseti stejných či různých monosacharidových jednotek, které jsou mezi sebou propojené O-glykosidickou vazbou [1–3].

1.1.1 Volné oligosacharidy

Oligosacharidy se v biologických systémech mohou vyskytovat přímo ve své volné formě nebo po hydrolytickém štěpení delších polysacharidových řetězců. Například v mléce, kde jsou oligosacharidy sestaveny z kombinace pěti základních monomerních jednotek, mezi něž patří glukóza, galaktóza, N-acetylglukosamin, fukóza a kyselina sialová, zastupují bohatý makronutrient, který přispívá k imunitní regulaci, podporuje probiotickou funkci a na kolonocytech brání patogenům v přichycení. Z toho důvodu se staly předmětem zájmu při jejich stanovení v mateřském mléce [4, 5].

1.1.2 Vázané oligosacharidy

Daleko komplexnější pohled do oblasti výzkumu sacharidů představují oligosacharidy kovalentně vázané k lipidům, proteinům či k jiným látkám. V buňkách, ať už eukaryotických či prokaryotických, dochází k řadě posttranslačních modifikací, mezi nimiž se vyjímá proces zvaný glykosylace. Ten skýtá různé formy glykosylačních cest, které připojují lineární nebo rozvětvené řetězce oligosacharidů na bílkovinný základ. Na výstupu tak stojí glykoproteiny, které se liší povahou vazby mezi cukernou jednotkou a aminokyselinou. Mezi nejvýznamnější vazby patří jmenovitě N-glykosidická a O-glykosidická, další jsou přehledně zmíněné na obrázku 1.1 [6, 7].



Obrázek 1.1 – Přehled vazeb mezi aminokyselinami a sacharidy, převzato a upraveno z [6]

Glykosylace hraje klíčovou roli v řadě biologických procesů, jako je buněčná signalizace, komunikace, adheze, rozpoznávání a navázání látek na buněčnou membránu nebo apoptóza. Daleko důležitější je však její účast na modulaci imunitní odpovědi organismu. V posledních letech byla zjištěna souvislost mezi změnami v glykosylaci a nádorovým, autoimunitním či neurodegenerativním onemocněním. Postižené buňky mají totiž jiné glykosylační vzory než zdravé buňky. Změny v glykosylaci tak mohou představovat diagnostický marker, který by poukázal na nástup nebo progresi takové nemoci [8–10].

Monitorování rozličných glykosylačních forem nachází své uplatnění i v odvětví výroby terapeutik založených na glykoproteinech. Mezi ně patří například biopolymerní léčiva trastuzumab, vankomycin a erythropoetin. Při jejich vývoji se uvolněné oligosacharidy analyzují kvůli dohledu nad biologickou aktivitou léčiva, jeho terapeutickou funkcí, stabilitou a jeho bezpečností z hlediska imunogenicity či případných kontaminantů [9, 11].

Důležitost kontroly kvality výrobního procesu a bezpečnosti léčiva podtrhla heparinová krize, k níž došlo mezi lety 2007 a 2008. Heparin je jedním ze zástupců polydisperzních aniontových glukosaminoglykanů s opakujícími se disacharidovými stavebními jednotkami ve svém lineárním řetězci. Své uplatnění nachází dodnes jako jedno z nejčastěji používaných antikoagulans. Během jeho produkce však docházelo k nechtěné syntéze jednoho z nadměrně sulfátovaných derivátů chondroitin sulfátu, jenž u pacientů, kterým byl podán heparin s touto nežádoucí látkovou příměsí, způsobil přehnanou anafylaktoidní reakci, která v některých případech vedla až ke smrti.

Tato krizová událost poukázala na to, jak důležité je vyvinout citlivou, selektivní metodu, jejíž strategií by bylo odhalit neznámé kontaminanty v podobně komplexních vzorcích [12, 13].

1.1.3 Uvolnění oligosacharidů a metody analýzy

Vzhledem k velké velikosti složených polysacharidových molekul a jejich složitým matricím by získaný signál po analýze byl natolik komplexní, že by nebylo možné sledovat glykosylační modifikace, místo jejich navázání a současně by bylo obtížné charakterizovat jednotlivé klíčové strukturní rysy. Pro jednodušší interpretaci dat je vhodnější selektivně uvolnit z kostry polysacharidů oligosacharidové fragmenty, které stále nesou důležitou informaci o struktuře, jsou dostatečně malé, aby byly účinně separované, a nemají tak širokou distribuci poměru náboje a velikosti. Celý proces se sestává z několika kroků a může být proveden chemicky nebo enzymaticky. Pro deglykosylaci chemickou cestou se využívá hydrazinolýzy nebo β -eliminace v alkalické prostředí NaBH_4 . Zatímco tento přístup se volí pro glykoproteiny s O-glykosidickou vazbou, pro N-glykany je daleko častější enzymatické štěpení pomocí glykosidáz [11, 14, 15].

Pro analýzu jsou samotné oligosacharidy problematickými molekulami, přesto je možné je analyzovat ve většině separačních módů. Prakticky se osvědčily různé strategie pro separaci kapalinovou chromatografií (LC), včetně LC s obrácenými fázemi s odpařovacím detektorem rozptylu světla nebo s detekcí indexu lomu. Dále se osvědčila iontově výměnná chromatografie s pulzní amperometrickou detekcí nebo chromatografie hydrofilních interakcí, ideální kvůli hydrofilní povaze sacharidů [3, 9, 16].

Poměrně jednoduchou a materiálově levnou metodu představuje chromatografie na tenké vrstvě. Ta ale nenabízí tolik významnou separaci [16].

U analýzy sacharidů si své významné místo našla i nedestruktivní nukleární magnetické rezonance. Na základě ^1H a ^{13}C chemických posunů je možné získat detailní informace o strukturních formách těchto molekul na úkor spotřeby relativně velkého množství čistého vzorku a vysokých nákladů na instrumentaci [3, 8].

Pro použití plynové chromatografie (GC) musí být sacharidy derivatizovány pro zvýšení jejich těkavosti. S tím souvisí riziko ztráty vzorku nebo jeho znečištění. GC se nejčastěji spojuje s hmotnostní spektrometrií (MS) nebo s plamenovým ionizačním

detektorem. Pro analýzu sacharidů se nejedná o tolik častou techniku na rozdíl od elektroforetických metod [16].

Velkou změnu v přístupu k analýzám přineslo spojení MS se separačními technikami, nejčastěji s LC a kapilární zónovou elektroforézou (CZE). Použití samotné MS není obvykle ideální pro analýzu sacharidů. Derivatizací nebo spojením s jiným separačním módem je možné překonat překážku, která tkví v jejich vysokém hydrofilním charakteru. Kvůli němu se sacharidy neefektivně odpařují, což omezuje jejich ionizační účinnost v iontovém zdroji [3, 9].

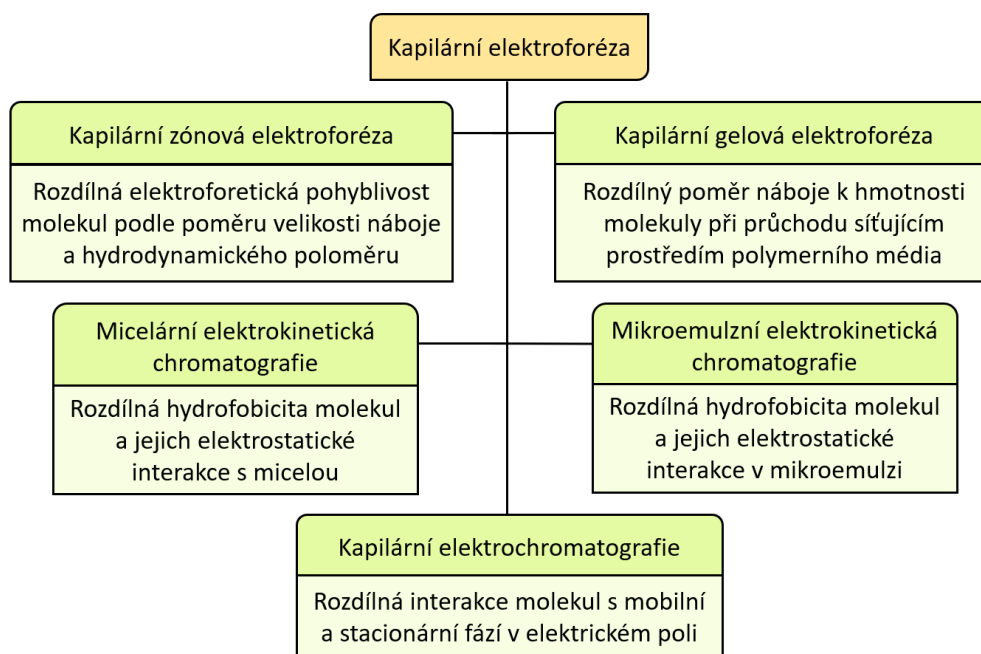
1.2 Kapilární elektroforéza

Jednou ze silných stránek separací za využití elektroforetických metod je možnost provést analýzy polárních látek, mezi něž spadají právě oligosacharidy. Ty sice v roztoku vykazují neutrální charakter a jsou i obtížně detekovatelné vzhledem k absenci chromoforu ve své struktuře, přesto je možné tyto nedostatky odstranit vhodnými postupy aplikovanými ještě před počátkem samotné analýzy [3, 17].

Klasické módy kapilární elektroforézy (CE) aplikovatelné v analýze oligosacharidů, jejichž separační mechanismy jsou popsány níže na obrázku 1.2, neposkytují detailní informace o struktuře analytu. K jeho identifikaci je potřeba použít komerčně vyráběné referenční standardy, jejichž migrační časy se porovnávají s analyty. V kombinaci s referenčními standardy byla snaha přepočítat migrační časy glykanů na hodnoty, které by nebyly tolik závislé na separačních podmínkách, urychlily by identifikaci a eliminovaly by chyby způsobené posunem migračních časů. Princip je shodný s identifikací látek v GC pomocí retenčních Kovatsových indexů. U analýz glykanů v CE režimu se liší tím, že se pracuje se standardizovanými hodnotami GU (z anglického *glucose unit*). Pomocí GU je možné porovnat migrační časy neznámých glykanů s referenčními daty glukózového žebříčku obsahujícího různý počet jednotek glukózy. Model počítá i s různým stupněm polymerace. Tato strategie je aplikovatelná i na separace pomocí LC, která se stala prvním podkladem pro vznik takových databází, mezi které patří například GlycoBase. Pro CE separace je významnější databáze GUcal, z něhož byl vyvinut software, který z elektroforegramu přímo určí hodnotu GU a k ní přiřadí sledovanou látku. Nutné je vzít v potaz, že hodnoty GU jsou specifické vůči experimentálním podmínkám, při nichž byly stanoveny [18–21].

Daleko běžnější, přesnější a časově úspornější přístup v identifikaci látek nabízí spojení kapilární elektroforézy s hmotnostním spektrometrem (CE-MS). Vhodnou ionizační technikou se profilovaná molekula ionizuje a následně identifikuje [22].

Použití různých módů kapilární elektroforézy je oblíbené z hlediska několika faktorů. Nabízí vysokou rozlišovací schopnost pro analyty s podobnými vlastnostmi. Separace probíhají relativně rychle, často v řádu několika desítek minut. Spotřeba chemikálií k analýze je velmi malá, a tedy i cenově a ekologicky příznivá. Vzhledem k dávkovaným desítkám nanolitrů vzorku je CE vhodná, když jsme limitováni množstvím vzorku. Vzorek není potřeba před analýzou složitě upravovat. Separační systém lze jednoduše a rychle obměnit, čímž je možné rychle upravit separační podmínky. Po analýze jej není potřeba dlouho proplachovat velkými objemy kvůli eliminaci zbytkových složek, které by způsobovaly paměťové efekty. Přístroje pro CE jsou navíc snadno automatizovatelné v případě velkého množství vzorků [3, 23, 24].



Obrázek 1.2 – Rozdělení a charakterizace elektromigračních technik uplatňujících se v analýze oligosacharidů, převzato a upraveno z [24]

1.2.1 Princip kapilární zónové elektroforézy

Analýza molekul v uspořádání CZE vychází z několika transportních mechanismů, které k separaci přispívají selektivně i neselektivně [25].

Elektroforetická pohyblivost

Selektivně se na rozdělení molekul podílí elektroforetická pohyblivost, která rovněž zastupuje hlavní separační mechanismus. Její efekt se projevuje v systému sestaveného z vodivého elektrolytu, separační kapiláry a ze dvou elektrod, na něž je vlákáno stejnosměrné napětí, v jehož důsledku se generuje elektrické pole. Jeho intenzita se po celou dobu aplikovaného napětí nemění a po vložení nabitě částice do takovéto sestavy je částice uvedena do pohybu. Velikost síly elektrického pole (F_E), která přitahuje nabitě částice k opačně orientovaným elektrodám, je úměrná velikosti náboje iontu (q_i) a intenzitě elektrického pole (E), která je vyjádřena jako podíl napětí (U) vložené na elektrody a celkové vzdálenosti mezi elektrodami (L), jak níže znázorňuje vztah 1.1:

$$F_E = q_i \cdot E = q_i \cdot \frac{U}{L} \quad (1.1)$$

Symbols

| | | |
|-------|------------------|---------------------------|
| F_E | N | elektrická síla, |
| q_i | C | elektrický náboj částice, |
| E | $V \cdot m^{-1}$ | elektrické pole, |
| U | V | vložené napětí, |
| L | m | celková délka kapiláry. |

Zatímco rychlost nabitě molekuly uvedené do pohybu roste, třecí síla prostředí (F_T) se staví proti elektrické síle a brzdí tento pohyb částice v elektrolytu. Pro sférické částice je tato odporová síla vyjádřena Stokesovým vztahem jako:

$$F_T = 6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r_i \cdot v_i \quad (1.2)$$

Symbols

| | | |
|--------|--------------------------|---------------------------------|
| F_T | N | frikční síla prostředí, |
| η | $N \cdot s \cdot m^{-2}$ | dynamická viskozita prostředí, |
| r_i | m | hydrodynamický poloměr částice, |
| v_i | $m \cdot s^{-1}$ | rychlost částice. |

Jakmile dojde k dosažení rovnovážného stavu, kdy se obě protichůdné síly vyrovnají, nabitá částice přestává zrychlovat a v kapiláře se začne pohybovat konstantní rychlostí, která je charakteristická pro danou částici a úměrná intenzitě elektrického pole. Pro zjednodušení porovnání charakteristik pohybu nabitých částic v elektrickém poli byl zaveden termín elektroforetická pohyblivost (μ_i) [25–28].

Elektroforetická pohyblivost je vyjádřena jako poměr rychlosti nabitě částice k jednotkové intenzitě elektrického pole, jak znázorňuje rovnice 1.3. Změní-li se vložené napětí na soustavu a s ním i intenzita elektrického pole, změní se i rychlost nabitě částice tak, aby poměr rychlosti ku intenzitě elektrického pole zůstal zachován. Po dosažení vztahu pro rychlost po dosažení rovnovážného stavu do definice pro elektroforetickou pohyblivost platí:

$$\mu_i = \frac{v_i}{E} = \frac{q_i}{\delta \cdot \pi \cdot \eta \cdot r_i} \quad (1.3)$$

Z toho lze vyvodit několik praktických důsledků. Pohyblivost nabitých iontů v kapiláře nezávisí na intenzitě elektrického pole. Při změně napětí se hodnota pohyblivosti částice nezmění takřka vůbec. Bez zásahu vnějších vlivů a při daném experimentálním uspořádání by měly být migrační časy reprodukovatelné. Elektroforetická pohyblivost závisí na velikosti náboje částice, jejího hydrodynamického poloměru a viskozitě elektrolytu. Čím větší je náboj iontu, tím je jeho elektroforetická pohyblivost vyšší, naopak čím víc roste jeho efektivní poloměr v roztoku, o to nižší pohyblivost následně vykazuje, což je spojené s delšími migračními časy. S rostoucí viskozitou elektrolytu rovněž klesá elektroforetická pohyblivost. Lze tedy uvést, že elektroforetická pohyblivost je specifická pro každý iont jednotlivě, vzhledem k poměru velikosti náboje částice a jejího efektivního poloměru. Tento poměr je podstatou separačního mechanismu CZE a u ostatních konfigurací CE [25, 26, 28, 29].

Elektroosmotický tok

Elektroforetické separace doprovází jev zvaný elektroosmotický tok (EOF). V typickém instrumentálním uspořádání CZE se projevuje poté, co je kapilára naplněná vodivým elektrolytem, oba její konce jsou ponořené do nádobek s elektrolytem společně s inertními elektrodami, standardně platinovými, a k elektrodám je připojen vysokonapěťový stejnosměrný zdroj. K běžně používaným kapilárám v této sestavě se řadí křemenné sklo, které je z vnějšku pokryto tenkou vrstvou polyimidu, jehož funkcí je zvýšit pružnost křehké kapiláry. Ta je většinou 25–75 cm dlouhá, s vnějším průměrem kolem 300–400 μm a vnitřním 25–75 μm . Kapilára má na svém povrchu různé typy silanolových skupin SiOH s hodnotami pK_a mezi 3 až 5. V rozmezí pH slabě kyselého až zásaditého roztoku proto podléhají disociaci na SiO^- , vlivem čehož vnitřní strana separační kapiláry vykazuje záporný náboj [30, 31].

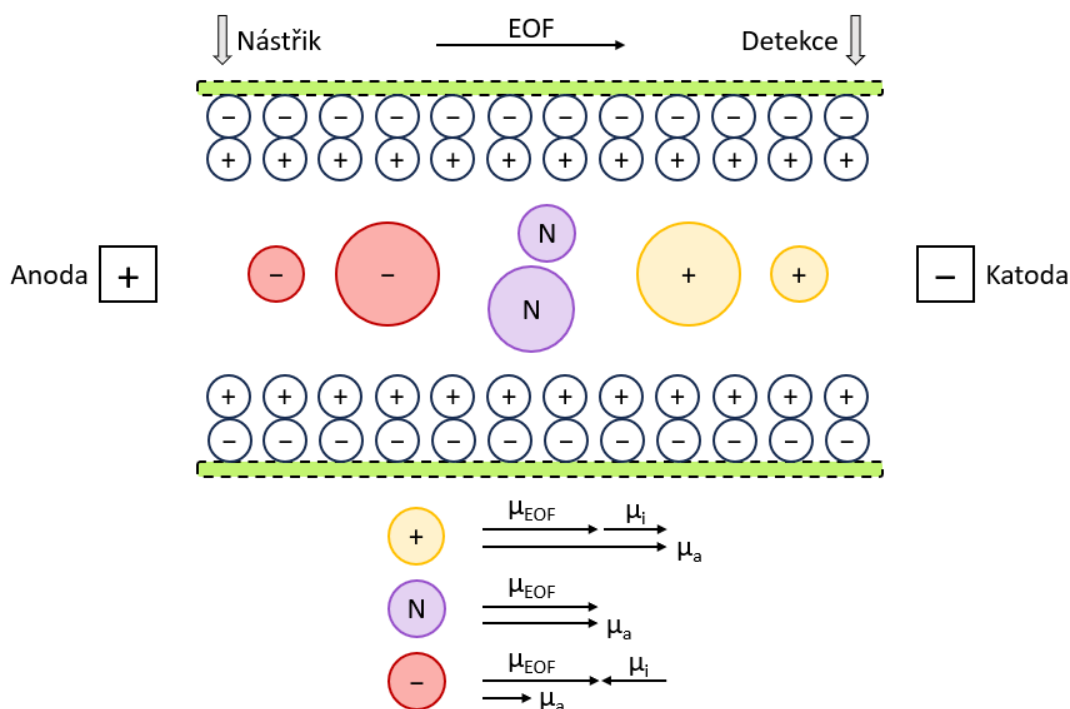
Vzhledem k tomu, že fáze s vyšší permitivitou bývá pozitivně polarizovaná oproti jiné, voda proto nese kladný potenciál v porovnání se záporně nabitou vnitřní stěnou kapiláry. Z toho důvodu tvoří molekuly vody se solvovanými kationty na rozhraní se stěnou kapiláry Sternovu statickou elektrickou dvojvrstvu a dále od ní pak difuzní vrstvu, kde jsou kationty stále elektrostaticky přitahovány ke stěně kapiláry. Tato interakce není příliš silná, a proto se difuzní vrstva může pohybovat, což se děje po zavedení elektrického pole. Solvované kationty z elektrolytu jsou unášeny k opačnému pólu, tedy ke katodě, a během toho s sebou hromadně strhávají elektrolyt v celém jeho objemu. Výsledkem tohoto děje je pak EOF, vlivem kterého migrují všechny složky elektrolytu stejnou rychlostí směrem ke katodě, a to včetně neutrálních molekul a aniontů [29].

Z výše uvedeného vyplývá, že EOF není specifický pro každý iont roztoku. Přesto jde o důležitý transportní mechanismus, který ovlivňuje kvalitu separace, například z hlediska rovnoměrného profilu toku elektrolytu, a který je možné vyjádřit elektroforetickou pohyblivostí (μ_{EOF}) analogicky jako podíl konstantní rychlosti, tentokrát EOF, a intenzity elektrického pole [28].

Pohyblivost EOF je obvykle vyšší než pohyblivost nadávkovaných iontů. Dávkování se provádí zpravidla z anodové strany kapiláry. Jelikož pohyblivosti EOF a separovaných částic vykazují buď stejný, nebo opačný směr, celkovou pohyblivost částice následně udává jejich vektorový součet. Výsledkem je pak zdánlivá pohyblivost (μ_a), která je pozorována poté, co částice dosáhne detekční zóny. Skutečná pohyblivost pro separovanou částici (μ_i) se nazývá efektivní pohyblivost, jak ilustruje obrázek 1.3. Na detektor u katodové strany postupně putují zóny v následujícím pořadí:

- malé kationty – vlivem EOF a vysoké elektroforetické pohyblivosti z důvodu malého hydratovaného poloměru částice,
- velké kationty – se detekují jako druhé kvůli menší elektroforetické pohyblivosti než v případě malých kationtů,
- neutrální látky – nenesou náboj, a tedy nevykazují elektroforetickou pohyblivost, ale jejich pohyb je řízen EOF, a proto mohou vystupovat jako ideální marker EOF z důvodu shodných migračních časů,
- velké anionty – ze své povahy by migrovaly k anodě, přesto opačný vektor EOF je větší, a anionty tak migrují později než neutrální látky,

- malé anionty – mají vyšší elektroforetickou pohyblivost k anodě než anionty s větším hydratovaným poloměrem i větší opačně orientovaný vektor než EOF, tudíž migrují ke katodě poslední nebo nemusí být detekovány vůbec.



Obrázek 1.3 – Migrační pořadí iontových a neutrálních molekul v závislosti na EOF, převzato a upraveno z [26]

Velikost EOF podmiňuje kromě permitivity (ϵ) a dynamické viskozity elektrolytu (η) rovněž zeta-potenciál (ζ), který vzniká na rozmezí difuzní a statické vrstvy. Čím větší je, tím intenzivnější mobility může EOF dosahovat. Naopak klesne-li na nulu, EOF se zcela zastaví, jak vyplývá z rovnice 1.4:

$$\mu_{EOF} = \frac{\epsilon \cdot \zeta}{\eta} \quad (1.4)$$

Symbols

| | | |
|-------------|---------------------------------|-----------------------------------|
| μ_{EOF} | $m^2 \cdot s^{-1} \cdot V^{-1}$ | elektroforetická pohyblivost EOF, |
| ϵ | $F \cdot m^{-1}$ | permitivita, |
| ζ | V | zeta-potenciál. |

Velikost zeta-potenciálu, a potažmo EOF je možné ovlivnit volbou pH elektrolytu, jeho iontovou silou nebo vlivem dynamické či statické modifikace kapilární stěny [26, 28, 32].

1.2.2 Faktory ovlivňující rozlišení

Při elektroforetických separacích dochází k několika nepříznivým efektům, které jsou navzájem aditivní a přispívají k rozšiřování zón, což znemožňuje rozlišit jednotlivé zóny a integrovat je. Čím vyšší je rozlišení, tím lépe jsou jednotlivé zóny od sebe oddělené. Při optimalizaci separace v CZE a obecně v CE je nutné počítat s faktory, jako jsou podélná difuze, adsorpce látek na kapilární stěnu, Joulovo teplo, vliv dávkování vzorku, elektroforetická disperze, disperze vlivem geometrie zakřivení kapiláry nebo šířka detekční zóny [33, 34].

1.2.3 Detekce a derivatizace oligosacharidů

Oligosacharidy a sacharidy obecně mají vzhledem k počtu monosacharidových jednotek ve své struktuře různé hydrodynamické poloměry a většina z nich je snadno rozpustná ve vodných roztocích elektrolytu. Na druhou stranu vykazují neutrální povahu, vyjma sacharidů s karboxylovou skupinou, kvůli čemuž nespĺňují předpoklady pro separaci podle klasických elektroforetických principů. Nabízí se hned několik možností, jak se tomuto problému vyhnout. Pro jejich separaci v CZE je možné modifikovat základní elektrolyty použitím borátu, který jakožto komplexotvorné činidlo tvoří se sacharidem negativně nabitý borátový komplex. Dále je možné zvýšit pH nad disociační konstantu hydroxylových skupin sacharidu, kdy dojde k jejich disociaci a vytvoří se systém s jistou konjugací dvojných vazeb a volných elektronů o negativním náboji. Tyto dva případy jsou aplikovatelné u detekčních metod, jako jsou bezkontaktní vodivostní detekce nebo spektrofotometrická detekce v UV oblasti [16, 35].

Jako řada jiných látek, samotné sacharidy absorbují při vlnové délce 185 nm, což nedovoluje potřebnou selektivitu. K překonání nízké citlivosti detekce, zvýšení stability analytu nebo zlepšení ionizace pro detekci hmotnostním analyzátozem se častěji volí derivatizační přístup. Ten umožňuje dosáhnout optimální a účinné separace. Ve své podstatě jde o jistý zásah do vlastností oligosacharidů, které většinou nejsou samy o sobě nabitě a postrádají chromoforní či fluoroformní skupiny. Tyto aspekty jsou esenciální pro vyvolání odezvy detektoru, který je kompatibilní s CE. Při derivatizaci se oligosacharid modifikuje přidáním specifické UV-absorbující nebo fluorescenční značky nesoucí náboj. Většina derivatizačních činidel je použitelná pro detekci laserem indikovanou fluorescencí (LIF), která je jednou z nejpoužívanějších metod a současně dovoluje výrazně nižší detekční limity pro kvantifikaci. Oproti této strategii

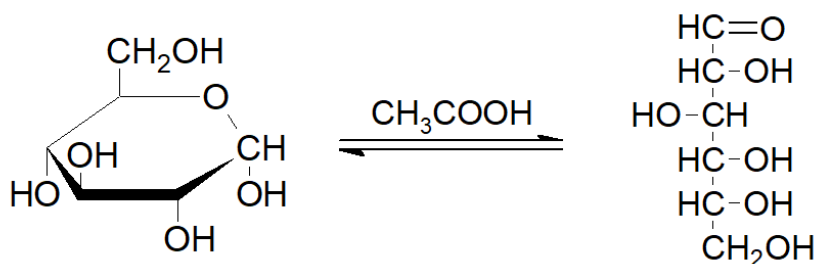
je možné použít i nepřímou detekci, kdy se chromofor nebo fluorofor přidává cíleně do základního elektrolytu, jehož absorpční pozadí se zvýší a ustálí na konstantní hodnotě. Jakmile oligosacharid s podobným nábojem, jako je náboj značky, dosáhne detekční zóny, nahradí zde chromofor nebo fluorofor. V tento okamžik se koncentrace značky skokově sníží, což se projeví poklesem signálu, a na elektroforegramu se objeví negativní pík odpovídající danému sacharidu [16, 35–37].

Derivatizačních strategií je hned několik. Mezi nejpoužívanější patří značení sacharidové molekuly přes poloacetalový uhlík ještě před separací. Derivatizace sacharidů by měla být selektivní, ekonomicky a environmentálně nezatěžující a měla by poskytovat stabilní produkty s vysokými výtěžky. Mezi takové se řadí redukční aminace, oxidativní kondenzace s aromatickými vicinálními diaminy, reakce s deriváty hydrazinu, tvorba oximů z derivátů hydroxylaminu a kondenzace se sloučeninami s aktivní methylenovou skupinou. V textu bude dál rozebrán pouze princip redukční aminace vzhledem k tomu, že tento přístup byl zvolen v experimentální části pro derivatizaci vybraných oligosacharidů [11, 38].

Redukční aminace

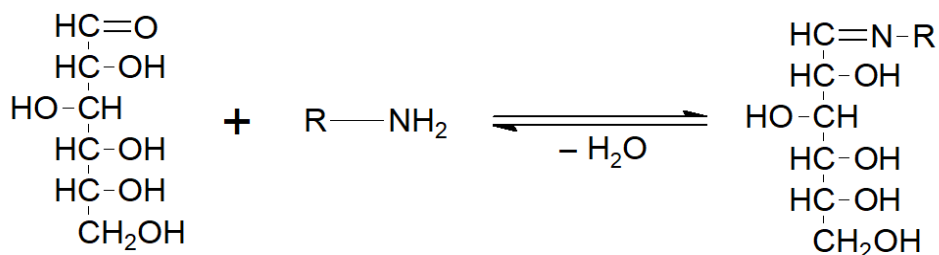
Redukční aminaci je možné provést pouze u sacharidů s volnou poloacetalovou skupinou, tedy na karbonylovém uhlíku u redukovatelných sacharidů. Neredukovatelné sacharidy je potřeba převést enzymaticky nebo po hydrolýze kyselinou na menší monosacharidové jednotky, které následně vykazují takzvaný volný redukovatelný konec [39].

Zjednodušený reakční mechanismus redukční aminace zahrnuje celkem tři kroky. U sacharidů dochází běžně k vnitřní cyklizaci, vlivem čehož se v lineární podobě vyskytují pouze výjimečně. V prvním kroku, jak ukazuje obrázek 1.4, je proto potřeba otevřít sacharidový kruh a zpřístupnit tak karbonylový uhlík atakujícímu nukleofilu, aby došlo k úplné derivatizaci. Rovnováhu směrem k otevřenému cyklu posouvá mírně kyselé prostředí, kterého se nejčastěji dosahuje kyselinou octovou nebo citronovou. Ta navíc rozpouští derivatizační činidla, jelikož většina z nich je málo rozpustných ve vodných roztocích, a podporuje stabilitu Schiffovy báze, která vzniká hned v druhém kroku reakčního mechanismu [38].



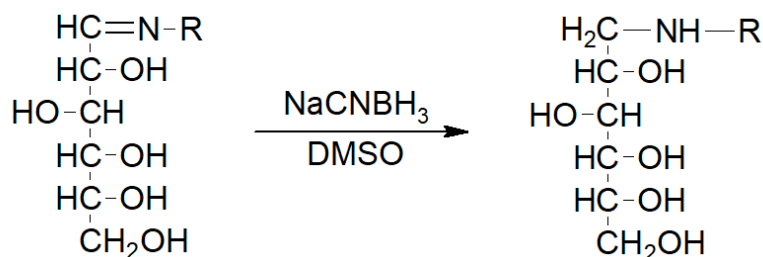
Obrázek 1.4 – Otevření cyklu glukózové jednotky

Druhý krok představuje nukleofilní adici primárního aminu na karbonylový uhlík sacharidu za vzniku nestabilního iminu za ztráty molekuly vody, jak je znázorněné na obrázku 1.5. Ten má tendenci se zpětně hydrolyzovat na volný sacharid a amin. Aby se tomu zabránilo, rovnováha reakce se posouvá v prospěch vzniku iminu nadbytkem derivatizačního činidla. Hydrolyzu navíc potlačuje dimethylsulfoxid (DMSO), který jakožto aprotické rozpouštědlo zvyšuje rozpustnost a reaktivitu sacharidu a derivatizačního činidla, díky čemuž reakce probíhá i při nižších teplotách, obvykle mezi 37–50 °C [38, 40].



Obrázek 1.5 – Vznik nestabilní Schiffovy báze

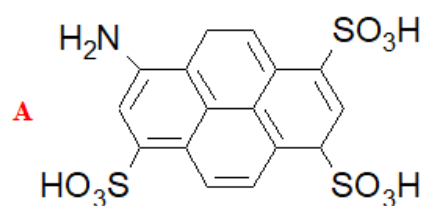
Schiffova báze je v posledním kroku, který je již ireverzibilní, jak naznačuje obrázek 1.6, redukována na stabilní sekundární amin. Jako redukční činidlo se nejčastěji používá kyanoborohydrid sodný, který je selektivní a redukuje pouze iminovou vazbu. Nevýhoda v jeho použití spočívá v tom, že se v kyselém prostředí snadno protonuje a rozkládá na toxický kyanovodík. I z toho důvodu je kyselé pH moderováno kyselinou octovou [25, 38].



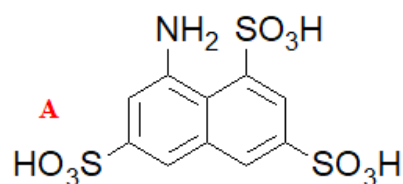
Obrázek 1.6 – Redukce Schiffovy báze na sekundární amin

Kyanoborohydrid sodný je možné nahradit jinými šetrnějšími redukčními činidly, která jsou v kyselém prostředí stabilní. Mezi takovými si našly své uplatnění 2-pikolin-boranový komplex, diethylamin-boranový komplex a triacetoxyborohydrid sodný. Bezpečnější alternativu k redukční aminaci, jenž eliminuje riziko uvolňování kyanovodíku, představuje použití fosfinových ligandů s dvojmocným rutheniem nebo trojmocným iridiem. Ty katalyzují přenos vodíku z kyseliny mravenčí na Schiffovu bázi [41].

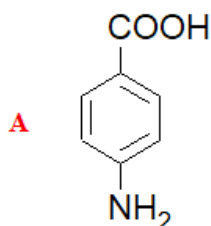
Mezi značkami s volnou aminovou skupinou pro redukční aminaci v analýze oligosacharidů pomocí CE dodnes převažuje značení 8-aminopyren-1,3,6-trisulfonovou kyselinou, která je velmi citlivá pro LIF detekci. Ve spojení CE-MS je preferované značení kationickými značkami oproti těm s trvalým záporným nábojem. Důvodem je lepší separace v CE režimu vzhledem k tomu, že nemigrují proti EOF, a efektivnější ionizace v MS s lepšími detekčními limity měřeními v pozitivním módu. Přehled používaných značek s kladným nebo záporným nábojem v CE-MS je uveden na obrázku 1.7 [25, 42].



