

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

**Přírodovědecká fakulta**

Katedra analytické chemie

---

**CHIRÁLNÍ SEPARACE ACYKlickÝCH NUKLEOSID  
FOSFONÁTŮ A STANOVENÍ ASOCIAČNÍCH KONSTANT  
JEJICH KOMPLEXŮ S CYKLODEXTRINŮ  
KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZOU**

**Chiral Separation of Acyclic Nucleoside Phosphonates  
and Determination of Association Constants of Their Complexes  
with Cyclodextrins by Capillary Electrophoresis**

Diplomová práce  
studijního programu Klinická a toxikologická analýza

Praha 2010

Hana Mikysková

Tato diplomová práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru AV0Z405506 a MSM0021620857.

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně, pod vedením školitele-garanta Doc. RNDr. Pavla Coufala, PhD., a školitele-specialisty, RNDr. Václava Kašičky, CSc., a že jsem všechny použité prameny řádně citovala.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze a Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i., je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity a Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i.

V Praze dne 1. května 2010.

.....

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala svému školiteli-specialistovi, RNDr. Václavu Kašíčkovi, CSc., a školiteli-garantovi, Doc. RNDr. Pavlu Coufalovi, PhD., za možnost pracovat v Laboratoři elektromigračních metod Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i, za odborné vedení při vypracování této práce, poskytnutí konzultací a za cenné rady a konstruktivní připomínky k textu.

Poděkování patří celému kolektivu Laboratoře elektromigračních metod za poskytnutí dobrého pracovního zázemí.

Mé poděkování patří také mé rodině za poskytnuté zázemí a trpělivost po celou dobu mého studia.

## Abstrakt

Kapilární elektroforéza byla využita pro chirální separaci acyklických nukleosid fosfonátů, které patří mezi nejvýznamnější již používaná nebo potenciální antivirotická léčiva. Pro enantioseparaci acyklických nukleosid fosfonátů byly jako chirální selektory použity nativní a derivatizované cyklodextriny:  $\alpha$ -cyklodextrin,  $\beta$ -cyklodextrin,  $\gamma$ -cyklodextrin, heptakis(2,6-dimethyl)- $\beta$ -cyklodextrin, 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyklodextrin a kvartérní amonium  $\beta$ -cyklodextrin. Nejvyššího rozlišení (*R,S*)-enantiomerů acyklických nukleosid fosfonátů bylo dosaženo v základním elektrolytu obsahujícím 35 mM tetraboritan sodný (pH 10) s přidavkem 17,6 mM  $\beta$ -cyklodextrinu nebo 10 mM kvartérního amonium  $\beta$ -cyklodextrinu.

Metodou kapilární elektroforézy byly stanoveny asociační konstanty komplexů enantiomerů acyklických nukleosid fosfonátů s výše uvedenými chirálními selektory cyklodextrinového typu. Asociační konstanty byly vypočítány nelineární regresní analýzou z experimentálně změřené závislosti efektivní pohyblivosti analytů na koncentraci chirálního selektoru v základním elektrolytu. Efektivní elektroforetické pohyblivosti acyklických nukleosid fosfonátů byly předem korigovány na referenční teplotu 25 °C.

**Předmětová slova:** analytická chemie, separační metody, kapilární elektromigrační metody, acyklické nukleosid fosfonáty.

**Klíčová slova:** asociační konstanta komplexu, kapilární elektroforéza, cyklodextriny, chirální separace

## Abstract

Capillary electrophoresis (CE) has been applied to the chiral separation of acyclic nucleoside phosphonates, which belong to the most important already registered or potential antiviral drugs. For enantioseparation of acyclic nucleoside phosphonates, the following native and derivatized cyclodextrins were used as chiral selectors:  $\alpha$ -cyclodextrin,  $\beta$ -cyclodextrin,  $\gamma$ -cyclodextrin, heptakis(2,6-dimethyl)- $\beta$ -cyclodextrin, 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin and quaternary ammonium  $\beta$ -cyclodextrin. The best resolution of (*R,S*)-enantiomers of acyclic nucleoside phosphonates was achieved in basic background electrolyte composed of 35 mM sodium tetraborate; pH 10, with addition of 17.6 mM  $\beta$ -cyclodextrin or 10 mM quaternary ammonium  $\beta$ -cyclodextrin chiral selectors.

Capillary electrophoresis has been employed for determination of association constants of complexes of acyclic nucleoside phosphonate enantiomers with above mentioned chiral selectors. The association constants were determined by nonlinear regression analysis from the experimentally measured dependence of effective electrophoretic mobilities of the analytes on concentration of the chiral selector in the background electrolyte. Prior to association constant calculation, the effective electrophoretic mobilities were corrected to reference temperature, 25 °C.

**Subject words:** analytical chemistry, separation methods, capillary electromigration methods, acyclic nucleoside phosphonates

**Keywords:** association constant, capillary electrophoresis, cyclodextrins, chiral separation

# OBSAH

<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....</b>	<b>- 8 -</b>
<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ.....</b>	<b>- 10 -</b>
<b>1 ÚVOD .....</b>	<b>- 12 -</b>
<b>2 VÝZKUMNÉ CÍLE .....</b>	<b>- 13 -</b>
<b>3 TEORETICKÁ ČÁST.....</b>	<b>- 14 -</b>
<b>3.1 ELEKTROFORETICKÁ POHYBLIVOST A ELEKTROOSMOTICKÝ TOK.....</b>	<b>- 14 -</b>
3.1.1 ELEKTROFORETICKÁ POHYBLIVOST .....	- 14 -
3.1.2 ELEKTROOSMOTICKÝ TOK.....	- 15 -
<b>3.2 DISPERZNÍ JEVY .....</b>	<b>- 16 -</b>
3.2.1 PODÉLNÁ DIFÚZE .....	- 17 -
3.2.2 JOULEOVO TEPLLO.....	- 17 -
3.2.3 ADSORPCE .....	- 18 -
3.2.4 ELEKTROMIGRAČNÍ DISPERZE .....	- 19 -
<b>3.3 SEPARAČNÍ ÚČINNOST A ROZLIŠENÍ .....</b>	<b>- 19 -</b>
3.3.1 SEPARAČNÍ ÚČINNOST .....	- 19 -
3.3.2 ROZLIŠENÍ.....	- 20 -
<b>3.4 KAPILÁRNÍ ELEKTROMIGRAČNÍ METODY .....</b>	<b>- 21 -</b>
3.4.1 KAPILÁRNÍ ZÓNOVÁ ELEKTROFORÉZA .....	- 22 -
3.4.2 KAPILÁRNÍ AFINITNÍ ELEKTROFORÉZA (ACE) .....	- 23 -
3.4.3 KAPILÁRNÍ GELOVÁ ELEKTROFORÉZA (CGE).....	- 24 -
3.4.4 KAPILÁRNÍ IZOTACHOFORÉZA (CITP).....	- 24 -
3.4.5 KAPILÁRNÍ IZOELEKTRICKÁ FOKUSACE (CIEF) .....	- 25 -
3.4.6 KAPILÁRNÍ MICELÁRNÍ ELEKTROKINETICKÁ CHROMATOGRRAFIE (MEKC) .....	- 25 -
3.4.7 KAPILÁRNÍ ELEKTROCHROMATOGRRAFIE (CEC) .....	- 26 -
<b>3.5 ASOCIAČNÍ KONSTANTA KOMPLEXU.....</b>	<b>- 27 -</b>
<b>3.6 METODY KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZY PRO STANOVENÍ ASOCIAČNÍCH KONSTANT ....</b>	<b>- 30 -</b>
<b>3.7 CYKLODEXTRINY.....</b>	<b>- 31 -</b>
3.7.1 ZÁKLADNÍ CHARAKTERISTIKY A VYUŽITÍ .....	- 31 -
3.7.2 CYKLODEXTRINY V NATIVNÍM STAVU .....	- 32 -
3.7.3 DERIVATIZOVANÉ CYKLODEXTRINY .....	- 33 -
3.7.4 POLYMERIZOVANÉ CYKLODEXTRINY .....	- 34 -
<b>3.8 ACYKLIČKÉ NUKLEOSID FOSFONÁTY.....</b>	<b>- 34 -</b>

<b>4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....</b>	<b>- 39 -</b>
<b>4.1 CHEMIKÁLIE .....</b>	<b>- 39 -</b>
<b>4.2 ANALYZOVANÉ LÁTKY .....</b>	<b>- 39 -</b>
<b>4.3 PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ.....</b>	<b>- 40 -</b>
<b>5 VÝSLEDKY A DISKUZE .....</b>	<b>- 41 -</b>
<b>5.1 CE SEPARACE (R,S)-ENANTIOMERŮ ANP A STANOVENÍ ASOCIAČNÍCH KONSTANT JEJICH KOMPLEXŮ S CHIRÁLNÍM SELEKTOREM <math>\beta</math>-CYKLODEXTRINEM .....</b>	<b>- 41 -</b>
5.1.1 CE SEPARACE (R,S)-ENANTIOMERŮ ANP .....	- 41 -
5.1.2 STANOVENÍ EFEKTIVNÍ POHYBLIVOSTI (R,S)-ENANTIOMERŮ ANP.....	- 45 -
5.1.2.1 <i>Korekce efektivní pohyblivosti na referenční teplotu 25 °C a konstantní viskozitu</i> .....	- 45 -
5.1.3 STANOVENÍ ASOCIAČNÍCH KONSTANT KOMPLEXŮ (R,S)-ENANTIOMERŮ ANP S $\beta$ -CD. ....	- 49 -
<b>5.2 CE SEPARACE (R,S)-ENANTIOMERŮ ANP A STANOVENÍ ASOCIAČNÍCH KONSTANT JEJICH KOMPLEXŮ S CHIRÁLNÍM SELEKTOREM QA-<math>\beta</math>-CD .....</b>	<b>- 52 -</b>
5.2.1 CE SEPARACE (R,S)-ENANTIOMERŮ ANP .....	- 52 -
5.2.2 STANOVENÍ EFEKTIVNÍ POHYBLIVOSTI (R,S)-ENANTIOMERŮ ANP.....	- 56 -
5.2.3 STANOVENÍ ASOCIAČNÍCH KONSTANT KOMPLEXŮ (R,S)-ENANTIOMERŮ ANP S QA- $\beta$ -CD. ....	- 58 -
<b>5.3 STANOVENÍ ASOCIAČNÍCH KONSTANT KOMPLEXŮ (R,S)-ENANTIOMERŮ HPMPG S DALŠÍMI CHIRÁLNÍMI SELEKTORY.....</b>	<b>- 61 -</b>
5.3.1 STANOVENÍ EFEKTIVNÍ POHYBLIVOSTI (R,S)-HPMPG .....	- 61 -
5.3.2 STANOVENÍ ASOCIAČNÍCH KONSTANT KOMPLEXŮ (R,S)-HPMPG S DALŠÍMI CHIRÁLNÍMI SELEKTORY .....	- 62 -
<b>5.4 STANOVENÍ ASOCIAČNÍCH KONSTANT KOMPLEXŮ (R,S)-ENANTIOMERŮ HPMPG S DALŠÍMI CHIRÁLNÍMI SELEKTORY.....</b>	<b>- 64 -</b>
5.4.1 STANOVENÍ EFEKTIVNÍ POHYBLIVOSTI (R,S)-HPMPG.....	- 64 -
5.4.2 STANOVENÍ ASOCIAČNÍCH KONSTANT KOMPLEXŮ (R,S)-HPMPG S DALŠÍMI CHIRÁLNÍMI SELEKTORY .....	- 65 -
<b>6 ZÁVĚR.....</b>	<b>- 67 -</b>
<b>POUŽITÁ LITERATURA.....</b>	<b>- 69 -</b>

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ACE	afinitní kapilární elektroforéza (affinity capillary electrophoresis)
ANP	acyklický nukleosid fosfonát (acyclic nucleoside phosphonate)
BGE	základní elektrolyt (background electrolyte)
CD	cyklodextrin/y
CE	kapilární elektroforéza (capillary electrophoresis)
CEC	kapilární elektrochromatografie (capillary electrochromatography)
CGE	kapilární gelová elektroforéza (capillary gel electrophoresis)
CIEF	kapilární izoelektrická fokusace (capillary isoelectric focusing)
CITP	kapilární izotachoforéza (capillary isotachopheresis)
CMC	kritická micelární koncentrace
CTAB	cetyltrimethylamoniumbromid
CZE	kapilární zónová elektroforéza (capillary zone electrophoresis)
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EOF	elektroosmotický tok (electroosmotic flow)
EKC	elektrokinetická chromatografie (electrokinetic chromatography)
FA	frontální analýza (frontal analysis)
FACCE	frontální analýza spojená s kapilární elektroforézou (frontal analysis continuous capillary electrophoresis)
FPMPA	9-[3-fluoro-2-(fosfonomethoxy)propyl]adenin
HD	Hummel-Dreyerova metoda (Hummel-Dreyer method)
HIV	lidský virus imunitní nedostatečnosti (Human immunodeficiency virus)
HPCE	vysoučinná kapilární elektroforéza (high-performance capillary electrophoresis)
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie (high-performance liquid chromatography)
HPMPA	9-[3-hydroxy-2-(fosfonomethoxy)propyl]adenin
HPMPC	9-[3-hydroxy-2-(fosfonomethoxy)propyl]cytosin
HPMPDAP	9-[3-hydroxy-2-(fosfonomethoxy)propyl]-2,6-diaminopurin
HPMPG	9-[3-hydroxy-2-(fosfonomethoxy)propyl]guanin
ID	vnitřní průměr (inner diameter)
MEKC	micelární elektrokinetická chromatografie (micellar electrokinetic chromatography)
NMR	nukleární magnetická resonance
PAG	polyakryamidový gel
PMEA	9-[2-(fosfonomethoxy)ethyl]adenin
PMPA	9-[2-(fosfonomethoxy)propyl]adenin
PMPDAP	9-[2-(fosfonomethoxy)propyl]-2,6-diaminopurin
QA- $\beta$ -CD	2,3,6-[2-hydroxypropyl-(3- <i>N</i> -trimethylamonium chlorid)]- $\beta$ -CD kvartérní amonium $\beta$ -CD



RNA	ribonukleová kyselina
S- $\beta$ -CD	sulfatovaný- $\beta$ -CD
SBE- $\beta$ -CD	sulfobutyl- $\beta$ -CD
SD	standardní odchylka (standard deviation)
SDS	dodecylsulfát sodný
SEE- $\beta$ -CD	sulfoethylether- $\beta$ -CD
UV	ultrafialová oblast světelného záření
VACE	vakantní afinitní kapilární elektroforéza (vacancy affinity capillary electrophoresis)
VIS	oblast viditelného světla
VP	metoda vakantního píku (vacancy peak method)

## SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ

$A$	analyt
$[A]$	rovnovážná koncentrace analytu [ $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ]
$a_A$	aktivita analytu
$a_{AC}$	aktivita komplexu analyt-chirální selektor
$a_C$	aktivita chirálního selektoru
$AC$	komplex analyt-chirální selektor
$[AC]$	rovnovážná koncentrace komplexu analyt-chirální selektor [ $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ]
$C$	chirální selektor
$[C]$	rovnovážná koncentrace chirálního selektoru [ $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ]
$c$	molární koncentrace [ $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ]
$c_A^0, c_C^0, c_{AC}^0$	standardní koncentrace složek A, C a AC
$c_{\text{opt}}$	optimální koncentrace chirálního selektoru při separaci enantiomerů [ $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ]
$D$	difúzní koeficient [ $\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ ]
$E$	intenzita elektrického pole [ $\text{V}\cdot\text{m}^{-1}$ ]
$F_e$	síla elektrického pole [N]
$F_f$	frikční síla prostředí [N]
$H$	výškový ekvivalent teoretického patra (HETP)
$I$	iontová síla roztoku
$k$	rychlostní konstanta vzniku komplexu
$k'$	rychlostní konstanta zániku komplexu
$k$	retenční faktor
$K_{AC}^0$	normalizovaná asociační konstanta
$K_{AC}$	stechiometrická asociační konstanta
$K_{AC}^{th}$	termodynamická asociační konstanta
$K_{AC,R}$	asociační konstanta komplexu <i>R</i> -enantiomeru s chirálním selektorem [ $\text{dm}^3\cdot\text{mol}^{-1}$ ]
$K_{AC,S}$	asociační konstanta komplexu <i>S</i> -enantiomeru s chirálním selektorem [ $\text{dm}^3\cdot\text{mol}^{-1}$ ]
$K_d$	disociační konstanta 1. řádu
$L_t$	celková délka kapiláry [m]
$L_{\text{eff}}$	efektivní délka kapiláry [m]
$m$	elektroforetická pohyblivost [ $\text{m}^2\cdot\text{V}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ ]
$m_A$	elektroforetická pohyblivost (mobilita) látky A [ $\text{m}^2\cdot\text{V}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ ]
$m_{AC}$	elektroforetická pohyblivost (mobilita) komplexu AC [ $\text{m}^2\cdot\text{V}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ ]
$m_{\text{eff}}$	efektivní elektroforetická pohyblivost [ $\text{m}^2\cdot\text{V}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ ]
$m_{\text{eff},A}$	efektivní elektroforetická pohyblivost látky A [ $\text{m}^2\cdot\text{V}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ ]
$m_{\text{eff},AC}$	efektivní elektroforetická pohyblivost komplexu analyt-chirální selektor [ $\text{m}^2\cdot\text{V}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ ]
$m_{\text{eff},R}$	efektivní elektroforetická pohyblivost látky <i>R</i> -enantiomeru [ $\text{m}^2\cdot\text{V}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ ]

$m_{eff,S}$	efektivní elektroforetická pohyblivost látky S-enantiomeru [ $m^2 \cdot V^{-1} \cdot s^{-1}$ ]
$m_{eof}$	pohyblivost markeru elektroosmotického toku [ $m^2 \cdot V^{-1} \cdot s^{-1}$ ]
$\Delta m$	rozdíl pohyblivostí
$\bar{m}$	průměrná elektroforetická pohyblivost [ $m^2 \cdot V^{-1} \cdot s^{-1}$ ]
$M_r$	relativní molekulová hmotnost
$N$	počet teoretických pater
$\bar{N}$	průměrný počet teoretických pater
$Q_J$	Jouleovo teplo
pH	záporný dekadický logaritmus aktivity vodíkových iontů
pI	izoelektrický bod
pKa	záporný dekadický logaritmus acidobazické disociační konstanty
$q$	náboj [C]
$r$	poloměr iontu [m]
$R_S$	rozlišení
$R$	elektrický odpor [ $\Omega$ ]
$t$	migrační čas [s]
$t_A$	migrační čas analytu [s]
$t_{EOF}$	migrační čas markeru elektroosmotického toku [s]
$U$	elektrické napětí [V]
$v$	rychlost migrace látky (iontu) v elektrickém poli [ $m \cdot s^{-1}$ ]
$v_{eof}$	rychlost elektroosmotického toku [ $m \cdot s^{-1}$ ]
$w$	šířka píku u základny
$w_{1/2}$	šířka píku v polovině výšky
$x_i$	molární zlomek i-té složky dané látky
$[\alpha]_D^{25}$	specifická rotace
$\gamma_A$	aktivitní koeficient analytu
$\gamma_{AC}$	aktivitní koeficient komplexu analyt-chirální selektor
$\gamma_C$	aktivitní koeficient chirálního selektoru
$\varepsilon$	permitivita prostředí [ $F \cdot m^{-1}$ ]
$\zeta$	elektrokinetický potenciál [V]
$\eta$	viskozita [ $N \cdot s \cdot m^{-2}$ ]
$\sigma$	standardní odchylka píku
$\sigma^2$	rozptyl
$\sigma_{ADS}^2$	rozptyl způsobený adsorpcí
$\sigma_{celk}^2$	celkový rozptyl
$\sigma_{DET}^2$	rozptyl způsobený detekcí
$\sigma_{DIF}^2$	rozptyl způsobený difúzí
$\sigma_{EMD}^2$	rozptyl způsobený elektromigrační disperzí
$\sigma_{INJ}^2$	rozptyl způsobený dávkováním
$\sigma_{TEPL}^2$	rozptyl způsobený teplotním gradientem

# 1 ÚVOD

Asociační (vazebná) konstanta charakterizuje sílu interakcí mezi dvěma látkami, které vytvářejí komplex, a tím i stabilitu tohoto komplexu. Stanovení asociačních konstant má velký význam pro charakterizaci interakcí biomolekul [1]. Doposud byly studovány různé afinitní interakce, jako např. léčivo-protein [2–6], protein-protein [7,8], protein-DNA [9,10], protein-sacharid [11], peptid-antibiotikum [12], antigen-protilátka [13], enzym-kofaktor [14], cyklodextrin-enantiomer [15–19] a další.

Znalost asociačních konstant je významná při chirálních separacích, kdy je možné ze vztahu mezi asociačními konstantami komplexů jednotlivých enantiomerů a koncentrací chirálního selektoru vypočítat optimální koncentraci selektoru vhodnou pro separaci enantiomerů.

Pro stanovení vazebných konstant se používá řada metod, jako např. elektroforetické a chromatografické metody [1,20–22], spektrofotometrie [23], kalorimetrie [24], potenciometrické metody [25,26] či NMR [27].

Kapilární elektroforéza (CE) má velký potenciál pro stanovení rovnovážných asociačních (disociačních) konstant molekulárních interakcí v roztoku (např. interakce molekul analytů s cyklodextriny, antibiotiky, proteiny, RNA, DNA, atd.). V CE můžeme asociační konstanty komplexů vypočítat ze závislosti jejich efektivní elektroforetické pohyblivosti na koncentraci ligandu v základním elektrolytu [22,28].

## 2 VÝZKUMNÉ CÍLE

Hlavním cílem diplomové práce bylo:

- provést chirální separace významných antivirotických léčiv – acyklických nukleosid fosfonátů kapilární elektroforézou s využitím cyklodextrinů jako chirálních selektorů
- stanovit asociační konstanty komplexů enantiomerů acyklických nukleosid fosfonátů s vybranými chirálními selektory cyklodextrinového typu kapilární elektroforézou (CE).

Dílčí cíle této práce byly:

- výběr vhodných chirálních cyklodextrinových selektorů pro separaci enantiomerů výše uvedených látek
- proměření závislosti rozlišení CE separací analyzovaných látek na koncentraci chirálního selektoru
- ze závislosti efektivní mobility analytů na koncentraci cyklodextrinu v základním elektrolytu vypočítat asociační konstanty komplexů těchto analytů s cyklodextriny.

## 3 TEORETICKÁ ČÁST

### 3.1 Elektroforetická pohyblivost a elektroosmotický tok

#### 3.1.1 Elektroforetická pohyblivost

Elektroforéza je založena na dělení nabitých částic ve volném roztoku nebo v gelu podle jejich elektroforetických pohyblivostí. Elektroforetická pohyblivost,  $m$ , je definována jako rychlost pohybu nabitých částic v kapalném prostředí ve stejnosměrném elektrickém poli o jednotkové intenzitě:

$$m = \frac{v}{E} \quad [\text{m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}] \quad (3.1)$$

kde  $v$  je rychlost iontu v elektrickém poli o intenzitě  $E$ . Intenzita pole v kapiláře je dána podílem připojeného napětí  $U$  a celkové délky kapiláry  $L_t$  (rovnice 3.2).

$$E = \frac{U}{L_t} \quad [\text{V} \cdot \text{m}^{-1}] \quad (3.2)$$

Elektroforetická migrace nabitých analytů probíhá v médiu, které je nazýváno základní elektrolyt (BGE). Vlastnosti BGE, jako jsou iontová síla, pH a typ přítomných iontů, jsou důležité pro migraci a separaci. Výsledný rovnoměrný pohyb iontů během separace v roztoku je výsledkem působení dvou sil, a to síly elektrického pole,  $F_e$ , (rovnice 3.3) a frikční síly prostředí,  $F_f$ , (rovnice 3.4).

$$F_e = q \cdot E \quad (3.3)$$

$$F_f = -6\pi \cdot \eta \cdot r \cdot v \quad (3.4)$$

kde  $q$  je náboj iontu,  $\eta$  je viskozita prostředí,  $r$  je poloměr iontu a  $v$  je rychlost pohybu iontu v roztoku. V ustáleném stavu se velikosti obou opačně orientovaných sil rovnají:

$$F_e = -F_f \quad (3.5)$$

$$q \cdot E = 6\pi \cdot \eta \cdot r \cdot v \quad (3.6)$$

Pro elektroforetickou pohyblivost můžeme odvodit vztah:

$$m = \frac{q}{6\pi \cdot \eta \cdot r} \quad (3.7)$$

Z rovnice 3.7 vyplývá, že mobilita iontu je přímo úměrná jeho náboji a nepřímo úměrná jeho poloměru (velikosti, relativní molekulové hmotnosti) a viskozitě roztoku.

Elektroforetické pohyblivosti jsou kvalitativními charakteristikami ionogenních látek pro dané prostředí a teplotu. Elektroforetická pohyblivost iontů silných elektrolytů vztažená k dané iontové síle a teplotě se nazývá aktuální pohyblivost. Elektroforetická pohyblivost iontů v nekonečně zředěném roztoku se nazývá limitní pohyblivost. Limitní pohyblivosti při teplotě 25 °C jsou tabelovány jako fyzikálně chemické konstanty iontů. V případě slabých elektrolytů je pohyblivost závislá na stupni jejich disociace a tudíž i na pH prostředí. Pohyblivost slabých elektrolytů vztažená k danému pH, iontové síle a teplotě separačního prostředí se nazývá efektivní pohyblivost. Efektivní elektroforetickou pohyblivost,  $m_{eff}$ , lze vypočítat z migračních časů analytu a markeru elektroosmotického toku:

$$m_{eff} = \frac{L_{eff} \cdot L_t}{U} \cdot \left( \frac{1}{t_A} - \frac{1}{t_{eof}} \right) \quad (3.8)$$

kde  $L_t$  je celková délka kapiláry,  $L_{eff}$  je efektivní délka kapiláry,  $t_A$  je migrační čas analytu a  $t_{eof}$  je migrační čas markeru elektroosmotického toku [29–31].

