

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

Přenositelné a miniaturizované separační techniky využitelné
pro potravinářské a biotechnologické analýz

*Autoreferát doktorské disertační práce k získání vědecké hodnosti
„Doktor“ ve zkratce PH.D.*

Brno 2016

Ing. Miloš Dvořák

Doktorská práce byla sepsána v rámci doktorského studijního programu na Vysokém učení technickém v Brně, na ústavu Chemie potravin a biotechnologií.

Uchazeč: Ing. Miloš Dvořák
Ústav chemie potravin a biotechnologií
FCH VUT Brno

Školitel: doc. Ing. Bohuslav Rittich, Ph.D.
Školitel specialista: RNDr. Milena Vespalcová, PhD.
Ústav chemie potravin a biotechnologií
FCH VUT Brno

Oponenti:

Abstrakt

K analýze biologicky aktivních látek v přírodních materiálech se používá řada separačních metod. K separaci nabitých částic byla s úspěchem použita kapilární elektroforéza. Uvedená technika byla v této práci použita při stanovení 6 frakcí kaseinů, ve 144 vzorcích, pocházejících z pokusu vlivu výživy na produkci kaseinů. Poprvé byly separovány tyto frakce s úplným rozlišením všech frakcí. Kapilární elektroforéza byla aplikována také při stanovení krátkořetězcových organických kyselin v průběhu kvašení vinného moštu, pro určení profilu změn těchto kyselin a porovnání vlivu rozdílných kvasinek na zastoupení těchto kyselin v moštech. Analýzy neprokázaly rozdíl ve změně organických kyselin, pouze rychlost odbourání kyseliny jablečné se lišila. Byl vyvinut přenosný miniaturizovaný systém pro kapalinovou chromatografii. Byly testovány jednotlivé komponenty a systém byl použit při izokratické i gradientové eluci různých analytů (potravinová barviva, parabeny). Byly charakterizovány nové řady elektroluminiscenčních diod (LED), založené na odlišném materiálovém substrátu a porovnávány se starší řadou diod. Byly charakterizovány detekční systémy s použitím těchto zdrojů a jejich použití demonstrováno při detekci analytů v průtokové vstříkovací analýze a chromatografické separaci. Poprvé tak byly charakterizovány tyto zdroje a byl osvětlen původ parazitního emisního pásu vyskytující se u LED zdrojů v oblasti kolem 255 nm. Tento původ byl dán poruchami materiálového substrátu. Předložená práce přináší poznatky týkající se levných, přenositelných systémů a detekčních zařízení z oblasti analytické chemie.

Klíčová slova

Separace, kapilární zónová elektroforéza, kaseiny, organické kyseliny, přenosné a miniaturizované systémy, kapalinová chromatografie, elektroluminiscenční diody (LED), charakterizace přenositelných a detekčních systémů

Obsah

OBSAH	5
1 ÚVOD	6
2 PŘEHLED ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	7
2.1 VYUŽITÍ KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZY PRO ANALÝZU KASEINOVÝCH FRAKČÍ	7
2.2 VYUŽITÍ KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZY V PROCESU FERMENTACE VINNÉHO MOŠTU.....	9
2.3 PŘENOSNÝ MODULÁRNÍ MIKROFLUIDICKÝ PRŮTOKOVÝ SYSTÉM	10
2.4 ELEKTROLUMINISCENČNÍ ZDROJE HLUBOKÉ UV EMISE PRO FOTOMETRICKOU DETEKCI	11
3 CÍLE PRÁCE	13
3.1 VYUŽITÍ KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZY PŘI ANALÝZE KASEINOVÝCH FRAKČÍ A V PROCESU FERMENTACE VINNÉHO MOŠTU	13
3.2 PŘENOSNÝ MODULÁRNÍ MIKROFLUIDICKÝ PRŮTOKOVÝ SYSTÉM	13
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	14
4.1 VYUŽITÍ KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZY PRO ANALÝZU KASEINŮ	14
4.2 VYUŽITÍ KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZY V PROCESU FERMENTACE VINNÉHO MOŠTU.....	14
4.3 PŘENOSNÝ MODULÁRNÍ MIKROFLUIDICKÝ PRŮTOKOVÝ SYSTÉM	15
4.4 ELEKTROLUMINISCENČNÍ ZDROJE (LED) HLUBOKÉ UV EMISE PRO FOTOMETRICKOU DETEKCI NA PŘENOSNÝCH SYSTÉMECH	15
5 VÝSLEDKY A DISKUSE	17
5.1 VYUŽITÍ KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZY PŘI ANALÝZE KASEINOVÝCH FRAKČÍ.....	17
5.2 VYUŽITÍ KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZY V PROCESU FERMENTACE VINNÉHO MOŠTU.....	18
5.3 PŘENOSNÝ MODULÁRNÍ MIKROFLUIDICKÝ PRŮTOKOVÝ SYSTÉM	19
5.4 ELEKTROLUMINISCENČNÍ ZDROJE HLUBOKÉ UV EMISE PRO FOTOMETRICKOU DETEKCI.....	23
6 ZÁVĚREČNÉ SHRNUTÍ A BUDOUCÍ VÝZKUMNÉ SMĚRY	29
7 SEZNAM CITOVANÝCH LITERÁRNÍCH PRAMENŮ	31
8 BIBLIOGRAFIE	31
9 PUBLIKAČNÍ AKTIVITA AUTORA	44

1 ÚVOD

Přenositelnost, zmenšování rozměrů zařízení a minimalizace spotřeby chemikálií a vzorků je jedním z významných směrů analytické chemie. S rozvojem tohoto směru je čím dál více umožňován přesun analytické instrumentace z laboratoří přímo do místa odběru vzorků a v ideálním případě je instrumentace začleněna přímo do kroku (bio)technologické výroby. Žádoucí je i automatizace vzorkování a propojení „on-line“ analýz v reálném čase, bez nutnosti transportovat vzorek do laboratoří. Limitující je často komerční (ne)dostupnost jednotlivých komponent. V případě jejich nedostupnosti sice je možné je sestrojovat v laboratorních podmínkách, ale je to prakticky neopakovatelné dalšími osobami a vše je vázáno na zručnost a znalosti často i jednoho výzkumníka. Proto je cesta hledání možností miniaturizace a přenositelných částí a jejich kombinace stále cestou, tak jak jde vývoj, aktuální i pro vědecké pole. Jednou z nejjednodušších separačních technik, která je nejdále v oblasti miniaturizace se stala kapilární elektroforéza. Ta vyniká instrumentální jednoduchostí a nenáročností na spotřebu vzorků a chemikálií. Proto ji i v případě užití komerční stolní instrumentace lze řadit mezi nízkonákladové techniky.

Kapilární elektroforéza se používá v potravinářském a biotechnologickém odvětví s cílem v budoucnu tuto techniku začleňovat přímo do provozu. Nachází uplatnění např. při stanovení kaseinů, které jsou významnou složkou mlékárenského a sýrařského průmyslu, při sledování procesu fermentace vinného moštu, zrání vína, a složení výsledného produktu.

2 PŘEHLED ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Využití kapilární elektroforézy pro analýzu kaseinových frakcí

Mléko je sekreční produkt mléčných žláz savců sloužící jako základní zdroj výživy mláďat. Jedná se o homogenní, polydisperzní kapalinu, jejíž složení a vlastnosti jsou značně proměnné v závislosti na původu mléka. Výrazně závisí na odlišnosti jedinců, regionalitě jejich výskytu, ročním období a podmínkách skladování mléka [1]. V dalším textu, pokud nebude uvedeno jinak, bude vše vztaženo ke kravskému mléku. To obsahuje v průměru 4 % tuku, 3,2 % bílkovin – z nich 2,6 % kaseinových a 0,6 % sérových, neboli syrovátkových, 4,6 % laktózy, a 0,7 % popelovin. Zbytek tvoří z asi 87 % voda. Převažující složka mléka – mléčné bílkoviny, jsou zastoupeny v séru ve formě koloidní disperze [2].

Dusíkaté látky určují jeho základní fyzikální a chemické vlastnosti a jsou důležité z nutričního hlediska. Obsah bílkovin se podílí také na ekonomice mlékárenství. Dle jejich obsahu je mléko propláceno. Celkové dusíkaté látky jsou označovány jako „hrubá bílkovina“. Z nich asi 5 až 7 % tvoří dusíkaté látky nebílkovinného charakteru, kterými jsou močovina, amoniak, kreatin a další. Odečtením těchto látek od hrubé bílkoviny se získá „čistá bílkovina“. Z jejího celkového množství v mléce tvoří zhruba z 80 % procent kaseiny a zbytek jsou sérové proteiny. Kaseinové frakce jsou v kravském mléce zastoupeny v následujícím poměru: α_s 42 %, β 25 % a κ 9 %. Zbytek do 80 % kaseinových bílkovin v mléce, asi 4 %, tvoří degradační produkty β -kaseinu. Kromě frakce κ jsou všechny vysoce citlivé na přítomnost vápníku v mléce. Právě proti vysrážení je chráněna přítomnost κ -kaseinu [3].

Hlavní složkou kaseinové frakce jsou α_s -kaseiny. Jsou to fosfoproteiny a v kravském mléce se vyskytují jako α_{s1} a α_{s2} modifikace, oba ve čtyřech genetických variantách označovaných A, B, C a D, lišících se primární strukturou. Řetězce β -kaseinů se vyskytují se v 7 genetických variantách. Produkty degradace β -kaseinů jsou označovány jako γ -kaseiny. Ve dvou genetických variantách se v kravském mléce vyskytuje κ -kasein [4].

Obecně obsah dusíkatých látek kolísá v závislosti na řadě faktorů, kterými jsou výživa plemeno, dojivost, sezóna, stádium laktace a zdravotní stav dojníc. Zejména vliv výživy se projevuje na celkové produkci bílkovin i na zastoupení jednotlivých složek mléka. Složení a vlastnosti mléka ovlivňuje význačným způsobem i plemenná příslušnost. To má zásadní význam na technologické zpracování mléka z hlediska termostability a sýřitelnosti. Zastoupení jednotlivých frakcí bílkovin je dáno především geneticky a nelze je významně ovlivňovat [5].

Lze shrnout, že stanovení frakcí kaseinů je požadováno z několika důvodů. V zemědělsko-technologických účelech skladba a množství frakcí může identifikovat původ mléka v závislosti na plemenné různorodosti skotu. Dále slouží k odhalení falšování míšení mlék různých původů. Určuje i jeho vhodnost pro následné zpracování mléka zejména pro sýrařské účely, např. i proteolýzu kaseinů. Kromě toho se kaseiny podílejí významně na tvorbě ceny mléka při výkupu pro jeho další zpracování. Stanovení obsahu jednotlivých kaseinových modifikací i celkového množství kaseinů při prvovýrobě umožňuje sledování skladby frakcí v závislosti na výživě, k odhalení nemoci nebo poruch skotu [6]. Analýzy kaseinových frakcí, se dají využít i ze zdravotního hlediska ke zjištění výskytu potenciálně alergenních složek. Všechny tyto požadavky vedou k vývoji co nejjednodušší a nejlevnější, ale zároveň efektivní metody pro analýzy kaseinů. Uvedené požadavky splňuje technika kapilární elektroforézy, pomocí níž lze separace proteinů úspěšně provádět [7] a [8].

Nejrychlejší změny složení mléka se dosahují složením výživy. Požadované živiny obsažené v krmivu jsou absorbovány a transportovány do mléčných žláz, odkud jsou vylučovány do mléka [9].

Stanovení kaseinových frakcí kapilární elektroforézou

Validace kapilární elektroforézy pro stanovení kaseinu v ovčím mléce byla publikována v roce 1999. Separovány byly dvě α_s frakce kaseinů a dvě β frakce. Analýza trvala do 35 minut. Všechny analyty byly od sebe úplně rozlišeny [10]. Metoda byla v roce 2000 aplikována na studování sýření ovčího sýra [11].

Metoda souběžného stanovení syrovátkových proteinů, kaseinů a para kaseinu v mléce a mléčných produktech byla publikována v roce 2001 [12]. Vedle dalších proteinů byly plně rozlišeny dvě α_s , jedna κ a tři β frakce kaseinů.

V roce 2003 byla publikována studie podmínek separace kaseinů kravského mléka [13]. Separovány byly dvě α_s , tři β a jedna κ frakce kaseinů, s neúplným rozlišením. Linearita byla stanovena v oblasti od 2 do 10 mg/l. Analýza probíhala méně než 40 minut.

V roce 2010 byla publikována studie využívající tyto separační podmínky pro porovnání kaseinového složení korejských kozích mlék s Holštýnským plemenem. S úplným rozlišením byly separovány dvě α_s a κ frakce kaseinů a s neúplně rozlišeny byly některé β frakce. Analýza trvala do 40 minut [14].

2.2 Využití kapilární elektroforézy v procesu fermentace vinného moštu

Sledování procesu fermentace vinného moštu, zrání vína, a složení výsledného produktu je stále aktuálním tématem. Z pohledu analytického zpracování vzorku je víno, mošty a hrozny relativně jednoduchá matrice s poměrně komplexním obsahem látek. Poznatky o složení této matrice mají velký průmyslový význam jak z hlediska rozvoje tohoto odvětví, tak i pro rutinní kontroly procesů. Víno je produkt kvašení ovocného moštu, kdy se sacharidy přeměňují na alkohol, oxid uhličitý a jako vedlejší produkty metabolismu kvasinek nebo hroznů vznikají další sensoricky významné složky – organické kyseliny, vyšší alkoholy, estery, aldehydy a další [15].

Kromě sensorického vlivu mají organické kyseliny význam i stabilizační, případně jako ukazatel mikrobiální kontaminace a nežádoucích pochodů. Některé kyseliny, jako vinná a jablečná jsou již obsaženy v moštu a slouží jako substrát pro kvasinky. V průběhu hlavního kvašení a následně při zrání vína, nebo jeho dlouhodobém skladování se v důsledku metabolických procesů skladba kyselin mění a dochází k jejich přeměnám, nebo odbourávání [16].

Oproti chromatografickým separačním technikám se elektromigrační techniky pro analýzu organických kyselin vyznačují rychlejšími a lacinějšími analýzami s nízkou ekologickou náročností na spotřebované chemikálie, což je vhodné zejména pro rutinní analýzy [17].

V oblasti analýzy potravinářských tekutých matric elektromigračními metodami byla publikována řada odborných původních článků shrnutých do přehledové publikace např. [18].

Dizertační práce pojednává o využití analýz nízkouhlíkatých organických kyselin kapilární zónovou elektroforézou (CZE). Náplní práce je sledování rozdílu zastoupení vybraných organických kyselin v průběhu fermentace vinného moštu utilizovaného různými kvasinkami za podmínek různého agrotechnického ošetření vinohradu. Vliv použité zemědělské techniky se promítá do výsledného organoleptického dojmu a má vliv na biologické a chemické složení výsledného moštu a tím i výsledného produktu vína [19]. Předmětem této práce není analýza fenolických látek, tříslovin a dalších složek hroznů, moštů a vína.

Současné vědecké trendy se soustřeďují na miniaturizované a přenositelné techniky. Ty jsou méně robustní, proto je dávana přednost konvenčním analytickým technikám.

Stanovování organických kyselin má smysl z několika důvodů. Jednak pro sensorické posouzení profilu kyselin ve víně a možnost jeho ovlivnění. Sledování umělého dokyselování jako falšování a přidávání nepovolených

množství kyselin. Dále to jsou důvody technologické – sledování stavu procesu, jeho vývoje a možnost jeho okamžité regulace. Důvodem je i sledování a odhalení kontaminace a porušení technologické kázně, kdy lze včas odhalit nežádoucí kvašení, odchylky od standardního průběhu a vznik nežádoucích kyselin. Důvody jsou i legislativní – sledování dodržování obsahu předepsaných látek a správná kategorizace vína. Na počátku procesu může informace o zastoupení kyselin sloužit pro získání údajů vedoucí ke správnému nastavení počátečních podmínek, jako je úprava kyselosti moštu pro správný průběh procesu. A na závěr procesu je stanovení využitelné při zmiňovaném procesu jablečno-mléčného kvašení, které musí být pozorně sledováno na vývoj a přeměny kyselin [20] a [21].

Separace organických kyselin s krátkým řetězcem elektromigračními technikami

Nejvíce prací bylo publikováno na analýzy majoritních krátkořetězcových organických kyselin elektromigrační technikou v uspořádání kapilární zónové elektroforézy (CZE). Nejčastěji je využitý spektrofotometrický detekční systém využívající UV oblasti v módu přímé [22], či nepřímé [23] fotometrické detekce. Pro speciálnější případy, kdy je třeba identifikace analytů a/nebo se nalézají ve stopových množstvích je využito spojení elektromigračních technik s hmotností detekcí [24]. V poslední době došlo k odklonění od kontaktní vodivostní detekce [25] a byla plně nahrazena nábojovou bezkontaktní vodivostní detekcí (C4D), jak uvádí přehledná review [26]. Porovnání, přístupy a přehled analytických metod pro stanovení organických kyselin v tomto roce byla popsána v práci [27].