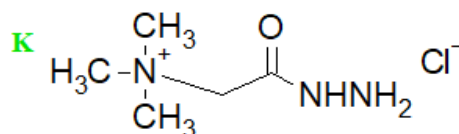
8-aminopyren-1,3,6-trisulfonová kyselina



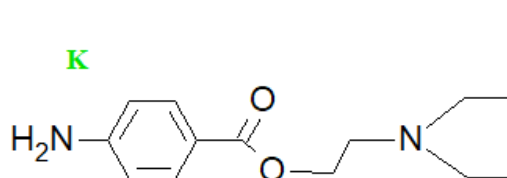
8-aminonaphthalen-1,3,6-trisulfonová kyselina



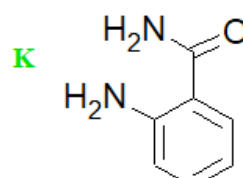
4-aminobenzoová kyselina



trimethylaminoacetohydrazid chlorid



prokainamid

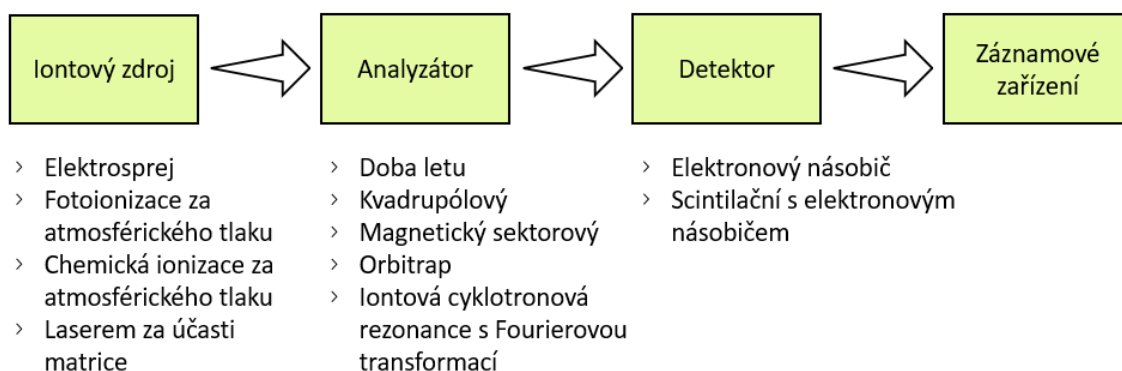


2-aminobenzamid

Obrázek 1.7 – Anionické (A) a kationické (K) značky pro CE-MS analýzu oligosacharidů

1.3 Hmotnostní spektrometrie

MS je citlivá separační technika, jenž umožňuje identifikovat a kvantifikovat široké spektrum látek. Její velkou výhodou je možnost detailně studovat strukturní a chemické složení látek, a to za předpokladu, že takovou látku je možné převést do ionizované podoby. Může se tedy jednat o anorganickou i organickou látku. Cílem MS je rozlišit různě ionizované částice v plynné fázi za vysokého vakua v hmotnostním analyzátoru. Na detektor následně dopadají požadované ionty rozdělené podle poměru jejich hmotnosti a náboje (m/z) k jejich intenzitě. Pík s největším počtem detekovaných iontů ve spektru je označován jako základní pík a ostatní jsou k němu vyjádřeny jako procentuální podíl. Na obrázku 1.8 je znázorněno, ze kterých základních komponentů je MS sestaven. K nim jsou uvedené vybrané konkrétní příklady [43, 44].



Obrázek 1.8 – Schéma základních částí MS, převzato a upraveno z [44]

1.3.1 Ionizace elektrosprejem

Zatím nebyla vyvinuta ionizační technika, která by byla univerzální pro všechny druhy látek. Proto se podle charakteru molekuly, například podle molekulové hmotnosti nebo tepelné stability látky, vybírá optimální iontový zdroj. Při výběru je důležité vzít v potaz i možné spojení MS se separační metodou. Pro on-line spojení CE-MS se nejvíce osvědčila ionizace elektrosprejem (ESI) vzhledem k tomu, že jde o nejšetrnější techniku vhodnou pro ionizaci polárních až iontových sloučenin za relativně nízkých průtoků v řádu jednotek až desítek $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ [45].

ESI patří mezi techniky, s nimiž je možné operovat za atmosférického tlaku. Než je ionizovaná látka vedena do hmotnostního analyzátoru, pomocí vloženého elektrického napětí na ESI je z kapalného roztoku převedena do plynné fáze. V případě

neutrální látky se molekuly takové látky převádí na ionty v závislosti na módu, v němž MS pracuje. V negativním módu se molekuly nejčastěji deprotonují jako $[M-zH]^{z-}$ nebo vznikají adukty s kovy ve tvarech $[M-zNa]^{z-}$. U pozitivního módu je tomu naopak. V ESI je možné sledovat různou distribuci nábojových stavů látky. Častý je vznik vícenásobných nabitých forem s vyšším záporným nábojem (z), kde $z \geq 1$. Formy vícenásobně nabitě se ve spektru projeví jako píky s nižším m/z , než je tomu u jednou nabitých molekul se sudým počtem elektronů. Tohoto způsobu se běžně využívá při analýze velkých biomolekul, které jsou ve spektru detekovány při nízkém m/z , což představuje velkou výhodu u analyzátorů s nízkým hmotnostním rozsahem [45, 46].

Ionty v ESI jsou generovány následujícím způsobem. Vzorek prochází kapilárou, na kterou je aplikované konstantní napětí v rozsahu do 6,0 kV. Vlivem toho se na výstupu kapiláry tvoří aerosol drobných nabitých kapek analytu a rozpouštědla. Ty pomáhá do prostoru rozptylovat zmlžující plyn, často dusík, jenž se aplikuje i pro podporu toku vzorku. Nabitě rozprášené kapky jsou vedeny do hmotnostního analyzátoru dvěma vzájemně prolínajícími se cestami. Mezi ESI a hmotnostním analyzátozem, u něhož se pumpou udržuje vakuum, dochází ke vzniku tlakového spádu, který řídí pohyb iontů. Vedle něj se uplatňuje i elektrické pole generující se mezi ESI a analyzátozem. U negativního módu ESI vystupuje jako katoda a vstupní část analyzátoru je obráceně nabitá. Kapky vystupující ze spreje nabývají taktéž záporného náboje, jaký je na zdroji ESI, a proto se začnou pohybovat k opačnému pólu, v tomto případě k anodě. Čím větší se vkládá napětí na ESI zdroj, tím rychlejší je pohyb iontů k analyzátozem. Díky vyhřívanému protiproudu sušícího dusíku je rozpouštědlo z nabitě kapky postupně odpařováno a kapky se zmenšují, zatímco se hustota náboje na jejich povrchu zvyšuje až do kritického okamžiku, kdy Coulombické síly převýší povrchové napětí a nabitým iontům na povrchu kapky je kineticky a energeticky umožněno přejít do plynné fáze. Frekvence celého tohoto procesu závisí na velikosti elektrického pole mezi ESI zdrojem a analyzátozem, na povrchovém napětí kapaliny a její elektrické vodivosti. Emitované volné ionty pak konečně putují přes skimmer do hmotnostního analyzátoru, kde jsou dále analyzovány podle svého hmotnostně-nábojového poměru [46, 47].

1.3.2 Analyzátor doby letu

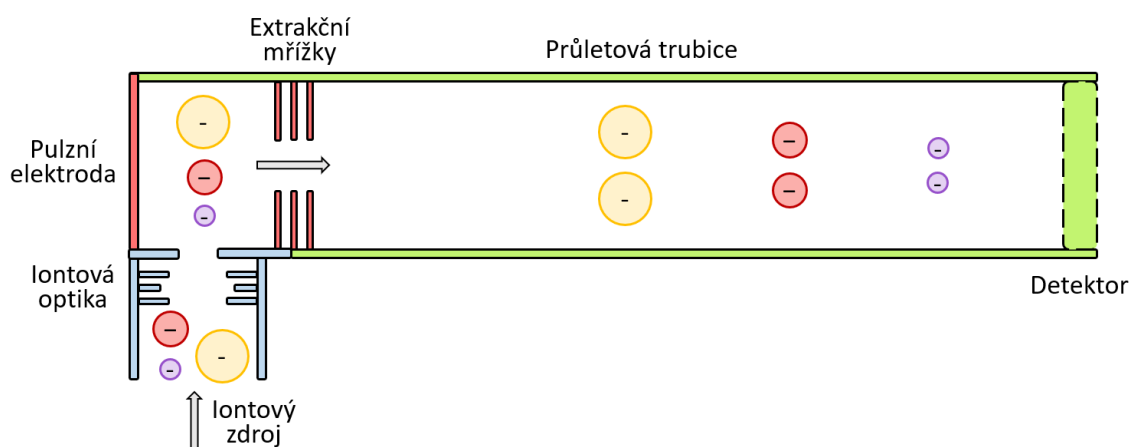
Hmotnostní analyzátor doby letu (TOF) patří mezi analyzátozem s velkou rozlišovací schopností a s velkým hmotnostním rozsahem, a proto je vhodný i na měření

velkých biomolekul. Rozdělení nabitých iontů podle jejich poměru m/z se v principu zjišťuje měřením doby, za kterou ionty překonají dráhu průletové trubice a doletí na jejím konci na detektor [47].

Priváděným iontům do TOF je skrze pulzní elektrodu přidělen vysokonapěťový extrakční pulz, který je rozpohybuje směrem k detektoru a zároveň jim udělí stejnou kinetickou energii (E_K). Vyjádří-li se z rovnice pro kinetickou energii hmotnost (m), získá se vztah 1.5:

$$m = \frac{2 \cdot E_K}{v^2} \quad (1.5)$$

Ze vztahu je patrné, že ionty s vyšší hmotností poletí k detektoru s nižší rychlostí (v), naopak lehčí ionty se k detektoru dostanou rychleji. Celý tento proces se odehrává za vysokého vakua, aby se separovanými ionty nic neinterferovalo. Místo měření rychlosti je jednodušší zaznamenat čas, za jak dlouho ionty doletí na konec průletové trubice. Zjednodušené schéma lineárního TOF se separací jednou záporně nabitých iontů s rozdílnou hmotností zobrazuje obrázek 1.9 [48].



Obrázek 1.9 – Zjednodušené schéma TOF v lineárním uspořádání bez reflektoru, převzato a upraveno z [48]

Rozlišení TOF je možné zlepšit použitím reflektronů nebo iontových zrcadel, jejichž smyslem je kompenzovat rozdíly v kinetických energiích u iontů se stejným m/z . Reflektoron představuje soubor elektrod vytvářející retardující elektrické pole, do něhož iont s vyšší kinetickou energií proniká hlouběji než iont s nižší energií. Na poměr m/z to však nemá vliv. Takovému iontu pak trvá déle návrat do průletové trubice. Díky tomu se kinetické energie obou iontů sjednotí a konečně jsou oba detekovány ve stejnou chvíli [47].

1.4 Možnosti spojení v CE-MS

Jelikož se v CE operuje v oblasti velmi malých průtoků, pro on-line spojení s MS je k tomu nejvíce kompatibilní ESI ionizační technika. Z praktického hlediska se však jedná o velice komplikované spojení, u něhož je zapotřebí překonat několik překážek v podobě elektrického propojení mezi elektroforetickou separací a ESI ionizací tak, aby se vzájemně negativně neovlivňovaly [49].

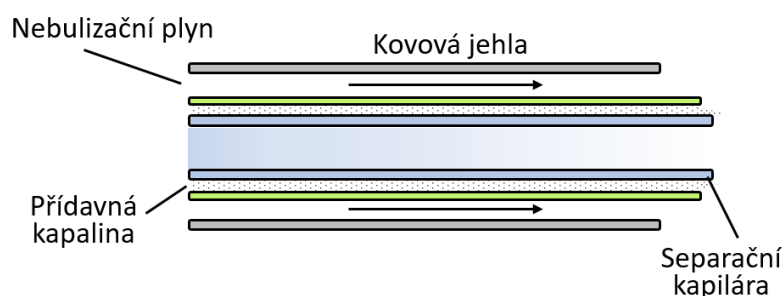
Konstrukčně je tento problém řešen následovně. Na vstupu separační kapiláry je elektroda, na níž se vkládá separační napětí maximálně do 30 kV, v rozsahu obou polarit. V blízkosti výstupu separační kapiláry se nachází sdílená elektroda pro CE a ESI, která uzavírá separační obvod. Aby ESI stabilně sprejoval a bylo možné na něj vložit potřebný potenciál pro ionizaci, je zapotřebí ustanovit druhý elektrický obvod mezi ESI elektrodou a koncovou elektrodou na vstupní části MS (*endplate*). Společná elektroda pro CE a ESI představuje výhodu v tom smyslu, že separační a sprejovací potenciály mohou být zvoleny nezávisle na sobě, což nahrává snazší optimalizaci podmínek, které tolik nelimitují CE separaci, ionizaci analytu nebo jeho detekci [50, 51].

Oba elektrické obvody musí být uzavřeny, a proto vznikají různé strategie, podle nichž se volí společný referenční bod pro uzemnění, který usměrňuje rozdíly v proudech protékajících oběma obvody. U výrobců MS, jako jsou Agilent Technologies a Bruker Daltonics, je uzemnění elegantně zvolené u společné elektrody pro CE a ESI, což umožňuje nezávislou volbu podmínek pro separaci a sprejování. U Thermo Fisher Scientific a jiných se podmínky musí volit pečlivě. Uzemnění je totiž až u vstupní části analyzátoru. Následkem toho jsou oba okruhy na sobě závislé a vhodné napětí se musí dopočítat [52].

Vzhledem ke společné elektrodě CE a ESI bylo vyvinuto několik druhů spojovacích modulů (*interface*), díky nimž jsou elektrické obvody uzavřeny různými způsoby. Některé typy interface se dočkaly komercializace a nachází své uplatnění v praxi, nejčastěji klinické, nicméně většina z nich jsou stále předmětem výzkumů s cílem tuto problematiku zdokonalit. Obecně je možné je rozlišit do tří základních skupin: interface s přídavným tokem kapaliny (*sheath liquid interface*), interface bez přídavného toku kapaliny (*sheathless interface*) a interface s vodivým kapalným spojením (*liquid junction interface*). Speciální skupinou jsou miniaturizované CE systémy, které pro MS buď přímo generují sprej, nebo mají integrovaný emitor [53].

1.4.1 Interface s přídavným tokem kapaliny

Interface s přídavným tokem kapaliny v podstatě odstartoval trend hledání ideálního spojení pro CE-MS a dodnes se řadí k nejčastěji komercializovaným doplňkům pro tuto žádanou instrumentaci. Tento přístup využívá přídavné vodivé kapaliny, která je konstantně čerpána k ústí separační kapiláry, kde se mísí s elektrolytem, aby zajistila potřebný průtok pro stabilní ESI sprejování. Díky této strategii není sprejování závislé na EOF, a tak uživatel není tolik svázán složením základního elektrolytu. ESI sprejování zároveň podporuje koaxiálně přiváděný nebulizační plyn. Zjednodušené uspořádání zobrazuje obrázek 1.10 [51].



Obrázek 1.10 – Uspořádání interface s koaxiální přídavnou kapalinou, převzato a upraveno z [51]

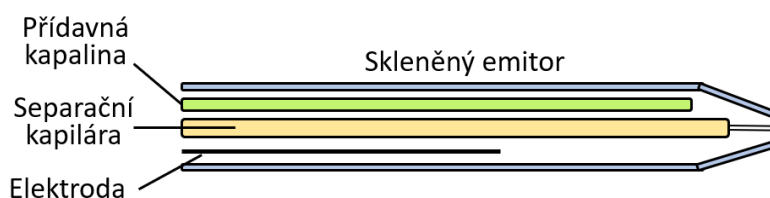
Další konstrukční výhodou této sestavy je, že přídavná kapalina uzavírá elektrický okruh pro CE, jelikož je v kontaktu s kovovou trubicí, na níž se přivádí napětí pro ESI. Tato vnější kovová trubice je nejčastěji z platiny, aby během elektrochemických procesů nedocházelo k její oxidaci, která by způsobovala ucpání separační kapiláry nebo by vytvářela komplexy s analyzovanými ionty a snižovala by tak citlivost detekce [53].

Pro získání nejvyšší ionizační účinnosti a kompatibility s elektrolytem je důležité optimalizovat složení přídavné kapaliny. Ta se nejčastěji skládá z organického rozpouštědla, které napomáhá ionizaci a snižuje povrchové napětí, smíchaného s malým množstvím těkavé kyseliny nebo báze, jejichž úkolem je (de)protonovat molekuly analytu. Vhodným složením je mírně kompenzováno ředění rozdělených zón. Ředění se projevuje z důvodu velkého rozdílu mezi průtokem přídavné kapaliny, který je v rozmezí 1 až 10 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$, a průtokem elektrolytu v separační kapiláře, který dosahuje 20 až 100 $\text{n}\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ [50, 51].

Pro získání lepších detekčních limitů byl navržen interface operující v podobném uspořádání, tentokrát bez trubice pro nebulizační plyn, kdy separační kapilára je vložena

do zužujícího se emitoru s vnitřním průměrem 2–10 μm . Jde o uspořádání ne tolik komerčně rozšířené, ale možné pro sestavení v laboratoři, které získalo název nanoESI interface nebo také interface se spojením ve špičce (*junction-at-the-tip interface*). Výhodou nanoESI je možnost snížit průtoky přídavné kapaliny, kdy separované zóny nejsou tolik ředěny jako v případě první možnosti, a dosáhnout lepší ionizace vlivem menšího průměru nabitých kapek formujících na výstupu emitoru, což souvisí s menším tvarem spreje (Taylorovým kuželem) [50, 53].

O první nanoESI interface se pokusili F. Hsieh a jeho skupina, která pro emitor využila nepokryté borosilikátové sklo, do něhož se vložily separační kapilára a kapilára pro přídavnou kapalinu napojená na externí rezervoár a elektroda pro ESI napětí [54].



Obrázek 1.11 – Uspořádání nanoESI podle Hsieha, převzato a upraveno z [54]

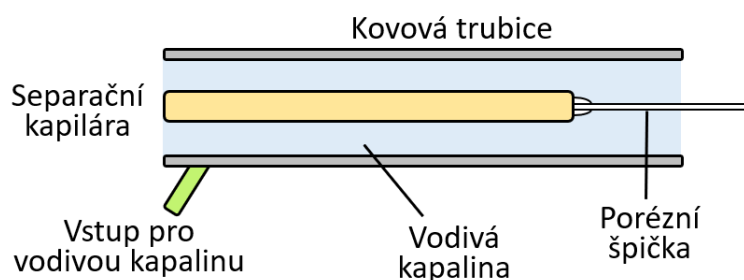
Od této sestavy se odvíjela skupina N. J. Dovichiho, jejichž interface má elektrodu vloženou do externího rezervoáru pro přídavnou kapalinu, která je napojená na emitor přes spojku tvaru T. Mezi elektrodou a emitorem vzniká potenciálový spád, který následně elektrokineticky nasává přídavnou kapalinu do emitoru. Skupina D. D. Y. Chena se pak pokusila nahradit skleněný emitor emitem z nerezové oceli. Průtok pomocné kapaliny pak snížili na $0,1 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ [55, 56].

1.4.2 Interface bez přídavného toku kapaliny

Interface bez přídavné kapaliny byl vytvořen jako pokus zcela eliminovat problém ředění analytu. Bez přídavné kapaliny je průtok potřebný na generování spreje řízen pouze tokem v separační kapiláře, proto složení základního elektrolytu musí splňovat podmínky jednak pro separaci a jednak pro ESI sprejování. Aby se na výstupu kapiláry vytvořil stabilní Taylorův kužel spreje, kapilára se na svém konci leptá nebo se po zahřátí vytahuje, aby se zmenšil její vnější průměr na přibližně 5 až 10 μm . Taková kapilára je vložena do kovové trubice, na kterou je přiváděno napětí pro ESI. Společný robustní elektrický kontakt mezi separační kapilárou a trubicí zajišťuje vodivá kapalina, nejčastěji

organická kyselina, která je z externího rezervoáru konstantně obměňována, aby se odstranily nechtěné produkty elektrochemického rozkladu [50].

Vzhledem k tomu, že zúžená špička kapiláry je porézní, do elektrolytu skrze stěnu separační kapiláry mohou procházet malé ionty z vodivé kapaliny. Tímto způsobem je vyřešeno uzavření elektrického okruhu pro CE a rovněž se tak předchází tvorbě bublinek v separační kapiláře po zapojení obvodu. Podle zúžené kapiláry byl interface pojmenován jako interface s porézní špičkou (*prous-tip interface*) a vychází z práce M. Moiniho. Interface je komerčně dostupný pod názvem CESI 8000 (Sciex). Jeho použití je však limitováno vnitřním průměrem separační kapiláry. Lze totiž použít kapiláry do vnitřního průměru 30 μm . Z hlediska citlivosti se pohybuje na podobné úrovni jako nanoESI s tím, že není tolik zatížen mrtvým objemem oproti některým sestavám nanoESI. Zjednodušené schéma interface s porézní špičkou je popsáno na obrázku 1.12 [51, 57].



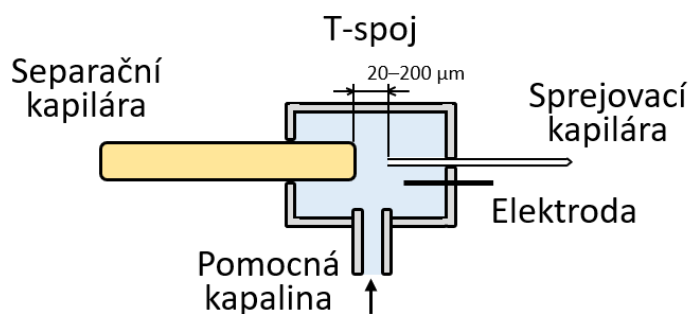
Obrázek 1.12 – Interface s porézní špičkou podle Moiniho, převzato a upraveno z [57]

Za zmínku stojí i první pokusy o uzavření elektrického obvodu potáhnutím nevodivé špičky separační kapiláry vodivým materiálem. Takové emitory disponovaly kovovým, grafitovým nebo polymerním povlakem, nicméně jejich životnost dosahovala pouze několika stovek hodin, a proto jsou stále předmětem testování [58].

1.4.3 Interface s vodivým kapalným spojením

Interface s vodivým kapalným spojením kombinuje předchozí dvě sestavy s důrazem na vyšší citlivost při použití přídatné kapaliny. Ta je zde označována jako pomocná kapalina (*makeup liquid*), přes kterou je uzavřen elektrický okruh pro CE. Pomocná kapalina musí být opět vodivého charakteru s podobným složením, jaké mají přídatné kapaliny u výše popsané problematiky. V T-spoji spojuje axiálně separační

kapiláru s emitorem pro ESI, jenž je jindy taktéž označován jako sprejovací kapilára, která je ocelová nebo z křemenného skla a má vnitřní průměr 10–50 μm . Tělo spoje může být zhotoveno ze skla nebo z polymerů (polypropylen, polysulfonát). Schéma této sestavy je popsáno na obrázku 1.13 [50, 53].



Obrázek 1.13 – Interface s vodivým kapalným spojením, převzato a upraveno z [44]

Přestože u tohoto interface byla snaha zachovat citlivost interface bez přidavné kapaliny, bohužel i zde dochází k rozšiřování zón. Přispívá k tomu mezera v T-spoji mezi kapilárami, která se pohybuje většinou v rozmezí 20–200 μm . K ní je vpravena elektroda pro ESI okruh. Pro správnou optimalizaci podmínek a zajištění reprodukovatelných výsledků je klíčové sladit správnou vzdálenost mezi kapilárami a zajistit homogenní mísení pomocné kapaliny s elektrolytem, což se nejčastěji provádí tlakově. I kvůli těmto důvodům nebyl tento typ spojení zatím úspěšně uveden na trh. Vývoj u tohoto interface v současné době směřuje k miniaturizaci, jelikož mikročipové sestavy by mohly nahradit T-spoje [50, 53, 58].

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Použité chemikálie

- 8-aminonaftalen-1,3,6-trisulfonová kyselina, ≥ 90 % (Sigma-Aldrich, USA)
- acetonitril, $\geq 99,9$ % (Sigma-Aldrich, Německo)
- amoniak, 20–22 % (Analytika, Česká republika)
- D-(+)-Maltóza hydrát, $\geq 99,0$ % (Sigma-Aldrich, USA)
- deionizovaná voda, připravena na Univerzitě Pardubice skrze Milli-Q Reference Water Purification System
- deionizovaná voda pro LC-MS (Sigma-Aldrich, USA)
- dihydrogenfosforečnan sodný, 99,6 % (J. T. Baker, Nizozemsko)
- dimethylsulfoxid, 99,9 % (J. T. Baker, Nizozemsko)
- ethanol, 96 % (Sigma-Aldrich, USA)
- hydrogenfosforečnan sodný, 99,5 % (Sigma-Aldrich, USA)
- hydrogenuhličitan amonný, pro LC-MS (Fluka, Německo)
- hydrogenuhličitan sodný, p. a. (Penta, Česká republika)
- hydroxid sodný, p. a. (Penta, Česká republika)
- isopropylalkohol (IPA), 99,5 % (Sigma-Aldrich, USA)
- kyanoborohydrid sodný, 95 % (Sigma-Aldrich, USA)
- kyselina fluorovodíková, 38–40 % (Penta, Česká republika)
- kyselina octová, 99,8 % (Fluka, Německo)
- kyselina sírová, 96 % (Sigma-Aldrich, USA)
- kyselina trihydrogenfosforečná, 85 % (Acros Organics, Belgie)
- maltooligosacharidový kit, DP 3–7 (Sigma-Aldrich, USA)
- methanol, 99,9 % (Sigma-Aldrich, USA)
- mravenčan amonný, $\geq 99,0$ % (Fluka, Německo)
- octan amonný, 98 % (Sigma-Aldrich, USA)
- tetraboritan sodný, 99,5 % (Lachema, Česká republika)
- thiomocovina, $\geq 99,0$ % (Sigma-Aldrich, USA)

2.2 Použité přístroje a vyhodnocovací programy

- analytické váhy H51-D (Sartorius, Německo)
- hmotnostní spektrometr maXis Impact ESI-TOF (Bruker Daltonics, Německo)
- interface G1607A CE-ESI-MS sprayer kit (Agilent Technologies, Německo)
- interface nanoCEasy, sestaven na Ústavu analytické chemie AV ČR
- kapilární elektroforéza Agilent 7100 CE (Agilent Technologies, Německo)
- kapilární elektroforéza Agilent CE G1600AX (Agilent Technologies, Německo)
- lineární dávkovač KDS 100 Series (KD Scientific, USA)
- magnetické míchadlo Topolino (IKA, Německo)
- pH metr Orion Star A111 (Thermo Fisher Scientific, USA)
- sušárna SICO-100 (Watrex Praha, původně SISw, Česká republika)
- stereoskopický mikroskop STM 722 (Euromex, Nizozemsko)
- stříkačkové filtry s póry 0,45 μm (VWR, Čína)
- ultrazvuková lázeň Sonorex Super RK (Bandelin, Německo)
- vortex Yellowline TTS2 (IKA, Německo)
- program Compass DataAnalysis 4.1 (Bruker Daltonics, Německo)
- program Excel 2024 (Microsoft Corporation, USA)
- program Chemstation G1601 (Agilent Technologies, Německo)
- program Origin 2025 (OriginLab Corporation, USA)
- program Statistica 14.0.0.15 (TIBCO Software, USA)

2.3 Příprava vzorků

Pro analýzu byly zvoleny oligosacharidy maltózového žebříčku – maltóza (M), maltotrióza (M3), maltotetraóza (M4), maltopentóza (M5), maltohexóza (M6) a maltoheptóza (M7). Tyto látky byly pomocí redukční aminace převedeny na deriváty značené ANTS podle postupu skupiny P. Česly [59], která vycházela z postupu původně publikovaného P. Jacksonem [60].

Pro derivatizaci byl připraven zásobní roztok ANTS o koncentraci $70 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ rozpuštěním příslušné navážky činidla v roztoku kyseliny octové a MiliQ deionizované vody 3:17 (v/v) a zásobní roztok kyanoborohydridu sodného o koncentraci $0,8 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ rozpuštěním požadované navážky v DMSO. Standardy maltózového žebříčku byly

připraveny navážením 1 mg každého z oligosacharidů do plastových zkumavek Eppendorf a do jednotlivých zkumavek bylo pipetováno 15 μ l zásobního roztoku ANTS a 15 μ l zásobního roztoku redukčního činidla. Reakční směsi byly vloženy do vzduchem vyhřívané sušárny nastavené na teplotu 40 °C po dobu 15 hodin. Po proběhnutí reakce byly zkumavky následně doplněny MiliQ vodou na 500 μ l a mezi dny uchovávány ve tmě v ledničce, při teplotě 4 °C.

2.4 Příprava elektrolytů

Během separací pomocí kapilární elektroforézy s UV-VIS detekcí bylo sledováno migrační chování derivatizovaných oligosacharidů v závislosti na složení různých elektrolytů. Pro popsání takových charakteristik byly zvoleny následující elektrolyty: tetraboritanový, fosfátový, octanový, mravenčanový a hydrogenuhličitanový. Ze značených standardů vzorků maltózy byly pro vlastní analýzu připraveny směšné vzorky, pokaždé zředěné padesátkrát jednotlivými elektrolyty o příslušné koncentraci a pH.

Elektrolyt tetraboritanu

Tetraboritanový elektrolyt byl připraven ve třech různých koncentracích 25 mM, 50 mM a 75 mM, všechny tři o stejném pH 9,5. Pro přípravu jednotlivých roztoků byl navážen $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ na analytických váhách a příslušné navážky pro každou z koncentrací byly rozpuštěny v malém množství MiliQ vody. Na předem zkalibrovaném pH metru bylo ověřeno jejich pH a případně upraveno malým množstvím roztoku NaOH na požadovanou hodnotu. Roztoky byly následně kvantitativně převedeny do 25ml odměrných baněk a doplněny po rysku. Elektrolyty byly před samotným měřením filtrovány skrze plastové stříkačkové filtry s 0,45 μ m póry a převedeny do plastových elektroforetických nádobek o objemu 1,5 ml.

Elektrolyt fosfátu

Fosfátové elektrolyty byly připraveny ve třech různých koncentracích 25 mM, 50 mM a 75 mM, všechny tři o kyselém a neutrálním pH.

Fosfátové elektrolyty o pH 2,5 byly připraveny navážením požadovaného množství $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ pro výše uvedené koncentrace a rozpuštěním v malém množství MiliQ vody. Na pH metru bylo ověřeno jejich pH a případně upraveno malým množstvím

H₃PO₄ na požadovanou hodnotu. Roztoky byly následně kvantitativně převedeny do 25ml odměrných baněk a doplněny po rysku. Dále se postupovalo jako v předchozím případě.

V případě fosfátových elektrolytů o pH 6,5 byly naváženy požadované navážky NaH₂PO₄·H₂O (kyselina) a Na₂HPO₄·2H₂O (báze) pro výše uvedené koncentrace a rozpuštěny v malém množství MiliQ vody. Na pH metru byla ověřena požadovaná hodnota pH a případně upravena přidavkem kyseliny nebo báze. Dále se postupovalo jako u předchozích pufrů.

Elektrolyt octanu amonného

Elektrolyty octanu amonného byly připraveny v koncentracích 10 mM, 30 mM a 50 mM, pokaždé o jednotném pH 6,5. Pro přípravu jednotlivých pufrů bylo naváženo potřebné množství octanu a rozpuštěno v malém množství MiliQ vody. Pro CE-MS analýzu byla navážka rozpuštěna ve vodě LC-MS kvality. Na pH metru byla ověřena požadovaná hodnota pH, která byla upravena malým přidavkem vodného roztoku amoniaku nebo kyseliny octové. Dále se postupovalo jako u předchozích pufrů.

Elektrolyt mravenčanu amonného

Elektrolyty mravenčanu amonného byly připraveny v koncentracích 10 mM, 30 mM a 50 mM, pokaždé o jednotném pH 6,5. Pro přípravu jednotlivých pufrů bylo naváženo potřebné množství mravenčanu a rozpuštěno v malém množství MiliQ vody. Na pH metru byla ověřena požadovaná hodnota pH, která byla upravena malým přidavkem vodného roztoku amoniaku nebo kyseliny mravenčí. Dále se postupovalo jako u předchozích elektrolytů.

Elektrolyt hydrogenuhličitanu amonného

Elektrolyty hydrogenuhličitanu amonného byly připraveny v koncentracích 10 mM, 30 mM a 50 mM, pokaždé o jednotném pH 8,0. Pro přípravu jednotlivých pufrů bylo naváženo potřebné množství hydrogenuhličitanu a rozpuštěno v malém množství MiliQ vody. Na pH metru byla ověřena požadovaná hodnota pH, která byla upravena malým přidavkem vodného roztoku amoniaku. Dále se postupovalo jako u předchozích elektrolytů.

2.5 Kapilární elektroforéza s UV-VIS detekcí

Migrační chování oligosacharidového žebříčku maltózy bylo zprvu analyzováno na kapilární elektroforéze od Agilentu, modul CE G1600AX, který byl vybaven detektorem diodového pole pro UV-VIS detekci (190–600 nm). Na základě výsledků měření byl vybrán optimální elektrolyt pro CE-MS analýzu.

2.5.1 Příprava kapiláry

Pro samotnou analýzu byla použita nepokrytá křemenná kapilára (Polymicro Technologies, USA) potažená elastickým polyimidem s vnitřním průměrem 50 μm a vnějším průměrem 375 μm o celkové délce 51 cm a o efektivní délce 42 cm.

Požadovaná délka kapiláry byla uříznuta diamantovým nožem po získání rovných řezů na koncích kapiláry. Detekční okénko bylo vytvořeno opálením polyimidu, jehož zbytky byly setřeny buničinou napojenou ethanolem. Takto připravená kapilára byla vložena do plastové kazety s vhodným UV-VIS interface odpovídající vnitřnímu průměru kapiláry.

Kapilára byla mezi měřícími dny kondicionována 1M NaOH po dobu 800 s, vodou MiliQ po dobu 600 s a základním elektrolytem po dobu 600 s, pokaždé při tlaku 930 mbar. Mezi měřeními byla kapilára promyta 1M NaOH po dobu 120 s, vodou po dobu 300 s a elektrolytem taktéž 300 s. Na konci měřícího dne byla kapilára promyta pouze vodou po dobu 600 s.

2.5.2 Podmínky separace

Do elektroforetické nádoby s kónickým dnem bylo pipetováno vždy 25 μl směsného vzorku zředěného příslušným elektrolytem. Jako marker EOF byl použit roztok thiomocoviny, jehož 0,1M zásobní roztok připravený z vypočtené navážky rozpuštěné v příslušném množství MiliQ vody byl 250krát zředěn. Podmínky měření se mírně měnily v závislosti na typu základního elektrolytu.

