

**Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra analytické chemie**

Diplomová práce

**Stanovení vybraných nečistot v kvartérních
amoniových sloučeninách s potenciálním
antibakteriálním účinkem metodou kapilární zónové
elektroforézy**

Hradec Králové, 2011

Bc. Pavla Prskavcová

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně a že nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.“

V Hradci Králové dne

podpis:

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucímu diplomové práce doc. RNDr. Miroslavovi Poláškov, CSc. za odborné vedení, rady a konzultace při zpracování této práce. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Kláři Petřů za pomoc s vypracováním práce po technické stránce.

Abstrakt

V této práci je popsán vývoj metody, která byla použita pro separaci a stanovení nečistot pyridinu a isochinolinu v kvartérních amoniových sloučeninách pomocí kapilární zónové elektroforézy. Analýza probíhala v křemenné kapiláře při napětí 20 kV a teplotě 25 °C. UV detekce probíhala při 210 nm a 254 nm. Celková délka kapiláry o vnitřním průměru 75 µm činila 58 cm a její efektivní délka byla 49,5 cm. Vzorky byly nastříkovány po dobu 6 s tlakem 50 mbar. Celá analýza trvala méně než 5 minut.

Jako optimální základní elektrolyt byl vybrán 70 mM acetát s 5% (v/v) methanolu. Jeho pH bylo upraveno na hodnotu 4,7 pomocí hydroxidu sodného. Jako vnitřní standard byl použit imidazol. Kalibrační závislosti byly lineární jak pro pyridin (0,1 – 10,4 µg/ml; $r^2 = 0,9988$), tak pro isochinolin (0,1 – 9,98 µg/ml; $r^2 = 0,9972$). Limit detekce byl stanoven 0,06 µg/ml pro pyridin a 0,02 µg/ml pro isochinolin.

Optimalizovaná metoda byla použita ke stanovení obsahu pyridinu a isochinolinu jako nečistot ve vzorcích kvartérních amoniových sloučenin.

Abstract

In this study, capillary zone electrophoresis with UV detection was developed for separation and determination of impurities pyridine and isoquinoline in quaternary ammonium compounds. The analysis was performed in a fused silica capillary at 20 kV and 25 °C with UV detection at 210 nm and 254 nm. The total length of the capillary was 58 cm, the effective length was 49,5 cm and its inner diameter was 75 µm. The injection was carried out for 6 seconds and under pressure of 50 mbar. The analysis took less than 5 minutes.

The optimal background electrolyte consisted of 70 mM acetic acid with 5% (v/v) of methanol. pH was adjusted to 4,7 with sodium hydroxide. As internal standard was chosen imidazole. The calibration graphs were linear for both pyridine (0,1 – 10,4 µg/ml; $r^2 = 0,9988$) and isoquinoline (0,1 – 9,98 µg/ml; $r^2 = 0,9972$). The limits of detection were 0,06 µg/ml for pyridine and 0,02 µg/ml for isoquinoline.

The optimized method has been used to determine the content of pyridine and isoquinoline as impurities in samples of quaternary ammonium compounds.

Obsah

1. ÚVOD.....	9
2. CÍL A ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE	10
3. TEORETICKÁ ČÁST	11
3.1. Kapilární elektroforéza	11
3.2. Základní elektroforetické charakteristiky	13
3.2.1. Elektroforetická pohyblivost	13
3.2.2. Elektroosmotický tok (EOF)	14
3.2.3. Migrační čas	16
3.2.4. Děje ovlivňující elektroforetickou pohyblivost.....	17
3.2.4.1. Vliv pH elektrolytu	17
3.2.4.2. Tvorba komplexů	17
3.2.4.3. Tvorba iontových asociátů	17
3.2.4.4. Tvorba hostitelských komplexů	18
3.2.4.5. Vliv nevodných rozpouštědel	18
3.2.4.6. Vliv síťujících prostředí	19
3.2.4.7. Vliv ionogenních smáčedel	19
3.2.5. Děje ovlivňující separaci.....	19
3.2.5.1. Jouelovo teplo	20
3.2.5.2. Difúze	20
3.2.5.3. Elektromigrační disperze	20
3.2.5.4. Adsorpce	21
3.3. Aplikace kapilární elektroforézy.....	21
3.4. Kapilární zónová elektroforéza (CZE)	21
3.4.1. Instrumentace.....	22
3.4.1.1. Kapiláry	23
3.4.1.2. Nástřík vzorku.....	23
3.4.1.3. Vkládané napětí	24
3.4.1.4. Detektor.....	24
3.5. Kapilární izotachoforéza (CITP)	25
3.6. Micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC).....	26
3.7. Kapilární gelová elektroforéza (CGE).....	27
3.8. Kapilární elektrochromatografie (CEC).....	27
3.9. Kapilární izoelektrická fokusace (CIEF).....	28
3.10. Kvartérní amoniové sloučeniny	28

3.10.1. Vlastnosti 1-dodecylpyridinium bromidu.....	29
3.10.2. Vlastnosti 2-dodecylisochinolinium bromidu	30
3.11. Nečistoty obsažené ve stanovovaných vzorcích	30
3.11.1. Pyridin	30
3.11.2. Isochinolin	31
4. Experimentální část.....	34
4.1. Používané přístroje	34
4.2. Použité chemikálie a roztoky.....	35
4.3. Příprava roztoků	36
4.3.1. Příprava pracovního elektrolytu	36
4.3.2. Příprava zásobních roztoků standardů	36
4.3.3. Příprava vzorku	36
4.3.4. Příprava kalibračních roztoků	37
4.4. Pracovní a výpočetní postupy	37
4.4.1. Pracovní postup	37
4.4.2. Vývoj a optimalizace metody	38
4.4.3. Měření kalibrační závislosti.....	38
4.4.4. Rozlišení R_s	38
4.4.5. Účinnost separace.....	39
4.4.6. Opakovatelnost metody.....	39
4.4.7. Limit detekce a kvantifikace.....	39
4.4.8. Stanovení množství nečistoty ve vzorku.....	40
4.4.9. Správnost metody	41
5. Výsledky a diskuze.....	41
5.1. Vývoj a optimalizace metody.....	41
5.1.1. Detekce.....	41
5.1.2. Volba pracovního elektrolytu	42
5.1.3. Výběr vhodného vnitřního standardu	46
5.1.4. Optimalizace pH	46
5.1.5. Vliv koncentrace BGE.....	46
5.1.6. Vliv přídavku methanolu	47
5.1.7. Vliv napětí	48
5.1.8. Vliv teploty.....	49
5.1.9. Optimální složení pracovního elektrolytu a podmínky měření.....	50
5.1.11. Rozlišení	51
5.1.12. Účinnost separace.....	52

5.2. Kvantitativní analýza	53
5.2.1. Kalibrační závislost pyridinu	54
5.2.2. Kalibrační závislost isochinolinu	55
5.2.3. Limity detekce a kvantifikace	56
5.2.4. Koncentrační závislost 1-dodecylpyridinium bromidu (DP)	56
5.2.5. Koncentrační závislost 2-dodecylisochinolinium bromidu (DI).....	57
5.3. Opakovatelnost metody	57
5.4. Stanovení obsahu nečistoty ve vzorku	58
5.5. Správnost metody	59
6. Závěry	60
7. Seznam použitých zkratk.....	62
8. Seznam literatury	63

1. ÚVOD

Kapilární elektromigrační metody nacházejí už dlouhá léta uplatnění v mnoha typech laboratoří. Oblasti lidské činnosti, kde se s úspěchem k nejrůznějším analýzám využívají, jsou rozsáhlé. Patří mezi ně obory jako je chemie, biochemie, farmaceutický a potravinářský průmysl, ekologie či medicína.

Existuje mnoho variant kapilárních elektromigračních metod, které se navzájem liší principem separace a každá z nich se s výhodou používá ke stanovení jiné skupiny látek. Všechny kategorie kapilární elektroforézy mají společné to, že u nich dochází k migraci elektricky nabitých stanovovaných látek vlivem stejnosměrného elektrického pole.

Díky účinnosti dosahující stovek tisíc až miliónů teoretických pater a velmi dobré citlivosti jsou tyto techniky považovány za nejúčinnější a nejperspektivnější analytické separační metody. Označení kapilární elektroforéza bývá někdy dokonce nahrazováno pojmem vysokoúčinná kapilární elektroforéza (High-Performance Capillary Electrophoresis, HPCE). Dalšími pozitivy jsou snadná optimalizace, rychlost a nízká spotřeba vzorku a chemikálií.

2. CÍL A ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Cílem této práce bylo vypracovat metodu vhodnou pro separaci a stanovení nečistot (pyridinu a isochinolinu) v kvartérních amoniových sloučeninách pomocí kapilární zónové elektroforézy.

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1. Kapilární elektroforéza

Pohyb rozptýlených částic kapalinou vlivem elektrického pole poprvé popsal Reuss v roce 1807. Tento jev se nazývá elektroforéza [1]. Poprvé byla zavedena do praxe roku 1937 Arne Tisellem, švédským chemikem a biochemikem, který za výzkum elektroforézy a adsorpční analýzy obdržel roku 1948 Nobelovu cenu.

Elektroforéza je analytická metoda používaná k separaci nabitých částic v elektrickém poli. Je založená na různé rychlosti putování jednotlivých složek dělené směsi ve vodivém nosiči při působení elektrického proudu. Separace probíhá ve volném roztoku elektrolytu nebo na nosném médiu, kterým může být například gel. Je-li elektrolytem nebo médiem naplněna kapilára, mluvíme o tzv. kapilární elektroforéze [2].

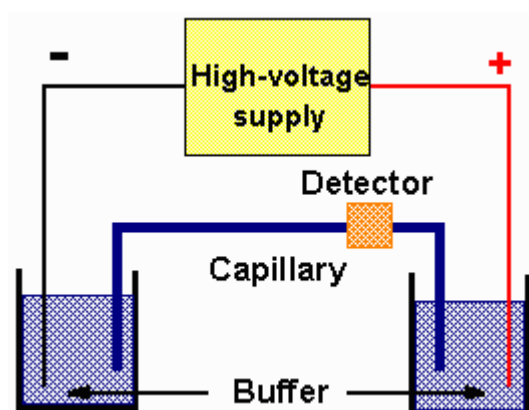
Vlivem elektrického pole nabitě molekuly migrují ve směru elektrody s opačným nábojem. Kladně nabitě ionty putují směrem k záporně nabitě elektrodě (katodě) a záporně nabitě ionty jsou naopak přitahovány kladně nabitou elektrodou (anodou). Ionty s vyšším nábojem se pohybují rychleji než ty s nábojem nižším. Kromě náboje má na pohyblivost částice vliv i její velikost a tvar. Migrační rychlost je zároveň ovlivněna rychlostí elektroosmotického toku, což je pohyb pufru kapilárou vlivem elektrického pole [3, 4].

Pojem kapilární elektromigrační metody zahrnuje několik variant kapilární elektroforézy, které probíhají v kapilárním instrumentálním formátu. Tyto metody mohou být provozovány i v makroměřítku [5, 6]. Mezi základní typy kapilární elektroforézy patří:

- Kapilární zónová elektroforéza (CZE)
- Kapilární gelová elektroforéza (CGE)
- Micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC)
- Kapilární elektrochromatografie (CEC)
- Kapilární izoelektrická fokusace (CIEF)
- Kapilární izotachoforéza (CITP)

Rozdíly mezi těmito metodami spočívají v médiu obsaženém v separační kapiláře a v mechanismu separace a budou probrány dále v textu [5]. Díky odlišným principům dělení lze těmito metodami analyzovat širokou škálu molekul různých velikostí a některé z nich lze aplikovat i při stanovení neutrálních molekul.

Jednou z hlavních výhod kapilární elektroforézy je potřeba poměrně jednoduchého instrumentálního vybavení. Separace probíhá v kapiláře, která má oba konce ponořeny do nádobek s elektrolytem. Do nich jsou kromě kapiláry ponořeny i elektrody vysokonapěťového zdroje a dochází tak k vytvoření elektrického pole nutného k separaci. Detektor je umístěn na distálním konci kapiláry [7] a zaznamenává závislost odezvy detektoru na čase. Tomuto záznamu říkáme elektroforeogram [8].



Obr. 1: Schéma zařízení pro kapilární elektroforézu

Mezi další výhody kapilární elektroforézy patří vysoká rychlost analýzy, vysoká separační účinnost dosahující stovek tisíc až milionů teoretických pater a vysoká citlivost umožňující stanovení 10^{-15} - 10^{-21} mol analytu v nano- až pikolitrových objemech analyzovaných vzorků [6]. Mohou se stanovovat látky termálně nestabilní a netěkavé bez nutnosti derivatizace. Spotřeba vzorků a chemikálií je velmi nízká, což vede ke snížení nákladů na analýzu i k menšímu dopadu na životní prostředí [9].

3.2. Základní elektroforetické charakteristiky

3.2.1. Elektroforetická pohyblivost

Elektroforetická pohyblivost μ_{ef} vyjadřuje rychlost, s jakou se nabitá částice v roztoku ve stejnosměrném elektrickém poli o jednotkové intenzitě pohybuje.

Pro rychlost pohybu iontu v roztoku platí:

$$v_{ef} = \mu_{ef} \cdot E$$

v_{ef} – elektroforetická rychlost [$m \cdot s^{-1}$]

μ_{ef} – elektroforetická pohyblivost [$m^2 \cdot V^{-1} \cdot s^{-1}$]

E – intenzita elektrického pole [$V \cdot m^{-1}$] [7]

Elektroforetická pohyblivost závisí na náboji, velikosti a tvaru molekuly rozpuštěné látky a na viskozitě elektrolytu, ve kterém k migraci dochází. Je-li nabitá částice kulového tvaru, platí pro elektroforetickou pohyblivost vzorec:

$$\mu_{ef} = \frac{q}{6\pi \cdot \eta \cdot r}$$

q - náboj částice [C]

η - viskozita roztoku elektrolytu [$N \cdot s \cdot m^{-2}$]

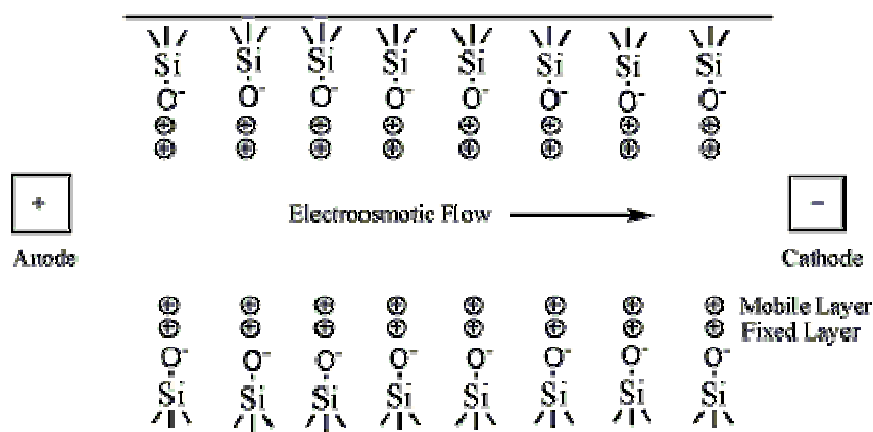
r – poloměr částice [m]

Z tohoto vztahu tedy plyne, že pohyblivost iontu je přímo úměrná jeho náboji a naopak nepřímo úměrná jeho velikosti a viskozitě elektrolytu [4]. Větší částice se budou pohybovat pomaleji než částice malé stejného náboje a ionty s větším nábojem budou migrovat rychleji než ionty s nábojem menším.