2.3 Přenosný modulární mikrofluidický průtokový systém

Dnešní doba vyžaduje v mnoha oblastech nízkonákladové, přenositelné, miniaturizované a automatizovatelné systémy, schopné začlenění přímo do procesů chemických, biotechnologických, potravinářských a farmaceutických výroby, případně schopné provozu přímo na místě v životním prostředí [28]. S postupem rozvoje možností zmenšovat jednotlivé části přístrojové instrumentace nastal trend miniaturizace průtokových systémů [29].

Oblastí s nejpomalejším rozvojem miniaturizace techniky je oblast kapalinové chromatografie. Teprve v poslední době došlo k výraznějšímu progresu v miniaturizovatelnosti a přenositelnosti instrumentace v oblasti kapalinové chromatografie [30]. Největším omezením rozvoje miniaturizace v oblasti kapalinové chromatografie byla nedostupnost kapilárních kolon

s dostatečně malými chromatografickými částicemi, nebo monolitických kolon. Proto až v posledních letech došlo k rozvoji μ - a nano-LC technik [31]. Současné směry (od roku 1990) vývoje instrumentace pro separační vědy jsou „lab-on-a-chip“ a „micro-total-analysis-systems“, čili laboratorní postupy a kroky umístěné na jednom čipu a celkové analýzy provedené v mikroměřítku v jednom kroku [32].

Vývoje přenositelných kapilárních a miniaturizovaných systémů pro kapalinovou chromatografii, včetně teorie a praxe, byly několikrát publikovány vědeckou společností v rámci akademického výzkumu. Většinou se jednalo o laboratorně sestavené instrumentace [33], což bylo pro rozvoj této oblasti limitující.

Řada přenositelných LC systémů, vyvíjených v laboratorních podmínkách, byla z oblasti iontové chromatografie (IC), která je méně náročná na práci s mobilní fází a na generaci gradientu. Přenositelné systémy z IC oblasti díky své nenáročnosti jsou využitelné při podmínkách měření na místě dokladuje práce [34], kde byl užitý jednoduchý LC systém z řady nízkotlakých systémů, používající otevřené kapilární kolony.

Jednou ze současných prací v oblasti miniaturizovaných přenositelných LC systémů publikoval Sharma a kol. [35]. Zde byl popsán přenositelný nano-LC systém [36]. Plně automatizovaný přenositelný iontový chromatograf použitelný na analýzy v místě odběru vzorku publikoval Elkin [37]. Kapilární LC a nano-LC techniky užití v analýze potravin shrnula přehledná review [38].

Filozofie návrhů miniaturizovaných LC systémů je zaměřena na flexibilitu. Tím je myšlena možnost začlenění uživatelem požadovaných kroků, jako příprava vzorků přímo v systému, nebo post-kolonová deprivatizace, za současného zachování přenositelnosti systému a nízké ceny. Přehlednou nejaktuálnější review přenositelných miniaturizovaných LC systémů zpracoval Sharma a kol. [30].

Z literární rešerše plyne, že rozvoj přenositelných systémů je otázkou několika posledních let a ještě zdaleka není vše dořešeno. Je zde poměrně široký prostor pro reálné aplikace na tyto systémy.

2.4 Elektroluminescenční zdroje hluboké UV emise pro fotometrickou detekci

Emise světla v hluboké UV oblasti je z analytického hlediska jednou z nejvyužitelnějších oblastí vlnových délek, zejména pro její univerzálnost, ale i selektivitu. Terminologicky se oblast od 200 do 280 nm označuje jako hluboká UV (z angl. deep-UV) oblast, někdy také jako UVC.

Komerčně dostupné detektory jsou běžně osazovány deuteriovými lampami, rtuťovými výbojkami, nebo xenonovými lampami. Poslední zmiňované jako jediné jsou schopné pulsního režimu. Všechny zmíněné vyžadují složitější řídicí elektronickou výbavu, jsou nákladné a jejich životnost je kolem 2000 hodin. Poskytují i rozdílné spektrální emisní profily a pro jejich využití pro danou vlnovou délku je nutné použít optické filtry, nebo mřížku. Výhodou LED zdrojů je jejich selektivita, protože emitují záření v úzkém rozmezí vlnových délek. Jsou schopné pracovat v pulsním módu, což je výhoda pro zvýšení intenzity záření a i pro větší životnost – výrobci v dnešní době udávají až 6000 hodin.

Jednou z nejrozšířenějších oblastí použití hluboké UV emise, v poslední době zasahující i do oblasti užití LED zdrojů, je oblast sterilace povrchů [39], potravin a kapalin [40]. S rozvojem LED technologie, zvyšováním životnosti a výkonu LED zdrojů poskytujících emisi záření v hluboké UV oblasti se tyto zdroje čím dál více prosazují v oblasti analytické instrumentace jako součást detekčního systému. Aktualizovaný přehled a trendy LED instrumentace z pohledu analytické chemie publikoval v roce 2014 Macka a kolektiv [41].

Jednou z prvních prací v oblasti použití hluboké UV emise z LED zdroje v analytické instrumentaci (kapilární elektroforéze) byla popsána v [42], kde byly o charakterizovány vlastnosti 255 nm LED zdroje a po zapojení do analytického elektroforetického systému byla otestována detekce separovaných bazí nukleotidů. Uspořádání a charakterizace tohoto detektoru bylo popsáno v práci [43]. Použití hluboké UV emise (255 nm LED v absorbančním detektoru pro kapalinovou chromatografii) bylo poprvé popsáno v [44]. Byla popsána konstrukce detekční cely, elektronické zapojení LED a fotodiody a otestování detekce separace modelové směsi benzoátů na koloně C18 izokratickou elucí. Sharma a spol. popsal použití LED UV absorpčního detektoru s velmi nízkým detekčním limitem pro kapilární kapalinovou chromatografii [36]. Autoři Bui a Hauser použili novější LED zdroje pro UV emisi (založené na odlišném materiálovém substrátu) v detekčním systému pro kapilární elektroforézu [45].

V současné době se vývoj LED technologie zaměřuje na dosažení co nejnižších vlnových délek v UV oblasti. Problémem je jejich životnost a cena technologie [46].

Největší pozornost výzkumu je v současné době věnována vývoji LED v oblasti 220 až 280 nm [47]. Materiálové substráty použitelné jako polovodiče pro přípravu LED s emisí v UV oblasti jsou dva. První je historicky dříve používaný a stále ještě vyvíjený substrát založený na AlGaIn [48]. Druhý substrát, rozšiřující se v poslední době, je založený na AlN [49].

Charakterizací LED zdrojů pro UV oblast, zejména starší (AlGaIn) řady, se zabírala práce z roku 2015 [50].

3 CÍLE PRÁCE

3.1 Využití kapilární elektroforézy při analýze kaseinových frakcí a v procesu fermentace vinného moštu

- Optimalizace analytické separace základních kaseinových frakcí v lyofilizovaném kravském mléce pomocí metody kapilární elektroforézy s cílem zlepšení účinnosti separace oproti publikovaným pracím.
- Optimalizace postupu a aplikace kapilární elektroforézy při stanovení základních organických kyselin ve vinném moštu.
- Aplikace optimalizovaného systému ke sledování změn profilu organických kyselin v průběhu kvašení vinného moštu vybranými kvasinkami.

3.2 Přenosný modulární mikrofluidický průtokový systém

- Z dostupných komerčních součástí sloužících jako mikrofluidické zařízení na promývání mikročipových kanálků, kapilární kolony a vstřikovacího ventilů navrhnout, zapojit a otestovat možnost užití této sestavy jako mikrofluidický přenositelný chromatografický systém.
- Použití elektroluminiscenčních zdrojů hluboké UV emise pro fotometrickou detekci.
- Charakterizovat nově dostupné LED zdroje pro hlubokou UV emisi, založené na nověji používaném materiálovém substrátu (AlN). Ověřit spektrální charakteristiky a optoelektrické vlastnosti a porovnat tyto vlastnosti s LED zdrojem založeným na polovodičovém substrátu (AlGaIn).
- Otestovat miniaturizovaný chromatografický systém v izokratickém i gradientovém módu za použití jednoduchého absorbančního detektoru o různých vlnových délkách, hlubokého UV LED absorbančního detektoru při separaci modelových analytů.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Využití kapilární elektroforézy pro analýzu kaseinů

Použité experimentální postupy a chemikálie vycházejí z diplomových prací ing. Ivany Mičíkové (Mičíková, 2009) a Ing. Ireny Dvořákové (Dvořáková, 2010) v kapitole 3 (Experimentální část).

Bylo připraveno a zanalyzováno 144 vzorků o navážce 12 mg/mL. Podrobné složení krmné dávky, uspořádání a rozvržení výživového pokusu a přehled odběrových period byly popsány v diplomové práci Ireny Dvořákové [51].

4.2 Využití kapilární elektroforézy v procesu fermentace vinného moštu

V experimentu bylo užito 4 druhů vinného moštu. Mošty se lišily jednak druhem produkce (integrovaná a ekologická) a každá produkce byla zastoupena moštem z červené i bílé odrůdy. Každý z těchto moštů byl zaočkován kvasinkami z komerčně dostupnými sušenými vinnými kvasinky (*Saccharomyces cerevisiae* (komerční označení BS6, Vinařské potřeby, Česká republika) a paralelně ten samý druh moštu byl zaočkován izolovaným autochtonním kvasinkovým kmenem *Saccharomyces cerevisiae* (1-09). Použitá metodika byla převzata z publikovaného zdroje [23] s optimalizací místa nástřiku a podmínek promývání pro zajištění opakovatelnosti.

Tabulka 1: Schéma uspořádání fermentací a časy odběru vzorků.

Odrůda:	Rulandské modré				Odrůda:	Sauvignon	
Produkce:	Integrovaná	Integrovaná	Ekologická	Ekologická	Produkce:	Ekologická	Ekologická
Produkční kultura:	Komerční	Izolovaná	Komerční	Izolovaná	Produkční kultura:	Komerční	Izolovaná
Datum odběru	Den fermentace/odběru				Datum odběru	Den fermentace/odběru	
3.10.2010	1	1	1	1	25.9.2010	1	1
5.10.2010	3	3	3	3	27.9.2010	3	3
8.10.2010	6	6	6	6	29.9.2010	5	5
10.10.2010	8	8	8	8	1.10.2010	7	7
12.10.2010	10	10	10	10	3.10.2010	9	9
15.10.2010	13	13	13	13	5.10.2010	11	11
17.10.2010	15	15	15	15	8.10.2010	14	14
19.10.2010	17	17	17	17	10.10.2010	16	16
8.11.2010	37	37	37	37	12.10.2010	18	18
20.12.2010	79	79	79	79	15.10.2010	21	21
6.3.2011	155	155	155	155	8.11.2010	45	45
					20.12.2010	87	87
					6.3.2011	163	163

4.3 Přenosný modulární mikrofluidický průtokový systém

Experimentální postupy, uspořádání a užitá instrumentace jsou popsány v odborné publikaci prošlé recenzním řízením [52].

4.4 Elektroluminiscenční zdroje (LED) hluboké UV emise pro fotometrickou detekci na přenosných systémech

Byly testovány nově komerčně dodávané LED zdroje, emitující záření v oblasti vlnových délek pod 300 nm, založené na odlišném materiálovém substrátu (nitridy hliníku – AlN). Všechny tyto UV LED jsou k dohledání pod katalogovým označením OPTAN255H (255 nm), OPTAN255J (255 nm) a OPTAN280J (280 nm) a byly dodány společností CRYSTAL IS, NY, USA. Dříve používané UV LED zdroje byly založené na substrátu obsahující nitridy hliníku s galiem (AlGaIn). Postupy převzaty z práce [53].

Pro spektrální charakterizaci emitovaného signálu byl použit miniaturizovaný USB spektrofotometr USB2000+XR1-ESOO2000+ (Ocean Optic, Germany). LED zdroje byly přiloženy na vstup do spektrofotometrické štěrbinou (souběžně se štěrbinou).

Měření zářivého výkonu (mW) a elektrického výkonu (mW) probíhalo v uspořádání, které zobrazuje Obrázek 1.



Obrázek 1: Uspořádání měřícího systému pro měření zářivého a elektrického výkonu.

Aplikace LED fotometrického detekčního systému na přenosném miniaturizovaném chromatografickém systému

Pro detekci analytů procházející křemennou kapilárou byl užitý jednoduchý LED absorbanční detektor [54]. Pro základní charakterizaci uvedeného detektoru byl zvolen postup běžný pro charakterizaci absorbančních detektorů dle publikace [55].

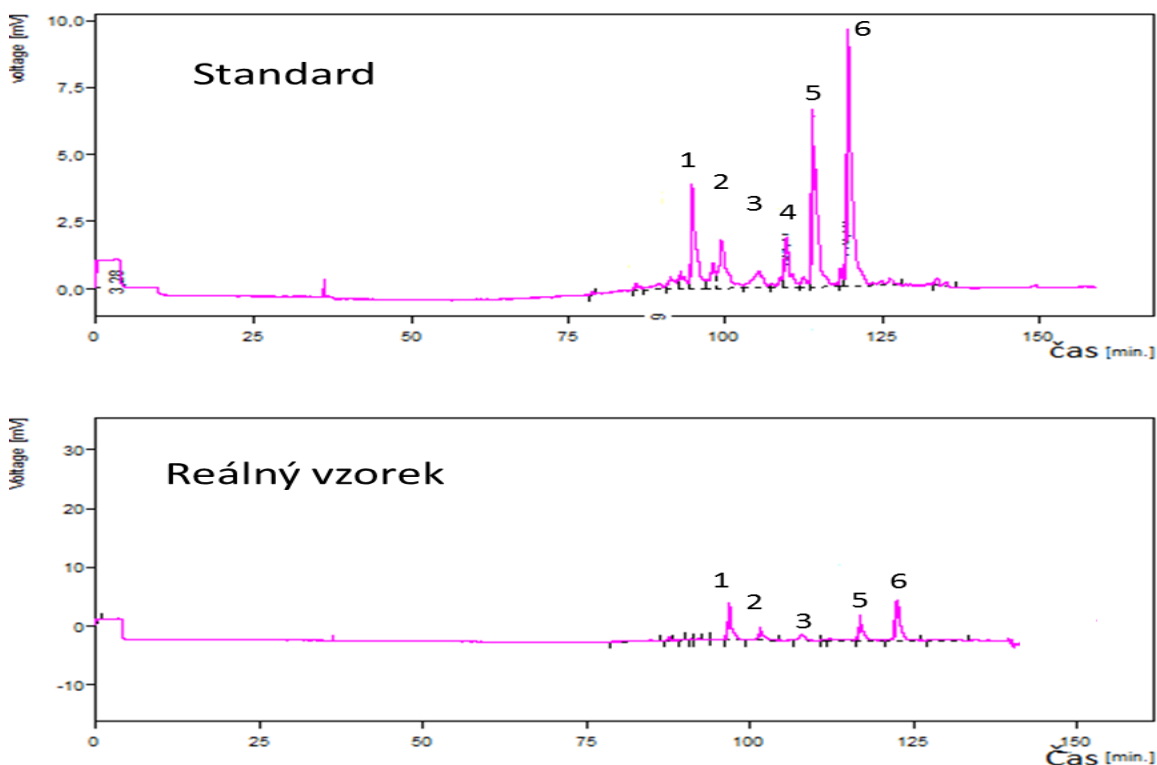
Nové řady UV LED zdrojů byly testovány v detekčním systému v několika uspořádáních napojených na mikrofluidické zařízení schopné poskytnout průtokovou vstříkovací analýzu, nebo separace na kapilární koloně. Pro obě byly zvoleny modelové analyty a rovněž byla testována možnost tandemové techniky spojení optické detekce a elektrochemické

5 VÝSLEDKY A DISKUSE

5.1 Využití kapilární elektroforézy při analýze kaseinových frakcí

Byly optimalizovány a validovány podmínky elektroforetické separace (složení elektrolytů, pufrů a volba separačního systému) při analýze kaseinových frakcí.

Obrázek 2 ukazuje vzorový elektroforeogram směsi standardů s identifikacemi jednotlivých píků představující genetické varianty kaseinových frakcí. Pro porovnání je znázorněn i elektroforeogram reálného vzorku.