### 3.1.2 Elektroosmotický tok

Elektroosmotický tok (EOF) je elektrokinetický jev, při kterém působením vnějšího elektrického pole na prostorový náboj elektrické dvojvrstvy v kapalině dochází k pohybu této kapaliny [32]. Vznik elektrické dvojvrstvy je důsledkem selektivní adsorpce jednoho druhu iontů na stěnu kapiláry a/nebo disociace ionogenních skupin na vnitřním povrchu kapiláry (např. silanolových skupin v případě nejčastěji používaných křemenných kapilár). Adsorbované nebo disociací vzniklé ionty vytváří na stěně imobilizovanou část elektrické dvojvrstvy (Sternova vrstva), zatímco v její difúzní části směrem do roztoku zůstává přebytek volného náboje. Tím se v blízkosti stěny vytváří potenciální rozdíl, jehož část vyskytující se v difúzní oblasti elektrické dvojvrstvy se nazývá elektrokinetický potenciál nebo též zeta potenciál. Působením stejnosměrného pole v podélném směru kapiláry se uvádí do pohybu nejen difúzní část elektrické dvojvrstvy, ale i veškerý roztok přítomný v kapiláře. Elektroosmotický tok unáší všechny přítomné ionty stejnou rychlostí, tj. z hlediska separace působí jako neselektivní síla. Významně ovlivňuje výslednou migrační rychlost přítomných analytů a tím i účinnost separace a dobu analýzy [29,33].

Pro rychlost elektroosmotického toku,  $v_{eof}$ , a pro její velikost vztaženou na jednotkovou intenzitu elektrického pole, tzv. elektroosmotickou pohyblivost,  $m_{eof}$ , platí:

$$v_{eof} = m_{eof} \cdot E \quad (3.9)$$

$$m_{eof} = \frac{\varepsilon \cdot \zeta}{\eta} \quad (3.10)$$

kde  $\varepsilon$  je permitivita roztoku,  $\zeta$  je elektrokinetický potenciál a  $\eta$  je viskozita prostředí. Elektrokinetický potenciál je v podstatě určen povrchovou hustotou náboje na vnitřní stěně kapiláry. Jelikož disociace ionogenních silanolových skupin na vnitřním povrchu křemenných kapilár je závislá na pH roztoku, jímž je kapilára naplněna, je EOF v křemenných kapilárách silně závislý na pH nosného elektrolytu. Mezi pH 3 – 8 EOF několikanásobně (čtyřikrát až pětkrát) stoupá a elektroosmotická pohyblivost převyšuje elektroforetickou pohyblivost i rychlých malých iontů, např. chloridů.

Elektrokinetický potenciál a tudíž i elektroosmotický tok lze regulovat změnou složení nosného elektrolytu (pH, iontová síla), úpravou vnitřního povrchu kapiláry (kovalentní nebo dynamické povlaky) nebo též vnějším příčným polem.

Význačnou předností elektroosmotického toku ve srovnání s laminárním prouděním hydrodynamického toku je jeho téměř pravoúhlý rychlostní profil v celém průřezu kapiláry na rozdíl od parabolického rychlostního profilu hydrodynamického toku, takže jeho příspěvek k celkové disperzi zón je zanedbatelný [29].

### 3.2 Disperzní jevy

Působením disperzních jevů v CE dochází k rozšiřování zón analytů a k ovlivnění citlivosti a účinnosti separace. Mezi nejdůležitější disperzní jevy patří podélná difúze, změna teploty v důsledku Jouleova tepla, rozšíření zón v důsledku dávkování a detekce, elektromigrační disperze, nerovnoměrný EOF a interakce analytu se stěnou kapiláry.

Celkový rozptyl,  $\sigma_{celk}^2$ , je pak popisován jako suma jednotlivých rozptylů souvisejících s různými vlivy (rovnice 3.11).

$$\sigma_{celk}^2 = \sigma_{DIF}^2 + \sigma_{INJ}^2 + \sigma_{TEPL}^2 + \sigma_{ADS}^2 + \sigma_{DET}^2 + \sigma_{EMD}^2 + \dots \quad (3.11)$$

Indexy u jednotlivých rozptylů přísluší podélné difúzi, dávkování, teplotě, adsorpci, detekci a elektromigrační disperzi [31].



### 3.2.1 Podélná difúze

Nadávkovaný vzorek do separační kapiláry reprezentuje zónu analyzovaných látek, na jejímž rozhraní se vytvoří velmi ostrý skok koncentrací. Vlivem difúze je tento ostrý skok plynule rozmýván. Podélná difúze je jev, kdy dochází k rozmývání zón v důsledku koncentračního spádu. Za zjednodušujícího předpokladu, že dávkovaný vzorek tvoří v čase  $t = 0$  pravoúhlý tenký obdélníkový schod koncentrací analyzovaných látek, pak po určitém čase  $t$  jsou výsledkem difúze koncentrační profily „gaussovského“ tvaru. Můžeme je charakterizovat rozptylem  $\sigma^2$  nebo standardní odchylkou  $\sigma$ .

$$\sigma = \sqrt{2D \cdot t} \quad (3.12)$$

kde  $t$  je čas a  $D$  je difúzní koeficient [31,32,34].

### 3.2.2 Jouleovo teplo

Jouleovo teplo,  $Q_J$ , je teplo, které vzniká ve vodiči, jímž prochází elektrický proud,  $I$ , a na jehož koncích je napětí,  $U$ . Velikost Jouleova tepla můžeme vypočítat ze vztahu:

$$Q_J = U \cdot I = R \cdot I^2 = \frac{U^2}{R} \quad (3.13)$$

kde  $R$  je odpor vodiče.

Elektrický ohřev je hlavním limitujícím faktorem pro používání vysokého elektrického napětí, a tím i elektrických proudů a výkonů při snaze o zrychlení analýzy. Dvojnásobné zrychlení analýzy vyžaduje dvojnásobné napětí, ale tepelný výkon tím stoupne čtyřikrát. Jouleovým ohřevem se zvyšuje střední teplota zón, což ovlivňuje efektivní pohyblivost migrujících látek, ale může vést i k destrukci termolabilních separovaných látek, např. k denaturaci proteinů. Teplo vzniká v celém objemu sloupce elektrolytu, ale odváděno je jenom na okrajích, kde se elektrolyt stýká s chlazenými stěnami kapiláry. Z toho vyplývá, že vnitřní část sloupce je teplejší než okrajové části. Diference může být i více než 10 K. Přítomnost teplotního gradientu má za následek nehomogenitu dalších fyzikálně-chemických vlastností, jako jsou pohyblivost, pH, hustota atd.

Jouleovo teplo je možné omezit snížením intenzity elektrického pole, použitím kapiláry s menším vnitřním průměrem, používat pufr s nízkou iontovou silou a elektrickou vodivostí [31,32,34].

### 3.2.3 Adsorpce

Ionty separovaných látek interagují se stěnou separační kapiláry a tím dochází ke změnám migračního chování separovaných zón. Tato interakce negativně ovlivňuje separaci v CE. Rozptyl způsobený adsorpcí je dán rovnicí:

$$\sigma_{\text{ADS}}^2 = \frac{k \cdot v_{\text{eof}} L_{\text{eff}}}{(L_{\text{eff}} + k)^2} \cdot \left( \frac{r^2 \cdot k}{4D} + \frac{2}{K_d} \right) \quad (3.14)$$

kde  $k$  je retenční faktor a  $K_d$  je disociační konstanta 1. řádu. Rozptyl je závislý na hodnotě retenčního faktoru. Retenční faktor je definován jako:

$$k = \frac{t_r - t_0}{t_0} \quad (3.15)$$

kde  $t_r$  je migrační čas sorbujícího se analytu a  $t_0$  je migrační čas nesorbujícího se analytu [30,31].

Adsorpce je způsobena iontovými interakcemi mezi ionizovanými skupinami na povrchu křemenných kapilár a ionty analytu s opačným nábojem. V blízkosti stěn separační kapiláry dochází k hromadění iontů analytu a kapilára se vůči těmto iontům začne chovat jako iontoměnič, což vede ke zvýšené sorpci hlavně u makromolekul. Adsorpce vede k rozmývání separovaných zón, které se projevuje silným chvostováním zadního rozhraní. Fixace sorbované látky na stěnu kapiláry může být tak silná, že ji již nelze z kapiláry vymýt. Sorbované látky mohou zároveň změnit rozložení náboje podél stěn separační kapiláry, a tím i lokálně ovlivnit elektroosmotický tok.

Adsorpci můžeme omezit použitím základního elektrolytu o takovém pH, že stěny kapiláry i separované látky ponesou náboj stejného znaménka a budou se navzájem odpuzovat. Nejčastějším způsobem omezení adsorpce je deaktivace stěn kapilár. Stěny kapiláry můžeme pokrývat různými hydrofilními polymery typu alkylcelulos nebo polyakrylamidu. Tímto způsobem bývá zároveň snížen EOF během separace [32].

### 3.2.4 Elektromigrační disperze

Elektromigrační disperze způsobuje deformaci zóny analytu a nesymetrické rozšiřování zón. Elektrická vodivost v zónách separovaných látek se liší od vodivosti základního elektrolytu tak, jak se liší jejich pohyblivosti. Intenzita elektrického pole se tedy v jednotlivých zónách liší od intenzity elektrického pole v základním elektrolytu a zmíněná intenzita ovlivňuje pohyblivost jednotlivých analytů [32].

Pokud je pohyblivost analytů nižší než pohyblivost koiontu základního elektrolytu, vedoucí rozhraní zóny látky je ostré a koncové rozhraní podléhá rozmývání. Jestliže jsou pohyblivosti stejné, tak nedochází k deformaci zóny a má tvar „gaussovského“ píku. Má-li analyt pomalejší pohyblivost než koiont BGE, přední rozhraní zóny analytu podléhá rozmývání a koncové rozhraní je ostré [30].

Pro snížení elektromigrační disperze je tedy výhodné dávkovat vzorek o nízké koncentraci, ale tím vzrůstají nároky na citlivost detekce. Vliv elektromigrační disperze můžeme zanedbat, pokud koncentrace separovaných látek bude o 2 – 3 řády nižší, než je koncentrace základního elektrolytu [32].

## 3.3 Separační účinnost a rozlišení

### 3.3.1 Separační účinnost

Separační účinnost v CE je charakterizována počtem teoretických pater,  $N$ , který je definován:

$$N = \left( \frac{L_{eff}}{\sigma} \right)^2 \quad (3.16)$$

kde  $L_{eff}$  je efektivní délka kapiláry a  $\sigma$  je standardní odchylka píku. Počet teoretických pater můžeme vypočítat přímo z elektroferogramu podle vztahu:

$$N = 16 \left( \frac{t}{w} \right)^2 = 5.54 \left( \frac{t}{w_{1/2}} \right)^2 \quad (3.17)$$

kde  $t$  je migrační čas,  $w$  je šířka píku při základně a  $w_{1/2}$  je šířka píku v polovině výšky píku. Rovnici 3.17 můžeme použít pouze pro symetrické („gaussovské“) píky.

Pro charakterizaci separační účinnosti můžeme použít i výškový ekvivalent teoretického patra,  $H$ , pro který platí:

$$H = \frac{L_{eff}}{N} \quad (3.18)$$

Za ideálních podmínek (malý objem dávkovaného vzorku, omezení interakcí analytu se stěnou kapiláry, atd.), kdy je rozšiřování zóny analytu způsobeno podélnou difúzí, můžeme rozptyl detekované zóny vyjádřit následující rovnicí:

$$\sigma^2 = 2D \cdot t = \frac{2D \cdot L_{eff} \cdot L_t}{m \cdot U} \quad (3.19)$$

kde  $D$  je difúzní koeficient daného analytu,  $t$  je čas analýzy,  $L_{eff}$  a  $L_t$  je efektivní a celková délka kapiláry,  $m$  je mobilita sledovaného analytu a  $U$  je elektrické napětí. Dosazením rovnice 3.19 do rovnice 3.16 dostaneme základní elektroforetický vztah pro počet teoretických pater:

$$N = \frac{m \cdot U \cdot L_{eff}}{2D \cdot L_t} = \frac{m \cdot E \cdot L_{eff}}{2D} \quad (3.20)$$

Z rovnice 3.21 vyplývá, že počet teoretických pater je přímo úměrný použitému napětí v kapiláře a že velké molekuly s nízkými difúzní koeficienty budou vykazovat menší disperzi než malé molekuly [30,31].

### 3.3.2 Rozlišení

Rozlišení,  $R_s$ , charakterizuje míru vzájemné separace dvou látek. Obecně je rozlišení definováno vztahem:

$$R_s = \frac{2(t_2 - t_1)}{w_1 + w_2} = \frac{t_2 - t_1}{4\sigma} \quad (3.21)$$

kde  $t$  je migrační čas,  $w$  je šířka píku při základně a  $\sigma$  je standardní odchylka koncentrační distribuce. Rozlišení je bezrozměrná veličina. Rozdělení analytů může být dokonalé nebo nedokonalé. Dvě složky analyzované směsi jsou považovány za plně separované, pokud je jejich rozlišení větší nebo rovno 1,5.

Na základě výše zmíněných rovnic můžeme odvodit vztah mezi rozlišením a počtem teoretických pater:

$$R_s = \frac{1}{4} \left( \frac{\Delta m}{\bar{m}} \right) \sqrt{\bar{N}} \quad (3.22)$$

kde  $\Delta m$  je rozdíl mobility sledovaných analytů,  $\bar{m}$  je jejich průměrná pohyblivost a  $\bar{N}$  je průměrný počet teoretických pater [31].

### 3.4 Kapilární elektromigrační metody

Kapilární elektromigrační metody jsou účinné separační techniky, které jsou založené na rozdílné migraci iontů v tenké kapiláře naplněné základním elektrolytem působením elektrického pole.

Základní prací v oblasti elektromigračních metod je práce německého chemika F. Kohlrausche, který již v roce 1897 odvodil regulační funkci, která kvantitativně popisuje vztah mezi koncentrací iontů pohybujících se v elektrickém poli. K rozvoji kapilárních elektromigračních metod významně přispěli: Hjertén [35], Everaerts a Hoving-Keulemans [36] Virtanen [37], Mikkers [38], Jorgenson a Lukacsová [39–41], Terabe [42–44] a další. První automatický přístroj pro kapilární elektromigrační metody se na trhu objevil v roce 1987 pod názvem Microphoresis 1000 od firmy Microphoretic Systéms (Sunnyvale, CA, USA). V současnosti existuje více než 20 společností, které poskytují vybavení pro CE s různými úrovněmi automatizace a širokou nabídkou doplňků [30].

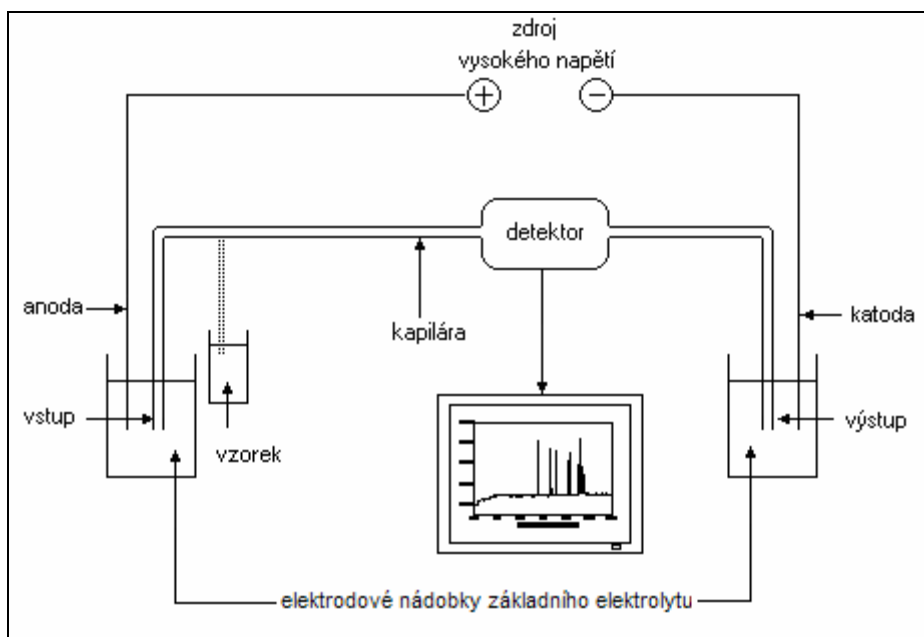
Kapilární elektromigrační metody patří dnes pro svou vysokou separační účinnost a citlivost mezi nejúčinnější a nejcitlivější analytické separační metody. Kapilární elektromigrační metody zahrnují sedm základních módů, které se od sebe liší typem média přítomného v separační kapiláře a vlastním mechanismem separace. Mezi základní kapilární elektromigrační metody patří kapilární zónová elektroforéza (CZE), kapilární izotachoforéza (CITP), kapilární izoelektrická fokusace (CIEF), gelová elektroforéza (CGE), afinitní elektroforéza (ACE), elektrokinetická chromatografie (EKC) a kapilární elektrochromatografie (CEC) [29,45].

Kapilární elektromigrační metody se využívají jak pro analýzu malých molekul (anorganické [46] a organické [47,48] ionty), tak pro analýzu středně velkých a velkých biomolekul (nukleotidy [49–52], nukleosidy [49,50,53], peptidy [54–57] proteiny [58], polysacharidy [59,60] či fragmenty nukleových kyselin [61]). Významné je využití kapilární elektroforézy v projektu sekvenace lidského genomu [62], v aplikacích proteomického [63], peptidomického [64] a metabolického výzkumu [65–69] nebo pro analýzy mikroorganismů [70] a jednotlivých buněčných organel [71,72].

### 3.4.1 Kapilární zónová elektroforéza

Kapilární zónová elektroforéza je principiálně nejjednodušší metodou z kapilárních elektromigračních metod, při které se jednotlivé ionogenní látky lišící se svými elektroforetickými pohyblivostmi oddělují v homogenním prostředí základního elektrolytu (BGE). Základní elektrolyt vede v podstatě všechen elektrický proud, který prochází kapilárou. Měl by mít dostatečnou pufrací kapacitu, nízkou absorpci světla (při použití přímé UV absorpční detekce) a nízkou vodivost (malý vývoj Jouleova tepla). Vodivost roztoku v kapiláře zůstává prakticky během celého separačního děje konstantní, a tudíž i elektrický potenciálový spád se během separace nemění.

Základní experimentální sestava pro kapilární zónovou elektroforézu je schématicky znázorněna na obrázku 3.1.



Obrázek 3.1: Schéma zařízení pro kapilární zónovou elektroforézu.

Po nadávkování vzorku do kapiláry se na kapiláru vloží elektrické napětí. Jednotlivé složky vzorku lišící se svými pohyblivostmi se v kapiláře pohybují různými elektroforetickými rychlostmi,  $v$ , směrem k detektoru. Kromě elektroforetického pohybu nabitých částic je celý objem roztoku uvnitř kapiláry uváděn do pohybu elektroosmotickým tokem o rychlosti  $v_{eof}$ . V křemenných kapilárách s chemicky nemodifikovaným vnitřním povrchem je tento tok orientován směrem ke katodě. Jeho

rychlost je relativně vysoká, takže výsledná rychlost kationtů a aniontů má stejný směr (katodický). CZE tedy umožňuje analyzovat anionty a kationty současně v průběhu jednoho experimentu.

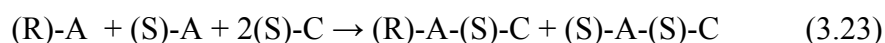
Pohyb zón vzorku v kapiláře je nejčastěji sledován pomocí UV-VIS absorpčního detektoru, tj. v určitém místě kapiláry je při zvolené vlnové délce měřena absorpce záření pohybujícího se nosného elektrolytu a zón analytu. Ze získaného záznamu časového průběhu absorpce, tzv. elektroforegramu, můžeme získat kvalitativní a kvantitativní informace o složení analyzovaného vzorku. Kvalita analytu je dána migračním časem jeho píku a kvantita analytu je přímo úměrná výšce resp. ploše jeho píku [29,32].

### 3.4.2 Kapilární afinitní elektroforéza (ACE)

Kapilární afinitní elektroforéza je nejpoužívanější CE metoda pro stanovení asociačních (vazebných) konstant. Principem ACE je změna elektroforetických pohyblivostí v závislosti na afinitních interakcích mezi ligandem a analytem. Afinitní interakce jsou zapříčiněny elektrostatickými vazbami, vodíkovými můstky, hydrofobním efektem a van der Walsovými interakcemi. Se zvyšující se koncentrací ligandu (chirálního selektoru) elektroforetická pohyblivost analytu postupně klesá [1,73].

Existují dva způsoby provádění ACE: obě složky analyt a ligand interagují v homogenním roztoku nebo je jedna ze složek imobilizována na stěnách kapiláry, v gelu či na chromatografickém nosiči. Technika prováděná v homogenním roztoku je rozšířenější, protože je aplikovatelná na široký rozsah analytů i separačních podmínek [74]. Výhody ACE jsou: potřeba malého množství analytu a ligandu, dávkovaný analyt nebo ligand nemusí být vysoce čistý a asociační konstanty několika analytů mohou být stanoveny současně [1].

ACE se často používá zejména v oblasti separace chirálních látek, kde dosahuje výrazných úspěchů [30]. Analýza chirálních látek je založena na tvorbě diastereomerních komplexů analytu (A) s chirálním selektorem (C) (rovnice 3.23).



Existují dva přístupy k analýze chirálních látek označované jako metody přímé a nepřímé. Nepřímé metody se vyznačují tvorbou diastereomerních konjugátů analytů jejich derivatizací před vlastní separací v achirálním prostředí. Nepřímé metody mají oproti přímým metodám výhodu v dosahování nízkých detekčních limitů a nevýhodu s problematickou validací derivatizace a možností tvorby vedlejších produktů (racemizace). Přímé metody jsou založené na dynamické tvorbě přechodných komplexů v průběhu vlastního separačního procesu. K tvorbě diastereomerních komplexů přispívají intermolekulární interakce chirálního selektoru a analytu, jako jsou coulombické atrakce, vodíkové vazby, interakce  $\pi$ - $\pi$ , interakce dipól-dipól, zapojení do kavity (dutiny) apod.

Jako chirální selektory se nejčastěji používají cyklodextriny a jejich elektroneutrální a ionogenní deriváty, crown ethery, proteiny, makrocyclická antibiotika, lineární oligosacharidy a polysacharidy, chirální micely a kalixareny [75,76].

### **3.4.3 Kapilární gelová elektroforéza (CGE)**

Kapilární gelová elektroforéza je kapilární zónová elektroforéza v síťovacích prostředích. Síťový efekt vykazují např. kovalentně prokřížované polyakrylamidové gely (PAG) a agarosové gely. Na základě nekovalentních interakcí vytvářejí síťový efekt i tzv. fyzikální gely, což jsou roztoky lineárních polymerů (lineární polyakrylamid, deriváty celulosy, dextran, polyoxyethylen, agarosa, aj.). Separačním principem této techniky je migrace nabitých částic v prostředí molekulárního síta vlivem vloženého potenciálního spádu. CGE slouží k separaci makromolekul (proteinů, fragmentů nukleových kyselin). Tyto látky mají rozdílnou relativní molekulovou hmotnost a velmi blízký či identický specifický náboj, a proto jejich elektromigrační separace probíhají v prostředích se síťovým efektem. Látky jsou oddělovány podle vzrůstajících relativních molekulových hmotností [29].

### **3.4.4 Kapilární izotachoforéza (CITP)**

Kapilární izotachoforéza je elektroforéza, ve které se elektrodový systém skládá ze dvou elektrolytů, tzv. vedoucího a koncového elektrolytu. Vzorek se nadávkuje do rozhraní mezi vedoucím a koncovým elektrolytem. Pohyblivost dělených iontů



(aniontů nebo kationtů) musí být intermediární vzhledem k pohyblivosti vedoucího iontu vedoucího elektrolytu a koncového iontu koncového elektrolytu. Protion vedoucího elektrolytu je volen tak, aby měl pufrací kapacitu při daném pH separace, protion koncového elektrolytu je do značné míry libovolný. Pokud k takto definovanému systému připojíme stejnosměrné elektrické pole, dojde po určitém čase k vytvoření tzv. ustáleného stavu, ve kterém jednotlivé ionty vzorku putují stejnou rychlostí v bezprostředně sousedících zónách s velmi ostrými rozhraními, jejichž ostrost se díky samozaostřujícímu efektu s časem nemění. Opustí-li ion vlivem difúze svou zónu a dostane se do zóny méně pohyblivých iontů, kde na něj působí větší gradient potenciálu, je zvýšením hnací síly ion vrácen zpět do své zóny. Opačným vlivem působí pokles gradientu potenciálu a tím i hnací síly, když se ion dostane do pohyblivější zóny [29,31].

### **3.4.5 Kapilární izoelektrická fokusace (CIEF)**

Izoelektrická fokusace umožňuje dělení amfoterních látek podle jejich izoelektrických bodů ( $pI$ ). Amfolyty mohou existovat ve formě kladně či záporně nabitých nebo elektroneutrálních částic. Typickým příkladem amfolytů jsou aminokyseliny, peptidy a proteiny. Elektromigrace probíhá v prostředí gradientu pH, který je vytvořen působením elektrického pole na komplexní směsi amfolytů, jež tvoří nosný elektrolyt metody. Dělené látky v tomto prostředí migrují a po určité době dojde k ustavení ustáleného stavu, ve kterém všechny amfolyty dosáhnou polohy v kapiláře, která odpovídá hodnotě jejich  $pI$ . Po dosažení ustáleného stavu je třeba fokusované zóny mobilizovat. Mobilizace se uskutečňuje buď hydrodynamickým tokem vyvolaným přetlakem nebo podtlakem u jednoho z konců kapiláry nebo elektroelucí. K přirozené mobilizaci zón dochází při IEF v přítomnosti elektroosmotického toku v křemenných kapilárách s neupraveným vnitřním povrchem [29,31].