3.2.2. Elektroosmotický tok (EOF)

Uvnitř kapiláry naplněné elektrolytem dochází vlivem elektrického pole k pohybu tohoto pufru, který s sebou unáší částice vzorku [4]. Tento jev vzniká díky náboji na vnitřní stěně kapiláry. Ta je vyrobena z taveného křemene a obsahuje velké množství silanolových skupin Si-OH. V závislosti na pH elektrolytu dochází u těchto skupin k disociaci a vnitřní stěna kapiláry je díky tomu tvořena záporně nabitými ionty Si-O⁻.

Tyto záporně nabitě silanolové skupiny přitahují kladně nabitě kationty pufru, které vytváří vnitřní pevnou vrstvu kationtů na stěně kapiláry. Již menší silou jsou přitahovány další kationty, které vytvářejí mobilní vrstvu. Tato mobilní vrstva tvořená kladně nabitými ionty je po aplikaci elektrického pole unášena směrem k záporně nabitě elektrodě a strhává s sebou i molekuly elektrolytu. Celý pufr je unášen směrem ke katodě a tento jev se nazývá elektroosmotický tok [6].



Obr. 2: Vznik elektroosmotického toku

Rychlost elektroosmotického toku je dána vztahem:

$$v_{EOF} = \frac{\varepsilon \cdot \zeta \cdot E}{\eta}$$

ε – permitivita roztoku [$C^2 J^{-1} m^{-1}$]

ζ – elektrokinetický (zeta) potenciál [V]

E – intenzita elektrického pole [$V \cdot m^{-1}$]

η – viskozita roztoku [$N \cdot s \cdot m^{-2}$] [6]

Zeta potenciál ζ je potenciálový rozdíl mezi pevnou a mobilní vrstvou křemenné kapiláry. Je určen hustotou náboje vnitřní stěny kapiláry. Množství disociovaných silanolových skupin je závislé na pH elektrolytu a velikost zeta potenciálu a tím pádem i rychlost elektroosmotického toku jsou tedy významně závislé na pH nosného pufru. Zeta potenciál závisí také na iontové síle pufru. S rostoucí iontovou silou dochází k redukci EOF. Lze ho ovlivnit i úpravou vnitřního povrchu kapiláry [6].

Elektroosmotický tok unáší všechny ionty stejnou rychlostí, takže působí jako neselektivní síla. Je to jev pozitivní způsobující pohyb všech látek stejným směrem, a to bez ohledu na náboj. Díky EOF jsou ke katodě unášeny i anionty, které kvůli svému zápornému náboji migrují k anodě. Velikost EOF je ale mnohem větší než jejich elektroforetická pohyblivost. To umožňuje současné stanovení kationtů, aniontů i neutrálních látek. Kationty migrují nejrychleji, jelikož se u nich sčítá rychlost EOF a elektroforetická pohyblivost působící stejným směrem. Neutrální látky jsou nesené rychlostí EOF, vzájemně však nejsou separovány. Anionty se k detektoru dostávají nejpozději, jelikož putují proti EOF k anodě [10].

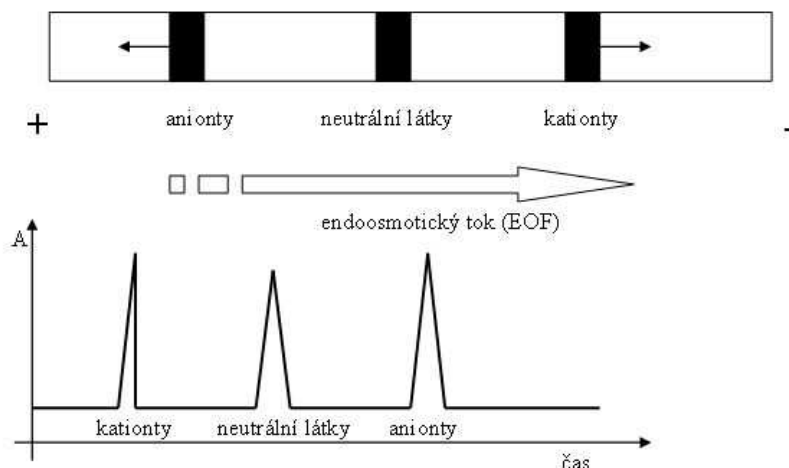
Migrační rychlost stanovené látky je tedy výslednicí její elektroforetické rychlosti a rychlosti EOT:

$$V_{\text{tot}} = V_{\text{ef}} + V_{\text{eof}}$$

V_{tot} – celková rychlost analytu [$\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$]

V_{ef} - elektroforetická rychlost [$\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$]

V_{eof} – rychlost elektroosmotického toku [$\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$] [4].



Obr. 3: Působení EOF na migraci iontů a neutrálních molekul

3.2.3. Migrační čas

Elektroforetická pohyblivost nelze experimentálně zjistit. Můžeme ji ale vypočítat z naměřeného migračního času analytu. Migrační čas je čas, který uplyne, než se látka dostane z místa nástřiku do detekční cely. Pokud je elektromigrace provázena hydrodynamickým tokem, je třeba počítat i s migračním časem nenabitých částic. Elektroforetickou pohyblivost lze spočítat dle vztahu:

$$\mu = \frac{l_t l_s}{U} \left(\frac{1}{t_m} - \frac{1}{t_0} \right)$$

l_t – celková délka kapiláry [m]

l_s – efektivní délka kapiláry [m]

U – napětí [V]

t_m – migrační čas analytu [s]

t_0 – migrační čas nenabitých částic [s]

Zkrácení migračního času a tedy i celé analýzy můžeme docílit několika způsoby. Nabízí se nám možnost zvýšit napětí, zkrátit délku kapiláry nebo nej-různějšími způsoby ovlivnit EOT (teplota, pH, iontová síla elektrolytu) [7].

3.2.4. Děje ovlivňující elektroforetickou pohyblivost

Na dělení látek díky různé elektroforetické pohyblivosti je z existujících variant kapilární elektroforézy založena hlavně kapilární zónová elektroforéza a izotachoforéza. U těchto metod je nutné dosáhnout maximálních rozdílů v migračních časech jednotlivých analytů. Úkolem je najít takové podmínky separace, při kterých budou rozdíly mezi elektroforetickými pohyblivostmi přilehlých zón co největší [7].

K ovlivnění pohyblivosti můžeme použít některý z následujících nástrojů: změnu pH pracovního elektrolytu, přídavek vhodného komplexujícího činidla nebo látek vytvářejících hostitelské komplexy, použití gelu nebo přídavek nevodného rozpouštědla.

3.2.4.1. Vliv pH elektrolytu

Pohyblivost slabých kyselin a zásad je silně závislá na stupni jejich disociace a tudíž na pH prostředí [6]. Se změnou pH dochází ke změně ionizace a tím pádem i efektivní pohyblivosti. Optimalizujeme-li podmínky analýzy, hledáme takové pH pracovního elektrolytu, při němž je rozdíl efektivních pohyblivostí dvou nejhůře separovatelných látek největší [7].

3.2.4.2. Tvorba komplexů

Některé látky jsou schopny tvořit komplexy, což má vliv na jejich pohyblivost. Elektroforetická pohyblivost vzniklých komplexů se podstatně liší od pohyblivosti volného analytu. Tvorby komplexů se dosahuje přidáním iontu kovu nebo ligandu k elektrolytu. Výběrem druhu a koncentrace kovu nebo ligandu volíme takové podmínky, za kterých dojde k úplné separaci všech složek vzorku [7].

3.2.4.3. Tvorba iontových asociátů

Schopnosti tvořit iontové asociáty s ionty opačného náboje se využívá ke snížení migrační rychlosti analytů. Čím mají interagující ionty vyšší náboj, tím je vazba mezi nimi silnější a dochází k výraznějšímu poklesu mobilit. Je-li tedy součástí vzorku analyt mající díky svému nejvyššímu náboji mezi ostatními

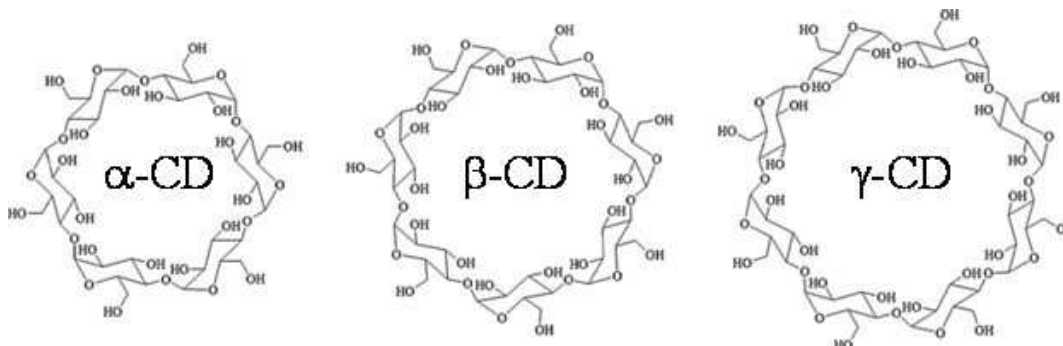
analyty i nejvyšší pohyblivost, dojde u něj po přidání protiiontu k nejvýraznějšímu zpomalení pohybu. Tento úkaz může být tak silný, že zapříčiní výměnu migračního pořadí analytů.

K ovlivňování elektroforetické pohyblivosti tvorbou iontových asociátů se nejlépe hodí kyseliny či zásady o vyšším náboji, jako je kyselina citrónová, kyselina fytová či spermin [7].

3.2.4.4. Tvorba hostitelských komplexů

Cyklodextriny jsou cyklické oligosacharidy tvořené 6 – 8 molekulami glukózy. Vytváří dutý válec, na jehož obvodu jsou hydroxylové skupiny a vnitřní jádro zůstává hydrofobní. Do této dutiny vstupují hydrofobní skupiny a tvoří se tak hostitelské komplexy.

Hostitelských komplexů se využívá při separaci chirálních látek. Jelikož jsou hydroxylové skupiny na povrchu chirální, vytvářejí cyklodextriny s chirálními analyty komplexy lišící se stabilitou, což umožňuje jejich separaci. Podobné komplexy vytváří i jiné cyklické sloučeniny, např. crown ethery [7].



Obr. 4: Struktura cyklodextrinu α, β a γ

3.2.4.5. Vliv nevodných rozpouštědel

Přídavkem organického modifikátoru do vodného tlumivého roztoku dojde ke změně solvatace separovaných iontů i změně viskozity elektrolytu. To vede k ovlivnění iontové pohyblivosti, což může mít pozitivní vliv na průběh separace. Nezanedbatelná je i ta skutečnost, že přídavek organických modifikátorů do pracovního elektrolytu vede ke snížení EOF [4]. Nejvíce se

k tomuto účelu využívají methanol, ethanol, propanol, aceton, acetonitril a dimethylsulfoxid [7].

3.2.4.6. Vliv síťujících prostředí

Potřebujeme-li navzájem separovat polymery, které se od sebe neliší hustotou elektrického náboje, ale pouze molekulovou hmotností, použijeme k tomu síťujícího prostředí. Tradičně je jako síťující prostředí využíván polyakrylamidový gel. Látky jsou v gelu separovány podle velikostí jejich molekul. Méně rozměrné molekuly procházejí gelem snáze, ty větší jsou při průchodu síťujícím prostředím více zpomalovány. Příprava gelových kapilár není jednoduchá, jejich pořizovací cena je vysoká a životnost krátká. Z těchto důvodů se v poslední době gel nahrazuje lineárními polymery. Lineární polymery vytvářejí síť, která funguje podobně jako gel. Jako lineární polymery slouží deriváty celulózy, polyvinylalkohol, polyethylenglykol, dextran a další [7].

3.2.4.7. Vliv ionogenních smáčedel

Jako ionogenní smáčedlo se nejčastěji používá dodecylsírán sodný. Po překročení kritické micelární koncentrace tvoří molekuly smáčedla micely. Jádro micel je hydrofobní a umožňuje vstup nepolárních látek. Díky náboji micel migrují tyto spolu s nepolární látkou v elektrickém poli. To je základním principem micelární elektrokinetické chromatografie [7].

3.2.5. Děje ovlivňující separaci

Při elektromigraci se v kapiláře uplatňují další jevy ovlivňující separaci. Způsobují rozmývání a mísení zón a jsou tedy klasifikovány jako negativní úkazy [11]. Mezi tyto faktory působící na separaci patří:

- Jouelovo teplo
- Difúze
- Elektromigrační disperze
- Adsorpce

3.2.5.1. Jouelovo teplo

Jouelovo teplo vzniká při průchodu elektrického proudu vodičem [12]. S rostoucím napětím roste i elektrický proud. Pokud elektrický proud nekoná mechanickou nebo chemickou práci, dochází k přeměně této energie na teplo.

Následkem nárůstu teploty dochází ke zvýšení pohyblivosti a tudíž ke zkrácení migračních časů. Tento ohřev je limitujícím faktorem pro používání vysokých elektrických napětí jako nástroje pro urychlení analýzy. Vznikající vysoká teplota může mít za následek destrukci analyzovaných termolabilních látek. Dále dochází k nehomogenitě mobility, hustoty a pH a tím i k rozmývání zón. To je způsobeno tím, že stěny kapiláry částečně vznikající teplo odvádějí. Následně dochází k diferencii teplot mezi elektrolytem procházejícím středem kapiláry a elektrolytem na obvodu kapiláry, který je chlazen. Vzhledem k teplotní závislosti pohyblivosti se ionty ve středu kapiláry pohybují rychleji než ty na obvodu a v detektoru se tato skutečnost projeví rozšířením zóny [7, 12].

3.2.5.2. Difúze

Difúze (rozmývání) je způsobeno různou rychlostí molekul analytu v jednotlivých zónách. Rychlost disperze je nepřímo závislá na velikosti molekuly. Větší disperze a tím pádem i menší počet teoretických pater bude u menších molekul, které jsou rychleji vymývány ze zóny. Zóny analytů budou rozmyté a píky deformované [7].

