



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

OPTIMALIZACE METODY PRO STANOVENÍ ANORGANICKÝCH IONTŮ ZA VYUŽITÍ KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZY

OPTIMIZATION OF A METHOD FOR THE DETERMINATION OF INORGANIC IONS USING
CAPILLARY ELECTROPHORESIS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Simona Špačková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Mgr. Markéta Vaculovičová, Ph.D.

BRNO 2021

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1522/2020 Akademický rok: 2020/21
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Bc. Simona Špačková**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **doc. Mgr. Markéta Vaculovičová, Ph.D.**

Název diplomové práce:

Optimalizace metody pro stanovení anorganických iontů za využití kapilární elektroforézy

Zadání bakalářské práce:

1. Rešerše zaměřená na danou problematiku
2. Optimalizace metody pro stanovení anorganických iontů
3. Ověření optimalizovaného postupu na reálném vzorku
4. Přehledné zpracování dat, vyhodnocení výsledků a porovnání se současnými postupy

Termín odevzdání diplomové práce: 30.7.2021:

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

Bc. Simona Špačková
student(ka)

doc. Mgr. Markéta Vaculovičová, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústav

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.

děkan

V Brně dne 20.7.2021

ABSTRAKT

Anorganické ionty jsou jednou z nejdůležitějších skupin chemických látek. Jejich význam je klíčový pro všechny živé organismy na planetě a monitorování jejich obsahu se uplatňuje jak v klinické nebo environmentální analýze ale také v potravinářství, zemědělství nebo řadě dalších průmyslových odvětví. Postupem let bylo navrženo a použito mnoho analytických metod pro detekci iontů v závislosti na oblasti jejich využití. V poslední době dochází k adaptaci některých metod i do oblastí, ve kterých nebyly primárně zamýšleny. Jednou z takových metod může být například laserová ablace s hmotnostní spektrometrií indukčně vázaného plazmatu, která se v nedávné době začala využívat pro analýzu biologických vzorků. Jako doplňkovou metodu schopnou detekovat i nekovové ionty je možné s výhodou využít kapilární elektroforézu.

V této diplomové práci byla testována možnost aplikace kapilární elektroforézy s nepřímou fotometrickou detekcí pro separaci anorganických iontů v buněčných lyzátech HeLa buněk kapilární elektroforézou. Pozornost byla zaměřena na chloridové ionty. Byla ověřena schopnost separace anorganických iontů v buněčném materiálu při použití kyseliny salicylové jako absorbujícího aniontu v základním elektrolytu.

KLÍČOVÁ SLOVA

Anorganické ionty, buňky, iontové kanály, chloridový kanál, kapilární elektroforéza, UV/Vis detekce

ABSTRACT

Inorganic ions are one of the most important group chemicals. Their importance is crucial for all living organisms on the planet and monitoring of their content is essential for this purpose in clinical or environmental analysis but also in the food industry, agriculture or many other industries. Many analytical methods for ion detection have been designed and used, depending on the area of their use. Recently, numerous methods have been adapted to areas where not primarily intended. One such methods may be, for example, laser ablation with inductively coupled plasma mass spectrometry, which has recently begun to affect the analysis of biological samples. As a complementary method, able to detect also non-metallic ions is capillary electrophoresis.

In this master thesis, the possibility of applying capillary electrophoresis with indirect photometric detection for the separation of inorganic ions in cell lysates of HeLa cells by capillary electrophoresis was verified. Main attention was paid to chloride ions. The ability to separate inorganic compounds in cellular material using salicylic acid as an absorbing anion in the base electrolyte was tested.

KEYWORDS

Inorganic ions, cells, ion channels, chloride channel, capillary electrophoresis, UV/Vis detection

ŠPAČKOVÁ, Simona. *Optimalizace metody pro stanovení anorganických iontů za využití kapilární elektroforézy*. Brno, 2021. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/131678>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Markéta Vaculovičová.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....

podpis studentky

PODĚKOVÁNÍ

Největší poděkování patří mé paní vedoucí diplomové práce doc. Mgr. Markétě Vaculovičové, Ph.D. Děkuji za lidský přístup, cenné rady, ochotu a trpělivost při měření a následném zpracování diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat paní Ing. Jaroslavě Bezděkové, Ph.D. a panu Ing. Lukášovi Nejdlovi, Ph.D. za poskytnutí vlastních zkušeností a jejich ochotu.

OBSAH

1	Úvod	10
2	Teoretická část	11
2.1	Anorganické ionty.....	11
2.1.1	Chemické složení buněk.....	11
2.1.2	Anorganické ionty v buňkách	11
2.1.3	Iontové kanály	14
2.1.4	Anorganické ionty v prostředí	15
2.1.5	Definice a vlastnosti anorganických iontů	16
2.1.6	Možnosti stanovení anorganických iontů.....	17
2.2	Elektroforetické metody a jejich využití ke studiu interakcí iontů.....	19
2.2.1	Princip metody	19
2.2.2	Instrumentace	22
2.2.3	Typy detekce	22
2.2.4	Použití CE	25
3	Experimentální část	26
3.1	Popis experimentu.....	26
3.2	Materiály.....	26
3.3	Přístrojové vybavení	26
3.4	Podmínky separace	27
3.5	Volba kapiláry	27
3.6	Příprava roztoku základního elektrolytu (BGE)	28
3.7	Příprava DoTaOH	28
3.8	Příprava roztoků směsi vybraných iontů	28
3.9	Příprava buněčného vzorku	28
4	Výsledky a diskuze	29
4.1	Separace anorganických iontů, podmínky t=1 ($L_{tot} = 48,5$ cm, $L_{ef} = 40$ cm) 31	
4.1.1	Optimalizace koncentrace NaCl	31
4.1.2	Detekce chloridových iontů v HCl	34
4.2	Separace anorganických iontů, podmínky t=2 ($L_{tot} = 64$ cm, $L_{ef} = 55,5$ cm) 36	
4.2.1	Optimalizace koncentrace vzorku NaCl a stanovení limitu detekce .. 36	
4.2.2	Stanovení citrátu, fosfátu a chloridu	37
4.3	Porovnání podmínek t=1 a t=2.....	38
4.4	Stanovení reálných vzorků, podmínky t=1 ($L_{tot} = 48,5$ cm, $L_{ef} = 40$ cm).....	40

4.4.1	Stanovení chloridů v buněčném lyzátu HeLa buněk připravených pomocí 5% HNO ₃	40
4.4.1	Stanovení chloridů v buněčném lyzátu HeLa buněk připravených tekutým dusíkem.....	42
4.5	Porovnání se současnými postupy	42
5	Závěr.....	44
6	Seznam použitých zdrojů	45
7	Seznam použitých zkratk a symbolů	53
8	Seznam obrázků	54
9	Seznam použitých tabulek.....	55

CÍL PRÁCE

1. Rešerše zaměřená na danou problematiku
2. Optimalizace metody pro stanovení anorganických iontů
3. Ověření optimalizovaného postupu na reálném vzorku
4. Přehledné zpracování dat, vyhodnocení výsledků a porovnání se současnými postupy

1 ÚVOD

Anorganické látky se v organismu vyskytují v různém množství a složení. Některé anorganické látky jsou nezbytné pro životní funkci – nukleové kyseliny, bílkoviny, sacharidy a lipidy. Zejména v případě anorganických iontů je důležité sledovat odchylky od optimálních biologických koncentrací. Na základě odlišné koncentrace iontů lze diagnostikovat různé poruchy (např. diabetes, dysfunkce jater či ledvin, srdeční problémy) nebo rozlišit nádorové a zdravé buňky. Iontové toky a buněčná fyziologie byla zavedena mnohem dříve, než byly objeveny proteiny podílející se na transportu iontů. Až v 80. letech došlo k charakterizaci a identifikaci specifických proteinů odpovědných za iontové toky. Ionty v živém systému se transportují skrze biologickou membránu pomocí tzv. iontových kanálů po spádu svého elektrochemického potenciálu [1].

Iontové kanály mají řadu funkcí. V uplynulém desetiletí došlo k pozoruhodnému pokroku v chápání rolí chloridových kanálů ve vývoji lidských nemocí. Genetické studie u lidí identifikovaly mutace v genech kódujících Cl⁻ kanály, které vedou ke ztrátě aktivity Cl⁻ kanálů. Nicméně v současné době nejsou kanály chloridových iontů zcela objasněny a0je zapotřebí dalšího výzkumu. Doposud bylo zjištěno, že chloridové kanály vedou k řadě onemocnění ve svalech, ledvinách, kostech, mozku apod. Typickými patologickými stavy jsou cystická fibróza, ledvinové kameny, osteoporóza, některé druhy rakovin apod. [2].

Rakovinové buňky vykazují zvýšenou metabolickou aktivitu a jejich spotřeba iontů je mnohem větší ve srovnání se zdravými buňkami. Například prostatické buňky jsou schopny akumulovat zinečnaté ionty až s 10x vyšší koncentrací. Zvýšeným počtem sodíkových kanálů lze pozorovat metastáze rakovinových buněk. Draselné kanály jsou prokázány u rakoviny prostaty. Hlavní třídou aniontových kanálů spojených s různými patologickými poruchami jsou chloridové kanály [3].

Cílem diplomové práce je zavést a otestovat metodu kapilární elektroforézy (CE) pro detekci anorganických iontů (především Cl⁻). CE se ukázala jako účinný nástroj pro analýzu mnoha biologických, farmaceutických, klinických nebo potravinářských vzorků. Metoda umožňuje pracovat s malými objemy vzorku v jednotkách μl . To je obzvláště důležité pro vzorky s omezeným množstvím. Optimalizovaná metoda je určena k analýze buněčných lyzátů HeLa buněk. CE je kombinována s nepřímou fotometrickou detekcí, která umožňuje využití výhod UV/Vis detekce (univerzálnost, dostupnost, cena) a nepřímé detekce. Metoda nepřímé detekce může sloužit pro snadnou a citlivou detekci mnoha anorganických a organických iontů [4].

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Anorganické ionty

2.1.1 Chemické složení buněk

Buňka je základní stavební jednotka živého organismu skládající se z biogenních prvků, které se vyskytují ve formě anorganických a organických sloučenin. Nejzastoupenější látkou v buňce je voda, ve které se odehrává většina reakcí. Biogenní prvky nezbytné pro život jsou podle obsahu rozděleny na makrobiogenní, mikrobiogenní a stopové prvky. Makrobiogenní prvky (C, H, O, N, P, S, Ca) tvoří 99 % hmotnosti živé soustavy a jsou z nich vystavěny základní biomolekuly – nukleové kyseliny, bílkoviny, sacharidy a lipidy. Mikrobiogenní prvky (K, Na, Fe, Mg, Cl) tvoří 0,05 až 1 % hmotnosti. Stopové prvky se vyskytují jen v některých živých soustavách a ve velmi nízkých koncentracích [5].

Množství hlavních prvků obsažených v lidském těle je uvedeno v tabulce 1. Kyslík tvoří více než polovinu tělesné hmotnosti. Kovových prvků je přítomno výrazně menší množství, ale jedná se o životně důležité prvky [6].

Tabulka 1 Obsah [g] hlavních makrobiogenních a kovových prvků v lidském těle (průměrný zdravý muž o hmotnosti 70 kg) [7]

	Makrobiogenní p.		Kovové p.
Kyslík	45 000	Draslík	140
Uhlík	12 600	Sodík	105
Vodík	7 000	Hořčík	25
Dusík	2 100	Železo	4,2
Vápník	1 050	Zinek	2,3
Fosfor	700	Měď	0,11

Živá hmota potřebuje pro svoji existenci získávat, přeměňovat a využívat energii pro aktivní transport molekul a iontů, k mechanické práci při svalové kontrakci a dalších pohybech buněk, k biosyntéze makromolekul a k tvorbě tepla (termogenezi) [8].

2.1.2 Anorganické ionty v buňkách

Kovové prvky jsou životně důležité, neboť hrají klíčovou roli v mnoha biochemických procesech. Prvky se nachází v molekulách metaloenzymů a enzymových kofaktorů, neenzymatických metaloproteinů, biominerálů, vitamínů, nukleových kyselin, hormonů, antibiotik a chlorofylu [9].

Nedílnou složku živých organismů představují minerální látky Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} a Cl^- , PO_4^{3-} , CO_3^{2-} . Kationty se v živých systémech podílejí na stabilizaci buněčné membrány, enzymů a konformaci DNA a RNA. Anorganické ionty jsou součástí tělních tekutin i samotných buněk, a proto mají velký klinický i fyziologický význam. Uvnitř buněk je převaha K^+ iontů, v tělních tekutinách je převaha Na^+ a Cl^- (viz. tabulka 2) [10].

Tabulka 2 Koncentrace [mM] hlavních iontů v živých buňkách a krevní plazmě [7]

	Intracelulární tekutina	Krevní plazma
Na⁺	10	140
K⁺	150	4
Ca²⁺	0,0001	2,5
Mg²⁺	10	1,5
Cl⁻	4	100

Změna koncentrace kationtů (vč. draslíku a sodíku) je charakteristická pro apoptózu, proto je důležité tuto změnu koncentrace sledovat. Apoptóza vedle nekrózy způsobuje buněčnou smrt, u níž se neprojevuje zánětlivá reakce. Apoptóza vyvolá aktivaci endonukleáz, které rozštěpí DNA buňky. Buněčná smrt může být vyvolána vnějšími vlivy – teplotní šok, UV záření, nedostatek růstových faktorů, cytokiny, viry nebo genetickou modifikací. Apoptóza umožňuje eliminovat poškozené, nebezpečné, zmutované buňky k zajištění udržování homeostázy mnohobuněčných organismů [11].

Na rozdíl od metabolismu jiných látek (např. metabolismu glukózy), anorganické látky v organismu nevznikají ani nezánikají, ale do organismu se dostávají potravou. Rostliny jsou schopny přijímat anorganické ionty z půdy (dusičnany, fosfáty a draslík) [12].

Chloridy (Cl⁻)

Chlorid je v extracelulární tekutině nejzastoupenější anion, jehož koncentrace v krvi je regulována ledvinami (nadbytek vylučován ve formě moči). Toxicita chloridů je závislá na příslušném kationtu – pro rostlinné i živočišné organismy jsou sodné a draselné soli v určitých koncentracích nezbytné. Chlorid v tělních tekutinách plní funkci elektrolytu a je odpovědný za udržování rovnováhy kyselin a zásad (pH) a přenos nervových impulzů. Společně s Na⁺ regulují pohyb tekutin dovnitř a ven z buněk (osmotický tlak). Koncentrace chloridů lokalizovaných extracelulárně je v rozmezí 95-105 mM a intracelulárně 3-5 mM. Přijatelné rozmezí koncentrace v krevní plazmě u dospělého člověka je 85-125 mM, u dětí 80-125 mM [13]. Vyšší koncentrace chloridů vede k nesprávné funkci ledvin, dehydrataci a metabolické acidózy. Pokud jsou hladiny nízké, může dojít k nadměrnému pocení či k zvracení vlivem metabolické alkalózy [14].

HCl obsažená v žaludeční šťávě je potřebná k trávení bílkovin v žaludku a usmrcení patogenů z potravin. Chloridovými ionty je aktivována slinná amyláza k trávení škrobu [15].

Chlorid má významné účinky na vývoj buněčného cyklu v lidských buňkách např. rakoviny žaludku a je významným anorganickým aniontem v mozku. Chloridová homeostáza může být klíčovým determinantem zralého a nezralého fenotypu nervových buněk. Ve většině zralých neuronů se nachází chlorid ve velmi nízkých koncentracích a slouží ke stabilizaci klidového membránového potenciálu při otevírání kanálů. Cl⁻ je akumulován proliferujícími buňkami v mozku, včetně nezralých neuronů a nervových kmenových buněk. Koncentrace Cl⁻ v gliomových buňkách je ~100 mM, astrocytech ~40 mM a neuronech

~10 mM. Akumulace Cl⁻ iontů vlivem potenciální změny na membráně vyvolá hnací sílu pro uvolňování chloridu, kterou lze využít k regulaci objemu buněk v procesech migrace a proliferace. Vysoké koncentrace intracelulárního chloridu nacházejícího se v gliomových buňkách by po otevření chloridových kanálů vedlo k zmenšení objemu buňky, protože osmoticky aktivní Cl⁻ ionty by poháněly odtok vody [16].

Fosfáty (PO₄³⁻)

Fosfátové ionty v kombinaci s vápníkem jsou součástí zubů a kostí. V živém systému se mohou vyskytovat volně v roztoku nebo vázaně ve formě organofosfátu. Organické fosfáty se vyskytují ve formě esterů jako nukleotidy (AMP, ADP, ATP apod.) a v DNA a RNA. Uvolněná energie oxidací živin je v organismu uskladněna ve formě ATP. Energie je využita k celé řadě biosyntetických drah (syntéza proteinů, RNA apod.). Fosfátové ionty se využívají k léčbě infekcí močových cest a k zabránění vytváření kamenů v močových cestách [17].

Ionty sodíku (Na⁺)

Sodné ionty se podílejí na přenosu nervových impulzů a pomáhají při reabsorpci vody v ledvinách za vzniku koncentrované moči. Sodné ionty se také podílejí na přenosu glukózy do buněk pomocí sodno-draselné pumpy. Sodný kationt je přečerpáván Na⁺/K⁺-ATPázou ven z buňky a do buňky je naopak vháněn draslík. Neustálá výměna iontů proti koncentračním spádům je energeticky velmi náročná [18].

Hlavní funkcí sodíku je udržovat stálý osmotický tlak v buňce a acidobazickou rovnováhu. Všechny životní projevy buňky se odehrávají v základním elektrolytu tvořeném sodíkem s chloridovými a hydrogenuhličitanovými anionty [18].

Ionty draslíku (K⁺)

Draselné ionty se podílí na osmotické rovnováze zejména v ledvinách. 98 % obsahu draslíku je uloženo intracelulárně (ve svalových buňkách, játrech, červených krvinkách) a jen 2 % extracelulárně. V intracelulární tekutině se draslík rozlišuje na volný a vázaný. Vázaný draselný iont je součástí intracelulárních fosfátů a bílkovin. Poměr vázaného a volného draslíku je závislý na pH prostředí. Množství iontů draslíku v plazmě se zvyšuje při uvolňování iontů během katabolických procesů. V anabolických procesech se draslík naopak váže a obsah v plazmě se snižuje [19].

K⁺ slouží také k aktivaci některých enzymů (enzymy glykolýzy, dýchacího řetězce atd.), ovlivňuje činnost svalů a podílí se na využití sacharidů, syntéze proteinů, tvorbě glykogenu a udržování stálosti intracelulární tekutiny [20].

Ionty vápníku (Ca²⁺)

Vápenaté ionty slouží jako intracelulární posílí, které kromě tvorby kostí a svalové kontrakce zprostředkovávají proces srážení krve, vylučování neurotransmiterů a hormonů nebo roli kofaktoru stabilizujícího proteiny. Vápník je nejvíce nezbytný v období růstu – v dětství, během těhotenství a při kojení. Dlouhodobý nedostatek vápníku může vést k osteoporóze, při níž se kost zeslabuje a existuje zvýšené riziko zlomenin. Vápník také napomáhá při tvorbě lymfatických tekutin [21].