Pro fosforečnanový pufr o pH 2,5 bylo použito hydrodynamické dávkování 50 mbar po dobu 5 s. Teplota kapiláry byla udržována termostatem na 25 °C. S ohledem na minimální EOF, který se při tomto pH neuplatňuje, a tudíž je zanedbatelný, bylo zvoleno separační napětí –30 kV, –25 kV, –20 kV a –15 kV s negativní polaritou

na inletu u začátku kapiláry. Vlnová délka pro detekci při 220 nm, s šířkou 10 nm, byla zvolena na základě literatury [61, 62].

U ostatních pufrů bylo použito hydrodynamické dávkování 50 mbar po dobu 5–2,5 s. Teplota kapiláry byla udržována na 25 °C, u tetraboritanového elektrolytu byla separace provedena i za 20 °C. Separační napětí se vkládalo opět v rozsahu 30–15 kV, tentokrát s negativní polaritou na outletu u detektoru. Vlnová délka pro detekci byla vybrána obdobně.

2.6 Kapilární elektroforéza s MS detekcí

Ve druhé polovině experimentální části byly veškeré separace oligosacharidového žebříčku maltózy provedeny na přístroji Agilent 7100 CE, který byl spojen s ESI-TOF hmotnostním spektrometrem maXis Impact od společnosti Bruker Daltonics. V tomto uspořádání byly porovnány následující CE-MS spojení: v laboratoři sestavený nanoCEasy navržený skupinou J. Schlechta [63] a komerčně dostupný G1607A elektrosprej s trojitou trubicí (z anglického *triple tube sprayer*, dále jako TTS).

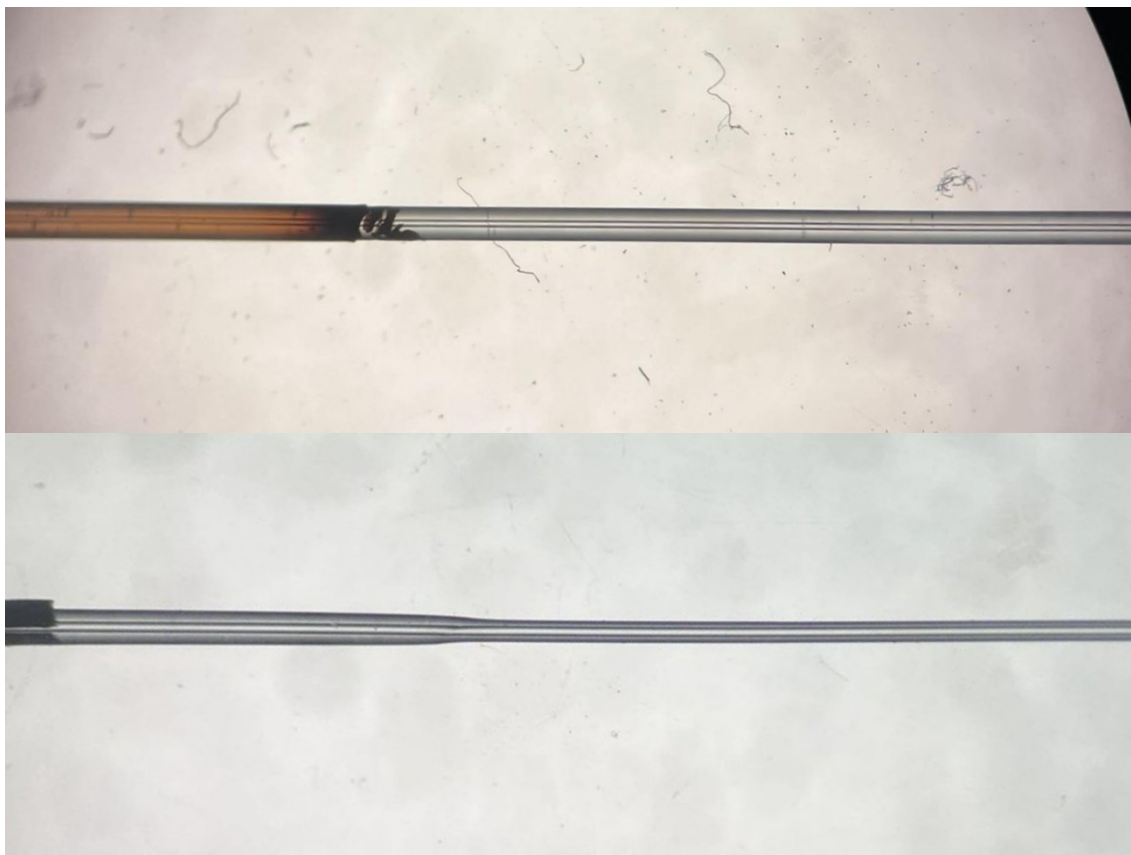
2.6.1 Příprava kapilár

Pro CE separace byly použity nepokryté křemenné kapiláry potažené polyimidem o vnitřním průměru 50 μm a vnějším průměru 375 μm o celkové délce 95 cm, později zkrácené na 73 cm. Konce kapilár se lišily v závislosti na typu CE-MS interface.

Úprava konců kapilár pro nanoCEasy a TTS

Diamantovým nožem byla uříznuta potřebná délka separační kapiláry. Pro nanoCEasy byly z jednoho z konců kapiláry odstraněny asi 3 cm polyamidového pokrytí pomocí pájky a koncentrované kyseliny sírové takovým způsobem, že ke kapce H_2SO_4 , která byla v kontaktu s polyimidem, se přiložila pájka. Konec kapiláry bez polyimidu byl opláchnut deionizovanou vodou, usušen a ucpán tavným lepidlem. Takto nachystaný konec kapiláry pro leptání byl ponořen do roztoku HF 38–40 % (v/v). Pro nanoCEasy je potřeba snížit vnější průměr kapiláry na $\leq 150 \mu\text{m}$, aby bylo možné vložit separační kapiláru do emitoru co nejbližší k jeho špičce, čehož bylo dosaženo po 1,5 hodině leptání, jak ukazuje obrázek 2.1. Po odleptání byl konec kapiláry ponořen do nasyceného roztoku NaHCO_3 kvůli zneutralizování zbytkové HF na kapiláře a opláchnut deionizovanou vodou. Ucpaný konec tavným lepidlem byl pomocí žiletky

odříznut. Tento závěrečný krok byl prováděn pod mikroskopem kvůli dosažení rovného řezu na kapiláře, který je důležitý pro získání stabilního spreje.

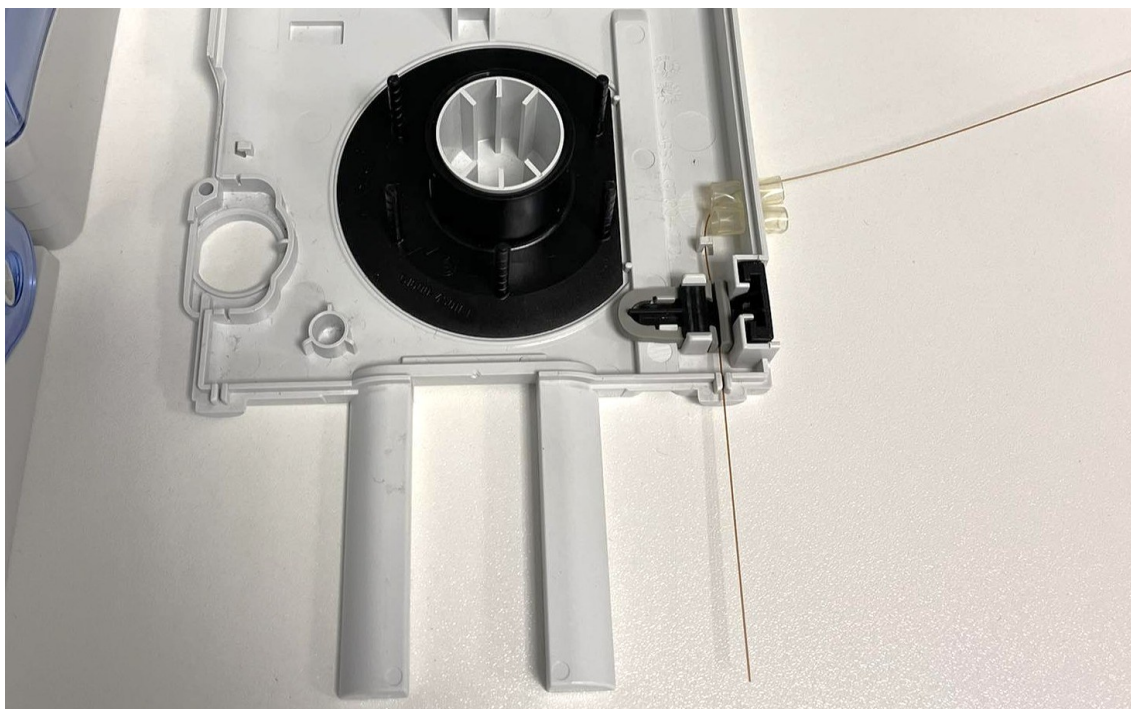


Obrázek 2.1 – Část konce separační kapiláry zvětšená pod mikroskopem před leptáním (horní), po leptání (spodní), zvětšeno 20x

Z konce separační kapiláry pro TTS interface byl odstraněn polyamidový povlak opět o délce 3 cm stejným způsobem jako v předchozím případě. Kapilára však nebyla leptána, žiletkou byl pouze proveden rovný řez, který byl kontrolován pod mikroskopem.

Obě kapiláry byly následně očištěny isopropylalkoholem a vloženy do plastové kazety tak, že v záložkách kazety byl upevněn pouze druhý konec kapiláry bez odstraněného polyimidu a zarovnán podle konců kazety, jak je uvedeno na obrázku 2.2.

Mezi měřicími dny byly obě kapiláry kondicionovány 1M NaOH po dobu 1800 s, vodou LC-MS kvality po dobu 800 s a 50mM octanem amonným s pH 6,5 po dobu 800 s, vždy mimo interface při tlaku 930 mbar. Mezi měřeními, kdy kapiláry zůstávaly zavedené v interface, se kapiláry promývaly octanem amonným po dobu 300 s. Na konci dne byly kapiláry promyty vodou LC-MS kvality po dobu 800 s.



Obrázek 2.2 – Způsob vložení separační kapiláry do kazety pro CE-MS

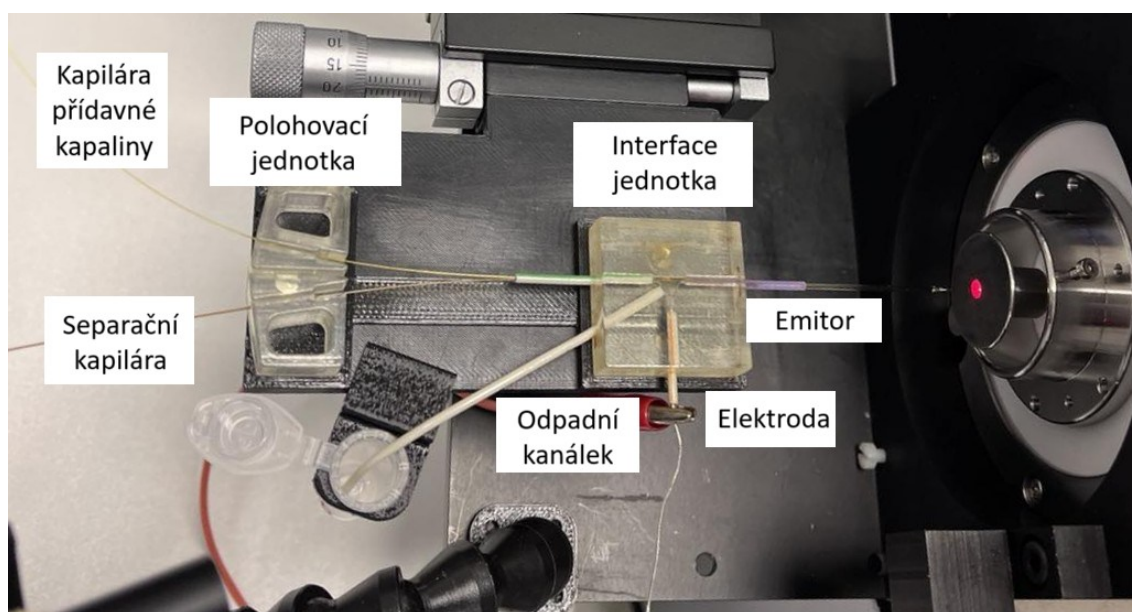
2.6.2 Uspořádání nanoCEasy

NanoCEasy patří mezi zástupce nanoESI interface s přídatným tokem kapaliny, který je se vstupním otvorem MS zarovnan v ose, konfigurace spreje je tedy axiální. Interface se skládá z polohovací jednotky a interface jednotky, obě umístěné do bloků z polyoxymethylenu, jak je zobrazeno na obrázku 2.3.

Polohovací jednotka disponuje třemi žlábkami. Středový slouží k zavedení separační kapiláry a kapiláry pro přídatnou kapalinu do emitoru, zato boční velikostně odpovídají průměrům kapilár, čímž je možné kapiláry upevnit vůči jejich poloze v emitoru. Uchycení kapilár není zcela fixní, což představuje jednu z velkých výhod pro tento typ interface. Kapilárami lze bez velké obtíže ručně pohybovat. Pakliže je separační kapilára blíže špičce emitoru oproti kapiláře pro přídatnou kapalinu, elektrolyt s analyty je sprejován a veden do MS. V případě, že se pozice kapilár vymění, elektrolyt je unášen do odpadu a separační kapiláru je možné kondiciovat, aniž by byl MS zanesen nebo by došlo k ucpání emitoru. Jedná se o přenesený koncept z LC, kde se přepínáním ventilů ve smyčkovém dávkovači řídí dávkování vzorku.

Interface disponuje vstupy pro obě kapiláry, elektrodu, emitor a rovněž má odpadní kanálek pro přebytečnou kapalinu. Všechny tyto cesty se schází v malé dutině, která je na středu jednotky. Pakliže se v ní formují bublinky z důvodu vysokého napětí

vloženého na elektrodu, přebytečná přídavná kapalina se odvádí přes odpadní kanálek do odpadní zkumavky. Jednotlivé komponenty jsou upevněné na jednotku skrze termoplastické polymerní spojky. Vstupy pro kapiláry a emitor jsou v jedné ose pro jednoduchou manipulaci při vsouvání a vysouvání kapilár. Polohy kapilár v emitoru byly sledovány přes připojenou kameru. Pro výměnu emitoru se kapilára pro přídavnou kapalinu stáhne do dutiny a separační kapilára se zcela vysune, aby nedošlo k ulomení její zúžené špičky.



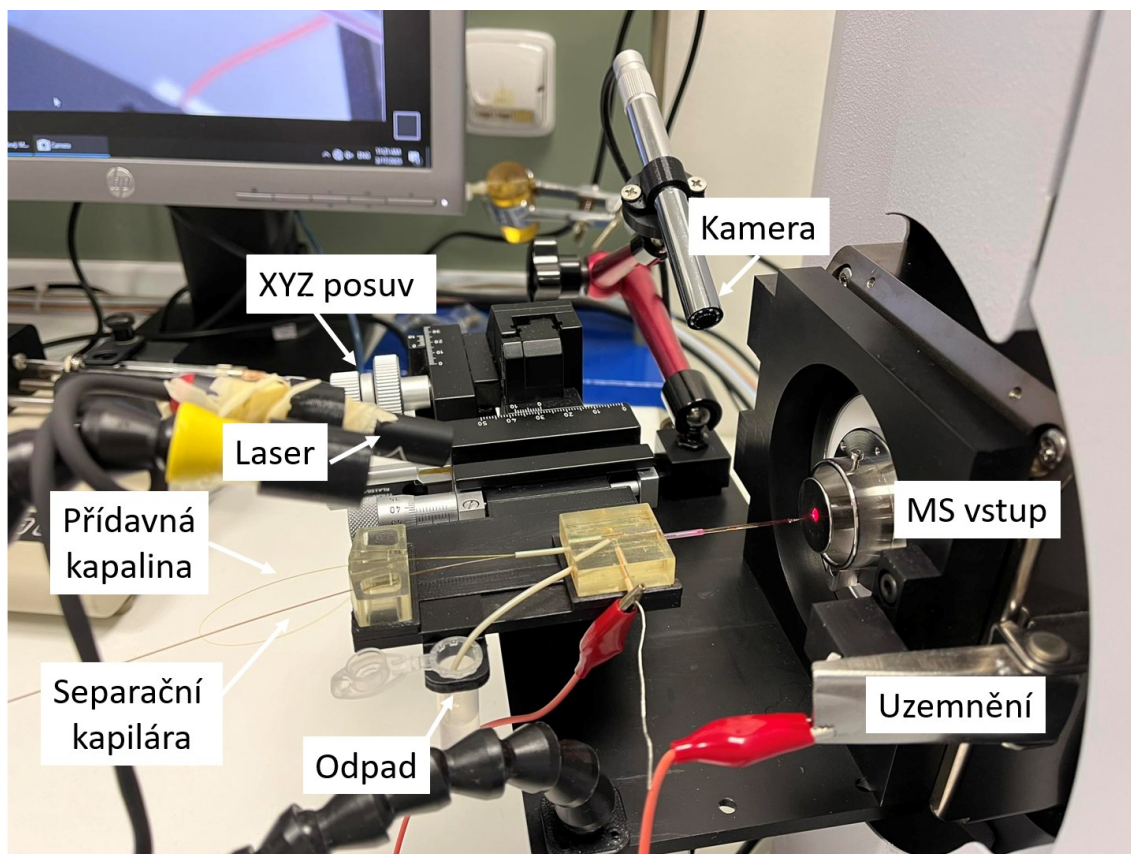
Obrázek 2.3 – Popis základní sestavy nanoCEasy interface

U nanoCEasy interface byl použit borosilikátový skleněný emitor s vnitřním průměrem 780 μm , který je na špičce zúžen na 30 μm (BioMedical Instruments Německo). Pro přídavnou kapalinu byla použita nepokrytá křemenná kapilára (Polymicro Technologies, USA) o přibližné délce 25 cm s vnějším průměrem 245 μm a s vnitřním průměrem 100 μm . Kapilára byla spojena s mikrostříkačkou (Hamilton, USA) s 500 μl objemem, pomocí níž byla kontinuálně přiváděna přídavná kapalina do emitoru. Stálý průtok přídavné kapaliny byl korigován na lineárním dávkovači. Na začátku a konci každého měřicího dne byl celým objemem mikrostříkačky promyt emitor čistým isopropylalkoholem. Interface i mikrostříkačka v dávkovači byly umístěny přibližně ve stejné výškové úrovni.

Pro interface byly testovány různé kombinace přídavné kapaliny. Jejich příprava spočívala ve smíchání daných objemů roztoků, které byly následně odvzdušněny

v ultrazvukové lázni. Zkoušené roztoky pro přídatnou kapalinu jsou uvedené v kapitole 3.2.2, která je součástí výsledkové části.

Interface byl posazen na platformě, kterou bylo možné pohybovat ve všech třech osách X, Y, Z, díky čemuž se zarovnávala poloha emitoru axiálně se vstupem do MS. Po nalezení optimální sprejovací polohy se mezi měřeními vzdálenost mezi vstupem MS a emitorem neměnila. Celkové zapojení interface je zobrazeno na obrázku 2.4.



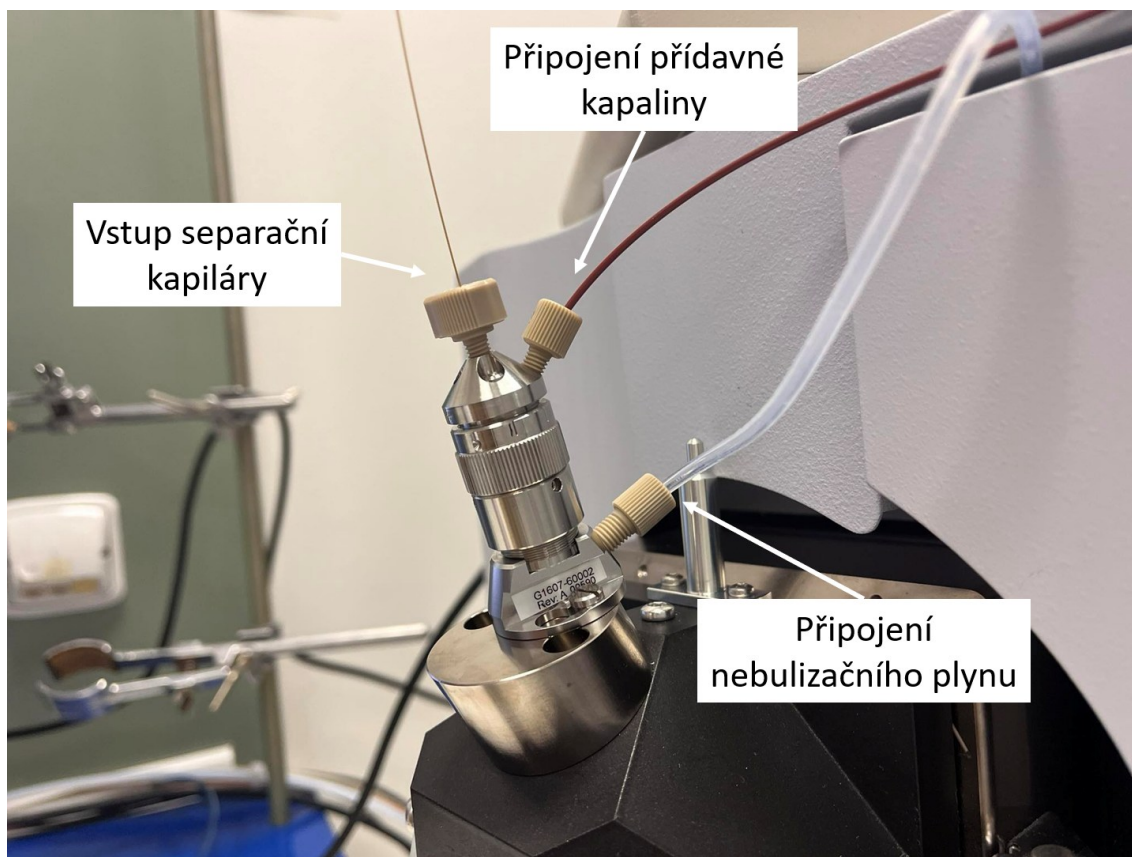
Obrázek 2.4 – Zapojení nanoCEasy axiálně k TOF

2.6.3 Uspořádání elektrospreje s trojitou trubicí

Jak bylo uvedeno výše, TTS je jeden z mála komerčně dostupných interface pro CE-MS separace. Jde rovněž o techniku s přídatným tokem kapaliny v ose, poprvé popsanou skupinou R. D. Smitha [64], později uvedenou na trh firmou Agilent Technologies.

TTS je sestaven celkově ze tří trubic, jak ukazuje obrázek 2.5. Vnitřní částí je vedena separační kapilára tak, že vyčnívá ze špičky spreje. Na ni navazuje trubice pro přídatnou kapalinu, která se na výstupu jehly mísí s elektrolytem ze separační

kapiláry a uzavírá elektrický obvod. Vnější třetí trubice nejbližší kovovému tělu spreje pak konečně přísluší nebulizačnímu plynu. Zdroj napětí pro ESI sprejování se vkládá na vstupu MS.



Obrázek 2.5 – Zapojení TTS ortogonálně k TOF

Ve snaze snížit šum, zabránit falešným zónám a zajistit stabilní sprejování se separační kapilára zaváděla do TTS, aby vyčnívala z ESI jehly ve vzdálenosti 0,1 mm, což bylo kontrolováno pod mikroskopem. Spojovacími hadičkami se připojily N₂ jako nebulizační plyn a přídatná kapalina, která byla opět izokraticky přiváděna skrze lineární dávkovač s mikrostríkačkou. Na začátku a konci každého měřícího dne byla celým objemem mikrostríkačky promyta ESI jehla čistým isopropylalkoholem. Ta nebyla umístěna ve stejné výškové úrovni, ale byla položena níže oproti přívodu přídatné kapaliny. Poloha ESI jehly ortogonálně chránila MS vstup před zanesením neutrálními částicemi a velkými kapkami, které se sporadicky objevovaly na výstupu jehly. Výška stolu nesoucího CE instrumentaci byla nastavena tak, aby hladina elektrolytu ve vstupní vialce korespondovala s úrovní hladiny elektrolytu na výstupu separační kapiláry. Stejná výška stolu byla ponechána i u měření s nanoCEasy interface.

2.6.4 Separační a detekční podmínky

Vzorky byly dávkovány hydrodynamicky při 50 mbar po dobu 10 s, po čemž následoval oplach elektrody vodou LC-MS kvality a za účelem stabilizace ionizace byla za vzorkem nadávkována tlakem 50 mbar po dobu 5 s krátká zóna elektrolytu 50 mM octanu amonného s pH 6,5, zvoleného pro CE-MS separace. Všechny separace probíhaly při teplotě 25 °C a separační napětí s vystoupaním po 0,1 min dosahovalo 30 kV, s proudovým tokem 46–50 μA . Maximální práh pro proud byl nastaven na 50 μA . Během separace byl aplikován vnitřní tlak 30 mbar v 0,5 min od začátku separace. Konečné podmínky pro výše popsané interface a MS detekci v negativním módu jsou uvedené níže.

NanoCEasy interface:

- přídavná kapalina: isopropylalkohol, octan amonný 50 mM pH 6,5 1:1 (v/v)
- tok přídavné kapaliny: 400 $\mu\text{l}\cdot\text{h}^{-1}$
- ESI napětí: 2,5 kV
- Sušící plyn: N_2 , průtok 4 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$
- Teplota sušícího plynu: 150 °C
- Rozsah hmot (m/z): 240–2000
- Kvadrupólový filtr: 300 m/z nejnižší, energie iontů 5 eV
- Skenovací rychlost: 1 Hz

TTS interface:

- přídavná kapalina: isopropylalkohol, octan amonný 50 mM pH 6,5 1:1 (v/v)
- tok přídavné kapaliny: 400 $\mu\text{l}\cdot\text{h}^{-1}$
- ESI napětí: 4,5 kV
- Sušící plyn: N_2 , průtok 4 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$
- Teplota sušícího plynu: 150 °C
- Nebulizační plyn: N_2 , 0,6 bar
- Rozsah hmot (m/z): 240–2000
- Kvadrupólový filtr: 300 m/z nejnižší, energie iontů 5 eV
- Skenovací rychlost: 1 Hz

3 VÝSLEDKY A DISKUZE

3.1 Elektromigrační charakteristiky derivatizovaných oligosacharidů

K derivatizaci oligosacharidového žebříčku maltózy byla použita značka ANTS, která v širokém rozmezí pH vykazuje stabilní záporný náboj vzhledem ke svým třem záporným sulfonovým skupinám, prakticky vždy disociovaným. Oligosacharidům tak přidává fixní záporný náboj, díky němuž mají vysokou elektroforetickou pohyblivost s vektorem orientovaným proti EOF. Efektivní pohyblivost oligosacharidů μ_i byla vypočtena pomocí vztahu 3.1:

$$\mu_i = \frac{l_t \cdot l_d}{U \cdot t_i} - \mu_{EOF} \quad (3.1)$$

kde l_t je celková délka kapiláry, l_d je efektivní délka kapiláry, tedy v jaké délce je detekční okno pro detektor, U je napětí vložené na kapiláru a t_i je migrační čas látky. μ_{EOF} představuje pohyblivost elektroosmotického toku, k jejíž zjištění byl použit roztok thiomochoviny (TM), jejíž migrační čas t_{EOF} byl měřen zvlášť oproti smíšenému vzorku oligosacharidů. μ_{EOF} byl vypočten podle vztahu 3.2:

$$\mu_{EOF} = \frac{l_t \cdot l_d}{U \cdot t_{EOF}} \quad (3.2)$$

Účinnost separací N , jinými slovy počet teoretických pater vztažený na kapiláru, byla vypočtena z migračního času látky t_i a z šířky zóny v polovině její výšky $w_{1/2}$ podle vztahu 3.3:

$$N = 5,545 \cdot \left(\frac{t_i}{w_{1/2}}\right)^2 \quad (3.3)$$

Výška teoretického patra H normalizuje účinnost na jednotku délky. Čím je délka patra menší, znamená to, že zóna je efektivněji separovaná. Pro porovnání separací za různých podmínek byla výška teoretického patra vztažena k μm a vypočtena podle vztahu 3.4:

$$H = \frac{l_d}{N} \cdot 10^6 \quad (3.4)$$

Píková kapacita n_c byla zjišťována jako další klíčový parametr pro popis separací maltózového žebříčku. Je mírou toho, kolik zón je teoreticky možné rozdělit v jedné rámci separace, aniž by se vzájemně překrývaly. Za předpokladu, že zóny mají Gaussovský tvar, byla průměrná $w_{1/2}$ přepočtena na šířku zóny při základně w a pro n_c byl

použit vztah 3.5:

$$n_c = 1 + \frac{t_z - t_1}{1,7 \cdot \bar{w}_{1/2}} \quad (3.5)$$

kde t_z je migrační čas poslední zóny a t_1 je migrační čas první zóny.

Pro určení, jak dobře jsou od sebe dvě separované látky rozdělené, bylo počítáno i rozlišení R podle vztahu 3.6:

$$R = \frac{2 \cdot (t_2 - t_1)}{w_2 + w_1} \quad (3.6)$$

kde t_2 je migrační čas látky 2, která migruje později, t_1 je čas látky 1, která migruje dříve a $w_{1,2}$ jsou šířky zón při jejich základně.

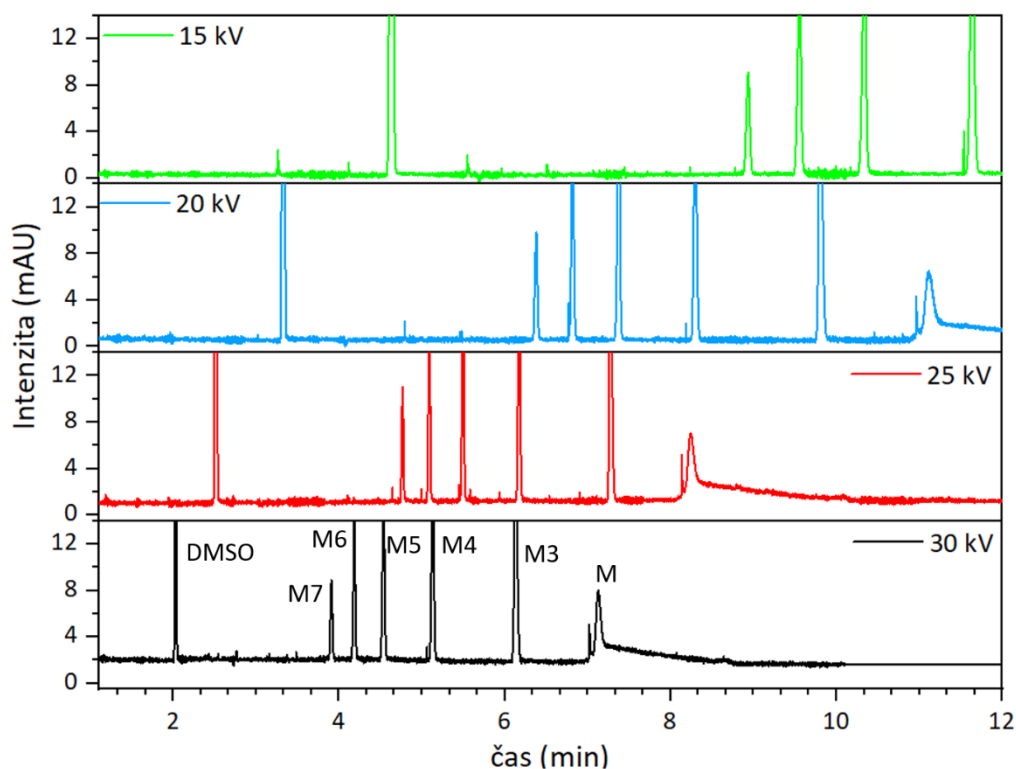
3.1.1 Tetraboritanový elektrolyt

S analýzou sacharidů jsou hodně spjaty borátové pufrы s vyšším pH, a má to svůj opodstatňující důvod. Kyselina boritá nebo tetraboritan se v alkalickém prostředí nejčastěji vyskytují ve formě tetrahydroxyborátového aniontu $B(OH)_4^-$. Volné OH skupiny tetrahydroxyborátu následně reagují s hydroxylovými skupinami sacharidu a vážou tak sacharid do komplexu s borátem, vlivem čehož sacharid nabývá záporného náboje. Komplexace je stabilnější, jsou-li vzdálenosti OH skupin na sacharidu a borátovém aniontu podobné. S rostoucím počtem OH skupin na sacharidu je komplexace silnější a celkový náboj molekuly vyšší, což se promítá i do rostoucího počtu monosacharidových jednotek oligosacharidu.

Oligosacharidy maltózového žebříčku byly separovány podle různé velikosti sacharidových řetězců a podle celkového náboje, který se sestává ze tří sulfonových skupin od značky ANTS na redukujícím konci oligosacharidů a z různých forem borátových komplexů. Vzhledem k zápornému náboji molekul byla pro separace použita nepokrytá kapilára, na jejíž negativně nabitě vnitřní stěně se nepředpokládala adsorpce molekul, která by jinak zatěžovala účinnost separace. Polarita elektrody u nástřikového konce byla zvolena pozitivní a elektroda u detektoru vystupovala jako katoda. Separace v borátovém pufru o pH 9,5 byla ovlivněna EOF, který záporně nabitě oligosacharidy s opačně orientovaným vektorem elektroforetické pohyblivosti unášel k detektoru. V borátovém pufru byly optimalizovány podmínky: separační napětí vkládané na elektrody, teplota kapiláry a koncentrace elektrolytu.

Optimalizace separačního napětí

Na elektrody bylo postupně vkládáno napětí 15 kV, 20 kV, 25 kV a 30 kV při teplotě kapiláry 25 °C a dávkování 50 mbar po dobu 5 s. Koncentrace borátového pufru byla 25 mM. Směsný vzorek standardů maltózové řady byl 50x zředěn borátovým pufrům. Výsledné elektroforeogramy jsou zobrazeny na obrázku 3.1.