3.2.5.3. Elektromigrační disperze

Následkem elektromigrační disperze je nesymetrické rozšíření zón a také píky jsou asymetrické. Je to vyvoláno rozdíly v pohyblivostech mezi analytem a spoluiontem pracovního elektrolytu. Je-li mobilita vzorku větší než mobilita elektrolytu, je intenzita elektrického pole v zóně vzorku nižší než v okolí obsahujícím pouze elektrolyt. Když se ion vzorku dostane do roztoku elektrolytu, pohybuje se tam vyšší rychlostí než ve své vlastní zóně a do původní zóny už se nevrátí. Čelo zóny vzorku se rozmývá, ale zadní rozhraní zůstává ostré. Ionty vzorku, které se dostanou do základního elektrolytu jsou v něm urychleny a navrací se zpět do vlastní migrační zóny. Naopak pomalé ionty elektrolytu by se v zóně vzorku zpomalily a vrátily se zpět [7].

3.2.5.4. Adsorpce

Interakce solutu se stěnou kapiláry má negativní dopad na separační účinnost. Má-li analyt opačný náboj než stěna kapiláry, může dojít k jeho zachycení na stěně kapiláry. Sorpce může být tak velká, že se analyt v elektroforeogramu vůbec neobjeví. Této vazbě lze zabránit tvorbou ochranného filmu na stěně kapiláry nebo změnou pH pracovního elektrolytu [7].

3.3. Aplikace kapilární elektroforézy

Po desetiletí byla elektroforéza metodou volby při řešení mnoha biochemických problémů. Nicméně nikdy nenašla větší uplatnění v běžném provozu analytických laboratoří kvůli problémům s automatizací a kvantifikací. Změna nastala po roce 1981, kdy Jorgenson a Lukacs publikovali výhody použití elektroforézy ve skleněné kapiláře. První komerční přístroj vybavený kapilárou se začal používat v roce 1988 a od té doby zažila kapilární elektroforéza neobyčejný rozmach [13].

V dnešní době nachází kapilární elektroforéza uplatnění hlavně v biochemii, farmacii, v analýze životního prostředí nebo potravin [9]. S výhodou se používá k separaci nejrozmanitějších chemických sloučenin a to jak anorganických iontů, organických molekul, tak i bioorganických makromolekul.

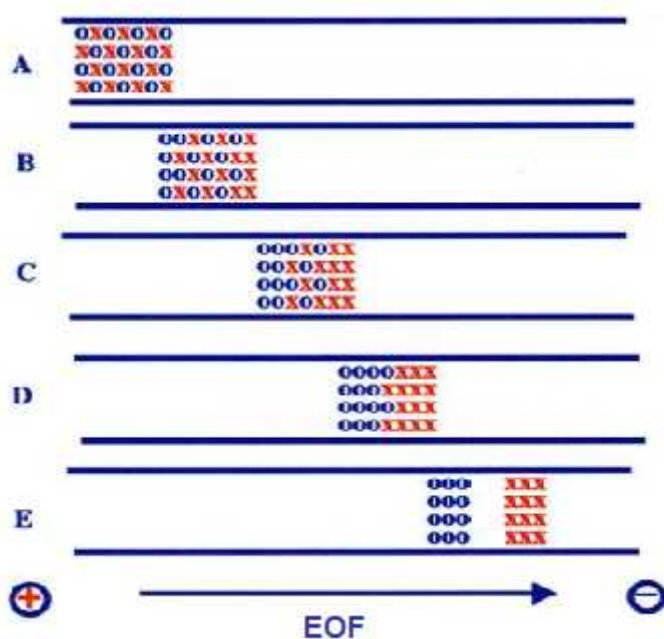
3.4. Kapilární zónová elektroforéza (CZE)

Kapilární zónová elektroforéza je nejjednodušší elektromigrační metodou. Využívá jediného homogenního pracovního elektrolytu (background electrolyte = BGE), jehož složení je konstantní podél celé migrační dráhy a nemění se v čase. Proto je vodivost v celé kapiláře stálá a při průchodu konstantního elektrického proudu roztokem je i intenzita elektrického pole podél kapiláry všude stejná a konstantní. Díky konstantnímu složení základního elektrolytu jsou efektivní pohyblivosti a tím pádem i migrační rychlosti látek během celé analýzy neměnné.

K separaci jednotlivých složek vzorku dochází díky jejich rozdílným efektivním pohyblivostem a tím i migračním rychlostem. Naším úkolem je zvolit takový elektrolyt, jehož vlastnosti zajistí, že efektivní pohyblivosti jednotlivých

látek se od sebe budou dostatečně lišit, díky čemuž se od sebe navzájem před vstupem do detektoru oddělí [5].

Kromě elektroforetického pohybu nabitých částic je celý objem roztoku uvnitř kapiláry unášen elektroosmotickým tokem. V křemenných kapilárách směřuje EOF ke katodě. Jeho rychlost bývá větší než rychlost elektroforetická a proto jsou směrem ke katodě unášeny i anionty a kationty i anionty můžeme tím pádem v CZE stanovovat současně [6].



Obr. 5: Princip separace v CZE

Citlivost EOF na pH vyžaduje použití takového pufru, který je schopen udržet konstantní pH. Efektivní pufrovací systémy mají rozmezí pH přibližně +/- 1 jednotka pH kolem hodnoty pKa [7].

3.4.1. Instrumentace

Zařízení pro CZE není nikterak složité. Tvoří ho kapilára, jejíž oba konce jsou ponořeny v nádobce s elektrolytem. V elektrolytu jsou ponořeny i obě elektrody, které jsou připojeny ke zdroji stejnosměrného vysokého napětí. Vhodný dávkovací systém umožňuje injekci přesného množství vzorku. Na opačném konci kapiláry, než je dávkován vzorek, probíhá detekce. Signál detektoru je zapisován zapisovačem a dále zpracováván počítačem. Důležitou

součástí vybavení je termostat udržující stálou teplotu v prostoru, kde je uložena kapilára.

3.4.1.1. Kapiláry

Křemenné kapiláry používané v CZE mají hned několik výhod. Propouštějí UV a viditelné záření, jsou chemicky a elektricky neutrální, snadno se vyrábí a nejsou příliš nákladné. Aby se zabránilo problémům plynoucím z křehkosti tohoto materiálu, bývá kapilára pokryta vrstvou polyamidu. Při použití detektoru založeného na absorpční spektrofotometrii je nutné kapiláru vrstvy polyamidu v místě detekce zbavit a vytvořit tak detekční okno.

Délka kapiláry se většinou pohybuje mezi 30 a 80 cm, vnitřní průměr bývá menší než 100 μm , nejčastěji je to 50 μm . Právě díky kapilárnímu uspořádání je možné používat vysoké intenzity elektrického pole a tím dosáhnout vysokých účinností a rychlostí separace. Stěna kapiláry totiž dobře odvádí Jouelovo teplo [14, 4].

3.4.1.2. Nástřik vzorku

Nástřik vzorku se provádí dvojitým způsobem. Konec kapiláry vzdálenější od detektoru se zasune do roztoku s analyty a buď se tlakem (hydrodynamicky) nebo vloženým napětím (elektrokineticky) nadávkuje krátká zóna vzorku do kapiláry. Kapilára se poté znovu ponoří do elektrolytu [10].

Při hydrodynamickém dávkování se na hladinu vzorku působí tlakem pomocí stlačeného vzduchu nebo se přetlaku dosáhne tak, že se vialka se vzorkem mechanicky zvedne, aby byla výše než výstupní vialka a přetlak nad hladinou vzorku natlačí malé množství vzorku do vstupního konce separační kapiláry. Další možností je vytvoření tlakového gradientu aplikací vakua [15].

Elektrokinetické dávkování spočívá v tom, že se elektrodová nádoba s pracovním elektrolytem nahradí vialkou se vzorkem a po určitou dobu na vzorek působí napětí [7]. Nevýhodou tohoto způsobu dávkování je skutečnost, že se iontů majících větší pohyblivost dostane do kapiláry při stejné koncentraci složek víc než těch, které mají menší pohyblivost. To je také hlavní důvod, proč je preferován hydrodynamický způsob dávkování [5].

3.4.1.3. Vkládané napětí

Na oba konce kapiláry se vkládá stejnosměrné elektrické pole. Jednotlivé složky vzorku migrují při vhodně zvoleném napětí (velikost a polarita). Polarita napětí nabývá kladných hodnot v případě, je-li katoda blíže detektoru. Když je blíž k detektoru anoda, polarita má zápornou hodnotu [10].

3.4.1.4. Detektor

Možností detekce je celá řada. Nejčastěji se využívá UV-VIS detekce, i když má nízkou citlivost. Absorpci v UV nebo viditelné oblasti vykazuje velké množství analytů a není tedy problém je tímto způsobem stanovit. Látky, které v UV oblasti neabsorbují, můžeme stanovit nepřímou UV detekcí. Tehdy musí pracovní elektrolyt obsahovat složku, která v této oblasti absorbuje a přítomnost neabsorbujícího iontu v detekční cele vyvolá pokles koncentrace UV absorbujícího iontu, což se v elektroforeogramu projeví jako negativní pík. UV detektory měří absorbanci při několika nastavitelných vlnových délkách nebo lze využít detektor s diodovým polem, jehož výstupem je trojrozměrný záznam o absorpčním spektru látky [7].

Hmotnostní detektor je sice univerzální, ale nákladný a spojení s CZE není ještě úplně vyřešeno. Největším problémem je delší čas analýzy, což je následek použití delší kapiláry, která je nutná ve spojení s MS. Další potíž je nedostatek vhodných těkavých separačních pufrů.

Laserem indukovaná fluorescenční (LIF) detekce je velice citlivá, ale většina analyticky zajímavých látek nemá vlastní fluorofor a je třeba je derivatizovat nebo použít nepřímou detekci, při které obsahuje pracovní elektrolyt fluoreskující složku a nefluoreskující analyt se projeví jako negativní pík [9, 7].

Konduktometrická detekce je naprosto univerzální. Je založena na faktu, že vodivost zón analytu se liší od vodivosti pracovního elektrolytu [7].

Výstupem kteréhokoliv detektoru je vždy elektroforeogram vyjadřující závislost odezvy detektoru na migračním čase analytu.

3.5. Kapilární izotachoforéza (CITP)

Specifikem kapilární izotachoforézy je použití dvou elektrolytů, mezi něž se vnáší vzorek. Tyto elektrolyty jsou označovány jako vedoucí L a koncový T. V izotachoforéze lze provádět buď analýzu kationtů nebo aniontů, nikoliv však obojí současně. Separujeme-li anionty, je vzorek obsahující směs aniontů vložen mezi vedoucí elektrolyt obsahující vedoucí aniont, který musí mít větší pohyblivost než nejrychlejší aniont vzorku a mezi koncový elektrolyt, jehož aniont má naopak pohyblivost menší než je pohyblivost nejpomalejšího aniontu vzorku. Pro kationty je situace analogická.

Po zapnutí stejnosměrného elektrického proudu migrují zóny v pořadí jejich pohyblivostí a tím se jednotlivé anionty od sebe oddělují. Po určité době se vytvoří ustálený stav, v němž oddělené zóny putují bezprostředně za sebou. Zóny se při konstantním proudu pohybují všechny stejnou rychlostí (isotachos = stejná rychlost). Kdyby tomu tak nebylo, vznikl by mezi nimi prostor neobsahující žádné ionty a elektrický obvod by se přerušil [16, 2].

Intenzita elektrického pole vzrůstá od vedoucího iontu ke koncovému. S tím souvisí samozaostřující efekt. Díky němu zůstávají rozhraní mezi zónami úzká a ostrá. Když vedoucí iont L vstoupí vlivem difúze do zóny vzorku X, jeho migrační rychlost díky vyšší intenzitě elektrického pole v zóně vzorku vzroste a iont L se vrátí zpět do své zóny. Proto nedochází k rozmývání izotachoforetických rozhraní [7]. Všechny zóny se pohybují stejně rychle a pro jejich rychlost platí následující vztah:

$$v_{izo} = E_L \cdot \mu_L = E_X \cdot \mu_X = E_T \cdot \mu_T$$

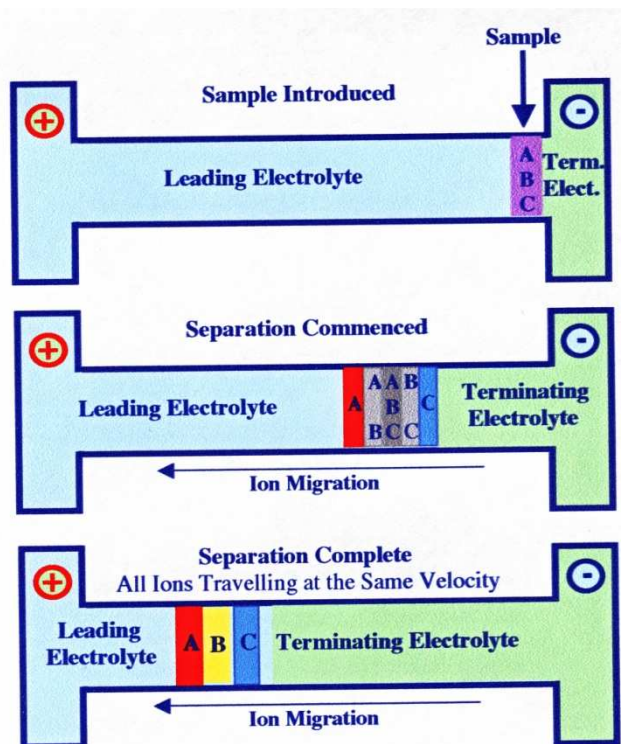
přičemž $\mu_L > \mu_X > \mu_T$

$$E_L < E_X < E_T$$

v_{izo} – rychlost pohybu zóny

E – intenzita elektrického pole

μ – efektivní pohyblivost



Obr. 6: Izotachoforetická separace směsi tří aniontů

Výstupem z detektoru je izotachoforeogram. Nejčastěji je pořizován vodivostním detektorem. Jedná se o soubor stupňovitých vln. Výška vlny odpovídá kvalitě separované látky a délka vlny je přímo úměrná její kvantitě [6].

3.6. Micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC)

MEKC je separační technika kombinující chromatografický separační proces a elektromigrační jevy. Tato metoda byla vyvinuta hlavně pro analýzu molekul neutrální povahy, ale nabitě látky separaci neruší.

Instrumentální vybavení je shodné s CZE. Změnou je přidání povrchově aktivní látky (tenzidu neboli detergentu). Molekuly tenzidu vytváří v koncentracích nad kritickou micelární koncentrací útvary s hydrofobní dutinou, tzv. micely. Hydrofobní dutiny jsou schopny pojmout do svého středu nepolární molekuly. Molekuly analytů budou tím více rozpuštěny ve vodné fázi, čím jsou polárnější a tím více budou vstupovat do micel, čím jsou hydrofobnější. K rozdělování analytu mezi vodnou a micelární fázi tedy dochází podle polaritě jejich molekuly [17].

Micely mají na svém povrchu polární nabitou část a migrují v komplexu s analytem vlivem elektrického pole [7]. Jako detergenty se mohou používat anionty jako je dodecylsulfát sodný (SDS) nebo žlučové kyseliny. Mezi kationtově povrchově aktivní látky patří třeba cetyltrimethylammonium bromid.