Ionty hořčíku (Mg^{2+})

Hořečnaté ionty se nacházejí v aktivních místech některých enzymů, které se podílejí na katalýze ATP. Hořčík je součástí porfyrinové molekuly chlorofylu. 65 % hořečnatých iontů je uloženo v kostech a 35 % je využito ke konformaci nukleových kyselin (RNA) nebo jako enzymový aktivátor. Mg^{2+} se podílí také na stabilizaci ribozomů. Nedostatek hořečnatých iontů v organismu má za následek vznik křečí [22].

2.1.3 Iontové kanály

Iontové kanály jsou specializované proteiny v plazmatické membráně, které umožňují pasivní transport nabitých iontů po koncentračním gradientu. Kanálové proteiny vytvářejí v membráně hydrofilní póry, kterými mohou rozpuštěné látky difundovat. Většinou mohou procházet pouze anorganické ionty, proto se značí jako iontové kanály. Iontové kanály vykazují iontovou selektivitu, která umožňuje průchod pouze konkrétních iontů. Iontová selektivita závisí na průměru a tvaru kanálu a na rozdělení nabitých aminokyselin v buněčných stěnách. Pokud je koncentrace iontů v mimobuněčném prostoru větší než uvnitř buňky, usnadněnou difúzí prochází ionty skrz membránu do buňky. K pasivnímu transportu není zapotřebí dodávat proteinu energii. Rychlost difúze je řízena rozdílem elektrochemického potenciálu iontů na obou stranách membrány. Iontové kanály se změnou konformace uzavírají a otevírají v závislosti na aktivitě signálních molekul. K typickým iontovým kanálům patří sodíkový, draslíkový nebo chloridový kanál. Na základě vysokého počtu kanálů (zejména sodíkových), lze pozorovat schopnost rakovinových buněk metastázovat. Iontové kanály mají oproti přenašečovým proteinům výhodu rychlého transportu. Naopak není zde umožněn aktivní transport iontů [23].

Chloridové kanály

Chloridové kanály umožňují pasivní transport Cl^- přes biologické membrány. Jsou všudypřítomně exprimovány téměř ve všech eukaryotických buňkách. Cl^- kanály se nacházejí také v membránách intracelulárních organel, jako jsou lysozomy a endosomy. V plazmatické membráně jsou Cl^- kanály nezbytné pro regulaci objemu buněk, transepiteliální transport soli a vody, stejně jako modulaci elektrické excitability v neuronech. Cl^- kanály hrají klíčovou roli v regulaci objemu organel a pH, což jsou faktory, které jsou důležité pro dodávání membránových transportních proteinů do plazmatické membrány. Cl^- kanály hrají důležitou roli v modulaci buněčného cyklu a buněčné migraci. Cl^- kanály se liší od ostatních kanálů pohybem aniontů a zahrnují jak napětově řízené, tak ligandově řízené mechanismy pro transport iontů přes buněčnou membránu. U kanálů řízených napětím je pravděpodobnost otevření řízena membránovým potenciálem. U kanálů řízených ligandem je pravděpodobnost otevření kanálů řízena navázáním molekuly k iontovému kanálu [24].

Princip chloridových kanálů

Cl^- kanály se otevírají v závislosti na změnách elektrického potenciálu membrány, aktivace proteinkinázy, zvýšení intracelulárních hladin Ca^{2+} , zvýšením objemu buněk, extracelulárním okyselením, stupněm fosforylace a vazbou ATP. V gliomových buňkách například inhibice otokem aktivovaných Cl^- kanálů inhibuje migraci nádorových buněk. Cl^- kanál aktivovaný

objemem hraje důležitou roli také při migraci závislé na buněčném cyklu v HeLa buňkách [25].

Defekt chloridových kanálů

V uplynulém desetiletí došlo k pozoruhodnému pokroku v chápání rolí Cl⁻ kanálů ve vývoji lidských nemocí. Genetické studie u lidí identifikovaly mutace v genech kódujících Cl⁻ kanály, které vedou ke ztrátě aktivity Cl⁻ kanálů. Tyto mutace jsou odpovědné za vývoj celé řady onemocnění ve svalech, ledvinách, kostech a mozku. Ztráta aktivity chloridového kanálu regulovaného pomocí cAMP je příčinou svalové poruchy myotonie, cystické fibrózy, astma, vysokého krevního tlaku, ledvinových kamenů, osteoporóza kostí nebo některých druhů rakoviny [26].

Cystická fibróza (CF) je závažné dědičně podmíněné onemocnění, které postihuje zejména dýchací a trávicí ústrojí, ale i mnoho dalších orgánů. Je způsobeno mutací v genu, který se označuje jako gen CFTR (cystický fibrózní transmembránový regulátor vodivosti). Ten řídí činnost chloridového kanálu v membráně buněk. Koncentrace chloridu v potu se používá k diagnostice řady onemocnění. Hodnoty nad 60 mmol/l se považují za diagnostiku klasického onemocnění CF. Normální koncentrace chloridů v potu se pohybuje mezi 10-30 mmol/l potu. Průměrné hladiny chloridů v potu u nealergických astmatiků byly $22 \pm 8,5$ mmol/l a u kontrol $20 \pm 7,0$ mmol/l [27, 28].

2.1.4 Anorganické ionty v prostředí

Anorganické látky se v organismu vyskytují v různém množství a složení. Sledování odchylky koncentrace těchto iontů od biologických koncentrací je velmi užitečné při diagnostice různých poruch (např. diabetes, dysfunkce jater či ledvin, srdeční problémy apod.). Na základě odlišné koncentrace iontů lze rozlišit nádorové a zdravé buňky [29].

Anorganické ionty se s oblibou využívají ve farmacii – pro stanovení protiiontů ve farmaceutických solích a ionizovatelných léčivech. Farmaceutické roztoky (infúze, hemodialýza, izotonické roztoky) jsou kromě organických kyselin a uhlohydrátů složeny také z anorganických iontů [30].

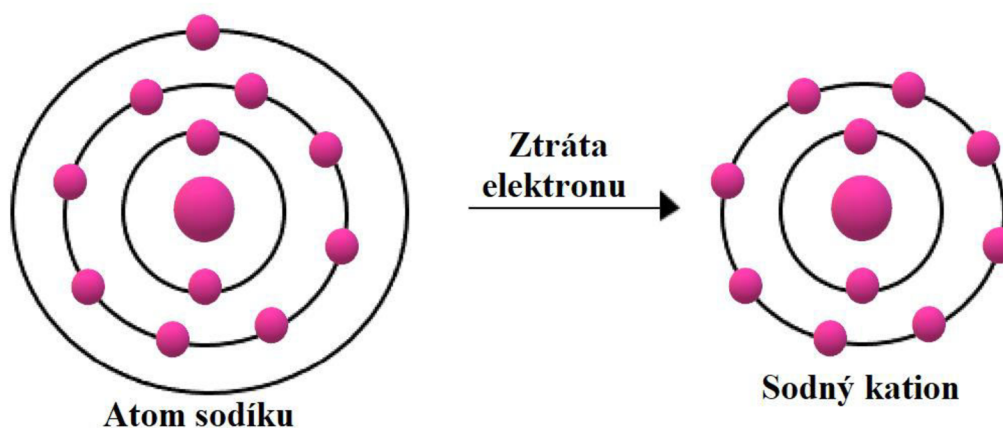
Neviditelnou hrozbou pro život je přítomnost iontů těžkých kovů. Nachází se ve vzduchu, v potravě nebo v půdě nezbytné pro růst rostlin, čímž dochází k ovlivnění potravního řetězce. Při nízkých koncentracích nejsou škodlivé, mají však jednu velkou nevýhodu – schopnost akumulace v organismu a pomalé odbourávání v těle. Mezi nejzastoupenější těžké kovy v prostředí se řadí kadmium, měď, olovo a rtuť. Tyto kovy se mohou vázat na proteiny a způsobit tak nádorová onemocnění. Velkým problémem je přítomnost chemických kontaminantů v dětské výživě. Děti jsou vůči kontaminantům zranitelnější, a proto se stanovuje jejich přítomnost a vliv na zdraví [31]. Mezi další kontaminanty záměrně přidávané do potravin, hnojiv a postřiků patří barviva, konzervanty, emulgátory nebo stabilizátory [32].

Kromě iontů těžkých kovů v potravě a půdě se monitorují koncentrace anorganických látek ve vzduchu, ve vodě nebo také v zábavní pyrotechnice. Ve vzduchu se nejčastěji sledují znečišťující složky SO₂ a (NH₄)₂SO₄. SO₂ se dostává průduchy do těl rostlin a negativně ovlivňuje fotosyntézu a respiraci (vznik astma). Síran amonný má za následek vysoké emise

amoniaku v zemědělství [33]. Stanovením koncentrace anorganických iontů je možné sledovat čistotu čištěné vody [34]. Anorganické ionty (síraný, dusičnaný, chloridy nebo sodík) se také mohou stanovovat v kriminalistice. Pomocí techniky iontové chromatografie lze vyšetřovat stopové důkazy z místa činu bombardování – identifikace a potvrzení přítomnosti anorganických výbušných zbytků [35][36].

2.1.5 Definice a vlastnosti anorganických iontů

Anorganické ionty jsou elektricky nabitě atomy, jejichž elektrický náboj vzniká při ztrátě či zisku elektronu valenční vrstvy. Zisk/ztráta elektronů vede k zaplnění vnějších orbitalů a tím i k vyšší stabilitě atomové struktury. Proces odevzdání vnějšího elektronu za vzniku stabilnějšího kladně nabitěho sodného iontu je zobrazen na obrázku 1 [37].



Obrázek 1 Schéma znázorňující tvorbu sodného iontu

Ionty se podle náboje dělí na kationty a anionty (tabulka 3) a prostřednictvím iontové vazby vytváří soli za uvolnění tzv. mřížkové energie, která určuje pevnost vazby. Mřížková energie je odhad síly vazby v iontových sloučeninách. Je definována jako teplo tvorby pro ionty opačného náboje v plynné fázi, které se spojí do iontové pevné látky. Hodnota energie je závislá na vzdálenosti iontů v krystalové mřížce, na rozměrech iontů, velikosti náboje, na jejich uspořádání a na elektronové konfiguraci iontů. Velkými elektrostatickými silami jsou k sobě v krystalové mřížce přitahovány malé ionty s velkými náboji (např. Na^+ a Cl^-). Iontové sloučeniny jsou také obvykle rozpustnější ve vodě než kovalentní sloučeniny. Rozpustnost iontům umožňuje vlastní difúzi a osmózu. Rozpustnost iontů závisí na rozdílu mezi mřížkovou a hydratační energií. Pokud převažuje mřížková energie, jsou sloučeniny málo rozpustné [38].

Vlastnosti iontových sloučenin (vysoká teplota tání a varu, křehkost, nevodivost) vyplývají z uspořádání krystalové mřížky pevně vázaných nabitých částic. Nicméně pokud jsou iontové sloučeniny rozpuštěny a mohou se disociovat na jednotlivé ionty pohybující se roztokem, mohou být dobře vodivé [39].

Tabulka 3 Srovnání kation vs. anion [39]

	Anion (-)	Kation (+)
Vznik	Získem e ⁻ redukcí	Získem H ⁺ oxidací
Zastoupení protonů a elektronů	Více e ⁻	Více H ⁺
Typ prvku	Nekov	Kov
Příklady	O ²⁻ , S ²⁻ , F ⁻ , Cl ⁻	Na ⁺ , Pb ²⁺ , Fe ²⁺
Elektroda, ke které jsou přitahovány při elektrolýze	Anoda	Katoda
Iontový poloměr	Větší než kation (Cl ⁻ ~ 181 pm)	Menší než anion (Na ⁺ ~ 95 pm)

2.1.6 Možnosti stanovení anorganických iontů

Kvantifikace iontů se běžně provádí při laboratorních vyšetřeních z klinických vzorků. V klinických aplikacích se pro stanovení anorganických iontů běžně používají standardní analytické metody jako je:

Atomová absorpční spektrometrie (AAS)

Atomová absorpční spektroskopie je analytická metoda určená ke stanovení obsahu stopových koncentrací prvků s citlivostí od setin do stovek ppm. Analyzovaný roztok je zmlžen za vzniku aerosolu, který je veden do plamene nebo grafitového atomizátoru, kde je roztok odpařen, a jsou rozrušeny chemické vazby v molekulách. Metodou AAS je možné stanovit široké spektrum prvků alkalických kovů nebo také kovy alkalických zemin. Pomocí metody AAS se stanovují dvojmocné anorganické kationty (př. Ca²⁺ a Mg²⁺). Některé příklady analyzovaných stopových prvků mohou být arsen, rtuť a olovo. Příkladem aplikace AAS na lidskou tkáň je měření elektrolytů sodíku a draslíku v plazmě. U vzorků potravin se nejčastěji stanovuje množství minerálů a stopových prvků, k ověření deklarovaného množství výrobcem. Vzorky jsou také analyzovány za účelem stanovení těžkých kovů, které mohou být pro spotřebitele škodlivé. Metodou je možné analyzovat vodu od pitné po odpadní a mořskou [40].

Plamenová emisní spektrometrie (AES)

Metodou plamenové emisní spektrometrie se stavují monovalentní anorganické kationty (Na⁺ a K⁺). Stanovení se provádí měřením intenzity emitovaného světla o vlnové délce po excitaci atomů daného prvku plamenem. Zředěný vzorek je rozprášen na jemnou mlhu a převeden do plamene, ve kterém dochází k odstranění rozpouštědla a atomizaci, excitaci a následně deexcitaci atomů za uvolnění fotonu. Foton je přes monochromátor detekován detektorem. Intenzita záření je úměrná koncentraci měřeného prvku ve vzorku [41].

Hmotnostní spektrometrie indukčně vázaného plazmatu (ICP-MS)

Hmotnostní spektrometrie indukčně vázaného plazmatu je analytická metoda pro stanovení stopových víceprvkových a izotopových vzorků. ICP-MS odděluje ionty generované

horizontálním plazmatem na základě jejich poměrů hmotnost/náboj. Díky své vysoké propustnosti ICP-MS je citlivou metodou pro víceprvkovou detekci ve vzorcích hornin a minerálů (lithium, skandium, titan atd.). Metoda je využívána pro identifikaci stopových kovů přítomných v podzemních vodách. Elementární analýza ve vodě je také důležitá pro zdraví vodních druhů, které mohou v konečném důsledku ovlivnit celý potravní řetězec [42].

Atomová emisní spektroskopie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-AES)

Atomová emisní spektroskopie s indukčně vázaným plazmatem je spektrální metoda používána k velmi přesnému stanovení elementárního složení vzorků. Hlavní rozdíl mezi ICP-MS a ICP-AES je způsob, jakým jsou ionty vytvářeny a detekovány. V ICP-AES jsou ionty excitovány vertikálním plazmatem a emitují fotony, které jsou detekovány na základě jejich emisních vlnových délek [43].

Spektrofotometrické metody

Anorganické či organické ionty v biologických systémech lze kvantifikovat spektrofotometrickými metodami za předpokladu, že jsou přítomny ve vhodných koncentracích (několik mg/ml a více). Prvky jako hliník, kadmium, chrom a nikl je téměř nemožné stanovit pomocí UV/Vis spektrofotometrie, protože se v biologických systémech vyskytují v příliš nízkých koncentracích. Ke stanovení anorganických iontů pomocí UV/Vis spektrofotometrie je možné použití činidel vytvářející barevnou sloučeninu (viz. tabulka 4) [44].

Tabulka 4 Charakteristiky anorganických prvků pomocí UV/Vis spektrofotometrického stanovení [44]

Anorganický prvek	Činidlo	λ_{\max} [nm]
Železo	1,10-fenantrolin	510
Měď	Cuproine	546
Hořčík	Thiazol žlutá	540
Sulfid	<i>N</i> - <i>N</i> - dimethyl- <i>p</i> -fenylendiamin	669
Vápník	Klonanát sodný	520

Iontově selektivní elektrody (ISE)

Iontově selektivní elektroda je analytická technika používána ke stanovení aktivity iontů ve vodném roztoku měřením elektrického potenciálu. ISE mají mnoho výhod ve srovnání s jinými technikami – levné, snadno proveditelné, široký rozsah měření koncentrace, měření v reálném čase a stanovení kladně i záporně nabitých iontů. Pomocí metody ISE se stanovují monovalentní i dvojmocné anorganické kationty. ISE nachází využití při monitorování znečištění přírodních vod (CN^- , F^- , S^- , Cl^- atd.), při zpracování potravin (NO_3^- , NO_2^- v konzervačních látkách, Ca^{2+} v mléčných produktech a K^+ v ovocných šťávách) [45].

Tyto analytické metody vykazují dobrou přesnost a opakovatelnost, jsou však mimo ICP schopné analyzovat najednou pouze jeden analyt. K získání úplných informací o složení iontů v tělních tekutinách je potřeba použít kombinace metod, což má za následek velkou spotřebu

vzorku, dlouhou dobu analýzy a vysoké náklady na stanovení. Proto byly vyvinuty alternativní přístupy založené na separačních metodách, které umožňují stanovení celé řady anorganických kationtů i aniontů v jediném měření [46].

Pro stanovení anorganických iontů ve vzorcích krevního séra a moči lze použít například iontovou chromatografii (IC) s vodivostní nebo UV/Vis detekcí. IC je chromatografická metoda, která odděluje ionty a polární molekuly na základě jejich afinity k iontoměničím. Funguje pro téměř jakýkoli druh nabitě molekuly – včetně velkých proteinů, malých nukleotidů a aminokyselin. IC musí být prováděna v prostředí s pH o jednotku odlišném od izoelektrického bodu/ pK_a analytu. Je ideální pro analýzu iontů ve farmaceutických aplikacích. Nicméně tento přístup má určité nevýhody – drahé kolony s krátkou životností, použití silně kyselých mobilních fází, vysoké náklady na analýzu apod. [47].

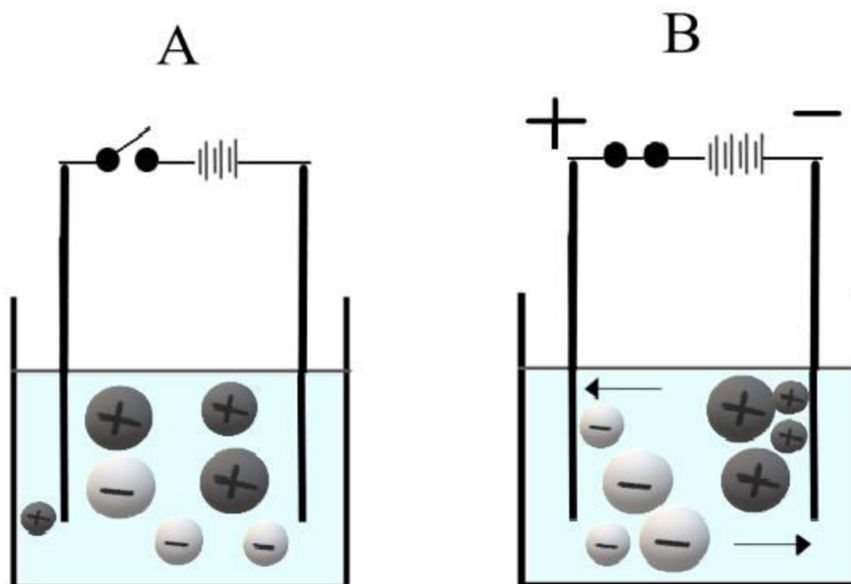
Jako další alternativa může být použito kapilární elektroforézy, která poskytuje v porovnání s jinými analytickými metodami řadu výhod např. možnost stanovit kationty i anionty souběžně, krátkou dobu analýzy, nízkou spotřebu vzorku (nl), nízké náklady na materiál a provoz. Metoda je vhodná pro analýzu anorganických iontů mobilních a snadno rozpustných ve vodě (př. chlorid, dusičnan a síran). Analyt má omezené absorpční vlastnosti, proto je vhodná nepřímá detekce [48].