Obrázek 2: Příklad elektroforeogramu roztoku standardů (nahore) a reálného vzorku kravského mléka (dole). Směsný standard frakcí kaseinů 4 mg/mL každé frakce. Identifikace píků : 1 = α_{S1} , 2 = α_{S0} , 3 = κ , 4 = β_B , 5 = β_{A1} , 6 = β_{A2}

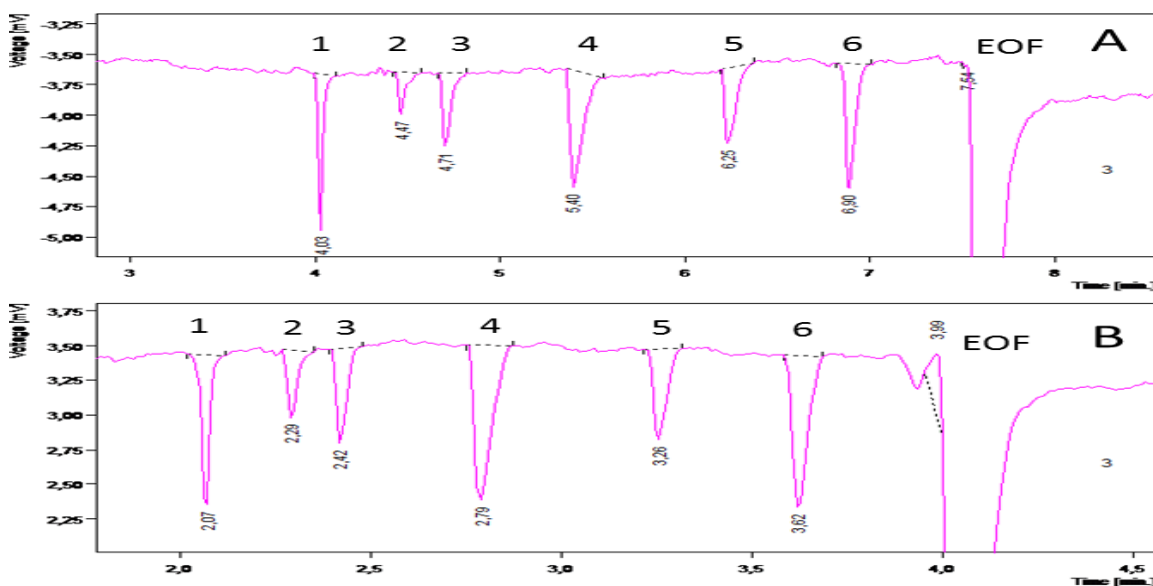
Všech 6 frakcí mělo dostatečné rozlišení (nad 1,0 mezi nejbližšími píky κ a β_B). V porovnání s reálným vzorkem je patrna dobrá opakovatelnost analýz (do 3 % RSD). V této práci se poprvé podařilo řádně rozseparovat všech 6 těchto frakcí, oproti pracem uvedeným v literárním přehledu. Separace s takto dobrým rozlišením nebyla dosud v literatuře popsána. Bylo dosaženo lepších výsledků zejména pro beta frakce, než popisuje práce [14]. Tito autoři popisují separaci 7 frakcí kaseinů s dobou analýzy do 40 minut, ale s ne úplně rozlišenou frakcí β_{A3} .

Metoda popisovaná v této dizertační práci popisuje separaci s dobou analýzy do 125 minut, ale s úplným rozlišením všech frakcí kaseinů.

Pro běžnou praxi je metoda dostačující pro zjištění všech separovaných frakcí při použití zařízení umožňující kontinuální dávkování vzorků bez nutnosti obsluhy.

5.2 Využití kapilární elektroforézy v procesu fermentace vinného moštu

Dle převzaté metodiky [23], bylo optimalizováno místo nástřiku. Separace na krátké dráze probíhala na 25 cm kapiláry umístěné za detektorem. Rozlišení dvou nejbližše migrujících píků bylo úplné a doba analýzy oproti nástřiku na druhé straně se zkrátila na polovinu (z 8 minut na 4). Oproti separaci na inletové straně zde nebylo možno temperovat prostor jako u inletového prostoru a separace probíhala za ambientní laboratorní teploty. Nemělo to však vliv na opakovatelnost analýz. Protékající proud činil $5,5 \mu\text{A}$, tak že nedocházelo k výraznému uvolňování Jouleova tepla a nebyl problém s lokálním přehříváním vzorku rozpuštěného ve vodném prostředí.



Obrázek 3: Porovnání dávkování na odlišných stranách kapiláry. A: Záznam dávkování na inletové straně (efektivní délka 50 cm). B: dávkování na outletové straně. Směs standardů organických kyselin – identifikace píků: 1.vinná, 2.citronová, 3.jablečná, 4.mléčná, 5.jantarová, 6.octová, EOF elektroosmotický tok. Ostatní podmínky viz. Experimentální část. Na ose y zachycen signál změn absorbance ($1 \text{ mV} = 1 \text{ mAU}$).

Relativní směrodatná odchylka (RSD) ploch píků a migračních časů byla pod 3%. Šum signálu byl vyhodnocen z časového úseku 3 minut a činil 1.10^{-5} absorbanční jednotky (AU). Limit detekce činil $5 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ pro všechny analyty.

Limit kvantifikace činil $15 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ pro stanovované analyty. Výťažnost byla kolem 90%, takže matriční vlivy byly minimální.

Po polovině doby kvašení se u všech vzorků projevilo jablečno-mléčné kvašení, což souhlasí s předpoklady uvedené v úvodu do problematiky. Došlo zde k rozvoji autochtonních bakterií mléčného kvašení. Kyselina jablečná byla spotřebována a vytvářela se kyselina mléčná. Výraznější projev tohoto kvašení byl u červených vín. V průběhu celého hlavního kvašení docházelo k odbourávání kyseliny vinné, což souhlasí s poznatkou, že tato kyselina je substrátem pro činnost kvasinek. Mírný nárůst v počáteční fázi a následně udržování koncentrace bez výraznějších změn vykazovaly kyseliny octová, citronová a jantarová. Neměnnost obsahu těchto kyselin prokazuje, že nedocházelo k octovému kvašení ani jiným vadám vína.

Výraznější změny profilu kyselin u červené odrůdy Rulandské modré byly markantnější oproti bílé odrůdě Sauvignon. Rozdíly byly znatelné zejména u rychlosti odbourání kyseliny vinné, kdy u červené odrůdy bylo toto odbourání rychlejší. Z hlediska jablečno-mléčné fermentace docházelo u červených vín k razantnějšímu poklesu kyseliny jablečné a celkově vyšší koncentraci výsledné kyseliny mléčné na konci kvasného procesu. U kyselin octové, citronové a jantarové nedocházelo k výrazným změnám ani rozdílům mezi kvašenými odrůdami moštů ani mezi rozdílnými druhy kvasinek. Vliv užití agrotechniky na profilaci organických kyselin neměl větší vliv přímo. Je možné, že některé složky postřiků mohly částečně ovlivnit diverzitu a chování mikroflóry a to se sekundárně mohla projevit různým profilem jablečno-mléčné fermentace a rychlostí odbourání kyseliny vinné.

Vliv na různý profil kyselin při kvašení mohly mít jednak rozdílná diverzita mikroflóry u červené a bílé odrůdy a odlišné chování mikroflóry způsobené rozdílným složením složek moštu. Červené víno obsahuje značně více polyfenolických látek, které zcela mění charakter vína, jiná byla i cukernatost a částečně jiné mohly být i teplotní podmínky dané rychlostí prokvašení. Vliv těchto parametrů nebyl studován z důvodu rozsáhlosti nutné práce a nebylo to primárním cílem této práce. Zde šlo o základní screening sledování výrazných změn v zastoupení organických kyselin.

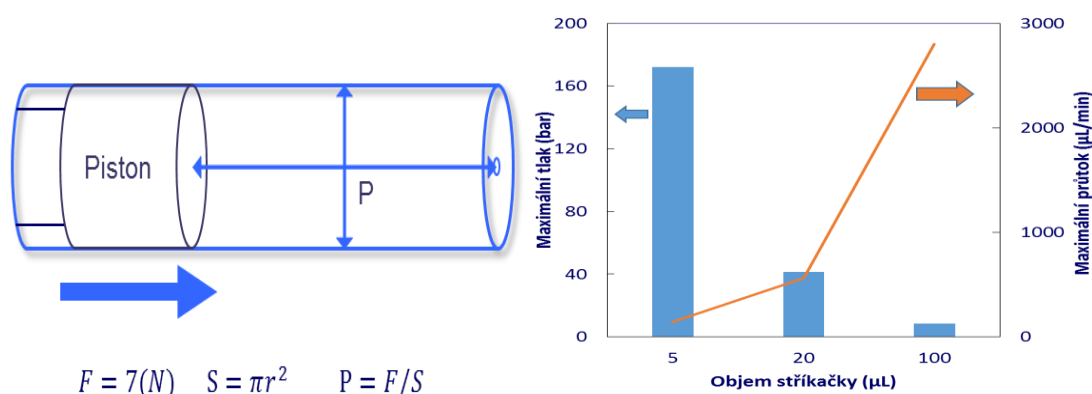
5.3 Přenosný modulární mikrofluidický průtokový systém

V této části práce bylo zkompletováno a otestováno mikrofluidické zařízení použitelné jako miniaturizovaný přenositelný kapalinový chromatograf S minimem nutných laboratorních úprav. Důraz byl dán i na modifikovatelnost systému a kompatibilitu s dalšími součástmi systému nepatřících ke standardní

výbavě komerčně dostupných částí. Tato část práce byla opublikována v zahraničním impaktovaném časopise [52]. Zde je také proveden popis systému, potřebná diskuse a jsou zde uvedeny příklady aplikací a různé módy tohoto systému.

Jako optický detekční systém byl užitý v podobě kapilárního detektoru dříve publikované práce [53]. Jejich charakterizace a testování je popsáno jako samostatná kapitola (5.4). V příložené práci.

Z údajů na krokovém motoru bylo možné dohledat v technických specifikacích výrobce krokových motorů (Haydon Linear Motors Co., Ltd., Čína), že maximální síla kterou je schopen tento typ motoru vyvinout je 7 Newtonů. Skrze Pascalův zákon z plochy a maximální síly (7 N) byl kalkulován maximální tlak, který jsou pumpy schopny vyvinout pro jednotlivé velikosti pístů. Diskutované údaje ukazuje Tabulka 2.



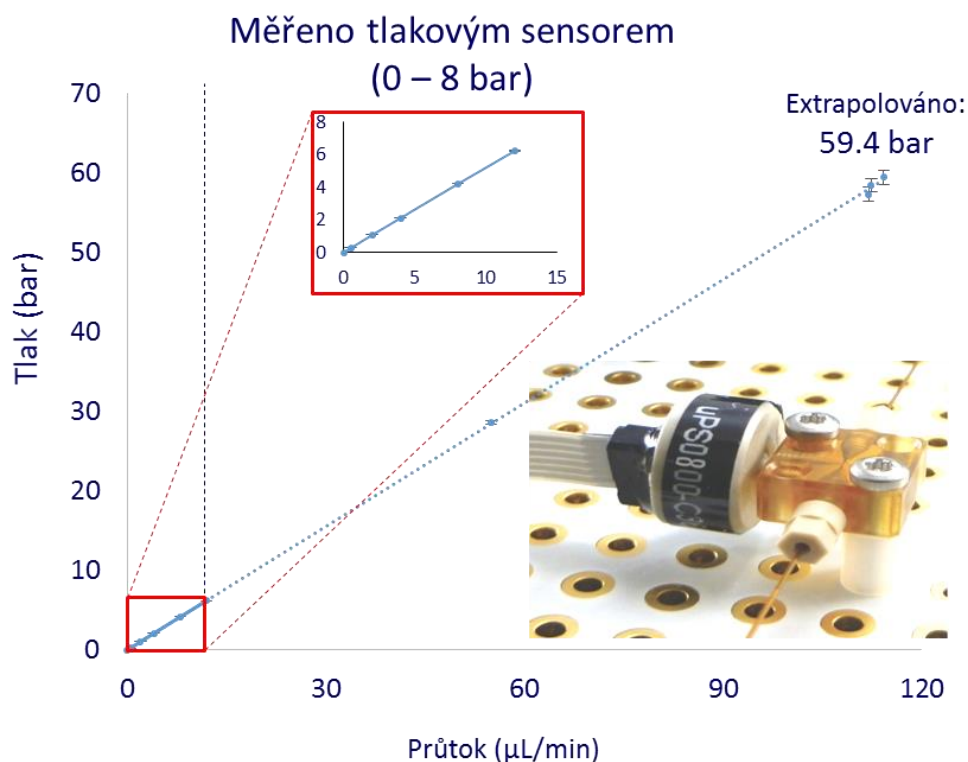
Obrázek 4: Schéma výpočtu maximálního tlaku pump (vlevo). Graf kalkulovaných hodnot maximálního tlaku pro různé objemy pístů (5, 10 a 100 μL) (uprostřed). V grafu jsou na vedlejší ose znázorněny i maximální softwarem dovolené limity pro nastavení průtoků.

Tabulka 2: Uvedené nastavitelné hodnoty dle technických specifikací a skutečné hodnoty nastavitelné v ovládacím software (v závorkách) pro jednotlivé rozměry stříkaček (tabulka vlevo). Kalkulované hodnoty velikosti objemu jednotlivého kroku krokového motoru pro jednotlivé velikosti stříkaček (tabulka vpravo).

Stříkačkové pumpy: Technické specifikace vs. (rozsahy akceptované softwarem)			
F [ul/min]	V _{stříkačky} [ul]	Objem stříkačky (μL)	Velikost kroku (μL)
1.0 – 5600 (0.073 – 2800)	80 (0-100)	5	0.008
0.5 – 2800 (0.036 – 1410)	40 (0-50)	20	0.033
0.2 – 1100 (0.0145 – 560)	20 (0-20)	80	0.170
0.10 – 560 (0.0073 – 280)	8 (0-10)		
0.05 – 280 (0.0036 – 141)	4 (0-5)		

Tlakové limity a charakterizace pump byla ověřována i experimentálně, pomocí tlakového senzoru umístěného v systému. Pro testování byla zvolena 5 μL a 20 μL stříkačky, které byly předpokládány pro použití na systémy s chromatografickou kolonou, vzhledem k nejvýše dosažitelným tlakům

a nejmenším fluktuacím během dodávání kapaliny. Systém byl charakterizován za podmínek pumpování vody a metanolu. Jako simulace odporu namísto kolony. Měření naráželo na tlakové limity tlakového sensoru (do 800 kPa). Tato hodnota byla pro měření limitující a tlaky pro větší průtoky byly extrapolovány, jak zobrazuje Obrázek 5 a výsledky pro 5 μL a 20 μL stříkačky shrnuje Tabulka 3.



Obrázek 5: Experimentální ověření tlaku v závislosti na průtoku. Měření pomocí začleněného tlakového sensoru.

Tabulka 3: Extrapolované hodnoty tlaků při maximálním průtoku pro vybrané stříkačky pro dvě různá vodná prostředí.

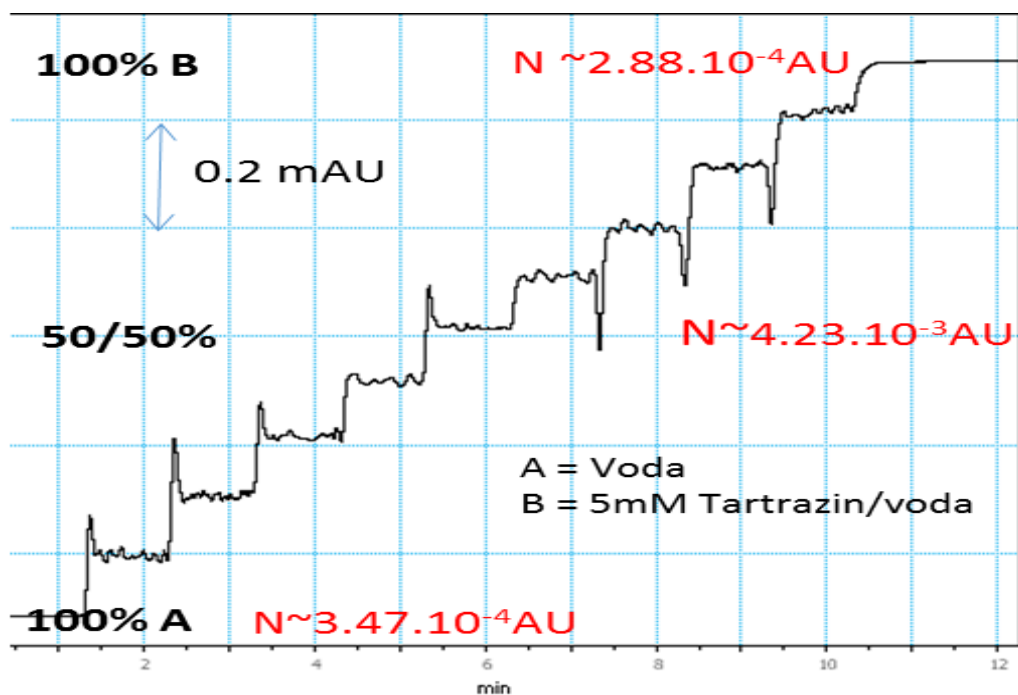
	Maximální průtok ($\mu\text{L}/\text{min}$)	Tlak (bar) při maximálním průtoku	
		Voda	Metanol
Stříkačka 5 μL	116 (%RSD=2)	59.4	40.7
Stříkačka 20 μL	96 (%RSD=1)	53.5	36.3

Maximální tlak pro průtok, kdy ještě nedocházelo k úniku kapaliny pro 5 μL stříkačku byl 60,4 bar. Nad tento průtok (tlak) bylo zaznamenáno nižší množství vytlačené kapaliny, než byla nastaveno, takže logicky začalo docházet k úniku kapaliny kolem pístu, nebo do přepínacího ventilu. Tlak 6000 kPa byl dostačující a i průtok kolem 1,5 $\mu\text{L}/\text{min}$ byl vzhledem k průměrům kapilár a kolon

kteře dosahovaly maximálně 100 μm dostatečný i pro rychlé analýzy. Tlakové limity a průtoky se samozřejmě lišily dle užití stříkačky a podmínek měření.