### **3.4.6 Kapilární micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC)**

Kapilární micelární elektrokinetická chromatografie je kombinovanou separační technikou, která využívá jevy elektrokinetické (elektroforézu a elektroosmózu) i princip chromatografický, tj. distribuci analyzovaných látek mezi dvě fáze a relativní pohyb těchto fází vůči sobě. V MEKC je separace založena na rozdílné distribuci

analyzovaných látek mezi pseudofází tvořenou micelami a vodnou fází roztoku nosného elektrolytu. Vodnou fází nosného elektrolytu lze považovat za fází mobilní a micelární fází za fází pseudostacionární. MEKC používá základní elektrolyt s vhodnou povrchově aktivní látkou v koncentraci vyšší, než je tzv. kritická micelární koncentrace (CMC).

Povrchově aktivní látka se v koncentracích nižších než CMC chová jako normální elektrolyt. Po překročení určité mezní koncentrace (CMC) dojde ke tvorbě agregátů - micel. V hydrofilním (vodném) prostředí základního elektrolytu se orientují hydrofobní řetězce povrchově aktivních látek dovnitř micely, zatímco hydrofilní skupiny jsou orientovány vně do vodného prostředí. V takto vytvořeném hydrofobním jádře micely se mohou rozpouštět hydrofobní částice ze vzorku. Povrchově aktivní látka může být kationická (CTAB), anionická (SDS) nebo neionogenní (octylglukosid). Aplikací stejnosměrného elektrického pole na kapiláru dojde k migračnímu toku micel a k elektroosmotickému toku prostředí, který má zpravidla opačný směr a větší velikost. Výsledný separační princip je tedy složen z migrace částice ve volném roztoku a z distribuce částice mezi volným roztokem a micelární pseudofází. Tato technika umožňuje separovat i elektroneutrální látky [29,31].

### **3.4.7 Kapilární elektrochromatografie (CEC)**

Kapilární elektrochromatografie je technika analogická vysokoúčinné kapilární chromatografii (HPLC). V CEC existují dva základní typy kapilárních kolon: náplňové a povrchově modifikované. U náplňových kolon je kapilára naplněna příslušnou stacionární fází zcela nebo po detekční okénko. U povrchově modifikovaných kolon je stacionární fáze kovalentně uchycena na vnitřní stěnu, nebo je v kapiláře udržována adsorpcí. Separační prostor je tvořen plněnou kapilární kolonou, jejíž nosič představuje stacionární fází. Zatímco v HPLC je pohyb mobilní fáze způsoben tlakovým rozdílem, u CEC je tok mobilní fáze vyvolán aplikací stejnosměrného elektrického pole, které je připojeno k oběma koncům kapiláry ponořeným do roztoku mobilní fáze v elektroodových nádobkách. Tok mobilní fáze u CEC je totožný s elektroosmotickým tokem. CEC má proti HPLC výhodu, že elektroosmotický tok mobilní fáze má pravoúhlý rychlostní profil, což umožňuje dosahovat při separacích několikanásobně vyšší účinností. V CEC můžeme díky absenci zpětného tlaku kolony užít menší částice sorbentu než v HPLC [29,33].

### 3.5 Asociační konstanta komplexu

Asociační (afinitní, vazebná, stabilitní, komplexační) konstanta charakterizuje vznik a sílu nekovalentní vazby mezi analytem a komplexačním činidlem. Asociační konstanta je důležitým parametrem popisujícím vznik komplexu analyt-chirální selektor z volného analytu a chirálního selektoru. Znalost asociačních konstant je důležitá při výběru vhodných separačních podmínek. Schématicky můžeme vznik tohoto komplexu v poměru 1:1 (analyt : chirální selektor) vyjádřit:



kde A je analyt, C je chirální selektor a AC je komplex analyt-chirální selektor.

Bezrozměrnou termodynamickou asociační konstantu,  $K_{AC}^{th}$ , můžeme vyjádřit:

$$K_{AC}^{th} = \frac{k}{k'} = \frac{a_{AC}}{a_A \cdot a_C} \quad (3.25)$$

kde  $k$  a  $k'$  jsou rychlostní konstanty vzniku a zániku komplexu AC (popsaném rovnicí 3.24),  $a_{AC}$ ,  $a_A$  a  $a_C$  jsou aktivity A, C a AC v rovnováze. Pro vznik komplexu musí být splněny následující předpoklady: složky A a C vstupují do reakce v jedné chemické formě a složky A, C a AC nepodléhají jiným reakcím. Z rovnic 3.24 a 3.25 je patrné, že silnější interakce mezi A a C zvyšují stabilitu komplexu AC a tím i asociační konstantu  $K_{AC}^{th}$  [21,77].

Aktivita složky souvisí s její koncentrací v roztoku. Pro složky A, C a AC platí:

$$a_A = \frac{[A]}{c_A^0} \cdot \gamma_A \quad (3.26a)$$

$$a_C = \frac{[C]}{c_C^0} \cdot \gamma_C \quad (3.26b)$$

$$a_{AC} = \frac{[AC]}{c_{AC}^0} \cdot \gamma_{AC} \quad (3.26c)$$

kde [A], [C] a [AC] jsou rovnovážné molární koncentrace,  $c_A^0$ ,  $c_C^0$  a  $c_{AC}^0$  jsou standardní koncentrace složek A, C a AC, jejichž hodnota se obvykle volí  $1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ .  $\gamma_A$ ,  $\gamma_C$  a  $\gamma_{AC}$  jsou aktivní koeficienty složek A, C a AC. Aktivní koeficienty jsou bezrozměrné veličiny a udávají aktivity příslušných složek v roztoku za standardních podmínek. Standardní podmínky jsou teplota 25 °C a tlak 0,1 MPa.

Vedle termodynamické asociační konstanty,  $K_{AC}^{th}$ , můžeme definovat stechiometrickou (zdánlivou) asociační konstantu,  $K_{AC}$ , a normalizovanou asociační konstantu,  $K_{AC}^0$ , pro které platí:

$$K_{AC} = \frac{[AC]}{[A] \cdot [C]} \quad (3.27)$$

$$K_{AC}^0 = \frac{[AC]}{[A] \cdot [C]} \cdot \frac{c_A^0 \cdot c_C^0}{c_{AC}^0} = K_{AC} \cdot \frac{c_A^0 \cdot c_C^0}{c_{AC}^0} \quad (3.28)$$

Kombinací rovnic 3.25-3.28 můžeme pro termodynamickou asociační konstantu odvodit vztah:

$$K_{AC}^{th} = K_{AC}^0 \cdot \frac{\gamma_{AC}}{\gamma_A \cdot \gamma_C} = K_{AC} \cdot \frac{c_A^0 \cdot c_C^0}{c_{AC}^0} \cdot \frac{\gamma_{AC}}{\gamma_A \cdot \gamma_C} = \frac{[AC]}{[A] \cdot [C]} \cdot \frac{c_A^0 \cdot c_C^0}{c_{AC}^0} \cdot \frac{\gamma_{AC}}{\gamma_A \cdot \gamma_C} \quad (3.29)$$

Stechiometrická asociační konstanta  $K_{AC}$  je založena na rovnovážné koncentraci složek A, C a AC za daných experimentálních podmínek. Hodnota  $K_{AC}$  závisí na teplotě, tlaku a na iontové síle roztoku. Tuto konstantu můžeme jednoduše stanovit. Stechiometrická asociační konstanta má jednotky  $\text{dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$ . Použitím standardních koncentrací složek A, C a AC můžeme ze stechiometrické asociační konstanty vypočítat normalizovanou asociační konstantu  $K_{AC}^0$ . Normalizovaná asociační konstanta je bezrozměrná. Normalizací rovnovážných koncentrací eliminujeme závislost asociační konstanty na tlaku. Její závislost na teplotě a na iontové síle roztoku přetrvává. Závislost na iontové síle je odstraněna při použití  $K_{AC}^{th}$  (rovnice 3.25 nebo 3.29). Termodynamickou asociační konstantu je velmi obtížné stanovit, protože neznáme aktivitní koeficienty jednotlivých složek v soustavě [21].

Látka, přítomná v roztoku ve více formách, které jsou navzájem v rychlé dynamické rovnováze, migruje ve elektrickém poli jako jediná látka o určité efektivní pohyblivosti,  $m_{eff}$  [78]. Efektivní pohyblivost můžeme vyjádřit:

$$m_{eff} = \sum_i m_i \cdot \frac{c_i}{c} = \sum_i m_i \cdot x_i \quad (3.30)$$

kde  $m_i$  je iontová pohyblivost i-té složky přítomné v roztoku v rovnovážné koncentraci  $c_i$ ,  $x_i$  je molární zlomek i-té složky dané látky přítomné v roztoku. Z rovnice 3.24, ve které jsou  $[A]$  a  $[AC]$  rovnovážné koncentrace volného a vázaného analytu A, platí:

$$c = [A] + [AC] \quad (3.31)$$

Jestliže  $m_A$  a  $m_{AC}$  jsou iontové pohyblivosti volného a vázaného analytu, můžeme efektivní pohyblivost analytu A vyjádřit jako:

$$m_{eff,A} = \frac{[A]}{c} \cdot m_A + \frac{[AC]}{c} \cdot m_{AC} \quad (3.32)$$

Použitím rovnice 3.27 a 3.31 dostaneme:

$$m_{eff,A} = \frac{1}{1 + K_{AC} \cdot [C]} \cdot m_A + \frac{K_{AC} \cdot [C]}{1 + K_{AC} \cdot [C]} \cdot m_{AC} \quad (3.33)$$

Pro analyt A skládající se z enantiomeru  $R$  a  $S$ , můžeme rovnici 3.33 přepsat do tvaru:

$$m_{eff,R} = \frac{1}{1 + K_{AC,R} \cdot [C]} \cdot m_A + \frac{K_{AC,R} \cdot [C]}{1 + K_{AC,R} \cdot [C]} \cdot m_{AC,R} \quad (3.34a)$$

$$m_{eff,S} = \frac{1}{1 + K_{AC,S} \cdot [C]} \cdot m_A + \frac{K_{AC,S} \cdot [C]}{1 + K_{AC,S} \cdot [C]} \cdot m_{AC,S} \quad (3.34b)$$

Pohyblivosti enantiomerů  $R$  a  $S$ ,  $m_R$ , a,  $m_S$ , naměřené bez přítomnosti chirálního selektoru jsou identické s pohyblivostí analytu A,  $m_A$ . Rozdílné mobility komplexů RC a SC vyplývají z rozdílu jejich asociačních konstant a tvarů.

Výpočet asociačních konstant je důležitý u chirálních separací, kdy je třeba získat maximální možný rozdíl mobilit komplexů chirálního selektoru s enantiomery. Z asociačních konstant komplexů enantiomerů můžeme vypočítat optimální koncentraci chirálního selektoru,  $c_{opt}$ , při které je rozdíl mobilit komplexů s enantiomery nejvyšší [21].

$$c_{opt} = (K_{AC,R} \cdot K_{AC,S})^{-0.5} \quad (3.35)$$

### 3.6 Metody kapilární elektroforézy pro stanovení asociačních konstant

Stanovení asociačních konstant pomocí CE má několik výhod, např. malé množství vzorku nutné pro stanovení, rychlost analýzy, vysoká účinnost a vysoká rozlišovací schopnost. V CE existuje několik metod pro stanovení asociačních konstant, např. afinitní kapilární elektroforéza (ACE), Hummel-Dreyerova metoda (HD), vakantní afinitní kapilární elektroforéza (VACE), metoda vakantního píku (VP) a frontální analýza (FA), frontální analýza spojená s kapilární elektroforézou (FACCE). CE metody používané pro stanovení asociačních konstant a jejich pracovní postup jsou shrnuty v tabulce 3.1 [1]. Principy těchto metod jsou popsány v následujících publikacích [1,5,21,79–82].

Tabulka 3.1: Přehled CE metod používaných pro stanovení asociačních konstant komplexu (A, analyt, C, chirální selektor) [1].

metoda	vzorek	roztok	stanovení $K_{AC}$
ACE	A C	pufř + C pufř + A	změna mobility A změna mobility C
VACE	pufř	pufř + A + C	změna mobility A nebo C (vakantní pík)
HD	pufř + A + C	pufř + A (nebo C)	plocha vakantního píku odpovídá [AC]
VP	pufř	pufř + A + C	plocha vakantního píku odpovídá [A]
FA	pufř + A + C	pufř	výška píku odpovídá [A]
FACCE	pufř + A + C	pufř	výška píku odpovídá [A]

Stanovení asociačních konstant provádíme v sérii experimentů, kde koncentrace jedné složky je konstantní a koncentrace druhé složky se mění. Asociační konstanty můžeme vypočítat z elektroforetických pohyblivostí nebo koncentračního poměru vázaného a volného analytu. Doposud byly studovány různé afinitní interakce, jako např. léčivo-protein [2–6], protein-protein [7,8], protein-DNA [9,10], protein-sacharid [11], peptid-antibiotikum [12], antigen-protilátka [13], enzym-kofaktor [14], cyklodextrin-enantiomer [15–19] a další [1].

## 3.7 Cyklodextriny

### 3.7.1 Základní charakteristiky a využití

Cyklodextriny (CD) jsou cyklické oligosacharidy skládající se z D-glukopyranosových jednotek spojených  $\alpha$ -(1,4)-O-glykosidovou vazbou. CD obsahují 6 až 13 D-glukopyranosových jednotek. CD mají tvar komolého kužele s hydrofóbní dutinou, která umožňuje vytvářet diastereomerní inkluzní komplexy s nepolárními analyty. Vnější část dutiny je hydrofilní díky přítomnosti hydroxylových skupin. CD vytvářejí s řadou látek inkluzní komplexy, které jsou stabilizovány sekundárními vazbami mezi okrajem CD a funkčními skupinami analytu. Hydroxylové skupiny mohou být snadno upraveny chemickou reakcí s různými funkčními skupinami [16,30,76]. Každá D-glukosová jednotka obsahuje pět asymetrických uhlíků, z čehož vyplývá, že cyklodextrinový makrocyklus je chirální [83].

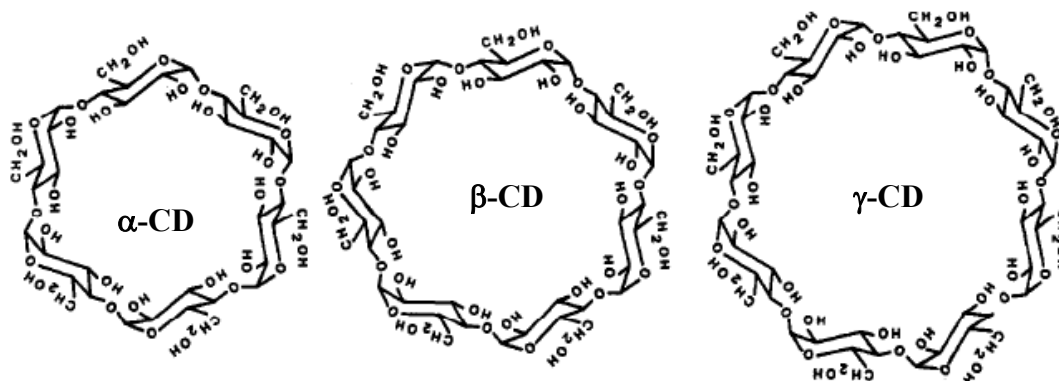
CD byly poprvé připraveny v roce 1891 Villiersem degradací škrobu pomocí bakterie *Bacillus amylobacter*. Schardinger položil základ cyklodextrinové chemii v roce 1903 a identifikoval  $\alpha$ - a  $\beta$ -CD. Freudenberg objevil  $\gamma$ -CD v roce 1935. Chemická struktura  $\alpha$ -,  $\beta$ - a  $\gamma$ -CD byla objasněna v roce 1938 Freudenbergem a jeho kolegy. Cramer v roce 1954 objevil schopnost CD tvořit inkluzní komplexy [84]. CD a jejich deriváty byly rozsáhle prozkoumány a použity pro chirální separaci velkého počtu analytů, hlavně ve farmacii [85].

CD často používáme pro chirální separace, protože jsou dobře rozpustné ve vodných roztocích, mají nízkou toxicitu a nízkou absorpci záření v UV oblasti. CD a jejich deriváty jsou v současné době nejčastěji používanými chirálními selektory v CE. CD se používají v nativní, chemicky modifikované (derivatizované) a polymerizované formě [16,76].

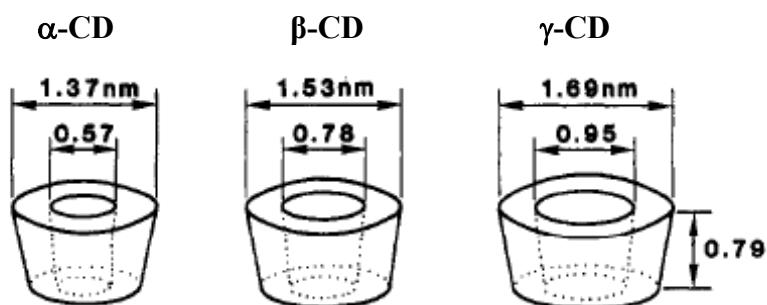
CD mají široké uplatnění, např. ve farmaceutickém, kosmetickém, potravinářském a chemickém průmyslu, v chemii životního prostředí a analytické chemii [86].

### 3.7.2 Cyklodextriny v nativním stavu

Mezi nativní CD patří  $\alpha$ -,  $\beta$ - a  $\gamma$ -CD, které obsahují 6, 7 a 8 D-glukopyranosových jednotek [30,83,87]. Chemická struktura a molekulární rozměry  $\alpha$ -,  $\beta$ - a  $\gamma$ -CD jsou na obrázku 3.2 a 3.3.



Obrázek 3.2: Chemická struktura  $\alpha$ -cyklodextrinu,  $\beta$ -cyklodextrinu a  $\gamma$ -cyklodextrinu [30].



Obrázek 3.3: Molekulární rozměry  $\alpha$ -cyklodextrinu,  $\beta$ -cyklodextrinu a  $\gamma$ -cyklodextrinu [30].

Tyto CD mají rozdílné rozměry dutiny, rozpustnost a relativní molekulovou hmotnost. Přehled vlastností nativních CD je uveden v tabulce 3.2. Rozpustnost nativních CD závisí na počtu D-glukopyranosových jednotek a může být zvýšena přidávkem močoviny, alkoholu nebo jiného organického rozpouštědla mísitelného s vodou [76,88]. Z nativních CD je nejméně rozpustný  $\beta$ -CD [83]. Nativní  $\alpha$ -,  $\beta$ - a  $\gamma$ -CD jsou neutrální téměř v celém pH rozsahu používaném v CE [30].



Tabulka 3.2: Přehled vlastností nativních cyklodextrinů (podle [83,89,90]).

	$\alpha$ -cyklodextrin	$\beta$ -cyklodextrin	$\gamma$ -cyklodextrin
Počet glukózových jednotek	6	7	8
Počet hydroxylových skupin	18	21	24
Počet primárních hydroxylů	6	7	8
Počet sekundárních hydroxylů	12	14	16
Relativní molekulová hmotnost	972	1135	1297
Vnitřní průměr dutiny (mm)	0,57	0,78	0,95
Vnější průměr dutiny (mm)	1,37	1,53	1,69
Hloubka dutiny (mm)	0,79	0,79	0,79
Objem dutiny (nm <sup>3</sup> )	0,176	0,346	0,510
Počet molekul vody v kavitě	5	11	17
Bod tání (K)	551	572	540
Rozpustnost ve vodě při 25°C (g/100 ml)	14,5	1,85	23,2
pK <sub>a</sub> rozpětí hydroxylových skupin	12,1 – 12,6	12,1 – 12,6	12,1 – 12,6
Specifická rotace $[\alpha]_D^{25}$	+150,5	+162,0	+177,4
Hustota (g/cm <sup>3</sup> )	1,42 – 1,45	1,42 – 1,45	1,42 – 1,45

### 3.7.3 Derivatizované cyklodextriny

CD obsahují na vnějším kruhu primární (C-6) a sekundární (C-2 a C-3) hydroxylové skupiny. Modifikací hydroxylových skupin chemickými reakcemi získáme deriváty CD s různým stupněm substituce. Modifikace CD závisí na několika parametrech, jako jsou reakční podmínky, typ a poměr reagentů. Modifikované CD mají rozdílné vlastnosti než původní nativní CD. Tyto vlastnosti mohou být využity pro zlepšení citlivosti stanovení při chirální analýze, jsou to např. zvýšení rozpustnosti, schopnost tvořit sekundární vazby, schopnost analýzy i nenabitých analytu, rozdílná hydrofobicita, atd. [85]. Nejvíce CD derivátů je odvozeno od  $\beta$ -CD, zatímco deriváty  $\alpha$ - a  $\gamma$ -CD jsou méně prozkoumány. Jeden z hlavních důvodů může být podstatně nižší rozpustnost  $\beta$ -CD ve srovnání s  $\alpha$ - a  $\gamma$ -CD [83].

Derivatizované CD mohou být elektroneutrální a pozitivně nebo záporně nabitě [30]. Neutrální CD deriváty obsahují navázanou methylovou, hydroxyetylovou, hydroxypropylovou, karboxymethylovou a acetylovou skupinu. Tyto skupiny mění

hloubku a otevření dutiny CD, např. navázání dvou methylových skupin na  $\beta$ -CD změni hloubku dutiny přibližně o 0,2 – 0,3 nm [76]. Neutrální CD deriváty se používají pro separaci nabitých analytů [30].

Mezi kladně nabitě CD deriváty patří amino-, alkylamino-CD nebo CD s jinak navázaným dusíkem, fosforem a sírou [83]. Pozitivně nabitě CD se používají při chirálních separacích kyselých a neutrálních analytů. Nejčastěji se používají při separacích karboxylových kyselin a aminokyselin [16].

Mezi záporně nabitě CD deriváty patří sulfo-, karboxymethyl-, karboxyethyl-, sukcinyl-, sulfoethyl-, a sulfobutyl-CD [83]. Negativně nabitě CD deriváty jsou vhodné pro chirální separaci bazických a neutrálních analytů [91]. Nejpoužívanější anionické CD deriváty jsou: sulfatovaný- $\beta$ -CD (S- $\beta$ -CD), sulfobutyl- $\beta$ -CD (SBE- $\beta$ -CD) a sulfoethylether- $\beta$ -CD (SEE- $\beta$ -CD) [87].

### 3.7.4 Polymerizované cyklodextriny

Polymerizované CD jsou připraveny zesíťováním CD s bifunkčními činidly, jako např. diepoxidy, diizokyanáty. Vysoká molekulová hmotnost polymeru způsobuje zmenšení efektivní pohyblivosti enantiomerů kvůli nižší pohyblivosti chirálního selektoru, což vede k lepší enantioseparaci. Polymerizované CD jsou mnohem více rozpustné než původní CD. Polymerizované CD se můžou adsorbovat na kapilární stěnu a tím ovlivnit rychlost a směr EOF [16].

## 3.8 Acyklické nukleosid fosfonáty

Acyklické nukleosid fosfonáty (ANP) jsou strukturně podobné nukleotidům. ANP jsou tvořeny dusíkatou bazí (puriny, pyrimidiny), (derivatizovaným) alkylem a zbytkem kyseliny fosforité (fosfonové) [92]. ANP reprezentují třídu nukleotidových analogů, která má široké spektrum antivirální a cytostatické aktivity [93].