Aniontově povrchově aktivní látky se používají více. Povrch těchto micel je záporně nabitý a migrují proto proti EOF. EOF je při vysokém pH elektrolytu dostatečně silný na to, aby micely v komplexech s analyty unášel směrem k detektoru. Příkladem využití MEKC je analýza ve vodě nerozpustných steroidů [9].

3.7. Kapilární gelová elektroforéza (CGE)

CGE se používá k dělení látek s rozdílnou relativní molekulovou hmotností a velmi blízkým specifickým nábojem, tj. nábojem vztaženým na jednotku relativní molekulové hmotnosti. Elektromigrační separace těchto látek musí probíhat v prostředí vykazujícím síťový efekt. Při průchodu částic tímto prostředím dochází ke zpomalení jejich migrace. Výsledná elektroforetická pohyblivost těchto částic je nepřímo úměrná jejich velikosti a tyto látky jsou oddělovány podle vzrůstajících relativních molekulových hmotností. Kapiláry nemusí být naplněny jenom gelem, v dnešní době se přechází spíše k roztokům lineárních polymerů, které rovněž vykazují síťový efekt. Gelová elektroforéza se využívá hlavně pro separaci velkých iontů jako jsou peptidy, bílkoviny, sacharidy či nukleové kyseliny [6].

3.8. Kapilární elektrochromatografie (CEC)

Kapilární elektroforéza je forma kapalinové chromatografie, která využívá k posunu mobilní fáze chromatografickou kolonou elektrického pole. Mobilní fáze unášející analyty je separační kolonou hnána pomocí elektroosmózy. Jako stacionární fáze slouží tavené křemenné kapiláry o vnitřním průměru 50 – 200 μm , které jsou plněné mikročásticemi stacionární fáze o rozměrech 1 – 5 μm [18].

Částice vzorku jsou unášeny mobilní fází směrem k detektoru a zároveň jsou zpouzdřovány interakcemi se stacionární fází. Tuto metodu lze použít pro

stanovení neutrálních molekul i iontů. Neutrální analyty jsou separovány na základě interakcí se stacionární fází. Separace analytů iontové povahy je navíc podpořena ještě rozdíly v jejich efektivních elektroforetických mobilitách, což vede k rozdílným elektroforetickým rychlostem při jejich migraci v elektrickém poli [17].

3.9. Kapilární izoelektrická fokusace (CIEF)

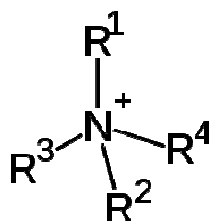
CIEF slouží k dělení amfolytů, tj. látek majících kyselou i bazickou funkční skupinu. Sem patří například aminokyseliny, peptidy nebo proteiny. U CIEF dochází k dělení látek v migračním prostředí s pH gradientem.

Látky migrují prostředím s pH gradientem do té doby, než dosáhnou svého izoelektrického bodu a stanou se elektroneutrálními. Tehdy se zastaví, protože neutrální látky se v elektrickém poli nepohybují.

Po ustálení je třeba fokusované (zkoncentrované) zóny opět mobilizovat, aby mohly projít detektorem umístěným u jednoho z konců kapiláry. Mobilizace se realizuje buď hydrodynamickým tokem vyvolaným přetlakem nebo podtlakem u konců kapiláry nebo elektroelucí. Elektroeluce se dosáhne změnou složení elektrolytu poblíž elektrod, čímž dojde k pohybu pH gradientu a tím se dají do pohybu směrem k detektoru i fokusované zóny [6].

3.10. Kvartérní amoniové sloučeniny

Kvartérní amoniové sloučeniny jsou kladně nabitě ionty o struktuře NR_4^+ , kde R je alkyl nebo aryl. Jakákoliv sloučenina, kterou můžeme považovat za odvozenou z hydroxidu amonného nebo z amonné soli výměnou všech čtyř atomů vodíku za organické skupiny, se dá nazvat kvartérní amoniovou sloučeninou.



Obr. 7: Kvartérní amonný kationt

Ty sloučeniny, které mají jednu z těchto organických skupin tvořenou dlouhým alkylovým řetězcem (C8 - C18) a další tři tvoří kratší alkylové i jiné řetězce, mají vlastnosti kationtových detergentů a jsou to silné antimikrobiální látky. Při nízkých koncentracích působí bakteriostaticky, při vyšších pak baktericidně. Více aktivní jsou zpravidla proti gram pozitivním bakteriím než proti gram negativním. Výhodou je to, že tyto sloučeniny působí relativně málo toxicky na zvířata a lidi a mohou být proto celkem běžně používány jako antiseptické a dezinfekční prostředky [19].

Kvartérní amoniové sloučeniny, které jsem separovala, byly deriváty pyridinu a isochinolinu. Jednalo se o 2-dodecylisochinolinium bromid a 1-dodecylpyridinium bromid. Ve vzorcích se vyskytovaly i pyridin a isochinolin, což byly suroviny pro přípravu kvartérních amoniových sloučenin.

K syntéze těchto sloučenin se přistoupilo proto, že se předpokládal jejich dezinfekční a dekontaminační účinek. Dezinfekční účinky byly testovány na gram pozitivních a gram negativních bakteriích a na některých houbách. Tyto účinky byly potvrzeny. Jsou dány strukturou těchto látek, která je relativně podobná struktuře biologické membrány. Díky tomu jsou tyto látky schopny se do membrány inkorporovat a narušit tak její permeabilitu.

Další vlastností těchto látek je schopnost tvorby micel, jsou to látky povrchově aktivní. Byly testovány jako micelární katalyzátory. Micelární katalyzátory jsou látky schopné několikanásobně urychlovat rozklad některých látek, např. chemických bojových látek nebo pesticidů.

Možnosti využití těchto látek by se jistě našly i ve farmacii, v chemickém průmyslu nebo např. v potravinářství, kde je již používání látek podobných struktur zavedeno.

3.10.1. Vlastnosti 1-dodecylpyridinium bromidu

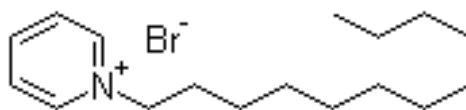
Synonymum: laurylpyridinium bromid

Sumární vzorec: $C_{17}H_{30}BrN$

Molární hmotnost: 328,33 g/mol

Registrační číslo CAS: 104-73-4

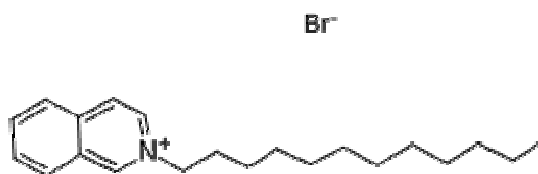
1-dodecylpyridinium bromid je bílý až krémově zbarvený prášek. Je rozpustný ve vodě a alkoholu, ale nerozpustný v etheru [20].



Obr. 8: 1-dodecylpyridinium bromid

3.10.2. Vlastnosti 2-dodecylisochinolinium bromidu

Synonymum:	2-laurylisochinolinium bromid
Sumární vzorec:	$C_{21}H_{32}BrN$
Molární hmotnost:	378,39 g/mol
Registrační číslo CAS:	93-23-3 [21]

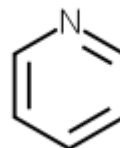


Obr. 9: 2-dodecylisochinolinium bromid

3.11. Nečistoty obsažené ve stanovovaných vzorcích

3.11.1. Pyridin

Systematický název:	azin
Sumární vzorec:	C_5H_5N
Molární hmotnost:	79,1g/mol
Registrační číslo CAS:	110-86-1
Teplota tání:	-41,6 °C
Teplota varu:	115,2 °C
Hodnota pKa:	5,25



Pyridin je aromatická heterocyklická sloučenina strukturálně odvozená od benzenu náhradou jedné skupiny CH atomem dusíku. Je to bezbarvá, slabě alkalická, hořlavá kapalina mísitelná s vodou. Je nepříjemně cítit po rybách.

Pyridin se v přírodě s výjimkou listů a kořenů rulíku zlomocného (*Atropa belladonna*) nevyskytuje. Získává se z uhlénoho dehtu a jako vedlejší produkt zplyňování uhlí. Zvýšená poptávka po pyridinu vyústila ve vývoj úspornější metody syntézy z acetaldehydu a amoniaku.

Používá se při syntéze antihistaminik, repelentů či herbicidů [22].

Metody pro stanovení pyridinu:

Pro separaci pyridinu, 1-dodecylpyridinium bromidu, isochinolinu a 2-dodecylisochinolinium bromidu byla použita HPLC analýza. Nastaveny byly tyto separační podmínky (Fakulta vojenského zdravotnictví, Univerzita obrany):

- Kolona: Waters Spherisorc CN (250 mm x 4,6 mm; 5 μm)
- Izokratická eluce
- MF: 45% acetonitrilu, 55% vody, pH upraveno kyselinou octovou na 5,000
- Průtoková rychlost: 1 ml/min
- Detekce: UV při vlnové délce 257 nm

Ke stanovení pyridinu, který je obsažen v tabákovém kouři, byla použita kombinace RP-HPLC-ESI-MS/MS. Podmínky byly následující: [23]

- Kolona Zorbax SB – Aq (150 x 4,6 mm; 5 μm)
- Gradientová eluce
- MF: různé poměry 0,01 M octanu amonného a acetonitrilu
- Průtok: 1,0 ml/min
- Detekce: MS

3.11.2. Isochinolin

Systematický název: benzo[c]pyridin

Sumární vzorec: C₉H₇N

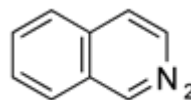
Molární hmotnost: 129.16 g/mol

Registrační číslo CAS: 119-65-3

Teplota tání: 26 - 28 °C

Teplota varu: 242 °C

Hodnota pK_a: 5,42



Isochinolin je slabě bazická, lehce nažloutlá olejovitá kapalina, při pokojové teplotě pronikavého zápachu. Má nízkou rozpustnost ve vodě, ale rozpouští se dobře v ethanolu, acetonu, diethyletheru, sirouhlíku, a dalších běžných organických rozpouštědlech.

Deriváty isochinolinu se používají jako antihypertensiva, anestetika, antimykotika, lokální antiseptika, dezinfekční prostředky či vasodilatátory. Isochinoliny jsou používány při výrobě barviv, nátěrových hmot, insekticidů a fungicidů. Také se využívají jako rozpouštědlo pro extrakci pryskyřic a terpenů nebo jako inhibitor koroze [24].

Metody pro stanovení isochinolinu:

Isochinolin byl stanovován ve směsi s dalšími azaareny ve vzorcích půd HPLC metodou s UV detekcí [25]:

- Kolona se stacionární fází SiC18 (250 x 4,6 mm; 5 μ m)
- Izokratická eluce
- MF: acetonitril – fosfátový pufr 80:20 (c = 5 mmol/l, pH = 7,2)
- Průtok: 0,5 ml/min
- Detekce: UV při 231 nm

Podobná HPLC metoda byla vyvinuta pro stanovení vybraných azaarenů ve vodě [26]:

- Kolona Nova – PAK C18, ID 8 mm, 5 μ m
- MF: do 1 l ultračisté vody byl přidán 1 ml kyseliny fosforečné a po kapkách byl přidáván amoniak až do dosažení hodnoty pH 6,5
- Průtok: 1 ml/min
- Detekce: UV při 214 nm

Metoda CZE byla použita pro analýzu chinolinu a jeho alkyl a arylderivátů [27]:

- Kapilára: křemenná, ID 75 μm , celková délka 75 cm, efektivní délka 45 cm
- BGE: 0,0176 mol/l acetát + 10% (m/m) PEG 2000, pH 5,5
- Podmínky separace: napětí 25 kV, dávkování vzorku vakuově po dobu 0,5 s
- Detekce: UV při 260 nm

4. Experimentální část

4.1. Používané přístroje

- Kapilární elektroforetický systém Agilent CE 7100, Agilent Technologies
- Laboratorní digitální pH metr MeterLab PHM 220, Radiometer Copenhagen, Francie. Přístroj byl vybaven kombinovanou pH elektrodou s RED ROD Ag/AgCl referenční částí a byl kalibrován za použití standardních pufrů (pH 4,005; 7,000 a 10,012).
- Ultrazvuková lázeň Bandelin Sonorex Digitec, Bandelin Electronic, Německo
- Automatické analytické váhy Sartorius 2004 MP, Německo
- Magnetická míchačka MM 2A, Laboratorní přístroje Praha

Kapilární elektroforetický systém Agilent CE 7100

Tento přístroj je vybaven detektorem s diodovým polem (DAD) a vodivostním detektorem. K separaci jsem používala křemennou kapiláru o vnitřním průměru (ID) 75 μm , celkové délce 58 cm a efektivní délce 49,5 cm. Komunikaci s analyzátozem a zpracování dat umožňoval software Agilent ChemStation B.04.



Obr. 10: Kapilární elektroforetický systém Agilent CE 7100

4.2. Použité chemikálie a roztoky

- Methanol Chromasolv® pro HPLC, Mr = 32,04, Sigma-Aldrich, Praha
- Imidazol, p.a., Mr = 68,08, Sigma-Aldrich, Německo
- TMAI, Tetramethylammonium iodide, 99%, Mr = 201,05, Aldrich Chemical Company, USA
- TBABr, Tetrabutylammonium bromide, > 99,0%, Mr = 322,37, Fluka Analytical, Indie
- TFAI, Tetrafenylammonium iodide, 99%, Mr = 449,32, Sigma-Aldrich, Praha
- Cetylpyridinium bromide, 98%, Mr = 402,47, Lachema Brno, Chemapol, Praha
- Dihydrogenfosforečnan sodný, p.a., Mr = 119,98, RNDr. Jan Kulich, Hradec Králové
- Kyselina chlorovodíková p.a., 37%, Mr = 36,46, Sigma-Aldrich, Praha
- Hydroxid sodný, p.a., Mr = 40,00, Merck
- Kyselina octová, p.a.99%, Mr = 60,05, Sigma-Aldrich, Praha
- TRIS, 2-amino-2-hydroxymethylpropan-1,3-diol, ≥ 99,9%, Mr = 121,1, Sigma-Aldrich, Praha
- Kyselina boritá pro elektroforézu, p.a., Mr = 61,83, Sigma-Aldrich, Japonsko
- MES, 2-(N-morfolino)ethan sulfonová kyselina, > 99%, Mr = 195,2, Sigma-Aldrich, USA
- HEPES, N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethan, ≥ 99,5%, Mr = 238,31, Sigma-Aldrich, USA
- Tetraboritan sodný, dekahydrát, 99%, Mr = 381,37, Sigma-Aldrich, Praha
- Kyselina mravenčí, Mr = 46,02, 99%, Sigma-Aldrich, Praha
- Pyridin, ≥99%, Mr = 79,1, Sigma-Aldrich, Praha
- Isochinolin, 97%, Mr = 129,16, Sigma-Aldrich, Praha
- 1 – dodecylpyridinium bromid, Mr = 328,33, syntetizováno a poskytnuto Univerzitou obrany v Hradci Králové
- 2 – dodecylisochinolinium bromid, Mr = 378,39, syntetizováno a poskytnuto Univerzitou obrany v Hradci Králové

4.3. Příprava roztoků

Ultračistá voda používaná pro přípravu veškerých roztoků byla produkována zařízením Millipore MileQRG.