V módu průtokové vstřikovací analýzy bylo testováno i chování systému na vyvíjení izokratické a gradientové eluce. Izokratická eluce byla řešena pumpováním pouze jedné mobilní fáze dvěma stříkačkami.

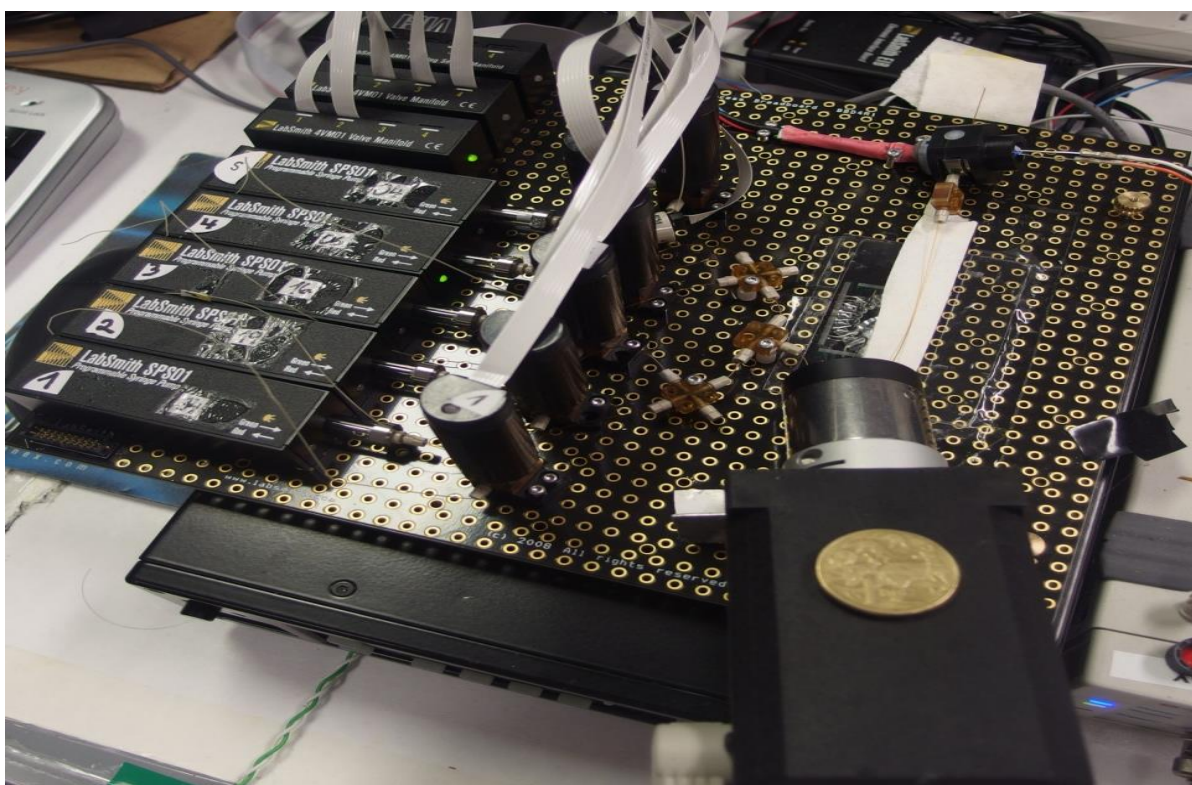
V módu gradientové eluce byla situace složitější nutností nastavit časovou synchronizaci průtoků a přepínání jednotlivých pump. Gradient byl vytvářen postupným zvyšováním průtoků pump čerpající mobilní fázi B (organická fáze např. methanol) a postupným snižováním průtoků pump dodávajících mobilní fázi A (vodná fáze, např. octan amonný). K tomu ještě bylo třeba zauvažovat správné načasování přepnutí mezi pumpami vytlačujícími kapalinu do systému a nasávající kapalinu z rezervoáru a opět minimalizovat tlakové rázy vzniklé rozběhem pump a přepínáním přepínacího ventilu spuštěním vytlačení před přepnutím ventilu. Testování systému se zátěží (s kolonou) probíhalo za pomoci 23 mM roztoku octanu amonného (A) a metanolu (B). Obě situace znázorňuje Obrázek 6.



Obrázek 6: Vizualizace gradientové eluce za použití vodného roztoku Tartrazinu (5mM) jako mobilní fáze B a vody jako mobilní fáze A. Generování gradientu začíná od 100% A do 100% B. V záznamu je uvedena i hodnota šumu (N) v absorbančních jednotkách. Systém byl testován ve FIA módu bez kolony za použití 5 μL stříkaček, průtok (A+B) byl 0,5 $\mu\text{L}/\text{min}$ a použity byly 100 μm kapiláry. Detekce probíhala při 470 nm LED absorbančním detektorem.

Nejmenší hodnoty šumu vykazovaly hodnoty v oblasti nevyšších průtoků A nebo B. To korelovalo s pozorováním a předpoklady danými určováním chyb z nejmenšího možného rozlišení kroku motoru.

Na rozdíl od předchozích prací uvedených v úvodu této práce došlo k poskládání komerčně dostupného miniaturizovaného, modulárního a přenositelného střednětlakého chromatografického systému. Tlak vyvinutý pumpami dostačoval na běžné analýzy a byl dostatečný na protlačení kapaliny monolitickou kapilární kolonou v rozsahu, kdy nedocházelo k únikům kapaliny v důsledku vysokých tlaků. Celková opakovatelnost pro analýzy v gradientovém módu se pohybovala do 5% RSD, což korelovalo s jinými pracemi [56].

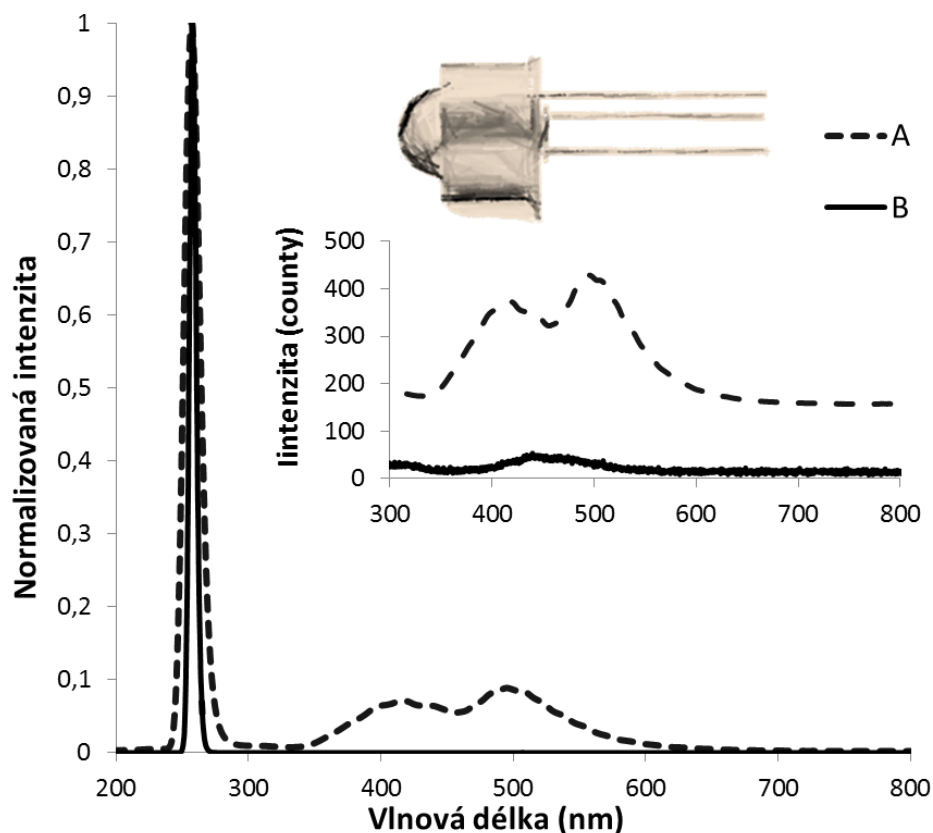


Obrázek 7: Fotografie modulární střednětlaké chromatografické stanice. Přiložena jednodolarová australská mince pro porovnání. Celá sestava je cca 25 cm x 25 cm velká a váží cca 0,7 kg.

5.4 Elektroluminiscenční zdroje hluboké UV emise pro fotometrickou detekci

Proměřením emisních spekter LED zdrojů na hlubokou UV detekci byly získány údaje o skutečné hodnotě polohy maximální emise (nejsilnější pík) a informace o parazitním emisním pásu ve viditelné oblasti. Tato emise je typická pro LED zdroje zejména emitující kolem 255 nm a byla již dříve zaznamenána v práci [53]. Naměřená emisní spektra pro LED zdroje na 255 nm založených

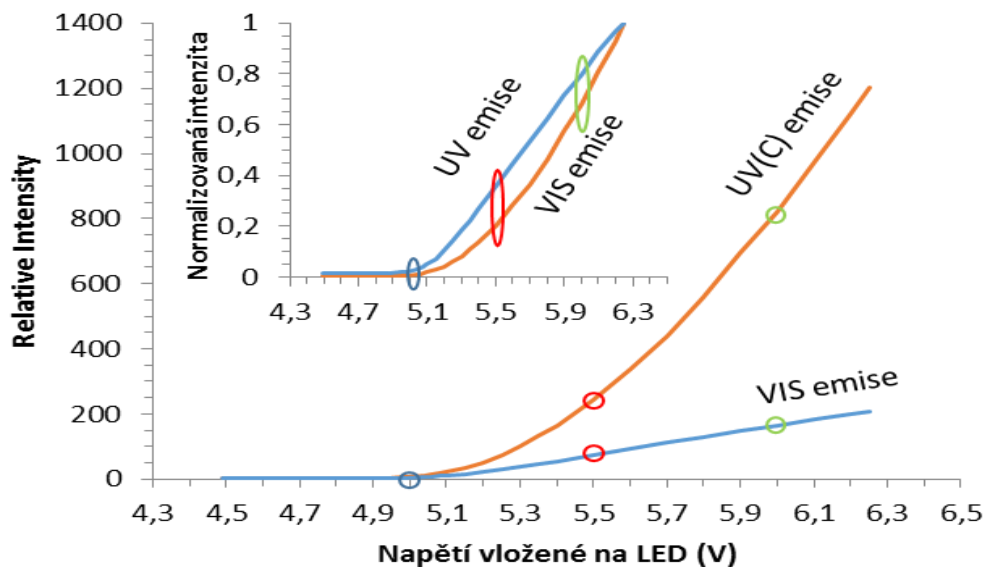
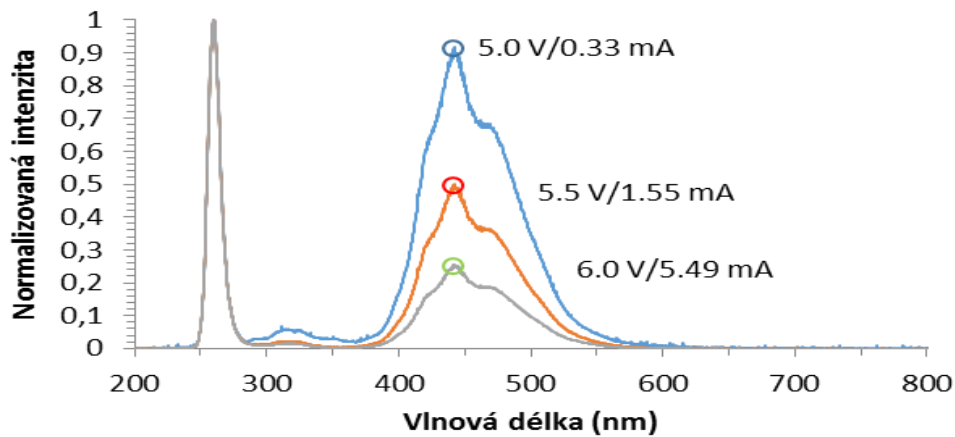
na materiálových substrátech starší řady AlGaN a novější řady AlN ukazuje Obrázek 8.



Obrázek 8: Emisní spektra 255 nm LED zdrojů: A: LED starší řady UV-TOP255-HL-TO39; B: OPTAN255H, založená na novějších materiálových substrátech.

Emise parazitního viditelného záření v oblasti 350-580 nm je u novější řady založené na AlN o několik řádů nižší. Rovněž šířka píku hlavního signálu je výrazně užší, což zvyšuje selektivitu vlnové délky. Odpadá tak větší potřeba užívat přídatné optické filtry na selekci žádaného emisního signálu, užití například v práci [57].

Došlo k proměření nejvýznamnější oblasti zesilování intenzity spekter a bylo tak možno posoudit závislosti růstu emise v hluboké UV oblasti i ve viditelné oblasti na vloženém napětí a proudu. Polohy maxima ve viditelné oblasti (kolem 470 nm) byly znormalizovány k poloze maxima při 255 nm. Situaci zachycuje Obrázek 9.



Obrázek 9: Změny spekter poskytovaných LED OPTAN255H v průběhu měněného vloženého napětí. Nahoře: výběr tří hodnot blízkých začátku emise záření, normalizováno k maximu polohy kolem 255 nm. Dole: grafická závislost poloh maxim v UV a VIS oblasti v průběhu celé škály vkládaného napětí.

Z měření vyplynulo, že při zvyšování napětí vkládané na LED zdroj se zvyšovaly intenzity emisního záření. Byl pozorován poměr zvyšování intenzity v UV a VIS oblasti a bylo zjištěno, že intenzita emise v UV oblasti roste razantně rychleji, než ve VIS oblasti a tuto oblast mnohonásobně překračuje. Toto pozorování potvrzuje hypotézu, že parazitní emisní pás ve VIS oblasti je dán spíše poruchami materiálů a nečistotami, než fluorescenčním efektem, který by zvyšováním intenzity záření v UV oblasti zvyšoval i intenzitu záření ve VIS oblasti.

Z naměřených parametrů byly spočítány hodnoty zářivého výkonu a v závislosti na elektrickém výkonu a z těchto hodnot byly přepočítány % konverze elektrického výkonu na zářivý výkon, čili kolik elektrické energie se přemění na emitované záření. Situaci zachycuje **Chyba! Nenalezen zdroj odkazů..** V případě UV LED zdrojů jsou to pouze desetiny procent oproti VIS LED zdroji, který dosahoval kolem 10 %. Celkově takto nízké emisní výtěžky v UV oblasti jsou zatím běžné a i proto oblast výzkumu v hledání nových materiálů a

jejich kombinace a možností ve vývoji polovodičů emitujících záření pod 300 nm je stále jedním z velkých zájmů vědecké i průmyslové oblasti. Souhrnné výsledky týkající se charakterizace LED zdrojů shrnuje Tabulka 4.

Tabulka 4: Souhrnná data získaná z měření a technické dokumentace pro testované LED zdroje.