9-[2-(fosfonomethoxy)ethyl]adenin (PMEA, adefovir) je účinný proti DNA-virům a retrovirům a byl schválen na léčbu hepatitidy B (Hepseta). 9-(R)-[2-(fosfonomethoxy)-propyl]adenin (PMPA, tenofovir) je perspektivní anti-HIV lék a byl schválen na léčbu AIDS (Viread). Dalším důležitým reprezentantem této třídy látek je 9-[3-

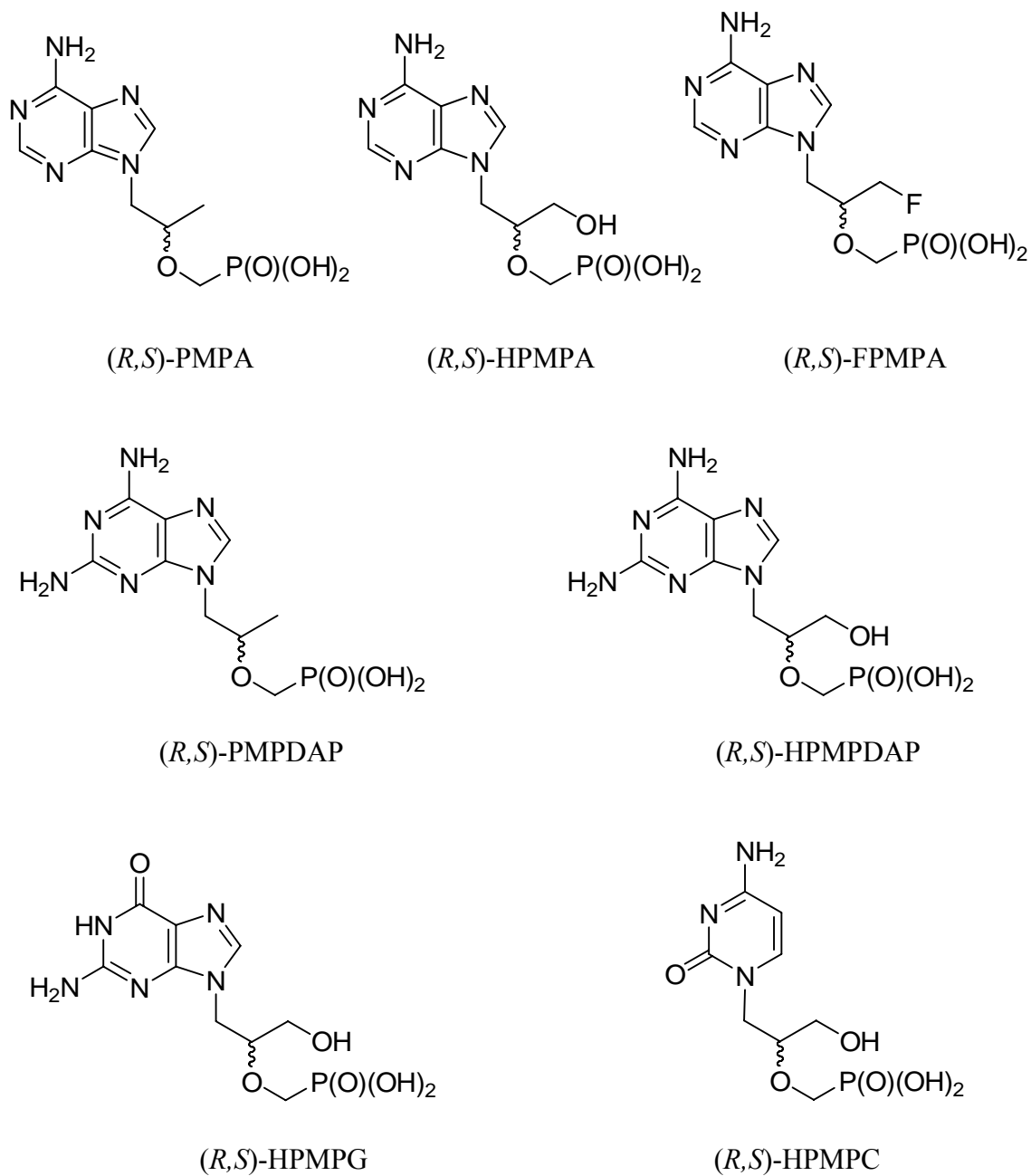
hydroxy-2-(fosfonomethoxy)propyl]cytosin (HPMPC, cidofovir, Vistide), který má anti-DNAvirovou aktivitu. Cidofovir se používá na léčbu zánětu sítnice způsobeného cytomegalovirem (cytomegalovirue retinitis) u pacientů s AIDS. 9-[3-hydroxy-2-(fosfonomethoxy)propyl]adenin (HPMPA), 9-[2-(fosfonomethoxy)-propyl]-2,6-diaminopurin (PMPDAP) a 9-[3-hydroxy-2-(fosfonomethoxy)propyl]-2,6-diaminopurin (HPMPDAP) nejsou pouze antivirotika, ale mají i antiparazitickou aktivitu a imunostimulační potenciál. 9-[3-hydroxy-2-(fosfonomethoxy)propyl]guanin (HPMPG) ukázal široké spektrum protivirové aktivity, např. proti oparům (herpes simplex virus), lidskému cytomegaloviru, pásovému oparu (varicella zoster virus) a planým neštovicím (vaccinia virus) [92–94].

ANP používané jako registrovaná nebo potenciální léčiva jsou opticky čisté látky, které obsahují chirální uhlík v acyklickém alkylovém řetězci. Enantiomery nebo diastereomery těchto léčiv mohou mít různou biologickou aktivitu, antivirovou aktivitu a farmaceutický profil, např. (*R*)-enantiomery PMPA a PMPDAP jsou 10 – 100krát účinnější proti viru HIV než jejich (*S*)-enantiomer. Stanovení enantiomerní čistoty těchto látek je velice důležité a nezbytné pro biologické testování a lékařskou aplikaci. Pro kontrolu čistoty se většinou používají HPLC nebo HPCE (vysokoučinná kapilární elektroforéza). CZE, MEKC a CEC se ukázaly být vhodnou metodou pro analýzu nukleotidů, nukleosidů a bází nukleových kyselin [92].

V rámci diplomové práce byly metodou CZE určovány asociační konstanty pro komplexy enantiomerů acyklických nukleosid fosfonátů s chirálním selektorem. Struktury analyzovaných acyklických nukleosid fosfonátů jsou zobrazené na obrázku 3.4. Přehled analyzovaných ANP, jejich zkratk a relativních molekulových hmotností jsou shrnuty v tabulce 3.3. Některé příklady stanovení ANP s využitím CE jsou shrnuty v tabulce 3.4.

Tabulka 3.3: Přehled analyzovaných acyklických nukleosid fosfonátů (ANP), jejich zkratk a relativních molekulových hmotností,  $M_r$ .

<b>Acyklický nukleosid fosfonát</b>	<b>Zkratka</b>	<b><math>M_r</math></b>
9-[2-(fosfonomethoxy)propyl]adenin	PMPA	287,2
9-[3-hydroxy-2-(fosfonomethoxy) propyl]adenin	HPMPA	303,2
9-[3-fluoro-2-(fosfonomethoxy)propyl]adenin	FPMPA	305,2
9-[2-(fosfonomethoxy)propyl]-2,6-diaminopurin	PMPDAP	302,2
9-[3-hydroxy-2-(fosfonomethoxy)propyl]-2,6-diaminopurin	HPMPDAP	318,2
9-[3-hydroxy-2-(fosfonomethoxy)propyl]guanin	HPMPG	319,2
9-[3-hydroxy-2-(fosfonomethoxy)propyl]cytosin	HPMPC	279,2



Obrázek 3.4: Molekulární struktura analyzovaných látek.

PMPA	9-[2-(fosfonomethoxy)propyl]adenin
HPMPA	9-[3-hydroxy-2-(fosfonomethoxy)propyl]adenin
FPMPA	9-[3-fluoro-2-(fosfonomethoxy)propyl]adenin
PMPDAP	9-[2-(fosfonomethoxy)propyl]-2,6-diaminopurin
HPMPDAP	9-[3-hydroxy-2-(fosfonomethoxy)propyl]-2,6-diaminopurin
HPMPG	9-[3-hydroxy-2-(fosfonomethoxy)propyl]guanin
HPMPC	9-[3-hydroxy-2-(fosfonomethoxy)propyl]cytosin

Tabulka 3.4: Příklady chirálních i nechirálních analýz nukleotidů, nukleosidů a pyrimidinových a purinových bází kapilárními elektromigračními metodami.

Analyt	Složení a pH BGE	Chirální selektor	Materiál a rozměry kapiláry ( $L_t/L_{eff}$ [cm] / ID [ $\mu$ m])	Detekce	T [ $^{\circ}$ C]	U [kV]	Ref.
Pyrimidinové a purinové báze (A,G,T,C,U)	20 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ pH 10,5	25 mM $\beta$ -CD	$\text{SiO}_2$ 43 / 36 / 75	UV 254 nm	25	8	[95]
PMEA a HPMEDAP ve směsi s monoribonukleotidy nebo deoxynukleotidy	20 mM borát pH 9,9	10,13 mM $\beta$ -CD	$\text{SiO}_2$ 67,8 / 60,3 / 75	UV 210 nm	25	30	[96]
3'-azido-3'-deoxythymidin (zidovudin, AZT) 2',3'-dideoxy-2',3'-didehydrothymidin (stavudin, d4T) ve směsi s nukleotidy (A,C,G,U,T)	50 mM $\text{CH}_3\text{COOH} / \text{NH}_3$ pH 9 - 11	-----	$\text{SiO}_2$ 67 / 60 / 50 47 / 40 / 50	UV 254 nm ESI-MS	25	25	[97]
3'-azido-3'-deoxythymidin (AZT) 2',3'-dideoxyinosin (ddI) 2',3'-dideoxyadenosin (ddA) 2',3'-dideoxycytidin (ddC) 2',3'-didehydro-3'-deoxythymidin (d4T) $\beta$ -L-(2)-2'-deoxy-3'-thiacytidin (3TC)	20 mM TEAA / acetonitril pH 5,5	$\beta$ -CD jako stacionární fáze $\beta$ -Cyclose-2-OH (10 cm, 5 $\mu$ m)	$\text{SiO}_2$ 31,2 / -- / 75	UV 254 nm	20	- 15	[98]
Amlodipin a nicardipin (deriváty 4-aryl-1,4-dihydropyridinu)	50 mM fosfát pH 6 - 8	18 mM $\alpha$ -CD 9 mM $\beta$ -CD	$\text{SiO}_2$ 47 / 40 / 50	UV 190 -300 nm	25	8 - 10	[99]
Pseudouridin, uridin, adenosin, cytidin, 5-methyluridin, inosin, N4-acetylcytidin, guanosine, N2,N2-dimethylguanosin, xanthosin	100 mM borát / 72,5 mM fosfát / 160 mM SDS pH 6,7	-----	$\text{SiO}_2$ -- / 70 / 50	UV 254 nm	30	25	[100]

Analyt	Složení a pH BGE	Chirální selektor	Materiál a rozměry kapiláry ( $L_t/L_{eff}$ [cm] / ID [ $\mu\text{m}$ ])	Detekce	T [ $^{\circ}\text{C}$ ]	U [kV]	Ref.
1-[[2-O-benzoyl-1-fenyl-)-ethoxy]-methyl]thymín 1-[[2-O-benzoyl-1-fenyl-)-ethoxy]-methyl]uracil 1-[[2-O-benzoyl-1-fenyl-)-ethoxy]-methyl]cytosin 1-[[2-O-benzoyl-1-fenyl-)-ethoxy]-methyl]adenin 1-[[2-O-benzoyl-1-fenyl-)-ethoxy]-methyl]guanin	25 mM fosfát ( $\text{H}_3\text{PO}_4 + \text{TEA}$ ) pH 2,5	3% S- $\alpha$ -CD S- $\beta$ -CD S- $\gamma$ -CD (w/v)	$\text{SiO}_2$ potažená PEO (polyethylen oxid) 50,2 / 10 / 50	UV 200 nm	30	0,3 kV/cm	[101]
Stavudin (d4T) a didanosin (ddI)	40 mM $\text{NH}_4\text{OH}/\text{CH}_3\text{COOH}$ pH 10	-----	$\text{SiO}_2$ 80 / -- / 50	ESI-MS	28	30	[102]
Acyklické nukleosid bisfosfonáty: 2-amin-4-[2-(fosfometoxy)ethoxy]-6-(R,S)-[2-(fosfometoxy)propoxy]-pyrimidin	50 mM borát/NaOH pH 10	20 mg/ml $\beta$ -CD	$\text{SiO}_2$ 39 / 28,8 / 50	UV 254 nm	20	15	[93]
Pronukleotidy diastereomerů AZT v biologickém vzorku	50 mM fosfát pH 6,2	8 mM CM- $\beta$ -CD	$\text{SiO}_2$ 31,2 / 21,2 / 50	UV 268 nm	15	19	[103]
Diastereomery ( <i>cis</i> a <i>trans</i> ) 2',3'-didehydro-2',3'-dideoxy thymidinových analogů	25 mM fosfát ( $\text{H}_3\text{PO}_4 + \text{TEA}$ ) pH 2,5	3% S- $\beta$ -CD (w/v)	$\text{SiO}_2$ potažená PEO (polyethylen oxid) 50,2 / 10 / 50	UV 200 nm	30	25	[104]
Isochromanové aromatické analogy ( <i>cis</i> a <i>trans</i> ) stavudinu (d4T)	25 mM fosfát ( $\text{H}_3\text{PO}_4 + \text{TEA}$ ) pH 2,5	7% S- $\beta$ -CD (w/v)	$\text{SiO}_2$ potažená PEO (polyethylen oxid) 50,2 / 10 / 50	UV 200 nm	30	15	[105]

## 4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 Chemikálie

Všechny použité chemikálie dosahovaly stupně čistoty p.a.:

- 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyklodextrin,  $\beta$ -cyklodextrin, hydroxypropylcelulosa, heptakis-(2,6-di-O-methyl)- $\beta$ -cyklodextrin – Sigma Aldrich (Praha, ČR)
- dimethylsulfoxid (DMSO), hydroxid sodný, tetraboritan sodný dekahydrát – Lachema (Brno, ČR)
- $\alpha$ -cyklodextrin – Fluka (Buchs, Švýcarsko)
- $\gamma$ -cyklodextrin – Serva (Heidelberg, Německo)
- 2,3,6-[2-hydroxypropyl-(3-N-trimethylamonium chlorid)]- $\beta$ -CD (DS = 3,5) – (QA- $\beta$ -CD) – Supelco (Bellenfonte, PA, USA)

Na filtraci základních elektrolytů byl použit filtr o porozitě 0,45  $\mu$ m (Millipore, Belford, MA, USA).

### 4.2 Analyzované látky

V rámci diplomové práce byly analyzovány tyto látky:

- PMPA 9-[2-(fosfonomethoxy)propyl]adenin
- HPMPA 9-[3-hydroxy-2-(fosfonomethoxy)propyl]adenin
- FPMPA 9-[3-fluoro-2-(fosfonomethoxy)propyl]adenin
- PMPDAP 9-[2-(fosfonomethoxy)propyl]-2,6-diaminopurin
- HPMPDAP 9-[3-hydroxy-2-(fosfonomethoxy)propyl]-  
-2,6-diaminopurin
- HPMPG 9-[3-hydroxy-2-(fosfonomethoxy)propyl]guanin
- HPMPG 9-[3-hydroxy-2-(fosfonomethoxy)propyl]cytosin

Jejich molekulární struktura je uvedena na obrázku 3.4. Analyzované ANP byly syntetizovány v Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i, podle popsání postupu [106–108]. Byly vytvořeny směsi *R* a *S* enantiomerů v poměru  $R : S = 2 : 1$ . Analyty byly rozpuštěny v deionizované vodě, koncentrace jejich roztoků byla 0,1 mM.

### 4.3 Přístrojové vybavení

Měření bylo provedeno na přístroji P/ACE MDQ CE od firmy Beckman Coulter (Fullerton, CA, USA). Tento přístroj je plně automatický, jeho řízení, sběr a zpracování dat je prováděno pomocí osobního počítače a softwaru P/ACE System MDQ, verze 32 Karat 7.0, dodaného firmou Beckman Coulter (Fullerton, CA, USA).

Separace analytů probíhala ve vnitřně nemodifikované křemenné kapiláře s vnějším polyimidovým povlakem dodané firmou Polymicro Technologies (Phoenix, AR, USA) a v téže kapiláře vnitřně potažené vrstvou hydroxypropylcelulosity ( $M_r \sim 100\ 000$ ). Křemenná kapilára měla vnitřní průměr 50  $\mu\text{m}$ , vnější průměr 375  $\mu\text{m}$ , celkovou délku 39,5 cm a efektivní délku (od počátku k detektoru) 29,4 cm. Vnitřně potažená kapilára měla vnitřní průměr 50  $\mu\text{m}$ , vnější 375  $\mu\text{m}$ , celkovou délku 39,8 cm a efektivní délku 29,5 cm. Kapilára byla chlazena kapalinou na teplotu 20 °C. Dávkování analytů bylo hydrodynamické. Vzorokly byly dávkovány tlakem 6,9-13,8 mbar po dobu 3-15 s. Analyty byly detekovány UV-VIS absorpčním spektrofotometrickým detektorem s diodovým polem s vlnovým rozsahem 190-600 nm. Pracovní vlnové délky byly 206 a 254 nm.

Kapilára byla postupně promývána 1 M hydroxidem sodným (případně 0,1 M hydroxidem sodným), vodou a základním elektrolytem, a to vždy pod tlakem 1000 mbar po dobu 5-10 minut. Následně byly vnitřní stěny kapiláry a elektroosmotický tok stabilizovány napětím 15 kV po dobu 10-15 minut. Mezi jednotlivými měřeními byla kapilára promývána základním elektrolytem pod tlakem 1000 mbar po dobu 1 minuty. Separální napětí bylo +15 kV nebo -15 kV. Jako marker elektroosmotického toku byl použit 0,5 mg/ml dimethylsulfoxid (DMSO).



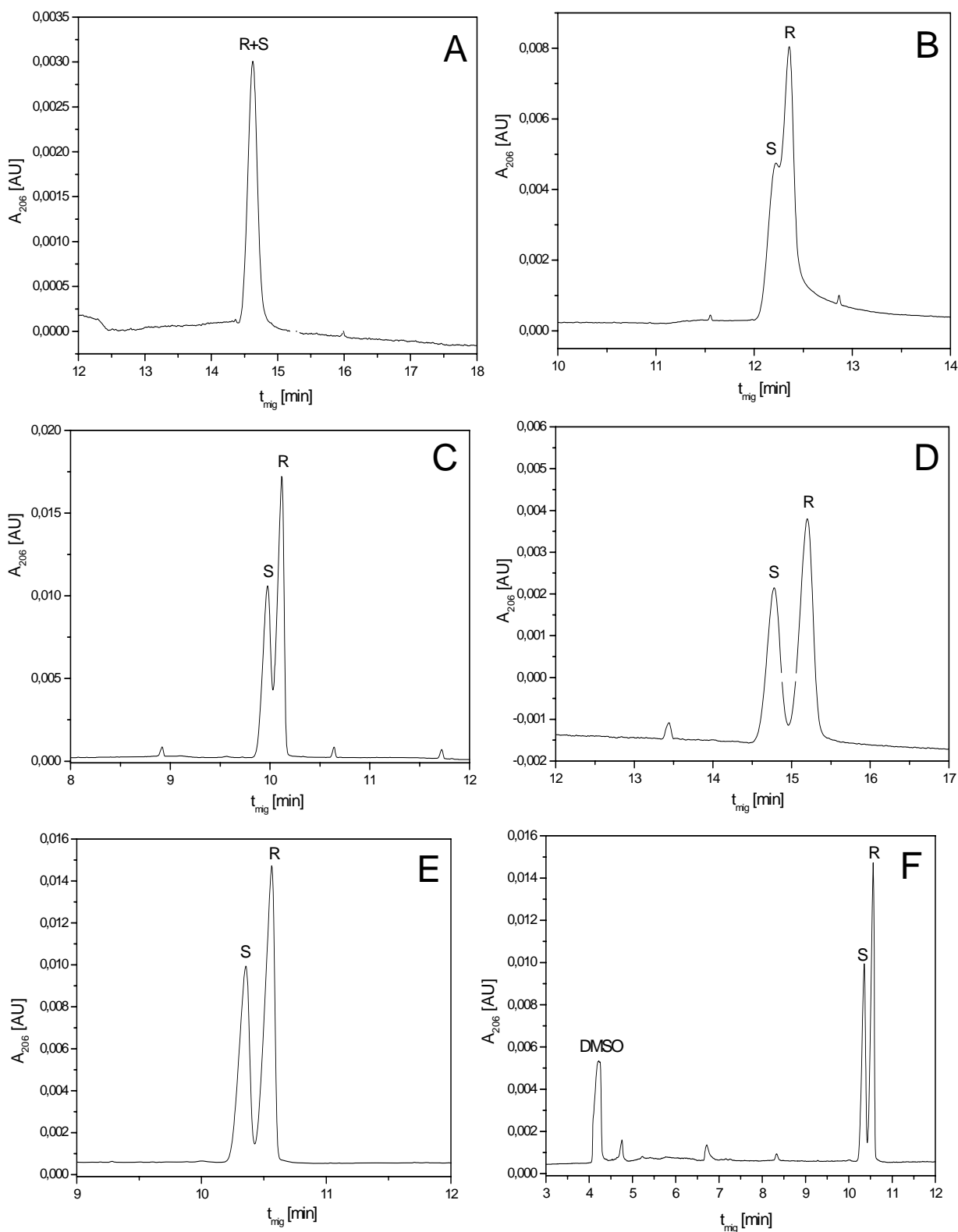
## 5 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 5.1 CE separace (*R,S*)-enantiomerů ANP a stanovení asociačních konstant jejich komplexů s chirálním selektorem $\beta$ -cyklodextrinem

#### 5.1.1 CE separace (*R,S*)-enantiomerů ANP

Pro CE separace (*R,S*)-enantiomerů ANP byl jako základní elektrolyt použit 35 mM tetraboritan sodný / hydroxid sodný (pH 10), který byl zvolen na základě předchozích experimentů [92]. Neutrální  $\beta$ -cyklodextrin ( $\beta$ -CD) byl vybrán jako stereoselektivní komplexační činidlo. Koncentrace  $\beta$ -CD v základním elektrolytu byla 0; 5; 10; 15 a 20 mg/ml (resp. 0; 4,41; 8,81; 13,22 a 17,62 mM). Separace analytů probíhala v křemenné kapiláře při napětí +15 kV. Ukázky CE separací (*R,S*)-enantiomerů HPMPA při různých koncentracích chirálního selektoru  $\beta$ -CD jsou uvedeny na obrázku 5.1.

Nejlepší chirální separace analyzovaných (*R,S*)-enantiomerů ANP, které obsahují purinové báze (adenin, diaminopurin a guanin), bylo dosaženo v základním elektrolytu s přídavkem 20 mg/ml  $\beta$ -CD. Získané enantioseparace byly relativně rychlé (8-23 minut). Pouze HPMPA, který obsahuje pyrimidinovou bazi (cytosin), se choval odlišně. V základním elektrolytu s přídavkem 20 mg/ml  $\beta$ -CD se rozdělil pouze částečně. Tato analýza byla nejdelší (28 minut), píky byly široké a jejich tvar byl deformován vlivem elektromigrační disperze. Záznamy CE separací (*R,S*)-enantiomerů ANP s maximálním rozlišením jsou na obrázku 5.2.



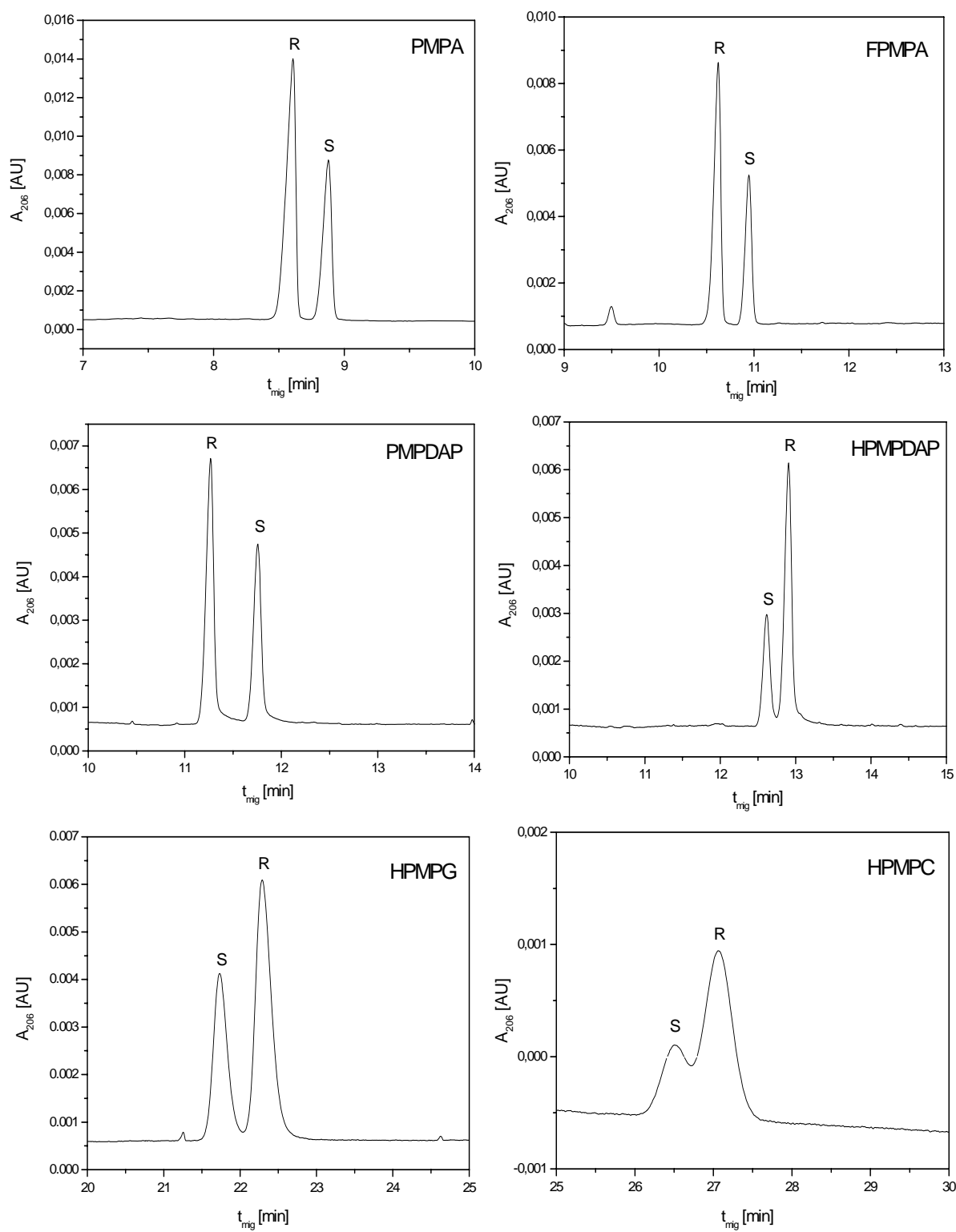
Obrázek 5.1: CE separace (*R,S*)-enantiomerů HPMPA při různých koncentracích chirálního selektoru,  $\beta$ -CD, v základním elektrolytu.