4.3.1. Příprava pracovního elektrolytu

Do kádinky jsem odměřila pipetou vypočtené množství kyseliny octové, přidala jsem menší množství vody a za stálého míchání upravila pH pomocí 1 M hydroxidu sodného na požadovanou hodnotu. Poté jsem roztok kvantitativně převedla do odměrné baňky, přidala odpovídající množství methanolu a doplnila vodou po rysku.

4.3.2. Příprava zásobních roztoků standardů

Na analytických vahách jsem do kádinky navážila 0,10415 g pyridinu, který jsem následně kvantitativně převedla do 100 ml odměrné baňky a doplnila vodou po rysku. Tak jsem získala zásobní standardní roztok pyridinu o koncentraci 1,0415 mg/ml.

Při přípravě standardního roztoku isochinolinu jsem isochinolin nejprve zahřála na 28°C, aby došlo k jeho roztavení. Poté jsem navážila 0,09981 g isochinolinu a kvantitativně ho převedla do 100 ml odměrné baňky, přidala jsem 25 ml methanolu a doplnila vodou po rysku. Tak vznikl zásobní roztok isochinolinu o koncentraci 0,9981 mg/ml.

4.3.3. Příprava vzorku

Zásobní roztok vzorku o koncentraci 1 mg/ml jsem připravila tak, že jsem do 10 ml odměrné baňky navážila přibližně přesně 0,01 g vzorku a doplnila vodou po rysku. Roztok jsem nechala 10 min rozpouštět na ultrazvukové lázni. Stejným způsobem jsem připravovala i zásobní roztok vnitřního standardu.

Ze zásobního roztoku vzorku jsem připravila měrný roztok o koncentraci 0,1 mg/ml a 0,05 mg/ml imidazolu (sloužil jako IS), a to napipetováním 1 ml zásobního roztoku vzorku a 0,5 ml zásobního roztoku imidazolu do 10 ml

odměrné baňky a následným doplněním vodou po rysku. Tento roztok jsem používala jako vzorek při optimalizaci metody.

4.3.4. Příprava kalibračních roztoků

Sadu kalibračních roztoků jsem připravovala ředěním zásobních roztoků standardů ultračistou vodou. Koncentrace IS byla ve všech roztocích stejná, a to 0,05 mg/ml.

Jako slepý vzorek jsem při všech měřeních používala ultračistou vodu.

4.4. Pracovní a výpočetní postupy

4.4.1. Pracovní postup

Před samotnou analýzou jsem zapnula PC a elektroforetický analyzátor a spustila software umožňující komunikaci s přístrojem. V programu jsem zadala parametry, za kterých probíhalo měření.

Před prvním použitím jsem novou kapiláru promývala 10 min MeOH, 10 min 1 M NaOH, 5 min ultračistou vodou a 20 min roztokem pracovního elektrolytu. Před začátkem analýzy jsem prováděla denní promytí kapiláry 10 min 0,1 M NaOH, 10 min vodou a 20 min BGE. Po skončení všech měření vždy následovalo promytí 10 min 1 M NaOH, 10 min 0,1 M NaOH a 10 min vodou. Za účelem dosažení lepší separační účinnosti a reprodukovatelnosti měření jsem kapiláru mezi analýzami proplachovala 2 min 0,1 M NaOH a 2 min BGE.

Injektáž vzorku byla prováděna hydrodynamicky tlakem 50 mbar po dobu 6 s. Kapilára byla temperována na teplotu 25 °C a napětí bylo nastaveno na 20 kV. Detekce probíhala při vlnové délce 210 nm a při 254 nm.

Pracovní elektrolyt bylo nutné přefiltrovat membránovým filtrem Econofilter s póry o velikosti 0,45 µm a všechny roztoky se před vložením do analyzátoru musely odplynit na ultrazvukové lázni po dobu 5 minut.

4.4.2. Vývoj a optimalizace metody

Při optimalizaci jsem postupně zkoumala následující aspekty:

- použití různých BGE
- volba vnitřního standardu
- testování vlivu pH BGE
- testování vlivu koncentrace BGE
- vliv přídavku organického rozpouštědla
- vliv napětí
- vliv teploty

4.4.3. Měření kalibrační závislosti

Pro měření kalibrační závislosti jsem jako pracovní elektrolyt používala 70 mM octanový tlumivý roztok. Roztokem hydroxidu sodného jsem upravila pH na hodnotu 4,7 a přidala jsem 5 % (v/v) methanolu.

Měrné roztoky pro měření kalibrační závislosti jsem naředila v čas potřeby ze zásobních roztoků standardů o koncentraci 1,0415 mg/ml pyridinu a 0,9981 mg/ml isochinolinu. Pro každou z koncentrací jsem provedla 3 paralelní měření. Měrné roztoky obsahovaly vnitřní standard o koncentraci 0,05 mg/ml.

Kalibrační závislost byla vyhodnocena na počítači pomocí programu lineární regrese jako závislost ploch korigovaných vnitřním standardem na koncentraci nečistot.

4.4.4. Rozlišení R_s

Jedná se o kvantitativní vyjádření míry separace dvou sousedních píků. Je-li hodnota R_s větší než 1,5, došlo k rozdělení píků až na základní linii.

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

t_1, t_2 - migrační časy sledovaných látek [s]; ($t_1 < t_2$)

w_1, w_2 - šířky píků měřené na základní linii [s] [2]

4.4.5. Účinnost separace

Účinnost separace se vyjadřuje jako počet teoretických pater N . Počet teoretických pater a tím i účinnost separace je tím vyšší, čím je pík užší. Při rozmývání píků se tedy účinnost separace snižuje.

$$N = 5,545 \left(\frac{t_m}{w_{h/2}} \right)^2$$

t_m - migrační čas [s]

$w_{h/2}$ - šířka píku v polovině jeho výšky [s] [2]

4.4.6. Opakovatelnost metody

Opakovatelnost metody je charakterizována jako variabilita výsledků získaných opakovaným nástřikem téhož vzorku v krátkém časovém úseku při shodných podmínkách analýzy. Vyjadřuje se jako směrodatná odchylka a relativní směrodatná odchylka migračního času a plochy píku.

Směrodatná odchylka s :

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

n - počet měření

x_i - výsledek jednotlivého měření

\bar{x} - průměr naměřených hodnot

Relativní směrodatná odchylka RSD:

$$RSD[\%] = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100$$

s – směrodatná odchylka

\bar{x} - průměr naměřených hodnot

4.4.7. Limit detekce a kvantifikace

Detekční limit LOD (limit of detection)

LOD vyjadřuje nejnížší koncentraci sloučeniny, kterou je možné danou metodou detekovat. Jedná se o takovou koncentraci, jejíž analytický signál je

statisticky významně odlišný od šumu. Nejčastěji se určuje jako koncentrace analyzované látky, jejíž poměr signálu k šumu je rovný 3 [5].

Limit kvantifikace LOQ (limit of quantification)

LOQ je nejnižší koncentrace analytu, kterou lze metodou stanovit jako exaktní hodnotu s požadovanou hodnotou nejistoty. Kvantitativní limit odpovídá hodnotě poměru signálu k šumu rovné 10 [5].

4.4.8. Stanovení množství nečistoty ve vzorku

Množství nečistoty ve vzorku se stanoví z poměru koncentrace neznámé látky a koncentrace známého standardu o známé koncentraci a z poměru korigované plochy neznámého vzorku a korigované plochy standardu:

$$\frac{c_x}{c_{st}} = \frac{A_x/A_{is}}{A_{st}/A_{is}}$$

c_x – stanovovaná koncentrace neznámé látky

c_{st} – známá koncentrace standardu

A_x – odečtená plocha stanovovaného vzorku

A_{st} – plocha odečtená pro příslušný standard

A_{is} – plocha vnitřního standardu

Procentuální podíl nečistoty ve vzorku:

$$\%(neč) = \frac{m_x}{m} \cdot 100$$

m_x - hmotnost nečistoty ve vzorku

m - navážka vzorku

4.4.9. Správnost metody

Aby byla metoda správná, musí panovat co největší shoda mezi výsledky naměřenými a absolutní správnou hodnotou. Správnost metody lze ověřit analýzou vzorku s přidavkem standardních látek. Vyjadřuje se jako rozdíl hodnot nebo jako výtěžnost (recovery) R v %.

$$R [\%] = \frac{\text{hodnota nalezená}}{\text{hodnota vložena}} \cdot 100$$

5. Výsledky a diskuze

5.1. Vývoj a optimalizace metody

Cílem optimalizace podmínek měření je výběr takových parametrů analýzy, při kterých dojde k úplné separaci látek na základní linii, píky jsou co nejvíce symetrické a mají co největší plochu. Zároveň se snažíme dosáhnout přiměřené doby analýzy. Předmětem této práce bylo nalézt vhodné podmínky separace vedoucí k rozdělení 1-dodecylpyridinium bromidu, 2-dodecylisochinolinium bromidu a také pyridinu a isochinolinu, což jsou nečistoty nalezené ve vzorcích.

Optimalizační měření byla prováděna s roztokem obsahujícím DI o koncentraci 0,1 mg/ml a DP o téže koncentraci. Při změně podmínek analýzy se vždy proměřil také slepý roztok neobsahující tyto látky.

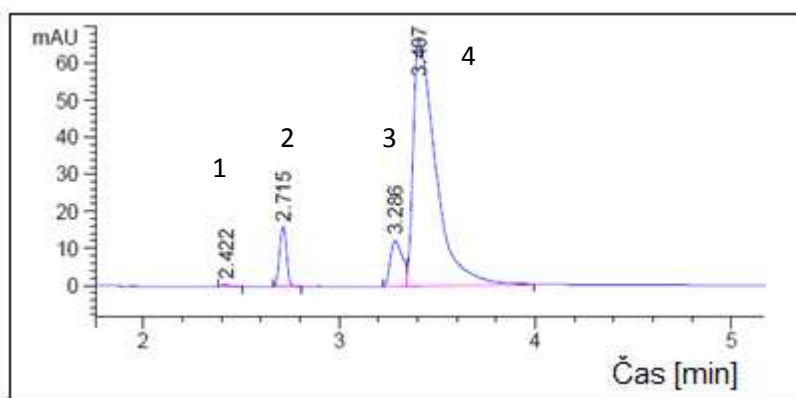
5.1.1. Detekce

Kapilární elektroforetický systém Agilent CE 7100 je vybaven UV (DAD) detektorem. Při zjišťování optimální vlnové délky jsem proměřila spektra látek v acetátovém pufru v rozmezí od 190 nm do 390 nm. Pyridin má absorpční maximum při 254 nm, isochinolin vykazuje 3 maxima: při 220 nm, 274 nm a 325 nm. Absorpční maximum imidazolu (IS) je 210 nm. Nakonec byly zvoleny dvě vlnové délky, a to 254 nm pro pyridin a 210 nm pro isochinolin a imidazol.

5.1.2. Volba pracovního elektrolytu

Při hledání vhodného BGE se vycházelo ze zkušeností zaměstnanců katedry i z literatury popisující separaci podobných látek. Postupně byly připraveny tyto BGE: mravenčanový, fosforečnanový, acetátový, borátový, imidazolový, HEPES a MES.

Doba analýzy probíhající v prostředí mravenčanového pufru byla uspokojivá, nedošlo však k úplnému rozdělení píků na základní linii. U nejpomalejšího píku nastalo chvostování. Záznam separace v tomto pufru je na následujícím obrázku.

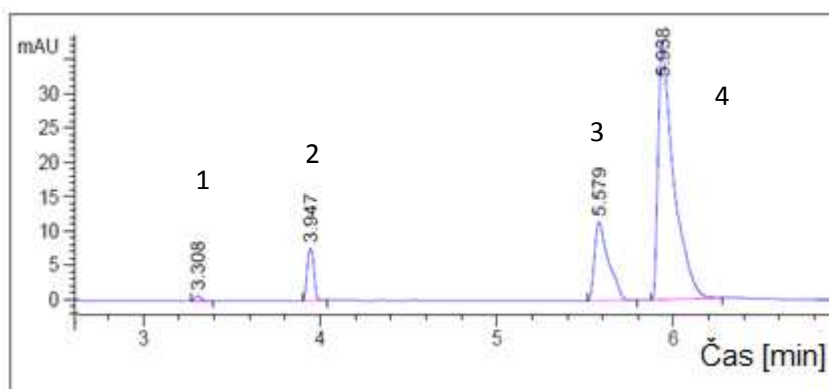


Obr. 11: Separace v mravenčanovém pufru

30 mM mravenčan, pH 3,7

Pík1: pyridin; 2: isochinolin; 3: DP; 4: DI

Ve fosforečnanovém pufru byla analýza pomalejší, ale analyty byly od sebe úplně odděleny. Symetrie píků však nebyla ideální.

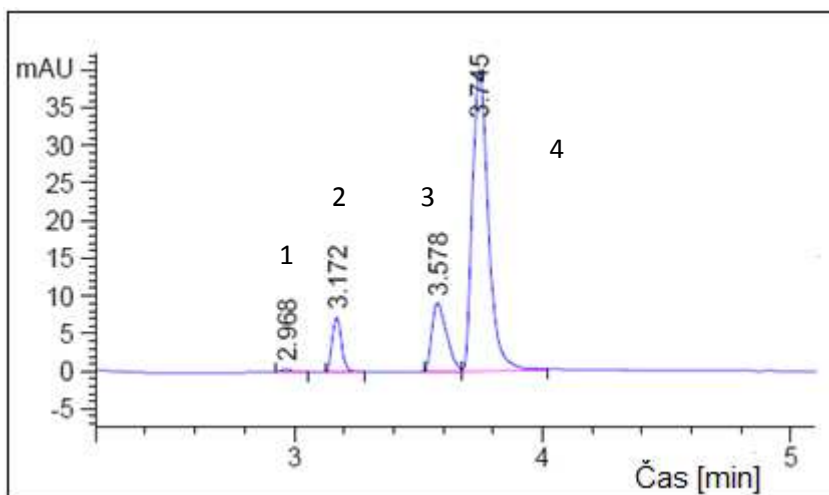


Obr. 12: Separace ve fosforečnanovém pufru

25 mM fosforečnan, pH 2,5

Pík 1: pyridin; 2: isochinolin; 3: DP; 4: DI

Dalším zkoumaným elektrolytem byl acetát. Rozlišení bylo dostatečné a symetrie píků nejlepší ze zkoumaných BGE systémů. Acetátový pufr se zdál být nejvhodnějším pro kvalitní separaci DI a DP v optimálním čase.