LED zdroj (katalog, označení)	Vložený Proud (mA)	Napětí (V)	Elektrický výkon (mW)	Vlnová délka hlavního píku (nm)*	Zářivý výkon (mW)**	Šířka emisního hlavního píku (nm)	Zářivý výkon dle technické dokumentace	Životnost (Hodiny)***	Materiál polovodiče	Cena (USD \$)
OPTAN255H	100	7,653	765,3	260	0,55	11	0,5–1,0 mW	3000	AlN	300
OPTAN255J	100	8,123	812,3	257	0,79	11	1,0–2,0 mW	3000	AlN	300
OPTAN280J	100	9,023	902,3	279	1,48	12	1,0–2,0 mW	3000	AlN	300
OVLGB0C6B9 (470 nm)	20	3,105	62,1	469	5,14	22	7 200 mcd	100 000	InGaN	0,5
UV-TOP255-HL-TO39)****	30	6,5	150	260	0,30	12	0,2 mW	100	AlGaIn	300

* Emisní maximum při maximální inenzite; ** Počítáno pro vlnovou délku píku o maximální intenzitě užitím hodnoty vloženého proudu; *** Pro kontinuální mód, pro 50% poklesu intenzity; **** Parametry převzaty z výrobních technických specifikací a nebo měřeny v publikaci (Macka a kol.,2009).

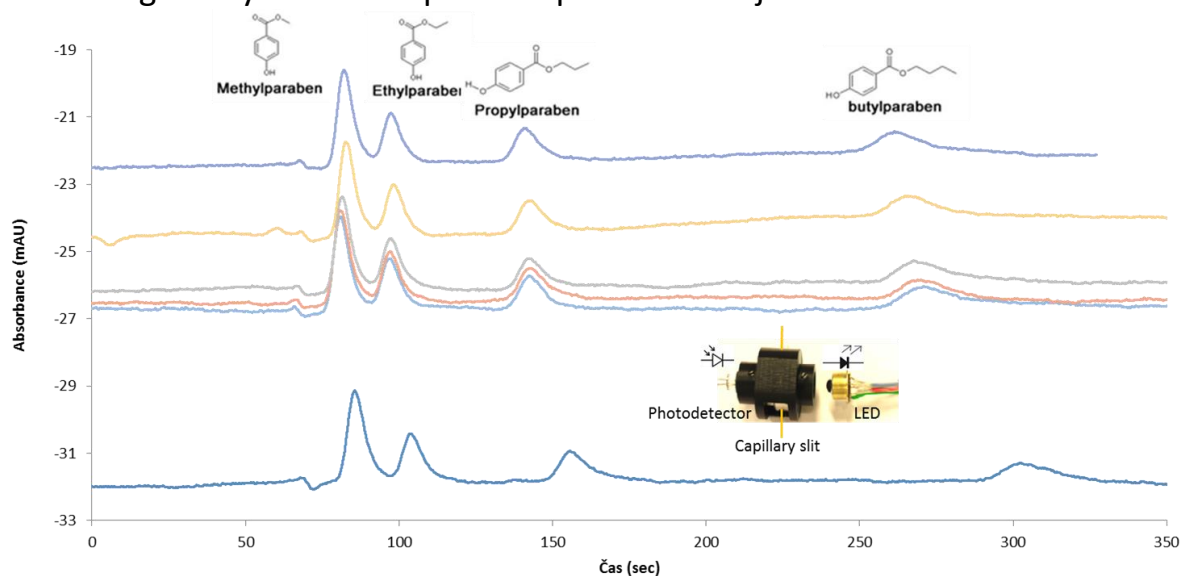
Charakterizace LED detektorů

Metodikou vhodnou pro charakterizaci optických detektorů různých uspořádání [55] byly charakterizovány LED absorbanční detektory – kapilární se štěrbinou a nanolitrová Z-cela. Efektivní délka pro kapilární LED detektor byla stanovena na 95,2 μm . Udávaný vnitřní průměr použité kapiláry byl 100 μm . Vzhledem k zakřivením a nerovnostem kapiláry, může být logicky efektivní délka kratší. Většina záření je určitým způsobem rozptýlena a jen velmi malá část jde přímou cestou skrz kapiláru. % rozptýleného světla 0,79 je také slušné, většina komerčně dodávaných optických detektorů má toto procento do 1 %. V uspořádání kdy byl LED zdroj (255 nm) v určité vzdálenosti od štěrbinu Z-cely byla efektivní délka cely stanovena na 3 mm oproti deklarovaným 8 mm. To mohlo být způsobeno větším rozptylem světla a nedostatečným prostupem světla kapilárou v Z-cele, % bočního světla bylo rovněž do 1 %.

Použití LED detektoru v miniaturizované chromatografické sestavě

Jako první byl zkoušen LED kapilární absorbanční detektor se štěrbinou. Byl zapojen do systému na vyvíjenou chromatografickou platformu v módu izokratické separace na chromatografické koloně a jako modelové analyty

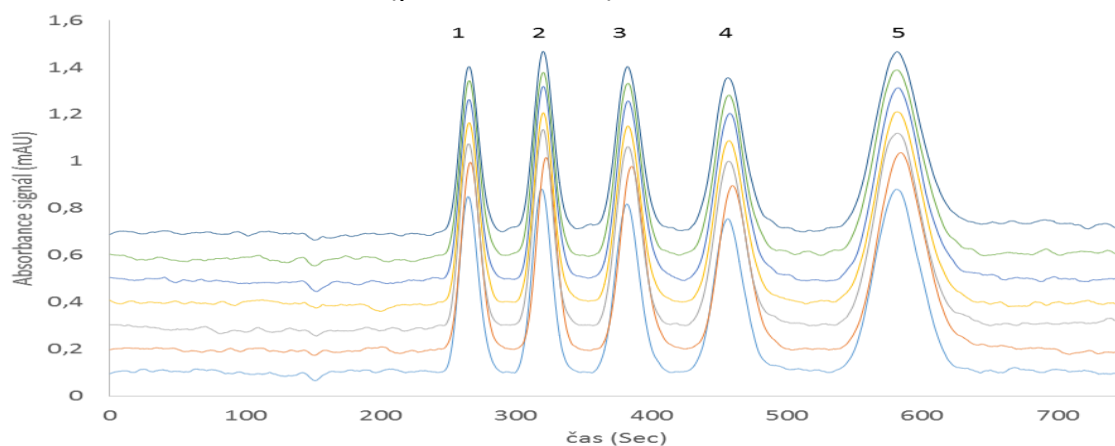
pro separaci sloužila směs derivátů kyseliny p-hydroxybenzoové (parabeny). Chromatografický záznam úspěšné separace ukazuje Obrázek 10.



Obrázek 10: Chromatografická izokratická separace směsi parabenů. Podmínky viz experimentální část.

Toto uspořádání poskytovalo uspokojivé detekční limity (řádově mM/dm^3), separace jednotlivých analytů byla dostatečná (rozlišení nad 1,5). Šum základní linie byl pod 10^{-4} absorbančních jednotek (AU). Poměr signál k šumu byl 10. Varianta zvýšení limitů detekce je použití komerčně dostupné Z-cely určené pro průtoky v řádech $\mu\text{L}/\text{min}$.

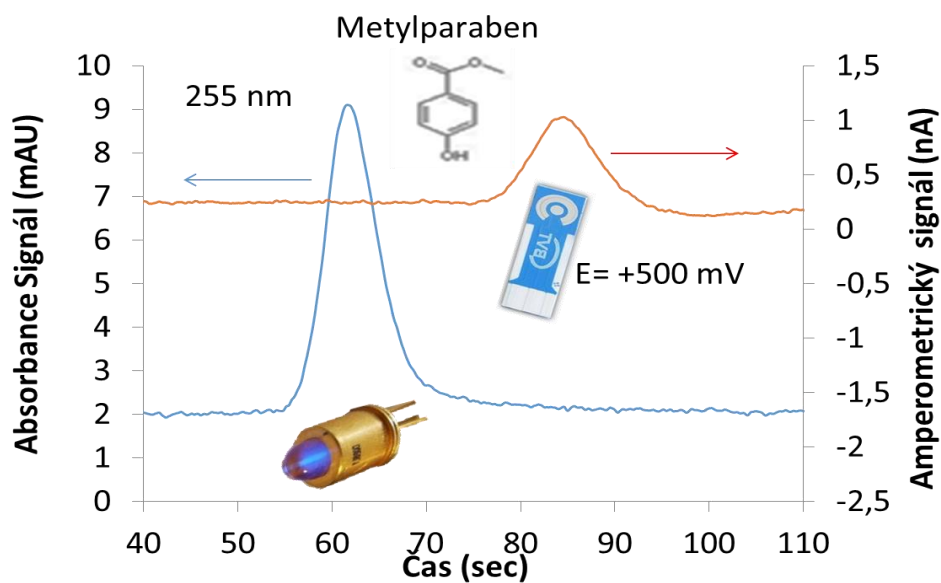
Chromatografický záznam systému s použitím Z-cely ukazuje Obrázek 11. Zde je patrné výrazné zvýšení hodnoty signálu k šumu na 20 a absorbanční šum základní linie se snížil o řád (pod $5 \cdot 10^{-5}$ AU).



Obrázek 11: Gradientová separace analytů s užitím průtokové Z-cely a LED zdroje s hlubokou UV emisí. Identifikace píků: 1. L-DOPA (0.08 mM), 2. octopamine (0.13 mM), 3. synephrine 0.12 mM), 4. phenylephrine (0.12 mM) a 5. 5-hydroxytryptophan (0.09 mM). Další podmínky viz experimentální část.

Poslední testovanou variantou bylo tandemové spojení různých detekčních technik v jedné analýze. Testováno bylo spojení měření absorbance

v hluboké UV oblasti a elektrochemické detekce (amperometrické). Ověření spojení LED detektoru založeného na LED zdroji pro hlubokou UV emisi ve spojení s elektrochemickým detektorem. bylo realizováno v módu průtokové vstříkací analýzy. Jako testovaný analyt byl zvolen methylparaben. Analýzu a získané signály ukazuje Obrázek 12.



Obrázek 12: FIA analýza methylparabenu při testování tandemového spojení LED detekce s 255 nm LED a amperometrické detekce.

6 ZÁVĚREČNÉ SHRNUÍ A BUDOUCÍ VÝZKUMNÉ SMĚRY

V rámci dizertační práce byla řešena problematika použití elektromigračních technik při stanovení vybraných analytů, vývoje přenositelného chromatografického systému a charakterizace novějšího typu UV LED zdroje a detekčního systému. Podstatné závěry by se daly shrnout následujícím způsobem:

Při použití konvenčních technik došlo k aplikaci stávajících metod na větší počet vzorků bez jejich další optimalizace a vývoje metod. Cílem práce bylo získat výsledky obsahu příslušných látek (kaseinů a organických kyselin).

- Pomocí techniky kapilární zónové elektroforézy byla dosažena separace 6 základních kaseinových frakcí v jedné analýze. Ta zabrala delší čas (asi 110 minut, ale zahrnovala úplnou separaci všech frakcí, oproti předchozím publikovaným článkům.
- Kapilární zónová elektroforéza byla aplikována na analýzu vzorků vinného moštu kvašeného rozdílnými kvasinkami. Byl sledován průběh kvašení z hlediska změn základních krátkořetězcových organických kyselin. Mezi vzorky moštu kvašeného rozdílnými kvasinkami byly pozorovatelně velké rozdíly, pouze rychlost odbourání kyseliny jablečné na mléčnou byla rozdílná. Výsledky byly publikovány v časopise obsaženém v databázi Scopus.
- Byla vyvinuta a otestována mikrofluidická přenositelná chromatografická stanice. Použity byly až na vstříkovací ventil a detekční systém komerčně dostupné součásti. Jednotlivé části systému byly charakterizovány: testovány tlakové limity, šum, schopnost přesně generovat a reprodukovat gradient. Sestava byla testována pro izokratickou separaci směsi barviv a parabenů a gradientová eluce byla demonstrována na směsi barviv. Problematika byla publikována v renomovaném impaktovaném vědeckém časopise zaměřeného na novinky v analytické chemii.
- Byly charakterizovány nově komerčně dostupné LED zdroje emitující záření v oblasti hluboké UV emise založené na materiálovém polovodičovém substrátu AlN. Byly stanoveny spektrální charakteristiky, zářivý výkon a elektrické volt-ampérové charakteristiky. LED zdroje byly implementovány do různých forem LED absorbančních detektorů – jednoduchého štěrbinového kapilárního detektoru a do Z-cely a tyto detektory byly charakterizovány z hlediska linearity a efektivní optické délky. Použití detektorů bylo demonstrováno na analýzách modelových analytů – parabenů. Bylo úspěšně otestováno spojení absorbančního detektoru a elektrochemického amperometrického detektoru pro použití analýz v jednom kroku. Tato část

problematiky je sepisována pro podání v impaktovaném časopise a byla prezentována na řadě posterů, z nichž jeden získal ocenění prvního místa v posterové sekci na mezinárodní mikrofluidickém sympoziu.

Do budoucna je zde prostor pro implementace daných přenositelných technik v analýzách přímo na místě odběru, nebo začlenění daných technik přímo do procesu technologické výroby. Nabízí se zde i možnost propojení s dalšími detekčními systémy a transfer metod ze stávajících stolních přístrojů na přenositelné systémy. To platí i pro použité konvenční techniky aplikací elektromigračních technik na analýzy organických kyselin a kaseinových frakcí, které mají prostor pro transfer metod na jednodušší miniaturizované systémy, posouzení předností a nedostatků těchto přesunů. Nabízí se i kombinace vyvíjených technik s poznatky publikovanými autory ze současné doby, pro zvýšení limitů detekce, opakovatelnosti a reprodukovatelnosti analýz a celkové snížení nákladů.

7 SEZNAM CITOVANÝCH LITERÁRNÍCH PRAMENŮ

- [1] KADLEC, Pavel. *Technologie potravin II*. 1. vyd. Praha: VŠCHT, 2002, 236 s. ISBN 80-708-0510-2.
- [2] DRDÁK, Milan. *Základy potravinářských technologií zpracování rostlinných a živočišných surovin, cereálne a fermentačné technológie uchovávanie, hygiena a ekológia potravín*. 1. vyd. Bratislava: Malé Centrum, 1996, 511 s. ISBN 80-967-0641-1.
- [3] GAJDŮŠEK, Stanislav. *Laktologie*. Vyd. 1. V Brně: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2003, 78 s. ISBN 80-715-7657-3.
- [4] VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin*. Rozš. a přeprac. 3. vyd. Tábor: OSSIS, 2009, 623 s. ISBN 978-80-86659-17-6.
- [5] ŠRUBAŘOVÁ, P. a J. DVOŘÁK Analysis of genomic marker CSN2 in cow's milk: Analýza genomického markeru CSN2 v mléce skotu. In: *MendelNet'07 Agro – sborník z mezinárodní konference posluchačů postgraduálního doktorského studia: Proceedings of International Ph.D. Students Conference*. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně: MZLU, Brno, 2007, s. 127-134. ISBN 978-80-7375-119-7. Dostupné také z: mnet.mendelu.cz/mendelnet07agro/articles/bioziv/srubarova.pdf
- [6] RODRIGUEZ-NOGALES, J.M. Approach to the quantification of milk mixtures by partial least-squares, principal component and multiple linear regression techniques. *Food Chemistry*. 2006, **98**(4), 782-789. DOI: 10.1016/j.foodchem.2005.07.037. ISSN 03088146. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814605006199>
- [7] CIFUENTES, Alejandro. Recent advances in the application of capillary electromigration methods for food analysis. *ELECTROPHORESIS*. 2006, **27**(1), 283-303. DOI: 10.1002/elps.200500474. ISSN 0173-0835. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/elps.200500474>
- [8] MŮLLER, Lukáš, Petr BARTÁK, Petr BEDNÁŘ, Iveta FRYŠOVÁ, Juraj ŠEVČÍK a Karel LEMR. Capillary electrophoresis-mass spectrometry – a fast and reliable tool for the monitoring of milk adulteration. *ELECTROPHORESIS*. 2008, **29**(10), 2088-2093. DOI: 10.1002/elps.200700794. ISSN 01730835. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/elps.200700794>
- [9] KENNELLY, John, J., John, A. BELL, Aileen, F. KEATING a Lorraine DOEPEL. Nutrition as a Tool to Alter Milk Composition. *Advances in Dairy Technology*. 2005, **17**(1), 255-275.
- [10] IZCO, Jesús M., Mónica TORMO a Rafael JIMÉNEZ-FLORES. Development of a CE Method to Analyze Organic Acids in Dairy Products: Application to Study the Metabolism of Heat-Shocked Spores. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2002, **50**(7), 1765-1773. DOI:

10.1021/jf010929i. ISSN 0021-8561. Dostupné také z:
<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf010929i>