2.2 Elektroforetické metody a jejich využití ke studiu interakcí iontů

Elektroforetické či elektromigrační metody jsou separační techniky využívající rozdílného pohybu ionizovaných částic v elektrickém poli. Mezi elektroforetické metody se řadí kapilární elektroforéza (CE). CE je rychlá a všestranná elektroforetická metoda, která kombinuje jednoduchost, reprodukovatelnost, citlivost a vysokou separační účinnost. Pro svou účinnost CE dosahuje stovek tisíc až milionů teoretických pater v nano- až pikolitrových objemech analytu. Technika nabízí vysoký stupeň rozlišení, snadnou automatizaci u nanášení vzorku či vyhodnocování záznamů a poměrně snadnou kvantifikaci. Její výhodou je také možnost separace téměř všech typů analytů např. biomolekul, iontů, nanočástic apod. Právě díky těmto vlastnostem a možnostem aplikace byla CE vybrána jako vhodná metoda pro stanovení anorganických iontů v buněčném lyzátu. Metoda CE zvolena pro tuto práci zahrnující hydrodynamické dávkování vzorků byla kombinována s nepřímou UV/Vis detekcí [49].

2.2.1 Princip metody

K detekci jednotlivých složek směsi je využíváno stejnosměrného elektrického pole. K separaci dochází na základě odlišných migračních rychlostí složek směsi po vložení napětí. V nepřítomnosti elektrického pole je pohyb iontů náhodný (obrázek 2a). Po vložení napětí se ionty pohybují směrem k opačně nabitě elektrodě (obrázek 2b) [50].



Obrázek 2 a) Elektroforéza bez přítomnosti elektrického pole – pohyb iontů je náhodný,
 b) Elektroforéza po vložení stejnosměrného elektrického pole – spořádaný pohyb iontů

Konstantní rychlost pohybu iontů (v) je úměrná velikosti nábojů a je definována pomocí vztahu (1):

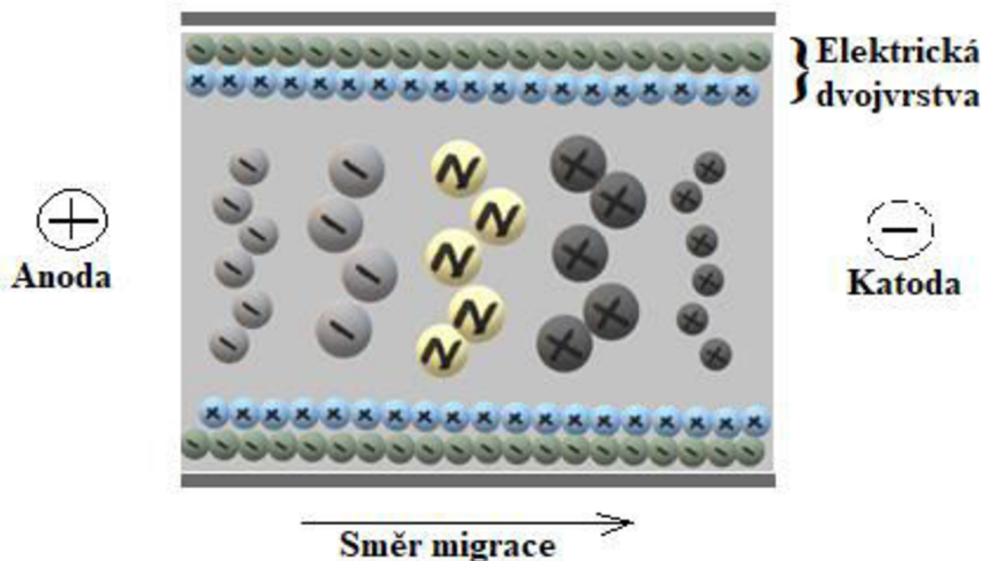
$$v = \mu_e \cdot E \quad (1)$$

Intenzita elektrického pole (E) je funkcí vloženého napětí a délky kapiláry. Elektroforetická mobilita (μ_e) je pro daný ion a dané médium konstantou. Elektroforetickou mobilitu je možné vyjádřit jako:

$$\mu_e = \frac{q}{6\pi\eta r} \quad (2)$$

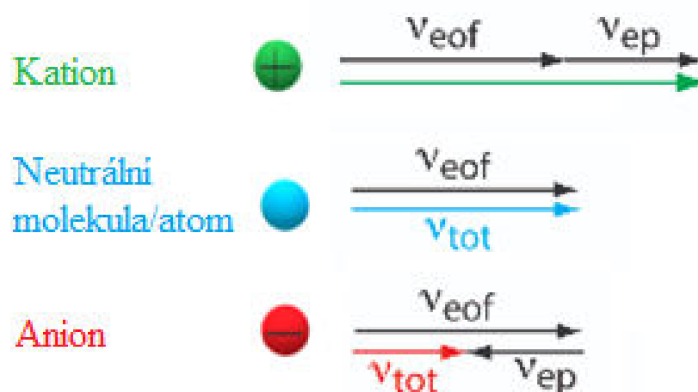
Z rovnice (2) vyplývá, že malé částice s velkým nábojem se budou pohybovat rychleji než velké částice s malým nábojem (viz. obrázek 3). Na částice působí odporová síla (F_F) vnitřního tření média, která se mění s viskozitou (η). Síla vnitřního tření i rychlost pohybu částice se změní teplotou. V průběhu elektroforézy dojde k vytvoření rovnováhy síly elektrického pole a vnitřního tření. Jednotlivé síly budou mít stejnou velikost s opačným znaménkem [51].

K elektroforetické separaci dochází v křemenné kapiláře, jejíž konce jsou ponořeny do elektrolytu a umístěny mezi dvěma elektrodami. Samotná kapilára je naplněná médiem, které při vhodném pH (≥ 6) způsobí ionizaci silanových skupin na vnitřním povrchu kapiláry za vzniku elektrické dvojvrstvy. Působením stejnosměrného elektrického pole na difúzní část elektrické dvojvrstvy, dochází ke vzniku elektroosmotického toku (EOF), který strhává celý vnitřní objem kapiláry směrem ke katodě [52].



Obrázek 3 Schéma separace iontů v křemenné kapiláře na základě odlišné migrační rychlosti založené na velikosti molekuly a náboji. Skupiny SiOH jsou ionizované a vytvářejí elektroosmotický tok uvnitř kapiláry.

Kationty separovaného vzorku putují ve směru EOF ke katodě (od + k -). Celková rychlost kationtů (v_{tot}) při jejím pohybu kapilárou je dána součtem její elektroforetické rychlosti a rychlosti EOF (obrázek 4). Anionty se pohybují k anodě, proti směru EOF, proto jsou detekovány v delší migrační čas. Celková rychlost aniontů (v_{tot}) při jejich pohybu kapilárou je dána rozdílem jejich elektroforetické mobility a mobility EOF. Tato metoda tedy umožňuje analýzu kationtů a aniontů vedle sebe. Neutrální molekuly nejsou separovány. Mezi faktory, které ovlivňují elektroforetickou separaci, patří pH, hydrodynamický poloměr molekul, viskozita a teplota separačního média. To platí v případě kladné polarizace, která je vhodná pro stanovení kationtů. Záporná polarita způsobí pohyb ve směru EOF k anodě (od - k +) a anionty jsou detekovány jako první [53].



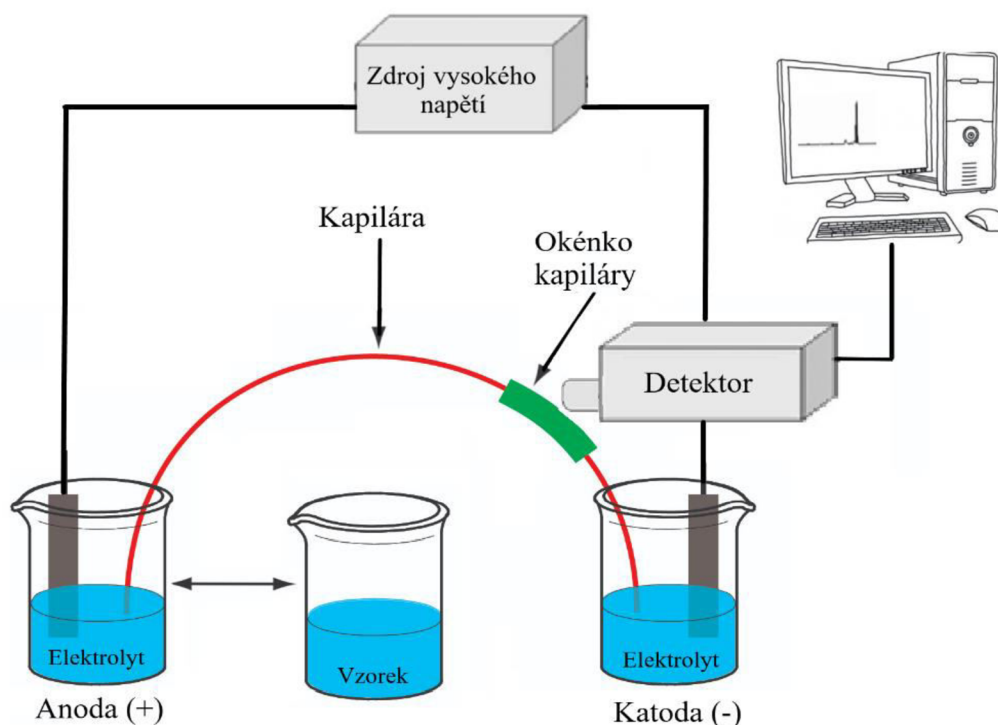
Obrázek 4 Vizuální vysvětlení obecného pořadí eluce v CE. Každý druh iontu má stejný elektroosmotický tok. Kationty se eluují jako první, protože mají kladnou elektroforetickou rychlost. Anionty se eluují jako poslední, protože jejich záporná elektroforetická rychlost částečně kompenzuje rychlost elektroosmotického toku. Neutrální molekuly/atomy se eluují rychlostí elektroosmotického toku [54].

Záznam analýzy se nazývá elektroferogram, který znázorňuje závislost signálu na čase. Kvalitativní vlastnosti jsou vztaheny k době migrace a kvantitativní charakteristiky jsou reprezentovány výškou/plochou píku [55].

2.2.2 Instrumentace

Typický systém CE se skládá z vialky s elektrolytem a vzorkem, zdroje vysokého napětí s výstupem na platinové elektrody a křemenné kapiláry. Na injekční konec kapiláry se nadávkuje vzorek, který je na detekčním konci kapiláry detekován a zaznamenaný signál v čase vyhodnocován počítačem. Detektor je zařízení, které monitoruje změny složení procházejícího roztoku. Odpověď detektoru na konci kapiláry je závislá na mnoha faktorech (typ vzorku, dávkování, složení elektrolytu, vložené napětí, způsob detekce, sorpce na stěny kapiláry, rozdíly v pohyblivosti atd.) [56].

Kapiláry z oxidu křemičitého jsou velmi křehké, proto jsou zvnějšku potaženy vrstvou polyimidu pro zajištění potřebné mechanické odolnosti a flexibility. Touto vrstvou neprochází UV záření, proto je nutné polymerní vrstvu v místě optické detekce odstranit. Některé přístroje obsahují také zařízení pro regulaci teploty, které zajišťuje opakovatelnost a reprodukovatelnost analýz. Kompletní instrumentace je schematicky znázorněna na obrázku 5 [56].



Obrázek 5 Schéma instrumentace kapilární elektroforézy [56]

2.2.3 Typy detekce

Detekce analytických zón v CE může být provedena buď v průběhu jejich migrace kapilárou (UV/Vis absorpční detekce, fluorescenční detekce, vodivostní detekce, detekce na základě indexu lomu atd.) nebo po eluci z kapiláry (elektrochemická detekce, hmotnostní spektrometrie). V tabulce 5 jsou zmíněny nejčastěji využívané detekční metody a porovnány

jejich výhody a nevýhody [57].

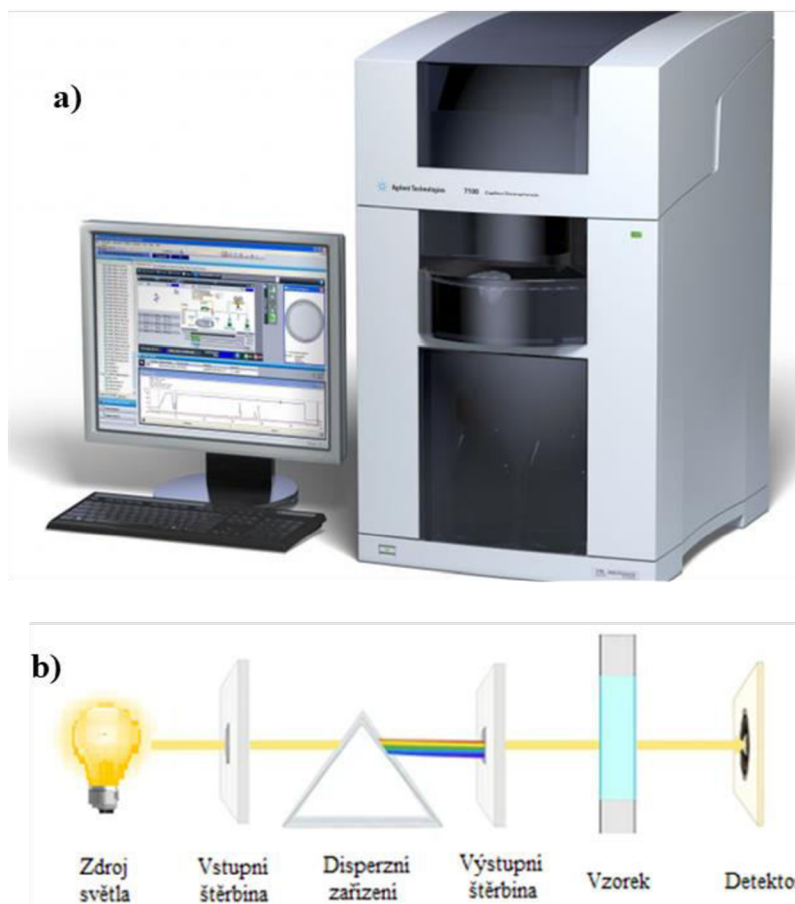
Univerzální detektor reaguje na co největší počet analytů. Selektivní detektor reaguje pouze na určitou skupinu látek a specifický detektor reaguje pouze na jediný analyt, případně na velmi malou skupinu látek velmi podobných vlastností [58].

Tabulka 5 Srovnání detekčních metod [58]

	Výhody	Nevýhody
UV/Vis absorpční detekce	Univerzálnost Účinnost Použití nízké vlnové délky (~190 nm) Nízké náklady Jednoduché použití	Detekční citlivost Analyt musí obsahovat chromofor
Fluorescenční detekce	Selektivita Specifičnost Citlivost Minimum interference Široký rozsah koncentrací	Analyt musí obsahovat fluorofor (nebo nutná derivatizace) Vyšší náklady Citlivost na nečistoty, bubliny ve vzorku, pH
Elektrochemická detekce	Selektivita Citlivost Bez derivatizace vzorku	Sloučenina musí vykazovat elektrochemickou aktivitu Pasivace elektrod Následné čištění Nutnost použití vodivého média
Hmotnostní spektrometr	Selektivita Univerzálnost Citlivost	Drahé Provádění specializovanými technikami
Vodivostí detekce	Univerzálnost	Tvorba usazenin na elektrodě v elektrolytu Detekční citlivost Nespecifičnost

UV/Vis absorpční detekce

UV/Vis absorpce je nejběžnější detekční metoda v CE (obrázek 6). Tato metoda je používaná k detekci absorpce UV (190–400 nm) nebo viditelného (400–800 nm) záření molekulami ve vzorku. Existují tři typy detektorů – s pevnou vlnovou délkou, s proměnlivou vlnovou délkou či fotodiodové pole. Absorbance je popsána pomocí Lambert-Beerova zákona. S použitím UV/Vis absorpčního detektoru je možné detekovat široké spektrum sloučenin. Předpokládá se, že více než 90 % sloučenin absorbuje v rozsahu vlnových délek UV/Vis. U sloučenin, které nevykazují tuto absorpci, lze použít nepřímou detekci. Při nepřímé detekci je použito separační médium obsahující chromofor a detektor pak zaznamená snížení odezvy signálu, což se na elektroferogramu projeví jako záporný pík. Citlivost UV/Vis detekce závisí na průměru kapiláry [59].



Obrázek 6 a) Schéma CE Agilent Technologies [60] b) Schéma UV/Vis spektrofotometru

Fluorescenční detekce

Další velmi používaná detekce v CE je fluorescenční (nejčastěji laserem indukovaná fluorescenční detekce, LIF). Jako budící zdroj bývá používán laser nebo laserová dioda, která se stala alternativou pro lasery díky malým rozměrům, stabilnímu a monochromatickému záření. Fluorescence umožňuje extrémně nízké detekční limity, které se pohybují, v závislosti na zdroji excitace, postupu derivatizace a fluorescenční značce [61].

Detektor je zvláště důležitý pro stopovou analýzu v biologických aplikacích, zejména u analytů obsahujících primární aminy (např. aminokyseliny, peptidy a proteiny), důležitý je i při sekvenování DNA. V současné době je vyvinuta široká škála fluorescenčních značek, které udělují fluorescenční vlastnosti sloučeninám, které nejsou inherentně fluorescenční [61].

Elektrochemická detekce

Elektrochemická detekce je založena na oxidaci nebo redukci analytu na elektrodě. Tato metoda vykazuje nižší limity detekce v porovnání s UV/Vis absorpční detekcí a nevyžaduje žádnou derivatizaci vzorku jako je tomu u fluorescenční detekce. I přesto je v CE využívána méně. Důvodem může být to, že vysoké napětí aplikované při separaci a výsledný proud v kapiláře jsou vnímány jako nekompatibilní s elektrochemickou detekcí [62].

Hmotnostní spektrometr (MS)

Propojení CE-MS je velmi atraktivní, protože umožňuje propojení účinné separační techniky s citlivou a selektivní detekcí jak malých, tak velkých molekul. Analyty jsou detekovány na základě poměru jejich hmotnosti a náboje. Získané informace jsou zvláště užitečné pro identifikaci struktury sloučenin [63].