Obrázek 3.1 – Elektroforeogram ANTS maltózového žebříčku maltoheptóza (M7), maltohexóza (M6), maltopentóza (M5), maltotetraóza (M4), maltotrióza (M3) a maltóza (M) při 25 °C, dávkování 50 mbar 5 s, $l_t = 51$ cm, $l_d = 42$ cm, borát 25 mM pH 9,5

Jako první k detektoru migruje neutrální DMSO, který je součástí derivatizační směsi. Dále je detekována celá maltózová řada, což je umožněno díky tomu, že EOF má vyšší hodnotu pohyblivosti v porovnání s absolutními hodnotami pohyblivosti jednotlivých oligosacharidů. Vypočtené pohyblivosti látek jsou uvedené v tabulce 4.1, která je součástí přílohy A. Z maltózové řady nejdříve migruje maltoheptóza a další oligosacharidy migrují podle sestupné molekulové hmotnosti. Maltoheptóza tvoří s borátem nejvíce stabilních komplexů a má tedy i nejvyšší náboj. Se sedmi glukózovými jednotkami má současně největší poloměr, a proto je její efektivní pohyblivost k anodě menší v porovnání s nejmenší maltózou. Kvůli převažujícímu EOF maltoheptóza migruje v opačném směru ke katodě s vyšší výslednou zdánlivou elektroforetickou pohyblivostí,

než se kterou migrují menší oligosacharidy, méně komplexované borátem. Z tabulky 4.1 je současně vidět, že velikost EOF mírně klesá s klesajícím napětím. Důležité je zmínit, že thiomocovina byla měřena zvlášť, a tak mohlo dojít k malým posunům v migračních časech i z toho důvodu.

Přestože jsou koncentrace standardů stejné, výšky zón jsou různé v závislosti na podélné difuzi. Čím později látka migruje, tím více se její zóna rozšíří, a naopak se sníží její výška, jak je vidět u maltózy. Současně by rozdíly ve výškách zón mohly být způsobeny různými absorpčními maximy v závislosti vazby ANTS k různě dlouhému glukózovému řetězci. Absorpční maximum samotné ANTS bývá posunuto k nižším vlnovým délkám, než když je vázaná. Zóna samotné značky se na elektroforeogramu neobjevuje, neboť ANTS má podle poměru náboje a hydrodynamického poloměru vyšší vlastní pohyblivost k anodě, než je pohyblivost EOF ke katodě.

Nejvyšší počet teoretických pater s nejnižší výškou patra a s nejvyšší píkovou kapacitou byl zjištěn u separace s 20kV vkládaným napětím, jak uvádí tabulka 3.1.

Tabulka 3.1 – Vliv napětí na separační charakteristiky, borát 25 mM, 25 °C

| U (kV) | N ¹ | H ¹ (μm) | n _c | I ² (μA) |
|--------|----------------|---------------------|----------------|---------------------|
| 30 | 41 829 | 10,9 | 35 | 68,8 |
| 25 | 171 403 | 3,8 | 49 | 52,6 |
| 20 | 222 326 | 2,8 | 57 | 39,1 |
| 15 | 176 395 | 2,9 | 55 | 27,5 |

¹ průměrná hodnota, n = 6

² průměrná hodnota, n = 4

Vyšší napětí sice vede ke kratším migračním časům, ale elektrolytem zároveň protéká vyšší proud. Elektrická energie se částečně převádí na Joulovo teplo, které zvyšuje teplotní gradient podél kapiláry a vede k nerovnoměrnému EOF, k rozšiřování zón a k nižší účinnosti. U nižšího napětí je průběh separace časově delší a v kombinaci s podélnou difuzí jsou zóny rozptýlenější, což rovněž snižuje účinnost. Optimálním zvoleným napětím by bylo 20 kV, které nabízí kompromis mezi účinností a dobou separace, která běží necelých jedenáct minut.

Optimalizace teploty

V borátovém pufru o koncentraci 25 mM byly rovněž změřeny záznamy s teplotou kapiláry temperovanou na 20 °C, při různých separačních napětích. Ostatní podmínky separace zůstaly nezměněny. Vypočtené separační charakteristiky při různých

separačních napětí jsou uvedeny v tabulce 4.2, která je součástí přílohy A. Z nich je patrné, že s nižší teplotou je pohyblivost EOF nižší, což souvisí s vyšší viskozitou elektrolytu. Vzhledem k vyšší viskozitě má elektrolyt i vyšší odpor, vlivem čehož se v systému generuje více Joulova tepla, přestože kapilárou prochází nižší proudy než v případě separací při 25 °C. Z důvodu těchto kombinací, které ovlivňují výsledný průběh separace, je nejvyšší účinnosti dosaženo při 15 kV, tedy při nižším napětí v porovnání s předchozí teplotou, viz tabulka 3.2.

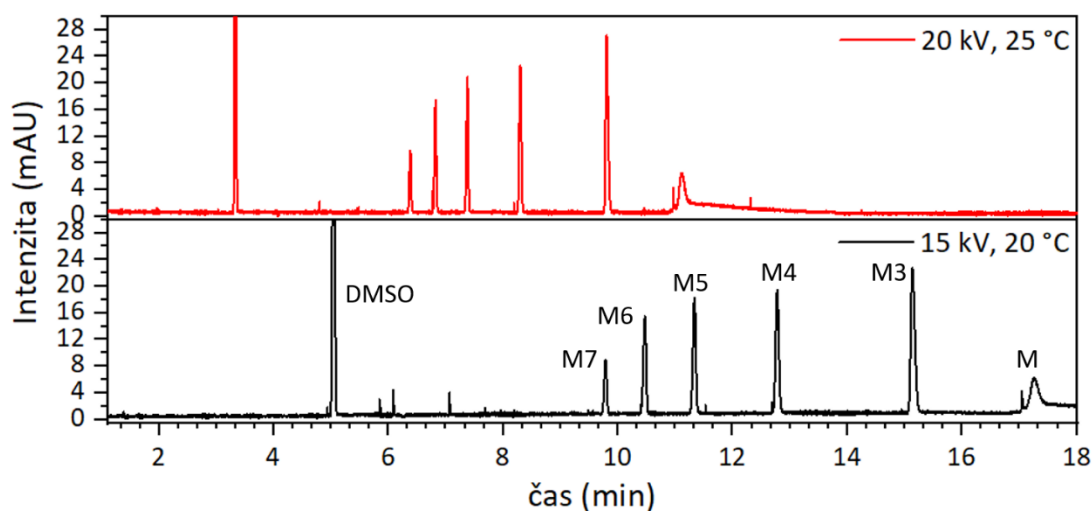
Tabulka 3.2 – Vliv napětí na separační charakteristiky, borát 25 mM, 20 °C

| U (kV) | N ¹ | H ¹ (μm) | n _c | I ² (μA) |
|--------|----------------|---------------------|----------------|---------------------|
| 30 | 37 924 | 11,4 | 38 | 57,7 |
| 25 | 92 839 | 4,9 | 42 | 49,1 |
| 20 | 123 621 | 4,7 | 46 | 34,5 |
| 15 | 152 016 | 4,1 | 52 | 25,0 |

¹ průměrná hodnota, n = 6

² průměrná hodnota, n = 4

Celkově lepší separace a vyšší účinnosti je stále dosaženo při teplotě 25 °C s vkládaným napětím 20 kV. Srovnání obou nejúčinnějších separací za různých teplot je uvedeno na obrázku 3.2.



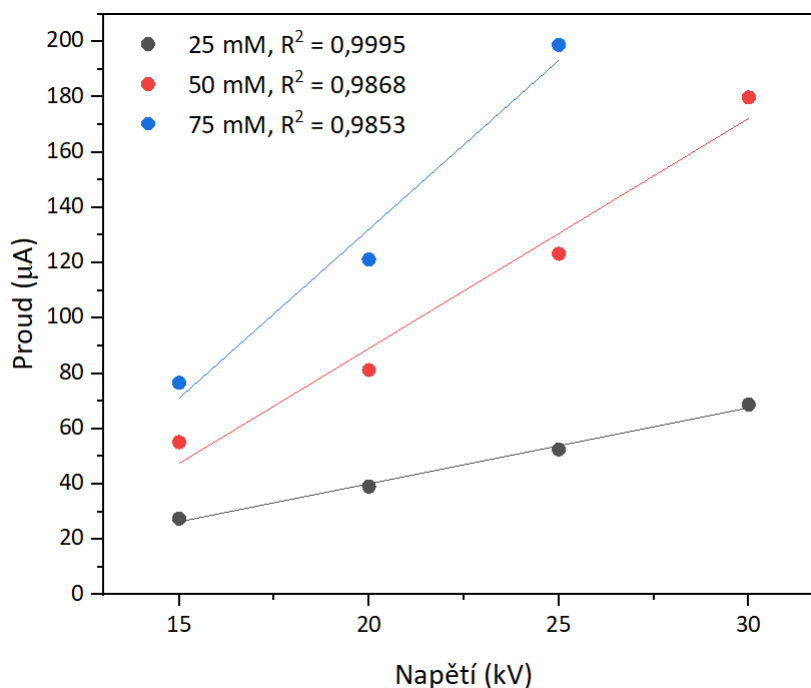
Obrázek 3.2 – Porovnání nejúčinnějších separací v borátu 25 mM při různých teplotách

Optimalizace koncentrace elektrolytu

Při teplotě 25 °C, za nezměněných podmínek byly separovány derivatizované standardy maltózového žebříčku v elektrolytech borátu o koncentracích 50 mM a 75 mM. Vyšší koncentrace elektrolytu vedou k silnějšímu komplexování borátu a oligosacharidu, vlivem čehož oligosacharidy nabývají vyššího náboje a vyšší efektivní pohyblivosti.

Ve výsledku jim však trvá migrace k detektoru podstatně delší dobu. Vyšší koncentrace borátu by byly vhodné pro komplexnější vzorky sacharidů, kdy by bylo možné rozlišit více látek v delším časovém intervalu. S klesající molekulovou hmotností analyzovaných látek roste ve vyšších koncentracích elektrolytu rozlišení. U 25 mM borátu nedochází k tak silné komplexaci, a sacharidy s nižším počtem jednotek se proto výrazně neliší ve svých pohyblivostech. Rozlišení se sice zvyšovalo k maltorióze, ale mezi maltotriózou a maltózou ukazuje zhoršení, viz tabulka 4.1.

Koncentrované borátové elektrolyty interagují se sacharidy poměrně dobře, nicméně vyšší iontová síla elektrolytu přináší řadu jiných negativních vlivů pro samotnou separaci, které celkově převažují. Významným negativem jsou vyšší proudové toky kapilárou, které se s rostoucím vkládaným separačním napětím na elektrody odchyľují od lineárního trendu a které by mohly při překročení limitu poškodit přístrojovou techniku. U koncentrace 75 mM borátu nebylo možné dosáhnout 30 kV separačního napětí, aniž by došlo k překročení maximálního prahu pro proud, který byl nastaven na 200 μA . Závislost proudu na napětí při různé koncentraci pufru popisuje obrázek 3.3.



Obrázek 3.3 – Závislost proudové odezvy na různém separačním napětí v borátu 25 mM, 50 mM a 75 mM

Účinnost separace také zatěžují nežádoucí teplotní gradienty, které se v doprovodu vyšších proudů mohou vyskytovat podél kapiláry. Z tabulek 4.3 (50 mM borát) a 4.4 (75 mM borát) je vidět, že EOF je citlivější na změny separačního napětí.

S klesajícím napětím výrazně klesá i pohyblivost EOF. Patrné jsou i širší zóny látek. Optimální podmínky tedy byly dosaženy u 25mM borátu při 25 °C a 20 kV, které poskytují dobrou účinnost, dostatečně stabilní EOF, přiměřený proud do 40 μ A a separaci do necelých jedenácti minut, s píkovou kapacitou $n_c = 57$.

3.1.2 Fosfátový elektrolyt

Maltózový žebříček derivatizovaný ANTS byl dále měřen v kyselém a neutrálním fosfátovém elektrolytu. Na rozdíl od borátového elektrolytu zde nedochází ke komplexaci sacharidu s fosfátem a při kyselém a neutrálním pH je průběh separace odlišný.

Porovnání fosfátového pufru o různém pH

U fosfátového pufru byly za různého separačního napětí změřeny koncentrace 25 mM, 50 mM a 75 mM, pokaždé při pH 2,5 a pH 6,5, při teplotě 25 °C. Celková délka separační kapiláry a efektivní délka zůstaly nezměněny. Dávkování vzorku bylo provedeno hydrodynamicky při 50 mbar po dobu 5 s, u pH 6,5 byla doba dávkování poloviční. U nízkého pH, kdy je potlačena disociace silanolových skupin na vnitřním povrchu separační kapiláry, se EOF blíží k nule a je možné jej při separaci zanedbat. Negativně nabitě deriváty migrovaly k pozitivně nabitě elektrodě u detektoru. U pH 6,5 nelze EOF zanedbat. Vkládané napětí na elektrody proto muselo být opačné a vlivem EOF látky migrovaly ke katodě, která byla na výstupu u detektoru.

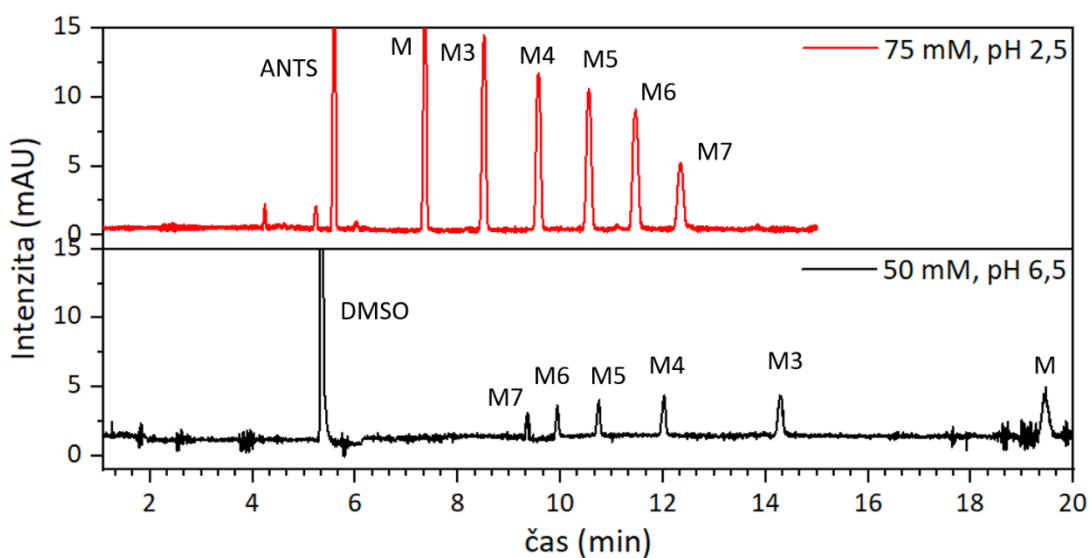
Vzhledem k tomu, že deriváty nesou stejný náboj vlivem ANTS značky, rozdělí se na základě odlišeného hydrodynamického poloměru molekuly. S přibývajícím počtem monosacharidových jednotek stále klesá efektivní pohyblivost, zato migrační pořadí se změní. U pH 2,5 nejdříve zónuje samotná ANTS značka a následně oligosacharidy, počínaje maltózou. Jakmile se do separace zapojí EOF, pořadí se obrátí a první migruje opět neutrální DMSO, po něm se objeví zóna maltoheptózy a oligosacharidy postupně zónují až k poslední maltóze.

Homology maltózy mají v obou případech nižší efektivní pohyblivost v porovnání s pohyblivostmi v borátovém elektrolytu, protože nevytváří komplexy s fosfátem. Současně je možné detekovat mnohem dříve, u pH 2,5 je doba separace výrazně kratší. Fosfátový elektrolyt je rovněž méně vodivý, a tedy kapilárou prochází nižší proudy než v případě borátového elektrolytu. S rostoucím pH a zvyšující koncentrací fosfátu jsou proudové toky výraznější a mají větší tendenci nabývat konvexního tvaru při porovnání

závislosti velikosti proudu na separačním napětí. U napětí 30 kV u 75 mM fosfátu pH 6,5 by již překročily nastavený 200 μ A práh, a proto tato separace nebyla provedena. Porovnání proudové odezvy při vkládání různého napětí pro oba fosfátové elektrolyty s různou koncentrací je uvedeno na obrázcích 4.1. (pH 2,5) a 4.2. (pH 6,5), které jsou součástí přílohy B.

Účinnost separace v kyselém fosfátovém elektrolytu (pH 2,5) je výrazně horší ve srovnání se slabě kyselým fosfátovým elektrolytem (pH 6,5), což může být následek potlačení EOF. Nejvyšší účinnosti s necelými 50 tisíci teoretickými patry bylo dosaženo u 75 mM fosfátu pH 2,5 při separačním napětí -15 kV. Téměř tak dvakrát vyšší účinnosti bylo dosaženo u fosfátu s pH 6,5 o 50 mM koncentraci při stejném vkládaném separačním napětí, opačné polarity. Výšky a plochy zón jsou však u fosfátu s pH 6,5 podstatně nižší.

U fosfátu pH 2,5 je rozlišení mezi jednotlivými zónami látek nejvyšší na začátku separace a snižuje se s rostoucí molekulovou hmotností látek. Vyššího rozlišení lze dosáhnout u fosfátu s pH 6,5, a tak po optimalizaci dalších podmínek pro zvýšení intenzity signálu by byl tento elektrolyt vhodný pro separace, kde by bylo potřeba rozlišit větší množství látek s menším počtem monosacharidových jednotek. Obě separace jsou porovnány na obrázku 3.4. Vypočtené separační charakteristiky při různých separačních napětí a koncentrací elektrolytů shrnují tabulky 4.5–4.7 pro fosfátový elektrolyt s pH 2,5 a 4.8–4.10 pro fosfátový elektrolyt s pH 6,5, které jsou součástí přílohy B.



Obrázek 3.4 – Porovnání separací ve 75 mM fosfátovém pufru při pH 2,5, napětí -15 kV, dávkování 50 mbar 5 s; a v 50 mM fosfátovém pufru při pH 6,5, napětí 15 kV, dávkování 50 mbar 2,5 s

3.1.3 Těkavé elektrolyty pro MS

Fosfátový ani borátový elektrolyt není vhodný pro testování CE-MS spojení z toho důvodu, že nejsou tolik těkavé, místo podporování ionizace analytu v ESI ji naopak konkurují a zanáší iontovou optiku MS. S touto sestavou byly testovány kompatibilnější elektrolyty, konkrétně octan amonný pH 6,5, mravenčan amonný pH 6,5 a hydrogenuhličitan amonný pH 8,0.

Separace u všech třech jmenovaných probíhala za stejně nastavených podmínek. Celková délka kapiláry zůstala na 51 cm, efektivní délka na 42 cm. Kapilára byla temperována na 25 °C a hydrodynamické dávkování bylo nastaveno na 50 mbar po dobu 2,5 s. Měnilo se pouze separační napětí v rozsahu 15–30 kV a optimalizovala se koncentrace elektrolytů v rozmezí 10–50 mM.

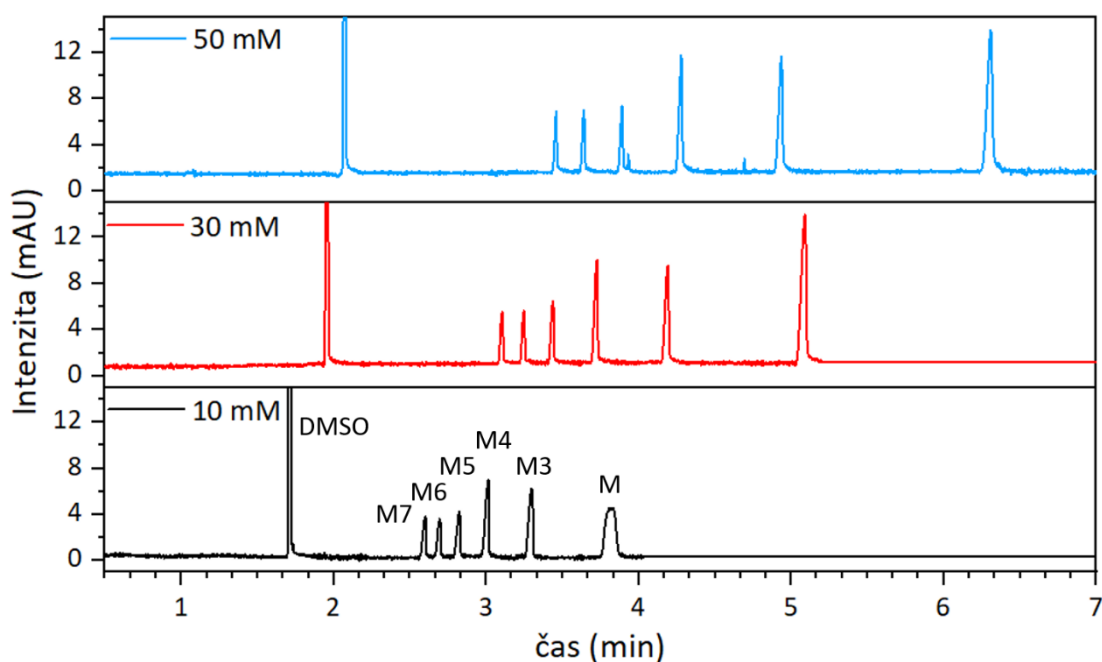
Mravenčan amonný

U koncentrace 10mM mravenčanu amonného byla zjištěna stabilní pohyblivost EOF, který se navzdory různě vkládaného separačního napětí mezi 15–30 kV neměnil. Vlivem elektromigrační disperze docházelo k nesymetrickému rozšiřování zón, a tak byly pozorovány rozmyté zóny. Důvodem může být vyšší vodivost elektrolytu, jímž byly vzorky naředěny. Snížením vodivosti elektrolytu, například ředěním vzorku vodou, by se účinek elektromigrační disperze snížil a zóny by se více přibližovaly Gaussovskému tvaru.

U koncentrovanějších elektrolytů (30 mM a 50 mM) je předpokládána zvýšená iontová síla, která může vést k nižším pohyblivostem EOF. U některých separacích v kombinaci vysoké koncentrace a nízkého separačního napětí už EOF nepřevyšuje opačně orientovanou pohyblivost nízkých oligosacharidů, které by normálně migrovaly jako poslední, a tak u separačního napětí 20 kV a níže již maltóza nebyla detekována a současně se prodlužovaly migrační časy ostatních látek. EOF navíc není tolik stabilní a je citlivější na změny ve vkládaném napětí. Nejvyšší účinnosti bylo dosaženo u 30 mM elektrolytu se separačním napětím 30 kV. Počet teoretických pater dosahoval kolem 51 tisíc teoretických pater. Vypočtené separační charakteristiky pro jednotlivé koncentrace elektrolytů za různého napětí jsou uvedené v tabulkách 4.11–4.13, které jsou součástí přílohy C.

Hydrogenuhlíčan amonný

U koncentrace 10 mM dochází opět k rozšiřování zón, u tohoto elektrolytu mnohem výrazněji, zatímco výška zón klesá. Zvýšením koncentrace NH_4HCO_3 na 30 mM, potažmo 50 mM jsou zóny mnohem vyšší a ostřejší. V případě 50 mM koncentrovaného elektrolytu dojde k trojnásobnému zvýšení v účinnosti oproti 10 mM elektrolytu. Pohyblivosti EOF jsou u nižších koncentrací poměrně stabilní, u 50 mM elektrolytu EOF klesá s klesajícím napětím. Na počet teoretických pater to však nemá značný vliv, neboť při 30–15 kV jsou účinnost a rozlišení mezi jednotlivými zónami látek podobné. Pro separaci v 50 mM NH_4HCO_3 s pH 8,0 by bylo optimální pracovat s 30 kV separačním napětím, kdy je možné dosáhnout 91 tisíc teoretických pater a celkové doby separace do 6,5 minuty. Rozšíření zón u separace maltózového žebříčku značeného ANTS v méně koncentrovaném elektrolytu a dosažení ostřejších zón při zvyšování koncentrace elektrolytu uvádí obrázek 3.5. Vypočtené separační charakteristiky pro jednotlivé koncentrace elektrolytů NH_4HCO_3 za různého napětí jsou uvedené v tabulkách 4.14–4.16, které jsou součástí přílohy D.

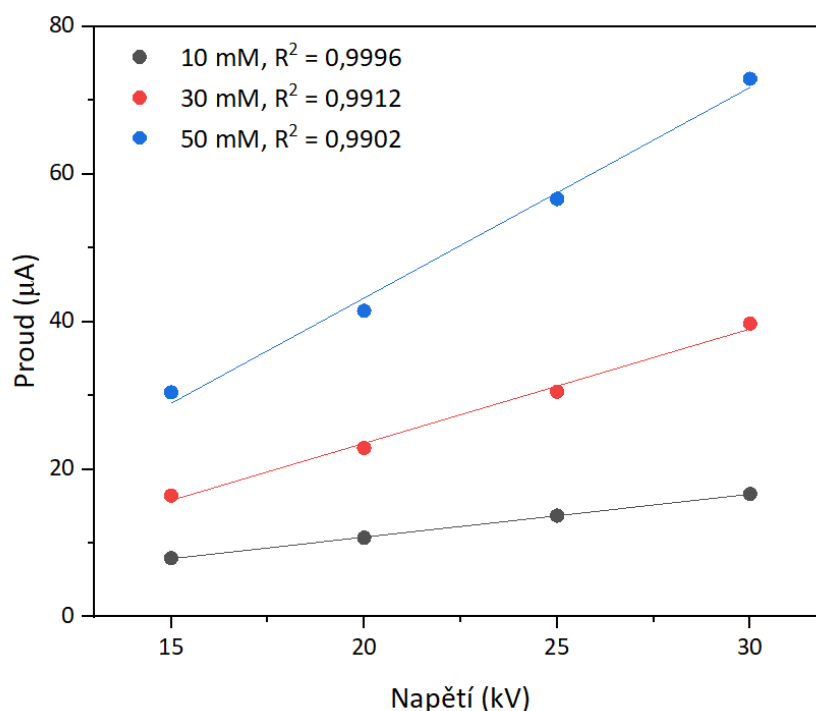


Obrázek 3.5 – Porovnání separací v NH_4HCO_3 pH 8,0 o koncentracích 10 mM, 30 mM a 50 mM, separační napětí 30 kV

Octan amonný

U elektrolytu octanu amonného již není tolik výrazná elektromigrační disperze ani u jedné ze tří testovaných koncentrací. Počet teoretických pater je vyšší už od nízkých

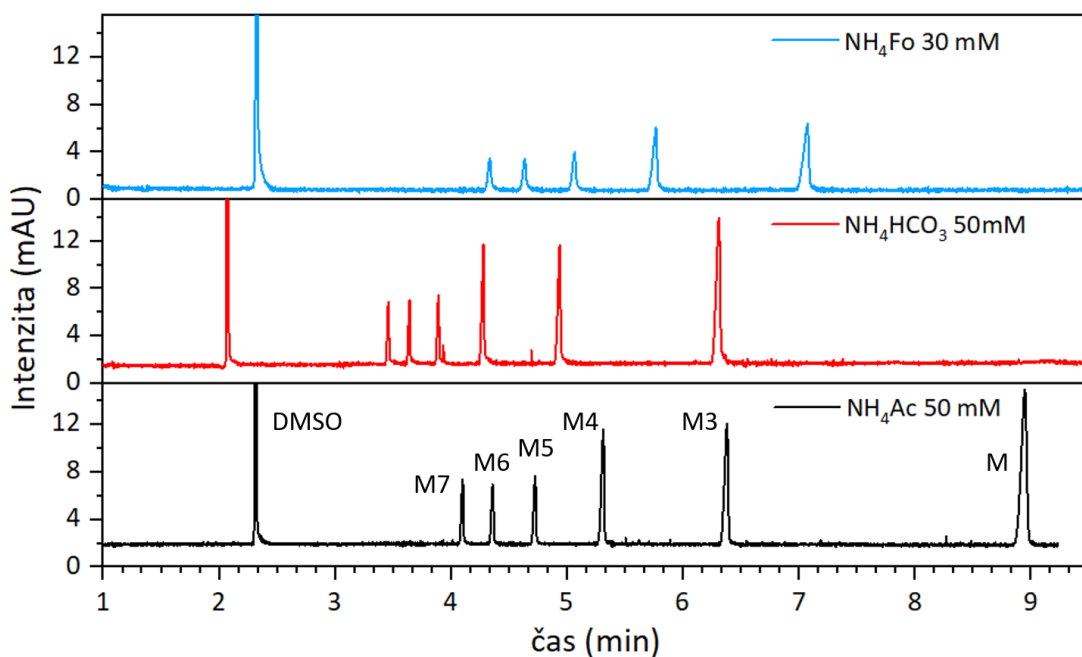
koncentrací v porovnání s předchozími testovanými elektrolyty. U 10 mM koncentrace je pohyblivost EOF stabilní při změnách separačního napětí, u koncentrovanějších elektrolytů se již změna v pohyblivosti EOF projevuje víc. Nejvyšších účinností bylo dosaženo u 50 mM octanu amonného, kdy se počet teoretických pater pohybuje kolem 200 tisíc u všech čtyřech vkládaných separačních napětí (30–15 kV). U všech třech koncentrací protékají kapilárou relativně nízké proudy, které v závislosti na vkládaném napětí vykreslují lineární trend, viz obrázek 3.6. To poukazuje na to, že všechna napětí v testovaném rozsahu jsou aplikovatelná a příliš neovlivňují kvalitu separace.



Obrázek 3.6 – Závislost proudové odezvy na separačním napětí v octanu amonném 25 mM, 50 mM a 75 mM

Kompromisně s ohledem na dobu separace byl pro sestavu CE-MS zvolen 50 mM octan amonný s pH 6,5. Optimální podmínky byly dosaženy při teplotě 25 °C se separačním napětím 30 kV, kdy je možné docílit přibližně 197 tisíc teoretických pater s výškou 2,2 μm a kapilárou protéká přijatelný proud (do 72 μA). Separaci derivatizované maltóзовé řady je možné provést do 9,5 minuty s dobře rozdělenými ostrými zónami.

Vypočtené separační charakteristiky pro jednotlivé koncentrace elektrolytů octanu amonného za různého napětí jsou uvedené v tabulkách 4.17–4.19, které jsou součástí přílohy E. Obrázek 3.7 dále porovnává průběhy separací ve všech třech těkavých elektrolytech za optimalizovaných podmínek.



Obrázek 3.7 – Porovnání separací při 30 kV napětí v 30 mM mravenčanu amonném pH 6,5 (N = 51 000); v 50 mM hydrogenuhličitanu amonném pH 8,0 (N = 91 000); v 50 mM octanu amonném pH 6,5 (N = 197 000)

3.2 Porovnání CE-MS spojení

3.2.1 Identifikace značených oligosacharidů

Identifikace značených oligosacharidů pomocí ANTS, kdy ANTS bylo ve formě disodné soli, byla založena na porovnání teoreticky vypočtených a experimentálně zjištěných molekulových hmotností iontových forem.

U negativního ESI módu došlo u všech derivatizovaných standardů ke ztrátě dvou Na^+ iontů, a tak byly detekovány stabilní dvojnásobně nabitě anionty $[\text{M}-2\text{Na}]^{2-}$, které byly primárně použity pro konstrukci extrahovaného iontového elektroforeogramu (EIE) a pro další vyhodnocení. Tabulka 3.3 pak porovnává teoreticky vypočtené a experimentálně zjištěné hodnoty m/z ANTS derivatizovaných oligosacharidů. Rozdíl mezi porovnávanými hmotami byl v rozmezí 0,04–0,06 Da, s průměrnou hodnotou 0,05 Da. Relativní směrodatná odchylka (RSD) mezi pěti experimentálně zjištěnými hodnotami m/z u všech forem $[\text{M}-2\text{Na}]^{2-}$ byla menší než 0,01 %, což odráží vysokou shodu mezi detekovanými hodnotami m/z těchto iontových forem. RSD bylo vypočteno podle vztahu 3.7:

$$RSD = \frac{s}{\bar{x}_i} \cdot 100 (\%) \quad (3.7)$$

kde \bar{x}_i je aritmetický průměr a s je směrodatná odchylka, která byla vypočtena podle vztahu 3.8:

$$s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x}_i)^2} \quad (3.8)$$

kde n je počet měření a x_i jsou naměřené hodnoty.

Dále byla zaznamenána vedlejší iontová forma $[M-H-Na]^{2-}$. Ta nebyla zahrnuta do vyhodnocení, neboť intenzita detekovaných hodnot m/z byla nižší, a navíc u tohoto aniontu maltózy se v jeho blízkém okolí vyskytoval stabilní interferující signál nečistoty, což by mohlo způsobovat různou variabilitu mezi analýzami.

Tabulka 3.3 – Teoretické a experimentální hodnoty hmot ANTS žebříčku maltózy

| Látka | Počet hexóz | M_r | | | |
|-------|-------------|------------------|--------------------------|--|--------------|
| | | značený sacharid | Vypočtené $[M-2Na]^{2-}$ | Experimentální ¹ $[M-2Na]^{2-}$ | ΔM_r |
| M | 2 | 753,03 | 353,52 | 353,56 | 0,04 |
| M3 | 3 | 915,08 | 434,55 | 434,59 | 0,04 |
| M4 | 4 | 1077,13 | 515,58 | 515,62 | 0,04 |
| M5 | 5 | 1239,19 | 596,60 | 596,65 | 0,05 |
| M6 | 6 | 1401,24 | 677,63 | 677,67 | 0,04 |
| M7 | 7 | 1563,29 | 758,66 | 758,72 | 0,06 |

¹ průměrná hodnota, $n = 5$

3.2.2 Separace s nanoCEasy

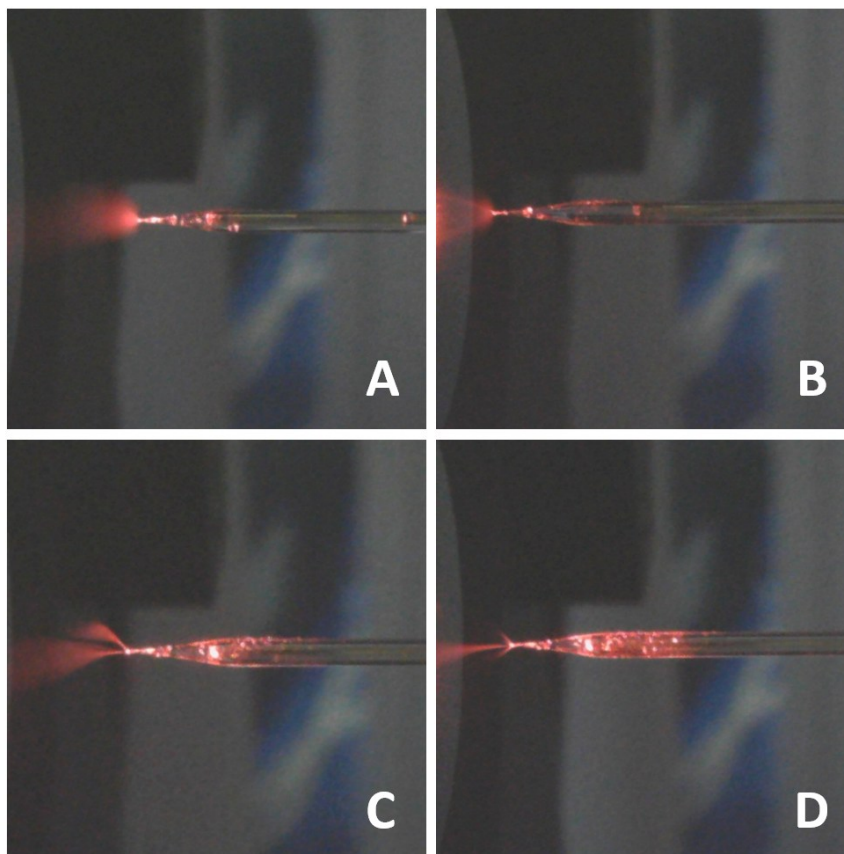
Optimalizace přídavné kapaliny

Ze začátku byla připravena separační kapilára o celkové délce 95 cm podle postupu popsaného v kapitole 2.6.1. Pro optimalizaci přídavné kapaliny byly připraveny následující roztoky:

- 1:1 a 1:2 (v/v) 50 mM octan amonný pH 6,5 a IPA,
- 1:19 a 1:4 (v/v) 50 mM octan amonný pH 6,5 a methanol,
- 1:1 (v/v) 50 mM octan amonný pH 6,5 a acetonitril,
- 1:1 (v/v) IPA a acetonitril.