A: 0 mg/ml  $\beta$ -CD; B: 5 mg/ml  $\beta$ -CD; C: 10 mg/ml  $\beta$ -CD; D: 15 mg/ml  $\beta$ -CD; E: 20 mg/ml  $\beta$ -CD a F: 20 mg/ml  $\beta$ -CD elektroforegram včetně píku EOF markeru (0,5 mg/ml DMSO)

Experimentální podmínky: křemenná kapilára 50 / 375  $\mu$ m; 29,4 / 39,5 cm

BGE: 35 mM tetraboritan sodný /NaOH; pH 10; 20 °C; + 15 kV

$A_{206}$  – absorbance při vlnové délce 206 nm,  $t_{mig}$  – migrační čas



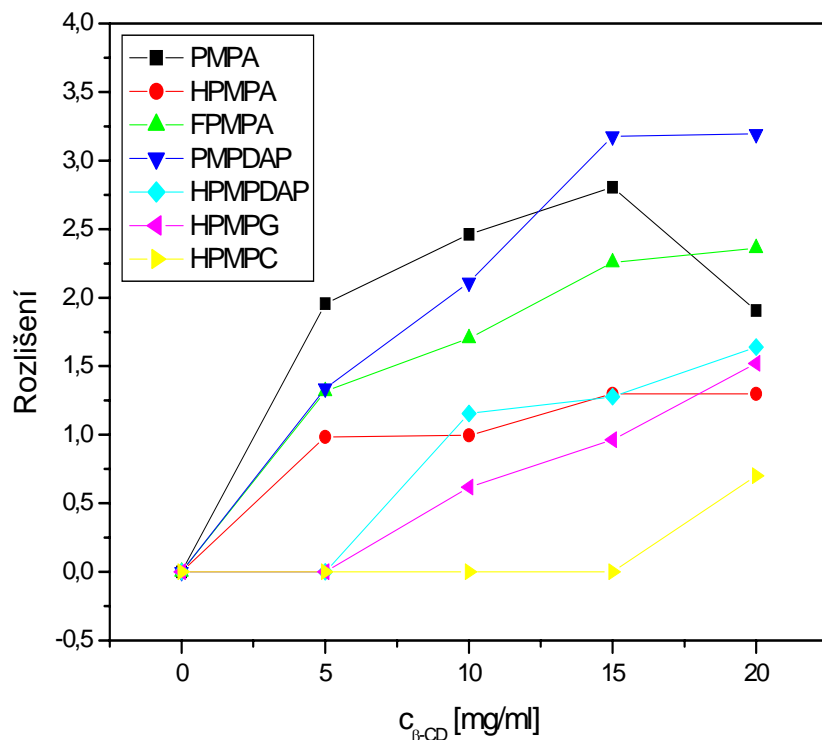
Obrázek 5.2: CE separace (*R,S*)-enantiomerů ANP s maximálním rozlišením.

Experimentální podmínky: křemenná kapilára 50 / 375  $\mu\text{m}$ ; 29,4 / 39,5 cm

BGE: 35 mM tetraboritan sodný /NaOH; pH 10; 20 mg/ml  $\beta$ -CD; 20  $^{\circ}\text{C}$ ; + 15 kV

$A_{206}$  – absorbance při vlnové délce 206 nm,  $t_{mig}$  – migrační čas

Z obrázku 5.1 je patrná závislost rozlišení (*R,S*)-enantiomerů HPMPA na koncentraci chirálního selektoru  $\beta$ -CD. Pro (*R,S*)-enantiomery všech analyzovaných ANP je závislost rozlišení jejich CE separací na koncentraci chirálního selektoru  $\beta$ -CD zobrazena na obrázku 5.3.



Obrázek 5.3: Závislost rozlišení separovaných (*R,S*)-enantiomerů ANP na koncentraci chirálního selektoru  $\beta$ -CD,  $c_{\beta\text{-CD}}$ .

Hodnoty rozlišení CE separací analyzovaných (*R,S*)-enantiomerů ANP jsou uvedeny v tabulce 5.1. Rozlišení (*R,S*)-enantiomerů se ve většině případů zvyšuje s rostoucí koncentrací  $\beta$ -CD.

Tabulka 5.1: Rozlišení CE separací analyzovaných (*R,S*)-enantiomerů ANP při různých koncentracích chirálního selektoru  $\beta$ -CD.

Rozlišení							
$c_{\beta\text{-CD}}$ [mg/ml]	PMPA	HPMPA	FPMPA	PMPDAP	HPMPDAP	HPMPG	HPMPC
0	0	0	0	0	0	0	0
5	1,96	0,99	1,32	1,34	0	0	0
10	2,46	1,00	1,70	2,11	1,16	0,62	0
15	2,80	1,30	2,26	3,18	1,28	0,96	0
20	1,90	1,30	2,36	3,20	1,64	1,52	0,70

### 5.1.2 Stanovení efektivní pohyblivosti (*R,S*)-enantiomerů ANP

Efektivní elektroforetické pohyblivosti jednotlivých analytů byly vypočteny podle rovnice 3.9. Pohyblivost látek je závislá na teplotě a vzrůstá přibližně o 2 % na 1 °C, proto pro její přesné stanovení je nezbytné znát teplotu, při které byla pohyblivost změřena.

#### 5.1.2.1 Korekce efektivní pohyblivosti na referenční teplotu 25 °C a konstantní viskozitu

Přístroj, na kterém byly prováděny všechny analýzy, je vybaven aktivním chlazením povrchu kapiláry cirkulujícím kapalným médiem na teplotu 20 °C. Uvnitř kapiláry dochází k tvorbě Jouleova tepla a vzrůstu teploty, a proto byly naměřené efektivní pohyblivosti korigovány na referenční teplotu 25 °C.

Vzrůst teploty v kapiláře byl určen z měření závislosti elektrického proudu v kapiláře naplněné standardním roztokem 0,02 M chloridu draselného na vloženém elektrickém napětí při jinak stejných experimentálních podmínkách jako při CE analýzách. Ze změn elektrického odporu,  $R$ , při postupně se zvyšujících hodnotách příkonu, vztažených na jednotkovou délku kapiláry, můžeme podle rovnice 5.1 vypočítat přírůstek teploty,  $\Delta T$ , v kapiláře.

$$\Delta T = \frac{R_0 - R}{0,02R} \quad (5.1)$$

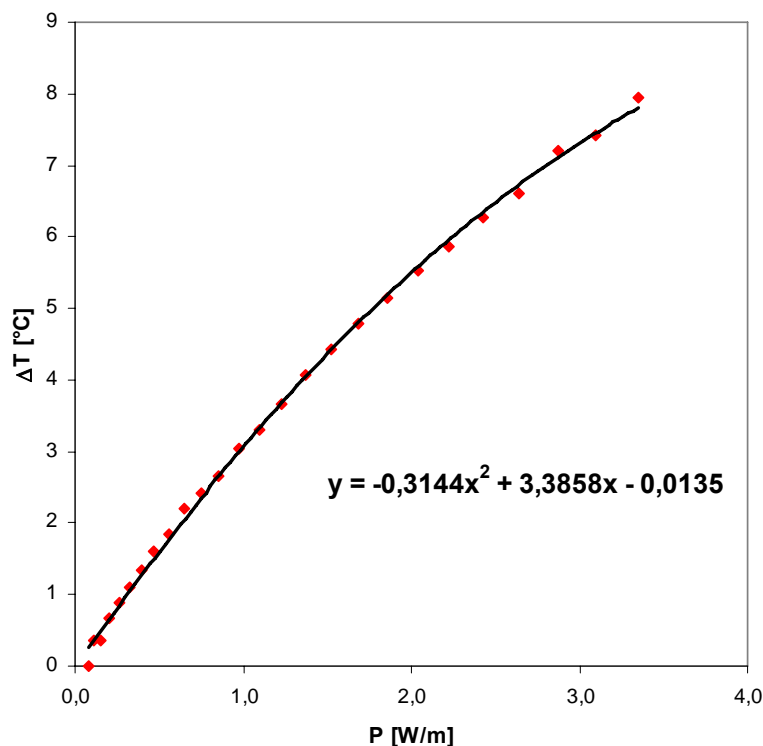
kde  $R_0$  je odpor roztoku KCl při nízkém příkonu v kapiláře, kdy je ohřev elektrolytu a přírůstek teploty zanedbatelný.  $R$  je odpor roztoku KCl při postupně se zvyšujících hodnotách příkonu, které způsobují ohřev roztoku v kapiláře. Závislost přírůstku teploty na příkonu je znázorněna na obrázku 5.4.

Pro výpočet přírůstku teploty,  $\Delta T$ , oproti teplotě 20 °C, na kterou byl chlazen vnější povrch kapiláry cirkulujícím kapalným médiem při elektroforetické separaci analytů, byla použita rovnice regresní křivky této závislosti. Ze získaných hodnot vzrůstu teploty byla vypočtena korigovaná pohyblivost podle vztahu:

$$m_{eff,25} = m_{eff,T} [1 - 0,020(T_0 + \Delta T - 25)] \quad (5.2)$$

kde  $m_{eff,25}$  je efektivní elektroforetická pohyblivost při 25 °C,  $m_{eff,T}$  je naměřená efektivní elektroforetická pohyblivost při aktuální teplotě experimentu uvnitř kapiláry,

$T_0$  je teplota chladicího média (chladící kapaliny) a  $\Delta T$  je přírůstek teploty způsobený příkonem,  $P$ , [109].



Obrázek 5.4: Závislost vzrůstu teploty v kapiláře  $\Delta T$  na příkonu  $P$  vztaženém na jednotkovou délku kapiláry.

Korekce na konstantní viskozitu základního elektrolytu byla provedena vynásobením pohyblivosti vypočtené z migračního času poměrem proudu při měření bez přídavku cyklodextrinu a s přídavkem cyklodextrinu podle vztahu:

$$m_{cor,\eta} = m_{exp} \cdot \frac{I_0}{I} \quad (5.3)$$

kde  $m_{cor,\eta}$  je pohyblivost analytu po korekci na viskozitu,  $m_{exp}$  je pohyblivost analytu vypočtená ze získaného migračního času,  $I_0$  elektrický proud při CE analýze v BGE bez přídavku cyklodextrinu a  $I$  je elektrický proud při analýze v BGE s přídavkem cyklodextrinu.

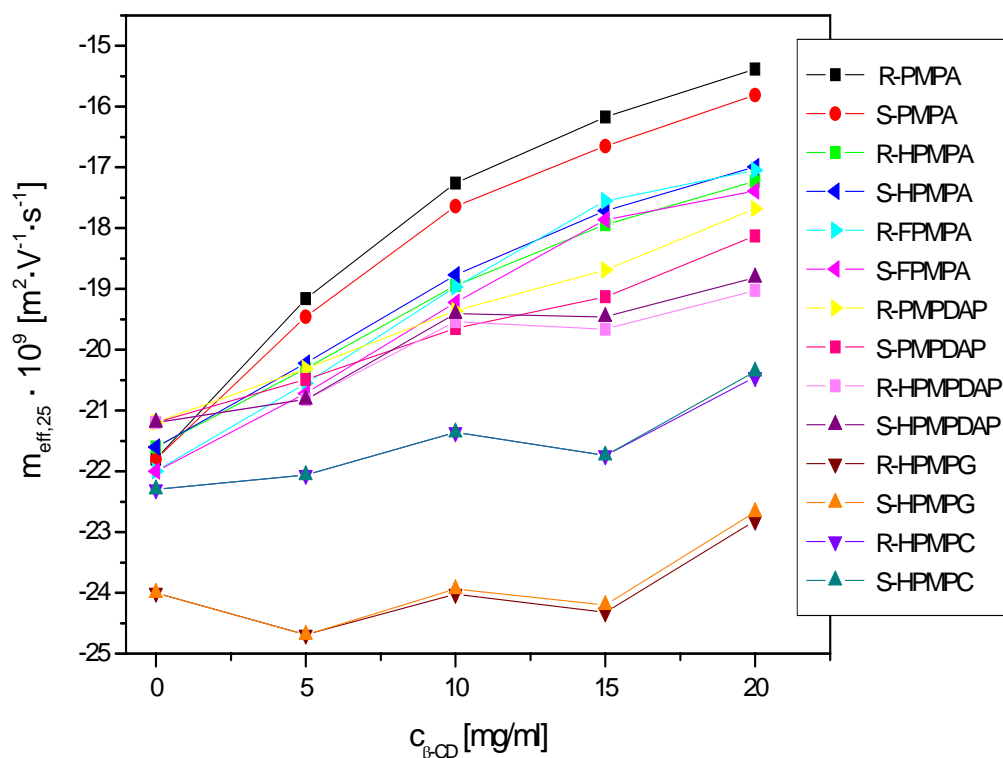
Při korekci efektivních elektroforetických pohyblivostí na konstantní viskozitu však vznikl vyšší rozptyl naměřených hodnot, a proto byly efektivní pohyblivosti analytů vypočtené z migračních časů korigovány pouze na teplotu.

Hodnoty efektivních elektroforetických pohyblivostí (*R,S*)-enantiomerů ANP korigovaných na referenční teplotu 25 °C jsou uvedeny v tabulce 5.2.

Tabulka 5.2: Hodnoty efektivních pohyblivostí (*R,S*)-enantiomerů ANP korigovaných na referenční teplotu 25 °C při různých koncentracích β-CD v základním elektrolytu. (uvedené hodnoty jsou průměry ze 3 měření s relativními standardními odchylkami v rozmezí 0,1 – 2,0 %, u většiny měření do 1 %)

Analyt		0 mg/ml β-CD	5 mg/ml β-CD	10 mg/ml β-CD	15 mg/ml β-CD	20 mg/ml β-CD
		$m_{eff,25} \cdot 10^9$ [m <sup>2</sup> ·V <sup>-1</sup> ·s <sup>-1</sup> ]	$m_{eff,25} \cdot 10^9$ [m <sup>2</sup> ·V <sup>-1</sup> ·s <sup>-1</sup> ]	$m_{eff,25} \cdot 10^9$ [m <sup>2</sup> ·V <sup>-1</sup> ·s <sup>-1</sup> ]	$m_{eff,25} \cdot 10^9$ [m <sup>2</sup> ·V <sup>-1</sup> ·s <sup>-1</sup> ]	$m_{eff,25} \cdot 10^9$ [m <sup>2</sup> ·V <sup>-1</sup> ·s <sup>-1</sup> ]
PMPA	R	-21,8	-19,2	-17,3	-16,2	-15,4
	S	-21,8	-19,5	-17,6	-16,7	-15,8
HPMPA	R	-21,6	-20,3	-18,9	-17,9	-17,2
	S	-21,6	-20,2	-18,8	-17,7	-17,0
FPMPA	R	-22,0	-20,6	-19,0	-17,6	-17,1
	S	-22,0	-20,7	-19,2	-17,9	-17,4
PMPDAP	R	-21,2	-20,3	-19,4	-18,7	-17,7
	S	-21,2	-20,5	-19,7	-19,1	-18,1
HPMPDAP	R	-21,2	-20,8	-19,5	-19,7	-19,0
	S	-21,2	-20,8	-19,4	-19,5	-18,8
HPMPG	R	-24,0	-24,7	-24,0	-24,3	-22,8
	S	-24,0	-24,7	-23,9	-24,2	-22,7
HPMPC	R	-22,3	-22,1	-21,4	-21,7	-20,5
	S	-22,3	-22,1	-21,4	-21,7	-20,4

Analyzované ANP se v alkalickém pufru (35 mM tetraboritan sodný/NaOH, pH 10) použitím jako BGE vyskytují ve formě aniontů. Efektivní elektroforetické pohyblivosti (*R,S*)-enantiomerů jsou v základním elektrolytu bez přídavku chirálního selektoru stejné. Se zvyšující se koncentrací chirálního selektoru β-CD absolutní hodnota efektivních elektroforetických pohyblivostí ANP klesá a zvětšuje se i rozdíl pohyblivostí mezi jednotlivými (*R,S*)-enantiomery. Závislost efektivních elektroforetických pohyblivostí (*R,S*)-enantiomerů ANP na koncentraci chirálního selektoru β-CD je zobrazena na obrázku 5.5.



Obrázek 5.5: Závislost efektivních elektroforetických pohyblivostí (*R,S*)-enantiomerů ANP na koncentraci chirálního selektoru  $\beta$ -CD. ( $c_{\beta\text{-CD}}$  – koncentrace  $\beta$ -CD,  $m_{\text{eff},25}$  – efektivní elektroforetická pohyblivost při 25 °C)

Analyzované ANP můžeme rozdělit do dvou skupin podle jejich struktury a vztahu elektroforetické pohyblivosti a migračního pořadí (*R,S*)-enantiomerů. Skupinu 1 tvoří ANP, které neobsahují hydroxylovou skupinu, jsou to: PMPA, PMPDAP a FPMPA. Skupinu 2 tvoří ANP, které obsahují hydroxylovou skupinu na uhlíku C3 propylového řetězce, jsou to: HPMPA, HPMPDAP, HPMPG a HPMPC. (*R*)-enantiomery ANP ze skupiny 1 mají kratší migrační časy, tj. při jejich protiproudé elektroforetické migraci vzhledem k rychlému katodickému EOF vykazují nižší anionickou elektroforetickou pohyblivost než (*S*)-enantiomery, neboť jsou více zpomalovány pevnější komplexací s neutrálním  $\beta$ -CD než (*S*)-enantiomery. Naproti tomu (*R*)-enantiomery komponentů ANP ze skupiny 2 vykazují delší migrační časy, tj. při jejich protiproudé elektroforetické migraci vzhledem k rychlému katodickému EOF vykazují vyšší anionickou elektroforetickou pohyblivost než (*S*)-enantiomery, neboť jsou méně zpomalovány komplexací s neutrálním  $\beta$ -CD než (*S*)-enantiomery. Z toho vyplývá, že přítomnost hydroxylové skupiny na uhlíku C3 propylového řetězce ovlivňuje pohyblivost a migrační pořadí (*R,S*)-enantiomerů analyzovaných ANP.



Pokud ANP obsahuje hydroxylovou skupinu, (*S*)-enantiomer vytváří silnější komplex s  $\beta$ -CD než (*R*)-enantiomer. Jestliže ANP neobsahuje hydroxylovou skupinu vzniká silnější komplex mezi (*R*)-enantiomerem a  $\beta$ -CD než mezi (*S*)-enantiomerem a  $\beta$ -CD.

### 5.1.3 Stanovení asociačních konstant komplexů (*R,S*)-enantiomerů ANP s $\beta$ -CD

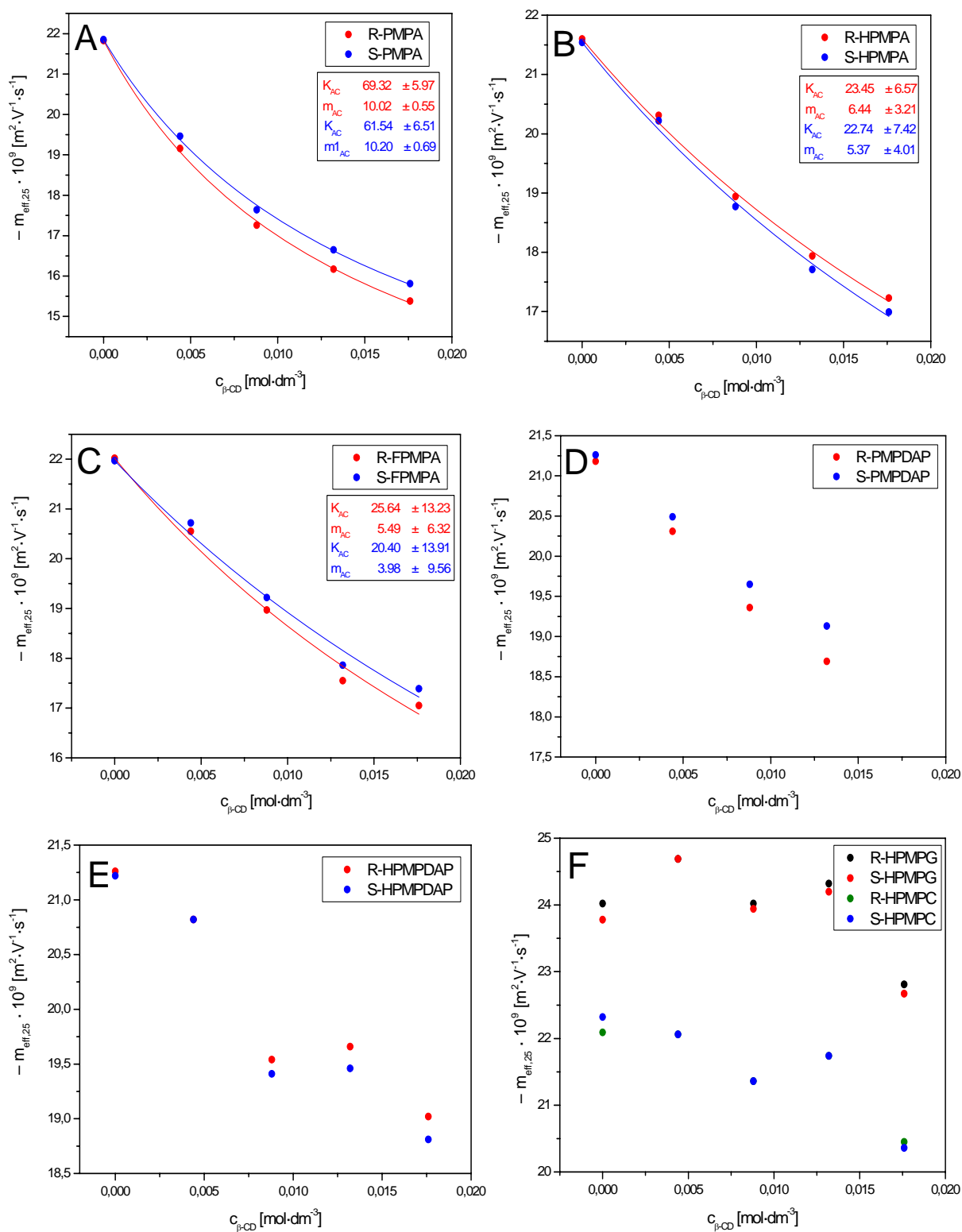
Asociační konstanty vyjadřují pevnost komplexu vytvořeného mezi analytem a chirálním selektorem. Hodnota asociační konstanty se vypočítá ze závislosti efektivní elektroforetické pohyblivosti analytu na koncentraci chirálního selektoru. Příklady těchto závislostí jsou uvedeny na obrázku 5.6. Se zvyšující se koncentrací chirálního selektoru elektroforetická pohyblivost analytu postupně klesá v důsledku zvýšeného podílu analytu v komplexu s chirálním selektorem.

Pro výpočet asociační konstanty se používá vztah 5.4 (odvozený z rovnice 3.33), který může být použit jako regresní funkce pro metodu nelineární regresní analýzy.

$$m_{eff,A} = \frac{1}{1 + K_{AC} \cdot c_{CD}} \cdot m_A + \frac{K_{AC} \cdot c_{CD}}{1 + K_{AC} \cdot c_{CD}} \cdot m_{AC} \quad (5.4)$$

kde  $m_{eff,A}$  je naměřená efektivní elektroforetická pohyblivost analytu,  $m_A$ , je elektroforetická pohyblivost volného analytu v základním elektrolytu bez přídavku chirálního selektoru,  $m_{AC}$  je elektroforetická pohyblivost komplexu analyt – chirální selektor,  $K_{AC}$  je stechiometrická asociační konstanta [ $\text{dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$ ] a  $c_{CD}$  je koncentrace chirálního selektoru [ $\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ]. Pohyblivost volného analytu,  $m_A$ , je dosažitelná experimentálně při nulové koncentraci chirálního selektoru. Pohyblivost komplexu analyt-chirální selektor,  $m_{AC}$ , může být odhadnuta z průběhu závislosti efektivní pohyblivosti,  $m_{eff,A}$ , na koncentraci chirálního selektoru. Přesná hodnota pohyblivosti,  $m_{AC}$ , se získá nelineární regresní analýzou podle rovnice 5.4, ve které,  $m_{AC}$ , vystupuje vedle asociační konstanty,  $K_{AC}$ , jako druhý stanovovaný parametr.

Nelineární regresní analýza byla provedena pomocí programu Origin 6.1. Hodnoty efektivních elektroforetických pohyblivostí korigované na referenční teplotu 25 °C byly vloženy do programu Origin 6.1 a vyneseny v závislosti na koncentraci chirálního selektoru  $\beta$ -cyklodextrinu. Asociační konstanty a pohyblivosti komplexu analyt-chirální selektor vypočítané programem Origin 6.1 podle rovnice 5.4 a jejich standardní odchylky jsou uvedeny v tabulce 5.3.



Obrázek 5.6: Vynesení nelineární regresní analýzy použité pro stanovení asociačních konstant,  $K_{AC}$ , a pohyblivosti,  $m_{AC}$ , komplexu analyt-chirální selektor ze závislosti efektivní mobility (*R,S*)-enantiomerů ANP na koncentraci  $\beta$ -CD

(A: (*R,S*)-PMPA, B: (*R,S*)-HPMPA, C: (*R,S*)-FPMPA, D: (*R,S*)-PMPDAP, E: (*R,S*)-HPMPDAP, F: (*R,S*)-HPMPG a G: (*R,S*)-HPMPC)

Tabulka 5.3: Hodnoty asociačních konstant,  $K_{AC}$ , a elektroforetických pohyblivostí,  $m_{AC}$ , komplexů (*R,S*)-enantiomerů ANP s  $\beta$ -CD a jejich standardní odchylky (SD).

Analyt		$K_{AC}$ [dm <sup>3</sup> ·mol <sup>-1</sup> ]	SD	$m_{AC}$ [m <sup>2</sup> ·V <sup>-1</sup> ·s <sup>-1</sup> ]	SD
<b>PMPA</b>	<b>R</b>	69,3	6,0	10,0	0,6
	<b>S</b>	61,5	6,5	10,2	0,7
<b>HPMPA</b>	<b>R</b>	23,5	6,6	6,4	3,2
	<b>S</b>	22,7	7,4	5,4	4,0
<b>FMPA</b>	<b>R</b>	25,6	13,2	5,5	6,3
	<b>S</b>	20,4	13,9	4,0	9,6
<b>PMPDAP</b>	<b>R</b>	*	*	*	*
	<b>S</b>	*	*	*	*
<b>HPMPDAP</b>	<b>R</b>	*	*	*	*
	<b>S</b>	*	*	*	*
<b>HPMPG</b>	<b>R</b>	*	*	*	*
	<b>S</b>	*	*	*	*
<b>HPMPC</b>	<b>R</b>	*	*	*	*
	<b>S</b>	*	*	*	*

(\*nebylo stanoveno)

Pro komplex (*R*)-enantiomeru analytů PMPA a FMPA s  $\beta$ -CD byla nalezena vyšší hodnota asociační konstanty než pro jejich (*S*)-enantiomer. Z vypočtených asociačních konstant pro komplexy (*R,S*)-enantiomerů PMPA a FMPA vyplývá, že (*R*)-enantiomer těchto analytů vytváří pevnější komplex s  $\beta$ -CD než jejich (*S*)-enantiomer.