- [11] IRIGOYEN, Aurora, Jesús Mar??a IZCO, Francisco Clemente IBÁÑEZ a Paloma TORRE. Evaluation of the effect of rennet type on casein proteolysis in an ovine milk cheese by means of capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*. 2000, **881**(1-2), 59-67. DOI: 10.1016/S0021-9673(99)01276-5. ISSN 00219673. Dostupné také z:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967399012765>
- [12] MIRALLES, Beatriz, Volker ROTHBAUER, Mar??a A MANSO, Lourdes AMIGO, Ingolf KRAUSE a Mercedes RAMOS. Improved method for the simultaneous determination of whey proteins, caseins and para-?-casein in milk and dairy products by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*. 2001, **915**(1-2), 225-230. DOI: 10.1016/S0021-9673(01)00617-3. ISSN 00219673. Dostupné také z:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967301006173>
- [13] ORTEGA, N., S.M. ALBILLOS a M.D. BUSTO Application of factorial design and response surface methodology to the analysis of bovine caseins by capillary zone electrophoresis. *Food Control*. 2003, **14**(5), 307-315. DOI: 10.1016/S0956-7135(02)00095-6. ISSN 09567135. Dostupné také z:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713502000956>
- [14] HAM, J.-S., S.-G. LEE, S.-G. JEONG, M.-H. OH, D.-H. KIM a Y.W. PARK Characteristics of Korean-Saanen goat milk caseins and somatic cell counts in comparison with Holstein cow milk counterparts. *Small Ruminant Research*. 2011, **93**(2-3), 202-205. DOI: 10.1016/j.smallrumres.2010.05.006. ISSN 09214488. Dostupné také z:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0921448810001562>
- [15] JACKSON, Ronald S. *Wine science: principles and applications*. 3rd ed. Amsterdam: Elsevier/Academic Press, 2008. ISBN 978-012-3736-468.
- [16] FLEET, edited by Graham H. *Wine microbiology and biotechnology*. 1st published, Reprinted. London: Taylor, 2002. ISBN 04-152-7850-3.
- [17] FRAZIER, Richard. *Capillary Electrophoresis for Food Analysis: Method Development*. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2000, 127 s. ISBN 08-540-4492-2.
- [18] SÁDECKÁ, J a J POLONSKÝ. Electrophoretic methods in the analysis of beverages. *Journal of Chromatography A*. 2000, **880**(1-2), 243-279. DOI: 10.1016/S0021-9673(00)00426-X. ISSN 00219673. Dostupné také z:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002196730000426X>
- [19] BRANDT, K., C. LEIFERT, R. SANDERSON a C. J. SEAL Agroecosystem Management and Nutritional Quality of Plant Foods: The Case of Organic Fruits and Vegetables. *Crit. Rev. Plant Sci*. 2011, **30**(1-2), 177-197. DOI: 10.1080/07352689.2011.554417. ISSN 07352689. Dostupné také z:
<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/07352689.2011.554417>
- [20] BIANCHI, Federica, Maria CARERI a Claudio CORRADINI. Novel approach for the rapid determination of water-soluble organic acids in wine by co-electroosmotic flow capillary zone electrophoresis. *Journal of*

- Separation Science*. 2005, **28**(9-10), 898-904. DOI: 10.1002/jssc.200500046. ISSN 1615-9306. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jssc.200500046>
- [21] DE VILLIERS, André, Phillipus ALBERTS, Andreas G.J. TREDoux a Hélène H. NIEUWOUDT Analytical techniques for wine analysis: An African perspective; a review. *Analytica Chimica Acta*. 2012, **730**, 2-23. DOI: 10.1016/j.aca.2011.11.064. ISSN 00032670. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003267011016321>
- [22] CASTIÑEIRA, A., R.M. PEÑA, C. HERRERO a S. GARCÍA-MARTÍN Analysis of Organic Acids in Wine by Capillary Electrophoresis with Direct UV Detection. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2002, **15**(3), 319-331. DOI: 10.1006/jfca.2002.1056. ISSN 08891575. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0889157502910562>
- [23] PERES, R.G., E.P. MORAES, G.A. MICKE, F.G. TONIN, M.F.M. TAVARES a D.B. RODRIGUEZ-AMAYA Rapid method for the determination of organic acids in wine by capillary electrophoresis with indirect UV detection. *Food Control*. 2009, **20**(6), 548-552. DOI: 10.1016/j.foodcont.2008.08.004. ISSN 09567135. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713508002168>
- [24] HAGBERG, Jessika. Analysis of low-molecular-mass organic acids using capillary zone electrophoresis–electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* [online]. 2003, **988**(1), 127-133 [cit. 2016-04-27]. DOI: 10.1016/S0021-9673(02)02022-8. ISSN 00219673. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967302020228>
- [25] MASÁR, Marián, Katarína POLIAKOVÁ, Mariana DANKOVÁ, Dušan KANIANSKY a Bernd STANISLAWSKI. Determination of organic acids in wine by zone electrophoresis on a chip with conductivity detection. *Journal of Separation Science* [online]. 2005, **28**(9-10), 905-914 [cit. 2016-04-27]. DOI: 10.1002/jssc.200500061. ISSN 16159306. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jssc.200500061>
- [26] KUBÁŇ, Pavel a Peter C. HAUSER Application of an external contactless conductivity detector for the analysis of beverages by microchip capillary electrophoresis. *ELECTROPHORESIS* [online]. 2005, **26**(16), 3169-3178 [cit. 2016-04-27]. DOI: 10.1002/elps.200500178. ISSN 01730835. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/elps.200500178>
- [27] ZERAVIK, Jiri, Zdenka FOHLEROVA, Miodrag MILOVANOVIC et al.. Various instrumental approaches for determination of organic acids in wines. *Food Chemistry* [online]. 2016, **194**, 432-440 [cit. 2016-04-28]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2015.08.013. ISSN 03088146. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814615011966>
- [28] ATENCIA, Javier a David J. BEEBE Controlled microfluidic interfaces. *Nature*. 2005, **437**(7059), 648-655. DOI: 10.1038/nature04163. Dostupné také z: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nature04163>

- [29] CHURÁČEK, Jaroslav. *Nové trendy v teorii a instrumentaci vybraných analytických metod*. 1. vyd. Praha: Academia, 1993, 387 s. ISBN 80-200-0010-0.
- [30] SHARMA, Sonika, Luke T. TOLLEY, H. Dennis TOLLEY, Alex PLISTIL, Stanley D. STEARNS a Milton L. LEE Hand-portable liquid chromatographic instrumentation. *Journal of Chromatography A*. 2015, **1421**(1), 38-47. DOI: 10.1016/j.chroma.2015.07.119. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967315011292>
- [31] ŠESTÁK, Jozef, Dana MORAVCOVÁ a Vladislav KAHLE. Instrument platforms for nano liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2015, **1421**(1), 2-17. DOI: 10.1016/j.chroma.2015.07.090. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002196731501078X>
- [32] MARK, Daniel, Stefan HAEBERLE, Günter ROTH, Felix VON STETTEN a Roland ZENGERLE. Microfluidic lab-on-a-chip platforms: Requirements, characteristics and applications. *Chemical Society Reviews*. 2010, **39**(3), 1153-1182. DOI: 10.1039/B820557B. Dostupné také z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=b820557b>
- [33] ŠESTÁK, Jozef, Filip DUŠA, Dana MORAVCOVÁ a Vladislav KAHLE. Simple automated liquid chromatographic system for splitless nano column gradient separations. *Journal of Chromatography A*. 2013, **1276**(1), 26-32. DOI: 10.1016/j.chroma.2012.12.020. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002196731201878X>
- [34] KIPLAGAT, Isaac K., Petr KUBÁŇ, Pavlína PELCOVÁ a Vlastimil KUBÁŇ. Portable, lightweight, low power, ion chromatographic system with open tubular capillary columns. *Journal of Chromatography A*. 2010, **1217**(31), 5116-5123. DOI: 10.1016/j.chroma.2010.06.017. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967310007697>
- [35] SHARMA, Sonika, Alex PLISTIL, Robert S. SIMPSON, Kun LIU, Paul B. FARNSWORTH, Stanley D. STEARNS a Milton L. LEE Instrumentation for hand-portable liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2014, **1327**(1), 80-89. DOI: 10.1016/j.chroma.2013.12.059. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967313019407>
- [36] SHARMA, Sonika, H. Dennis TOLLEY, Paul B. FARNSWORTH a Milton L. LEE LED-Based UV Absorption Detector with Low Detection Limits for Capillary Liquid Chromatography. *Analytical Chemistry*. 2015, **87**(2), 1381-1386. DOI: 10.1021/ac504275m. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac504275m>
- [37] ELKIN, Kyle R. Portable, fully autonomous, ion chromatography system for on-site analyses. *Journal of Chromatography A*. 2014, **1352**(1), 38-45. DOI: 10.1016/j.chroma.2014.05.046. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967314008127>
- [38] FANALI, Chiara, Laura DUGO, Paola DUGO a Luigi MONDELLO. Capillary-liquid chromatography (CLC) and nano-LC in food analysis. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*. 2013, **52**(1), 226-238. DOI:

- 10.1016/j.trac.2013.05.021. Dostupné také z:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S016599361300188X>
- [39] KIM, Soo-Ji, Do-Kyun KIM, Dong-Hyun KANG a J. L. SCHOTTEL Using UVC Light-Emitting Diodes at Wavelengths of 266 to 279 Nanometers To Inactivate Foodborne Pathogens and Pasteurize Sliced Cheese. *Applied and Environmental Microbiology*. 2016, **82**(1), 11-17. DOI: 10.1128/AEM.02092-15. Dostupné také z: <http://aem.asm.org/lookup/doi/10.1128/AEM.02092-15>
- [40] SHATALOV, M., A. LUNEV, X. HU et al. PERFORMANCE AND APPLICATIONS OF DEEP UV LED. *International Journal of High Speed Electronics and Systems*. 2012, **21**(1), 125011-1-125011-15. DOI: 10.1142/S0129156412500115. Dostupné také z: <http://www.worldscientific.com/doi/abs/10.1142/S0129156412500115>
- [41] MACKA, Mirek, Tomasz PIASECKI a Purnendu K. DASGUPTA Light-Emitting Diodes for Analytical Chemistry. *Annual Review of Analytical Chemistry*. 2014, **7**(1), 183-2017. DOI: 10.1146/annurev-anchem-071213-020059. Dostupné také z: <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-anchem-071213-020059>
- [42] KRČMOVÁ, Lenka, Anna STJERNLOF, Sebastien MEHLEN, Peter C. HAUSER, Silvija ABELE, Brett PAULL a Mirek MACKA. Deep-UV-LEDs in photometric detection: A 255 nm LED on-capillary detector in capillary electrophoresis. *Analyst*. 2009, **134**(12), 2394-2396. DOI: 10.1039/b916081g. Dostupné také z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=b916081g>
- [43] JOHNS, Cameron, Miroslav MACKA a Paul R. HADDAD Design and performance of a light-emitting diode detector compatible with a commercial capillary electrophoresis instrument. *Electrophoresis*. 2004, **25**(18-19), 3145-3152. DOI: 10.1002/elps.200405913. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/elps.200405913>
- [44] SCHMID, Stefan, Mirek MACKA a Peter C. HAUSER UV-absorbance detector for HPLC based on a light-emitting diode. *Analyst*. 2008, **133**(4), 465-469. DOI: 10.1039/b715681b. Dostupné také z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=b715681b>
- [45] BUI, Duy Anh a Peter C. HAUSER Absorbance detector for capillary electrophoresis based on light-emitting diodes and photodiodes for the deep-ultraviolet range. *Journal of Chromatography A*. 2015, **1421**, 203-208. DOI: 10.1016/j.chroma.2015.06.005. ISSN 00219673. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967315008213>
- [46] HIRAYAMA, Hideki, Sachie FUJIKAWA a Norihiko KAMATA. Recent Progress of AlGaIn-based Deep-UV LEDs. *IEEJ Transactions on Electronics, Information and Systems*. 2013, **133**(8), 1443-14482. DOI: 10.1541/ieejeiss.133.1443. Dostupné také z: <http://jlc.jst.go.jp/DN/JST.JSTAGE/ieejeiss/133.1443?lang=en>
- [47] HIRAYAMA, Hideki, Sachie FUJIKAWA, Norimichi NOGUCHI, Jun NORIMATSU, Takayoshi TAKANO, Kenji TSUBAKI a Norihiko KAMATA. 222-282 nm AlGaIn and InAlGaIn-based deep-UV LEDs fabricated on high-quality AlN on

- sapphire. *Physica Status Solidi (A) Applications and Materials Science*. 2009, **206**(6), 1176-1182. DOI: 10.1002/pssa.200880961. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/pssa.200880961>
- [48] SUN, Pai, Xianglong BAO, Songqing LIU, Chunya YE, Zhaorong YUAN, Yukun WU, Shuping LI a Junyong KANG. Advantages of AlGaIn-based deep ultraviolet light-emitting diodes with a superlattice electron blocking layer. *Superlattices and Microstructures*. 2015, **85**(1), 59-66. DOI: 10.1016/j.spmi.2015.05.010. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0749603615002694>
- [49] HELAVA, Heikki, Tat'jana CHEMEKOVA, Oleg AVDEEV, Eugeny MOKHOV, Sergey NAGALYUK, Yuri MAKAROV a Mark RAMM. AlN substrates and epitaxy results. *Physica Status Solidi (C) Current Topics in Solid State Physics*. 2010, **7**(7-8), 2115-2117. DOI: 10.1002/pssc.200983619. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/pssc.200983619>
- [50] HOLLINGTON, D, J T BAIRD, T J SUMNER a P J WASS. Characterising and testing deep UV LEDs for use in space applications. *Classical and Quantum Gravity*. 2015, **32**(23), 235020-1-235020-19. DOI: 10.1088/0264-9381/32/23/235020. Dostupné také z: <http://stacks.iop.org/0264-9381/32/i=23/a=235020?key=crossref.a0c9b2592e8a20aaf4f82298c28b372a>
- [51] DVOŘÁKOVÁ, Irena. *Analýza kaseinů kravského mléka kapilární elektroforézou*. Brno, 2010. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická. Vedoucí práce RNDr. Milena Vespalcová, Ph.D.
- [52] LI, Yan, Miloš DVOŘÁK, Pavel N. NESTERENKO, Roger STANLEY, Nantana NUCHTAVORN, Lenka Kujovská KRČMOVÁ, Jana AUFARTOVÁ a Mirek MACKA. Miniaturised medium pressure capillary liquid chromatography system with flexible open platform design using off-the-shelf microfluidic components. *Analytica Chimica Acta*. 2015, **896**, 166-176. DOI: 10.1016/j.aca.2015.09.015. ISSN 00032670. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003267015011393>
- [53] KRČMOVÁ, Lenka, Anna STJERNLOF, Sebastien MEHLEN, Peter C. HAUSER, Silvija ABELE, Brett PAULL a Mirek MACKA. Deep-UV-LEDs in photometric detection: A 255 nm LED on-capillary detector in capillary electrophoresis. *Analyst*. 2009, **134**(12), 2394-2396. DOI: 10.1039/b916081g. Dostupné také z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=b916081g>
- [54] JOHNS, Cameron, Miroslav MACKA a Paul R. HADDAD. Design and performance of a light-emitting diode detector compatible with a commercial capillary electrophoresis instrument. *Electrophoresis*. 2004, **25**(18-19), 3145-3152. DOI: 10.1002/elps.200405913. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/elps.200405913>
- [55] JOHNS, Cameron, Miroslav MACKA, Paul R. HADDAD, Marion KING a Brett PAULL. Practical method for evaluation of linearity and effective pathlength of on-capillary photometric detectors in capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*. 2001, **927**(1-2), 237-241. DOI: 10.1016/S0021-9673(01)01095-0. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967301010950>