Optimálního hydrodynamického dávkování vzorku bylo dosaženo při 50 mbar po dobu 10 s. Na kvadrupólovém filtru byla nastavena dolní mez 300 m/z , aby při detekci zesílila intenzita aniontu $[M-2Na]^{2-}$ značené maltózy. Teplota slučovacího plynu byla držena

na 150 °C, zatímco průtok dusíku na 4 ml·min⁻¹. Jednotného a stabilního rozprašování ve tvaru kuželu, tzv. cone-jet tvar spreje, který je zobrazen na obrázku 3.8 (A), bylo dosaženo na výstupu emitoru při vkládaném 2,5 kV ESI napětí u roztoku elektrolytu a isopropylalkoholu v poměru 1:1. Při separačním napětí 30 kV procházel kapilárou proud o velikosti 46 μA. Jakmile se zvýšil obsah isopropylalkoholu, u kuželového tvaru spreje byly po stranách pozorovány proudy s jemnou mlhovinou soustředěnou ve středu (B). U této kombinace přídavné kapaliny byla citlivost detekce nižší. U vyššího podílu organického rozpouštědla navíc docházelo k výraznějšímu prostupu isopropylalkoholu do separační kapiláry, kvůli čemuž značně poklesl proud protékající kapilárou na 37 μA a detekované zóny byly rozšířené.



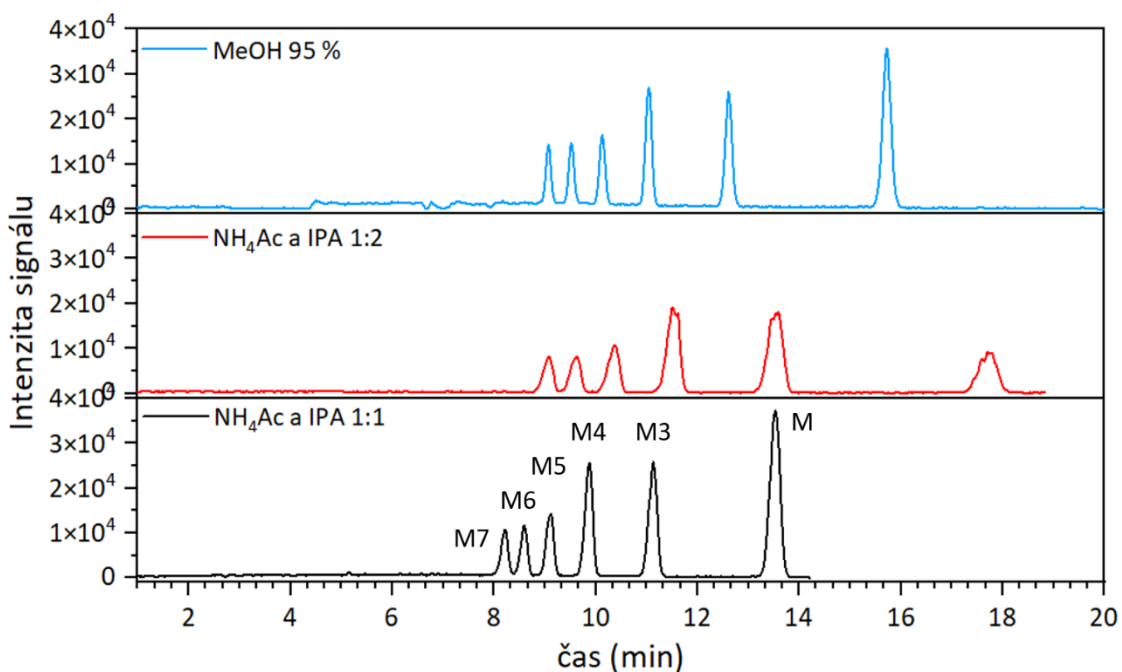
Obrázek 3.8 – Pozorované tvary spreje

- A: Stabilní cone-jet NH₄Ac a IPA 1:1 (ESI napětí 2,5 kV).
- B: Cone-jet s proudy po stranách NH₄Ac a IPA 1:2 (ESI napětí 2,5 kV).
- C: Multi-jet NH₄Ac a MeOH 1:19 (ESI napětí 3,0 kV)
- D: Proud soustředěný ve středu NH₄Ac a ACN 1:1 (ESI napětí 2,0 kV).

U kombinace elektrolytu a methanolu bylo možné přiblížit se stabilnímu cone-jetu při 2,7 kV ESI napětí, jakmile byl obsah methanolu zvýšen na 95 % (v/v). Při pokusech snížit ESI napětí a rovněž při nižším podílu methanolu v přídavné kapalině docházelo

ke ztrátám spreje. Při zvýšení ESI napětí se na výstupu emitoru objevovalo více proudů místo jednoho a tvar spreje tak přecházel do tzv. multi-jetu (C), který vede k neefektivní ionizaci. U ostatních složení přídavné kapaliny nebylo možné dosáhnout stabilního spreje navzdory měnícího se napětí na ESI. Sprej buď střídavě pulsoval, nebo se proud ve středu kuželu úzce stahoval (D). Složení přídavné kapaliny byla testována při průtoku nastaveném na $400 \mu\text{l}\cdot\text{h}^{-1}$.

Pro přídavnou kapalinu byl vybrán roztok elektrolytu a isopropylalkoholu 1:1 s průtokem $400 \mu\text{l}\cdot\text{h}^{-1}$, který dosahoval stabilního spreje a současně měl nejvyšší a stabilní signál elektroforeogramu základního píku spektra a vyšší poměr signál/šum (S/N) v porovnání s přídavnou kapalinou s 95% (v/v) obsahem methanolu. U IPA 1:1 byla snaha optimalizovat napětí pro ESI v rozsahu 2,2–2,7 kV. Mimo tento rozsah bylo pozorováno pulzování spreje, až jeho zhroucení. Jelikož v testovaném rozsahu napětí nebyly pozorovány výrazné rozdíly v intenzitě signálu ani ve stabilitě spreje, bylo ponecháno napětí 2,5 kV. Vzdálenost mezi emitorem a vstupem do MS byla zvolena s ohledem na stabilitu spreje a dále se neměnila. Obrázek 3.9 konečně porovnává průběhy separací derivatizovaných standardů maltózového žebříčku v závislosti na složení přídavné kapaliny, kdy bylo možné dosáhnout nebo se přiblížit stabilnímu cone-jetu.



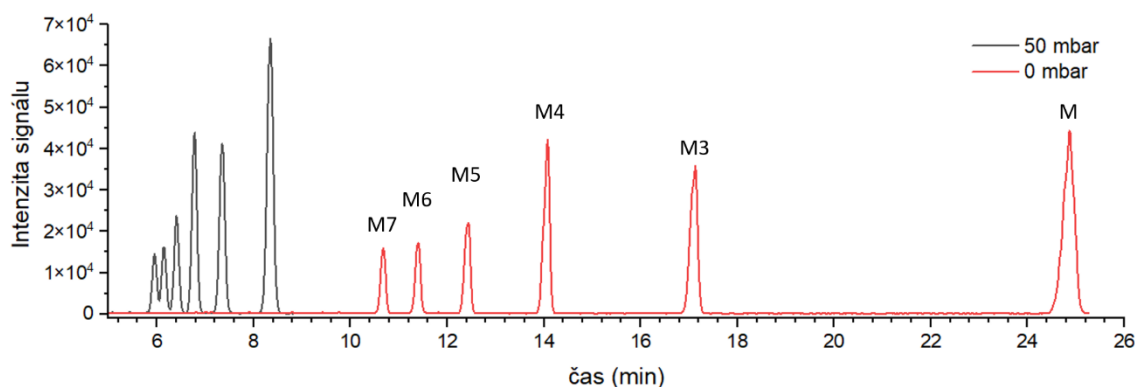
Obrázek 3.9 – EIE dvojnásobně nabitých aniontů ANTS žebříčku maltózy ($\pm 0,05 \text{ Da}$)

Separční podmínky: nepokrytá kapilára o délce 95 cm ($50 \mu\text{m}$ vnitřní průměr), teplota $25 \text{ }^\circ\text{C}$, napětí 30 kV, hydrodynamický tok 30 mbar, dávkování 50 mbar 10 s, elektrolyt NH_4Ac 50 mM pH 6,5. Přídavná kapalina: elektrolyt a methanol 1:19, ESI napětí 2,7 kV; elektrolyt a IPA 1:2 a 1:1, ESI napětí 2,5 kV. N_2 $4 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, $150 \text{ }^\circ\text{C}$.

Optimalizace hydrodynamického toku

Hydrodynamický tok je jeden z dalších neselektivních transportních mechanismů, jehož vliv byl testován na průběhu separace. Bez přídavného tlaku totiž dochází u CE-MS interface s přídavným tokem kapaliny k pronikání přídavné kapaliny do separační kapiláry. To vede k ředění separovaných zón. Zavedení přídavného tlaku tento jev mírně omezuje, na druhou stranu může dojít ke snížení citlivosti v důsledku zkrácení doby kontaktu analytu s ionizačním rozhraním.

U separací při aplikování tlaku 50 mbar a bez přídavného tlaku nebyl pozorován výrazný rozdíl v poměru S/N. Zatímco výšky zón jsou u obou separací srovnatelné, až na nejpozději migrující iont maltózy u separace bez přídavného tlaku, kde se na rozptýlení zóny výrazně podílí difuze, u separace bez tlaku došlo k rozšíření zón a k nárůstu jejich ploch, což poukazuje na známky ředění. Průběhy separací, kdy separační kapilára byla zkrácena na nejnižší možnou celkovou délku, tedy 73 cm, jsou zobrazeny na obrázku 3.10.

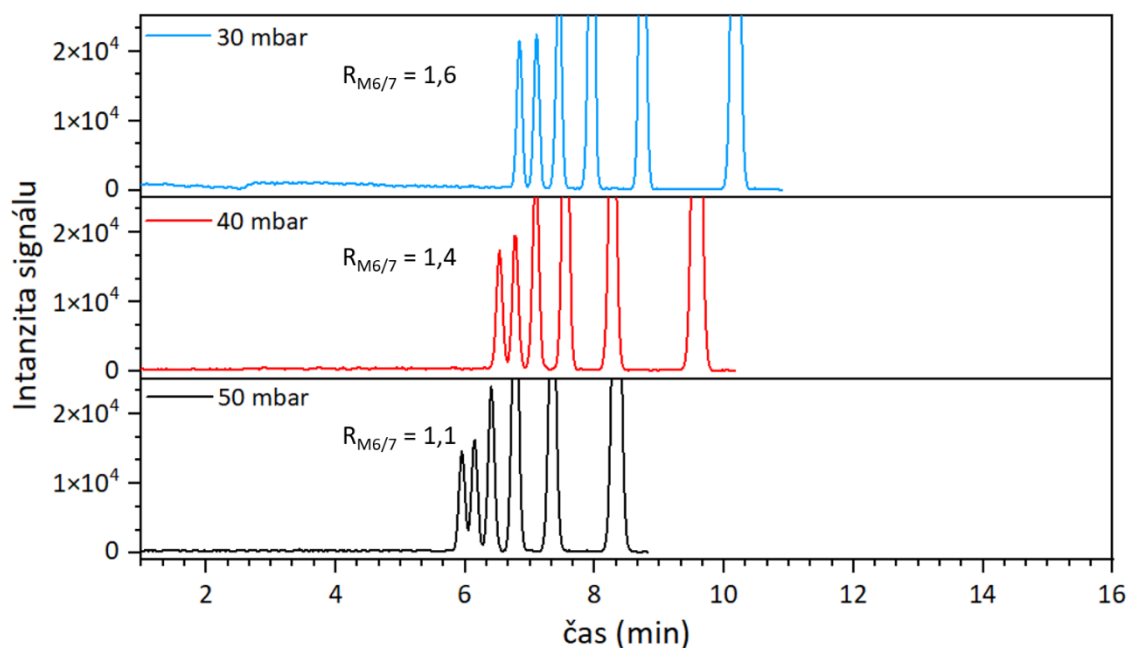


Obrázek 3.10 – Porovnání separací při zavedení přídavného tlaku a bez tlaku

CE-MS podmínky: nepokrytá kapilára o délce 73 cm (50 μm vnitřní průměr), napětí 30 kV, teplota 25 $^{\circ}\text{C}$, dávkování 50 mbar 10 s, elektrolyt NH_4Ac 50 mM pH 6,5. Přídavná kapalina: elektrolyt a IPA 1:1, průtok 400 $\mu\text{l}\cdot\text{h}^{-1}$. ESI napětí 2,5 kV. N_2 4 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$, 150 $^{\circ}\text{C}$.

Ačkoliv se s přídavným tlakem výrazně zkrátí doba separace, negativně se to projeví na rozlišení u rychleji migrujících analytů. Rozlišení pro ionty maltoheptózy a maltohexózy bylo vypočteno podle vztahu 3.6 uvedeného v kapitole 3.1. Jako optimální přídavný tlak byl zvolen tlak 30 mbar, kdy je možné dosáhnout celkové separace do necelých 11 minut. Při těchto podmínkách bylo dosaženo rozlišení separovaných látek $R_{M6/7} = 1,6$. Za dostatečné rozlišení dvou separovaných látek se obecně považuje $R \geq 1,5$. Průběhy separací derivatizované maltóзовé řady při různých přídavných tlacích

s vypočtenými rozlišeními pro maltoheptózu a maltohexózu jsou uvedeny na obrázku 3.11. Ostatní podmínky separace zůstaly nezměněny.



Obrázek 3.11 – Porovnání vlivu přidavného tlaku (50 mbar, 40 mbar a 30 mbar) na rozlišení CE-MS podmínky: nepokrytá kapilára o délce 73 cm (50 μm vnitřní průměr), napětí 30 kV, teplota 25 $^{\circ}\text{C}$, dávkování 50 mbar 10 s, elektrolyt NH_4Ac 50 mM pH 6,5. Přídavná kapalina: elektrolyt a IPA 1:1, průtok 400 $\mu\text{l}\cdot\text{h}^{-1}$. ESI napětí 2,5 kV. N_2 4 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$, 150 $^{\circ}\text{C}$.

Opakovatelnost

Pro posouzení opakovatelnosti bylo v rámci jednoho dne provedeno pět po sobě navazujících analýz, za stejných podmínek a za použití stejného emitoru. Poloha separační kapiláry v emitoru se mezi měřeními neměnila. Z migračních časů (t_i) a ploch zón (A_i) byly pro každou separovanou látku vypočteny RSD podle vztahu 3.7 uvedeného v kapitole 3.2.1. RSD migračních časů a ploch zón byly zjištěny v rozmezí 3,8–6,4 % a 4,9–12,1 %. Konkrétní hodnoty RSD doplňuje tabulka 3.4.

Tabulka 3.4 – Měření opakovatelnosti u nanoCEasy

| Látka | t_i^1 (min) | RSD_t (%) | A_i^1 | RSD_A (%) |
|---------------|---------------|--------------------|-----------------|--------------------|
| maltóza | 10,80 | 6,4 | $6,9\cdot 10^5$ | 12,1 |
| maltotrióza | 9,15 | 5,3 | $3,8\cdot 10^5$ | 12,1 |
| maltotetraóza | 8,26 | 4,6 | $3,6\cdot 10^5$ | 8,7 |
| maltopentóza | 7,71 | 4,2 | $2,0\cdot 10^5$ | 10,7 |
| maltohexóza | 7,33 | 4,0 | $1,3\cdot 10^5$ | 7,9 |
| maltoheptóza | 7,05 | 3,8 | $1,2\cdot 10^5$ | 4,9 |

¹ průměrná hodnota, n = 5

Mezilehlá přesnost

Pro posouzení mezilehlé přesnosti byly každé tři dny provedeny tři měření za nezměněných experimentálních podmínek, za použití stejného emitoru a se stejnými roztoky, které byly v případě potřeby vyměněny. Vzdálenost mezi emitorem a vstupem do MS se neměnila. V rámci jednoho dne byly vypočteny RSD migračních časů a ploch zón pro každou separovanou látku. Pro posouzení vlivu dne měření z hlediska migračních časů a ploch zón současně pro každou látku byla zvolena vícerozměrná analýza rozptylu MANOVA. Vzhledem k rozdílným jednotkám závisle proměnných byla provedena standardizace dat. Na hladině významnosti 0,05 α byly podle Boxova M-testu a Shapiro-Wilkova testu splněny předpoklady homogenity a normality, normalita byla testována analýzou reziduí.

Jednodenní měření vykazovala nízké hodnoty RSD pro migrační časy v rozsahu 0,5–4,0 %, což opět svědčí o dobré opakovatelnosti. Pro plochy zón jsou hodnoty RSD ve většině případech akceptovatelné, přesto u druhého měřicího dne dosahují u nejpozději zónujících látek hodnot 19,8 % a 36,9 %. Statistická analýza ukázala, že na hladině významnosti 0,05 α existují statisticky významné rozdíly mezi jednotlivými dny (Wilksova lambda, $p < 0,05$). Současně jednorozměrné F-testy ukázaly, že se dny statisticky významně liší v migračních časech a plochách, výsledné úrovně p jsou uvedeny v tabulce 3.5. Tyto výsledky poukazují na omezenou mezilehlou přesnost, která může souviset s různým umístěním separační kapiláry v emitoru nebo s odchylkami v teplotě, jelikož větší část separační kapiláry zůstává mimo temperovaný prostor.

Tabulka 3.5 – Měření mezilehlé přesnosti u nanoCEasy

| Látka | | M | M3 | M4 | M5 | M6 | M7 |
|--------|----------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| 1. den | t_i^1 (min) | 10,32 | 8,83 | 8,00 | 7,49 | 7,14 | 6,87 |
| | RSD _t (%) | 1,7 | 1,4 | 1,2 | 1,1 | 1,2 | 1,3 |
| | A_i^1 | $7,1 \cdot 10^5$ | $3,8 \cdot 10^5$ | $3,7 \cdot 10^5$ | $2,0 \cdot 10^5$ | $1,3 \cdot 10^5$ | $1,2 \cdot 10^5$ |
| | RSD _A (%) | 14,5 | 12,2 | 11,8 | 13,4 | 11,0 | 6,5 |
| 2. den | t_i^1 (min) | 11,43 | 9,58 | 8,58 | 7,97 | 7,56 | 7,26 |
| | RSD _t (%) | 4,0 | 2,9 | 2,4 | 2,1 | 2,0 | 1,9 |
| | A_i^1 | $7,1 \cdot 10^5$ | $5,3 \cdot 10^5$ | $4,6 \cdot 10^5$ | $2,4 \cdot 10^5$ | $1,7 \cdot 10^5$ | $1,5 \cdot 10^5$ |
| | RSD _A (%) | 36,9 | 19,8 | 9,8 | 9,1 | 16,1 | 10,4 |
| 3. den | t_i^1 (min) | 11,62 | 9,70 | 8,68 | 8,04 | 7,62 | 7,31 |
| | RSD _t (%) | 1,4 | 1,1 | 0,7 | 0,7 | 0,6 | 0,5 |
| | A_i^1 | $4,8 \cdot 10^5$ | $2,2 \cdot 10^5$ | $2,4 \cdot 10^5$ | $1,2 \cdot 10^5$ | $0,8 \cdot 10^5$ | $0,8 \cdot 10^5$ |
| | RSD _A (%) | 9,2 | 21,4 | 4,2 | 5,3 | 7,9 | 9,8 |

Pokračování tabulky 3.5

| Látka | M | M3 | M4 | M5 | M6 | M7 |
|------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| p hodnota ² t_i | 0,004 | 0,002 | 0,002 | 0,002 | 0,002 | 0,003 |
| p hodnota ² A_i | 0,212 | 0,006 | 0,001 | 0,001 | 0,003 | 0,001 |

¹ průměrná hodnota, n = 3

² F-test, $\alpha = 0,05$

3.2.3 Separace s TTS

U TTS interface byla snaha aplikovat podobné experimentální podmínky jako u předchozího interface s ohledem na nebulizační plyn. Stablního signálu elektroforeogramu základního píku spektra bylo dosaženo při ESI napětí 4,5 kV, s tlakem nebulizačního plynu udržovaným na 0,6 bar. Nejnižšího průtoku přídavné kapaliny složené opět z elektrolytu a isopropylalkoholu v poměru 1:1 bylo dosaženo při 400 $\mu\text{l}\cdot\text{h}^{-1}$.

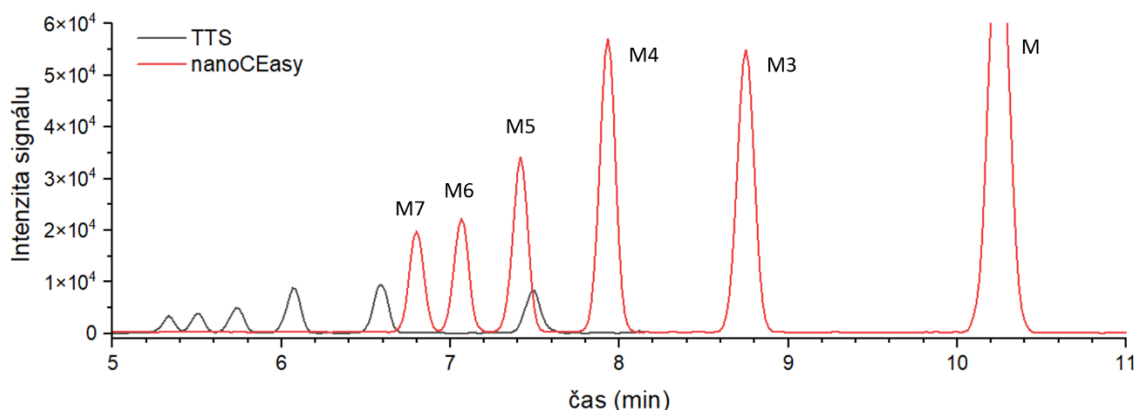
Opakovatelnost

Pro posouzení opakovatelnosti bylo v rámci jednoho dne provedeno pět po sobě navazujících analýz, za stejných experimentálních podmínek. Hodnoty RSD migračních časů a ploch zón byly zjištěny v rozmezí 4,7–8,1 % a 15,1–6,8 %, což svědčí o dobré opakovatelnosti, ale horší v porovnání s nanoCEasy. Kvůli přídavnému nebulizačnímu plynu je zvýšen tok v kapiláře, čímž je urychlena migrace analytů, což vede ke kratším migračním časům (celková doba separace do 8 minut, u nanoCEasy do 11 minut). Současně však způsobuje výraznější ředění separovaných zón, což se projevilo nižšími výškami a plochami zón. Hodnoty ploch jsou téměř desetkrát nižší než u nanoCEasy. Použití nebulizačního plynu se projevuje i na nižším rozlišení separace. U prvních dvou zón se rozlišení pohybuje v rozmezí $R_{M6/7} = 1,1\text{--}1,2$, zato u nanoCEasy je standardně kolem $R_{M6/7} = 1,6$. Snížení tlaku nebulizačního plynu vedlo k destabilizaci, až ke ztrátám spreje. Obrázek 3.12 porovnává separaci žebříčku maltózy s použitím obou interface.

Tabulka 3.6 – Měření opakovatelnosti u TTS

| Látka | t_i^1 (min) | RSD _t (%) | A_i^1 | RSD _A (%) |
|---------------|---------------|----------------------|-----------------|----------------------|
| maltóza | 7,86 | 8,1 | $5,2\cdot 10^4$ | 6,8 |
| maltotrióza | 6,85 | 6,6 | $5,4\cdot 10^4$ | 14,3 |
| maltotetraóza | 6,29 | 5,8 | $5,3\cdot 10^4$ | 10,5 |
| maltopentóza | 5,93 | 5,3 | $3,0\cdot 10^4$ | 15,1 |
| maltohexóza | 5,67 | 4,9 | $2,1\cdot 10^4$ | 10,5 |
| maltoheptóza | 5,49 | 4,7 | $1,8\cdot 10^4$ | 13,2 |

¹ průměrná hodnota, n = 5



Obrázek 3.12 – Porovnání separací ANTS maltózové řady s TTS a nanoCEasy interface

CE podmínky: nepokrytá kapilára o délce 73 cm (50 μm vnitřní průměr), napětí 30 kV, teplota 25 $^{\circ}\text{C}$, dávkování 50 mbar 10 s, elektrolyt NH_4Ac 50 mM pH 6,5. Přídavná kapalina: elektrolyt a IPA 1:1, průtok 400 $\mu\text{l}\cdot\text{h}^{-1}$.

MS podmínky: ESI napětí 2,5 kV (nanoCEasy) a 4,5 kV (TTS), N_2 4 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$, 150 $^{\circ}\text{C}$, nebulizační plyn 0,6 bar (pouze TTS).

3.2.4 Mez detekce a stanovitelnosti

Při porovnání signálů bylo nejvyšší odezvy obdrženo při měření s nanoCEasy interface, jelikož u TTS interface se výrazně projevuje ředění separovaných zón. Tento rozdíl odráží i hodnoty poměru S/N, které byly získány pomocí softwarového vyhodnocení v programu Compass DataAnalysis. Hodnoty poměru S/N dosažené při použití nanoCEasy interface byly přibližně čtyřikrát až pětkrát vyšší ve srovnání s TTS interface, jak je vidět v tabulce 3.7, která byla doplněna o hodnoty detekčních limitů. Mez detekce (LOD) byla vypočtena jako koncentrace látky (c_i) odpovídající poměru $S/N = 3$ dle vztahu:

$$LOD = 3 \cdot \frac{c_i}{S/N} \quad (3.9)$$

Mez stanovitelnosti (LOQ) byla vypočtena jako koncentrace látky (c_i) s desetinásobným signálem vyšším, než je úroveň šumu, tedy dle poměru $S/N = 10$:

$$LOQ = 10 \cdot \frac{c_i}{S/N} \quad (3.10)$$

K detekčním limitům v tabulce 3.7, které byly vypočteny pro všechny látky vybraného maltózového žebříčku derivatizovaného ANTS, je nutné poznamenat, že se

jedná o přibližné hodnoty LOD a LOQ. Účinnost derivatizace nebyla ověřena, pracovalo se s malými navážkami standardů a při výpočtech bylo zohledněno ředění. Výtěžek derivatizace byl předpokládán jako nejvyšší.

Tabulka 3.7 – Poměry S/N a detekční limity pro nanoCEasy a TTS spojení

| Látka | nanoCEasy S/N | TTS S/N | zlepšení S/N | nanoCEasy | | TTS | |
|---------------|------------------|------------|-----------------|--------------------|------|------|-------|
| | | | | LOD | LOQ | LOD | LOQ |
| | | | | mg·l ⁻¹ | | | |
| maltóza | 147 | 40 | 4 | 0,82 | 2,72 | 3,00 | 10,00 |
| maltotrióza | 166 | 45 | 4 | 0,72 | 2,41 | 2,67 | 8,89 |
| maltotetraóza | 255 | 59 | 4 | 0,47 | 1,57 | 2,03 | 6,78 |
| maltopentóza | 429 | 107 | 4 | 0,28 | 0,93 | 1,12 | 3,74 |
| maltohexóza | 414 | 116 | 4 | 0,29 | 0,97 | 1,03 | 3,45 |
| maltoheptóza | 526 | 103 | 5 | 0,23 | 0,76 | 1,17 | 3,88 |

ZÁVĚR

Cílem diplomové práce bylo porovnat možnosti spojení CE-MS. Srovnání bylo provedeno mezi laboratorně sestaveným interface nanoCEasy a komerčně dostupným TTS (typ G1607A) na separacích oligosacharidů maltóзовé řady. Vzhledem k neutrální povaze sacharidu a k absenci chromoforu a fluoroforu v jejich struktuře byla provedena reduktivní aminace, při níž byl maltóзовý žebříček značen ANTS. Testovány byly různé elektrolyty a separační podmínky pomocí CZE s UV detekcí. Na základě zjištěných účinností separace, dosaženého rozlišení, elektromigračních charakteristik značených oligosacharidů a kompatibility s MS systémem byl pro CE-MS analýzy vybrán elektrolyt octanu amonného 50 mM s pH 6,5.

Pro srovnání obou interface byly zvoleny podobné separační a ionizační podmínky, které byly podrobněji optimalizovány na jednotlivých sestavách. U přídavné kapaliny o složení octan amonný 50 mM s pH 6,5 a IPA 1:1 (v/v) bylo dosaženo jednotného a stabilního sprejování na výstupu nanoCEasy emitoru při ESI napětí 2,5 kV. S ohledem na ředění separovaných zón přídavnou kapalinou byl optimalizován hydrodynamický tok. U přídavného tlaku 30 mbar bylo u 73cm nepokryté kapiláry dosaženo celkové separace do necelých 11 minut s optimálním rozlišením pro všechny separované látky. Kvůli přítomnosti nebulizačního plynu u TTS muselo být ESI napětí zvýšené na 4,5 kV. Jeho tlak byl nastaven na 0,6 bar. Při nižším docházelo ke ztrátám spreje. K tomu kompatibilní a současně nejnižší byl průtok přídavné kapaliny při 400 $\mu\text{l}\cdot\text{h}^{-1}$. V návaznosti na to byl tento průtok zvolen i pro nanoCEasy interface.

NanoCEasy vykazuje v rámci dne dobrou opakovatelnost v migračních časech (RSD < 6,4 %, n = 5) a plochách zón (RSD < 12,1 %, n = 5). V sérii měření mezi třemi dny bylo zjištěno, že existují statisticky významné rozdíly v migračních časech a plochách zón mezi jednotlivými dny. Ty mohly být způsobeny kvůli různé poloze separační kapiláry v emitoru, kvůli stárnutí emitoru nebo kvůli odchýlkám v teplotě, jelikož větší část separační kapiláry zůstává mimo temperovaný prostor. U TTS byly hodnoty RSD migračních časů (RSD < 8,1 %, n = 5) a ploch (RSD < 15,1 %, n = 5) vyšší, ale stále akceptovatelné. Díky nebulizačnímu plynu byla celková doba separace zkrácena na necelých 8 minut, na druhou stranu se výrazně projevilo ředění zón, což se negativně odrazilo na rozlišení prvních migrujících látek (pokles z $R_{M6/7} = 1,6$ na $R_{M6/7} = 1,1$) a na poměru S/N (čtyřnásobný až pětinasobný pokles).

S nanoCEasy bylo možné dosáhnout lepších výsledků než u komerčně dostupného interface. Obě CE-MS spojení však provází řada negativních vlivů, které se převážně projevily při snaze o udržení stabilního spreje. U nanoCEasy šlo například o zavádění separační kapiláry do emitoru, kdy bylo obtížné opakovaně zajistit stejnou polohu kapiláry vůči zužujícímu se konci emitoru. Sprej byl citlivý ke každému pohybu kapiláry. Její leptaná špička se navíc často lámala. Při následném seříznutí kapiláry mohly i drobné nerovnosti ovlivnit geometrii spreje. Nerovnosti v řezu kapiláry jsou významné i u TTS, kde separační kapilára vyčnívá ze samotné ESI jehly. Na jejím výstupu se často tvořila kapka, kvůli níž bylo nutné celé rozhraní několikrát promýt, potažmo rozebrat.

Za nevýhodu považuji nemožnost regenerovat vnitřní povrch kapiláry pomocí NaOH při opakování analýz. Mezi analýzami se toto dalo realizovat pouze u nanoCEasy, kde je možné posunout separační kapiláru dál od výstupu emitoru, případně ji zcela vysunout. To představuje praktickou výhodu zejména při práci se zasolenými vzorky. Podobné výhody či konstrukční vylepšení by měly být předmětem zájmu v rámci budoucího vývoje CE-MS spojení.