Vypočítané asociační konstanty pro (*R,S*)-enantiomery HPMPA nebyly příliš rozdílné. Jejich hodnoty se pohybovali mezi 22,7 – 23,5 dm<sup>3</sup>·mol<sup>-1</sup>. Asociační konstanty komplexů analytů PMPDAP, HPMPDAP, HPMPG a HPMPC s  $\beta$ -CD nebyly stanoveny, neboť změřené závislosti jejich pohyblivostí na koncentraci chirálního selektoru v BGE nebyly ve shodě s navrženým modelem vzniku komplexu analyt-chirální selektor.

## 5.2 CE separace (*R,S*)-enantiomerů ANP a stanovení asociačních konstant jejich komplexů s chirálním selektorem QA-β-CD

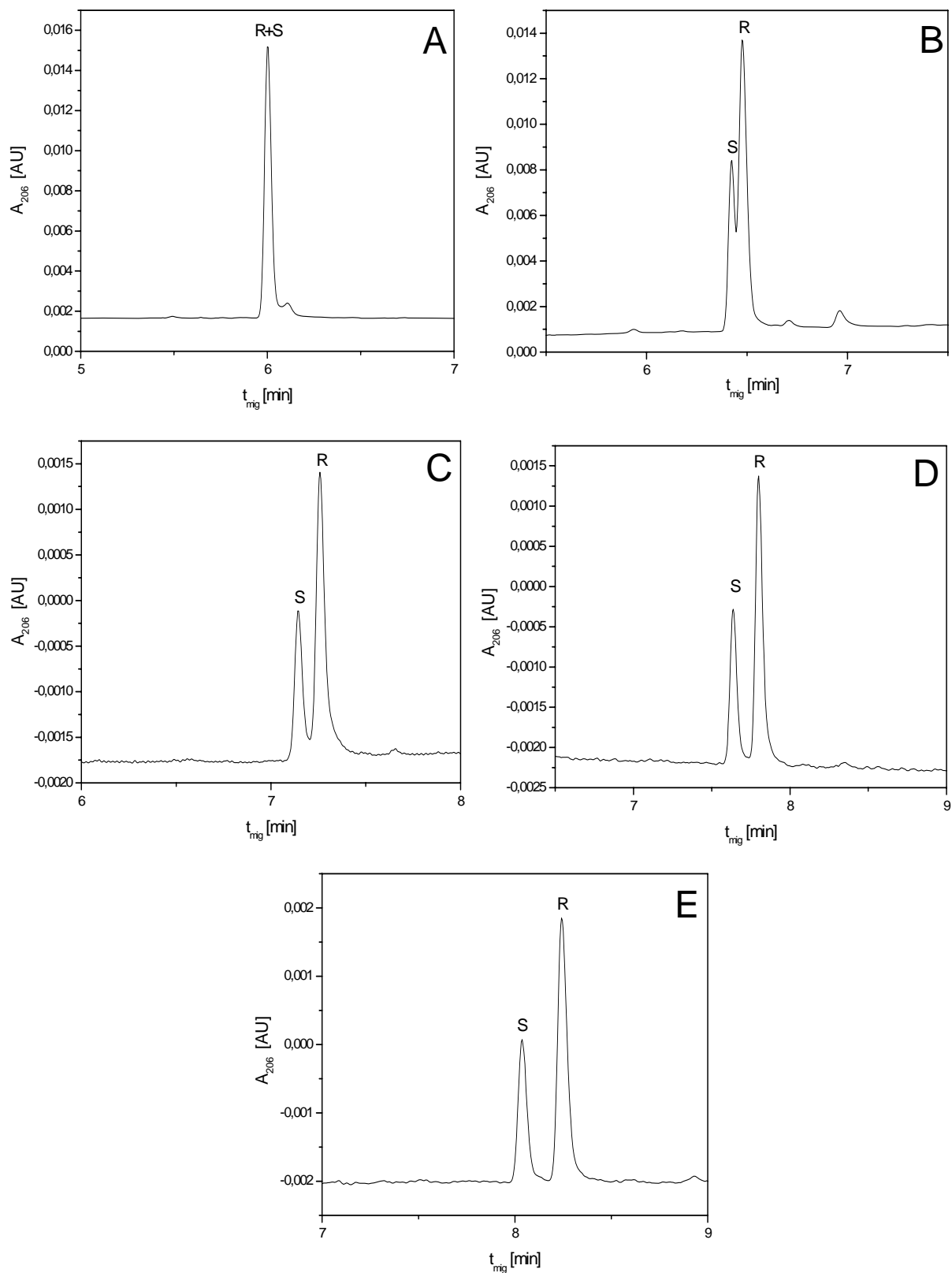
### 5.2.1 CE separace (*R,S*)-enantiomerů ANP

Pro CE separace (*R,S*)-enantiomerů ANP byl jako základní elektrolyt použit 35 mM tetraboritan sodný / hydroxid sodný (pH 10). Kladně nabitý kvartérní amonium-β-cyklodextrin (QA-β-CD) byl použit jako stereoselektivní komplexační činidlo. Koncentrace chirálního selektoru QA-β-CD v základním elektrolytu byla 0; 2,5; 5; 7,5 a 10 mM. CE separace analytů probíhala v křemenné kapiláře vnitřně potažené vrstvou hydroxyl-propylcelulosity. Aplikované napětí bylo -15 kV.

Analyzované (*R,S*)-enantiomery PMPA a HPMPA se podařilo rozdělit v základním elektrolytu s přidavkem 5 mM QA-β-CD. Nejlepší chirální separace bylo dosaženo v základním elektrolytu s přidavkem 10 mM QA-β-CD. (*R,S*)-enantiomery FPMPA se podařilo separovat v základním elektrolytu s přidavkem 10 mM QA-β-CD.

(*R,S*)-enantiomery analytů PMPDAP a HPMPDAP se při nejvyšší koncentraci chirálního selektoru QA-β-CD (10 mM) v 35 mM tetraboritanu sodném/NaOH (pH 10) podařilo rozdělit pouze částečně a (*R,S*)-enantiomerů analytů HPMPG a HPMPC se za daných podmínek nepodařilo rozlišit vůbec. Analýzy byly relativně rychlé (5-10 minut).

Ukázky CE separace (*R,S*)-enantiomerů FPMPA při různých koncentracích chirálního selektoru jsou uvedeny na obrázku 5.7.



Obrázek 5.7: CE separace (*R,S*)-enantiomerů FPMPA při různých koncentracích chirálního selektoru, QA-β-CD, v základním elektrolytu.

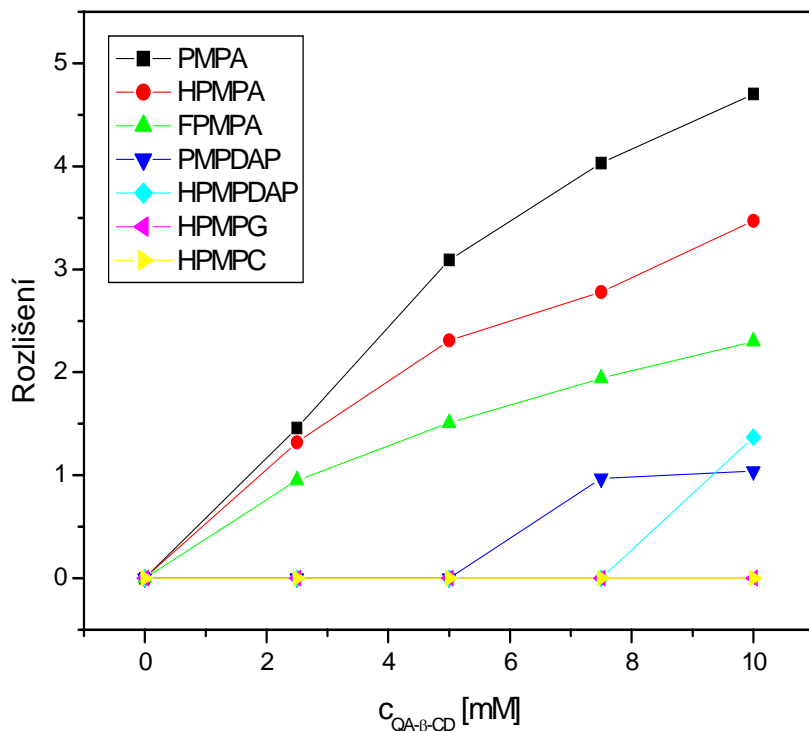
Experimentální podmínky: kapilára vnitřně potažená hydroxypropylcelulosou 50 / 375 μm; 29,5 / 39,8 cm

BGE: 35 mM tetraboritan sodný /NaOH; pH 10; 20 °C; – 15 kV

A: 0 mM QA-β-CD; B: 2,5 mM QA-β-CD; C: 5 mM QA-β-CD; D: 7,5 mM QA-β-CD a E: 10 mM QA-β-CD

$A_{206}$  – absorbance při vlnové délce 206 nm,  $t_{mig}$  – migrační čas

Z obrázku 5.7 je patrná závislost rozlišení (*R,S*)-enantiomerů FPMPA na koncentraci QA-β-CD. Pro (*R,S*)-enantiomery ANP je závislost rozlišení jejich CE separací na koncentraci chirálního selektoru QA-β-CD zobrazena na obrázku 5.8.



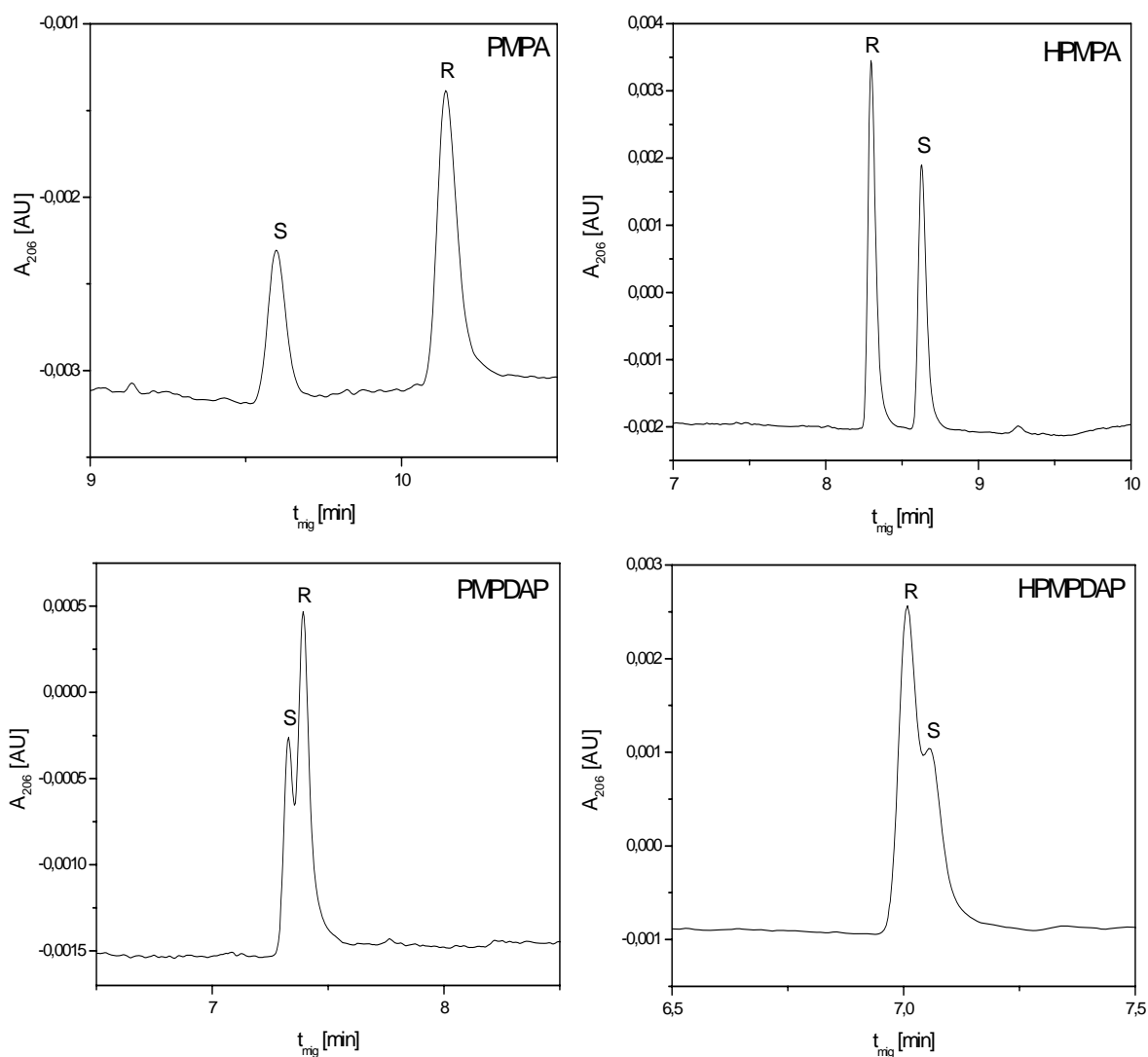
Obrázek 5.8: Závislost rozlišení separovaných (*R,S*)-enantiomerů ANP na koncentraci chirálního selektoru QA-β-CD,  $c_{QA-\beta-CD}$ .

Hodnoty rozlišení CE separací analyzovaných (*R,S*)-enantiomerů ANP jsou uvedeny v tabulce 5.4.

Tabulka 5.4: Rozlišení CE separací analyzovaných (*R,S*)-enantiomerů ANP při různých koncentracích chirálního selektoru QA-β-CD.

Rozlišení							
$c_{QA-\beta-CD}$ [mM]	PMPA	HPMPA	FPMPA	PMPDAP	HPMPDAP	HPMPG	HPMPC
0	0	0	0	0	0	0	0
2,5	1,46	1,32	0,95	0	0	0	0
5	3,09	2,31	1,51	0	0	0	0
7,5	4,03	2,78	1,94	0,97	0	0	0
10	4,70	3,47	2,30	1,04	1,37	0	0

Záznamy CE separací (*R,S*)-enantiomerů ANP s maximálním rozlišením jsou na obrázku 5.9.



Obrázek 5.9: CE separace (*R,S*)-enantiomerů ANP s maximálním rozlišením.

Experimentální podmínky: kapilára vnitřně potažená hydroxypropylcelulosou 50 / 375  $\mu$ m; 29,5 / 39,8 cm  
 BGE: 35 mM tetraboritan sodný /NaOH; pH 10; 10 mM QA- $\beta$ -CD; 20  $^{\circ}$ C; - 15 kV  
 $A_{206}$  – absorbance při vlnové délce 206 nm,  $t_{mig}$  – migrační čas

Z porovnání CE separací analyzovaných ANP v základním elektrolytu s přidavkem chirálního selektoru  $\beta$ -CD nebo QA- $\beta$ -CD vyplývá, že u analytů PMPA, HPMPA a FPMPA bylo dosaženo lepšího rozlišení s 10 mM QA- $\beta$ -CD. (*R,S*)-enantiomery ostatních analyzovaných ANP se podařilo lépe rozlišit v BGE s 20 mg/ml  $\beta$ -CD než v BGE s QA- $\beta$ -CD.

## 5.2.2 Stanovení efektivní pohyblivosti (*R,S*)-enantiomerů ANP

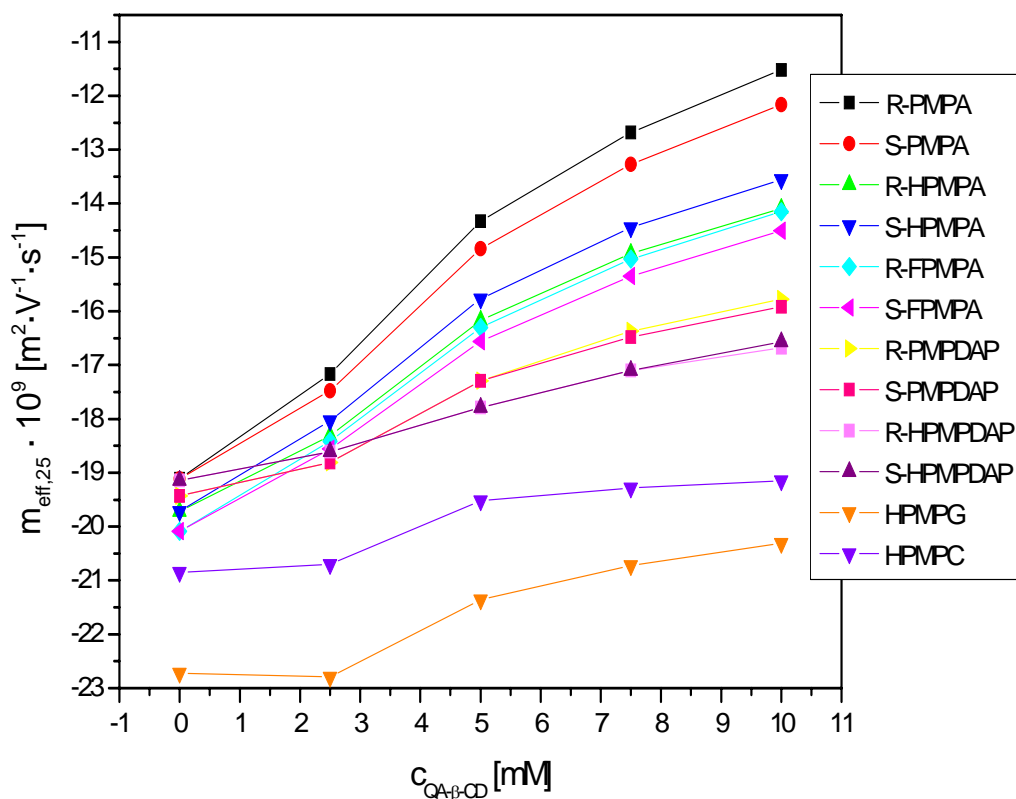
Efektivní pohyblivosti jednotlivých analytů byly vypočteny podle rovnice 3.9. Efektivní pohyblivost markeru elektroosmotického toku byla zanedbána, protože byla blízká nule. Z naměřených hodnot byla vypočtena efektivní elektroforetická pohyblivost korigovaná na referenční teplotu 25 °C podle rovnice 5.2. Hodnoty efektivních elektroforetických pohyblivostí (*R,S*)-enantiomerů ANP korigovaných na referenční teplotu 25 °C jsou uvedeny v tabulce 5.5.

Tabulka 5.5: Hodnoty efektivních pohyblivostí (*R,S*)-enantiomerů ANP korigovaných na referenční teplotu 25 °C při různých koncentracích QA-β-CD v základním elektrolytu. (uvedené hodnoty jsou průměry ze 3 měření s relativními standardními odchylkami v rozmezí 0,1 – 2,0 %, u většiny měření do 1 %)

Analyt		0 mM	2,5 mM	5 mM	7,5 mM	10 mM
		QA-β-CD	QA-β-CD	QA-β-CD	QA-β-CD	QA-β-CD
		$m_{eff,25} \cdot 10^9$	$m_{eff,25} \cdot 10^9$	$m_{eff,25} \cdot 10^9$	$m_{eff,25} \cdot 10^9$	$m_{eff,25} \cdot 10^9$
		[m <sup>2</sup> ·V <sup>-1</sup> ·s <sup>-1</sup> ]	[m <sup>2</sup> ·V <sup>-1</sup> ·s <sup>-1</sup> ]	[m <sup>2</sup> ·V <sup>-1</sup> ·s <sup>-1</sup> ]	[m <sup>2</sup> ·V <sup>-1</sup> ·s <sup>-1</sup> ]	[m <sup>2</sup> ·V <sup>-1</sup> ·s <sup>-1</sup> ]
PMPA	R	-19,1	-17,2	-14,3	-12,7	-11,5
	S	-19,1	-17,5	-14,8	-13,3	-12,2
HPMPA	R	-19,7	-18,3	-16,2	-14,9	-14,1
	S	-19,7	-18,0	-15,8	-14,5	-13,6
FPMPA	R	-20,1	-18,4	-16,3	-15,0	-14,2
	S	-20,1	-18,6	-16,6	-15,4	-14,5
PMPDAP	R	-19,4	-18,8	-17,3	-16,4	-15,8
	S	-19,4	-18,8	-17,3	-16,5	-15,9
HPMPDAP	R	-19,1	-18,6	-17,8	-17,1	-16,7
	S	-19,1	-18,6	-17,8	-17,1	-16,6
HPMPG		-22,7	-22,8	-21,4	-20,7	-20,3
HPMPC		-20,9	-20,7	-19,5	-19,3	-19,2



Efektivní elektroforetické pohyblivosti (*R,S*)-enantiomerů ANP jsou v základním elektrolytu bez přídavku chirálního selektoru stejné. Se zvyšující se koncentrací chirálního selektoru QA-β-CD hodnota efektivní elektroforetické pohyblivosti ANP klesá a zvětšuje se i rozdíl pohyblivostí mezi jednotlivými (*R,S*)-enantiomery. Závislost efektivních elektroforetických pohyblivostí (*R,S*)-enantiomerů ANP na koncentraci chirálního selektoru QA-β-CD je zobrazena na obrázku 5.10.



Obrázek 5.10: Závislost efektivních pohyblivostí (*R,S*)-enantiomerů ANP na koncentraci chirálního selektoru QA-β-CD. ( $c_{QA-\beta-CD}$  – koncentrace QA-β-CD,  $m_{eff,25}$  – efektivní elektroforetická pohyblivost při 25 °C)

Rozdělíme-li analyzované ANP do stejných skupin podle jejich struktury a elektroforetických pohyblivostí (*R,S*)-enantiomerů jako při stanovení s β-CD (kapitola 5.1.2) bude skupina 1 obsahovat analyty PMPA, PMPDAP a FPMPA a skupina 2 HPMPA, HPMPDAP, HPMPG a HPMPC. Analyty skupiny 1 neobsahují hydroxylovou skupinu na uhlíku C3 propylového řetězce. Jejich (*S*)-enantiomery vykazují kratší migrační časy než (*R*)-enantiomery. (*S*)-enantiomery mají vyšší elektroforetickou pohyblivost a jsou méně zpomalovány komplexací s kladně nabitým QA-β-CD. Analyty

skupiny 2 obsahují hydroxylovou skupinu na uhlíku C3 propylového řetězce a jejich (*R*)-enantiomery mají delší migrační časy a menší elektroforetickou pohyblivost než (*S*)-enantiomery. (*R*)-enantiomery jsou více zpožděny tvorbou komplexu s QA-β-CD. Pokud ANP obsahuje hydroxylovou skupinu (*R*)-enantiomer vytváří silnější komplex s QA-β-CD než (*S*)-enantiomer. Jestliže ANP neobsahuje hydroxylovou skupinu, vzniká slabší komplex mezi (*S*)-enantiomerem a QA-β-CD než (*R*)-enantiomerem a QA-β-CD.

### 5.2.3 Stanovení asociačních konstant komplexů (*R,S*)-enantiomerů ANP s QA-β-CD

Asociační konstanty a pohyblivosti komplexů (*R,S*)-enantiomerů ANP s QA-β-CD vypočítané programem Origin podle rovnice 5.4 a jejich standardní odchylky jsou uvedeny v tabulce 5.6.

Tabulka 5.6: Hodnoty asociačních konstant,  $K_{AC}$ , a elektroforetické pohyblivosti,  $m_{AC}$ , komplexů (*R,S*)-enantiomerů ANP s QA-β-CD a jejich standardní odchylky (SD).