Vodivostní (konduktometrická) detekce

Vodivostní detekce využívá rozdílnosti elektrických vodivostí jednotlivých zón v CE v porovnání s vodivostí okolního elektrolytu. Detekce je založena na měření elektrické vodivosti roztoku v detekční cele mezi dvěma kovovými elektrodami, které jsou umístěny na výstupu separační kapiláry. Na elektrody se vkládá střídavé napětí, aby se zabránilo polarizaci. Tato detekce je vhodná pro detekci všech typů organických kyselin, protože nezávisí na přítomnosti chromoforů [64].

2.2.4 Použití CE

Aplikace jsou velmi rozsáhlé a v této práci jsou zmíněny jenom některé významné. CE je používána k analýze velkých i malých molekul či iontů, k chirální separaci pro analýzu vzorků séra pacientů s rakovinou, pro stanovení čistoty řady farmaceutických přípravků, k separaci peptidů, k analýze sacharidů a oligosacharidů, k analýze nukleosidů, nukleotidů a nukleových kyselin nebo ke klinickým účelům (např. pro analýzu různých farmak a sloučenin – př. aspirinu, paracetamolu, cimetidinu, hypoglykemických léků, antiepileptik, morfinu nebo kokainu v moči či v krevní plazmě). CE je vhodnou metodou pro separaci anorganických či organických iontů [65].

Příklady stanovení iontů [66,67]

- Stanovení anorganických kationtů v biologických tekutinách – V lidské moči se stanovují např. amonné, draselné a sodné ionty. Koncentrace iontů v moči závisí na příjmu potravy, na pitném režimu, zdravotním stavu apod.
- Separace anorganických kationtů v pyrotechnice – Metodou CE lze stanovit ionty zastoupených v anorganických explozivních látkách (amonné, draselné, barnaté, vápenaté, sodné, hořčnaté, olovnaté, strontnaté a zinečnaté).
- Separace organických a anorganických iontů ve víně – Ve víně se kromě vody, alkoholu, glycerinu, fruktózy, kyselin vyskytují také minerální látky (fosforečnany, sírany, křemičitany, sodík, hořčík, draslík, železo) a dusíkaté látky (aminokyseliny, aminy, bílkoviny), které lze stanovit zmíněnou metodou.
- Stanovení kovových iontů ve vitaminových tabletách
- Detekce a kvantifikace anorganických iontů (sodík, draslík, vápník či hořčík) je využitelná při výzkumu iontových kanálů v buňkách a může přinést nové poznatky v této vědní oblasti
- Analýzy anorganických iontů ve vzorcích prostředí (pitná, dešťová, odpadní voda, sněh apod.)

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Popis experimentu

Experimentální část se zabývá optimalizací metody pro stanovení anorganických iontů a ověření optimalizovaného postupu na buněčném lyzátu HeLa buněk. Optimalizovaná metoda je určena k detekci chloridových iontů v HeLa buňkách. V budoucnu je plánováno její využití pro analýzu HeLa buněk s modifikovaným chloridovým kanálem k ověření úspěšnosti genetické modifikace. Separace roztoku směsi vybraných iontů a buněčného materiálu byly provedeny na přístroji CE vybaveném UV/Vis detekcí.

3.2 Materiály

Seznam potřebných chemikálií, sloučenin a ostatních materiálů pro separaci vybraných iontů je uveden v tabulce 6.

Tabulka 6 Seznam použitých materiálů potřebných k optimalizaci pracovního postupu

Materiál	Výrobce	Čistota
Chlorid sodný	Sigma Aldrich (USA)	99,5%
Hydrogenfosforečnan disodný	Sigma Aldrich (USA)	99,0%
Hydroxid sodný	Sigma Aldrich (USA)	
Salicylová kyselina	Sigma Aldrich (USA)	99,0%
Trizma báze (TRIS)	Sigma Aldrich (USA)	99,8%
Kapalný dusík	Cryotherm	
Kyselina citrónová bezvodá	Penta (CZ)	
Kyselina dusičná 70%	Sigma Aldrich (USA)	
Kyselina chlorovodíková 35%	Penta (CZ)	
DoTaOH	Připraveno na Mendelově univerzitě v Brně	
Filtrační zařízení Amicon 3K	Merck Millipore	

3.3 Přístrojové vybavení

K přípravě anorganických sloučenin, buněčného materiálu a k následné analýze byly použity zařízení uvedené v tabulce 7. Na měření pH základního elektrolytu byl použit pH metr s citlivostí 0,1 vybaveného skleněnou elektrodou. Pro hůře rozpouštějící se vzorky byla použita vysokorychlostní třepačka a blokový termostat. K oddělení složek různorodé směsi o rozdílné hustotě byla použita centrifuga.

Tabulka 7 Seznam použitého přístrojového zařízení včetně uvedeného výrobce

Přístroj	Název	Výrobce
Orbitální třepačka	Vortex mixer PV-1	GRANT-BIO
pH metr	INOLAB	WTW
Blokový termostat	Thermal Shake lite	VWR
Centrifuga	Eppendorf® Centrifuge 5424/5424R	Sigma Aldrich (USA)
Kapilární elektroforéza s UV/Vis detektorem	7100 Capillary Electrophoresis	Agilent Technologies, Německo

3.4 Podmínky separace

Signál UV/Vis detektoru byl zaznamenáván při vlnové délce 232 nm. Vzorek byl dávkován hydrodynamicky tlakem 10 mbar po dobu 1 s. Při všech separacích byla zvolená záporná polarita (katoda na vstupní části kapiláry, anoda na výstupní části kapiláry). Záporná polarita umožní migraci separovaných složek od - k +. Tzn. k detektoru migrují rychleji záporné částice (chlorid, octan, hydrogenfosforečnan). Kationty se pohybují ke katodě, proti směru EOF,

proto jsou detekovány v delší migrační čas. Na elektrody bylo vloženo napětí -20 kV. Podmínky separace jsou shrnuty v tabulce 8.

Tabulka 8 Podmínky separace

Podmínky separace			
Vlnová délka	Tlak dávkování	Délka dávkování	Napětí
232 nm	10 mbar	1 s	-20 kV

3.5 Volba kapiláry

Pro separaci byla použita křemenná kapilára z taveného oxidu křemičitého, která je vně potažená vrstvou polyimidu. Délka separační kapiláry byla zvolena tak, aby v krátké době bylo možné separovat analyzované látky. Citlivost UV/Vis detekce závisí na průměru kapiláry. Pro experiment byla použita kapilára o vnitřním průměru 75 μm , vnějším průměru 375 μm . Nová kapilára byla promyta 0,1M hydroxidem sodným. Před každou analýzou byla kapilára promyta po dobu 60 sekund roztokem základního elektrolytu. Za podmínek uvedených v tabulce 8 byla separace provedena dvěma rozdílně dlouhými kapilárami (tabulka 9).

Pro rychlejší separaci byla použita kapilára s celkovou délkou 48,5 cm a účinnou délkou 40 cm (podmínky $t=1$). Pro přesnější separaci byla použita křemenná kapilára s celkovou délkou 64 cm a účinnou délkou 55,5 cm (podmínky $t=2$). Podmínky budou porovnány na základě citlivosti a účinnosti separace.

Tabulka 9 Podmínky separace $t=1$ a $t=2$ na základě odlišné délky kapiláry

	Celková délka kapiláry	Účinná délka kapiláry
Podmínky $t=1$	48,5 cm	40 cm
Podmínky $t=2$	64 cm	55,5 cm

3.6 Příprava roztoku základního elektrolytu (BGE)

Základní elektrolyt pro stanovení anorganických látek obsahoval 75mM tris-(hydroxymethyl)-aminometan (TRIS), 2,5mM dodecyltrimethylamoniumhydroxid (DoTaOH) a 37,5mM kyselinu salicylovou. Všechny složky byly rozpuštěny v MilliQ vodě. Výsledné pH činilo 8,4.

3.7 Příprava DoTaOH

DoTaOH byl připraven z příslušného bromidu za použití bazického iontoměniče. Do 50 ml zkumavky bylo přidáno 15 ml ionexu, 40 ml MilliQ (30 min. třepáno). Voda byla odlita a ionex odsát. Přidáno 30 ml 3M NaOH (30 min. třepáno). Hydroxid byl odlit a ionex odsát. Do zkumavky bylo přidáno 10 mM decyltrimethylamoniumbromidu do celkového objemu 50 ml (60 min. třepáno). Vzniklý roztok vykazoval $\text{pH} > 8$.

3.8 Příprava roztoků směsi vybraných iontů

Roztoky anorganických sloučenin byly připraveny o vhodné koncentraci rozpuštěním/naředěním sloučenin v MilliQ vodě. K analýze byly připraveny roztoky chloridu sodného, kyseliny chlorovodíkové, kyseliny citrónové a hydrogenfosforečnanu sodného. Koncentrace sloučenin jsou zobrazeny v tabulce 10.

Tabulka 10 Koncentrace anorganických sloučenin

Sloučenina	Koncentrace
NaCl	1 μM , 5 μM , 0,5 mM, 1,5 mM, 4,8 mM, 15 mM, 30 mM, 60 mM a 0,12 M
HCl	1,5 mM, 3 mM, 6 mM a 11 mM
$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$	0,9 mM
Na_2HPO_4	0,5 mM

3.9 Příprava buněčného vzorku

Optimalizovaná metoda je určena k analýze buněčného lyzátu HeLa buněk a v budoucnu bude použita pro monitorování efektivity genové modifikace chloridového kanálu. HeLa buňky byly kultivovány na Masarykově univerzitě.

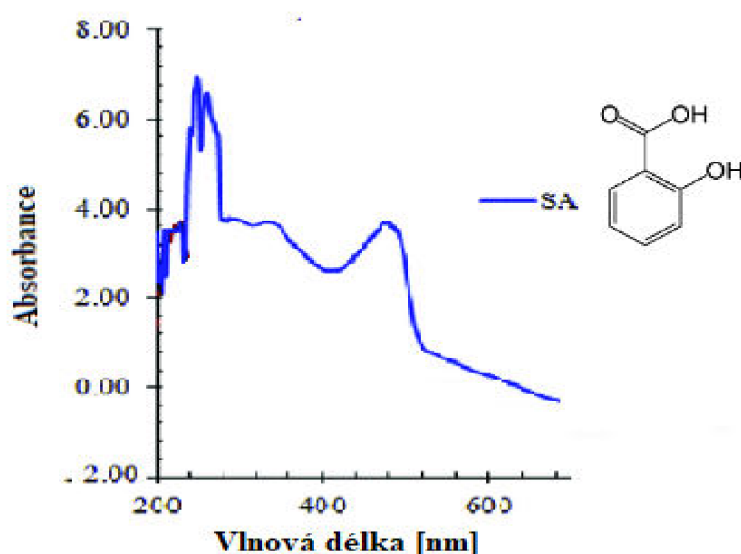
Před analýzou buněk je nutná úprava vzorku. Buňky byly připraveny dvěma způsoby: 1) tekutým dusíkem ($-196\text{ }^\circ\text{C}$) a 2) pomocí 5% HNO_3 . Buněčný materiál byl rozmělněn za přítomnosti 500 μl vody. Tepelnou denaturací (20 min, $100\text{ }^\circ\text{C}$) byly proteiny zničeny a odstraněny centrifugací (10 min, 15000 rcf). Vysokomolekulární látky byly odfiltrovány pomocí Amicon 3K a centrifugovány (10 min, 15000 rcf).

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

Diplomová práce je součástí projektu, který má za cíl studovat složení iontů v buňkách. Jako hlavní metoda pro stanovení iontů kovů byla použita laserová ablace a hmotností spektrometrie indukčně vázaného plazmatu. Do projektu diplomová práce přispěla stanovením nekovových prvků v buňkách pomocí CE, která je v současnosti zavedena ke stanovení iontů a optimalizuje se. Fyziologické zkoumání transportu iontů v buňkách poskytuje znalost o jejich správné funkci. Nejdůležitější je detekce Cl^- iontu ke stanovení závažných nemocí zejména fibrózy.

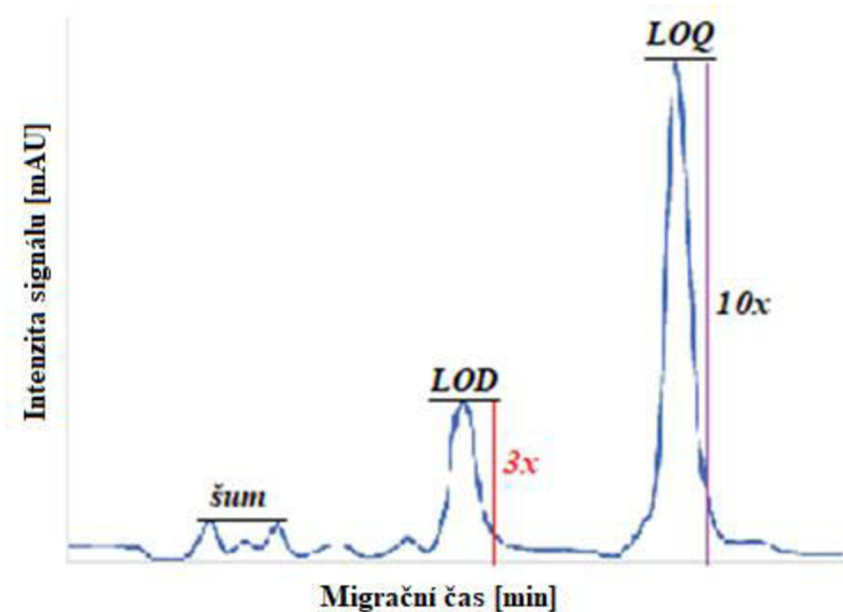
Na přístroji CE byla ověřena separace roztoku směsi vybraných iontů a iontů v buněčném materiálu, který byl kombinován s UV/Vis absorpčním detektorem s diodovým polem měřicím v oblasti délek od 190 nm až po 600 nm. Obvykle detekce sloučenin neabsorbujících UV záření v CE se provádí nepřímou detekcí. CE s použitím nepřímé UV detekce je demonstrována jako užitečná technika pro současné stanovení anorganických iontů v buněčných vzorcích. Nepřímá UV/Vis detekce je univerzální metoda detekce, ale poskytuje nižší citlivost než přímou detekcí. Díky mechanismu nepřímé detekce je iontová síla elektrolytu poměrně omezená, a proto je nevyhnutelné ředění vzorků. Vysoké ředění vzorků bude vyžadovat velmi nízké detekční limity pro stanovení stopových sloučenin. Detekční limit analytu závisí na rozdílu mobility mezi analytem a elektrolytem.

Stanovení anorganických iontů Cl^- , PO_4^{3-} , $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7^{3-}$, které jsou součástí lidského metabolismu, bylo provedeno metodou kapilární zónové elektroforézy (CZE). CZE je nejjednodušší metodou CE, při které jsou molekuly, ionty nebo částice odděleny pouze svou elektroforetickou mobilitou. Detekce těchto iontů byla sledována při vlnové délce 232 nm. Anorganické ionty neabsorbují UV ani viditelné záření, proto je k nepřímé metodě využita absorbující složka. Absorbující iont v základním elektrolytu se nazývá ko-iont. Vizualizující ko-iont musí mít stejné znaménko náboje jako detekovaný iont. Pro nepřímou detekci k vizualizaci iontu byla zvolena kyselina salicylová, která má dostatečně velký molární absorpční koeficient pro zajištění dobré citlivosti metody. Kyselina salicylová zprostředkovávající nepřímou detekci iontů dosahuje absorpčního maxima při vlnové délce 232 nm (obrázek 7) [68].



Obrázek 7 Absorpční spektrum a chemický vzorec kyseliny salicylové [68]

Na základě citlivosti a účinnosti separace se optimalizují podmínky analýzy anorganických sloučenin a buněčného materiálu. Citlivost měření lze stanovit pomocí meze detekce (LOD) a meze stanovitelnosti (LOQ). Příklad elektroferogramu zobrazujícího rozdíl mezi LOD a LOQ je znázorněn na obrázku 8. LOD stejně jako LOQ závisí na poměru signál/šum a jsou stanovované opakovanou analýzou slepého vzorku [69].



Obrázek 8 Graf elektroferogramu zobrazující mez detekce (LOD) – kdy lze prohlásit, že látka je přítomná, mez kvantifikace (LOQ) – kdy lze změřit obsah látky.

Mez detekce (LOD – limit of detection) je nejnižší koncentrace analytu ve vzorku, kterou lze spolehlivě detekovat a odlišit od limitu slepého vzorku (LOB). Odezva (S) přístroje pro koncentraci LOD je vyjádřena jako trojnásobek šumu základní linie h_n . Koncentraci meze detekce lze vypočítat podle vztahu (3) jako součet průměrného signálu slepého vzorku ($\overline{X_{sl}}$) a trojnásobku směrodatné odchylky pro slepý vzorek (s_{sl}). U separačních metod se LOD počítá podle vztahu (4), kde h_n je šum základní linie a b je směrnice kalibrační přímky z koncentrační závislosti výšky píku $y = b \cdot x$ [69].

$$LOD = \overline{X_{sl}} + 3 \cdot s_{sl} \quad (3)$$

$$LOD = \frac{3 \cdot h_n}{b} \quad (4)$$

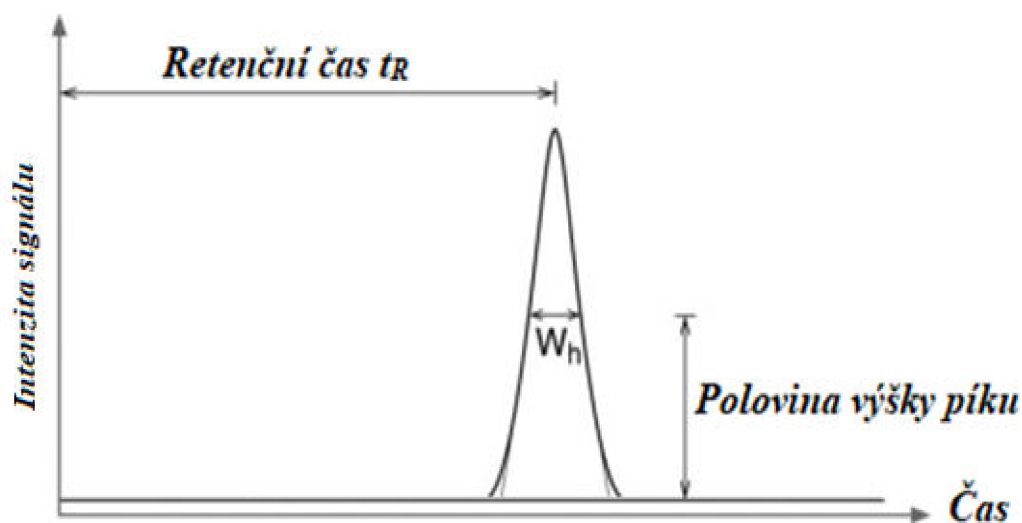
Mez stanovitelnosti (LOQ – limit of quantification) je nejnižší množství analytu ve vzorku, které lze stanovit s definovanou přesností. LOD je vždy menší než LOQ. Mez stanovitelnosti lze vyjádřit jako desetinásobek šumu základní linie. LOQ lze vypočítat jako součet průměrného signálu slepého vzorku ($\overline{X_{sl}}$) a desetinásobku směrodatné odchylky slepého vzorku (s_{sl}) podle vztahu (5). U separačních metod se počítá LOQ podle vztahu (6) [69]:

$$LOQ = \overline{X_{sl}} + 10 \cdot s_{sl} \quad (5)$$

$$LOD = \frac{10 \cdot h_n}{b} \quad (6)$$

Účinnost separace se měří počtem teoretických pater N . Čím je větší počet teoretických pater, tím je vyšší účinnost separace. Vyšším počtem teoretických pater (N) se separovaná zóna látky méně rozmývá při průchodu kapilárou a pík je užší (nízké W). Ve stejné kapiláře má každá látka jiný počet teoretických pater. Počet teoretických pater lze vypočítat podle vztahu (7) pomocí hodnoty šířky píku v jeho polovině (W_h) a retenčního času (t_R) zobrazeného na obrázku 9 [70].

$$N = 5,54 \cdot \left(\frac{t_R}{W_h}\right)^2 \quad (7)$$



Obrázek 9 Parametry potřebné k stanovení počtu teoretických pater N [70]

Výška teoretického patra H slouží k porovnání účinnosti separace v kapilárách různé délky. Vypočítá se obvykle v milimetrech jako poměr délky kapiláry (L) a počtu pater (N) podle vztahu (8). Čím je nižší H , tím je lepší rozlišení a efektivnější separace. Účinnost je optimalizována, když je N maximální a H minimální [70].