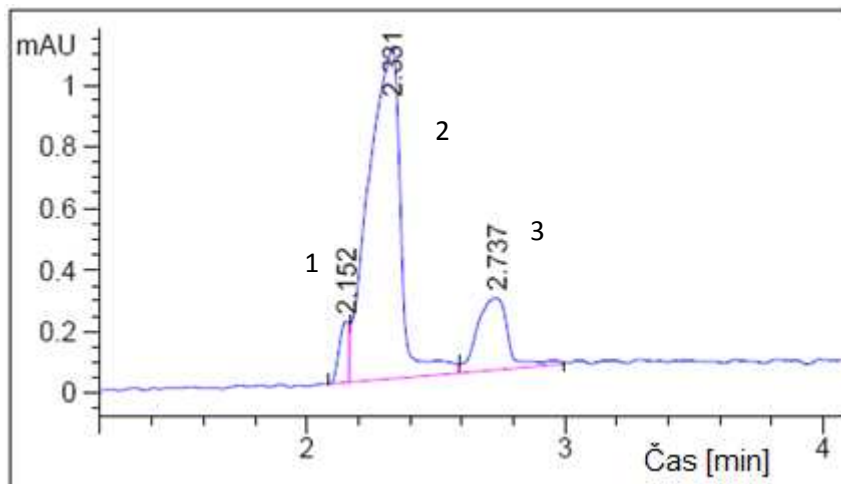


Obr. 13: Separace v acetátovém pufru

30 mM acetát, pH 4,7

Pík 1: pyridin; 2: isochinolin; 3: DP; 4: DI

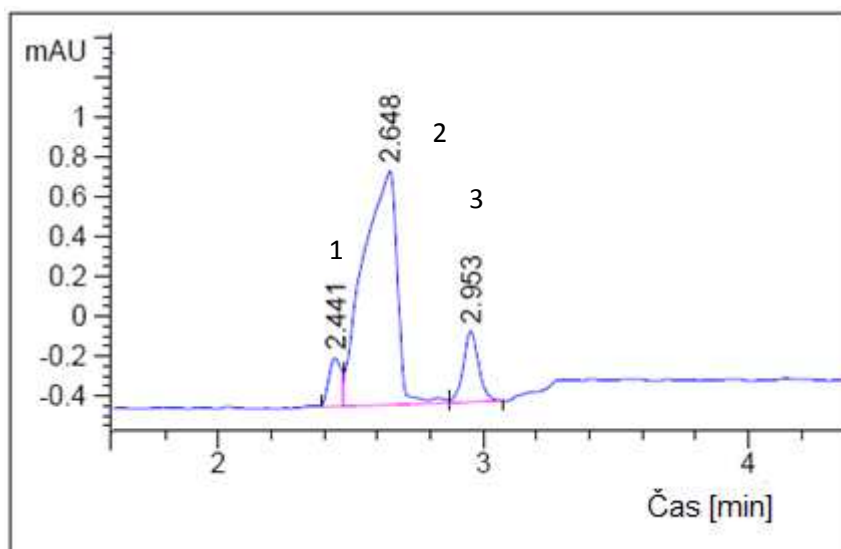
Velmi podobně probíhala separace v elektrolytech HEPES a MES. Oba tyto pufrы se ukázaly jako nevhodné, jelikož v těchto systémech nedošlo k uspokojivému rozdělení jednotlivých analytů. Navíc byly píky asymetrické.



Obr. 14: Separace v HEPES

30 mM HEPES, pH 7,6

Pík 1: DI; 2: DP; 3: pyridin

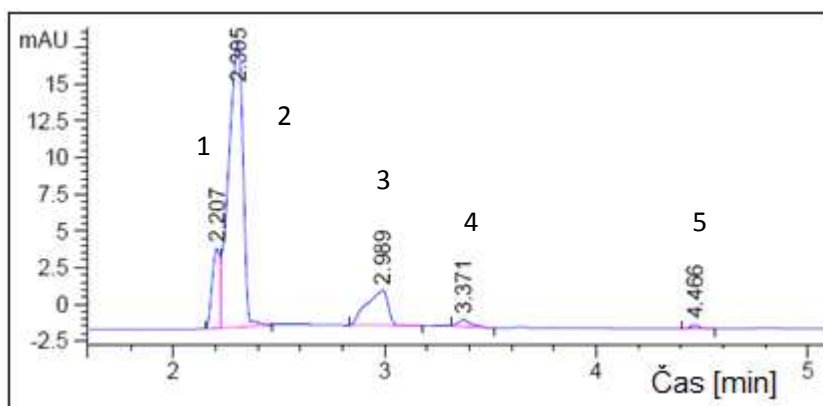


Obr. 15: Separace v MES

30 mM MES, pH 6,15

Pík 1: DI; 2: DP; 3: pyridin

Borátový pufr se neosvědčil hned z několika důvodů. Rozlišení nebylo dostatečné, ani symetrie nebyla optimální. Záznam také obsahoval systémové píky ($t_m = 3,371\text{ min}$ a $4,466\text{ min}$). Je zřejmé, že při takto vysokém pH (9,1) jsou báze pyridin a isochinolin málo ionizované.

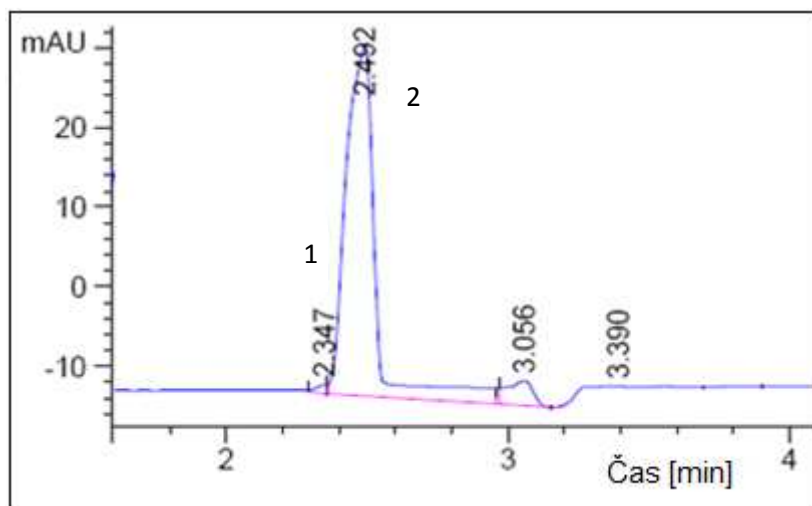


Obr. 16: Separace v borátovém pufru

30 mM borát (z tetraboritanu sodného), pH 9,1

Pík 1: DI; 2: DP; 3: pyridin; 4: systémový pík; 5: systémový pík

Ani separace probíhající v imidazolovém pufru neposkytovala požadované výsledky. Tento pufr vykazoval nízkou citlivost i rozlišení.



Obr. 17: Separace v imidazolovém pufru

30 mM imidazol, pH 7,0

Pík 1: DI; 2: DP

Jako nejlepší ze zkoumaných pufrů byl tedy vyhodnocen acetátový. Další podmínky analýzy, u nichž probíhala optimalizace, byly zkoumány právě v prostředí acetátu.

5.1.3. Výběr vhodného vnitřního standardu

Jako vnitřní standard jsem zkoušela použít tetrafenylammonium jodid, tetramethylammonium jodid, tetrabutylammonium bromid, cetylpyridinium bromid a imidazol. Tetramethylammonium jodid a tetrabutylammonium bromid migrují až za analyzovanými látkami, což není výhodné. Tetrafenylammonium jodid migroval sice jako první, ale jeho migrační čas interferoval s migračním časem pyridinu a píky tedy splývaly. V případě cetylpyridinium bromidu se do migračního času EOF neobjevila žádná odezva. Jako IS se nakonec osvědčil imidazol, který migroval ze separovaných analytů nejrychleji. Imidazol jsem připravila v koncentraci 0,1 mg/ml a 0,05 mg/ml. Lépe se osvědčila koncentrace 0,05 mg/ml, se kterou jsem dále pracovala.

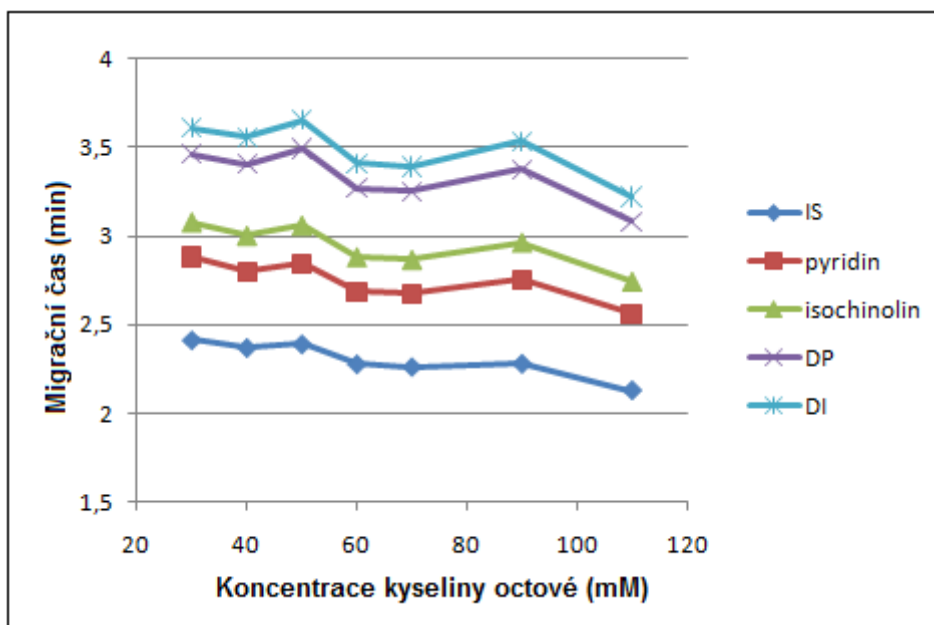
5.1.4. Optimalizace pH

Při výběru vhodného pH probíhala separace v 30 mM acetátu při pH 3,7; 4,2; 4,7; 5,2 a 5,7. pH jsem upravovala 1 M NaOH. Jako jediné vyhovující se z této škály ukázalo pH 4,7. Při ostatních hodnotách pH nedošlo k dostatečnému rozdělení píků, při pH 5,2 záznamy pyridinu a isochinolinu dokonce úplně splýnuly.

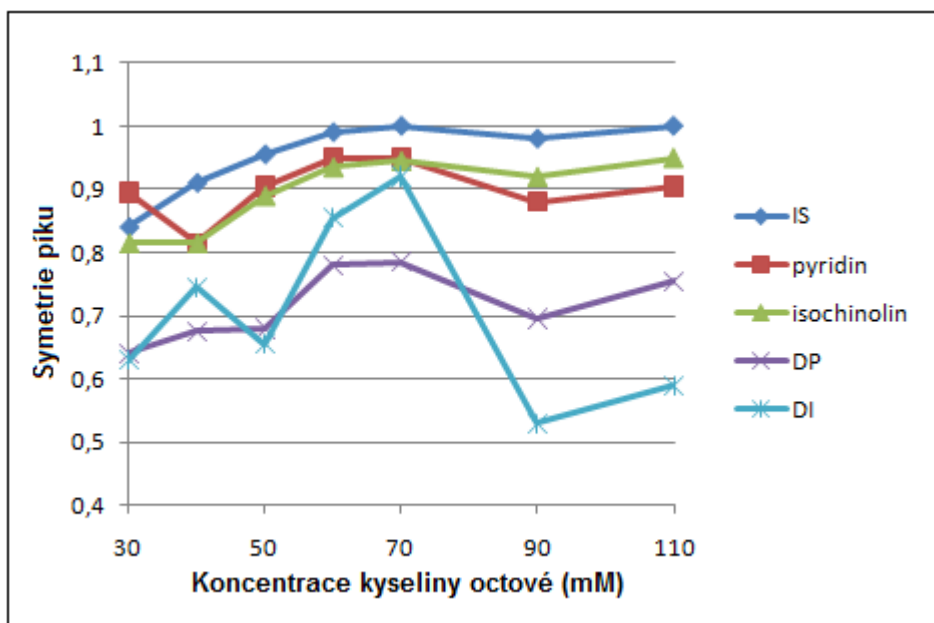
5.1.5. Vliv koncentrace BGE

Měření při hledání optimální koncentrace BGE probíhala v acetátovém pufru o pH 4,7. Byly připraveny elektrolyty o koncentraci 30 mM, 40 mM, 50 mM, 60 mM, 70 mM, 90 mM a 110 mM. Změny koncentrace elektrolytu se na migračních časech analytů téměř neprojevovaly (viz obr. 18), i rozlišení bylo ve všech případech vyhovující. Ukazatel, podle kterého jsem se rozhodovala, byla symetrie píků. Se stoupající koncentrací pufru byly píky symetričtější. Nejlepších hodnot symetrie bylo dosaženo při koncentraci octanu 70 mmol/l, u

vyšších koncentrací BGE než 70 mM se faktor symetrie naopak zhoršoval (viz obr. 19). Jako ideální byl tedy vybrán octanový pufr o koncentraci 70 mM.