Analyt		$K_{AC}$ [dm <sup>3</sup> ·mol <sup>-1</sup> ]	SD	$m_{AC}$ [m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]	SD
<b>PMPA</b>	<b>R</b>	36,1	22,9	-10,2	14,4
	<b>S</b>	27,2	23,0	-14,2	23,1
<b>HPMPA</b>	<b>R</b>	35,2	24,1	-2,5	11,9
	<b>S</b>	43,8	22,3	-1,0	7,85
<b>FPMPA</b>	<b>R</b>	45,3	20,4	0,6	6,5
	<b>S</b>	41,9	20,5	0,8	7,1
<b>PMPDAP</b>	<b>R</b>	58,4	7,0	9,9	0,8
	<b>S</b>	45,7	10,8	7,7	2,0
<b>HPMPDAP</b>	<b>R</b>	*	*	*	*
	<b>S</b>	*	*	*	*
<b>HPMPG</b>		34,2	11,5	13,2	2,5
<b>HPMPC</b>		*	*	*	*

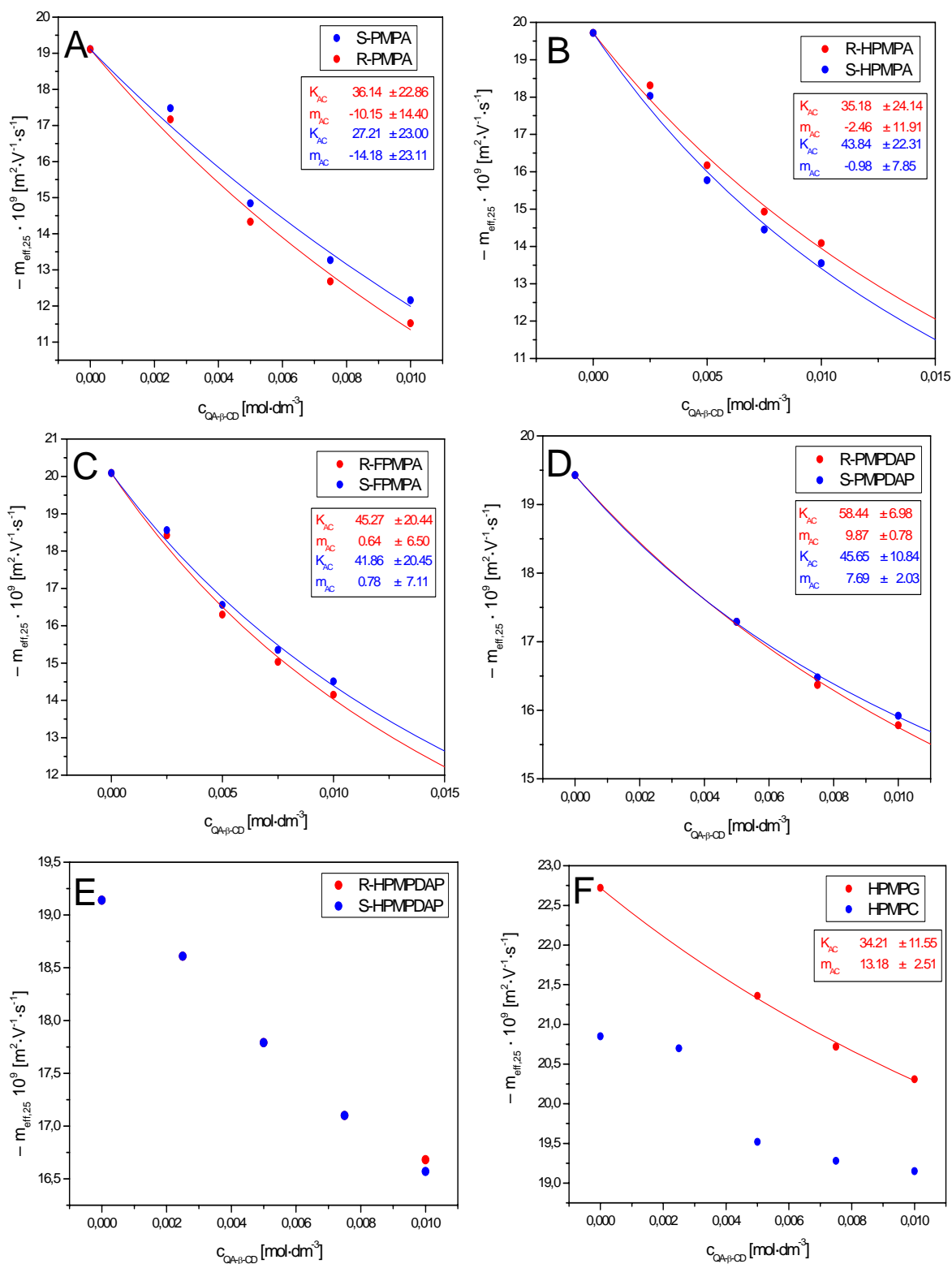
(\*nebylo stanoveno)

Pro komplex (*R*)-enantiomeru analytů PMPA, FPMPA, PMPDAP a HPMPDAP s QA-β-CD byla nalezena vyšší hodnota asociační konstanty než pro jejich (*S*)-enantiomer. Z těchto hodnot asociačních konstant vyplývá, že (*R*)-enantiomer těchto analytů vytváří pevnější komplex s QA-β-CD než jejich (*S*)-enantiomer.

U komplexů (*R,S*)-enantiomerů HPMPA s QA-β-CD byla zjištěna vyšší hodnota asociační konstanty pro komplex (*S*)-enantiomeru ( $43,8 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$ ) než pro komplex (*R*)-enantiomeru ( $35,2 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$ ). Z toho vyplývá, že (*S*)-enantiomer formuje stabilnější komplex s QA-β-CD než (*R*)-enantiomer.

(*R,S*)-enantiomery analytů HPMPG a HPMPC se nepodařilo rozdělit, a proto byla asociační konstanta stanovena pro *R* a *S* enantiomer společně. Pro HPMPG byla asociační konstanta rovna  $34,2 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$  a u HPMPC je  $33,5 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$ , ale tato hodnota je zatížená velkou chybou.

Závislosti, ze kterých byly asociační konstanty získány v programu Origin 6.1, jsou zobrazeny na obrázku 5.11.



Obrázek 5.11: Vynesení nelineární regresní analýzy použité pro stanovení asociačních konstant ze závislosti efektivní mobility (*R,S*)-enantiomerů ANP na koncentraci QA-β-CD.

A: (*R,S*)-PMPA, B: (*R,S*)-HPMPA, C: (*R,S*)-FPMPA, D: (*R,S*)-PMPDAP, E: (*R,S*)-HPMPDAP a F: (*R,S*)-HPMPG a (*R,S*)-HPMPC

( $c_{QA-\beta-CD}$  – koncentrace QA-β-CD,  $m_{eff,25}$  – efektivní elektroforetická pohyblivost při 25 °C)

## 5.3 Stanovení asociačních konstant komplexů

### (*R,S*)-enantiomerů HPMPG s dalšími chirálními selektory

#### 5.3.1 Stanovení efektivní pohyblivosti (*R,S*)-HPMPG

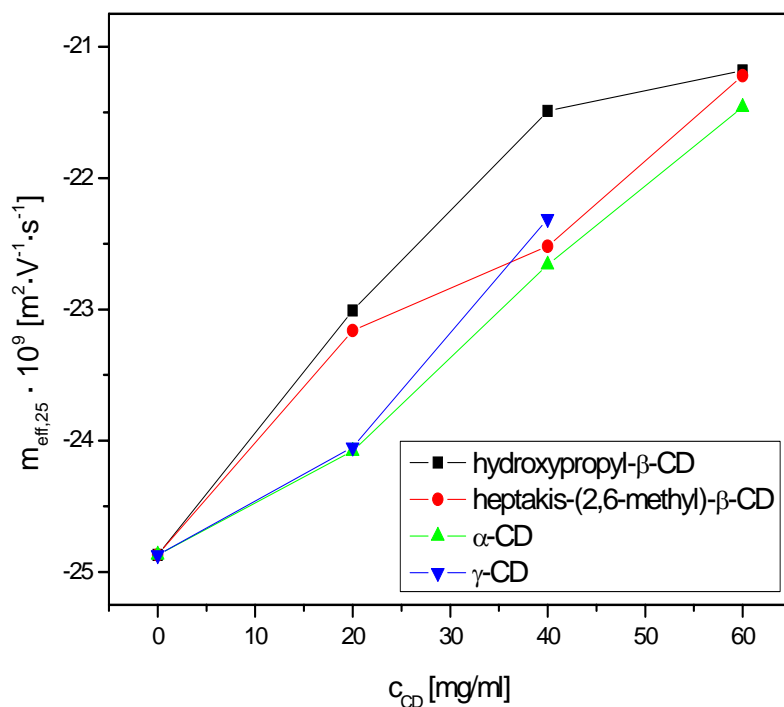
Efektivní elektroforetické pohyblivosti (*R,S*)-HPMPG byly vypočteny podle rovnice 3.9. Naměřené hodnoty byly korigovány na referenční teplotu 25 °C podle rovnice 5.2. Hodnoty efektivních elektroforetických pohyblivostí (*R,S*)-HPMPG korigované na referenční teplotu 25 °C jsou uvedeny v tabulce 5.7.

Tabulka 5.7: Hodnoty efektivních elektroforetických pohyblivostí (*R,S*)-HPMPG korigované na referenční teplotu 25 °C. (uvedené hodnoty jsou průměry ze 3 měření s relativními standardními odchylkami v rozmezí 0 – 3 %)

$c_{CD}$ [mg/ml]	2-hydroxypropyl- $\beta$ -CD $m_{eff,25} \cdot 10^9$ [m <sup>2</sup> ·V <sup>-1</sup> ·s <sup>-1</sup> ]	heptakis-(2,6-dimethyl)- $\beta$ -CD $m_{eff,25} \cdot 10^9$ [m <sup>2</sup> ·V <sup>-1</sup> ·s <sup>-1</sup> ]	$\alpha$ -CD $m_{eff,25} \cdot 10^9$ [m <sup>2</sup> ·V <sup>-1</sup> ·s <sup>-1</sup> ]	$\gamma$ -CD $m_{eff,25} \cdot 10^9$ [m <sup>2</sup> ·V <sup>-1</sup> ·s <sup>-1</sup> ]
0	-24,9	-24,9	-24,9	-24,9
20	-23,0	-23,2	-24,1	-24,1
40	-21,5	-22,5	-22,7	-22,3
60	-21,2	-21,2	-21,5	*

(\* nenaměřeno)

Efektivní elektroforetické pohyblivosti (*R,S*)-enantiomerů HPMPG jsou v základním elektrolytu bez přídavku chirálního selektoru stejné. Se zvyšující se koncentrací chirálního selektoru hodnota efektivní elektroforetické pohyblivosti klesá. Závislost efektivních elektroforetických pohyblivostí na koncentraci chirálních selektorů je zobrazena na obrázku 5.12.



Obrázek 5.12: Závislost efektivních elektroforetických pohyblivostí (*R,S*)-HPMPG na koncentraci chirálních selektorů ( $c_{CD}$  - koncentrace chirálních selektorů,  $m_{eff,25}$  - efektivní elektroforetická pohyblivost při 25 °C)

### 5.3.2 Stanovení asociačních konstant komplexů (*R,S*)-HPMPG s dalšími chirálními selektory

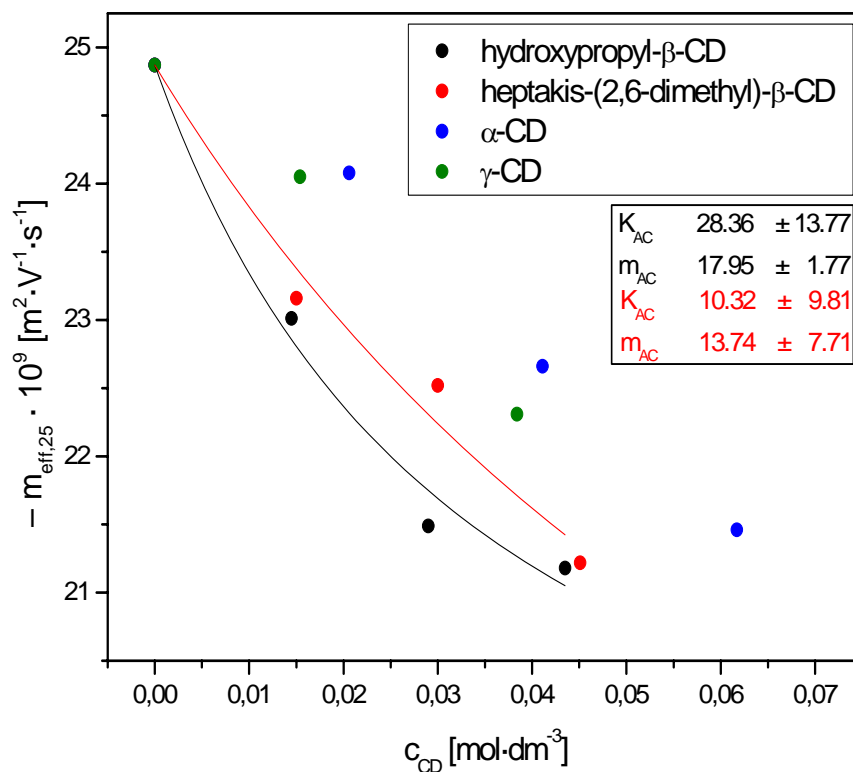
Asociační konstanty a elektroforetické pohyblivosti komplexů HPMPG s dalšími chirálními selektory vypočítané pomocí programu Origin 6.1 podle rovnice 5.4 a jejich standardní odchylky jsou uvedeny v tabulce 5.8.

Tabulka 5.8: Hodnoty asociačních konstant,  $K_{AC}$ , a elektroforetických pohyblivostí,  $m_{AC}$ , komplexů (*R,S*)-HPMPG s dalšími chirálními selektory a jejich standardní odchylky (SD).

Chirální selektor	$K_{AC}$ [dm <sup>3</sup> ·mol <sup>-1</sup> ]	SD	$m_{AC}$ [m <sup>2</sup> ·V <sup>-1</sup> ·s <sup>-1</sup> ]	SD
2-hydroxypropyl- $\beta$ -CD	28,4	13,8	18,0	1,8
heptakis-(2,6-dimethyl)- $\beta$ -CD	10,3	9,8	13,8	7,7
$\alpha$ -CD	*	*	*	*
$\gamma$ -CD	*	*	*	*

(\*nebylo stanoveno)

Závislosti, ze kterých byly asociační konstanty a elektroforetické pohyblivosti komplexů HPMPG s chirálními selektory získány, jsou zobrazeny na obrázku 5.13.



Obrázek 5.13: Vynesení nelineární regresní analýzy použité pro stanovení asociačních konstant a elektroforetických pohyblivostí,  $m_{AC}$ , komplexů HPMPG s chirálními selektory ze závislosti efektivní mobility (*R,S*)-HPMPG na koncentraci chirálního selektoru. ( $c_{CD}$  – koncentrace chirálního selektoru,  $m_{eff,25}$  – efektivní elektroforetická pohyblivost při 25 °C)

Hodnota asociační konstanty komplexů (*R,S*)-enantiomerů HPMPG s chirálním selektorem 2-hydroxypropyl- $\beta$ -CD je  $28,4 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$  a s heptakis-(2,6-dimethyl)- $\beta$ -CD je  $10,3 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$ . To znamená, že HPMPG tvoří pevnější komplex s hydroxypropyl- $\beta$ -CD než s heptakis-(2,6-dimethyl)- $\beta$ -CD. Asociační konstanty komplexů a elektroforetické pohyblivosti komplexů HPMPG s chirálními selektory  $\alpha$ -CD a  $\gamma$ -CD nebyly stanoveny.

## 5.4 Stanovení asociačních konstant komplexů

### (R,S)-enantiomerů HPMPK s dalšími chirálními selektory

#### 5.4.1 Stanovení efektivní pohyblivosti (R,S)-HPMPC

Efektivní elektroforetické pohyblivosti (R,S)-HPMPC byly vypočteny podle rovnice 3.9 a korigovány na teplotu 25 °C podle rovnice 5.2. Hodnoty efektivních elektroforetických pohyblivostí HPMPK korigované na referenční teplotu 25 °C jsou uvedeny v tabulce 5.9.

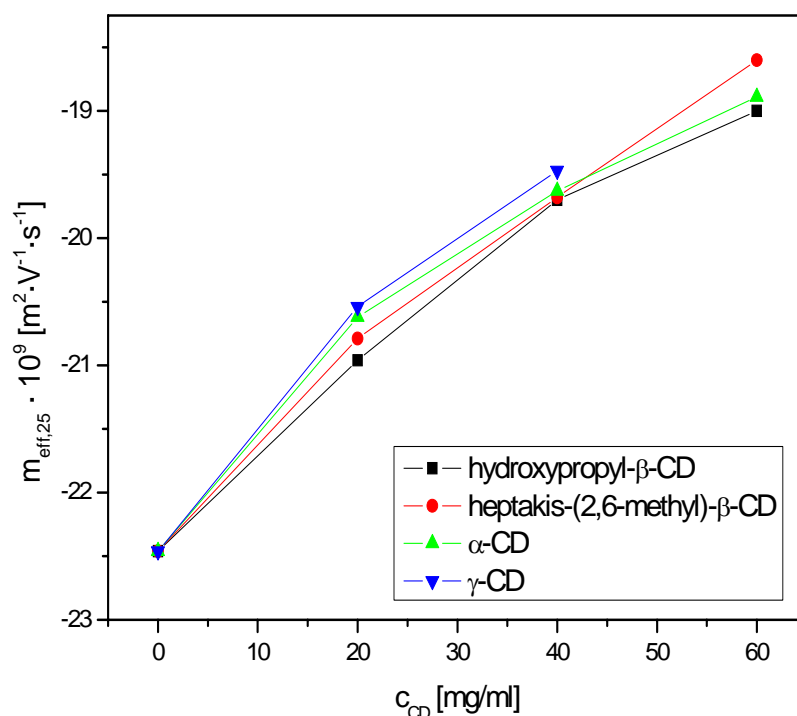
Tabulka 5.9: Hodnoty efektivních elektroforetických pohyblivostí (R,S)-HPMPC korigovaných na referenční teplotu 25 °C. (uvedené hodnoty jsou průměry ze 3 měření s relativními standardními odchylkami v rozmezí 0 – 3 %)

$c_{CD}$ [mg/ml]	2-hydroxypropyl- $\beta$ -CD $m_{eff,25} \cdot 10^9$ [m <sup>2</sup> ·V <sup>-1</sup> ·s <sup>-1</sup> ]	heptakis- (2,6-dimethyl)- $\beta$ -CD $m_{eff,25} \cdot 10^9$ [m <sup>2</sup> ·V <sup>-1</sup> ·s <sup>-1</sup> ]	$\alpha$ -CD $m_{eff,25} \cdot 10^9$ [m <sup>2</sup> ·V <sup>-1</sup> ·s <sup>-1</sup> ]	$\gamma$ -CD $m_{eff,25} \cdot 10^9$ [m <sup>2</sup> ·V <sup>-1</sup> ·s <sup>-1</sup> ]
0	-22,5	-22,5	-22,5	-22,5
20	-21,0	-20,8	-20,6	-20,5
40	-19,7	-19,7	-19,6	-19,5
60	-19,0	-18,6	-19,0	*

(\* nenaměřeno)

Efektivní elektroforetické pohyblivosti (R,S)-HPMPC jsou v základním elektrolytu bez přídavku chirálního selektoru stejné. Se zvyšující se koncentrací chirálního selektoru hodnota efektivní elektroforetické pohyblivosti klesá. Závislost těchto efektivních elektroforetických pohyblivostí na koncentraci chirálních selektorů je uvedena na obrázku 5.14.





Obrázek 5.14: Závislost efektivních elektroforetických pohyblivostí (*R,S*)-HPMPC na koncentraci chirálního selektoru ( $c_{CD}$  - koncentrace chirálního selektoru,  $m_{eff,25}$  - efektivní elektroforetická pohyblivost při 25 °C).

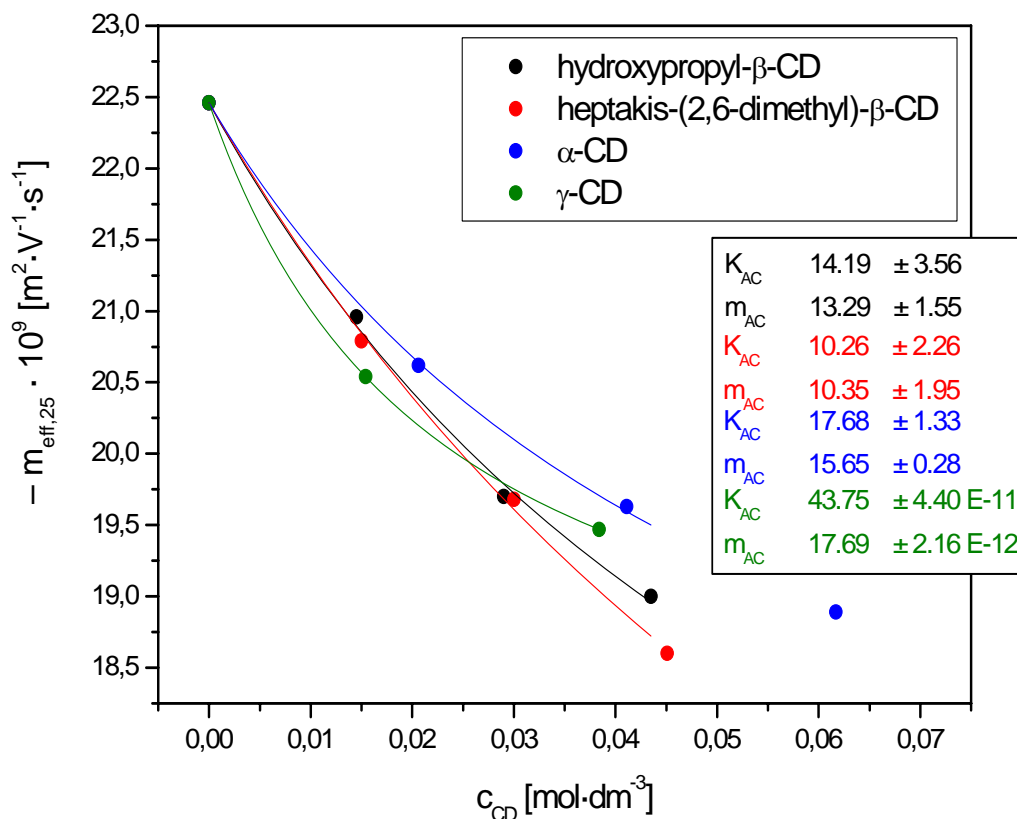
#### 5.4.2 Stanovení asociačních konstant komplexů (*R,S*)-HPMPC s dalšími chirálními selektory

Hodnoty asociačních konstant komplexů HPMPG s dalšími chirálními selektory stanovené pomocí programu Origin 6.1 podle rovnice 5.4 a jejich standardní odchylky jsou uvedeny v tabulce 5.10.

Tabulka 5.10: Hodnoty asociačních konstant,  $K_{AC}$ , a elektroforetických pohyblivostí,  $m_{AC}$ , komplexů (*R,S*)-HPMPC s dalšími chirálními selektory a jejich standardní odchylky (SD).

Chirální selektor	$K_{AC}$ [dm <sup>3</sup> ·mol <sup>-1</sup> ]	SD	$m_{AC}$ [m <sup>2</sup> ·V <sup>-1</sup> ·s <sup>-1</sup> ]	SD
2-hydroxypropyl- $\beta$ -CD	14,2	3,6	13,3	1,6
heptakis-(2,6-dimethyl)- $\beta$ -CD	10,3	2,3	10,4	2,0
$\alpha$ -CD	17,7	1,3	15,7	0,3
$\gamma$ -CD	43,8	$4,4 \cdot 10^{-11}$	17,7	$2,2 \cdot 10^{-12}$

Závislosti, ze kterých byly asociační konstanty a elektroforetické pohyblivosti komplexů HPMPC s chirálními selektory získány, jsou zobrazeny na obrázku 5.15.



Obrázek 5.15: Vynesení nelineární regresní analýzy použité pro stanovení asociačních konstant a elektroforetických pohyblivostí,  $m_{AC}$ , komplexů HPMPC s chirálními selektory ze závislosti efektivní mobility ( $R,S$ )-HPMPC na koncentraci chirálního selektoru. ( $c_{CD}$  - koncentrace chirálního selektoru,  $m_{eff,25}$  - efektivní elektroforetická pohyblivost při 25 °C)

Vypočítané asociační konstanty komplexů HPMPC s chirálními selektory 2-hydroxypropyl- $\beta$ -CD, heptakis-(2,6-dimethyl)- $\beta$ -CD a  $\alpha$ -CD nebyly příliš rozdílné. Jejich hodnoty se pohybovaly v rozmezí 10,2 – 17,7  $\text{dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$ . Nejvyšší hodnota asociační konstanty byla stanovena u komplexů HPMPC s chirálním selektorem  $\gamma$ -CD (43,8  $\text{dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$ ). To znamená, že HPMPC vytváří nejpevnější komplex s  $\gamma$ -CD.

## 6 ZÁVĚR

V rámci diplomové práce byla metodou kapilární elektroforézy (CE) provedena chirální separace významných, již schválených nebo potenciálních antivirotických léčiv, (*R,S*)-enantiomerů acyklických nukleosid fosfonátů. Z řady testovaných chirálních selektorů cyklodextrinového typu se pro tyto analyty jako nejlepší ukázaly neutrální  $\beta$ -cyklodextrin a kladně nabitý kvartérní amonium  $\beta$ -cyklodextrin. (*R,S*)-enantiomery analytů 9-[2-(fosfonomethoxy)propyl]adenin (PMPA), 9-[3-hydroxy-2-(fosfonomethoxy)propyl]adenin (HPMPA) a 9-[3-fluoro-2-(fosfonomethoxy)propyl]adenin (FPMPA) se podařilo nejlépe rozlišit v základním elektrolytu obsahujícím 35 mM tetraboritan sodný / hydroxid sodný (pH 10) s přidavkem 10 mM kvartérního amonium  $\beta$ -cyklodextrinu. Pro (*R,S*)-enantiomery ostatních analyzovaných acyklických nukleosid fosfonátů bylo dosaženo nejlepšího chirálního rozlišení v základním elektrolytu 35 mM tetraboritan sodný / hydroxid sodný (pH 10) s přidavkem 17,6 mM  $\beta$ -cyklodextrinu. Nejhůře se dělily (*R,S*)-enantiomery 9-[3-hydroxy-2-(fosfonomethoxy)propyl]cytosinu (HPMPC), u kterých došlo pouze k částečnému rozdělení při koncentraci 17,6 mM  $\beta$ -cyklodextrinu v základním elektrolytu.

Metodou kapilární elektroforézy byly stanoveny asociační konstanty komplexů (*R,S*)-enantiomerů acyklických nukleosid fosfonátů se stereoselektivními komplexačními činidly. Jako stereoselektivní komplexační činidla byly použity následující nativní a derivatizované cyklodextriny:  $\alpha$ -cyklodextrin,  $\beta$ -cyklodextrin,  $\gamma$ -cyklodextrin, 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyklodextrin, heptakis-(2,6-dimethyl)- $\beta$ -cyklodextrin, kvartérní amonium  $\beta$ -cyklodextrin. Asociační konstanty byly určeny z experimentálně změřené závislosti efektivní elektroforetické pohyblivosti analytů na koncentraci cyklodextrinu v základním elektrolytu metodou nelineární regresní analýzy. Efektivní elektroforetické pohyblivosti acyklických nukleosid fosfonátů byly předem korigovány na referenční teplotu 25 °C. Stanovené hodnoty asociačních konstant se pohybovaly v rozmezí 10,3 - 69,3 dm<sup>3</sup>·mol<sup>-1</sup>. Nejvyšší hodnota asociační konstanty byla zjištěna pro komplex (*R*)-enantiomeru 9-[2-(fosfonomethoxy)propyl]adeninu (PMPA) s  $\beta$ -cyklodextrinem. Nejnižší hodnotu asociační konstanty vykazovaly komplexy 9-[3-hydroxy-2-(fosfonomethoxy)propyl]guaninu (HPMPG) a 9-[3-hydroxy-2-(fosfonomethoxy)propyl]cytosinu (HPMPC) s heptakis-(2,6-dimethyl)-

$\beta$ -cyklodextrinem. V některých případech asociační konstanty komplexů nebylo možné stanovit, neboť změřené závislosti elektroforetických pohyblivostí analytů na koncentraci chirálního selektoru v základním elektrolytu neodpovídaly navrženému modelu komplexace.