ZDROJE

- [1] BAJPAI, P. Carbohydrate chemistry. In: *Biermann's Handbook of Pulp and Paper*. 3rd ed. Elsevier, 2018, s. 363-371. ISBN 9780128142387. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-814238-7.00017-9
- [2] MANO, M. C. R., P. N. DOS SANTOS, B. N. PAULINO a G. MOLINA. Enzyme technology applied to biomolecule synthesis for the food industry. In: *Value-Addition in Food Products and Processing Through Enzyme Technology*. Elsevier, 2022, s. 57-69. ISBN 9780323899291. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-323-89929-1.00018-4
- [3] MANTOVANI, V., F. GALEOTTI, F. MACCARI a N. VOLPI. Recent advances in capillary electrophoresis separation of monosaccharides, oligosaccharides, and polysaccharides. *Electrophoresis*. 2018, **39**(1), 179-189. ISSN 0173-0835. Dostupné z: doi:10.1002/elps.201700290
- [4] SZIGETI, M., A. MESZAROS-MATWIEJUK, D. MOLNAR-GABOR a A. GUTTMAN. Rapid capillary gel electrophoresis analysis of human milk oligosaccharides for food additive manufacturing in-process control. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2021, **413**(6), 1595-1603. ISSN 1618-2642. Dostupné z: doi:10.1007/s00216-020-03119-0
- [5] RUSIN, M., A. WOŹNIAKIEWICZ, M. GOŁĄB, J. DOBROWOLSKA-IWANEK, H. HURAS, M. STAŚKIEWICZ, R. LAUTERBACH a M. WOŹNIAKIEWICZ. Development of a capillary electrophoresis method with laser-induced fluorescence detection for the characterization of oligosaccharides in human milk. *Monatshefte für Chemie - Chemical Monthly*. 2024, **155**(8-9), 825-834. ISSN 0026-9247. Dostupné z: doi:10.1007/s00706-024-03239-8
- [6] SPIRO, R. G. Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds. *Glycobiology*. 2002, **12**(4), 43R-56R. ISSN 0959-6658. Dostupné z: doi:10.1093/glycob/12.4.43R
- [7] HUANG, Ch., A. HONDA a T. SUZUKI. Free oligosaccharides in serum. *BBA Advances*. 2025, **7**. ISSN 26671603. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbadv.2025.100139
- [8] SZABO, Z., A. GUTTMAN, T. REJTAR a B. L. KARGER. Improved sample preparation method for glycan analysis of glycoproteins by CE-LIF and CE-MS. *Electrophoresis*. 2010, **31**(8), 1389-1395. ISSN 0173-0835. Dostupné z: doi:10.1002/elps.201000037
- [9] MOLNÁROVÁ, K., K. ČOKRTOVÁ, A. TOMNÍKOVÁ, T. KRŹÍŽEK a P. KOZLÍK. Liquid chromatography and capillary electrophoresis in glycomic and glycoproteomic analysis. *Monatshefte für Chemie - Chemical Monthly*. 2022, **153**(9), 659-686. ISSN 0026-9247. Dostupné z: doi:10.1007/s00706-022-02938-4

- [10] MA, Q., W. WANG, X. YANG, Y. CHEN, Y. LIU, H. CHEN a Y. ZHAO. Development and application of a sensitive phosphonium-hydrazide oligosaccharide labelling reagent in capillary electrophoresis- electrospray ionization- mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2022, **1680**. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2022.463409
- [11] SMOLKOVÁ, D., R. ČMELÍK a J. LAVICKÁ. Labeling strategies for analysis of oligosaccharides and glycans by capillary electrophoresis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2023, **163**. ISSN 01659936. Dostupné z: doi:10.1016/j.trac.2023.117068
- [12] LIU, H., Z. ZHANG a R. J. LINHARDT. Lessons learned from the contamination of heparin. *Natural Product Reports*. 2009, **26**(3), 313-321. ISSN 0265-0568. Dostupné z: doi:10.1039/b819896a
- [13] SUN, X., L. LIN, X. LIU, F. ZHANG, L. CHI, Q. XIA a R. J. LINHARDT. Capillary electrophoresis-mass spectrometry for the analysis of heparin oligosaccharides and low molecular weight heparin. *Analytical Chemistry*. 2016, **88**(3), 1937-1943. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/acs.analchem.5b04405
- [14] GAUNITZ, S., G. NAGY, N. L. B. POHL a M. V. NOVOTNY. Recent advances in the analysis of complex glycoproteins. *Analytical Chemistry*. 2017, **89**(1), 389-413. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/acs.analchem.6b04343
- [15] ERNST, S., R. LANGER, C. L. COONEY a R. SASISEKHARAN. Enzymatic degradation of glycosaminoglycans. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. 2008, **30**(5), 387-444. ISSN 1040-9238. Dostupné z: doi:10.3109/10409239509083490
- [16] VLČKOVÁ, N., A. ŠIMONOVÁ, M. ĎURIŠ, K. ČOKRTOVÁ, S. ALMQUIST a T. KRÍŽEK. Detection techniques for carbohydrates in capillary electrophoresis – a comparative study. *Monatshefte für Chemie - Chemical Monthly*. 2023, **154**(9), 967-975. ISSN 0026-9247. Dostupné z: doi:10.1007/s00706-023-03109-9
- [17] AREDES, R. S., F. C. PEIXOTO, L. A. SPHAIER, V. N. H. SILVA, L. M. DUARTE a F. F. DE CARVALHO MARQUES. Determination of carbohydrates in brewer's wort by capillary electrophoresis with indirect UV detection. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2023, **120**. ISSN 08891575. Dostupné z: doi:10.1016/j.jfca.2023.105321
- [18] JARVAS, G., M. SZIGETI, J. CHAPMAN a A. GUTTMAN. Triple-internal standard based glycan structural assignment method for capillary electrophoresis analysis of carbohydrates. *Analytical Chemistry*. 2016, **88**(23), 11364-11367. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/acs.analchem.6b03596
- [19] VOETEN, R. L. C., I. K. VENTOURI, R. HASELBERG a G. W. SOMSEN. Capillary electrophoresis: Trends and recent advances. *Analytical Chemistry*. 2018,

90(3), 1464-1481. ISSN 0003-2700. Dostupné z:
doi:10.1021/acs.analchem.8b00015

- [20] CAMPBELL, M. P., L. ROYLE, C. M. RADCLIFFE, R. A. DWEK a P. M. RUDD. GlycoBase and autoGU: tools for HPLC-based glycan analysis. *Bioinformatics*. 2008, **24**(9), 1214-1216. ISSN 1367-4811. Dostupné z: doi:10.1093/bioinformatics/btn090
- [21] JARVAS, G., M. SZIGETI a A. GUTTMAN. GUcal: An integrated application for capillary electrophoresis based glycan analysis. *Electrophoresis*. 2015, **36**(24), 3094-3096. ISSN 0173-0835. Dostupné z: doi:10.1002/elps.201500397
- [22] WANG, J., J. ZHAO, S. NIE, M. XIE a S. LI. Mass spectrometry for structural elucidation and sequencing of carbohydrates. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2021, **144**. ISSN 01659936. Dostupné z: doi:10.1016/j.trac.2021.116436
- [23] AFSHAR, M. a D. MOLNAR-GABOR. Optimization, validation, and greenness assessment of a capillary zone electrophoresis method for analysis of inorganic and organic anions in human milk oligosaccharides. *Talanta*. 2025, **287**. ISSN 00399140. Dostupné z: doi:10.1016/j.talanta.2025.127607
- [24] KOŃCZYK, J., M. MYGA-NOWAK, R. MICHALSKI a K. JANOSZKA. Electromigration techniques in the analysis of selected cosmetic ingredients: A review. *Molecules*. 2025, **30**(1). ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules30010161
- [25] LU, G., C. L. CRIHFIELD, S. GATTU, L. M. VELTRI a L. A. HOLLAND. Capillary electrophoresis separations of glycans. *Chemical Reviews*. 2018, **118**(17), 7867-7885. ISSN 0009-2665. Dostupné z: doi:10.1021/acs.chemrev.7b00669
- [26] KALAYCIOĞLU, Z. a F. B. ERİM. Capillary electrophoresis: Basic principles. In: *Capillary Electrophoresis in Food Analysis*. Bentham Science Publishers, 2022, s. 1-31. Current and Future Developments in Food Science. ISBN 9789815036152. Dostupné z: doi:10.2174/9789815036152122020004
- [27] JAYWANT, S. A., H. SINGH a K. M. ARIF. Capillary zone electrophoresis: Opportunities and challenges in miniaturization for environmental monitoring. *Sensing and Bio-Sensing Research*. 2024, **43**. ISSN 22141804. Dostupné z: doi:10.1016/j.sbsr.2023.100617
- [28] KASIČKA, V. Theoretical bases and separation principles of capillary electromigration methods. *Chemické listy*. 1997, **91**(5), 320-329.
- [29] KUHN, R. a S. HOFFSTETTER-KUHN. Basic principles. In: *Capillary Electrophoresis: Principles and Practice*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1993, s. 5-36. ISBN 978-3-642-78060-8. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-642-78058-5_2

- [30] KVASNIČKOVÁ, L., Z. GLATZ a V. KAHLE. Capillary electrochromatography. *Chemické listy*. 2003, **97**(2), 86-92.
- [31] RAHMAN, M. application of computational methods in isolation of plant secondary metabolites. In: *Computational Phytochemistry*. Elsevier, 2018, s. 107-139. ISBN 9780128123645. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-812364-5.00004-3
- [32] SCHMITT-KOPPLIN, P. a A. FEKETE. The CE-way of thinking: “All is relative!” In: *Capillary Electrophoresis*. New York, NY: Springer New York, 2016, s. 3-19. Methods in Molecular Biology. ISBN 978-1-4939-6401-7. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4939-6403-1_1
- [33] GHOSAL, S. Band broadening theories in capillary electrophoresis. In: *Microfluidic Electrophoresis*. New York, NY: Springer New York, 2019, s. 143-166. Methods in Molecular Biology. ISBN 978-1-4939-8963-8. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4939-8964-5_11
- [34] BEALE, S. C. Capillary electrophoresis. *Analytical Chemistry*. 1998, **70**(12), 279-300. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/a19800141
- [35] ČOKRTOVÁ, K., V. MAREŠ a T. KRÍŽEK. On-capillary fluorescent labeling of saccharides for capillary electrophoresis. *Electrophoresis*. 2023, **44**(1-2), 35-43. ISSN 0173-0835. Dostupné z: doi:10.1002/elps.202200136
- [36] GOTTI, R, B. PASQUINI, S. ORLANDINI a S. FURLANETTO. Recent applications of the derivatization techniques in capillary electrophoresis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis Open*. 2023, **1**. ISSN 2949771X. Dostupné z: doi:10.1016/j.jpba.2023.100003
- [37] PAULUS, A. a A. KLOCKOW-BECK. Separation and detection of carbohydrates in capillary electrophoresis. In: *Analysis of Carbohydrates by Capillary Electrophoresis*. Wiesbaden: Vieweg Teubner Verlag, 1999, s. 49-92. Chromatographia CE-Series. ISBN 978-3-322-85022-5. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-322-85020-1_4
- [38] LAMARI, F. N., R. KUHN a N. K. KARAMANOS. Derivatization of carbohydrates for chromatographic, electrophoretic and mass spectrometric structure analysis. *Journal of Chromatography B*. 2003, **793**(1), 15-36. ISSN 15700232. Dostupné z: doi:10.1016/S1570-0232(03)00362-3
- [39] SHILOVA, N. V. a N. V. BOVIN. Fluorescent labels for the analysis of mono- and oligosaccharides. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. 2003, **29**(4), 309-324. ISSN 10681620. Dostupné z: doi:10.1023/A:1024995615374
- [40] OEFNER, P. J. a Claudia CHIESA. Capillary electrophoresis of carbohydrates. *Glycobiology*. 1994, **4**(4), 397-412. ISSN 0959-6658. Dostupné z: doi:10.1093/glycob/4.4.397

- [41] KOVÁCS, Z., G. PAPP, H. HORVÁTH, F. JOÓ a A. GUTTMAN. A novel carbohydrate labeling method utilizing transfer hydrogenation-mediated reductive amination. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2017, **142**, 324-327. ISSN 07317085. Dostupné z: doi:10.1016/j.jpba.2017.05.017
- [42] KŘENKOVÁ, J., M. LISKOVÁ, R. ČMELÍK, G. VIGH a F. FORET. Multicationic aminopyrene-based labeling tags for oligosaccharide analysis by capillary electrophoresis-mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*. 2020, **1095**, 226-232. ISSN 00032670. Dostupné z: doi:10.1016/j.aca.2019.10.032
- [43] MOURA, P. C., M. RAPOSO a V. VASSILENKO. Breath volatile organic compounds (VOCs) as biomarkers for the diagnosis of pathological conditions: A review. *Biomedical Journal*. 2023, **46**(4). ISSN 23194170. Dostupné z: doi:10.1016/j.bj.2023.100623
- [44] LAPIZCO-ENCINAS, B. H., Y. V. ZHANG, P. P. GQAMANA, J. LAVICKÁ a F. FORET. Capillary electrophoresis as a sample separation step to mass spectrometry analysis: A primer. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2023, **164**. ISSN 01659936. Dostupné z: doi:10.1016/j.trac.2023.117093
- [45] KONERMANN, L., E. AHADI, A. D. RODRIGUEZ a S. VAHIDI. Unraveling the mechanism of electrospray ionization. *Analytical Chemistry*. 2013, **85**(1), 2-9. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/ac302789c
- [46] HO, C. S., K. Ch. LAM, M. CHAN, et al. Electrospray ionisation mass spectrometry: Principles and clinical applications. *The Clinical biochemist Reviews*. 2003, **24**(1), 3-12.
- [47] CATHARINO, R. R., A. C. H. F. SAWAYA a M. N. EBERLIN. Use of electrospray ionization mass spectrometry to fingerprint beer. In: *Beer in Health and Disease Prevention*. Elsevier, 2009, s. 923-934. ISBN 9780123738912. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-373891-2.00092-4
- [48] FJELDSTED, J. *Time-of-Flight Mass Spectrometry: Technical Overview* [online]. USA: Agilent Technologies, 2003, 12 s. [cit. 2025-03-26]. 5989-0373EN. Dostupné z: <https://www.agilent.com/cs/library/technicaloverviews/public/5989-0373EN%2011-Dec-2003.pdf>
- [49] STOLZ, A., K. JOOSS, O. HÖCKER, J. RÖMER, J. SCHLECHT a Ch. NEUSÜSS. Recent advances in capillary electrophoresis-mass spectrometry: Instrumentation, methodology and applications. *Electrophoresis*. 2019, **40**(1), 79-112. ISSN 0173-0835. Dostupné z: doi:10.1002/elps.201800331
- [50] NAUMANN, L., J. SCHAIRER, A. HÖCHSMANN, E. NAGHDI a Ch. NEUSÜSS. Capillary electrophoresis-mass spectrometry interfacing: Principles and recent developments. In: *Capillary Electrophoresis-Mass Spectrometry for Proteomics and Metabolomics: Principles and Applications*. Wiley, 2022, s. 1-33. ISBN 978-3-527-34921-0. Dostupné z: doi:10.1002/9783527833092.ch1

- [51] WU, H. a K. TANG. Highly sensitive and robust capillary electrophoresis-electrospray ionization-mass spectrometry: Interfaces, preconcentration techniques and applications. *Reviews in Analytical Chemistry*. 2020, **39**(1), 45-55. ISSN 2191-0189. Dostupné z: doi:10.1515/revac-2020-0112
- [52] LINDENBURG, P. W., R. HASELBERG, G. ROZING a R. RAMAUTAR. Developments in interfacing designs for CE-MS: Towards enabling tools for proteomics and metabolomics. *Chromatographia*. 2015, **78**(5-6), 367-377. ISSN 0009-5893. Dostupné z: doi:10.1007/s10337-014-2795-5
- [53] KŘENKOVÁ, J. a F. FORET. On-line CE / ESI / MS interfacing: Recent developments and applications in proteomics. *Proteomics*. 2012, **12**(19-20), 2978-2990. ISSN 1615-9853. Dostupné z: doi:10.1002/pmic.201200140
- [54] HSIEH, J., E. BARONAS, C. MUIR a S. A. MARTIN. A novel nanospray capillary zone electrophoresis/mass spectrometry interface. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 1999, **13**(1), 62-72. Dostupné z: doi:10.1002/(SICI)1097-0231(19990115)13:1<67::AID-RCM453>3.0.CO;2-F
- [55] SUN, L., G. ZHU, Z. ZHANG, S. MOU a N. J. DOVICH. Third-generation electrokinetically pumped sheath-flow nanospray interface with improved stability and sensitivity for automated capillary zone electrophoresis-mass spectrometry analysis of complex proteome digests. *Journal of Proteome Research*. 2015, **14**(5), 2312-2321. ISSN 1535-3893. Dostupné z: doi:10.1021/acs.jproteome.5b00100
- [56] MAXWELL, E. J., X. ZHONG, H. ZHANG, N. VAN ZEIJL a D. D. Y. CHEN. Decoupling CE and ESI for a more robust interface with MS. *Electrophoresis*. 2010, **31**(7), 1130-1137. ISSN 0173-0835. Dostupné z: doi:10.1002/elps.200900517
- [57] MOINI, M. Simplifying CE-MS operation. 2. Interfacing low-flow separation techniques to mass spectrometry using a porous tip. *Analytical Chemistry*. 2007, **79**(11), 4241-4246. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/ac0704560
- [58] SASTRE TORAÑO, J., R. RAMAUTAR a G. DE JONG. Advances in capillary electrophoresis for the life sciences. *Journal of Chromatography B*. 2019, **1118-1119**, 116-136. ISSN 15700232. Dostupné z: doi:10.1016/j.jchromb.2019.04.020
- [59] ČESLA, P., N. VAŇKOVÁ, J. KŘENKOVÁ a J. FISCHER. Comparison of isocratic retention models for hydrophilic interaction liquid chromatographic separation of native and fluorescently labeled oligosaccharides. *Journal of Chromatography A*. 2016, **1438**, 179-188. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2016.02.032
- [60] JACKSON, P. The use of polyacrylamide-gel electrophoresis for the high-resolution separation of reducing saccharides labelled with the fluorophore 8-aminonaphthalene-1,3,6-trisulphonic acid. Detection of picomolar quantities by an imaging system based on a cooled charge-coupled device. *Biochemical Journal*. 1990, **270**(3), 705-713. ISSN 0264-6021. Dostupné z: doi:10.1042/bj2700705

- [61] CHIESA, C. a C. HORVÁTH. Capillary zone electrophoresis of malto-oligosaccharides derivatized with 8-aminonaphthalene-1,3,6-trisulfonic acid. *Journal of Chromatography A*. 1993, **645**(2), 337-352. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/0021-9673(93)83394-8
- [62] KLOCKOW, A., H. MICHAEL WIDMER, R. AMADO a A. PAULUS. Capillary electrophoresis of ANTS labelled oligosaccharide ladders and complex carbohydrates. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*. 1994, **350**(7-9), 415-425. ISSN 0937-0633. Dostupné z: doi:10.1007/BF00321784
- [63] SCHLECHT, J., A. STOLZ, A. HOFMANN, L. GERSTUNG a C. NEUSÜSS. NanoCEasy: An easy, flexible, and robust nanoflow sheath liquid capillary electrophoresis-mass spectrometry interface based on 3D printed parts. *Analytical Chemistry*. 2021, **93**(44), 14593-14598. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/acs.analchem.1c03213
- [64] SMITH, R. D., J. A. OLIVARES, N. T. NGUYEN a H. R. UDSETH. Capillary zone electrophoresis-mass spectrometry using an electrospray ionization interface. *Analytical Chemistry*. 1988, **60**(5), 436-441. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/ac00156a013

4 PŘÍLOHY

| | |
|--|----|
| Příloha A: Tetraboritanový elektrolyt..... | 78 |
| Příloha B: Fosfátový elektrolyt..... | 82 |
| Příloha C: Elektrolyt mravenčanu amonného..... | 89 |
| Příloha D: Elektrolyt hydrogenuhličitanu amonného..... | 92 |
| Příloha E: Elektrolyt octanu amonného..... | 95 |

Příloha A: Tetraboritanový elektrolyt

Tabulka 4.1 – Separační charakteristiky maltózového žebříčku v borátovém pufru 25 mM, pH 9,5, teplota kapiláry 25 °C, $l_t = 51$ cm, $l_d = 42$ cm, dávkování 50 mbar 5 s, různé separační napětí

| Napětí 30 kV | | | | | | |
|--------------|---------------|--|-------------------|---------|---------------|-------------------|
| Látka | t_i^1 (min) | μ_i ($m^2 \cdot s^{-1} \cdot V^{-1}$) $\cdot 10^{-9}$ | $w_{1/2}^1$ (min) | N | H (μm) | R |
| TM | 2,00 | 59,6 | | | | M 6/7 3,4 |
| M7 | 4,08 | -30,4 | 0,055 | 30 740 | 13,7 | M 5/6 4,4 |
| M6 | 4,39 | -32,5 | 0,052 | 39 054 | 10,8 | M 4/5 7,3 |
| M5 | 4,78 | -34,7 | 0,055 | 42 147 | 10,0 | M 3/4 11,6 |
| M4 | 5,46 | -37,8 | 0,055 | 55 308 | 7,6 | M 2/3 8,3 |
| M3 | 6,65 | -41,7 | 0,065 | 57 455 | 7,3 | |
| M | 7,92 | -44,6 | 0,115 | 26 267 | 16,0 | |
| Napětí 25 kV | | | | | | |
| Látka | t_i^1 (min) | μ_i ($m^2 \cdot s^{-1} \cdot V^{-1}$) $\cdot 10^{-9}$ | $w_{1/2}^1$ (min) | N | H (μm) | R |
| TM | 2,49 | 57,5 | | | | M 6/7 6,7 |
| M7 | 4,78 | -27,6 | 0,030 | 144 874 | 2,9 | M 5/6 8,6 |
| M6 | 5,11 | -29,5 | 0,028 | 187 387 | 2,2 | M 4/5 13,7 |
| M5 | 5,52 | -31,6 | 0,028 | 214 016 | 2,0 | M 3/4 19,4 |
| M4 | 6,20 | -34,5 | 0,031 | 227 151 | 1,8 | M 2/3 8,2 |
| M3 | 7,32 | -38,0 | 0,037 | 220 382 | 1,9 | |
| M | 8,30 | -40,3 | 0,105 | 34 607 | 12,1 | |
| Napětí 20 kV | | | | | | |
| Látka | t_i^1 (min) | μ_i ($m^2 \cdot s^{-1} \cdot V^{-1}$) $\cdot 10^{-9}$ | $w_{1/2}^1$ (min) | N | H (μm) | R |
| TM | 3,24 | 55,0 | | | | M 6/7 7,9 |
| M7 | 6,38 | -27,0 | 0,032 | 214 009 | 2,0 | M 5/6 9,8 |
| M6 | 6,81 | -28,8 | 0,033 | 242 289 | 1,7 | M 4/5 15,2 |
| M5 | 7,37 | -30,8 | 0,034 | 261 975 | 1,6 | M 3/4 22,1 |
| M4 | 8,29 | -33,5 | 0,037 | 274 570 | 1,5 | M 2/3 9,6 |
| M3 | 9,79 | -36,8 | 0,043 | 292 046 | 1,4 | |
| M | 11,10 | -39,0 | 0,118 | 49 068 | 8,6 | |
| Napětí 15 kV | | | | | | |
| Látka | t_i^1 (min) | μ_i ($m^2 \cdot s^{-1} \cdot V^{-1}$) $\cdot 10^{-9}$ | $w_{1/2}^1$ (min) | N | H (μm) | R |
| TM | 4,51 | 52,8 | | | | M 6/7 7,2 |
| M7 | 8,92 | -26,1 | 0,049 | 183 673 | 13,7 | M 5/6 8,7 |
| M6 | 9,54 | -27,8 | 0,051 | 191 935 | 10,8 | M 4/5 13,5 |
| M5 | 10,31 | -29,7 | 0,054 | 205 602 | 10,0 | M 3/4 18,9 |
| M4 | 11,60 | -32,3 | 0,059 | 213 786 | 7,6 | M 2/3 10,3 |
| M3 | 13,72 | -35,5 | 0,072 | 200 965 | 7,3 | |
| M | 15,63 | -37,6 | 0,147 | 62 407 | 16,0 | |

¹ průměrná hodnota, n = 2

Tabulka 4.2 – Separační charakteristiky maltózového žebříčku v borátovém pufru 25 mM, pH 9,5, teplota kapiláry 20 °C, $l_t = 51$ cm, $l_d = 42$ cm, dávkování 50 mbar 5 s, různé separační napětí

| Napětí 30 kV | | | | | | |
|--------------|---------------|--|-------------------|---------|---------------|-------------------|
| Látka | t_i^1 (min) | μ_i ($m^2 \cdot s^{-1} \cdot V^{-1}$) $\cdot 10^{-9}$ | $w_{1/2}^1$ (min) | N | H (μm) | R |
| TM | 2,12 | 56,2 | | | | M 6/7 3,0 |
| M7 | 4,11 | -27,2 | 0,053 | 33 734 | 12,5 | M 5/6 3,7 |
| M6 | 4,38 | -29,0 | 0,052 | 39 958 | 10,5 | M 4/5 5,9 |
| M5 | 4,74 | -31,0 | 0,059 | 35 911 | 11,7 | M 3/4 9,2 |
| M4 | 5,34 | -33,9 | 0,061 | 42 026 | 10,0 | M 2/3 13,1 |
| M3 | 6,35 | -37,4 | 0,069 | 47 649 | 8,8 | |
| M | 8,44 | -42,1 | 0,118 | 28 265 | 14,9 | |
| Napětí 25 kV | | | | | | |
| Látka | t_i^1 (min) | μ_i ($m^2 \cdot s^{-1} \cdot V^{-1}$) $\cdot 10^{-9}$ | $w_{1/2}^1$ (min) | N | H (μm) | R |
| TM | 2,67 | 53,5 | | | | M 6/7 4,4 |
| M7 | 5,07 | -25,3 | 0,049 | 58 220 | 7,2 | M 5/6 5,6 |
| M6 | 5,41 | -27,0 | 0,041 | 98 517 | 4,3 | M 4/5 8,6 |
| M5 | 5,83 | -29,0 | 0,049 | 77 741 | 5,4 | M 3/4 13,9 |
| M4 | 6,53 | -31,6 | 0,047 | 108 086 | 3,9 | M 2/3 9,4 |
| M3 | 7,67 | -34,8 | 0,049 | 134 214 | 3,1 | |
| M | 8,63 | -36,9 | 0,072 | 80 257 | 5,2 | |
| Napětí 20 kV | | | | | | |
| Látka | t_i^1 (min) | μ_i ($m^2 \cdot s^{-1} \cdot V^{-1}$) $\cdot 10^{-9}$ | $w_{1/2}^1$ (min) | N | H (μm) | R |
| TM | 3,54 | 50,5 | | | | M 6/7 6,2 |
| M7 | 7,10 | -25,3 | 0,047 | 124 587 | 3,4 | M 5/6 7,4 |
| M6 | 7,60 | -27,0 | 0,049 | 135 409 | 3,1 | M 4/5 11,6 |
| M5 | 8,24 | -28,8 | 0,052 | 138 170 | 3,0 | M 3/4 17,2 |
| M4 | 9,31 | -31,3 | 0,057 | 150 075 | 2,8 | M 2/3 8,5 |
| M3 | 11,08 | -34,4 | 0,065 | 162 000 | 2,6 | |
| M | 12,77 | -36,5 | 0,169 | 31 482 | 13,3 | |
| Napětí 15 kV | | | | | | |
| Látka | t_i^1 (min) | μ_i ($m^2 \cdot s^{-1} \cdot V^{-1}$) $\cdot 10^{-9}$ | $w_{1/2}^1$ (min) | N | H (μm) | R |
| TM | 4,92 | 48,4 | | | | M 6/7 6,8 |
| M7 | 9,83 | -24,1 | 0,059 | 153 585 | 3,3 | M 5/6 8,3 |
| M6 | 10,52 | -25,7 | 0,060 | 168 508 | 3,0 | M 4/5 12,7 |
| M5 | 11,40 | -27,5 | 0,064 | 174 297 | 2,9 | M 3/4 18,1 |
| M4 | 12,86 | -29,8 | 0,070 | 185 954 | 2,7 | M 2/3 9,7 |
| M3 | 15,25 | -32,8 | 0,085 | 176 978 | 2,9 | |
| M | 17,42 | -34,7 | 0,179 | 52 775 | 9,7 | |

¹ průměrná hodnota, n = 2

Tabulka 4.3 – Separační charakteristiky maltózového žebříčku v borátovém pufru 50 mM, pH 9,5, teplota kapiláry 25 °C, $l_t = 51$ cm, $l_d = 42$ cm, dávkování 50 mbar 5 s, různé separační napětí

| Napětí 30 kV | | | | | | |
|--------------|---------------|--|-------------------|---------|---------------|------------|
| Látka | t_i^1 (min) | μ_i ($m^2 \cdot s^{-1} \cdot V^{-1}$) $\cdot 10^{-9}$ | $w_{1/2}^1$ (min) | N | H (μm) | R |
| TM | 1,86 | 63,9 | | | | M 6/7 3,0 |
| M7 | 3,69 | -31,6 | 0,079 | 11 985 | 35,0 | M 5/6 3,7 |
| M6 | 3,97 | -33,9 | 0,063 | 21 879 | 19,2 | M 4/5 5,9 |
| M5 | 4,36 | -36,6 | 0,075 | 18 840 | 22,3 | M 3/4 9,2 |
| M4 | 5,02 | -40,2 | 0,059 | 39 927 | 10,5 | M 2/3 13,1 |
| M3 | 6,28 | -44,9 | 0,072 | 42 005 | 10,0 | |
| M | 9,41 | -51,2 | 0,082 | 72 640 | 5,8 | |
| n_c | 47 | | průměr | 34 546 | 17,1 | |
| Napětí 25 kV | | | | | | |
| Látka | t_i^1 (min) | μ_i ($m^2 \cdot s^{-1} \cdot V^{-1}$) $\cdot 10^{-9}$ | $w_{1/2}^1$ (min) | N | H (μm) | R |
| TM | 2,67 | 53,6 | | | | M 6/7 2,1 |
| M7 | 5,31 | -26,7 | 0,112 | 12 396 | 33,9 | M 5/6 2,7 |
| M6 | 5,73 | -28,6 | 0,116 | 13 626 | 30,8 | M 4/5 4,4 |
| M5 | 6,29 | -30,9 | 0,131 | 12 730 | 33,0 | M 3/4 8,7 |
| M4 | 7,28 | -34,0 | 0,131 | 17 238 | 24,4 | M 2/3 21,4 |
| M3 | 9,22 | -38,1 | 0,132 | 27 056 | 15,5 | |
| M | 14,42 | -43,7 | 0,154 | 48 531 | 8,7 | |
| n_c | 42 | | průměr | 21 929 | 24,4 | |
| Napětí 20 kV | | | | | | |
| Látka | t_i^1 (min) | μ_i ($m^2 \cdot s^{-1} \cdot V^{-1}$) $\cdot 10^{-9}$ | $w_{1/2}^1$ (min) | N | H (μm) | R |
| TM | 3,89 | 45,9 | | | | M 6/7 5,2 |
| M7 | 8,12 | -24,0 | 0,078 | 59 793 | 7,0 | M 5/6 6,6 |
| M6 | 8,82 | -25,7 | 0,079 | 69 389 | 6,1 | M 4/5 9,7 |
| M5 | 9,76 | -27,7 | 0,090 | 65 468 | 6,4 | M 3/4 16,6 |
| M4 | 11,43 | -30,3 | 0,112 | 57 968 | 7,2 | M 2/3 36,9 |
| M3 | 14,72 | -33,8 | 0,121 | 81 877 | 5,1 | |
| M | 23,70 | -38,4 | 0,165 | 113 789 | 3,7 | |
| n_c | 82 | | průměr | 74 714 | 5,9 | |
| Napětí 15 kV | | | | | | |
| Látka | t_i^1 (min) | μ_i ($m^2 \cdot s^{-1} \cdot V^{-1}$) $\cdot 10^{-9}$ | $w_{1/2}^1$ (min) | N | H (μm) | R |
| TM | 5,53 | 43,0 | | | | M 6/7 5,1 |
| M7 | 12,01 | -23,2 | 0,112 | 63 323 | 6,6 | M 5/6 6,6 |
| M6 | 13,06 | -24,8 | 0,132 | 54 466 | 7,7 | M 4/5 11,8 |
| M5 | 14,51 | -26,7 | 0,127 | 72 501 | 5,8 | M 3/4 19,4 |
| M4 | 17,07 | -29,1 | 0,129 | 96 844 | 4,3 | M 2/3 37,2 |
| M3 | 22,15 | -32,3 | 0,180 | 84 461 | 5,0 | |
| M | 36,49 | -36,5 | 0,274 | 98 640 | 4,3 | |
| n_c | 91 | | průměr | 78 372 | 5,6 | |

¹ průměrná hodnota, n = 2

Tabulka 4.4 – Separační charakteristiky maltóзовého žebříčku v borátovém pufru 75 mM, pH 9,5, teplota kapiláry 25 °C, $l_t = 51$ cm, $l_d = 42$ cm, dávkování 50 mbar 5 s, různé separační napětí

| Napětí 25 kV | | | | | | |
|----------------------|---------------|--|-------------------|--------|---------------|------------|
| Látka | t_i^1 (min) | μ_i ($m^2 \cdot s^{-1} \cdot V^{-1}$) $\cdot 10^{-9}$ | $w_{1/2}^1$ (min) | N | H (μm) | R |
| TM | 2,72 | 52,6 | | | | M 6/7 3,6 |
| M7 | 6,04 | -29,0 | 0,092 | 24 031 | 17,5 | M 5/6 4,5 |
| M6 | 6,62 | -31,0 | 0,096 | 26 250 | 16,0 | M 4/5 7,6 |
| M5 | 7,46 | -33,5 | 0,124 | 20 105 | 20,9 | M 3/4 15,7 |
| M4 | 9,01 | -36,8 | 0,115 | 33 799 | 12,4 | M 2/3 40,3 |
| M3 | 12,45 | -41,1 | 0,142 | 42 766 | 9,8 | |
| M | 25,79 | -47,1 | 0,248 | 60 180 | 7,0 | |
| n_c | 86 | | průměr | 34 522 | 13,9 | |
| Napětí 20 kV | | | | | | |
| Látka | t_i^1 (min) | μ_i ($m^2 \cdot s^{-1} \cdot V^{-1}$) $\cdot 10^{-9}$ | $w_{1/2}^1$ (min) | N | H (μm) | R |
| TM | 4,19 | 42,6 | | | | M 6/7 5,4 |
| M7 | 9,88 | -24,5 | 0,115 | 41 102 | 10,2 | M 5/6 7,8 |
| M6 | 10,91 | -26,2 | 0,108 | 56 470 | 7,4 | M 4/5 13,5 |
| M5 | 12,43 | -28,2 | 0,121 | 58 179 | 7,2 | M 3/4 25,1 |
| M4 | 15,28 | -30,9 | 0,128 | 79 551 | 5,3 | M 2/3 54,0 |
| M3 | 21,89 | -34,4 | 0,182 | 79 979 | 5,3 | |
| M | 51,73 | -39,1 | 0,469 | 67 594 | 6,2 | |
| n_c | 132 | | průměr | 63 813 | 6,9 | |
| Napětí 15 kV | | | | | | |
| Látka | t_i^1 (min) | μ_i ($m^2 \cdot s^{-1} \cdot V^{-1}$) $\cdot 10^{-9}$ | $w_{1/2}^1$ (min) | N | H (μm) | R |
| TM | 6,43 | 37,0 | | | | M 6/7 6,2 |
| M7 | 15,86 | -22,0 | 0,167 | 50 074 | 8,4 | M 5/6 8,8 |
| M6 | 17,59 | -23,5 | 0,162 | 65 425 | 6,4 | M 4/5 14,7 |
| M5 | 20,15 | -25,2 | 0,182 | 68 350 | 6,1 | M 3/4 26,7 |
| M4 | 25,04 | -27,5 | 0,209 | 79 654 | 5,3 | M 2/3 - |
| M3 | 36,58 | -30,5 | 0,300 | 82 597 | 5,1 | |
| M | - | - | - | - | - | |
| n_c | - | | průměr | 69 220 | 6,3 | |