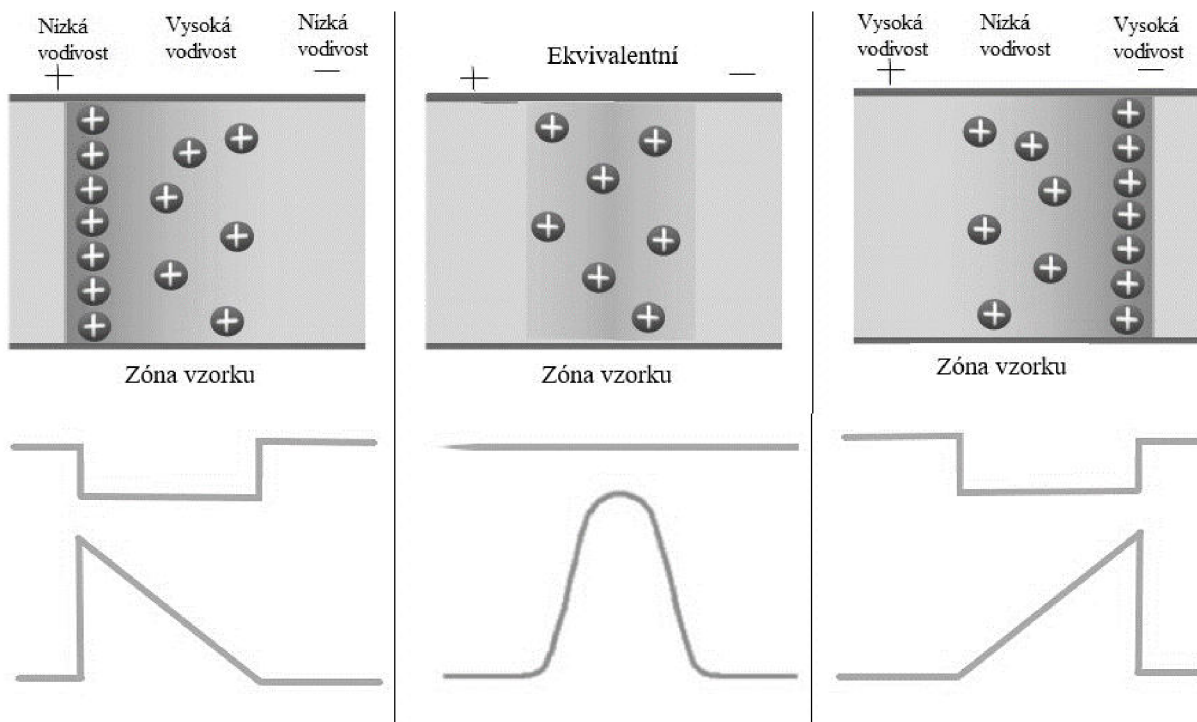
$$H = \frac{L}{N} \quad (8)$$

4.1 Separace anorganických iontů, podmínky $t=1$ ($L_{tot} = 48,5$ cm, $L_{ef} = 40$ cm)

4.1.1 Optimalizace koncentrace NaCl

Optimalizací je snaha nalézt rychlý separační systém, ve kterém budou separované složky vykazovat dobré rozlišení a odpovídající odezvu detektoru. Rozlišení udává míru separace mezi dvěma píky (obrázek 10) a je dáno rozdílem migrace jednotlivých složek a je snižováno elektromigrační disperzí (EMD). Pokud v kapiláře dominuje difúze, má pík Gaussovský tvar. Elektromigrační disperze je pozorována, když je koncentrace iontů vzorku srovnatelná

s koncentrací iontů elektrolytu. Důsledkem nelinearity elektromigračních jevů vzniká EMD a způsobuje rozšiřování píku – trojúhelníkový tvar píku, který se popisuje tzv. Haarhoff-van der Lindeho (HVL) funkcí [71].

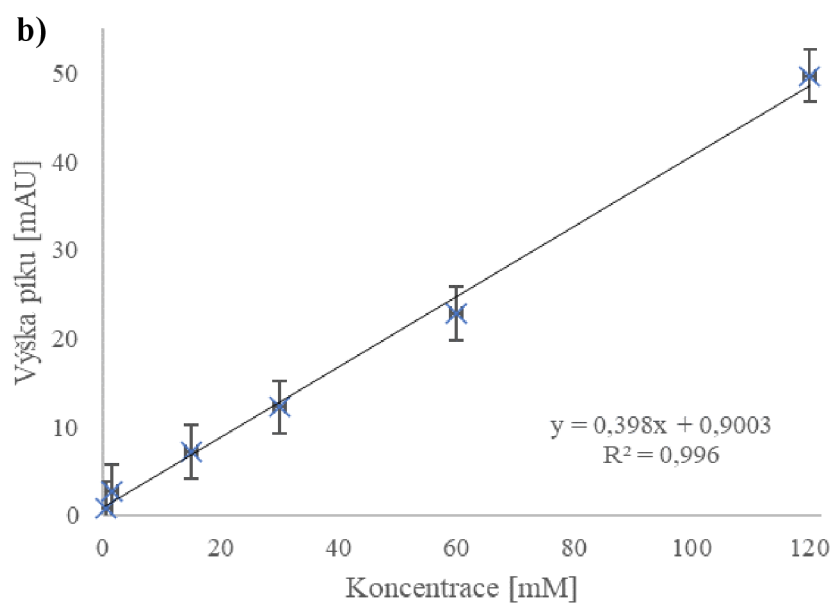
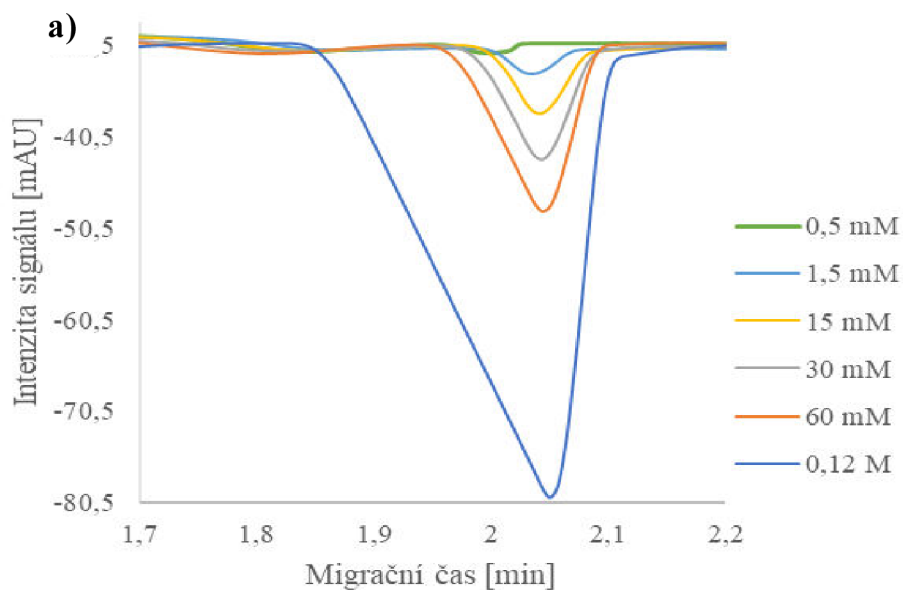


Obrázek 10 Schéma procesů elektrodisperze

Rozdíl ve vodivosti v zónách rozpuštěného analytu a elektrolytu se projeví deformací píku na elektroferogramu (obrázek 10). Změnu vodivosti (ΔK) lze vypočítat pomocí Kohlrauschovy rovnice (9). ΔK je změna vodivosti, k^β je vodivost základního elektrolytu, c_A^ε je koncentrace zóny analytu, c_B^β je koncentrace zóny v základním elektrolytu a Λ značí molární vodivost [72].

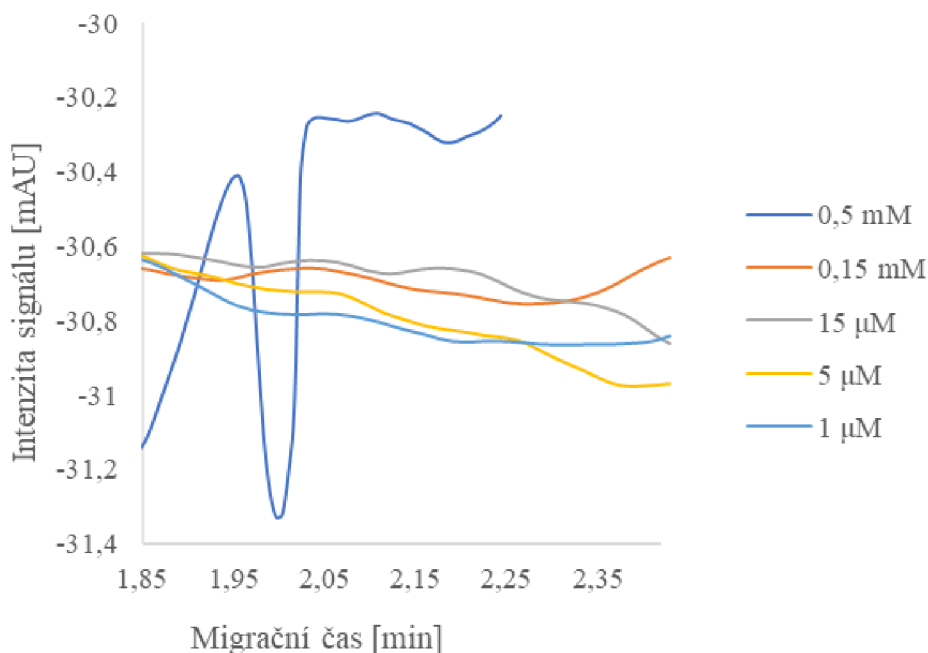
$$\frac{\Delta K}{k^\beta} \Lambda^0 = \frac{\mu_a - \mu_b}{\mu_a} \cdot \frac{c_A^\varepsilon}{c_B^\beta} \quad (9)$$

Koncentrační řada za podmínek $t=1$ ($L_{\text{tot}} = 48,5$ cm, $L_{\text{ef}} = 40$ cm) byla proměřena s 0,5 mM, 1,5 mM, 15 mM, 30 mM, 60 mM a 0,12 M NaCl. Chloridový pík byl detekován ve 2. minutě (obrázek 11a). Z kalibrační křivky na obrázku 11b lze pozorovat lineárně rostoucí intenzitu signálu s koncentrací NaCl. Lineární kalibrační řada vykazuje schopnost metody poskytnout výsledky přímo úměrné ke koncentraci analytu. Intenzita signálu jsou v záporných hodnotách, protože byla využita nepřímá detekce. Při nepřímé detekci je použito separační médium, které obsahuje absorbující složku (kyselina salicylová) a detektor pak zaznamená snížení odezvy signálu, což se na elektroferogramu projeví jako záporný pík. Také lze v obrázku 11a pozorovat výraznou elektromigrační disperzi při koncentraci NaCl 0,12 M, kterou je v případě potřeby možno eliminovat zvýšením koncentrace separačního elektrolytu.



Obrázek 11 a) Elektroforetická analýza roztoků NaCl a detekce Cl⁻ za podmínek $t=1$ ($L_{tot} = 48,5$ cm, $L_{ef} = 40$ cm); b) Kalibrační křivka NaCl s lineární regresí a koeficientem determinace R^2

Citlivost měření je charakterizována pomocí LOQ a LOD. Na základě výsledného elektroferogramu (obrázek 12) byla stanovena nejmenší koncentrace analytu ve vzorku (LOD), kterou lze detekovat 0,5 mM.



Obrázek 12 Stanovení meze detekce chloridu pomocí CE za podmínek $t=1$

Přesněji lze LOD stanovit výpočtem z rovnice 4 jako trojnásobkem šumu základní linie a ze směrodatné odchylky z lineární regrese. Výpočtem byla stanovena LOD 0,2 mM.

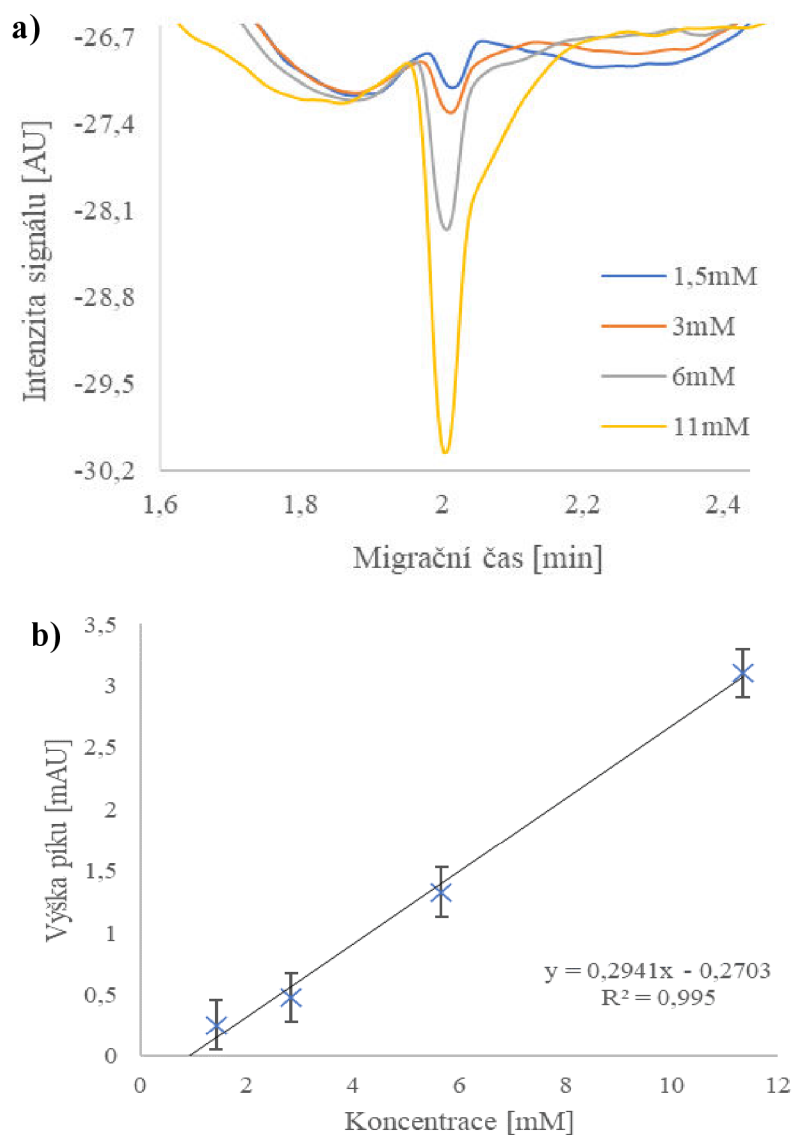
$$LOD = \frac{3 \cdot 0,029}{0,398} = 0,2 \text{ mM}$$

Desetinásobkem šumu základní linie a ze směrodatné odchylky z lineární regrese (rovnice 6) bylo stanovena nejmenší množství, které lze stanovit se specifickou přesností 0,7 mM.

$$LOQ = \frac{10 \cdot 0,029}{0,398} = 0,7 \text{ mM}$$

4.1.2 Detekce chloridových iontů v HCl

Na elektroferogramu z obrázku 13a byl ve 2. minutě za podmínek $t=1$ ($L_{tot} = 48,5$ cm, $L_{ef} = 40$ cm) detekován chloridový pík roztoků 1,5 mM, 3 mM, 6 mM a 11 mM HCl. Intenzita signálu lineárně roste s koncentrací HCl (obrázek 13b). Lineární kalibrační řada vykazuje schopnost metody poskytnout výsledky přímo úměrné ke koncentraci analytu.



Obrázek 13 a) Detekce chloridu v HCl pomocí CE za podmínek $t=1$ ($L_{tot} = 48,5$ cm, $L_{ef} = 40$ cm);
 b) Kalibrační křivka HCl s lineární regresí a koeficientem determinace R^2

Trojnásobkem šumu základní linie a ze směrodatné odchylky z lineární regrese (rovnice 4) byla stanovena nejmenší koncentrace analytu ve vzorku, kterou lze detekovat 0,2 mM.

$$LOD = \frac{3 \cdot 0,023}{0,2941} = 0,2 \text{ mM}$$

Desetinásobkem šumu základní linie a ze směrodatné odchylky z lineární regrese (rovnice 6) bylo stanovena nejmenší množství, které lze stanovit se specifickou přesností 0,8 mM.

$$LOQ = \frac{10 \cdot 0,023}{0,2941} = 0,8 \text{ mM}$$

Výsledný LOD i LOQ uvedený v tabulce 11 u analýzy HCl a NaCl vyšlo téměř totožně. Stanovením se potvrdilo, že zvolená metoda je spolehlivá, protože vykazuje obdobné výsledky pro dvě různé sloučeniny obsahující chloridy.