Obr. 18: Závislost migračních časů na koncentraci BGE

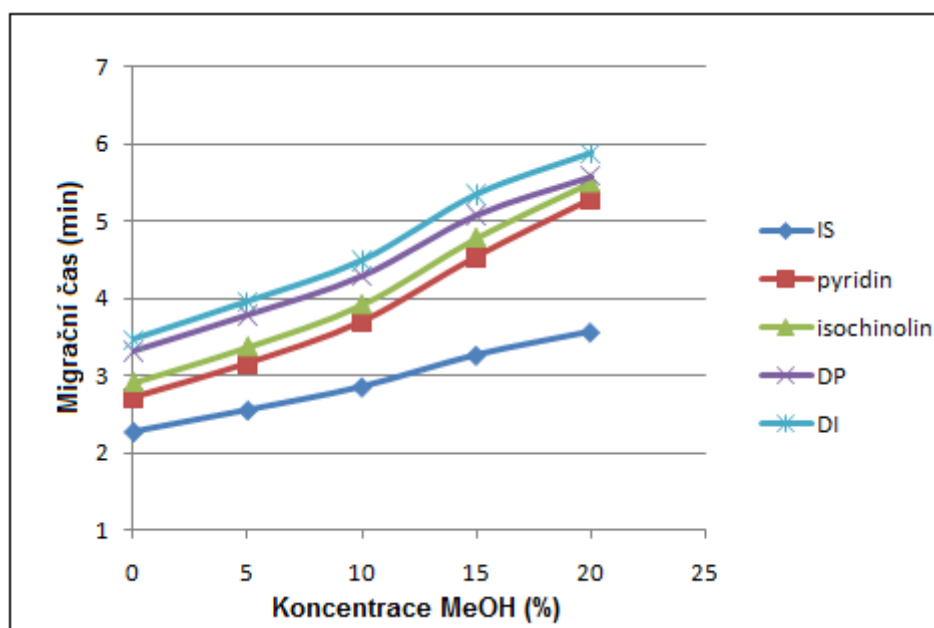


Obr. 19: Závislost symetrie píku na koncentraci BGE

5.1.6. Vliv přidavku methanolu

Dle očekávání došlo po přidání MeOH k ovlivnění pohyblivosti jednotlivých analytů, což se projevilo prodloužením doby analýzy. Migrační čas

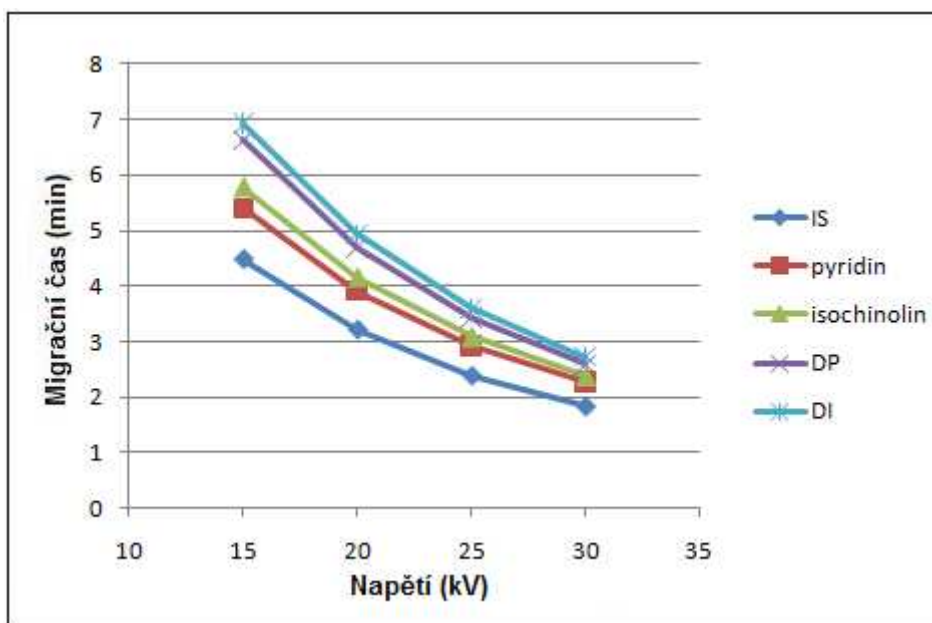
látek se zvyšoval úměrně s narůstajícím obsahem přidaného MeOH. Připravila jsem sérii acetátových pufrů o koncentraci 70 mM a pH 4,7 s přídávkem 5%, 10%, 15%, 20% MeOH a bez přidaného MeOH. Jako nejpříhodnější se jevil elektrolyt obsahující 5% MeOH. Při vyšších koncentracích došlo k přílišnému prodloužení analýzy, při separaci s přídávkem 20% MeOH nebyly isochinolin a DP dostatečně odděleny. Pokud se však MeOH do BGE nepřidal, rozlišení DP a DI nebylo uspokojivé.



Obr. 20: Závislost migračních časů na koncentraci MeOH

5.1.7. Vliv napětí

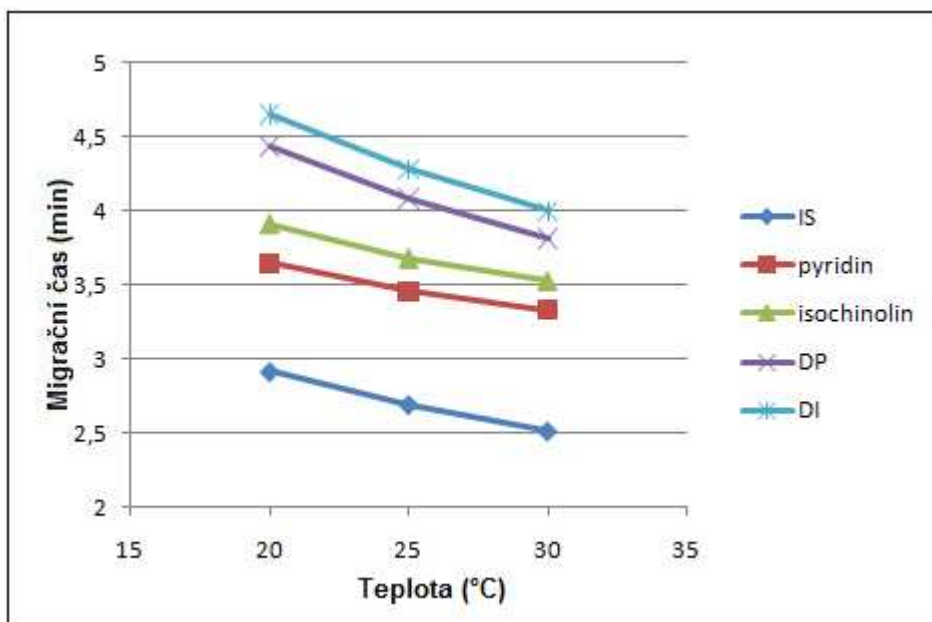
Všechny pokusy při optimalizačních měřeních probíhaly až doposud při napětí 25 kV. Nyní jsem v rámci hledání ideálních podmínek separace sledovala vliv napětí na analýzu prováděnou v elektrolytovém systému obsahujícím 70 mM kyselinu octovou a 5% MeOH, pH elektrolytu bylo 4,7. Zkoušela jsem rozsah napětí 15 – 30 kV. Rostoucí napětí se projevvalo výrazným zkrácením doby analýzy. Při 15 kV byly sice všechny látky dokonale separované, ale analýza probíhala zbytečně dlouho. Migrační čas EOF byl 10,2 min. Při 30 kV se doba analýzy natolik zkrátila, že došlo k částečnému splynutí DP a DI. Nakonec bylo jako nejlepší vyhodnoceno napětí 20 kV, jelikož rozlišení všech píků bylo při této analýze dostatečné a doba analýzy byla též vyhovující.



Obr. 21: Závislost migračních časů na napětí

5.1.8. Vliv teploty

S rostoucí teplotou roste i rychlost analýzy. Při separaci by bylo možné použít všechny 3 testované teploty, parametry analýz byly vyhovující. Další měření probíhala při teplotě 25 °C.



Obr. 22: Závislost migračních časů na teplotě

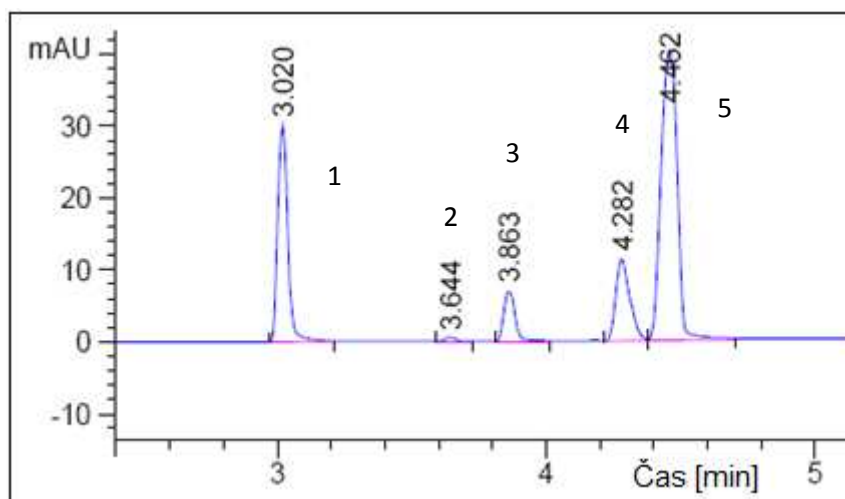
5.1.9. Optimální složení pracovního elektrolytu a podmínky měření

V následující tabulce jsou shrnuty podmínky separace, které byly v průběhu optimalizace zvoleny jako nejlepší.

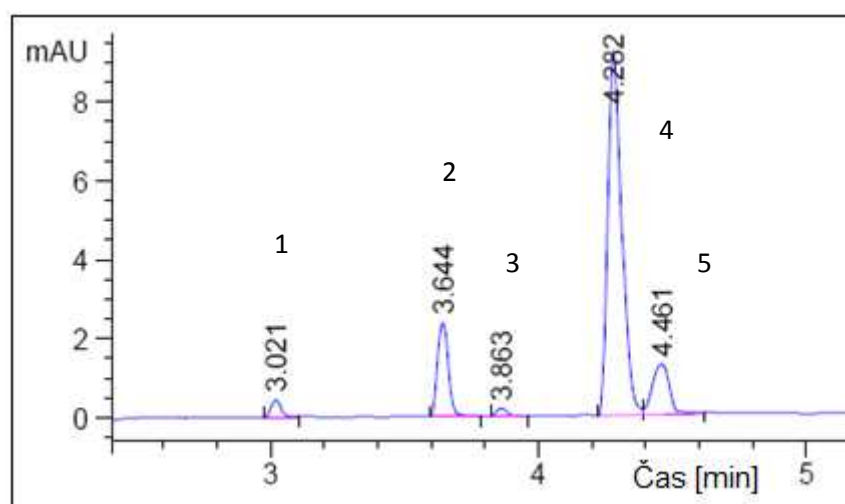
Tabulka 1: Optimální podmínky separace

Optimální podmínky separace	
Rozpouštědlo	Ultračistá voda
BGE	70 mM octan, pH 4,7
Organické rozpouštědlo v BGE	5% (v/v) MeOH
IS	imidazol (0,05 mg/ml)
Napětí	20 kV
Teplota	25 °C
Dávkování	6 s, tlak 50 mbar
Detekce	UV při 210 nm a 254 nm
Kapilára	Křemenná, ID 75 µm, celková délka 58 cm, efektivní délka 49,5 cm

Záznamy separace za optimálních podmínek při koncentraci 0,1 mg/ml vzorku DP, 0,1 mg/ml vzorku DI a 0,05 mg/ml imidazolu jsou uvedeny na obrázcích č. 23 a 24. Uvedená čísla vyjadřují migrační časy jednotlivých analytů v minutách. Analyzované látky migrují v pořadí imidazol, pyridin, isochinolin, DP a DI. Identifikace píků byla provedena přidávkem standardu s následným zvětšením plochy píku a také porovnáním absorbance při různých vlnových délkách. Při 210 nm byly detekovány imidazol a isochinolin. Pro pyridin byla citlivější detekce při 254 nm, kde má absorpční maximum.



Obr. 23: Vzorový elektroforeogram směsi analytů, měřeno při 210 nm
 Pík 1: imidazol (IS); 2: pyridin; 3: isochinolin; 4: DP; 5: DI



Obr. 24: Vzorový elektroforeogram směsi analytů, měřeno při 254 nm
 Pík 1: imidazol (IS); 2: pyridin; 3: isochinolin; 4: DP; 5: DI

5.1.11. Rozlišení

Hodnoty rozlišení mezi píky sousedních složek byly zjištěny pomocí softwaru Agilent ChemStation B.04.

Tab. 2: Rozlišení píků, 210 nm

Dvojice analytů	Rozlišení R_s
imidazol - pyridin	8,65
pyridin - isochinolin	2,96
isochinolin - DP	4,89
DP - DI	1,72

5.1.12. Účinnost separace

Účinnost separace se vyjadřuje pomocí počtu dosažených teoretických pater N. Hodnoty byly zpracovány softwarem Agilent ChemStation B.04.

Tab. 3: Počet teoretických pater

Analyt	N
imidazol	29 357
pyridin	39 175
isochinolin	43 415
DP	31 344
DI	25 445

5.2. Kvantitativní analýza

Kalibrační závislost jsem proměřila za použití optimálního pracovního elektrolytu a podmínek uvedených v tabulce č. 1. Plochy píků byly vyhodnoceny počítačovým softwarem Agilent ChemStation B.04. Pro každou koncentraci jsem provedla tři nástřiky a z výsledků jsem spočítala aritmetický průměr. Plochy analytů byly korigovány migračním časem analytu a plochou a časem IS podle vzorce:

$$A = \frac{A_x}{t_x} \cdot \frac{A_{IS}}{t_{IS}}$$

A – korigovaná plocha

A_x – plocha analytu

A_{IS} – plocha IS

t_x – migrační čas analytu

t_{IS} – migrační čas IS

Kalibrační závislost byla vytvořena metodou lineární regrese.

Obecný tvar rovnice přímky je:

$$y = kx + q$$

x – koncentrace látky ($\mu\text{g/ml}$)

y – plocha píku analytu/ plocha píku IS

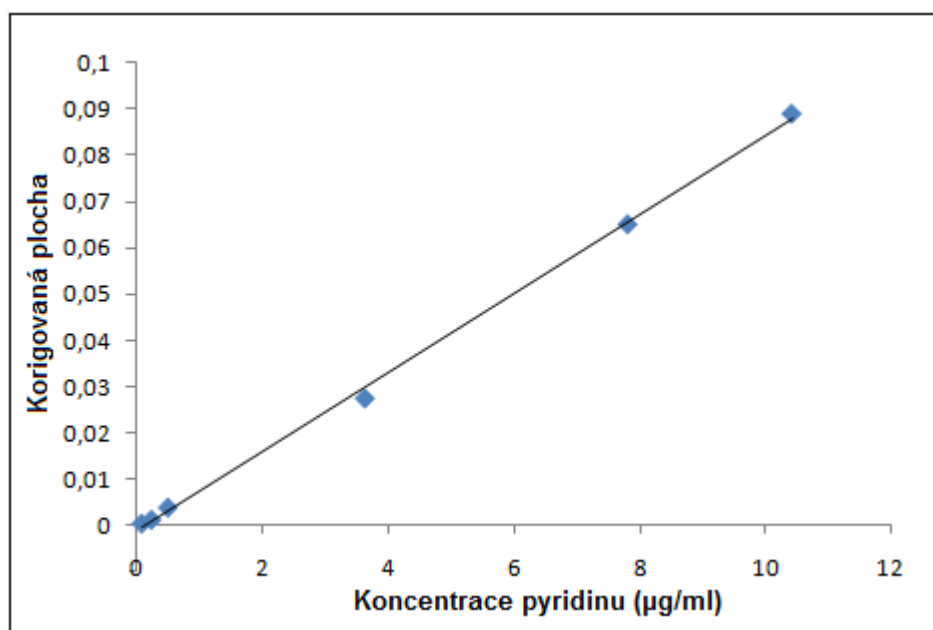
k – směrnice přímky

q – absolutní člen

5.2.1. Kalibrační závislost pyridinu

Měření probíhalo při vlnové délce 254 nm. IS (imidazol) byl hodnocen při 210 nm. Koncentrace, plochy píků, migrační časy a z nich vypočítané korigované plochy použité k vyjádření kalibrační závislosti jsou uvedeny v následující tabulce.