¹ průměrná hodnota, n = 2

Příloha B: Fosfátový elektrolyt

Tabulka 4.5 – Separáčnı charakteristiky maltózového žebřičku ve fosfátu 25 mM, pH 2,5, teplota kapiláry 25 °C, $l_t = 51$ cm, $l_d = 42$ cm, dávkování 50 mbar 5 s, různé separáčnı napětı

| Napětı –30 kV | | | | | | |
|----------------------|---------------|--|-------------------|--------|---------------|------------------|
| Látka | t_i^1 (min) | μ_i ($m^2 \cdot s^{-1} \cdot V^{-1}$) $\cdot 10^{-9}$ | $w_{1/2}^1$ (min) | N | H (μm) | R |
| ANTS | 2,47 | –48,1 | 0,031 | 36 335 | 11,6 | M 2/3 5,9 |
| M | 3,13 | –38,1 | 0,042 | 31 366 | 16,3 | M 3/4 4,7 |
| M3 | 3,59 | –33,1 | 0,052 | 26 908 | 19,0 | M 4/5 3,9 |
| M4 | 4,02 | –29,6 | 0,056 | 28 192 | 18,1 | M 5/6 3,2 |
| M5 | 4,42 | –26,9 | 0,064 | 26 219 | 19,5 | M 6/7 2,7 |
| M6 | 4,79 | –24,8 | 0,071 | 24 932 | 20,5 | |
| M7 | 5,15 | –23,1 | 0,085 | 20 359 | 25,0 | |
| n_c | 20 | | průměr | 26 329 | 19,7 | |
| Napětı –25 kV | | | | | | |
| Látka | t_i^1 (min) | μ_i ($m^2 \cdot s^{-1} \cdot V^{-1}$) $\cdot 10^{-9}$ | $w_{1/2}^1$ (min) | N | H (μm) | R |
| ANTS | 3,14 | –45,5 | 0,036 | 43 285 | 9,7 | M 2/3 7,4 |
| M | 3,99 | –35,8 | 0,045 | 43 702 | 9,6 | M 3/4 6,0 |
| M3 | 4,62 | –30,9 | 0,055 | 38 702 | 10,9 | M 4/5 5,0 |
| M4 | 5,22 | –27,4 | 0,062 | 39 210 | 10,7 | M 5/6 4,1 |
| M5 | 5,78 | –24,7 | 0,070 | 37 645 | 11,2 | M 6/7 3,9 |
| M6 | 6,30 | –22,7 | 0,079 | 35 539 | 11,8 | |
| M7 | 6,83 | –20,9 | 0,078 | 42 729 | 9,8 | |
| n_c | 26 | | průměr | 39 588 | 10,7 | |
| Napětı –20 kV | | | | | | |
| Látka | t_i^1 (min) | μ_i ($m^2 \cdot s^{-1} \cdot V^{-1}$) $\cdot 10^{-9}$ | $w_{1/2}^1$ (min) | N | H (μm) | R |
| ANTS | 3,90 | –45,8 | 0,042 | 47 750 | 8,8 | M 2/3 7,2 |
| M | 4,90 | –36,4 | 0,054 | 45 311 | 9,3 | M 3/4 5,8 |
| M3 | 5,61 | –31,8 | 0,061 | 46 289 | 9,1 | M 4/5 4,8 |
| M4 | 6,26 | –28,5 | 0,069 | 45 435 | 9,2 | M 5/6 3,8 |
| M5 | 6,86 | –26,0 | 0,077 | 44 383 | 9,5 | M 6/7 3,9 |
| M6 | 7,38 | –24,2 | 0,083 | 44 402 | 9,5 | |
| M7 | 7,94 | –22,5 | 0,083 | 50 536 | 8,3 | |
| n_c | 26 | | průměr | 46 059 | 9,1 | |
| Napětı –15 kV | | | | | | |
| Látka | t_i^1 (min) | μ_i ($m^2 \cdot s^{-1} \cdot V^{-1}$) $\cdot 10^{-9}$ | $w_{1/2}^1$ (min) | N | H (μm) | R |
| ANTS | 5,31 | –44,9 | 0,079 | 25 146 | 16,7 | M 2/3 5,5 |
| M | 6,68 | –35,6 | 0,096 | 26 900 | 15,6 | M 3/4 4,5 |
| M3 | 7,64 | –31,1 | 0,111 | 26 401 | 15,9 | M 4/5 3,8 |
| M4 | 8,52 | –27,9 | 0,122 | 27 040 | 15,5 | M 5/6 3,2 |
| M5 | 9,33 | –25,5 | 0,129 | 29 051 | 14,5 | M 6/7 2,9 |
| M6 | 10,07 | –23,6 | 0,140 | 28 876 | 14,5 | |
| M7 | 10,82 | –22,0 | 0,167 | 23 195 | 18,1 | |
| n_c | 20 | | průměr | 26 911 | 15,7 | |

¹ průměrná hodnota, n = 2

Tabulka 4.6 – Separační charakteristiky maltóзовého žebříčku ve fosfátu 50 mM, pH 2,5, teplota kapiláry 25 °C, $l_t = 51$ cm, $l_d = 42$ cm, dávkování 50 mbar 5 s, různé separační napětí

| Napětí –30 kV | | | | | | |
|----------------------|---------------|--|-------------------|--------|---------------|------------------|
| Látka | t_i^1 (min) | μ_i ($m^2 \cdot s^{-1} \cdot V^{-1}$) $\cdot 10^{-9}$ | $w_{1/2}^1$ (min) | N | H (μm) | R |
| ANTS | 2,59 | -45,9 | 0,032 | 36 395 | 11,5 | M 2/3 5,8 |
| M | 3,34 | -35,7 | 0,050 | 24 412 | 17,2 | M 3/4 4,7 |
| M3 | 3,84 | -31,0 | 0,052 | 29 950 | 14,0 | M 4/5 3,6 |
| M4 | 4,32 | -27,6 | 0,068 | 22 531 | 18,6 | M 5/6 2,9 |
| M5 | 4,76 | -25,0 | 0,081 | 19 368 | 21,7 | M 6/7 2,5 |
| M6 | 5,17 | -23,0 | 0,084 | 20 810 | 20,2 | |
| M7 | 5,58 | -21,3 | 0,106 | 15 234 | 27,6 | |
| n_c | 18 | | průměr | 22 051 | 19,9 | |
| Napětí –25 kV | | | | | | |
| Látka | t_i^1 (min) | μ_i ($m^2 \cdot s^{-1} \cdot V^{-1}$) $\cdot 10^{-9}$ | $w_{1/2}^1$ (min) | N | H (μm) | R |
| ANTS | 2,91 | -49,0 | 0,035 | 38 670 | 10,9 | M 2/3 6,1 |
| M | 3,74 | -38,2 | 0,052 | 28 295 | 14,8 | M 3/4 5,0 |
| M3 | 4,29 | -33,3 | 0,054 | 35 126 | 12,0 | M 4/5 3,7 |
| M4 | 4,79 | -29,8 | 0,066 | 29 035 | 14,5 | M 5/6 3,1 |
| M5 | 5,26 | -27,1 | 0,082 | 22 594 | 18,6 | M 6/7 2,9 |
| M6 | 5,70 | -25,1 | 0,082 | 26 891 | 15,6 | |
| M7 | 6,12 | -23,3 | 0,092 | 24 525 | 17,1 | |
| n_c | 20 | | průměr | 27 745 | 15,4 | |
| Napětí –20 kV | | | | | | |
| Látka | t_i^1 (min) | μ_i ($m^2 \cdot s^{-1} \cdot V^{-1}$) $\cdot 10^{-9}$ | $w_{1/2}^1$ (min) | N | H (μm) | R |
| ANTS | 3,86 | -46,2 | 0,048 | 35 999 | 11,7 | M 2/3 6,2 |
| M | 4,95 | -36,1 | 0,061 | 36 566 | 11,5 | M 3/4 5,0 |
| M3 | 5,67 | -31,5 | 0,076 | 30 798 | 13,6 | M 4/5 4,5 |
| M4 | 6,33 | -28,2 | 0,078 | 36 310 | 11,6 | M 5/6 3,9 |
| M5 | 6,93 | -25,8 | 0,080 | 41 178 | 10,2 | M 6/7 3,5 |
| M6 | 7,48 | -23,9 | 0,086 | 41 800 | 10,0 | |
| M7 | 8,00 | -22,3 | 0,092 | 42 146 | 10,0 | |
| n_c | 23 | | průměr | 38 133 | 11,2 | |
| Napětí –15 kV | | | | | | |
| Látka | t_i^1 (min) | μ_i ($m^2 \cdot s^{-1} \cdot V^{-1}$) $\cdot 10^{-9}$ | $w_{1/2}^1$ (min) | N | H (μm) | R |
| ANTS | 5,49 | -43,4 | 0,064 | 40 449 | 10,4 | M 2/3 6,2 |
| M | 7,04 | -33,8 | 0,089 | 34 400 | 12,2 | M 3/4 5,4 |
| M3 | 8,02 | -29,7 | 0,096 | 38 671 | 10,9 | M 4/5 4,2 |
| M4 | 8,98 | -26,5 | 0,115 | 34 003 | 12,4 | M 5/6 4,0 |
| M5 | 9,83 | -24,2 | 0,121 | 36 752 | 11,4 | M 6/7 3,6 |
| M6 | 10,64 | -22,4 | 0,117 | 45 841 | 9,2 | |
| M7 | 11,39 | -20,9 | 0,126 | 45 272 | 9,3 | |
| n_c | 24 | | průměr | 39 156 | 10,9 | |

¹ průměrná hodnota, n = 2

Tabulka 4.7 – Separační charakteristiky maltózového žebříčku ve fosfátu 75 mM, pH 2,5, teplota kapiláry 25 °C, $l_t = 51$ cm, $l_d = 42$ cm, dávkování 50 mbar 5 s, různé separační napětí

| Napětí –30 kV | | | | | | |
|----------------------|---------------|--|-------------------|--------|---------------|------------------|
| Látka | t_i^1 (min) | μ_i ($m^2 \cdot s^{-1} \cdot V^{-1}$) $\cdot 10^{-9}$ | $w_{1/2}^1$ (min) | N | H (μm) | R |
| ANTS | 2,34 | -50,9 | 0,039 | 20 022 | 21,0 | M 2/3 4,7 |
| M | 3,17 | -37,6 | 0,056 | 17 655 | 23,8 | M 3/4 3,2 |
| M3 | 3,72 | -32,0 | 0,083 | 11 163 | 37,6 | M 4/5 2,5 |
| M4 | 4,24 | -28,0 | 0,112 | 7 914 | 53,1 | M 5/6 2,2 |
| M5 | 4,72 | -25,2 | 0,110 | 10 240 | 41,0 | M 6/7 1,8 |
| M6 | 5,15 | -23,1 | 0,115 | 11 158 | 37,6 | |
| M7 | 5,56 | -21,3 | 0,158 | 6 856 | 61,3 | |
| n_c | 14 | | průměr | 10 831 | 42,4 | |
| Napětí –25 kV | | | | | | |
| Látka | t_i^1 (min) | μ_i ($m^2 \cdot s^{-1} \cdot V^{-1}$) $\cdot 10^{-9}$ | $w_{1/2}^1$ (min) | N | H (μm) | R |
| ANTS | 2,96 | -48,3 | 0,034 | 42 819 | 9,8 | M 2/3 7,9 |
| M | 3,94 | -36,2 | 0,048 | 37 476 | 11,2 | M 3/4 6,2 |
| M3 | 4,64 | -30,8 | 0,056 | 38 621 | 10,9 | M 4/5 4,9 |
| M4 | 5,27 | -27,1 | 0,065 | 36 226 | 11,6 | M 5/6 3,7 |
| M5 | 5,87 | -24,3 | 0,076 | 32 808 | 12,8 | M 6/7 2,8 |
| M6 | 6,42 | -22,2 | 0,097 | 24 276 | 17,3 | |
| M7 | 6,96 | -20,5 | 0,130 | 15 799 | 26,6 | |
| n_c | 23 | | průměr | 30 868 | 15,1 | |
| Napětí –20 kV | | | | | | |
| Látka | t_i^1 (min) | μ_i ($m^2 \cdot s^{-1} \cdot V^{-1}$) $\cdot 10^{-9}$ | $w_{1/2}^1$ (min) | N | H (μm) | R |
| ANTS | 3,95 | -45,2 | 0,044 | 44 790 | 9,4 | M 2/3 7,7 |
| M | 5,20 | -34,4 | 0,059 | 43 291 | 9,7 | M 3/4 6,2 |
| M3 | 6,02 | -29,6 | 0,067 | 44 382 | 9,5 | M 4/5 5,2 |
| M4 | 6,79 | -26,3 | 0,078 | 42 351 | 9,9 | M 5/6 4,4 |
| M5 | 7,51 | -23,8 | 0,085 | 43 296 | 9,7 | M 6/7 3,8 |
| M6 | 8,18 | -21,8 | 0,096 | 40 346 | 10,4 | |
| M7 | 8,84 | -20,2 | 0,110 | 35 585 | 11,8 | |
| n_c | 27 | | průměr | 41 542 | 10,2 | |
| Napětí –15 kV | | | | | | |
| Látka | t_i^1 (min) | μ_i ($m^2 \cdot s^{-1} \cdot V^{-1}$) $\cdot 10^{-9}$ | $w_{1/2}^1$ (min) | N | H (μm) | R |
| ANTS | 5,59 | -42,6 | 0,060 | 48 220 | 8,7 | M 2/3 7,9 |
| M | 7,34 | -32,4 | 0,083 | 43 523 | 9,7 | M 3/4 6,4 |
| M3 | 8,49 | -28,0 | 0,088 | 51 870 | 8,1 | M 4/5 5,3 |
| M4 | 9,54 | -24,9 | 0,106 | 44 573 | 9,4 | M 5/6 4,7 |
| M5 | 10,52 | -22,6 | 0,109 | 51 741 | 8,1 | M 6/7 4,8 |
| M6 | 11,42 | -20,8 | 0,118 | 51 604 | 8,1 | |
| M7 | 12,42 | -19,2 | 0,127 | 52 944 | 7,9 | |
| n_c | 29 | | průměr | 49 376 | 8,6 | |

Tabulka 4.8 – Separáčnı charakteristiky maltózovéhó žebřičku ve fosfátu 25 mM, pH 6,5, teplota kapiláry 25 °C, $l_t = 51$ cm, $l_d = 42$ cm, dávkování 50 mbar 2 s, různé separáčnı napětı

| Napětı 30 kV | | | | | | |
|--------------|---------------|--|-------------------|---------|---------------|------------|
| Látka | t_i^1 (min) | μ_i ($m^2 \cdot s^{-1} \cdot V^{-1}$) $\cdot 10^{-9}$ | $w_{1/2}^1$ (min) | N | H (μm) | R |
| TM | 1,99 | 59,7 | | | | M 6/7 1,9 |
| M7 | 3,22 | -22,8 | 0,047 | 26 002 | 8,4 | M 5/6 2,6 |
| M6 | 3,38 | -24,5 | 0,054 | 22 126 | 16,2 | M 4/5 3,8 |
| M5 | 3,60 | -26,7 | 0,046 | 34 221 | 19,0 | M 3/4 5,6 |
| M4 | 3,93 | -29,4 | 0,056 | 26 875 | 12,3 | M 2/3 9,9 |
| M3 | 4,48 | -33,1 | 0,059 | 31 524 | 15,6 | |
| M | 5,55 | -38,3 | 0,068 | 36 939 | 13,3 | |
| n_c | 25 | | průměr | 34 075 | 14,6 | |
| Napětı 25 kV | | | | | | |
| Látka | t_i^1 (min) | μ_i ($m^2 \cdot s^{-1} \cdot V^{-1}$) $\cdot 10^{-9}$ | $w_{1/2}^1$ (min) | N | H (μm) | R |
| TM | 2,50 | 57,2 | | | | M 6/7 5,0 |
| M7 | 4,07 | -22,1 | 0,043 | 49 157 | 8,5 | M 5/6 7,0 |
| M6 | 4,27 | -23,8 | 0,040 | 62 693 | 6,7 | M 4/5 10,5 |
| M5 | 4,55 | -25,8 | 0,039 | 74 946 | 5,6 | M 3/4 15,1 |
| M4 | 4,97 | -28,4 | 0,040 | 85 947 | 4,9 | M 2/3 25,3 |
| M3 | 5,66 | -32,0 | 0,052 | 65 661 | 6,4 | |
| M | 7,03 | -36,8 | 0,056 | 87 660 | 4,8 | |
| n_c | 39 | | průměr | 78 512 | 5,9 | |
| Napětı 20 kV | | | | | | |
| Látka | t_i^1 (min) | μ_i ($m^2 \cdot s^{-1} \cdot V^{-1}$) $\cdot 10^{-9}$ | $w_{1/2}^1$ (min) | N | H (μm) | R |
| TM | 3,20 | 55,7 | | | | M 6/7 2,5 |
| M7 | 5,27 | -21,9 | 0,065 | 36 506 | 11,5 | M 5/6 4,0 |
| M6 | 5,54 | -23,5 | 0,059 | 49 572 | 8,5 | M 4/5 6,3 |
| M5 | 5,89 | -25,4 | 0,046 | 89 513 | 4,7 | M 3/4 8,8 |
| M4 | 6,43 | -28,0 | 0,055 | 75 776 | 5,5 | M 2/3 13,5 |
| M3 | 7,32 | -31,3 | 0,064 | 73 008 | 5,8 | |
| M | 9,01 | -35,9 | 0,084 | 64 030 | 6,6 | |
| n_c | 36 | | průměr | 64 734 | 7,1 | |
| Napětı 15 kV | | | | | | |
| Látka | t_i^1 (min) | μ_i ($m^2 \cdot s^{-1} \cdot V^{-1}$) $\cdot 10^{-9}$ | $w_{1/2}^1$ (min) | N | H (μm) | R |
| TM | 4,44 | 53,6 | | | | M 6/7 3,7 |
| M7 | 7,22 | -20,7 | 0,048 | 123 886 | 3,4 | M 5/6 4,4 |
| M6 | 7,58 | -22,2 | 0,067 | 71 204 | 5,9 | M 4/5 6,4 |
| M5 | 8,06 | -24,1 | 0,061 | 98 191 | 4,3 | M 3/4 9,2 |
| M4 | 8,79 | -26,5 | 0,074 | 78 088 | 5,4 | M 2/3 16,1 |
| M3 | 9,98 | -29,8 | 0,079 | 87 630 | 4,8 | |
| M | 12,22 | -34,1 | 0,084 | 116 341 | 3,6 | |
| n_c | 43 | | průměr | 95 890 | 4,6 | |

¹ průměrná hodnota, n = 2

Tabulka 4.9 – Separační charakteristiky maltózového žebříčku ve fosfátu 50 mM, pH 6,5, teplota kapiláry 25 °C, $l_t = 51$ cm, $l_d = 42$ cm, dávkování 50 mbar 2 s, různé separační napětí

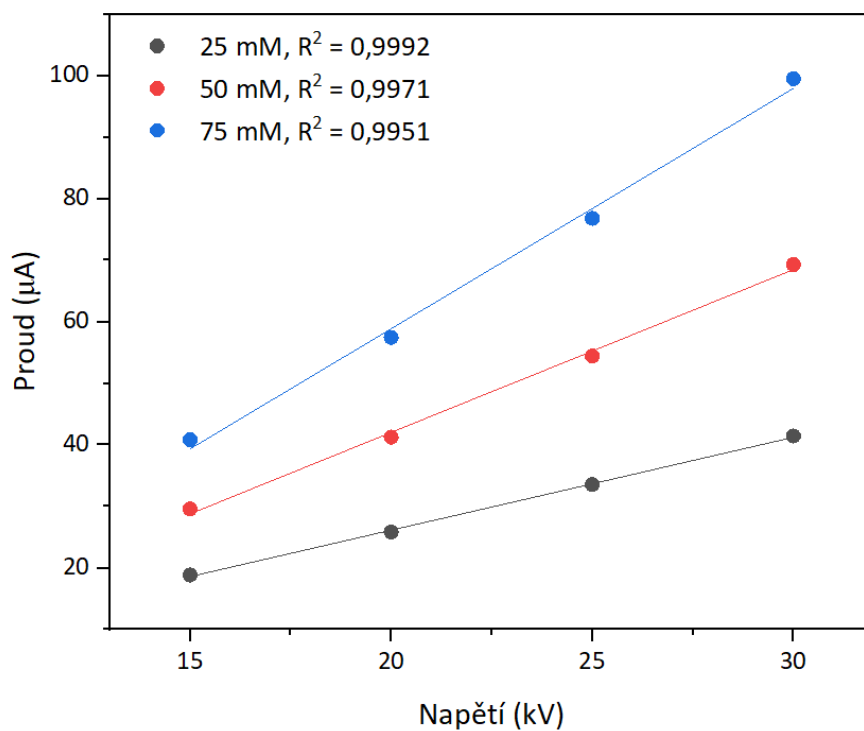
| Napětí 30 kV | | | | | | |
|--------------|---------------|--|-------------------|---------|---------------|------------|
| Látka | t_i^1 (min) | μ_i ($m^2 \cdot s^{-1} \cdot V^{-1}$) $\cdot 10^{-9}$ | $w_{1/2}^1$ (min) | N | H (μm) | R |
| TM | 2,20 | 54,0 | | | | M 6/7 2,7 |
| M7 | 3,67 | -21,6 | 0,047 | 33 241 | 12,6 | M 5/6 3,7 |
| M6 | 3,91 | -23,5 | 0,054 | 28 973 | 14,5 | M 4/5 6,1 |
| M5 | 4,24 | -25,9 | 0,051 | 38 552 | 10,9 | M 3/4 10,0 |
| M4 | 4,77 | -29,0 | 0,052 | 45 900 | 9,2 | M 2/3 18,7 |
| M3 | 5,75 | -33,3 | 0,062 | 47 660 | 8,8 | |
| M | 8,09 | -39,3 | 0,085 | 49 892 | 8,4 | |
| n_c | 45 | | průměr | 40 703 | 10,7 | |
| Napětí 25 kV | | | | | | |
| Látka | t_i^1 (min) | μ_i ($m^2 \cdot s^{-1} \cdot V^{-1}$) $\cdot 10^{-9}$ | $w_{1/2}^1$ (min) | N | H (μm) | R |
| TM | 2,77 | 51,5 | | | | M 6/7 3,3 |
| M7 | 4,85 | -22,1 | 0,051 | 51 065 | 8,2 | M 5/6 4,4 |
| M6 | 5,15 | -23,8 | 0,058 | 43 644 | 9,6 | M 4/5 7,6 |
| M5 | 5,58 | -25,9 | 0,055 | 56 961 | 7,4 | M 3/4 13,2 |
| M4 | 6,25 | -28,7 | 0,050 | 88 513 | 4,7 | M 2/3 23,5 |
| M3 | 7,47 | -32,4 | 0,059 | 89 493 | 4,7 | |
| M | 10,28 | -37,6 | 0,082 | 86 582 | 4,9 | |
| n_c | 55 | | průměr | 69 376 | 6,6 | |
| Napětí 20 kV | | | | | | |
| Látka | t_i^1 (min) | μ_i ($m^2 \cdot s^{-1} \cdot V^{-1}$) $\cdot 10^{-9}$ | $w_{1/2}^1$ (min) | N | H (μm) | R |
| TM | 3,75 | 47,6 | | | | M 6/7 4,5 |
| M7 | 6,58 | -20,5 | 0,055 | 78 223 | 5,4 | M 5/6 6,3 |
| M6 | 6,99 | -22,1 | 0,050 | 106 386 | 3,9 | M 4/5 9,4 |
| M5 | 7,56 | -24,0 | 0,055 | 103 939 | 4,0 | M 3/4 14,3 |
| M4 | 8,46 | -26,5 | 0,057 | 120 311 | 3,5 | M 2/3 25,2 |
| M3 | 10,06 | -29,9 | 0,075 | 99 578 | 4,2 | |
| M | 13,73 | -34,6 | 0,096 | 113 464 | 3,7 | |
| n_c | 65 | | průměr | 103 650 | 4,1 | |
| Napětí 15 kV | | | | | | |
| Látka | t_i^1 (min) | μ_i ($m^2 \cdot s^{-1} \cdot V^{-1}$) $\cdot 10^{-9}$ | $w_{1/2}^1$ (min) | N | H (μm) | R |
| TM | 5,34 | 44,6 | | | | M 6/7 5,3 |
| M7 | 9,34 | -19,1 | 0,059 | 141 316 | 3,0 | M 5/6 6,4 |
| M6 | 9,92 | -20,6 | 0,071 | 109 708 | 3,8 | M 4/5 9,3 |
| M5 | 10,72 | -22,4 | 0,076 | 110 396 | 3,8 | M 3/4 14,9 |
| M4 | 11,98 | -24,7 | 0,083 | 115 443 | 3,6 | M 2/3 28,6 |
| M3 | 14,23 | -27,8 | 0,095 | 124 868 | 3,4 | |
| M | 19,32 | -32,2 | 0,115 | 157 451 | 2,7 | |
| n_c | 71 | | průměr | 126 530 | 3,4 | |

¹ průměrná hodnota, n = 2

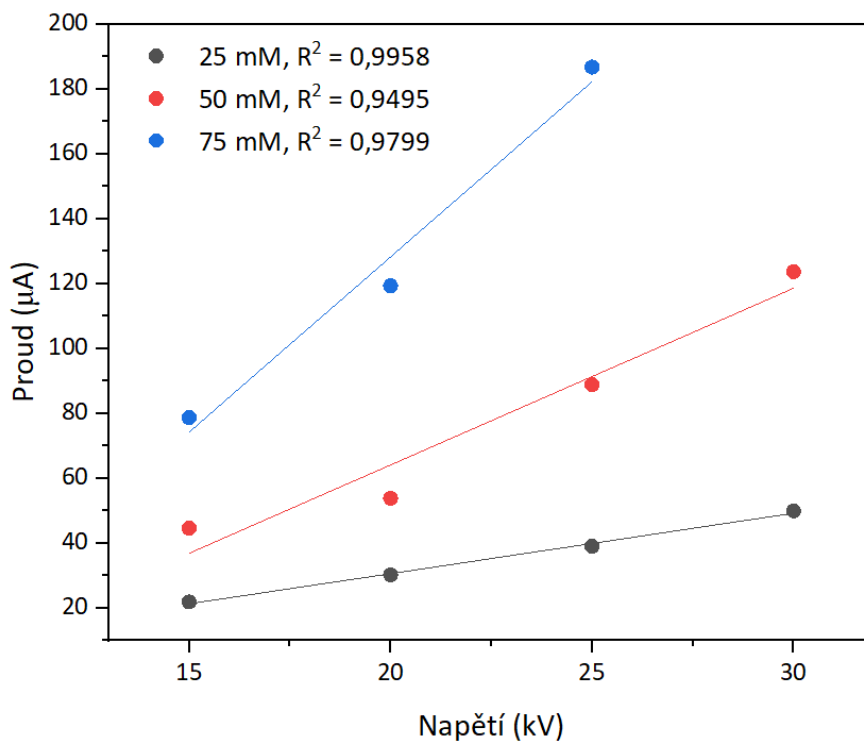
Tabulka 4.10 – Separální charakteristiky maltózového žebříčku ve fosfátu 75 mM, pH 6,5, teplota kapiláry 25 °C, $l_t = 51$ cm, $l_d = 42$ cm, dávkování 50 mbar 2 s, různé separální napětí

| Napětí 25 kV | | | | | | |
|--------------|---------------|--|-------------------|---------|---------------|------------|
| Látka | t_i^1 (min) | μ_i ($m^2 \cdot s^{-1} \cdot V^{-1}$) $\cdot 10^{-9}$ | $w_{1/2}^1$ (min) | N | H (μm) | R |
| TM | 1,99 | 57,9 | 0,019 | 60 841 | 8,2 | M 6/7 |
| M7 | 3,22 | -22,1 | 0,047 | 26 002 | 19,2 | M 5/6 |
| M6 | 3,38 | -23,8 | 0,054 | 22 126 | 22,6 | M 4/5 |
| M5 | 3,60 | -25,8 | 0,046 | 34 221 | 14,6 | M 3/4 |
| M4 | 3,93 | -28,5 | 0,056 | 26 875 | 18,6 | M 2/3 |
| M3 | 4,48 | -32,1 | 0,059 | 31 524 | 15,9 | |
| M | 5,55 | -37,1 | 0,068 | 36 939 | 13,5 | |
| n_c | 25 | | průměr | 34 075 | 16,1 | |
| Napětí 20 kV | | | | | | |
| Látka | t_i^1 (min) | μ_i ($m^2 \cdot s^{-1} \cdot V^{-1}$) $\cdot 10^{-9}$ | $w_{1/2}^1$ (min) | N | H (μm) | R |
| TM | 3,60 | 49,6 | | | | M 6/7 3,1 |
| M7 | 5,86 | -19,2 | 0,061 | 51 283 | 8,2 | M 5/6 4,8 |
| M6 | 6,19 | -20,8 | 0,064 | 51 837 | 8,1 | M 4/5 8,2 |
| M5 | 6,64 | -22,7 | 0,048 | 105 749 | 4,0 | M 3/4 12,4 |
| M4 | 7,35 | -25,3 | 0,054 | 103 907 | 4,0 | M 2/3 20,8 |
| M3 | 8,60 | -28,9 | 0,064 | 98 639 | 4,3 | |
| M | 11,35 | -33,9 | 0,091 | 86 086 | 4,9 | |
| n_c | 51 | | průměr | 82 917 | 5,6 | |
| Napětí 15 kV | | | | | | |
| Látka | t_i^1 (min) | μ_i ($m^2 \cdot s^{-1} \cdot V^{-1}$) $\cdot 10^{-9}$ | $w_{1/2}^1$ (min) | N | H (μm) | R |
| TM | 5,36 | 44,4 | | | | M 6/7 3,6 |
| M7 | 8,78 | -17,3 | 0,08165 | 64 103 | 6,6 | M 5/6 5,4 |
| M6 | 9,26 | -18,7 | 0,0755 | 83 484 | 5,0 | M 4/5 7,8 |
| M5 | 9,94 | -20,4 | 0,07225 | 104 996 | 4,0 | M 3/4 12,1 |
| M4 | 11,00 | -22,7 | 0,08615 | 90 328 | 4,6 | M 2/3 21,3 |
| M3 | 12,84 | -25,8 | 0,0932 | 105 220 | 4,0 | |
| M | 16,89 | -30,3 | 0,1307 | 92 556 | 4,5 | |
| n_c | 54 | | průměr | 90 115 | 4,8 | |

¹ průměrná hodnota, n = 2



Obrázek 4.1 – Závislost proudové odezvy na různém separačním napětí, fosfátový pufr, pH 2,5, koncentrace 25 mM, 50 mM a 75 mM



Obrázek 4.2 – Závislost proudové odezvy na různém separačním napětí, fosfátový pufr, pH 6,5, koncentrace 25 mM, 50 mM a 75 mM

Příloha C: Elektrolyt mravenčanu amonného

Tabulka 4.11 – Separací charakteristiky maltózového žebříčku ve NH₄Fo 10 mM, pH 6,5, teplota kapiláry 25 °C, l_t = 51 cm, l_d = 42 cm, dávkování 50 mbar 2 s, různé separační napětí

| Napětí 30 kV | | | | | | |
|----------------|-----------------------------------|---|-------------------------------------|--------|--------|------------|
| Látka | t _i ¹ (min) | μ _i (m ² ·s ⁻¹ ·V ⁻¹) ·10 ⁻⁹ | w _{1/2} ¹ (min) | N | H (μm) | R |
| TM | 1,90 | 62,5 | | | | M 6/7 2,1 |
| M7 | 3,10 | -24,1 | 0,044 | 28 087 | 15,0 | M 5/6 2,7 |
| M6 | 3,25 | -25,8 | 0,040 | 36 676 | 11,5 | M 4/5 4,0 |
| M5 | 3,44 | -27,9 | 0,044 | 33 387 | 12,6 | M 3/4 5,7 |
| M4 | 3,74 | -30,7 | 0,044 | 40 807 | 10,3 | M 2/3 6,7 |
| M3 | 4,22 | -34,3 | 0,057 | 30 669 | 13,7 | |
| M | 5,32 | -40,1 | 0,135 | 8 606 | 48,8 | |
| n _c | 22 | | průměr | 29706 | 18,6 | |
| Napětí 25 kV | | | | | | |
| Látka | t _i ¹ (min) | μ _i (m ² ·s ⁻¹ ·V ⁻¹) ·10 ⁻⁹ | w _{1/2} ¹ (min) | N | H (μm) | R |
| TM | 2,27 | 63,0 | | | | M 6/7 2,2 |
| M7 | 3,79 | -25,3 | 0,053 | 28 262 | 14,9 | M 5/6 3,0 |
| M6 | 3,98 | -27,1 | 0,046 | 40 648 | 10,3 | M 4/5 4,3 |
| M5 | 4,22 | -29,1 | 0,049 | 40 804 | 10,3 | M 3/4 6,2 |
| M4 | 4,60 | -31,9 | 0,055 | 38 779 | 10,8 | M 2/3 8,7 |
| M3 | 5,23 | -35,6 | 0,064 | 37 484 | 11,2 | |
| M | 6,80 | -42,0 | 0,149 | 11 586 | 36,3 | |
| n _c | 26 | | průměr | 32 927 | 15,6 | |
| Napětí 20 kV | | | | | | |
| Látka | t _i ¹ (min) | μ _i (m ² ·s ⁻¹ ·V ⁻¹) ·10 ⁻⁹ | w _{1/2} ¹ (min) | N | H (μm) | R |
| TM | 2,86 | 62,5 | | | | M 6/7 2,1 |
| M7 | 4,88 | -26,0 | 0,073 | 24 875 | 16,9 | M 5/6 2,7 |
| M6 | 5,13 | -27,7 | 0,070 | 30 115 | 13,9 | M 4/5 4,2 |
| M5 | 5,46 | -29,8 | 0,074 | 30 505 | 13,8 | M 3/4 6,1 |
| M4 | 5,99 | -32,7 | 0,073 | 37 496 | 11,2 | M 2/3 14,5 |
| M3 | 6,90 | -36,6 | 0,103 | 25 072 | 16,8 | |
| M | 9,08 | -42,9 | 0,074 | 84 231 | 5,0 | |
| n _c | 33 | | průměr | 38 716 | 12,9 | |
| Napětí 15 kV | | | | | | |
| Látka | t _i ¹ (min) | μ _i (m ² ·s ⁻¹ ·V ⁻¹) ·10 ⁻⁹ | w _{1/2} ¹ (min) | N | H (μm) | R |
| TM | 3,81 | 62,4 | | | | M 6/7 2,1 |
| M7 | 6,61 | -26,4 | 0,102 | 23 522 | 17,9 | M 5/6 2,9 |
| M6 | 6,97 | -28,2 | 0,094 | 30 512 | 13,8 | M 4/5 4,6 |
| M5 | 7,42 | -30,3 | 0,090 | 37 799 | 11,1 | M 3/4 6,1 |
| M4 | 8,17 | -33,3 | 0,100 | 37 264 | 11,3 | M 2/3 11,7 |
| M3 | 9,60 | -37,6 | 0,174 | 16 776 | 25,0 | |
| M | 12,55 | -43,4 | 0,122 | 58 490 | 7,2 | |
| n _c | 31 | | průměr | 34 061 | 14,4 | |