- [56] ČAPKA, Lukáš, Zbyněk VEČEŘA, Pavel MIKUŠKA, Jozef ŠESTÁK, Vladislav KAHLE a Alena BUMBOVÁ. A portable device for fast analysis of explosives in the environment. *Journal of Chromatography A*. 2015, **1388**(1), 167-173. DOI: 10.1016/j.chroma.2015.02.041. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967315002988>
- [57] SHARMA, Sonika, H. Dennis TOLLEY, Paul B. FARNSWORTH a Milton L. LEE LED-Based UV Absorption Detector with Low Detection Limits for Capillary Liquid Chromatography. *Analytical Chemistry*. 2015, **87**(2), 1381-1386. DOI: 10.1021/ac504275m. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac504275m>
- [58] ALHUSBAN, Ala, Michael BREADMORE a Rosanne GUIJT Capillary electrophoresis for monitoring bioprocesses. *Electrophoresis*. 2013, **34**(11), 1465-82. DOI: 10.1002/elps.201200646. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/elps.201200646>
- [59] LENA DO NASCIMENTO SILVA, Flamys, Eduardo Morgado SCHMIDT, Cláudio Luiz MESSIAS, Marcos Nogueira EBERLIN a Alexandra Christine HELENA FRANKLAND SAWAYA. Quantitation of organic acids in wine and grapes by direct infusion electrospray ionization mass spectrometry. *Anal. Methods* [online]. 2015, **7**(1), 53-62 [cit. 2016-04-26]. DOI: 10.1039/C4AY00114A. ISSN 17599660. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C4AY00114A>
- [60] CHIDI, Boredi S., Debra ROSSOUW a Florian F. BAUER Identifying and assessing the impact of wine acid-related genes in yeast. *Current Genetics*. 2016, **62**(1), 149-164. DOI: 10.1007/s00294-015-0498-6. ISSN 01728083. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00294-015-0498-6>
- [61] GAROFALO, C., M. EL KHOURY, P. LUCAS, M. BELY, P. RUSSO, G. SPANO a V. CAPOZZI Autochthonous starter cultures and indigenous grape variety for regional wine production. *Journal of Applied Microbiology* [online]. 2015, **118**(6), 1395-1408 [cit. 2016-04-26]. DOI: 10.1111/jam.12789. ISSN 13645072. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/jam.12789>
- [62] CHIDI, B. S., D. ROSSOUW, A. S. BUICA a F. F. BAUER Determining the Impact of Industrial Wine Yeast Strains on Organic Acid Production Under White and Red Wine-like Fermentation Conditions. *South African Journal of Enology* [online]. 2015, **36**(3), 316-327 [cit. 2016-04-26]. ISSN 0253939X.
- [63] ANTALICK, Guillaume, Marie-Claire PERELLO a Gilles DE REVEL. Characterization of Fruity Aroma Modifications in Red Wines during Malolactic Fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2012, **60**(50), 12371-12383 [cit. 2016-04-26]. DOI: 10.1021/jf303238n. ISSN 00218561. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf303238n>
- [64] GOMEZ, Federico J. V., Romina P. MONASTERIO, Verónica Carolina Soto VARGAS a María F. SILVA Analytical characterization of wine and its precursors by capillary electrophoresis. *ELECTROPHORESIS* [online]. 2012, **33**(15), 2240-2252 [cit. 2016-04-27]. DOI: 10.1002/elps.201100595. ISSN 01730835. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/elps.201100595>

- [65] VOLSCHENK, H., H.J.J. van VUUREN a M. VILJOEN-BLOOM Malic Acid in Wine: Origin, Function and Metabolism during Vinification. *South African journal for enology and viticulture / SAWWV, SASEV*. 2006, **27**(2). ISSN 0253-939x. Dostupné také z: <http://www.mendeley.com/research/malic-acid-wine-origin-function-metabolism-during-vinification/>
- [66] ESCARPA, Alberto, María Cristina GONZÁLEZ, Agustín González CREVILLÉN a Antonio Javier BLASCO. CE microchips: An opened gate to food analysis. *ELECTROPHORESIS* [online]. 2007, **28**(6), 1002-1011 [cit. 2016-04-27]. DOI: 10.1002/elps.200600412. ISSN 01730835. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/elps.200600412>
- [67] CAMILLERI, Patrick. *Capillary electrophoresis: theory and practice*. 2nd ed. Boca Raton, Fla.: CRC Press, 1998, 552 p. ISBN 084939127X.
- [68] ROVIO, Stella, Anna KALLIOLA, Heli SIRÉN a Tarja TAMMINEN. Determination of the carboxylic acids in acidic and basic process samples by capillary zone electrophoresis. *Journal of Chromatography A*. 2010, **1217**(8), 1407-1413. DOI: 10.1016/j.chroma.2009.12.032. ISSN 00219673. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967309018196>
- [69] DE VILLIERS, André, Frédéric LYNEN, Andrew CROUCH a Pat SANDRA. A robust capillary electrophoresis method for the determination of organic acids in wines. *European Food Research and Technology* [online]. 2003, **217**(6), 535-540 [cit. 2016-04-27]. DOI: 10.1007/s00217-003-0819-8. ISSN 14382377. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00217-003-0819-8>
- [70] ARELLANO, Michel, Pascal JOMARD, Said EL KADDOURI, Christine ROQUES, Françoise NEPVEU a François COUDERC. Routine analysis of short-chain fatty acids for anaerobic bacteria identification using capillary electrophoresis and indirect ultraviolet detection. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 2000, **741**(1), 89-100. DOI: 10.1016/S0378-4347(00)00066-9. ISSN 03784347. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378434700000669>
- [71] FORET, Frantisek. Capillary electrophoresis of small ions using complex formation and indirect detection. *ELECTROPHORESIS* [online]. 2009, **30**(1), 34-39 [cit. 2016-04-27]. DOI: 10.1002/elps.200900004. ISSN 01730835. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/elps.200900004>
- [72] ESTEVES, Valdemar I., Susana S.F. LIMA, Diana L.D. LIMA a Armando C. DUARTE Using capillary electrophoresis for the determination of organic acids in Port wine. *Analytica Chimica Acta*. 2004, **513**(1), 163-167. DOI: 10.1016/j.aca.2003.12.036. ISSN 00032670. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003267003016623>
- [73] SAENZ-LOPEZ, R., P. FERNANDEZ-ZURBANO a M.,T. TENA Development and validation of a capillary zone electrophoresis method for the quantitative determination of anthocyanins in wine. *Journal of Chromatography A* [online]. 2003, **990**(1-2), 247-258 [cit. 2016-04-28]. DOI: 10.1016/S0021-9673(02)02006-X. ISSN 00219673. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002196730202006X>

- [74] MORENO-ARRIBAS, M a M POLO. *Wine chemistry and biochemistry*. New York: Springer, 2009, 735 s. ISBN 9780387741185-.
- [75] MATO, Inés, Silvia SUÁREZ-LUQUE a José F. HUIDOBRO A review of the analytical methods to determine organic acids in grape juices and wines. *Food Research International*. 2005, **38**(10), 1175-1188. DOI: 10.1016/j.foodres.2005.04.007. ISSN 09639969. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996905000797>
- [76] ŠURANSKÁ, Hana. *Izolace, identifikace a charakterizace mikroflóry vína a vybraných potravin*. Brno, 2014. Dizertační práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická. Vedoucí práce Doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.
- [77] RIBÉREAU-GAYON, Pascal, Denis DUBOURDIEU a Bernard DONÈCHE. *Handbook of enology*. 2nd ed. Hoboken, NJ: John Wiley, 2006. ISBN 04-700-1037-1.
- [78] ALBILLOS, Silvia M., María D. BUSTO, Manuel PEREZ-MATEOS a Natividad ORTEGA. Analysis by capillary electrophoresis of the proteolytic activity of a *Bacillus subtilis* neutral protease on bovine caseins. *International Dairy Journal*. 2007, **17**(10), 1195-1200. DOI: 10.1016/j.idairyj.2007.02.003. ISSN 09586946. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0958694607000398>
- [79] VALENTI, B., R.I. PAGANO a M. AVONDO Effect of diet at different energy levels on milk casein composition of Girgentana goats differing in CSN1S1 genotype. *Small Ruminant Research*. 2011, **93**(2-3), 135–139. DOI: 10.1016/j.smallrumres.2011.11.013. ISSN 09214488. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0921448811004524>
- [80] KUČEROVÁ, Jitka, Eva NĚMCOVÁ ŠTÍPKOVÁ, Irena VRTKOVÁ, Josef DVOŘÁK, Jan FRELICH, Josef BOUŠKA a Miroslav MARŠÁLEK. The influence of markers CSN3 and ETH10 on milk production parameters in czech pied cattle. *Journal of Central European agriculture*. 2004, **5**(4), 303-308. ISSN 1332-9049. Dostupné také z: <http://jcea.agr.hr/volumes.php?lang=en&search=Article%3A211&field=title>
- [81] RECIO, Isidra, Lourdes AMIGO a Rosina LÓPEZ-FANDIÑO. Assessment of the quality of dairy products by capillary electrophoresis of milk proteins. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 1997, **697**(1-2), 231-242. DOI: 10.1016/S0378-4347(97)00085-6. ISSN 03784347. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378434797000856>
- [82] ŠNIRC, Július, Jozef GOLIAN, František BUŇKA, Leona BUŇKOVÁ, Margita ČANIGOVÁ, Karol HERLAN, Michaela ČERNÍKOVÁ a Vendula PACHLOVÁ. *Mlieko a mliečne výrobky*. První. Nitra: Slovenská poľnohospodárska univerzita, 2016, 254 s. ISBN 978-80-552-1451-1.
- [83] PHELAN, Martha, Aisling AHERNE, Richard J. FITZGERALD a Nora M. O'BRIEN Casein-derived bioactive peptides: Biological effects, industrial uses, safety aspects and regulatory status. *International Dairy Journal*. 2009, **19**(11),

643-654. DOI: 10.1016/j.idairyj.2009.06.001. ISSN 09586946. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0958694609001071>

- [84] MANSO, M.A., M. MIGUEL a R. LÓPEZ-FANDIÑO Application of capillary zone electrophoresis to the characterisation of the human milk protein profile and its evolution throughout lactation. *Journal of Chromatography A*. 2007, **1146**(1), 110-117. DOI: 10.1016/j.chroma.2007.01.100. ISSN 00219673. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002196730700180X>
- [85] GUBIC, Jasmina, Jelena TOMIC, Aleksandra TORBICA, Mirela ILICIC, Tatjana TASIC, Ljubisa SARIC a Sanja POPOVIC. Characterization of several milk proteins in Domestic Balkan donkey breed during lactation, using lab-on-a-chip capillary electrophoresis. *Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly*. 2016, **22**(1), 9-15. DOI: 10.2298/CICEQ150105013G. Dostupné také z: <http://www.doiserbia.nb.rs/Article.aspx?ID=1451-93721500013G>
- [86] COSTA, Fabiano Freire, Maria Aparecida VASCONCELOS PAIVA BRITO, Marco Antônio MOREIRA FURTADO, Marta Fonseca MARTINS, Marcene Augusto LEAL DE OLIVEIRA, Patrícia MENDONÇA DE CASTRO BARRA, Lourdes AMIGO GARRIDO a Alessa SIQUEIRA DE OLIVEIRA DOS SANTOS. Microfluidic chip electrophoresis investigation of major milk proteins: study of buffer effects and quantitative approaching. *Analytical Methods*. 2014, **6**(6), 1666-1673. DOI: 10.1039/c3ay41706a. Dostupné také z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=c3ay41706a>
- [87] SUTTON, J.D. Altering Milk Composition by Feeding. *Journal of Dairy Science*. 1989, **72**(10), 2801–2814. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(89)79426-1. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030289794261>
- [88] VARGA, Gabriella, A. a Virginia, A. ISHLER Managing Nutrition for Optimal Milk Components. In: *Western Dairy Management Conference* [online]. Reno, Nevada, USA, 2007, s. 1-14 [cit. 2016-06-16].
- [89] DEPETERS, E.J. a J.P. CANT Nutritional Factors Influencing the Nitrogen Composition of Bovine Milk: A Review. *Journal of Dairy Science*. 1992, **75**(8), 2043-2070. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(92)77964-8. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030292779648>
- [90] EMERY, R.S. Feeding For Increased Milk Protein. *Journal of Dairy Science*. 1978, **61**(6), 825-828. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(78)83656-X. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002203027883656X>
- [91] GRUMMER, R.R., M.L. LUCK a J.A. BARMORE Lactational performance of dairy cows fed raw soybeans, with or without animal by-product proteins, or roasted soybeans. *Journal of Dairy Science*. 1994, **77**(5), 1354-1359.
- [92] GEJDOŠOVÁ, Lucie. *Stanovení kaseinových frakcí v kravském mléce*. Brno, 2008. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická. Vedoucí práce RNDr. Milena Vespalcová, Ph.D.
- [93] BOMASTYK, Benjamin, Igor PETROVIC a Peter C. HAUSER Absorbance detector for high-performance liquid chromatography based on light-emitting

- diodes for the deep-ultraviolet range. *Journal of Chromatography A*. 2011, **1218**(1), 3750–3756. DOI: 10.1016/j.chroma.2011.04.039. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967311005383>
- [94] HOLLINGTON, D, J T BAIRD, T J SUMNER a P J WASS. Characterising and testing deep UV LEDs for use in space applications. *Classical and Quantum Gravity*. 2015, **32**(1), 1-19. DOI: 10.1088/0264-9381/32/23/235020. Dostupné také z: <http://stacks.iop.org/0264-9381/32/i=23/a=235020?key=crossref.a0c9b2592e8a20aaf4f82298c28b372a>
- [95] BUI, Duy Anh a Peter C. HAUSER Analytical devices based on light-emitting diodes – a review of the state-of-the-art. *Analytica Chimica Acta*. 2015, **853**(1), 46-58. DOI: 10.1016/j.aca.2014.09.044. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003267014011702>
- [96] RYVOLOVÁ, Markéta, Mirek MACKA, Jan PREISLER a Dermot BRABAZON. Portable capillary-based (non-chip) capillary electrophoresis. *Trends in Analytical Chemistry*. 2010, **29**(4), 339-353. DOI: 10.1016/j.trac.2009.12.010. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165993610000282>
- [97] YASHIN, Ya. I. a A. Ya. YASHIN Miniaturization of Gas-Chromatographic Instruments. *Journal of Analytical Chemistry*. 2001, **56**(9), 794–805. DOI: 10.1023/A:1016795926329. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1023/A:1016795926329>
- [98] SANDRON, S., B. HEERY, V. GUPTA et al. 3D printed metal columns for capillary liquid chromatography. *Analyst*. 2014, **139**(24), 6343-6347. DOI: 10.1039/c4an01476f. Dostupné také z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C4AN01476F>
- [99] DIFFEY, Brian L. Sources and measurement of ultraviolet radiation. *Methods*. 2002, **28**(1), 4-13. DOI: 10.1016/S1046-2023(02)00204-9. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1046202302002049>
- [100] SHIN, Joo-Yeon, Soo-Ji KIM, Do-Kyun KIM, Dong-Hyun KANG a C. A. ELKINS Fundamental Characteristics of Deep-UV Light-Emitting Diodes and Their Application To Control Foodborne Pathogens. *Applied and Environmental Microbiology*. 2016, **82**(1), 2-10. DOI: 10.1128/AEM.01186-15. Dostupné také z: <http://aem.asm.org/lookup/doi/10.1128/AEM.01186-15>
- [101] ROHRBASSER, Claude, Dominique RHÊME, Sylvain DÉCASTEL, Samuel ROTH, Maria de Lourdes Aja MONTES, Jean-Luc VEUTHEY a Serge RUDAZ. A New Capillary Electrophoresis Device with Deep UV Detector Based on LED Technology. *Chimia*. 2009, **93**(12), 890-891. DOI: 10.2533/chimia.2009.890. Dostupné také z: <http://openurl.ingenta.com/content/xref?genre=article>
- [102] BOMASTYK, Benjamin, Igor PETROVIC a Peter C. HAUSER Absorbance detector for high-performance liquid chromatography based on light-emitting diodes for the deep-ultraviolet range. *Journal of Chromatography A*. 2011, **1218**(24), 3750-3756. DOI: 10.1016/j.chroma.2011.04.039. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967311005383>
- [103] BUI, Duy Anh, Benjamin BOMASTYK a Peter C. HAUSER Absorbance detector based on a deep UV light emitting diode for narrow-column HPLC.