Bylo ověřeno, že kapilární elektroforéza je vhodná metoda pro separace (*R,S*)-enantiomerů acyklických nukleosid fosfonátů a pro stanovení asociačních konstant komplexů (*R,S*)-enantiomerů acyklických nukleosid fosfonátů s cyklodextriny.

## POUŽITÁ LITERATURA

- [1] Tanaka, Y.; Terabe, S.: Estimation of binding constants by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography B* **768**:1, 81-92 (2002).
- [2] Ostergaard, J.; Heegaard, N. H. H.: Capillary electrophoresis frontal analysis: Principles and applications for the study of drug-plasma protein binding. *Electrophoresis* **24**:17, 2903-2913 (2003).
- [3] Erim, F. B.; Kraak, J. C.: Vacancy affinity capillary electrophoresis to study competitive protein-drug binding. *Journal of Chromatography B* **710**:1-2, 205-210 (1998).
- [4] Rudnev, A. V.; Aleksenko, S. S.; Semenova, O.; Hartinger, C. G.; Timerbaev, A. R.; Keppler, B. K.: Determination of binding constants and stoichiometries for platinum anticancer drugs and serum transport proteins by capillary electrophoresis using the Hummel-Dreyer method. *Journal of Separation Science* **28**:2, 121-127 (2005).
- [5] Busch, M. H. A.; Carels, L. B.; Boelens, H. F. M.; Kraak, J. C.; Poppe, H.: Comparison of five methods for the study of drug-protein binding in affinity capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A* **777**:2, 311-328 (1997).
- [6] Oravcová, J.; Bohs, B.; Lindner, W.: Drug-protein binding studies - New trends in analytical and experimental methodology. *Journal of Chromatography B-Biomedical Applications* **677**:1, 1-28 (1996).
- [7] Uegaki, K.; Taga, A.; Akada, Y.; Suzuki, S.; Honda, S.: Simultaneous estimation of the association constants of glycoprotein glycoforms to a common protein by capillary electrophoresis. *Analytical Biochemistry* **309**:2, 269-278 (2002).
- [8] Kameshita, I.; Ishida, A.; Fujisawa, H.: Analysis of protein-protein interaction by two-dimensional affinity electrophoresis. *Analytical Biochemistry* **262**:1, 90-92 (1998).
- [9] Cann, J. R.: Theory and practice of gel electrophoresis of interacting macromolecules. *Analytical Biochemistry* **237**:1, 1-16 (1996).
- [10] Fraga, M. F.; Ballestar, E.; Esteller, M.: Capillary electrophoresis-based method to quantitate DNA- protein interactions. *Journal of Chromatography B* **789**:2, 431-435 (2003).
- [11] Huang, G. L.; Yang, H.; Mei, X. Y.; Liu, M. X.; Ma, Y. T.: Fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis as detection method for carbohydrate-protein interactions. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **136**:1, 17-22 (2007).
- [12] Rao, J. H.; Whitesides, G. M.: Tight binding of a dimeric derivative of vancomycin with dimeric L-Lys-D-Ala-D-Ala. *Journal of the American Chemical Society* **119**:43, 10286-10290 (1997).

- [13] Tseng, W. L.; Chang, H. T.; Hsu, S. M.; Chen, R. J.; Lin, S. M.: Immunoaffinity capillary electrophoresis: Determination of binding constant and stoichiometry for antibody-antigen interaction. *Electrophoresis* **23**:6, 836-846 (2002).
- [14] Freitag, R.: Utilization of enzyme-substrate interactions in analytical chemistry. *Journal of Chromatography B* **722**:1-2, 279-301 (1999).
- [15] Ševčík, J.; Tesařová, E.; Stránský, Z.: Separation of chiral compounds by capillary electrophoresis. *Chemické Listy* **95**:3, 139-146 (2001).
- [16] Van Eeckhaut, A.; Michotte, Y.: Chiral separations by capillary electrophoresis: Recent developments and applications. *Electrophoresis* **27**:14, 2880-2895 (2006).
- [17] Schmitt, U.; Branch, S. K.; Holzgrabe, U.: Chiral separations by cyclodextrin-modified capillary electrophoresis - Determination of the enantiomeric excess. *Journal of Separation Science* **25**:15-17, 959-974 (2002).
- [18] Koppenhoefer, B.; Zhu, X. F.; Jakob, A.; Wuerthner, S.; Lin, B. C.: Separation of drug enantiomers by capillary electrophoresis in the presence of neutral cyclodextrins. *Journal of Chromatography A* **875**:1-2, 135-161 (2000).
- [19] Bressolle, F.; Audran, M.; Pham, T. N.; Vallon, J. J.: Cyclodextrins and enantiomeric separations of drugs by liquid chromatography and capillary electrophoresis: Basic principles and new developments. *Journal of Chromatography B-Biomedical Applications* **687**:2, 303-336 (1996).
- [20] Rundlett, K. L.; Armstrong, D. W.: Methods for the determination of binding constants by capillary electrophoresis. *Electrophoresis* **22**:7, 1419-1427 (2001).
- [21] Vespalec, R.; Boček, P.: Calculation of stability constants for the chiral selector- enantiomer interactions from electrophoretic mobilities. *Journal of Chromatography A* **875**:1-2, 431-445 (2000).
- [22] Rundlett, K. L.; Armstrong, D. W.: Examination of the origin, variation, and proper use of expressions for the estimation of association constants by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*. **721**:1, 173-186 (1996).
- [23] McBryde, W. A. E.: Spectrophotometric Determination of Equilibrium Constants in Solution. *Talanta* **21**:10, 979-1004 (1974).
- [24] Egawa, T.; Tsuneshige, A.; Suematsu, M.; Yonetani, T.: Method for determination of association and dissociation rate constants of reversible bimolecular reactions by isothermal titration calorimeters. *Analytical Chemistry* **79**:7, 2972-2978 (2007).

- [25] Connors, K. A.; Lipari, J. M.: Effect of Cycloamyloses on Apparent Dissociation-Constants of Carboxylic-Acids and Phenols - Equilibrium Analytical Selectivity Induced by Complex-Formation. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **65**:3, 379-383 (1976).
- [26] Miyaji, T.; Kurono, Y.; Uekama, K.; Ikeda, K.: Inclusion Complexation of Barbiturates with Beta-Cyclodextrin in Aqueous-Solution .2. Simultaneous Determination of Complexation Equilibrium-Constants for Conjugated Guest Species by Extended Potentiometric Titration Method - Barbiturate-Beta-Cyclodextrin System. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **24**:6, 1155-1159 (1976).
- [27] Fielding, L.: Determination of association constants (K-a) from solution NMR data. *Tetrahedron* **56**:34, 6151-6170 (2000).
- [28] Rundlett, K. L.; Armstrong, D. W.: Methods for the estimation of binding constants by capillary electrophoresis. *Electrophoresis* **18**:12-13, 2194-2202 (1997).
- [29] Kašička, V.: Theoretical bases and separation principles of capillary electromigration methods. *Chemické Listy*. **91**:5, 320-329 (1997).
- [30] Chankvetadze, B.: *Capillary Electrophoresis in Chiral Analysis*. Chichester, New York, Weinheim, Brisbane, Singapore, Toronto, John Wiley & Sons 1997.
- [31] Heiger, D. N.: *High Performance Capillary Electrophoresis*. Waldbronn, Hewlett-Packard Company 1992, s. 1-136.
- [32] Boček, P. Analytical capillary electrophoresis. *In Advanced Instrumental Methods of Chemical Analysis*; Churacek, J. (ed.). Praha: Academia, 1993, p. 97-141.
- [33] Kvasničková, L.; Glatz, Z.; Kahle, V.: Capillary electrochromatography. *Chemické Listy* **97**:2, 86-92 (2003).
- [34] Foret, F.; Křivánková, L.; Boček, P. Capillary Zone Electrophoresis. Weinheim, Verlag Chemie 1993.
- [35] Hjertén, S. Free Zone Electrophoresis. 1-117. 1967. Faculty of Science, Univ. Uppsala.
- [36] Everaerts, F. M.; Hoving-Keulemans, W. M. L.: Zone electrophoresis in capillary tubes. *Sci. Tools* **17**, 25-28 (1970).
- [37] Virtanen, R.: Zone Electrophoresis in A Narrow-Bore Tube Employing Potentiometric Detection - Theoretical and Experimental Study. *Acta Polytechnica Scandinavica-Chemical Technology Series* **123**, 1-67 (1974).
- [38] Mikkers, F. E. P.; Everaerts, F. M.; Verheggen, T. P. E. M.: High-performance zone electrophoresis. *Journal of Chromatography* **169**: 11-20 (1979).

- [39] Jorgenson, J. W.; Lukacs, K. D.: Free-zone electrophoresis in glass-capillaries. *Clinical Chemistry* **27**:9, 1551-1553 (1981).
- [40] Jorgenson, J. W.; Lukacs, K. D.: High-resolution separations based on electrophoresis and electroosmosis. *Journal of Chromatography* **218**:1-3, 209-216 (1981).
- [41] Jorgenson, J. W.; Lukacs, K. D.: Zone electrophoresis in open-tubular glass-capillaries. *Analytical Chemistry* **53**:8, 1298-1302 (1981).
- [42] Terabe, S.; Otsuka, K.; Ichikawa, K.; Tsuchiya, A.; Ando, T.: Electrokinetic separations with micellar solutions and open-tubular capillaries. *Analytical Chemistry* **56**:1, 111-113 (1984).
- [43] Terabe, S.; Ozaki, H.; Otsuka, K.; Ando, T.: Electrokinetic chromatography with "2-O-carboxymethyl-beta-cyclodextrin as a moving stationary phase. *Journal of Chromatography* **332**:SEP, 211-217 (1985).
- [44] Terabe, S.; Otsuka, K.; Ando, T.: Electrokinetic chromatography with micellar solution and open-tubular capillary. *Analytical Chemistry* **57**:4, 834-841 (1985).
- [45] Petr, J.; Maier, V.; Znaleziowa, J.; Vítková, K.; Ranc, V.; Ševčík, J.: On-line Preconcentration on pH Boundary - the Beauty of Capillary Electrophoresis. *Chemické Listy* **103**:8, 661-666 (2009).
- [46] Pacáková, V.; Coufal, P.; Štulík, K.; Gaš, B.: The importance of capillary electrophoresis, capillary electrochromatography, and ion chromatography in separations of inorganic ions. *Electrophoresis* **24**:12-13, 1883-1891 (2003).
- [47] Padaruskas, A.: CE determination of small ions: methods and techniques. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **384**:1, 132-144 (2006).
- [48] Ramautar, R.; Somsen, G. W.; de Jong, G. J.: Direct sample injection for capillary electrophoretic determination of organic acids in cerebrospinal fluid. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **387**:1, 293-301 (2007).
- [49] Liu, C. C.; Huang, J. S.; Tyrrell, D. L. J.; Dovichi, N. J.: Capillary electrophoresis-electrospray-mass spectrometry of nucleosides and nucleotides: Application to phosphorylation studies of anti-human immunodeficiency virus nucleosides in a human hepatoma cell line. *Electrophoresis* **26**:7-8, 1424-1431 (2005).
- [50] Willems, A. V.; Deforce, D. L.; Van Peteghem, C. H.; Van Bocxlaer, J. F.: Analysis of nucleic acid constituents by on-line capillary electrophoresis-mass spectrometry. *Electrophoresis* **26**:7-8, 1221-1253 (2005).
- [51] Friedecky, D.; Bednar, P.; Prochazka, M.; Adam, T.: Analysis of intracellular nucleotides by capillary electrophoresis - Mass spectrometry. *Nucleosides Nucleotides & Nucleic Acids* **25**:9-11, 1233-1236 (2006).



- [52] Takahashi, T.; Sakurai, T.; Hirata, K.; Hoshino, H.: Separation of oligonucleotides with single-base mutation by capillary electrophoresis using specific interaction of metal ion with nucleotide. *Analyst* **134**:7, 1299-1301 (2009).
- [53] Helboe, T.; Hansen, S. H.: Separation of nucleosides using capillary electrochromatography. *Journal of Chromatography A* **836**:2, 315-324 (1999).
- [54] Dolník, V.: Capillary electrophoresis of proteins 2005-2007. *Electrophoresis* **29**:1, 143-156 (2008).
- [55] Kašička, V.: Recent developments in CE and CEC of peptides. *Electrophoresis* **29**:1, 179-206 (2008).
- [56] Kašička, V.: Recent advances in CE and CEC of peptides (2007-2009). *Electrophoresis* **31**:1, 122-146 (2010).
- [57] El Rassi, Z.: Electrophoretic and electrochromatographic separation of proteins in capillaries: An update covering 2007-2009. *Electrophoresis* **31**:1, 174-191 (2010).
- [58] Schiffer, E.; Mischak, H.; Novak, J.: High resolution proteome/peptidome analysis of body fluids by capillary electrophoresis coupled with MS. *Proteomics* **6**:20, 5615-5627 (2006).
- [59] Kabel, M. A.; Heijnis, W. H.; Bakx, E. J.; Kuijpers, R.; Voragen, A. G. J.; Schols, H. A.: Capillary electrophoresis fingerprinting, quantification and mass-identification of various 9-aminopyrene-1,4,6-trisulfonate-derivatized oligomers derived from plant polysaccharides. *Journal of Chromatography A* **1137**:1, 119-126 (2006).
- [60] Volpi, N.; Maccari, F.; Linhardt, R. J.: Capillary electrophoresis of complex natural polysaccharides. *Electrophoresis* **29**:15, 3095-3106 (2008).
- [61] Hert, D. G.; Fredlake, C. P.; Barron, A. E.: Advantages and limitations of next-generation sequencing technologies: A comparison of electrophoresis and non-electrophoresis methods. *Electrophoresis* **29**:23, 4618-4626 (2008).
- [62] Godde, R.; Akkad, D. A.; Arning, L.; Dekomien, G.; Herchenbach, J.; Kunstmann, E.; Meins, M.; Wiczorek, S.; Epplen, J. T.; Hoffjan, S.: Electrophoresis of DNA in human genetic diagnostics - state-of-the-art, alternatives and future prospects. *Electrophoresis* **27**:5-6, 939-946 (2006).
- [63] Fonslow, B. R.; Yates, J. R.: Capillary electrophoresis applied to proteomic analysis. *Journal of Separation Science* **32**:8, 1175-1188 (2009).
- [64] Herrero, M.; Ibanez, E.; Cifuentes, A.: Capillary electrophoresis-electrospray-mass spectrometry in peptide analysis and peptidomics. *Electrophoresis* **29**:10, 2148-2160 (2008).

- [65] Van Dyck, S.; Kaale, E.; Nováková, S.; Glatz, Z.; Hoogmartens, J.; Van Schepdael, A.: Advances in capillary electrophoretically mediated microanalysis. *Electrophoresis* **24**:22-23, 3868-3878 (2003).
- [66] Telnarová, M.; Vytisková, S.; Chaloupková, R.; Glatz, Z.: Study of enzymatic reaction by electrophoretically mediated microanalysis in a partially filled capillary with indirect or direct detection. *Electrophoresis* **25**:2, 290-296 (2004).
- [67] Issaq, H. J.; Abbott, E.; Veenstra, T. D.: Utility of separation science in metabolomic studies. *Journal of Separation Science* **31**:11, 1936-1947 (2008).
- [68] Ramautar, R.; Somsen, G. W.; de Jong, G. J.: CE-MS in metabolomics. *Electrophoresis* **30**:1, 276-291 (2009).
- [69] Kraly, J. R.; Holcomb, R. E.; Guan, Q.; Henry, C. S.: Review: Microfluidic applications in metabolomics and metabolic profiling. *Analytica Chimica Acta* **653**:1, 23-35 (2009).
- [70] Rodriguez, M. A.; Armstrong, D. W.: Separation and analysis of colloidal/nano-particles including microorganisms by capillary electrophoresis: a fundamental review. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **800**:1-2, 7-25 (2004).
- [71] Chen, Y.; Xiong, G.; Arriaga, E. A.: CE analysis of the acidic organelles of a single cell. *Electrophoresis* **28**:14, 2406-2415 (2007).
- [72] Johnson, R. D.; Navratil, M.; Poe, B. G.; Xiong, G. H.; Olson, K. J.; Ahmadzadeh, H.; Andreyev, D.; Duffy, C. F.; Arriaga, E. A.: Analysis of mitochondria isolated from single cells. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **387**:1, 107-118 (2007).
- [73] Kašička, V.: Recent developments in capillary electrophoresis and capillary electrochromatography of peptides. *Electrophoresis* **27**:1, 142-175 (2006).
- [74] Pacáková, V.; Štulík, K.; Hubená, S.; Tichá, M.: Affinity capillary electrophoresis. *Chemické Listy* **94**:2, 97-104 (2000).
- [75] Petr, J.; Maier, V.; Horáková, J.; Tesařová, E.; Ševčík, J.: How to achieve successful chiral separation by capillary electrophoresis. *Chemické Listy* **99**:3, 190-194 (2005).
- [76] Vespalec, R.; Boček, P.: Chiral separations in capillary electrophoresis. *Chemical Reviews* **100**:10, 3715-3753 (2000).
- [77] Ušelová-Včeláková, K.; Zusková, I.; Gaš, B.: Stability constants of amino acids, peptides, proteins, and other biomolecules determined by CE and related methods: Recapitulation of published data. *Electrophoresis* **28**:13, 2145-2152 (2007).

- [78] Tiselius, A.: A new apparatus for electrophoretic analysis of colloidal mixtures. *Trans. Faraday Soc.* **33**: 524-531 (1937).
- [79] Kraak, J. C.; Busch, S.; Poppe, H.: Study of Protein Drug Binding Using Capillary Zone Electrophoresis. *Journal of Chromatography* **608**:1-2, 257-264 (1992).
- [80] Busch, M. H. A.; Kraak, J. C.; Poppe, H.: Principles and limitations of methods available for the determination of binding constants with affinity capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A.* **777**:2, 329-353 (1997).
- [81] Gao, J. Y.; Dubin, P. L.; Muhoberac, B. B.: Measurement of the binding of proteins to polyelectrolytes by frontal analysis continuous capillary electrophoresis. *Analytical Chemistry* **69**:15, 2945-2951 (1997).
- [82] Chen, Z.; Weber, S. G.: Determination of binding constants by affinity capillary electrophoresis, electrospray ionization mass spectrometry and phase-distribution methods. *Trac-Trends in Analytical Chemistry* **27**:9, 738-748 (2008).
- [83] Luong, J. H. T.; Nguyen, A. L.: Achiral selectivity in cyclodextrin-modified capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A.* **792**:1-2, 431-444 (1997).
- [84] Loftsson, T.; Duchene, D.: Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. *International Journal of Pharmaceutics* **329**:1-2, 1-11 (2007).
- [85] Fanali, S.: Enantioselective determination by capillary electrophoresis with cyclodextrins as chiral selectors. *Journal of Chromatography A* **875**:1-2, 89-122 (2000).
- [86] Scriba, G. K. E.: Cyclodextrins in capillary electrophoresis enantioseparations - Recent developments and applications. *Journal of Separation Science* **31**:11, 1991-2011 (2008).
- [87] Gubitz, G.; Schmid, M. G.: Recent progress in chiral separation principles in capillary electrophoresis. *Electrophoresis* **21**:18, 4112-4135 (2000).
- [88] Vespalec, R.; Boček, P.: Chiral separations in capillary electrophoresis. *Electrophoresis* **20**:13, 2579-2591 (1999).
- [89] Li, S. F. Y. *Capillary Electrophoresis: Principles, Practice and Applications*. Amsterdam, Elsevier 1992.
- [90] Uekama, K.: Design and evaluation of cyclodextrin-based drug formulation. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **52**:8, 900-915 (2004).
- [91] Gubitz, G.; Schmid, M. G.: Chiral separation by chromatographic and electromigration techniques. A review. *Biopharmaceutics & Drug Disposition* **22**:7-8, 291-336 (2001).

- [92] Šolínová, V.; Kašička, V.; Sázelová, P.; Holý, A.: Chiral analysis of anti-acquired immunodeficiency syndrome drug, 9-(R)-[2-(phosphonomethoxy)propyl]adenine (tenofovir), and related antiviral acyclic nucleoside phosphonates by CE using beta-CD as chiral selector. *Electrophoresis* **30**:12, 2245-2254 (2009).
- [93] Doláková, P.; Dračínský, M.; Masojídková, M.; Šolínová, V.; Kašička, V.; Holý, A.: Acyclic nucleoside bisphosphonates: Synthesis and properties of chiral 2-amino-4,6-bis[(phosphonomethoxy)alkoxy]pyrimidines. *European Journal of Medicinal Chemistry* **44**:6, 2408-2424 (2009).
- [94] Holý, A.: Phosphonomethoxyalkyl analogs of nucleotides. *Current Pharmaceutical Design* **9**:31, 2567-2592 (2003).
- [95] Wang, P.; Ren, J. C.: Separation of purine and pyrimidine bases by capillary electrophoresis using beta-cyclodextrin as an additive. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **34**:2, 277-283 (2004).
- [96] Vargas, G.; Revilla, A.; Havel, J.; Holý, A.: Capillary electrophoresis separation of the new anti-AIDS agents 9-(2-phosphonylmethoxyethyl)adenine and 9-(2-phosphonylmethoxyethyl)-2,6-diaminopurine in mixtures with some monoribonucleotides or the most common deoxynucleotides. *Electrophoresis* **19**:16-17, 2926-2929 (1998).
- [97] Cahours, X.; Morin, P.; Dessans, H.; Agrofoglio, L. A.: Determination of some anti-human immunodeficiency virus nucleosides by capillary zone electrophoresis-tandem mass spectrometry. *Electrophoresis* **23**:1, 88-92 (2002).
- [98] Mesplet, N.; Morin, P.; Francois, C.; Agrofoglio, L. A.: Simultaneous quantitation of nucleoside HIV-1 reverse transcriptase inhibitors by short-end injection capillary electrochromatography on a beta-cyclodextrin-bonded silica stationary phase. *Journal of Chromatography A* **927**:1-2, 161-168 (2001).
- [99] Christians, T.; Diewald, D.; Wessler, C.; Otte, Y.; Lehmann, J.; Holzgrabe, U.: Resolution of newly synthesized racemic dihydropyridines with different chiral selectors by means of capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A* **853**:1-2, 455-460 (1999).
- [100] Szymanska, E.; Markuszewski, M. J.; Capron, X.; van Nederkassel, A. M.; Heyden, Y. V.; Markuszewski, M.; Krajka, K.; Kaliszan, R.: Evaluation of different warping methods for the analysis of CE profiles of urinary nucleosides. *Electrophoresis* **28**:16, 2861-2873 (2007).
- [101] Lipka, E.; Daniel, C.; Vaccher, M. P.; Glacon, V.; Ewing, D.; Mackenzie, G.; Len, C.; Bonte, J. P.; Vaccher, C.: Enantioseparation of new nucleoside analogs, related to d4T and acyclovir, by chiral capillary electrophoresis using highly sulfated beta-cyclodextrins. *Electrophoresis* **25**:3, 444-453 (2004).

- [102] Bezy, V.; Chaimbault, P.; Morin, P.; Unger, S. E.; Bernard, M. C.; Agrofoglio, L. A.: Analysis and validation of the phosphorylated metabolites of two anti-human immunodeficiency virus nucleotides (stavudine and didanosine) by pressure-assisted CE-ESI-MS/MS in cell extracts: Sensitivity enhancement by the use of perfluorinated acids and alcohols as coaxial sheath-liquid make-up constituents. *Electrophoresis* **27**:12, 2464-2476 (2006).
- [103] Perrin, C.; Coussot, G.; Lefebvre, I.; Perigaud, C.; Fabre, H.: Separation of 3'-azido-2',3'-dideoxythymidine pronucleotide diastereoisomers in biological samples by CZE with cyclodextrin addition. *Journal of Chromatography A* **1111**:2, 139-146 (2006).
- [104] Lipka, E.; Selouane, A.; Postel, D.; Len, C.; Vaccher, M.; Bonte, J. P.; Vaccher, C.: Enantioseparation of four cis and trans diastereomers of 2',3'-didehydro-2',3'-dideoxythymidine analogs, by high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A* **1034**:1-2, 161-167 (2004).
- [105] Lipka, E.; Len, C.; Rabiller, C.; Bonte, J. P.; Vaccher, C.: Enantio separation of cis and trans nucleosides, aromatic analogues of stavudine, by capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* **1132**:1-2, 141-147 (2006).
- [106] Holý, A.; Rosenberg, I.; Dvořáková, H.: Synthesis of *N*-(2-phosphonylmethoxyethyl) derivatives of heterocyclic bases. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications* **54**:8, 2190-2210 (1989).
- [107] Holý, A.; Dvořáková, H.; Masojídková, M.: Synthesis of enantiomeric *N*-(2-phosphonomethoxypropyl) derivatives of purine and pyrimidine-bases .2. the synthon approach. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications* **60**:8, 1390-1409 (1995).
- [108] Holý, A.; Gunter, J.; Dvořáková, H.; Masojídková, M.; Andrei, G.; Snoeck, R.; Balzarini, J.; De Clercq, E.: Structure-antiviral activity relationship in the series of pyrimidine and purine *N*-[2-(2-phosphonomethoxy)ethyl] nucleotide analogues. 1. Derivatives substituted at the carbon atoms of the base. *Journal of Medicinal Chemistry* **42**:12, 2064-2086 (1999).
- [109] Ehala, S.; Dybal, J.; Makrlík, E.; Kašička, V.: Application of capillary affinity electrophoresis and density functional theory to the investigation of valinomycin-lithium complex. *Journal of Chromatography A* **1216**:17, 3660-3665 (2009).