¹ průměrná hodnota, n = 2

Tabulka 4.12 – Separační charakteristiky maltózového žebříčku ve NH₄Fo 30 mM, pH 6,5, teplota kapiláry 25 °C, l_t = 51 cm, l_d = 42 cm, dávkování 50 mbar 2 s, různé separační napětí

| Napětí 30 kV | | | | | | |
|----------------|-----------------------------------|---|-------------------------------------|--------|--------|------------|
| Látka | t _i ¹ (min) | μ _i (m ² ·s ⁻¹ ·V ⁻¹) ·10 ⁻⁹ | w _{1/2} ¹ (min) | N | H (μm) | R |
| TM | 2,31 | 51,5 | | | | M 6/7 3,5 |
| M7 | 4,41 | -24,5 | 0,051 | 42 363 | 9,9 | M 5/6 4,3 |
| M6 | 4,73 | -26,3 | 0,056 | 39 822 | 10,5 | M 4/5 6,3 |
| M5 | 5,19 | -28,6 | 0,070 | 30 352 | 13,8 | M 3/4 12,7 |
| M4 | 5,89 | -31,3 | 0,062 | 50 031 | 8,4 | M 2/3 25,8 |
| M3 | 7,24 | -35,1 | 0,063 | 72 400 | 5,8 | |
| M | 10,74 | -40,4 | 0,096 | 69 355 | 6,1 | |
| n _c | 57 | | průměr | 50 720 | 9,1 | |
| Napětí 25 kV | | | | | | |
| Látka | t _i ¹ (min) | μ _i (m ² ·s ⁻¹ ·V ⁻¹) ·10 ⁻⁹ | w _{1/2} ¹ (min) | N | H (μm) | R |
| TM | 2,93 | 48,7 | | | | M 6/7 3,5 |
| M7 | 6,04 | -25,1 | 0,091 | 24 342 | 17,3 | M 5/6 5,2 |
| M6 | 6,55 | -26,9 | 0,085 | 32 697 | 12,8 | M 4/5 8,5 |
| M5 | 7,31 | -29,2 | 0,086 | 40 571 | 10,4 | M 3/4 17,2 |
| M4 | 8,67 | -32,3 | 0,102 | 40 407 | 10,4 | M 2/3 35,5 |
| M3 | 11,53 | -36,3 | 0,094 | 83 273 | 5,0 | |
| M | 22,73 | -42,4 | 0,277 | 37 327 | 11,3 | |
| n _c | 81 | | průměr | 43 103 | 11,2 | |
| Napětí 20 kV | | | | | | |
| Látka | t _i ¹ (min) | μ _i (m ² ·s ⁻¹ ·V ⁻¹) ·10 ⁻⁹ | w _{1/2} ¹ (min) | N | H (μm) | R |
| TM | 3,89 | 45,7 | | | | M 6/7 4,2 |
| M7 | 8,88 | -25,8 | 0,135 | 24 036 | 17,5 | M 5/6 7,3 |
| M6 | 9,85 | -27,8 | 0,140 | 27 404 | 15,3 | M 4/5 12,9 |
| M5 | 11,45 | -30,3 | 0,116 | 53 802 | 7,8 | M 3/4 20,6 |
| M4 | 14,46 | -33,5 | 0,159 | 45 974 | 9,1 | M 2/3 - |
| M3 | 23,43 | -38,3 | 0,353 | 24 410 | 17,2 | |
| M | - | - | - | - | - | |
| n _c | - | | průměr | 35 125 | 13,4 | |

¹ průměrná hodnota, n = 2

Tabulka 4.13 – Separální charakteristiky maltózového žebříčku ve NH₄Fo 50 mM, pH 6,5, teplota kapiláry 25 °C, l_t = 51 cm, l_d = 42 cm, dávkování 50 mbar 2 s, různé separální napětí

| Napětí 30 kV | | | | | | |
|----------------|-----------------------------------|---|-------------------------------------|--------|--------|------------|
| Látka | t _i ¹ (min) | μ _i (m ² ·s ⁻¹ ·V ⁻¹) ·10 ⁻⁹ | w _{1/2} ¹ (min) | N | H (μm) | R |
| TM | 2,01 | 59,2 | | | | M 6/7 2,1 |
| M7 | 3,83 | -28,2 | 0,066 | 18 946 | 22,2 | M 5/6 2,6 |
| M6 | 4,12 | -30,3 | 0,095 | 10 406 | 40,4 | M 4/5 4,6 |
| M5 | 4,52 | -32,9 | 0,088 | 14 810 | 28,4 | M 3/4 8,8 |
| M4 | 5,22 | -36,4 | 0,089 | 19 128 | 22,0 | M 2/3 20,9 |
| M3 | 6,52 | -41,0 | 0,086 | 31 540 | 13,3 | |
| M | 10,15 | -47,5 | 0,118 | 40 990 | 10,2 | |
| n _c | 22 | | průměr | 22 637 | 22,7 | |
| Napětí 25 kV | | | | | | |
| Látka | t _i ¹ (min) | μ _i (m ² ·s ⁻¹ ·V ⁻¹) ·10 ⁻⁹ | w _{1/2} ¹ (min) | N | H (μm) | R |
| TM | 2,61 | 54,6 | | | | M 6/7 3,9 |
| M7 | 5,99 | -30,8 | 0,096 | 21 424 | 19,6 | M 5/6 5,2 |
| M6 | 6,59 | -33,0 | 0,086 | 32 554 | 12,9 | M 4/5 8,8 |
| M5 | 7,45 | -35,5 | 0,110 | 25 641 | 16,4 | M 3/4 18,3 |
| M4 | 8,97 | -38,7 | 0,094 | 50 837 | 8,3 | M 2/3 29,3 |
| M3 | 12,19 | -42,9 | 0,113 | 64 281 | 6,5 | |
| M | 23,09 | -48,4 | 0,325 | 28 007 | 15,0 | |
| n _c | 74 | | průměr | 37 124 | 13,1 | |
| Napětí 20 kV | | | | | | |
| Látka | t _i ¹ (min) | μ _i (m ² ·s ⁻¹ ·V ⁻¹) ·10 ⁻⁹ | w _{1/2} ¹ (min) | N | H (μm) | R |
| TM | 3,53 | 50,6 | | | | M 6/7 4,7 |
| M7 | 9,44 | -31,7 | 0,081 | 75 899 | 5,5 | M 5/6 5,8 |
| M6 | 10,44 | -33,5 | 0,167 | 21 728 | 19,3 | M 4/5 11,7 |
| M5 | 11,94 | -35,7 | 0,140 | 40 461 | 10,4 | M 3/4 20,0 |
| M4 | 14,72 | -38,5 | 0,140 | 61 457 | 6,8 | M 2/3 - |
| M3 | 21,25 | -42,2 | 0,244 | 41 986 | 10,0 | |
| M | - | - | - | - | - | |
| n _c | - | | průměr | 48 306 | 10,4 | |
| Napětí 15 kV | | | | | | |
| Látka | t _i ¹ (min) | μ _i (m ² ·s ⁻¹ ·V ⁻¹) ·10 ⁻⁹ | w _{1/2} ¹ (min) | N | H (μm) | R |
| TM | 5,00 | 47,6 | | | | M 6/7 6,6 |
| M7 | 15,22 | -32,0 | 0,167 | 46 162 | 9,1 | M 5/6 9,8 |
| M6 | 17,11 | -33,7 | 0,171 | 55 567 | 7,6 | M 4/5 15,7 |
| M5 | 20,17 | -35,8 | 0,197 | 57 951 | 7,2 | M 3/4 20,9 |
| M4 | 26,50 | -38,7 | 0,279 | 50 192 | 8,4 | M 2/3 - |
| M3 | 44,34 | -42,3 | 0,727 | 20 635 | 20,4 | |
| M | - | - | - | - | - | |
| n _c | - | | průměr | 46 102 | 10,5 | |

¹ průměrná hodnota, n = 2

Příloha D: Elektrolyt hydrogenuhličitanu amonného

Tabulka 4.14 – Separační charakteristiky maltózového žebříčku ve NH_4HCO_3 10 mM, pH 8,0, teplota kapiláry 25 °C, $l_t = 51$ cm, $l_d = 42$ cm, dávkování 50 mbar 2 s, různé separační napětí

| Napětí 30 kV | | | | | | |
|--------------|---------------|---|-------------------|--------|---------------------|-----------|
| Látka | t_i^1 (min) | μ_i ($\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{V}^{-1}$) $\cdot 10^{-9}$ | $w_{1/2}^1$ (min) | N | H (μm) | R |
| TM | 1,78 | 66,9 | | | | M 6/7 2,1 |
| M7 | 2,60 | -21,0 | 0,027 | 51 032 | 8,2 | M 5/6 2,6 |
| M6 | 2,69 | -22,6 | 0,028 | 50 155 | 8,4 | M 4/5 3,6 |
| M5 | 2,82 | -24,7 | 0,030 | 49 973 | 8,4 | M 3/4 4,9 |
| M4 | 3,01 | -27,3 | 0,031 | 50 903 | 8,3 | M 2/3 5,7 |
| M3 | 3,30 | -30,8 | 0,037 | 43 181 | 9,7 | |
| M | 3,82 | -35,7 | 0,071 | 15 956 | 26,3 | |
| n_c | 20 | | průměr | 43 533 | 11,6 | |
| Napětí 25 kV | | | | | | |
| Látka | t_i^1 (min) | μ_i ($\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{V}^{-1}$) $\cdot 10^{-9}$ | $w_{1/2}^1$ (min) | N | H (μm) | R |
| TM | 2,09 | 68,4 | | | | M 6/7 2,0 |
| M7 | 3,12 | -22,5 | 0,034 | 46 422 | 9,0 | M 5/6 2,4 |
| M6 | 3,24 | -24,3 | 0,037 | 43 124 | 9,7 | M 4/5 3,4 |
| M5 | 3,39 | -26,3 | 0,038 | 43 354 | 9,7 | M 3/4 4,6 |
| M4 | 3,62 | -28,9 | 0,039 | 47 235 | 8,9 | M 2/3 5,4 |
| M3 | 3,97 | -32,4 | 0,049 | 35 794 | 11,7 | |
| M | 4,60 | -37,3 | 0,087 | 15 507 | 27,1 | |
| n_c | 19 | | průměr | 38 573 | 12,7 | |
| Napětí 20 kV | | | | | | |
| Látka | t_i^1 (min) | μ_i ($\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{V}^{-1}$) $\cdot 10^{-9}$ | $w_{1/2}^1$ (min) | N | H (μm) | R |
| TM | 2,57 | 69,5 | | | | M 6/7 1,5 |
| M7 | 3,87 | -23,4 | 0,065 | 19 712 | 21,3 | M 5/6 2,1 |
| M6 | 4,01 | -25,1 | 0,052 | 33 232 | 12,6 | M 4/5 3,3 |
| M5 | 4,20 | -27,1 | 0,055 | 36 865 | 12,8 | M 3/4 4,9 |
| M4 | 4,48 | -29,7 | 0,046 | 51 784 | 8,1 | M 2/3 5,2 |
| M3 | 4,91 | -33,2 | 0,056 | 42 789 | 9,8 | |
| M | 5,66 | -38,0 | 0,116 | 13 177 | 31,9 | |
| n_c | 17 | | průměr | 32 260 | 16,1 | |
| Napětí 15 kV | | | | | | |
| Látka | t_i^1 (min) | μ_i ($\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{V}^{-1}$) $\cdot 10^{-9}$ | $w_{1/2}^1$ (min) | N | H (μm) | R |
| TM | 3,41 | 69,9 | | | | M 6/7 2,0 |
| M7 | 5,14 | -23,6 | 0,056 | 46 891 | 9,0 | M 5/6 2,6 |
| M6 | 5,33 | -25,2 | 0,055 | 51 409 | 8,2 | M 4/5 3,8 |
| M5 | 5,58 | -27,3 | 0,058 | 51 183 | 8,2 | M 3/4 5,1 |
| M4 | 5,95 | -29,9 | 0,058 | 58 849 | 7,1 | M 2/3 5,9 |
| M3 | 6,51 | -33,3 | 0,070 | 48 604 | 8,6 | |
| M | 7,54 | -38,3 | 0,137 | 16 829 | 25,0 | |
| n_c | 20 | | průměr | 45 628 | 11,0 | |

¹ průměrná hodnota, n = 2

Tabulka 4.15 – Separační charakteristiky maltózového žebříčku ve NH_4HCO_3 30 mM, pH 8,0, teplota kapiláry 25 °C, $l_t = 51$ cm, $l_d = 42$ cm, dávkování 50 mbar 2 s, různé separační napětí

| Napětí 30 kV | | | | | | |
|--------------|---------------|---|-------------------|---------|---------------------|------------|
| Látka | t_i^1 (min) | μ_i ($\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{V}^{-1}$) $\cdot 10^{-9}$ | $w_{1/2}^1$ (min) | N | H (μm) | R |
| TM | 1,96 | 60,7 | | | | M 6/7 2,1 |
| M7 | 3,10 | -22,3 | 0,040 | 33 407 | 12,6 | M 5/6 3,0 |
| M6 | 3,24 | -24,0 | 0,039 | 38 618 | 10,9 | M 4/5 4,8 |
| M5 | 3,43 | -26,0 | 0,036 | 50 403 | 8,3 | M 3/4 7,6 |
| M4 | 3,71 | -28,7 | 0,034 | 66 360 | 6,3 | M 2/3 12,5 |
| M3 | 4,18 | -32,2 | 0,038 | 67 677 | 6,2 | |
| M | 5,07 | -37,2 | 0,046 | 66 191 | 6,3 | |
| n_c | 30 | | průměr | 53 776 | 8,4 | |
| Napětí 25 kV | | | | | | |
| Látka | t_i^1 (min) | μ_i ($\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{V}^{-1}$) $\cdot 10^{-9}$ | $w_{1/2}^1$ (min) | N | H (μm) | R |
| TM | 2,42 | 59,1 | | | | M 6/7 3,4 |
| M7 | 3,81 | -21,5 | 0,022 | 163 630 | 2,6 | M 5/6 3,6 |
| M6 | 3,98 | -23,2 | 0,037 | 63 907 | 6,6 | M 4/5 5,6 |
| M5 | 4,21 | -25,1 | 0,039 | 65 899 | 6,4 | M 3/4 8,5 |
| M4 | 4,56 | -27,7 | 0,035 | 95 020 | 4,4 | M 2/3 13,3 |
| M3 | 5,11 | -31,1 | 0,043 | 80 256 | 5,2 | |
| M | 6,19 | -36,0 | 0,053 | 75 555 | 5,6 | |
| n_c | 37 | | průměr | 90 711 | 5,1 | |
| Napětí 20 kV | | | | | | |
| Látka | t_i^1 (min) | μ_i ($\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{V}^{-1}$) $\cdot 10^{-9}$ | $w_{1/2}^1$ (min) | N | H (μm) | R |
| TM | 3,08 | 58,0 | | | | M 6/7 2,6 |
| M7 | 4,84 | -21,2 | 0,050 | 52 993 | 7,9 | M 5/6 3,5 |
| M6 | 5,06 | -22,7 | 0,049 | 59 263 | 7,1 | M 4/5 5,7 |
| M5 | 5,35 | -24,7 | 0,049 | 67 095 | 6,3 | M 3/4 8,9 |
| M4 | 5,79 | -27,2 | 0,042 | 104 366 | 4,0 | M 2/3 13,3 |
| M3 | 6,50 | -30,5 | 0,051 | 88 725 | 4,7 | |
| M | 7,86 | -35,3 | 0,069 | 72 163 | 5,8 | |
| n_c | 35 | | průměr | 74101 | 6,0 | |
| Napětí 15 kV | | | | | | |
| Látka | t_i^1 (min) | μ_i ($\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{V}^{-1}$) $\cdot 10^{-9}$ | $w_{1/2}^1$ (min) | N | H (μm) | R |
| TM | 4,16 | 57,3 | | | | M 6/7 2,7 |
| M7 | 6,53 | -20,8 | 0,066 | 54 090 | 7,8 | M 5/6 3,8 |
| M6 | 6,83 | -22,4 | 0,062 | 67 370 | 6,2 | M 4/5 5,3 |
| M5 | 7,22 | -24,3 | 0,059 | 82 106 | 5,1 | M 3/4 8,0 |
| M4 | 7,81 | -26,8 | 0,071 | 67 962 | 6,2 | M 2/3 13,3 |
| M3 | 8,75 | -30,1 | 0,068 | 92 966 | 4,5 | |
| M | 10,56 | -34,7 | 0,092 | 72 691 | 5,8 | |
| n_c | 35 | | průměr | 72 864 | 5,9 | |

¹ průměrná hodnota, n = 2

Tabulka 4.16 – Separační charakteristiky maltózového žebříčku ve NH_4HCO_3 50 mM, pH 8,0, teplota kapiláry 25 °C, $l_t = 51$ cm, $l_d = 42$ cm, dávkování 50 mbar 2 s, různé separační napětí

| Napětí 30 kV | | | | | | |
|--------------|---------------|---|-------------------|---------|---------------------|------------|
| Látka | t_i^1 (min) | μ_i ($\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{V}^{-1}$) $\cdot 10^{-9}$ | $w_{1/2}^1$ (min) | N | H (μm) | R |
| TM | 2,10 | 56,7 | | | | M 6/7 3,3 |
| M7 | 3,46 | -22,3 | 0,034 | 57 714 | 7,3 | M 5/6 5,0 |
| M6 | 3,64 | -24,0 | 0,031 | 75 494 | 5,6 | M 4/5 7,8 |
| M5 | 3,89 | -26,1 | 0,028 | 104 849 | 4,0 | M 3/4 11,2 |
| M4 | 4,28 | -28,9 | 0,031 | 109 319 | 3,8 | M 2/3 19,3 |
| M3 | 4,94 | -32,6 | 0,039 | 91 366 | 4,6 | |
| M | 6,31 | -37,9 | 0,045 | 107 504 | 3,9 | |
| n_c | 49 | | průměr | 91 041 | 4,9 | |
| Napětí 25 kV | | | | | | |
| Látka | t_i^1 (min) | μ_i ($\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{V}^{-1}$) $\cdot 10^{-9}$ | $w_{1/2}^1$ (min) | N | H (μm) | R |
| TM | 2,67 | 53,4 | | | | M 6/7 3,1 |
| M7 | 4,43 | -21,2 | 0,045 | 54 051 | 7,8 | M 5/6 4,3 |
| M6 | 4,67 | -22,8 | 0,044 | 61 900 | 6,8 | M 4/5 6,9 |
| M5 | 4,99 | -24,8 | 0,044 | 71 609 | 5,9 | M 3/4 11,4 |
| M4 | 5,50 | -27,4 | 0,042 | 96 838 | 4,3 | M 2/3 18,8 |
| M3 | 6,34 | -30,9 | 0,046 | 105 009 | 4,0 | |
| M | 8,10 | -35,8 | 0,064 | 89 345 | 4,7 | |
| n_c | 46 | | průměr | 79 792 | 5,6 | |
| Napětí 20 kV | | | | | | |
| Látka | t_i^1 (min) | μ_i ($\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{V}^{-1}$) $\cdot 10^{-9}$ | $w_{1/2}^1$ (min) | N | H (μm) | R |
| TM | 3,50 | 51,0 | | | | M 6/7 3,7 |
| M7 | 5,82 | -20,3 | 0,050 | 74 940 | 5,6 | M 5/6 5,2 |
| M6 | 6,13 | -21,9 | 0,049 | 87 209 | 4,8 | M 4/5 7,6 |
| M5 | 6,56 | -23,8 | 0,048 | 104 656 | 4,0 | M 3/4 11,1 |
| M4 | 7,22 | -26,3 | 0,054 | 97 935 | 4,3 | M 2/3 18,1 |
| M3 | 8,33 | -29,6 | 0,063 | 97 619 | 4,3 | |
| M | 10,62 | -34,2 | 0,085 | 85 669 | 4,9 | |
| n_c | 49 | | průměr | 91 338 | 4,7 | |
| Napětí 15 kV | | | | | | |
| Látka | t_i^1 (min) | μ_i ($\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{V}^{-1}$) $\cdot 10^{-9}$ | $w_{1/2}^1$ (min) | N | H (μm) | R |
| TM | 4,82 | 49,3 | | | | M 6/7 4,4 |
| M7 | 8,03 | -19,7 | 0,062 | 94 085 | 4,5 | M 5/6 5,1 |
| M6 | 8,47 | -21,2 | 0,057 | 122 639 | 3,4 | M 4/5 6,9 |
| M5 | 9,07 | -23,1 | 0,079 | 72 367 | 5,8 | M 3/4 10,7 |
| M4 | 9,98 | -25,5 | 0,078 | 91 064 | 4,6 | M 2/3 18,0 |
| M3 | 11,51 | -28,7 | 0,091 | 89 518 | 4,7 | |
| M | 14,64 | -33,1 | 0,114 | 91 214 | 4,6 | |
| n_c | 49 | | průměr | 93 481 | 4,6 | |

¹ průměrná hodnota, n = 2

Příloha E: Elektrolyt octanu amonného

Tabulka 4.17 – Separační charakteristiky maltózového žebříčku ve NH₄Ac 10 mM, pH 6,5, teplota kapiláry 25 °C, l_t = 51 cm, l_d = 42 cm, dávkování 50 mbar 2 s, různé separační napětí

| Napětí 30 kV | | | | | | |
|----------------|-----------------------------------|---|-------------------------------------|---------|--------|------------|
| Látka | t _i ¹ (min) | μ _i (m ² ·s ⁻¹ ·V ⁻¹) ·10 ⁻⁹ | w _{1/2} ¹ (min) | N | H (μm) | R |
| TM | 1,80 | 66,0 | | | | M 6/7 3,0 |
| M7 | 2,84 | -24,0 | 0,023 | 84 763 | 5,0 | M 5/6 4,0 |
| M6 | 2,96 | -25,7 | 0,024 | 86 567 | 4,9 | M 4/5 5,8 |
| M5 | 3,11 | -27,7 | 0,022 | 109 419 | 3,8 | M 3/4 8,3 |
| M4 | 3,35 | -30,4 | 0,025 | 98 509 | 4,3 | M 2/3 13,8 |
| M3 | 3,71 | -33,9 | 0,026 | 111 918 | 3,8 | |
| M | 4,38 | -38,8 | 0,031 | 111 285 | 3,8 | |
| n _c | 37 | | průměr | 100 410 | 4,2 | |
| Napětí 25 kV | | | | | | |
| Látka | t _i ¹ (min) | μ _i (m ² ·s ⁻¹ ·V ⁻¹) ·10 ⁻⁹ | w _{1/2} ¹ (min) | N | H (μm) | R |
| TM | 2,21 | 64,5 | | | | M 6/7 3,2 |
| M7 | 3,61 | -24,9 | 0,030 | 78 492 | 5,4 | M 5/6 4,3 |
| M6 | 3,77 | -26,7 | 0,030 | 90 561 | 4,6 | M 4/5 6,1 |
| M5 | 3,99 | -28,7 | 0,031 | 93 922 | 4,5 | M 3/4 8,9 |
| M4 | 4,32 | -31,5 | 0,034 | 90 397 | 4,6 | M 2/3 15,0 |
| M3 | 4,85 | -35,1 | 0,036 | 102 522 | 4,1 | |
| M | 5,84 | -40,1 | 0,042 | 106 844 | 3,9 | |
| n _c | 40 | | průměr | 93 790 | 4,5 | |
| Napětí 20 kV | | | | | | |
| Látka | t _i ¹ (min) | μ _i (m ² ·s ⁻¹ ·V ⁻¹) ·10 ⁻⁹ | w _{1/2} ¹ (min) | N | H (μm) | R |
| TM | 2,81 | 63,5 | | | | M 6/7 3,2 |
| M7 | 4,62 | -24,8 | 0,040 | 74 029 | 5,7 | M 5/6 4,4 |
| M6 | 4,83 | -26,6 | 0,039 | 83 240 | 5,0 | M 4/5 6,8 |
| M5 | 5,12 | -28,7 | 0,038 | 101 087 | 4,2 | M 3/4 10,3 |
| M4 | 5,56 | -31,4 | 0,038 | 117 268 | 3,6 | M 2/3 16,3 |
| M3 | 6,26 | -35,0 | 0,041 | 126 965 | 3,3 | |
| M | 7,58 | -40,0 | 0,054 | 108 525 | 3,9 | |
| n _c | 42 | | průměr | 101 852 | 4,3 | |
| Napětí 15 kV | | | | | | |
| Látka | t _i ¹ (min) | μ _i (m ² ·s ⁻¹ ·V ⁻¹) ·10 ⁻⁹ | w _{1/2} ¹ (min) | N | H (μm) | R |
| TM | 3,78 | 63,0 | | | | M 6/7 3,6 |
| M7 | 6,30 | -25,2 | 0,051 | 86 270 | 4,9 | M 5/6 4,7 |
| M6 | 6,61 | -26,9 | 0,051 | 94 856 | 4,4 | M 4/5 6,9 |
| M5 | 7,01 | -29,0 | 0,052 | 100 677 | 4,2 | M 3/4 10,4 |
| M4 | 7,64 | -31,8 | 0,055 | 107 876 | 3,9 | M 2/3 16,8 |
| M3 | 8,65 | -35,5 | 0,059 | 118 252 | 3,6 | |
| M | 10,60 | -40,5 | 0,077 | 104 608 | 4,0 | |
| n _c | 45 | | průměr | 102 090 | 4,2 | |

¹ průměrná hodnota, n = 2

Tabulka 4.18 – Separální charakteristiky maltózového žebříčku ve NH₄Ac 30 mM, pH 6,5, teplota kapiláry 25 °C, l_t = 51 cm, l_d = 42 cm, dávkování 50 mbar 2 s, různé separální napětí

| Napětí 30 kV | | | | | | |
|----------------|-----------------------------------|---|-------------------------------------|---------|--------|------------|
| Látka | t _i ¹ (min) | μ _i (m ² ·s ⁻¹ ·V ⁻¹) ·10 ⁻⁹ | w _{1/2} ¹ (min) | N | H (μm) | R |
| TM | 2,20 | 54,2 | | | | M 6/7 5,2 |
| M7 | 3,77 | -22,7 | 0,024 | 134 302 | 3,1 | M 5/6 6,9 |
| M6 | 3,99 | -24,3 | 0,024 | 154 195 | 2,7 | M 4/5 10,0 |
| M5 | 4,28 | -26,4 | 0,026 | 151 104 | 2,8 | M 3/4 15,1 |
| M4 | 4,73 | -29,0 | 0,028 | 163 379 | 2,6 | M 2/3 25,3 |
| M3 | 5,51 | -32,6 | 0,033 | 154 420 | 2,7 | |
| M | 7,17 | -37,6 | 0,044 | 145 442 | 2,9 | |
| n _c | 67 | | průměr | 150 474 | 2,8 | |
| Napětí 25 kV | | | | | | |
| Látka | t _i ¹ (min) | μ _i (m ² ·s ⁻¹ ·V ⁻¹) ·10 ⁻⁹ | w _{1/2} ¹ (min) | N | H (μm) | R |
| TM | 2,71 | 52,6 | | | | M 6/7 6,0 |
| M7 | 4,86 | -23,2 | 0,029 | 157 453 | 2,7 | M 5/6 7,9 |
| M6 | 5,16 | -24,9 | 0,029 | 170 774 | 2,5 | M 4/5 11,2 |
| M5 | 5,57 | -27,0 | 0,032 | 171 134 | 2,5 | M 3/4 17,0 |
| M4 | 6,22 | -29,7 | 0,036 | 162 332 | 2,6 | M 2/3 31,3 |
| M3 | 7,36 | -33,2 | 0,043 | 164 696 | 2,6 | |
| M | 9,91 | -38,2 | 0,053 | 192 048 | 2,2 | |
| n _c | 81 | | průměr | 169 740 | 2,5 | |
| Napětí 20 kV | | | | | | |
| Látka | t _i ¹ (min) | μ _i (m ² ·s ⁻¹ ·V ⁻¹) ·10 ⁻⁹ | w _{1/2} ¹ (min) | N | H (μm) | R |
| TM | 3,52 | 50,8 | | | | M 6/7 6,2 |
| M7 | 6,44 | -23,1 | 0,037 | 171 155 | 2,5 | M 5/6 8,0 |
| M6 | 6,85 | -24,7 | 0,041 | 153 542 | 2,7 | M 4/5 11,7 |
| M5 | 7,41 | -26,7 | 0,042 | 173 862 | 2,4 | M 3/4 17,5 |
| M4 | 8,31 | -29,3 | 0,049 | 161 707 | 2,6 | M 2/3 31,4 |
| M3 | 9,90 | -32,7 | 0,058 | 160 364 | 2,6 | |
| M | 13,55 | -37,6 | 0,079 | 164 164 | 2,6 | |
| n _c | 83 | | průměr | 164 132 | 2,6 | |
| Napětí 15 kV | | | | | | |
| Látka | t _i ¹ (min) | μ _i (m ² ·s ⁻¹ ·V ⁻¹) ·10 ⁻⁹ | w _{1/2} ¹ (min) | N | H (μm) | R |
| TM | 4,82 | 49,4 | | | | M 6/7 4,5 |
| M7 | 8,79 | -22,3 | 0,078 | 70 181 | 6,0 | M 5/6 6,9 |
| M6 | 9,35 | -23,9 | 0,067 | 107 666 | 3,9 | M 4/5 10,3 |
| M5 | 10,14 | -25,9 | 0,068 | 123 481 | 3,4 | M 3/4 15,6 |
| M4 | 11,40 | -28,5 | 0,077 | 122 848 | 3,4 | M 2/3 27,6 |
| M3 | 13,67 | -32,0 | 0,094 | 116 878 | 3,6 | |
| M | 18,90 | -36,8 | 0,129 | 119 490 | 3,5 | |
| n _c | 70 | | průměr | 110 091 | 4,0 | |

¹ průměrná hodnota, n = 2

Tabulka 4.19 – Separační charakteristiky maltózového žebříčku ve NH₄Ac 50 mM, pH 6,5, teplota kapiláry 25 °C, l_t = 51 cm, l_d = 42 cm, dávkování 50 mbar 2 s, různé separační napětí

| Napětí 30 kV | | | | | | |
|----------------|-----------------------------------|---|-------------------------------------|---------|--------|------------|
| Látka | t _i ¹ (min) | μ _i (m ² ·s ⁻¹ ·V ⁻¹) ·10 ⁻⁹ | w _{1/2} ¹ (min) | N | H (μm) | R |
| TM | 2,34 | 51,0 | | | | M 6/7 6,6 |
| M7 | 4,12 | -22,1 | 0,024 | 165 018 | 2,5 | M 5/6 9,3 |
| M6 | 4,39 | -23,8 | 0,023 | 204 392 | 2,1 | M 4/5 13,7 |
| M5 | 4,76 | -26,0 | 0,024 | 211 804 | 2,0 | M 3/4 21,1 |
| M4 | 5,36 | -28,7 | 0,027 | 213 630 | 2,0 | M 2/3 36,9 |
| M3 | 6,45 | -32,5 | 0,033 | 207 313 | 2,0 | |
| M | 9,09 | -37,9 | 0,051 | 177 425 | 2,4 | |
| n _c | 97 | | průměr | 196 597 | 2,2 | |
| Napětí 25 kV | | | | | | |
| Látka | t _i ¹ (min) | μ _i (m ² ·s ⁻¹ ·V ⁻¹) ·10 ⁻⁹ | w _{1/2} ¹ (min) | N | H (μm) | R |
| TM | 3,00 | 47,7 | | | | M 6/7 7,1 |
| M7 | 5,46 | -21,5 | 0,029 | 203 441 | 2,1 | M 5/6 9,5 |
| M6 | 5,83 | -23,2 | 0,032 | 181 084 | 2,3 | M 4/5 14,4 |
| M5 | 6,35 | -25,2 | 0,032 | 218 314 | 1,9 | M 3/4 22,7 |
| M4 | 7,18 | -27,8 | 0,036 | 222 886 | 1,9 | M 2/3 39,2 |
| M3 | 8,74 | -31,3 | 0,045 | 209 983 | 2,0 | |
| M | 12,65 | -36,4 | 0,072 | 169 628 | 2,5 | |
| n _c | 104 | | průměr | 200 889 | 2,1 | |
| Napětí 20 kV | | | | | | |
| Látka | t _i ¹ (min) | μ _i (m ² ·s ⁻¹ ·V ⁻¹) ·10 ⁻⁹ | w _{1/2} ¹ (min) | N | H (μm) | R |
| TM | 3,95 | 45,2 | | | | M 6/7 7,4 |
| M7 | 7,31 | -20,8 | 0,039 | 197 894 | 2,1 | M 5/6 10,1 |
| M6 | 7,82 | -22,4 | 0,042 | 189 511 | 2,2 | M 4/5 14,8 |
| M5 | 8,55 | -24,3 | 0,042 | 230 071 | 1,8 | M 3/4 22,9 |
| M4 | 9,72 | -26,9 | 0,052 | 196 941 | 2,1 | M 2/3 42,5 |
| M3 | 11,93 | -30,2 | 0,062 | 207 428 | 2,0 | |
| M | 17,60 | -35,1 | 0,095 | 190 150 | 2,2 | |
| n _c | 110 | | průměr | 201 999 | 2,1 | |
| Napětí 15 kV | | | | | | |
| Látka | t _i ¹ (min) | μ _i (m ² ·s ⁻¹ ·V ⁻¹) ·10 ⁻⁹ | w _{1/2} ¹ (min) | N | H (μm) | R |
| TM | 5,46 | 43,6 | | | | M 6/7 8,2 |
| M7 | 10,30 | -20,4 | 0,048 | 252 989 | 1,7 | M 5/6 10,6 |
| M6 | 11,03 | -22,0 | 0,058 | 203 072 | 2,1 | M 4/5 15,7 |
| M5 | 12,08 | -23,9 | 0,059 | 233 734 | 1,8 | M 3/4 23,6 |
| M4 | 13,81 | -26,3 | 0,071 | 211 239 | 2,0 | M 2/3 36,4 |
| M3 | 17,07 | -29,6 | 0,091 | 193 943 | 2,2 | |
| M | 25,54 | -34,3 | 0,183 | 108 631 | 3,9 | |
| n _c | 106 | | průměr | 200 601 | 2,3 | |

¹ průměrná hodnota, n = 2