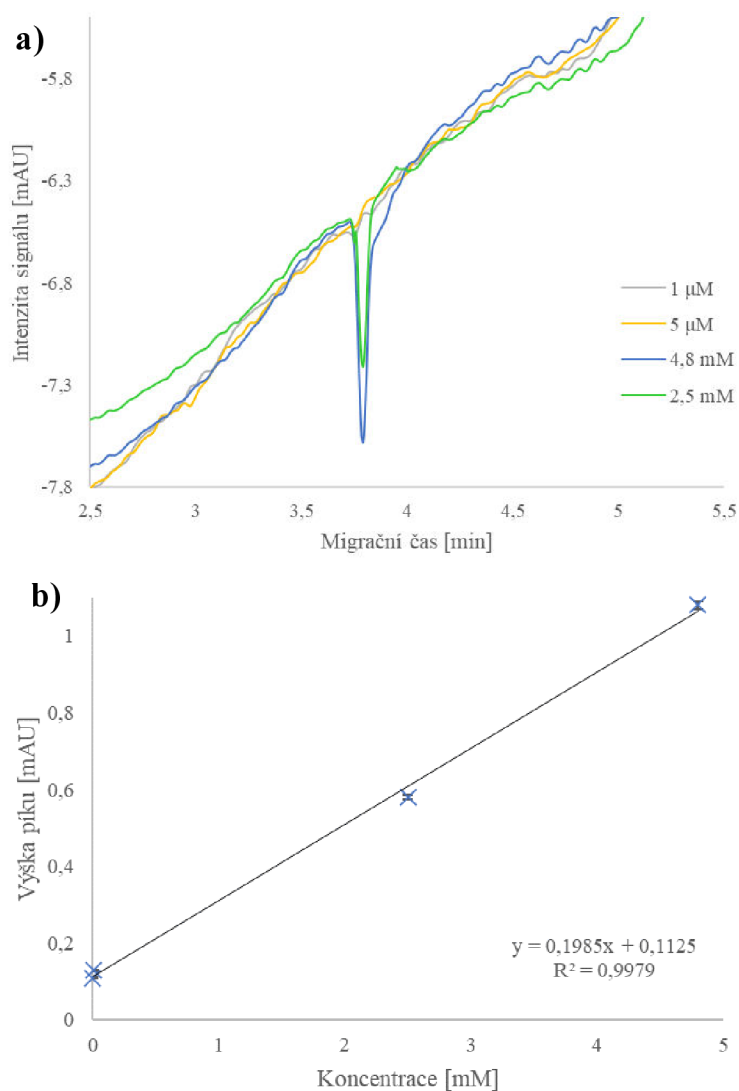
Tabulka 11 Porovnání vypočtených hodnot LOD, LOQ u NaCl a HCl

	NaCl	HCl
LOD	0,2 mM	0,2 mM
LOQ	0,7 mM	0,8 mM

4.2 Separace anorganických iontů, podmínky $t=2$ ($L_{\text{tot}} = 64$ cm, $L_{\text{ef}} = 55,5$ cm)

4.2.1 Optimalizace koncentrace vzorku NaCl a stanovení limitu detekce

Koncentrační řada byla proměřena za podmínek $t=2$ ($L_{\text{tot}} = 64$ cm, $L_{\text{ef}} = 55,5$ cm) s 4,8 mM, 5 μM a 1 μM NaCl. V elektroferogramu z obrázku 14a byl ve 3,8. minutě detekován chlorid. Lineární kalibrační řada zobrazena na obrázku 14b vykazuje schopnost metody poskytnout výsledky přímo úměrné ke koncentraci analytu.



Obrázek 14 a) Detekce chloridu v NaCl pomocí CE za podmínek $t=2$, b) Kalibrační křivka NaCl s lineární regresí a koeficientem determinace R^2

Citlivost měření byla charakterizována pomocí LOQ a LOD. Trojnásobkem šumu základní linie a ze směrodatné odchylky z lineární regrese (rovnice 4) byla stanovena nejmenší koncentrace analytu ve vzorku, kterou lze detekovat 0,2 mM.

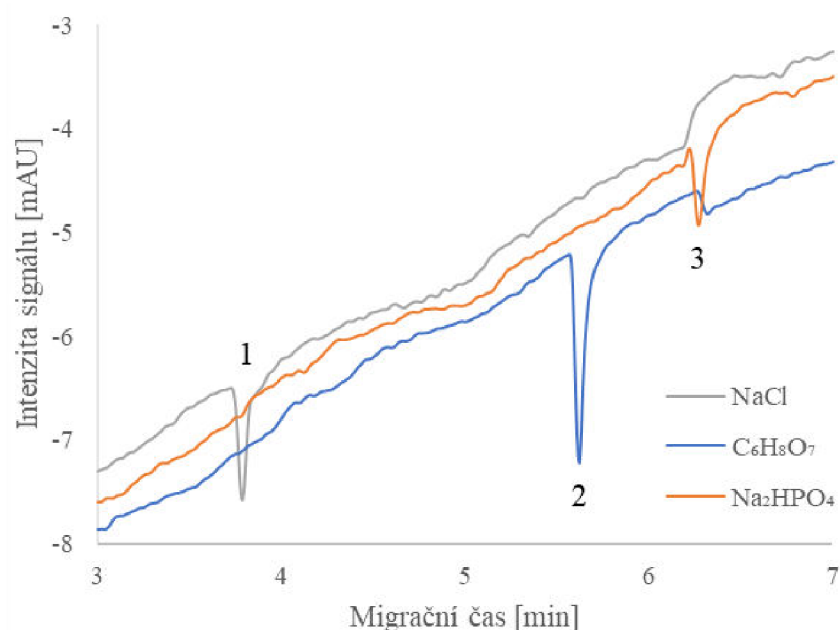
$$\text{LOD} = \frac{3 \cdot 0,014}{0,1985} = 0,2 \text{ mM}$$

Desetinásobkem šumu základní linie a ze směrodatné odchylky z lineární regrese (rovnice 6) bylo stanovena nejmenší množství, které lze stanovit se specifickou přesností na 0,7 mM. Hodnoty LOD i LOQ vyšli totožně jako při podmínkách $t=1$.

$$\text{LOQ} = \frac{10 \cdot 0,014}{0,1985} = 0,7 \text{ mM}$$

4.2.2 Stanovení citrátu, fosfátu a chloridu

K optimalizaci postupu byly detekovány ionty chloridu, citrátu a hydrogenfosforečnanu za podmínek $t=2$ ($L_{\text{tot}} = 64 \text{ cm}$, $L_{\text{ef}} = 55,5 \text{ cm}$). Byla použita k analýza delší kapilára ($L_{\text{tot}} = 64 \text{ cm}$, $L_{\text{ef}} = 55,5 \text{ cm}$), která na základě počtu teoretických pater nabízí vyšší účinnost separace. Separace anorganických solí 4,8 mM chloridu sodného, 0,9 mM kyseliny citrónové a 4,8 mM hydrogenfosforečnanu disodného je zobrazena na obrázku 15. Prokázalo se, že metoda je univerzální pro analýzu širšího spektra iontů, které jsou součástí lidského metabolismu (citrát, hydrogenfosforečnan).

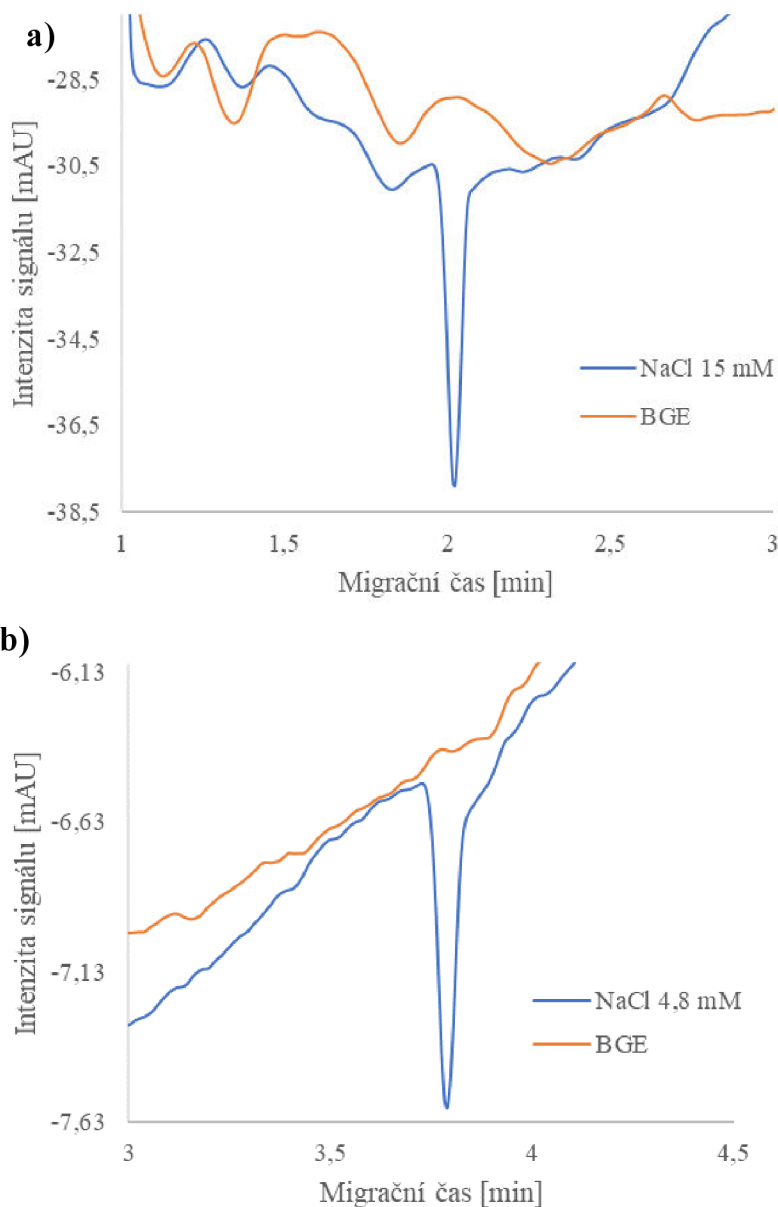


Obrázek 15 Separace anorganických iontů v elektrolytu pomocí CE (podmínky separace $t=2$).
Identifikace píku 1 = chlorid, 2 = citrát, 3 = fosfát.

4.3 Porovnání podmínek $t=1$ a $t=2$

Kvalitativní charakteristika analýzy je dána dobou migrace. Stanovení pomocí kratší kapiláry ($L_{\text{tot}} = 48,5 \text{ cm}$, $L_{\text{ef}} = 40 \text{ cm}$) umožnilo detekci chloridů v 15mM NaCl ve 2. minutě (obrázek 16a). Separací pomocí delší kapiláry ($L_{\text{tot}} = 64 \text{ cm}$, $L_{\text{ef}} = 55,5 \text{ cm}$) byl chloridový

iont v 4,8mM NaCl detekován ve 3,8. minutě (obrázek 16b). Kvantitativní charakteristiky jsou reprezentovány výškou/plochou píku. Rozdílem ve vodivosti v zónách rozpuštěného analytu a elektrolytu dochází k deformaci píku a nejedná se tak o klasický Gaussovský tvar. Při nesymetrickém píku je vhodné porovnávat plochy píku. Plocha píku 4,8 mM NaCl je přibližně 3x menší než u 15 mM NaCl.



Obrázek 16 Detekce chloridu a) 15 mM NaCl, podmínky $t=1$ ($L_{tot} = 48,5$ cm, $L_{ef} = 40$ cm),
b) 4,8 mM NaCl, podmínky $t=2$ ($L_{tot} = 64$ cm, $L_{ef} = 55,5$ cm)

Účinnost separace byla změřena pomocí teoretických pater a výšky teoretického patra. Čím je větší počet teoretických pater, tím je vyšší účinnost separace. Výška teoretického patra H slouží k porovnání účinnosti separace v kapilárách různé délky. Čím je nižší H , tím je lepší rozlišení a efektivnější separace. Účinnost je optimalizována, když je N maximální a H minimální.

a) Měření za podmínek $t=1$ ($L_{tot} = 48,5$ cm, $L_{ef} = 40$ cm)

$$N = 5,54 \cdot \left(\frac{2,02}{0,050} \right)^2 = 9\,042$$

$$H = \frac{48,5}{9\,042} = 0,005 \text{ cm}$$

b) Měření za podmínek $t=2$ ($L_{tot} = 64$ cm, $L_{ef} = 55,5$ cm)

$$N = 5,54 \cdot \left(\frac{3,79}{0,044} \right)^2 = 41\,104$$

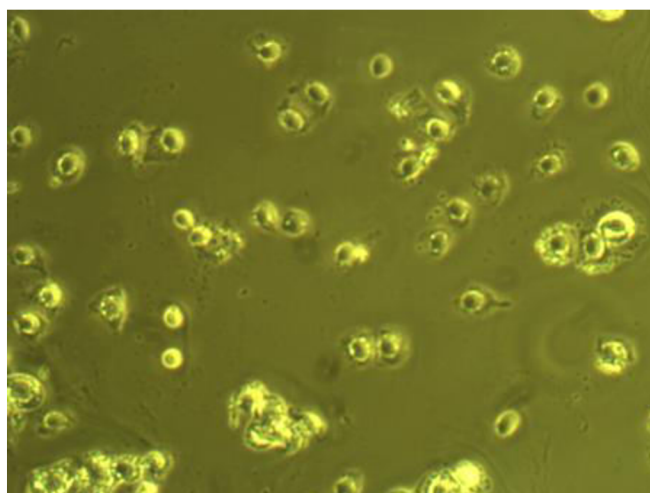
$$H = \frac{64}{41\,104} = 0,002 \text{ cm}$$

Podle počtu teoretických pater a výšky teoretického patra se jeví účinnější separace s delší kapilárou za podmínek $t=2$ ($L_{tot} = 64$ cm, $L_{ef} = 55,5$ cm), což perfektně koreluje s teorií. Za těchto podmínek byly stanoveny i další ionty – citrát a hydrogenfosforečnan, abychom prokázali univerzalitu metody ke stanovení dalších iontů. K analýze buněčného lyzátu bude použita metoda s kratší kapilárou za podmínek $t=1$ ($L_{tot} = 48,5$ cm, $L_{ef} = 40$ cm) pro rychlejší stanovení.

4.4 Stanovení reálných vzorků, podmínky $t=1$ ($L_{tot} = 48,5$ cm, $L_{ef} = 40$ cm)

Pro stanovení iontů v buněčném lyzátu byla zvolena metoda podmínek $t=1$ ($L_{tot} = 48,5$ cm, $L_{ef} = 40$ cm) protože na základě stanovení LOD a LOQ se potvrdila její citlivost. Vzhledem ke kratšímu času analýzy byla pro efektivní stanovení Cl^- v buněčném lyzátu použita metoda s kratší kapilárou.

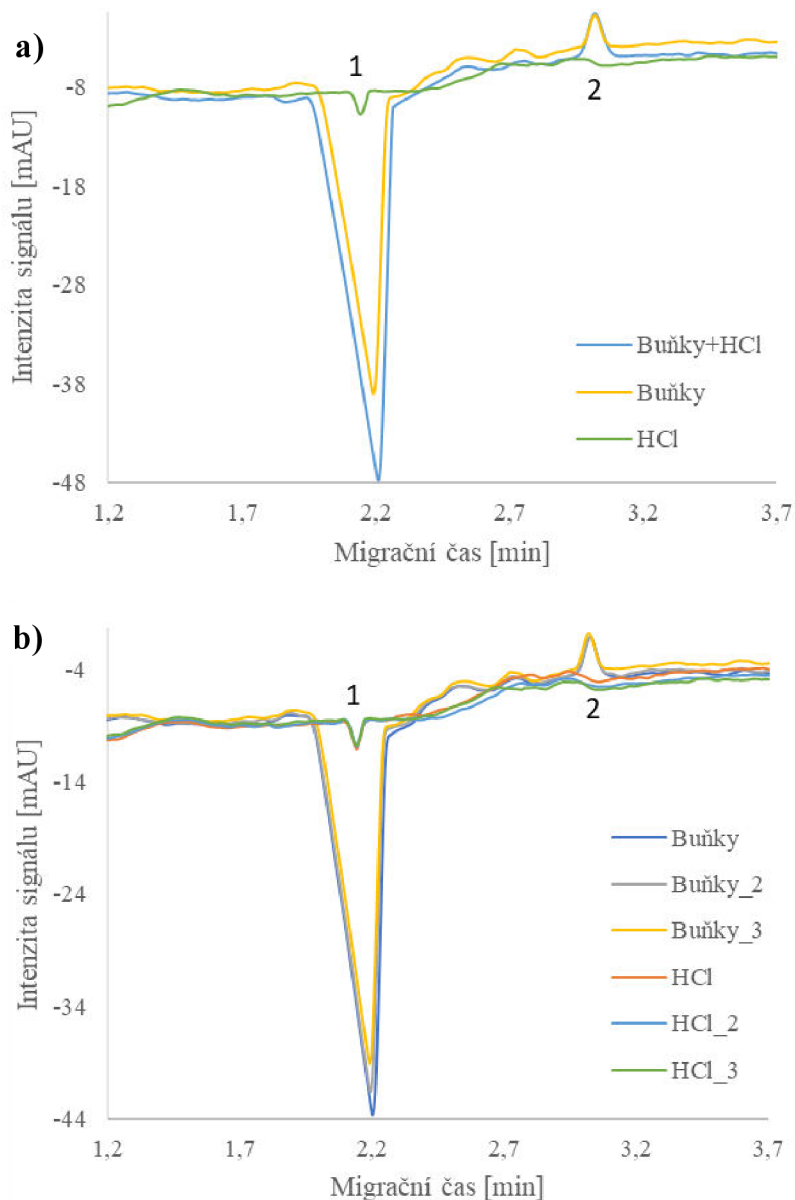
Konfokální fluorescenční mikroskop umožňuje buněčné zobrazování s vysokou účinností a přesností pro usnadnění klinického screeningu a diagnostiky. Na obrázku 17 jsou mikroskopicky zobrazené živé HeLa buňky s detaily buněčné struktury značeny pomocí zeleného barviva Invitrogen Tubulin Tracker Green.



Obrázek 17 Mikroskopické snímky lidských buněk cervikálního adenokarcinomu tzv. HeLa buněk (zvětšení 200x)

4.4.1 Stanovení chloridů v buněčném lyzátu HeLa buněk připravených pomocí 5% HNO₃

Analýzou HeLa buněk připravených pomocí 5% HNO₃ bylo zjištěno, že tato příprava není vhodná. Nepodařilo se detekovat signál buněk, ale složky součástí přípravy (obrázek 18a). Reprodukovatelnost optimalizovaného postupu je znázorněna na obrázek 18b.