- Journal of Separation Science*. 2013, **36**(19), 3152-3157. DOI: 10.1002/jssc.201300598. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jssc.201300598>
- [104] NORIMICHI, Noguchi, Hideki HIRAYAMA, Tohru YATABE a Norihiko KAMATA. 222 nm single-peaked deep-UV LED with thin AlGaIn quantum well layers. *Physica Status Solidi (C) Current Topics in Solid State Physics*. 2009, **6**(2), 459-461. DOI: 10.1002/pssc.200880923. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/pssc.200880923>
- [105] GASKA, Ignas, Olga BILENKO, Saulius SMETONA, Yuri BILENKO, Remis GASKA a Michael SHUR. Deep UV LEDs for Public Health Applications. *International Journal of High Speed Electronics and Systems*. 2014, **23**(3-4), 1450018-1-1450018-10. DOI: 10.1142/S0129156414500189. Dostupné také z: <http://www.worldscientific.com/doi/abs/10.1142/S0129156414500189>
- [106] DICKENS, Jason E., Michael S. VAUGHN, Mervin TAYLOR a Mike PONSTINGL. An LED array-based light induced fluorescence sensor for real-time process and field monitoring. *Sensors and Actuators, B: Chemical*. 2011, **158**(1), 35-42. DOI: 10.1016/j.snb.2011.04.077. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0925400511003741>
- [107] KHIZAR, M., Z. Y. FAN, K. H. KIM, J. Y. LIN a H. X. JIANG Nitride deep-ultraviolet light-emitting diodes with microlens array. *Applied Physics Letters*. 2005, **86**(17), 1-3. DOI: 10.1063/1.1914960. Dostupné také z: <http://scitation.aip.org/content/aip/journal/apl/86/17/10.1063/1.1914960>
- [108] MACKA, Miroslav, Per ANDERSSON a Paul R. HADDAD Linearity evaluation in absorbance detection: The use of light-emitting diodes for on-capillary detection in capillary electrophoresis. *Electrophoresis*. 1996, **17**(12), 1898-1905. DOI: 10.1002/elps.1150171215. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/elps.1150171215>
- [109] RUZICKA, Jaromir a Elo Harald HANSEN. Retro-review of flow-injection analysis. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*. 2008, **27**(5), 390-393. DOI: 10.1016/j.trac.2008.03.004. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165993608000782>
- [110] BARAM, G.I. Portable liquid chromatograph for mobile laboratories I. *Aims. Journal of Chromatography A*. 1996, **728**(1-2), 387-399. DOI: 10.1016/0021-9673(95)01271-0. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0021967395012710>
- [111] BORING, C. Bradley, Purnendu K DASGUPTA a Anna SJÖGREN. Compact, field-portable capillary ion chromatograph. *Journal of Chromatography A*. 1998, **804**(1-2), 45-54. DOI: 10.1016/S0021-9673(98)00139-3. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967398001393>
- [112] WHITESIDES, George M. The origins and the future of microfluidics. *Nature*. 2006, **442**(7101), 368-373. DOI: 10.1038/nature05058. Dostupné také z: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature05058>

- [113] SNYDER, Lloyd R., J. J. KIRKLAND a John W. DOLAN *Introduction to modern liquid chromatography*. 3rd ed. Hoboken, NJ: John Wiley, 2010. ISBN 978-0-470-16754-0.

8 PUBLIKAČNÍ AKTIVITA AUTORA

Impaktované publikace a publikace v databázích Scopus, nebo Web of Science

YAN, L. ;**DVOŘÁK, M**; NESTERENKO, N., P.; STANLEY, R.; NUCHTAVORN, N.;KUJOVSKÁ-KRČMOVÁ, L.; AUFARTOVÁ, J.;MACKA, M. Miniaturised medium pressure capillary liquid chromatography system with flexible open platform design using off-the- shelf microfluidic components. *ANALYTICA CHIMICA ACTA*, 2015, roč. 896, č. 1, s. 166-176. ISSN: 0003-2670.

DVOŘÁK, M.; VESPALCOVÁ, M.; RITTICH, B. Screening of potencial use of the capillary zone electrophoresis method with indirect photometric detection for the monitoring of selected organic acids in fruit wine, and culture media for microbiological and biotechnological purposes. In CECE 2012. Brno: Ústav analytické chemie AV ČR,,v.v.i., 2012. s. 341-343. ISBN: 978-80-904959-1- 3.

DVOŘÁK, M.; VESPALCOVÁ, M.; RITTICH, B. DEVELOPMENT OF CAPILLARY ZONE ELECTROPHORESIS METHOD FOR MONITORING OF SELECTED ORGANIC ACIDS IN FERMENTED FOODS. *Chemické listy*. Praha: Česká společnost chemická, 2011. s. s1021 (s1021 s.)ISSN: 0009- 2770.

CHROBOKOVÁ, M.; ŠPANOVÁ, A.; RITTICH, B.; GREGUŠOVÁ, B.; TURKOVÁ, K.; **DVOŘÁK, M.** Fermentative hydrogen production by bacterial strain *Clostridium tyrobutyricum* S5. *Chemické listy*. Praha: Česká společnost chemická, 2011. s. s1014 (s1014 s.) ISSN: 0009- 2770.

Ústní prezentace

2015

Yan Li, **Miloš Dvořák**, Nantana Nuchtavorn, Pavel N. Nesterenko, Roger Stanley, Mirek Macka; Portable capillary LC as a flexible design modular system based on a microfluidic platform and designed with off-the-shelf components; HPLC 2015, Geneva Switzerland

Yan Li, **Miloš Dvořák**, Pavel N. Nesterenko, Roger Stanley, Nantana Nuchtavorn, Lenka Krcmova, Mirek Macka; *On-site and In-vivo Instrumentation and Applications*; Pacificchem 2015, Honolulu Hawaii, USA, 15-20 December 2015

Yan Li, **Miloš Dvořák**, Pavel N. Nesterenko, Roger Stanley, Nantana Nuchtavorn, Lenka Krcmova, Mirek Macka; *Portable LC: An 'open-platform' flexible modular capillary system based on a microfluidic platform and off-the-shelf components*, ISSS 2015, Ljubljana, Slovenia, 30 June – 5 July 2015

Yan Li, **Miloš Dvořák**, Pavel N. Nesterenko, Roger Stanley, Mirek Macka; Miniaturised medium pressure capillary liquid chromatography system with flexible open platform design using off-the-shelf microfluidic components, 23rd Annual RACI R&D Topics Analytical and Environmental Chemistry Conference 2015, Monday 7th December, University of Melbourne, Melbourne

DVOŘÁK, M.; YAN, L.; NUCHTAVORN, N.; NESTERENKO, N., P.; MACKA, M. Applicability and characterization of High Power Deep UV LEDs for miniaturized portable analytical devices. *Studentská odborná konference Chemie je život 2015 Sborník abstraktů*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2015. s. 79-79. ISBN: 978-80-214-5290- 9.

DVOŘÁK, M.; YAN, L.; NUCHTAVORN, N.; NESTERENKO, N., P.; MACKA, M. Applicability and characterization of High Power Deep UV LEDs for miniaturized portable analytical devices. *Studentská odborná konference Chemie je život 2015 Sborník příspěvků*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2015. s. 319-321. ISBN: 978-80-214-5290- 6.

2014

Mirek Macka, Pornpan Prapatpong, **Miloš Dvořák**, Yan Li, Petr Smejkal, Michael C. Breadmore, and Rosanne M. Guijt; *Low entry barrier microfluidics: a dream?* Analytix, Dalian China 2014,

Miloš Dvořák, Jana Aufartová, Lenka Kujovská Krčmová, Yan Li, Mirek Macka, *Microfluidics meets Portable LC*, 5 th Australia and New Zealand Nano/Microfluidics Symposium & Workshop, Hobart, 14-16 April 2014, Short Talk, 16 April 2014.

Mirek Macka, **Miloš Dvořák**, Jana Aufartová, Lenka Kujovská Krčmová, Yan Li, *Portable Capillary LC: A Modular Medium Pressure System Designed with off-the-Shelf Components*, Proc 38 th International Symposium on Capillary Chromatography, Riva del Garda, Italy, 18-23 May 2014, oral presentation.

Miloš Dvořák; *Low Cost and Rapid Bioanalytical Instrumentation and Methods used in Food Bioanalysis*; ACROSS gathering, Australian Centre for Research on Separation Sciences Annual Meeting July 24-25th 2014, Hobart Function and Conference Centre, Hobart, Tasmania, Australia.

Yan Li, **Miloš Dvořák**, Nantana Nuchtavorn, Pavel N. Nesterenko, Roger Stanley, Jana Aufartová, Lenka Kujovská-Krčmová, Mirek Macka; *Portable capillary LC: A modular medium pressure system based on a microfluidic platform and designed with off-the-shelf components*; In Book of proceedings 20th International Symposium on Separation Science ISSS 2014, Pardubice Radanal. 2014, August 30 - September 2, 2014, Prague.

Mirek Macka, Nantana Nuchtavorn, Yan Li, **Miloš Dvořák**, Pavel N. Nesterenko, Roger Stanley, *Miniaturized portable analysis and sample preparation: Synergies?*, 1st Caparica Sample Treatment Conference 2014, Lisbon, 8 – 12 December 2014, invited plenary talk.

2012

DVOŘÁK, M.; GREGUŠOVÁ, B.; ŠURANSKÁ, H.; TURKOVÁ, K.; POŘÍZKA, J.; VESPALCOVÁ, M.; RITTICH, B. Optimization of the capillary zone electrophoresis method with indirect photometry detection for monitoring of selected organic acid in biotechnological processes. In *Studentská odborná konference Chemie je život 2012 - Sborník příspěvků*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2012. s. 271-275. ISBN: 978-80-214-4644- 1.

DVOŘÁK, M.; VESPALCOVÁ, M.; RITTICH, B.; GREGUŠOVÁ, B.; DUBSKÝ, H. Development of laboratory equipment for cultivation of anaerobic microorganisms in inert atmosphere enabling capturing and sampling of gas and cultivation media. *Studentská odborná konference Chemie a společnost 2011/12 - Sborník příspěvků*. Purkyňova 464/118, 612 00 Brno, Vysoké učení technické v Brně, Fakulta Chemická. 2012. p. 59 - 63. ISBN 978-80-214-4425-6.

2010

DVOŘÁK, M.; VESPALCOVÁ, M.; RITTICH, B. *Analysis of casein content in cow milk*. Studentská odborná konference Chemie a společnost 2010 - Sborník příspěvků. 1. Purkyňova 464/118, 612 00 Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta Chemická, 2010. s. 115-120. ISBN: 978-80-214-4212- 2.

DVOŘÁK, M.; VESPALCOVÁ, M.; DVOŘÁKOVÁ, I.; MIČÍKOVÁ, I.; KRÍŽOVÁ, L. *Obsah kaseinů v kravském mléce v závislosti na složení krmiva*. 2010. Lékařská Fakulta, Masarykova univerzita, Studentská konference, soutěžní prezentace

2009

DVOŘÁK, M.; VESPALCOVÁ, M. Evaluation of applicability of indirect photometric detection for chiral separations of selected carboxylic acids in dairy products. STUDENTSKÁ ODBORNÁ KONFERENCE CHEMIE A SPOLEČNOST 2009 Sborník příspěvků. 1. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Purkyňova 464/118, 612 00 Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Purkyňova 464/118, 612 00 Brno, 2009. s. 54-54. ISBN: 978-80-214-3555- 1.

Posterové prezentace

2014

Miloš Dvořák, Yan Li, Jana Aufartová, Lenka Kujovská Krčmová, Mirek Macka, *Portable Medium Pressure Capillary LC Designed as a Modular System using Off-the-Shelf Components*, Proc. 38 th International Symposium on Capillary Chromatography, Riva del Garda, Italy, 18-23 May 2014, poster presentation No.425

Yan Li, **Miloš Dvořák**, Nantana Nuchtavorn, Pavel Nesterenko, Roger Stanley, Mirek Macka, *Portable Medium Pressure Capillary Liquid Chromatography Using Off-The-Shelf Components Based on a Modular Microfluidic System*, 20th International Symposium on Separation Sciences ISSS 2014, Prague, 30 August - 5 September **2014**, poster presentation

Miloš Dvořák, Yan Li, Nantana Nuchtavorn, Pavel Nesterenko, Roger Stanley, Mirek Macka, *The Potential of a Portable Modular Medium Pressure Liquid Chromatography System for In-Field Food Analysis*, 14 th International Nutrition and Diagnostics Conference INDC 2014, Prague, 2-5 September 2014, poster presentation No. P167

Yan Li, **Miloš Dvořák**, Nantana Nuchtavorn, Pavel Nesterenko, Roger Stanley, Mirek Macka, *Portable Medium Pressure Capillary Liquid Chromatography Using Off-The-Shelf Components Based on a Modular Microfluidic System*, 20th International Symposium on Separation Sciences ISSS 2014, Prague, 30 August - 5 September 2014, poster presentation

Miloš Dvořák, Yan Li, Nantana Nuchtavorn, Pavel N. Nesterenko, Mirek Macka; *New High Power Deep UV LED For Portable Analytical Devices*, 22rd Annual RACI R&D Topics Analytical and Environmental Chemistry Conference 2014, 13-15 December 2014, Flinders University, Adelaide, South Australia

Yan Li, **Miloš Dvořák**, Nantana Nuchtavorn, Pavel N. Nesterenko, Roger Stanley, Jana Aufartová, Lenka Kujovská-Krčmová, Mirek Macka; *Portable moderate pressure capillary liquid chromatography based on a modular microfluidic system using off-the-shelf components*, 22rd Annual RACI R&D Topics Analytical and Environmental Chemistry Conference 2014, 13-15 December 2014, Flinders University, Adelaide, South Australia, Australia

2015

Yan Li, **Miloš Dvořák**, Nantana Nuchtavorn, Pavel N. Nesterenko, Roger Stanley, Jana Aufartová, Lenka Kujovská-Krčmová, Mirek Macka; Portable medium pressure capillary liquid chromatography based on a modular microfluidic system using off-the-shelf components. *TECHNICAL PROGRAM AGENDA OF SESSIONS ABSTRACT PDF*. New Orleans, LA, USA: The Pittsburgh Conference on Analytical Chemistry and Applied Spectroscopy, Inc., 2015. s. 1209-1209.

Miloš Dvořák, Yan Li. Nantana Nuchtavorn, Pavel N. Nesterenko, Mirek Macka; New generation deep-UV LED for portable robust low cost optical detection in microfluidic and miniaturised analysis. *ANZNMF 2015 Program Schedule. Melbourne, Victoria, Australia: 6TH Australia and New Zealand Nano and Microfluidic Symposium, Melbourne Centre for Nanofabrication, 31 MARCH – 2 APRIL 2015., MELBOURNE, VICTORIA, AUSTRALIA*, s. 18-18. (**oceněno první cenou v poster sekci**)

DVOŘÁK, M.; YAN, L.; NUCHTAVORN, N.; NESTERENKO, N., P.; MACKA, M. New generation of Deep-UV-LEDs incorporated in portable robust low cost detectors for microfluidic and miniaturised analysis. In *CECE 2015 12th International Interdisciplinary Meeting on Bioanalysis. Brno: Institute of Analytical Chemistry of the CAS, v. v. i., Brno, Czech Republic, 2015*. s. 112-115. ISBN: 978-80-904959-3- 7.

2011

GREGUŠOVÁ, B.; **DVOŘÁK, M.**; DUBSKÝ, H.; RITTICH, B.; ŠPANOVÁ, A. Production of carboxylic acids by different strains of Clostridium. In *International Conference Applied Natural Sciences 2011 Papiernička - Častá, October 5 - 7 PROCEEDINGS*. Trnava: University of SS. Cyril and Methodius in Trnava, 2011. s. 325-329. ISBN: 978-80-8105-266- 8.

DVOŘÁK, M.; VESPALCOVÁ, M. *DETERMINATION OF MILK ALBUMINS - CASEINS IN DIFFERENT TYPE OF MILKS BY CAPILLARY ZONE ELECTROPHORESIS METHOD*. 11th International Nutrition & Diagnostics Conference, Abstract Book and Final Programme August 28 - 31. 2011. 1. Pardubice: Univerzita Pardubice, 2011. s. 105-105. ISBN: 978-80-7395-378- 2.

GREGUŠOVÁ, B.; **DVOŘÁK, M.**; DUBSKÝ, H.; RITTICH, B.; ŠPANOVÁ, A. *Clostridia from late-blowing cheese: Is the carboxylic acid production species-dependent?*. Brno: Masarykova univerzita, 2011. s. 70-70. ISBN: 978-80-210-5594- 0.

DVOŘÁK, M.; VESPALCOVÁ, M.; KŘÍŽOVÁ, L. Using of Capillary Electromigration Methods for Determination of Impact of Cows Diet Composition on the Production and Milk Caseins. ISEKI_ FOOD 2011 Bridging Training and Research for Industry and the Wider Community. první. Milano, Itálie: Escola Superior de Biotecnologia, Universita Católica Portuguesa, 2011. s. 169-169. ISBN: 978-88-9059-890- 6.

2010

DVOŘÁK, M.; VESPALCOVÁ, M. Vývoj metody pro stanovení kontaminujícího enantiomeru kyseliny mléčné v mléčných výrobcích. *Sborník příspěvků XXXVII. Symposia o nových směrech výroby a hodnocení potravin*, 2010, roč. 40, č. 1, s. 96-98. ISSN: 1802- 1433.

Diplomová a bakalářská práce:

DVOŘÁK, M. Posouzení aplikovatelnosti nepřímé fotometrické detekce k chirálním separacím vybraných karboxylových kyselin v mlékárenských výrobcích. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2009. 44 s. Vedoucí diplomové práce RNDr. Milena Vespalcová, Ph.D.

DVOŘÁK, M. *Vzorkování a odběry potravinářských vzorků*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2007. 35 s. Vedoucí bakalářské práce RNDr. Milena Vespalcová, Ph.D.