Obrázek 18 Detekce chloridu v buněčném lyzátu HeLa buněk připravených pomocí 5% HNO₃, identifikace píku 1 = chlorid, 2 = signál buněk, a) Separace buněk, 3 mM HCl a roztoku buněk + HCl b) Stanovení reprodukovatelnosti

Z kalibračních křivek NaCl a HCl byla vypočtena koncentrace Cl⁻ v buňkách. Koncentrace podle kalibrační křivky NaCl je 76 mM, podle křivky HCl je 107 mM. Což odpovídá hodnotám uvedeným v kapitole 2.1.2. Rozdílné hodnoty zjištěné pomocí obou kalibračních křivek jsou dány použitím výšek píků namísto jejich ploch. Je potřeba tedy zdůraznit potřebu správného postupu při vyhodnocování signálů a kvantifikaci vzorků.

a) *Lineární regrese NaCl*

$$y = 0,398x + 0,9003$$

$$x = \frac{31,2 - 0,9003}{0,398} = 76 \text{ mM}$$

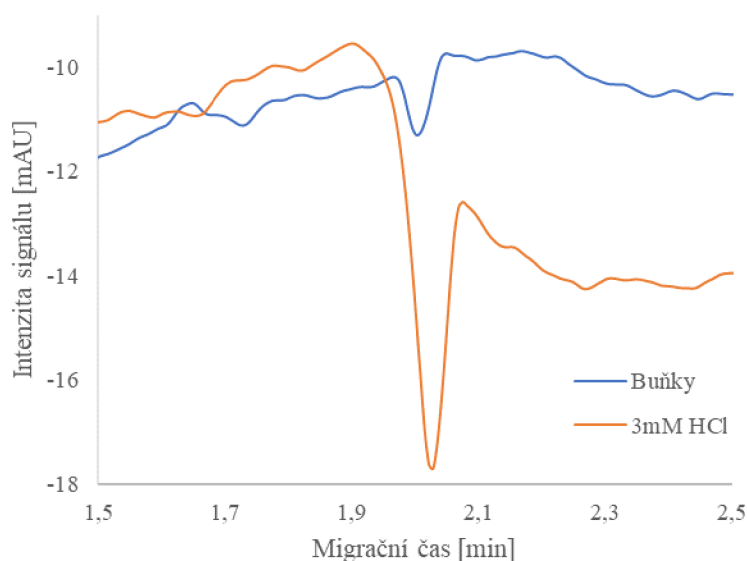
b) *Lineární regrese HCl*

$$y = 0,2941x - 0,2703$$

$$x = \frac{31,2 + 0,2703}{0,2941} = 107 \text{ mM}$$

4.4.1 Stanovení chloridů v buněčném lyzátu HeLa buněk připravených tekutým dusíkem

Analýzou HeLa buněk připravených tekutým dusíkem byl detekovat chloridový iont ve 2. minutě. Přítomnost chloridů byla potvrzena analýzou 3 mM HCl (obrázek 19). Příprava tekutým dusíkem se prokázala jako vhodná volba, protože se do systému nezakomponují další potenciálně rušivé složky.



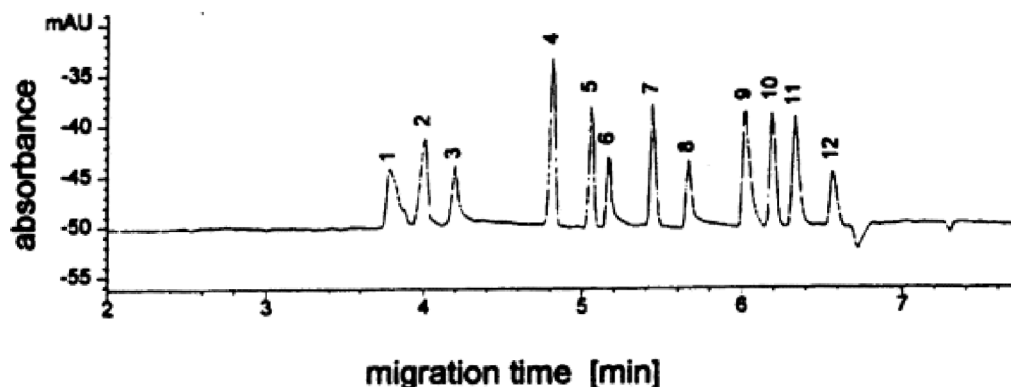
Obrázek 19 Detekce chloridu v buněčném lyzátu HeLa buněk připravených tekutým dusíkem a ověření detekce pomocí 3 mM HCl

4.5 Porovnání se současnými postupy

- a) Článek *Determination of Inorganic Anions, Carboxylic Acids and Amino Acids in Plant Matrices by Capillary Zone Electrophoresis* se zabývá fyziologickým výzkumem transportu rozpuštěných látek v rostlinách poskytující znalosti o distribuci rozpuštěných látek mezi různými tkáněmi. Metodou CE pomocí nepřímé UV detekce byli stanoveny anorganické anionty, aminokyseliny a karboxylové kyseliny ve vzorcích rostlin. V článku se prokázal salicylátový elektrolyt s komplexním činidlem (DoTaOH) vhodný pro nepřímou detekci poskytující vysoké rozlišení

anorganických aniontů s detekcí v nízkém mikromolárním rozsahu. Mobilita elektrolytu by měla být upravena tak, aby vyhovovala sloučeninám v nejnižší koncentraci. To je dáno salicylátem. Vyrovnávací paměť BGE je nezbytná pro reprodukovatelné a robustní separace. Jednou z běžných metod ukládání BGE do vyrovnávací paměti, když se pro analýzu aniontů používá nepřímá detekce, je použití TRIS. K separaci anorganických iontů proběhla úspěšně v elektrolytu 7,5 mM kyseliny salicylové, 15 mM TRIS a 0,5 mM DoTaOH, pH 8,3. Separace proběhla v křemenné kapiláře s délkou 62 cm, 55 cm k detektoru. Signál byl detekován při 232 nm [73].

- b) V článku *Indirect photometric detection of anions in capillary Electrophoresis* byly nepřímou metodou separované anorganické ionty (chlorid, citrát, fosfát). Byly porovnány migrační časy separovaných iontů stejného ko-iontu a vyrovnávací paměti BGE TRIS s daty v diplomové práci (obrázek 20). V obou případech byl chlorid detekován ve 3,7. minutě, citrát po 5. minutě a fosfát v 6,3. minutě [74].



Obrázek 20 Elektroferogram separovaných anorganických iontů stanovených CE s nepřímou detekcí. Identifikace píku 1 = chlorid, 6 = citrát, 11 = fosfát.

5 ZÁVĚR

Na základě odborných článků byla demonstrována CE jako vhodná technika pro stanovení velkého počtu rozpuštěných látek a metabolitů, jako jsou např. anorganické anionty v lidských buňkách. Její základní principy, včetně charakteristiky elektroforetické pohyblivosti iontů a elektroosmotického toku, jsou uvedeny v teoretické části této práce. Práce se dále zabývá teorií anorganických iontů, které jsou běžně zastoupeny v anorganických látkách a metodami jejich detekce.

Byla optimalizována metoda CE pro stanovení několika anorganických aniontů pomocí UV/Vis detektorů. V první řadě bylo stanoveno prostředí, ve kterém byly stanovované složky separované. V metodě CE s nepřímou UV/Vis detekcí měla koncentrace elektrolytu významný vliv na rozlišení, pořadí migrace a doby migrace aniontů. Anorganické sloučeniny neabsorbují záření, proto je nezbytná nepřímá detekce. Elektrolytické systémy pro nepřímou UV detekci byly založeny na kyselině salicylové jako sondy absorbující UV záření a DoTaOH jako modifikátoru elektroosmotického toku. Kyselina salicylová umožňuje detekci při 232 nm, kde vykazuje absorpční maximum. Nepřímá UV detekce s použitím kyseliny salicylové jako základního elektrolytu poskytuje dostatečnou citlivost. Pro reprodukovatelnost výsledků je součástí elektrolytu vyrovnávací paměť TRIS.

Citlivost měření je prokázána pomocí meze detekce (LOD) a meze stanovitelnosti (LOQ). Byly porovnány dvě délky křemenné kapiláry $t=1$ ($L_{tot} = 48,5$ cm, $L_{ef} = 40$ cm) a $t=2$ ($L_{tot} = 64$ cm, $L_{ef} = 55,5$ cm). V obou případech došlo k úspěšné separaci anorganických iontů. Účinnost separace v kapilárách různé délky byla vyjádřena počtem teoretických pater N a výškou teoretického patra H . Analýza s účinnější delší kapilárou s vyšším rozlišením píků byla použita k optimalizaci metody a ke stanovení iontů součástí lidského metabolismu. Migrační čas iontů byl porovnán s výsledným elektroferogramem z odborného článku. V obou případech byl chlorid detekován ve 3,7. minutě, citrát po 5. minutě a fosfát v 6,3. minutě.

Důsledkem nelinearity elektromigračních jevů vzniká elektromigrační disperze a způsobuje rozšiřování píku – trojúhelníkový tvar píku. To má za následek nepřesné vyhodnocování výsledků pomocí výšky píků. Je zapotřebí stanovit kvantitativní charakteristiky pomocí plochy píku, která bude reprezentativnější a přesnější.

Optimalizovanou metodou byl detekován chloridový iont v HeLa buňkách. K stanovení chloridů v lyzátech HeLa buněk byla použita rychlejší metoda s kratší kapilárou, která prokázala vysokou citlivost měření. Buňky byly připraveny dvěma způsoby: 1) tekutým dusíkem (-196 °C) a 2) pomocí 5% HNO_3 . Příprava tekutým dusíkem se prokázala jako vhodnější, protože se do systému nezakomponují další potenciálně rušivé složky.

6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] KREŽEL, Artur a Wolfgang MARET. The biological inorganic chemistry of zinc ions. *Archives of Biochemistry and Biophysics* [online]. 2016, **611**, 3-19 [cit. 2021-7-28]. ISSN 00039861. Dostupné z: doi:10.1016/j.abb.2016.04.010
- [2] ZHANG, Jieting, Yan WANG, Xiaohua JIANG a Hsiao Chang CHAN. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator—emerging regulator of cancer. *Cellular and Molecular Life Sciences* [online]. 2018, **75**(10), 1737-1756 [cit. 2021-7-28]. ISSN 1420-682X. Dostupné z: doi:10.1007/s00018-018-2755-6
- [3] RODRIGUEZ-TEJA, Mercedes, Claudia BREIT, Mitchell CLARKE, et al. How to Study Basement Membrane Stiffness as a Biophysical Trigger in Prostate Cancer and Other Age-related Pathologies or Metabolic Diseases. *Journal of Visualized Experiments* [online]. 2016, (115) [cit. 2021-7-28]. ISSN 1940-087X. Dostupné z: doi:10.3791/54230
- [4] DING, Jinmei, Lu ZHANG, Feng QU, Xiaomin REN, Xinying ZHAO a Qingsheng LIU. Cell activity analysis by capillary zone electrophoresis combined with specific cell staining. *ELECTROPHORESIS* [online]. 2011, **32**(3-4), 455-463 [cit. 2021-7-28]. ISSN 01730835. Dostupné z: doi:10.1002/elps.201000324
- [5] COOPER, Geoffrey M. *Cell: A Molecular Approach* [online]. 2nd ed. American Society Of Microbiology, 2000 [cit. 2021-02-22]. ISBN 10: 0-87893-106-6. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9879/>
- [6] RIKHVANOV, L.P., N.V. BARANOVSKAYA, M.A. DERIGLAZOVA a A.B. STRELNIKOVA. Mineralogical and Geochemical Characteristics of the Human Body Ash Residue. *Procedia Chemistry* [online]. 2014, **10**, 454-459 [cit. 2021-02-22]. ISSN 18766196. Dostupné z: doi:10.1016/j.proche.2014.10.076
- [7] PAVLÍČEK, Václav. *Funkce buněk a lidského těla: Anorganické látky v buňkách* [online]. [cit. 2021-02-22]. Dostupné z: <http://fb.lt.cz/skripta/i-struktura-bunky/anorganicke-latky-v-bunkach/>
- [8] PERIASAMY, Muthu, Jose Luis HERRERA a Felipe C. G. REIS. *Skeletal Muscle Thermogenesis and Its Role in Whole Body Energy Metabolism: Anorganické látky v buňkách* [online]. 2017, **41**(5) [cit. 2021-02-22]. ISSN 2233-6079. Dostupné z: doi:10.4093/dmj.2017.41.5.327
- [9] ZHANG, Yan, Junge ZHENG a Felipe C. G. REIS. Bioinformatics of Metalloproteins and Metalloproteomes: Anorganické látky v buňkách. *Molecules* [online]. 2020, **25**(15) [cit. 2021-02-22]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules25153366
- [10] MATUSIEWICZ, Henryk. Direct determination of normal physiological concentrations of major, minor and trace elements in undiluted microlitre volumes of human body fluids by discrete nebulization and atomic emission spectrometry with a nitrous oxide/acetylene flame. *Analytica Chimica Acta* [online]. 1988, **207**, 349-354 [cit. 2021-02-22]. ISSN 00032670. Dostupné z: doi:10.1016/S0003-2670(00)80813-2

- [11] BORTNER, Carl D. a John A. CIDLOWSKI. Ion channels and apoptosis in cancer. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* [online]. 2014, **369**(1638) [cit. 2021-02-22]. ISSN 0962-8436. Dostupné z: doi:10.1098/rstb.2013.0104
- [12] SESTOFT, L. Regulation of fructose metabolism in the perfused rat liver Interrelation with inorganic phosphate, glucose, ketone body and ethanol metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* [online]. 1974, **343**(1), 1-16 [cit. 2021-02-22]. ISSN 03044165. Dostupné z: doi:10.1016/0304-4165(74)90235-9
- [13] BUSCHOW, K. H. J., R. W. CAHN, Merton C. FLEMINGS, Bernard ILSCHNER, Edward J. KRAMER a Subhash MAHAJAN. *Encyklopedia of Materials: Science of Technology. Volume 5, J-Mag: Chloride Ion*. Amsterdam: Elsevier, 2001. ISBN 978-0-08-043152-9.
- [14] FUSTIK, Stojka, Nada POP-JORDANOVA, Nevenka SLAVESKA, Svetlana KOCEVA a Gorgi EFREMOV. Metabolic alkalosis with hypoelectrolytemia in infants with cystic fibrosis. *Pediatrics International* [online]. 2002, **44**(3), 289-292 [cit. 2021-02-22]. ISSN 1328-8067. Dostupné z: doi:10.1046/j.1442-200X.2002.01563.x
- [15] TROWERS, Eugene a Marc TISCHLER. Gastrointestinal Secretion: Aids in Digestion and Absorption. TROWERS, Eugene a Marc TISCHLER. *Gastrointestinal Physiology* [online]. Cham: Springer International Publishing, 2014, 2014-6-17, s. 53-80 [cit. 2021-02-22]. ISBN 978-3-319-07163-3. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-319-07164-0_4
- [16] HABELA, Christa W., Nola Jean ERNEST, Amanda F. SWINDALL a Harald SONTHEIMER. Chloride Accumulation Drives Volume Dynamics Underlying Cell Proliferation and Migration. *Journal of Neurophysiology* [online]. 2009, **101**(2), 750-757 [cit. 2021-03-11]. ISSN 0022-3077. Dostupné z: doi:10.1152/jn.90840.2008
- [17] WANG, Qingming, Hui SHENG, Lei JIN, Zhiheng ZHANG, Wenling WANG a Xinhui TANG. Nové fluorescenční chemosenzory založené na komplexu mononukleární mědi pro vysoce selektivní a citlivou detekci fosfátového aniontu ve vodném roztoku a živých buňkách. *Spectrochimica Acta Část A: Molekulární a biomolekulární spektroskopie* [online]. 2019, **207**, 96-104 [cit. 2021-02-22]. ISSN 13861425. Dostupné z: doi: 10.1016 / j.saa.2018.09.008
- [18] MALNIC, Gerhard, Shigeaki MUTO a Gerhard GIEBISCH. Regulation of Potassium Excretion. *Seldin and Giebisch's The Kidney: Sodium Ion* [online]. Elsevier, 2008, 2008, s. 1301-1347 [cit. 2021-02-22]. ISBN 9780120884889. Dostupné z: doi:10.1016/B978-012088488-9.50050-4
- [19] Potassium ion. *National Library of Medicine* [online]. [cit. 2021-02-22]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Potassium-ion>
- [20] SUELTER, Clarence H. Role of Potassium in Enzyme Catalysis. MUNSON, Robert D., ed. *Potassium in Agriculture* [online]. Madison, WI, USA: American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America,

- 1985, 2015-11-02, s. 337-349 [cit. 2021-02-22]. ASA, CSSA, and SSSA Books. ISBN 9780891182474. Dostupné z: doi:10.2134/1985.potassium.c13
- [21] KOVACS, Christopher S. *Calcium and Phosphate Metabolism and Related Disorders During Pregnancy and Lactation* [online]. **2018** [cit. 2021-02-22]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279173/>
- [22] SISSI, C. a M. PALUMBO. Effects of magnesium and related divalent metal ions in topoisomerase structure and function. *Nucleic Acids Research* [online]. 2009, **37**(3), 702-711 [cit. 2021-02-22]. ISSN 0305-1048. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gkp024
- [23] MISULIS, Karl E. *Essentials of Clinical Neurophysiology*. New Ed edition. Butterworth-Heinemann, 1995, 306 s. ISBN 978-0750696579.
- [24] SHEPPARD, DAVID N. a MICHAEL J. WELSH. Structure and Function of the CFTR Chloride Channel. *Physiological Reviews* [online]. 1999, **79**(1), S23-S45 [cit. 2021-02-22]. ISSN 0031-9333. Dostupné z: doi:10.1152/physrev.1999.79.1.S23
- [25] SUH, Kwang a Stuart YUSPA. Intracellular Chloride Channels: Critical Mediators of Cell Viability and Potential Targets for Cancer Therapy. *Current Pharmaceutical Design* [online]. 2005, **11**(21), 2753-2764 [cit. 2021-03-11]. ISSN 13816128. Dostupné z: doi:10.2174/1381612054546806
- [26] MCKONE, Edward F., Priscilla VELENTGAS, Anna J. SWENSON a Christopher H. GOSS. Association of sweat chloride concentration at time of diagnosis and CFTR genotype with mortality and cystic fibrosis phenotype. *Journal of Cystic Fibrosis* [online]. 2015, **14**(5), 580-586 [cit. 2021-7-25]. ISSN 15691993. Dostupné z: doi:10.1016/j.jcf.2015.01.005
- [27] MAO, Jianwen, Lixin CHEN, Bin XU, et al. Volume-activated chloride channels contribute to cell-cycle-dependent regulation of HeLa cell migration. *Biochemical Pharmacology* [online]. 2009, **77**(2), 159-168 [cit. 2021-03-11]. ISSN 00062952. Dostupné z: doi:10.1016/j.bcp.2008.10.009
- [28] Higher Sweat Chloride Levels in Patients with Asthma: A Case-Control Study. *The Indian Journal of Pediatrics* [online]. 2014 [cit. 2021-7-25].
- [29] LIN, Jiake, Xiaoyu WANG a Ruikang TANG. Regulations of organism by materials: a new understanding of biological inorganic chemistry. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry* [online]. 2019, **24**(4), 467-481 [cit. 2021-02-22]. ISSN 0949-8257. Dostupné z: doi:10.1007/s00775-019-01673-2
- [30] HUANG, Z., M.A. RICHARDS, Y. ZHA, R. FRANCIS, R. LOZANO a J. RUAN. Determination of inorganic pharmaceutical counterions using hydrophilic interaction chromatography coupled with a Corona® CAD detector. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 2009, **50**(5), 809-814 [cit. 2021-02-22]. ISSN 07317085. Dostupné z: doi:10.1016/j.jpba.2009.06.039
- [31] DE PAIVA, Esther Lima, Marcelo Antônio MORGANO a Adriana Pavesi ARISSETO-BRAGOTTO. Occurrence and determination of inorganic contaminants in baby food and infant formula. *Current Opinion in Food Science* [online].

- 2019, **30**, 60-66 [cit. 2021-02-22]. ISSN 22147993. Dostupné z: doi:10.1016/j.cofs.2019.05.006
- [32] NAGAJYOTI, P. C., K. D. LEE a T. V. M. SREEKANTH. Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. *Environmental Chemistry Letters* [online]. 2010, **8**(3), 199-216 [cit. 2021-02-22]. ISSN 1610-3653. Dostupné z: doi:10.1007/s10311-010-0297-8
- [33] AAS, Wenche, Min SHAO, Lei JIN, et al. Air concentrations and wet deposition of major inorganic ions at five non-urban sites in China, 2001–2003. *Atmospheric Environment* [online]. 2007, **41**(8), 1706-1716 [cit. 2021-02-22]. ISSN 13522310. Dostupné z: doi:10.1016/j.atmosenv.2006.10.030
- [34] ZAKOWSKI, K., M. NAROZNY, M. SZOCINSKI a K. DAROWICKI. Influence of water salinity on corrosion risk—the case of the southern Baltic Sea coast. *Environmental Monitoring and Assessment* [online]. 2014, **186**(8), 4871-4879 [cit. 2021-02-22]. ISSN 0167-6369. Dostupné z: doi:10.1007/s10661-014-3744-3
- [35] MENG, H, T WANG, B GUO, Y HASHI, C GUO a J LIN. Simultaneous determination of inorganic anions and cations in explosive residues by ion chromatography. *Talanta* [online]. 2008, **76**(2), 241-245 [cit. 2021-02-22]. ISSN 00399140. Dostupné z: doi:10.1016/j.talanta.2008.01.054
- [36] HADDAD, Paul R, Philip DOBLE a Miroslav MACKA. Developments in sample preparation and separation techniques for the determination of inorganic ions by ion chromatography and capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A* [online]. 1999, **856**(1-2), 145-177 [cit. 2021-02-22]. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/S0021-9673(99)00431-8
- [37] CLARK, J. *ELECTRONIC STRUCTURES OF IONS* [online]. 2000 [cit. 2021-02-22]. Dostupné z: <https://www.chemguide.co.uk/atoms/properties/ionstruct.html>
- [38] FOGARTY, Richard M., Rebecca ROWE, Richard P. MATTHEWS, et al. Atomic charges of sulfur in ionic liquids: experiments and calculations. *Faraday Discussions* [online]. 2018, **206**, 183-201 [cit. 2021-02-22]. ISSN 1359-6640. Dostupné z: doi:10.1039/C7FD00155J
- [39] *Characteristics of Ionic Compounds* [online]. 2020 [cit. 2021-02-22]. Dostupné z: [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Introductory_Chemistry/Book%3A_The_Basics_of_GOB_Chemistry_\(Ball_et_al.\)/03%3A_Ionic_Bonding_and_Simple_Ionic_Compounds/3.06%3A__Characteristics_of_Ionic_Compounds](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Introductory_Chemistry/Book%3A_The_Basics_of_GOB_Chemistry_(Ball_et_al.)/03%3A_Ionic_Bonding_and_Simple_Ionic_Compounds/3.06%3A__Characteristics_of_Ionic_Compounds)
- [40] DÍEZ, L. Polo, J. Hernández MÉNDEZ a J. A. Rodríguez GONZÁLEZ. Analytical applications of emulsions in atomic-absorption spectrophotometry: determination of zinc in undecenoate ointments using aqueous inorganic standards. *The Analyst* [online]. 1981, **106**(1264), 737-742 [cit. 2021-02-22]. ISSN 0003-2654. Dostupné z: doi:10.1039/AN9810600737
- [41] FERNÁNDEZ, Zahily Herrero, Lino Angel VALCÁRCEL ROJAS, Alfredo Montero ÁLVAREZ, et al. Application of Cold Vapor-Atomic Absorption (CVAAS) Spectrophotometry and Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometry

- methods for cadmium, mercury and lead analyses of fish samples. Validation of the method of CVAAS. *Food Control* [online]. 2015, **48**, 37-42 [cit. 2021-02-22]. ISSN 09567135. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodcont.2014.05.056
- [42] HUANG, Li, Die YANG, Xiangquan GUO a Zuliang CHEN. Speciation analysis of inorganic tin by on-column complexation ion chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometry and electrospray mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* [online]. 2014, **1368**, 217-221 [cit. 2021-02-22]. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2014.09.086
- [43] HARWOOD, John J. a Su WEN. Analysis of organic and inorganic selenium anions by ion chromatography-inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy. *Journal of Chromatography A* [online]. 1997, **788**(1-2), 105-111 [cit. 2021-02-22]. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/S0021-9673(97)00706-1
- [44] HOLNESS, N J a G ATFIELD. Application of a spectrophotometric method to the determination of the composition of oligonucleotides obtained from cysteine transfer ribonucleic acid. *Biochemical Journal* [online]. 1976, **159**(1), 15-22 [cit. 2021-02-22]. ISSN 0264-6021. Dostupné z: doi:10.1042/bj1590015
- [45] WANG, Liang, Ying CHENG, Dane LAMB, Mallavarapu MEGHARAJ a Ravendra NAIDU. Application of Ion Selective Electrode array to simultaneously determinate multi-free ions in solution. *Environmental Technology & Innovation* [online]. 2019, **15** [cit. 2021-02-22]. ISSN 23521864. Dostupné z: doi:10.1016/j.eti.2019.100424
- [46] Klouda, pavel. *Moderní analytické metody*. Třetí, upravené vydání. Ostrava: pavel klouda - nakladatelství pavko, 2016. Isbn 978-80-86369-22-8.
- [47] HADDAD, Paul R, Philip DOBLE a Miroslav MACKA. Developments in sample preparation and separation techniques for the determination of inorganic ions by ion chromatography and capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A* [online]. 1999, **856**(1-2), 145-177 [cit. 2021-02-22]. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/S0021-9673(99)00431-8
- [48] PETERSEN, John R. a Amin A. MOHAMMAD. *Clinical and forensic applications of capillary electrophoresis*. Totowa, N.J.: Humana Press, 2001. ISBN 0896036456.
- [49] Sang, fuming, xiangyi huang a jicun ren. Characterization and separation of semiconductor quantum dots and their conjugates by capillary electrophoresis. *Electrophoresis* [online]. 2014, **35**(6), 793-803 [cit. 2021-02-22]. Doi: 10.1002/elps.201300528. Issn 01730835. Dostupné z: http://doi.wiley.com/10.1002/elps.201300528
- [50] Lauer, h. H.; rozing, g. P. *High performance capillary electrophoresis*. Germany : agilent technologies, 2010. 174 s. 5990-3777en
- [51] Tagliaro, f., et al., a brief introduction to capillary electrophoresis. *Forensic science international*, 1998. **92**(2-3): p. 75-88.
- [52] Wuethrich, alain a joselito p. Quirino. Derivatisation for separation and detection in capillary electrophoresis (2012-2015). *Electrophoresis* [online]. 2016, **37**(1), 45-55

- [cit. 2021-02-22]. Doi: 10.1002/elps.201500290. Issn 01730835. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/elps.201500290>
- [53] Kašička, václav. Teoretické základy a separační principy kapilárních elektromigračních metod. In chemické listy, 1997, roč. 91, č. 5, s. 321 – 325. Issn 0009-2770.
- [54] *Chemistry LibreTexts: Capillary Electrophoresis* [online]. 2020 [cit. 2021-7-26]. Dostupné z: https://chem.libretexts.org/Courses/University_of_California_Davis/UCD_Chem_115_Lab_Manual/Lab_6%3A_Capillary_Electrophoresis
- [55] Bočekxs, petr. Capillary electrophoresis: theory and practice. Paul d. Grossman and joel c. Colburn (eds.) Academic press, inc., san diego, california, usa, 1992, 352 pp., price us \$ 69.95, isbn 0-12-304250-x. Electrophoresis[online]. 1993, 14(1), 559-559 [cit. 2021-02-22]. Doi: 10.1002/elps.1150140185. Issn 0173-0835. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/elps.1150140185>
- [56] Camilleri, patrick. Capillary electrophoresis: theory and practice. Crc press, 1997. 576 p. Isbn 9780849391279.
- [57] ALI, Imran, Omar M. L. ALHARBI a Mohd. MARSIN SANAGI. Nano-capillary electrophoresis for environmental analysis. *Environmental Chemistry Letters* [online]. 2016, 14(1), 79-98 [cit. 2021-02-22]. ISSN 1610-3653. Dostupné z: doi:10.1007/s10311-015-0547-x
- [58] SIEGEL, Jay a Pekka SAUKKO. *Encyclopedia of Forensic Sciences*. 2nd Edition. 2013, 2250 s. ISBN 9780123821652.
- [59] De jong, gerhardus, ed. Capillary electrophoresis-mass spectrometry (ce-ms): principles and applications [online]. Weinheim, germany: wiley-vch verlag gmbh & co., 2016 [cit. 2021-02-22]. Doi: 10.1002/9783527693801. Isbn 9783527339242.
- [60] *HPST: Agilent 7100 Capillary Electrophoresis System* [online]. [cit. 2021-7-23]. Dostupné z: <https://hpst.cz/analyticka-chemie/kapilarni-elektroforeza/agilent-7100-capillary-electrophoresis-system>
- [61] De kort, bregje j., gerhardus j. De jong a govert w. Somsen. Native fluorescence detection of biomolecular and pharmaceutical compounds in capillary electrophoresis: detector designs, performance and applications. *Analytica chimica acta* [online]. 2013, 766, 13-33 [cit. 2021-02-22]. Doi: 10.1016/j.aca.2012.12.006. Issn 00032670. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003267012017710>
- [62] Xiao, dan, lei yan, hongyan yuan, shulin zhao, xiupei yang a martin m. F. Choi. Ce with led-based detection: an update. *Electrophoresis* [online]. 2009, 30(1), 189-202 [cit. 2021-02-22]. Doi: 10.1002/elps.200800415. Issn 01730835. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/elps.200800415>
- [63] Smith, richard d., jose a. Olivares, nhung t. Nguyen a harold r. Udseth. Capillary zone electrophoresis-mass spectrometry using an electrospray ionization interface. *Analytical chemistry* [online]. 2002, 60(5), 436-441 [cit. 2021-02-22]. Doi:

10.1021/ac00156a013. Issn 0003-2700. Dostupné z:
<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac00156a013>

- [64] ZEMANN, Andreas J. Conductivity detection in capillary electrophoresis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2001, **20**(6-7), 346-354 [cit. 2021-02-22]. ISSN 01659936. Dostupné z: doi:10.1016/S0165-9936(01)00076-0
- [65] Whatley, Harry. Basic principles and modes of capillary electrophoresis. Petersen, John R. A. Amin A. Mohammad, ed. *Clinical and forensic applications of capillary electrophoresis* [online]. Totowa, NJ: Humana Press, 2001, 2001, s. 21-58 [cit. 2021-02-22]. Doi: 10.1007/978-1-59259-120-6_2. Isbn 978-1-61737-113-4. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/978-1-59259-120-6_2
- [66] FUKUSHI, Keiichi, Sahori TAKEDA, Kenji CHAYAMA a Shin-Ichi WAKIDA. Application of capillary electrophoresis to the analysis of inorganic ions in environmental samples. *Journal of Chromatography A* [online]. 1999, **834**(1-2), 349-362 [cit. 2021-02-22]. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/S0021-9673(98)01007-3
- [67] SHINTANI, Hideharu a J. POLONSKÝ, ed. *Handbook of Capillary Electrophoresis Applications* [online]. Dordrecht: Springer Netherlands, 1996 [cit. 2021-02-22]. ISBN 978-94-010-7197-0. Dostupné z: doi:10.1007/978-94-009-1561-9
- [68] BOUMYA, W., F. LAGHRIB, S. LAHRICH, A. FARAH, M. ACHAK, M. BAKASSE a M.A. EL MHAMMEDI. Electrochemical behavior study of salicylic acid following azo dye formation with 2,4-dinitrophenylhydrazine: Analytical evaluation. *South African Journal of Chemical Engineering* [online]. 2018, **25**, 48-53 [cit. 2021-7-27]. ISSN 10269185. Dostupné z: doi:10.1016/j.sajce.2018.01.002
- [69] DAVID A ARMBRUSTER a TERRY PRY. US National Library of Medicine National Institutes of Health Search database: Limit of Blank, Limit of Detection and Limit of Quantitation [online]. 2008 [cit. 2021-7-6]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2556583/>
- [70] *Fire Debris Analysis* [online]. Elsevier, 2008 [cit. 2021-7-12]. ISBN 9780126639711. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-663971-1.X5001-5
- [71] LOMASNEY, Anna R., Christelle GUILLO, Ashley M. SIDEBOTTOM a Michael G. ROPER. Optimization of capillary electrophoresis conditions for a glucagon competitive immunoassay using response surface methodology. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2009, **394**(1), 313-319 [cit. 2021-7-1]. ISSN 1618-2642. Dostupné z: doi:10.1007/s00216-009-2622-2
- [72] BECKERS, Jozef L. a Petr BOČEK. The preparation of background electrolytes in capillary zone electrophoresis: Golden rules and pitfalls. *ELECTROPHORESIS* [online]. **24**(3), 518-535 [cit. 2021-7-1]. ISSN 01730835. Dostupné z: doi:10.1002/elps.2003900
- [73] A. BAZZANELLA,, H. LOCHMANN, A. MAINKA a K. BÄCHMANN. Determination of inorganic anions, carboxylic acids and amino acids in plant matrices by capillary zone electrophoresis. **1997**, 59-62.

- [74] DOBLE, Philip a Paul R. HADDAD. Indirect photometric detection of anions in capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A* [online]. 1999, **834**(1-2), 189-212 [cit. 2021-7-28]. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/S0021-9673(98)00787-0

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

AAS	Atomová absorpční spektrofotometrie
AES	Plamenová emisní spektrofotometrie
BGE	Základní elektrolyt
CE	Kapilární elektroforéza
CF	Cystická fibróza
CFTR	Cystický fibrózní transmembránový regulátor vodivosti
CZE	Kapilární zónové elektroforézy
DoTaOH	Dodecyltrimethylamoniumhydroxid
EMD	Elektromigrační disperze
EOF	Elektroosmotický tok
EP	Elektroforetický tok
HVL	Haarhoff-van der Linde
ICP-AES	Atomová emisní spektroskopie s indukčně vázaným plazmatem
ICP-MS	Hmotnostní spektrometrie indukčně vázaného plazmatu
ISE	Iontově selektivních elektrody
LIF	Laserem indukovaná fluorescence
LOB	Limit slepého vzorku
LOD	Limit detekce
LOQ	Limit kvantifikace
MS	Hmotnostní spektrometr
SA	Kyselina salicylová
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminometan
UV	Ultrafialové
Vis	Viditelné

8 SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Schéma znázorňující tvorbu sodného iontu	16
Obrázek 2 a) Elektroforéza bez přítomnosti elektrického pole – pohyb iontů je náhodný, b) Elektroforéza po vložení stejnosměrného elektrického pole – spořádaný pohyb iontů	20
Obrázek 3 Schéma separace iontů v křemenné kapiláře na základě odlišné migrační rychlosti založené na velikosti molekuly a náboji. Skupiny SiOH jsou ionizované a vytvářejí elektroosmotický tok uvnitř kapiláry	21
Obrázek 4 Vizuální vysvětlení obecného pořadí eluce v CE. Každý druh iontu má stejný elektroosmotický tok. Kationty se eluují jako první, protože mají kladnou elektroforetickou rychlost. Anionty se eluují jako poslední, protože jejich záporná elektroforetická rychlost částečně kompenzuje rychlost elektroosmotického toku. Neutrální molekuly/atomy se eluují rychlostí elektroosmotického toku [54].	21
Obrázek 5 Schéma instrumentace kapilární elektroforézy [56]	22
Obrázek 6 a) Schéma CE Agilent Technologies [60] b) Schéma UV/Vis spektrofotometru ..	24
Obrázek 7 Absorpční spektrum a chemický vzorec kyseliny salicylové	29
Obrázek 8 Graf elektroferogramu zobrazující mez detekce (LOD) – kdy lze prohlásit, že látka je přítomná, mez kvantifikace (LOQ) – kdy lze změřit obsah látky	30
Obrázek 9 Parametry potřebné k stanovení počtu teoretických pater N [70]	31
Obrázek 10 Schéma procesů elektrodisperze	32
Obrázek 11 a) Elektroforetická analýza roztoků NaCl a detekce Cl ⁻ za podmínek t=1 (L _{tot} = 48,5 cm, L _{ef} = 40 cm); b) Kalibrační křivka NaCl s lineární regresí a koeficientem determinace R ²	33
Obrázek 12 Stanovení meze detekce chloridu pomocí CE za podmínek t=1	34
Obrázek 13 a) Detekce chloridu v HCl pomocí CE za podmínek t=1 (L _{tot} = 48,5 cm, L _{ef} = 40 cm); b) Kalibrační křivka HCl s lineární regresí a koeficientem determinace R ²	35
Obrázek 14 a) Detekce chloridu v NaCl pomocí CE za podmínek t=2, b) Kalibrační křivka NaCl s lineární regresí a koeficientem determinace R ²	37
Obrázek 15 Separace anorganických iontů v elektrolytu pomocí CE (podmínky separace t=2). Identifikace píku 1 = chlorid, 2 = citrát, 3 = fosfát.	38
Obrázek 16 Detekce chloridu a) 15 mM NaCl, podmínky t=1 (L _{tot} = 48,5 cm, L _{ef} = 40 cm), b) 4,8 mM NaCl, podmínky t=2 (L _{tot} = 64 cm, L _{ef} = 55,5 cm).....	39
Obrázek 17 Mikroskopické snímky lidských buněk cervikálního adenokarcinomu tzv. HeLa buněk (zvětšení 200x).....	40
Obrázek 18 Detekce chloridu v buněčném lyzátu HeLa buněk připravených pomocí 5% HNO ₃ , identifikace píku 1 = chlorid, 2 = signál buněk, a) Separace buněk, 3 mM HCl a roztoku buněk + HCl b) Stanovení reprodukovatelnosti	41
Obrázek 19 Detekce chloridu v buněčném lyzátu HeLa buněk připravených tekutým dusíkem a ověření detekce pomocí 3 mM HCl	42
Obrázek 20 Elektroferogram separovaných anorganických iontů stanovených CE s nepřímou detekcí. Identifikace píku 1 = chlorid, 6 = citrát, 11 = fosfát.	43

9 SEZNAM POUŽITÝCH TABULEK

Tabulka 1 Obsah [g] hlavních makrobiogenních a kovových prvků v lidském těle (průměrný zdravý muž o hmotnosti 70 kg) [7]	11
Tabulka 2 Koncentrace [mM] hlavních iontů v živých buňkách a krevní plazmě [7]	12
Tabulka 3 Srovnání kation vs. anion [39]	17
Tabulka 4 Charakteristiky anorganických prvků pomocí UV/Vis spektrofotometrického stanovení [44]	18
Tabulka 5 Srovnání detekčních metod [58]	23
Tabulka 6 Seznam použitých materiálů potřebných k optimalizaci pracovního postupu	26
Tabulka 7 Seznam použitého přístrojového zařízení včetně uvedeného výrobce	27
Tabulka 8 Podmínky separace	27
Tabulka 9 Podmínky separace $t=1$ a $t=2$ na základě odlišné délky kapiláry	28
Tabulka 10 Koncentrace anorganických sloučenin	28
Tabulka 11 Porovnání vypočtených hodnot LOD, LOQ u NaCl a HCl	36