Tab. 4: Kalibrační údaje pro pyridin Pyridin (254 nm)						
Bod kalibrační křivky	Koncentrace (µg/ml)	Plocha píku pyridinu	Plocha píku IS	Migrační čas pyridinu (min)	Migrační čas IS (min)	Korigovaná plocha A
1	0,104	0,068	118,480	3,76	3,08	0,0005
2	0,260	0,203	126,458	3,77	3,08	0,0013
3	0,521	0,543	113,017	3,74	3,06	0,0039
4	3,645	4,529	134,853	3,74	3,06	0,0275
5	7,811	8,929	112,754	3,75	3,08	0,0651
6	10,415	13,634	126,199	3,76	3,09	0,0890



Obr. 25: Kalibrační závislost pyridinu

Parametry lineární regrese:

rovnice přímky: $y = 0,0086 x - 0,0012$

korelační koeficient: 0,9988

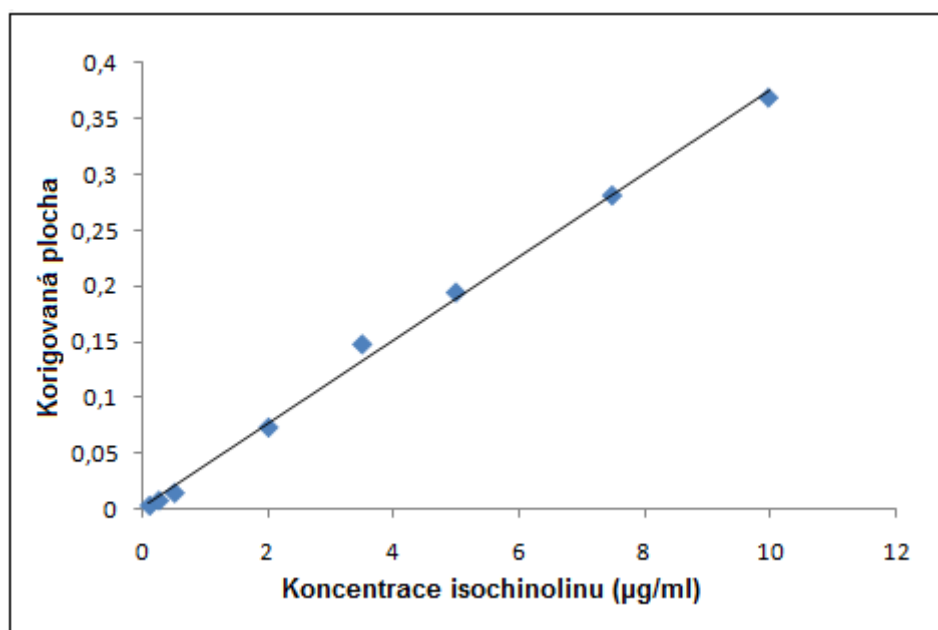
Ve sledovaném koncentračním rozmezí pyridinu je závislost lineární.

5.2.2. Kalibrační závislost isochinolinu

Měření bylo prováděno při 210 nm. Koncentrace, plochy píků, migrační časy a z nich vypočítané korigované plochy použité k vyjádření kalibrační závislosti jsou uvedeny v následující tabulce.

Tab. 5: Kalibrační údaje pro isochinolin

Isochinolin (210 nm)						
Bod kal. křivky	Koncentrace (µg/ml)	Plocha píku isochinolinu	Plocha píku IS	Migrační čas isochinolinu (min)	Migrační čas IS (min)	Korigovaná plocha A
1	0,100	0,561	118,480	3,97	3,08	0,0037
2	0,250	1,348	126,458	3,99	3,08	0,0083
3	0,499	2,199	113,017	3,95	3,06	0,0151
4	1,996	12,491	131,527	3,94	3,06	0,0736
5	3,493	25,760	134,853	3,95	3,06	0,1480
6	4,991	33,088	131,635	4,03	3,11	0,1944
7	7,486	40,886	112,754	3,97	3,08	0,2811
8	9,981	59,936	126,199	3,99	3,09	0,3686



Obr. 26: Kalibrační závislost isochinolinu

Parametry lineární regrese:

rovnice přímky: $y = 0,0374 x - 0,002$

korelační koeficient: 0,9972

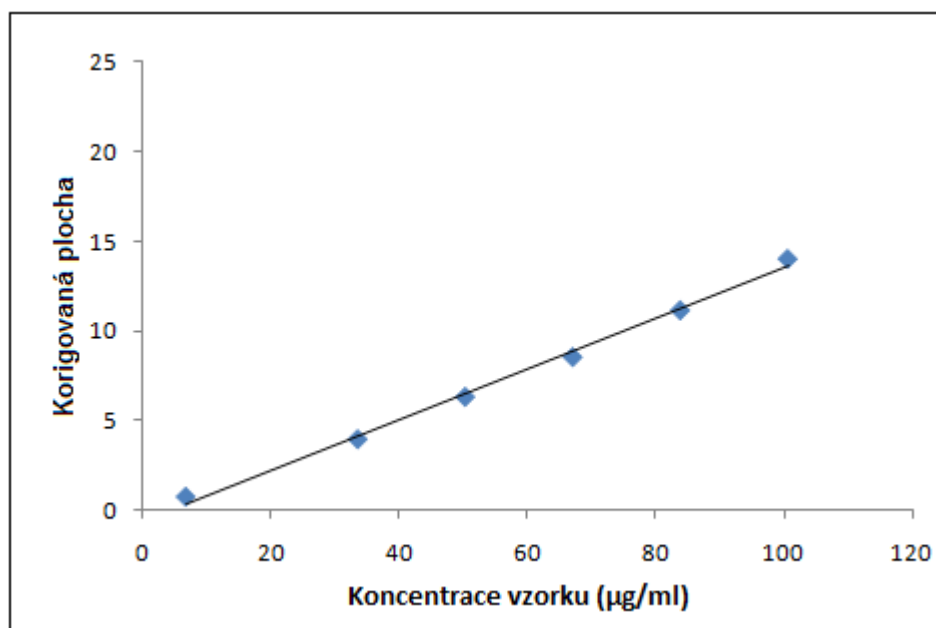
Ve sledovaném koncentračním rozmezí isochinolinu je závislost lineární.

5.2.3. Limity detekce a kvantifikace

Limity detekce a limity kvantifikace byly určeny na základě poměru signálu k šumu. Pro LOD je poměr signálu k šumu roven 3, hodnota LOQ odpovídá poměru signálu k šumu rovnému 10. Experimentálně jsem tyto hodnoty neověřovala, jelikož odpovídaly nejnižším měřeným koncentracím kalibrační přímky. U pyridinu byly zjištěny tyto hodnoty: LOD = 0,06 µg/ml a LOQ = 0,21 µg/ml. U isochinolinu byl stanoven LOD = 0,02 µg/ml a LOQ = 0,07 µg/ml.

5.2.4. Koncentrační závislost 1-dodecylpyridinium bromidu (DP)

V grafu je uvedena závislost plochy píku DP na koncentraci vzorku. Hodnoty koncentrací neodpovídají skutečné měřené koncentraci DP, ale vzorku obsahujícímu kromě DP i malé množství pyridinu (viz kapitola 5.4) jako nečistotu. Měření probíhalo při vlnové délce 254 nm.



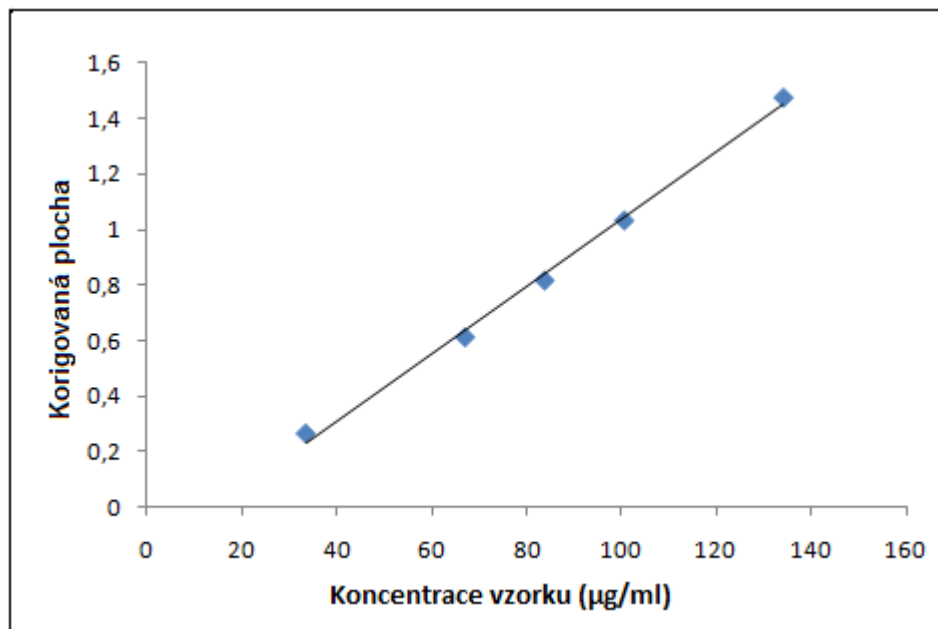
Obr. 27: Koncentrační závislost DP

rovnice přímky: $y = 0,141 x - 0,548$

korelační koeficient: 0,9956

5.2.5. Koncentrační závislost 2-dodecylisochinolinium bromidu (DI)

V grafu je uvedena závislost plochy píku DI na koncentraci vzorku. Hodnoty koncentrací neodpovídají skutečné měřené koncentraci DI, ale vzorku obsahujícímu kromě DI i malé množství isochinolinu (viz kapitola 5.4) jako nečistotu. Měření probíhalo při vlnové délce 210 nm.



Obr. 28: Koncentrační závislost DI

rovnice přímky: $y = 0,0121 x - 0,1704$

korelační koeficient: 0,9962

5.3. Opakovatelnost metody

Za účelem ověření opakovatelnosti metody jsem provedla 4 měření s měrným roztokem o koncentraci 0,1 mg/ml DP; 0,1 mg/ml DI a 0,05 mg/ml imidazolu jakožto vnitřního standardu. Směrodatnou odchylku s a relativní směrodatnou odchylku RSD jsem spočítala podle vzorce uvedeného v kapitole Výpočetní postupy. V tabulce 6 je uvedena opakovatelnost migračních časů a ploch píků.

Tab. 6: Opakovatelnost migračních časů a ploch píků při koncentraci 0,1 mg/ml

	Migrační čas (min)			Poměr ploch analyt/IS		
	průměrná hodnota (min)	s	RSD(%)	průměrná hodnota	s	RSD(%)
pyridin	3,69	0,0594	1,61	0,08106	0,00162	2,0
isochinolin	3,91	0,0649	1,66	0,2434	0,00233	0,96
DP	4,34	0,076	1,76	0,4121	0,006136	1,49
DI	4,53	0,086	1,91	2,0541	0,03137	1,53

Relativní směrodatná odchylka migračních časů se pohybuje v rozmezí 1,61 až 1,91% a pro plochy analytů nabývá relativní směrodatná odchylka hodnot 0,96 až 2,0%.

5.4. Stanovení obsahu nečistoty ve vzorku

Obsah nečistoty ve vzorku se stanoví z poměru koncentrace neznámé látky a koncentrace známého standardu o známé koncentraci a z poměru korigované plochy neznámého vzorku a korigované plochy standardu.

Ze zásobního roztoku vzorku DP o koncentraci 1,025 mg/ml jsem připravila měrný roztok o koncentraci 0,0513 mg/ml s přidavkem vnitřního standardu o koncentraci 0,0508 mg/ml. Tento roztok jsem proměřila 5 krát. Ze zásobního standardního roztoku pyridinu o koncentraci 1,0415 mg/ml jsem připravila měrný roztok standardu o koncentraci $3,6453 \cdot 10^{-3}$ mg/ml s vnitřním standardem o koncentraci 0,0508 mg/ml a změřila ho taktéž 5 krát.

V případě DI jsem připravila zásobní roztok o koncentraci 1,012 mg/ml a z něj pak měrný roztok 0,1012 mg/ml. Měrný roztok obsahoval 0,0508 mg/ml IS. Ze zásobního standardního roztoku isochinolinu o koncentraci 0,9981 mg/ml jsem připravila měrný roztok standardu o koncentraci $3,9924 \cdot 10^{-3}$ mg/ml, který také obsahoval 0,0508 mg/ml IS. Také tyto měrné roztoky byly změřeny 5 krát.

Procentuální zastoupení nečistoty ve vzorku bylo vypočteno podle vztahů v kapitole 4.4.8.

Tab.7: Procentuální zastoupení nečistot ve vzorcích

	1	2	3	4	5	průměr %	SD	RSD (%)
% nečistoty isochinolinu v DI	0,300	0,319	0,323	0,330	0,332	0,321	0,011	3,556
% nečistoty pyridinu v DP	0,711	0,662	0,691	0,666	0,653	0,677	0,024	3,523

5.5. Správnost metody

Ověření správnosti metody představuje závěrečný validační test při vývoji analytické metody. Toto stanovení bylo provedeno metodou standardního přídávku, kdy byl změřen vzorek o předem stanovené koncentraci po přidání přesně známého množství standardu. Tato hodnota byla následně porovnána s měřením samotného vzorku bez přídávku. Hodnoty recovery by se měly pohybovat v rozmezí +/- 5% od 100%. Při ověřování správnosti metody bohužel nebylo dosaženo uspokojivých výsledků. Hodnota vyjadřující správnost metody pro stanovení pyridinu je 104,95%, RSD = 4,61% a je tedy ještě vyhovující. Průměrná hodnota metody pro stanovení isochinolinu ale činí 115,47 %, RSD = 3,65%.

Tab. 8: Ověření správnosti metody

	1	2	3	4	5	průměr	SD	RSD (%)
správnost metody pro stanovení isochinolinu (%)	111,30	120,35	112,68	112,16	120,86	115,47	4,219	3,654
správnost metody pro stanovení pyridinu (%)	104,66	101,25	105,97	113,44	99,44	104,952	4,841	4,613

6. Závěry

Z výsledků této práce vyplývají následující závěry:

- Pomocí kapilární zónové elektroforézy byly analyzovány směsi obsahující pyridin, isochinolin, 1-dodecylpyridinium bromid a 2-dodecylisochinolinium bromid.
- Při hledání optimálních podmínek separace bylo vyzkoušeno několik typů pracovních elektrolytů, nejlépe se osvědčil acetátový pufr. Dále byl testován vliv pH (3,7 až 5,7) a koncentrace elektrolytu (30 až 110 mM), vliv přídatku methanolu (5 až 20% v/v).
- Optimální složení pracovního elektrolytu je: 70 mM kyselina octová, 5% MeOH, pH 4,7 (upraveno NaOH).
- Jako vnitřní standard byl použit imidazol v koncentraci 0,05 mg/ml.
- Separace probíhala v křemenné kapiláře o vnitřním průměru 75 μm , celkové délce 58 cm a efektivní délce 49,5 cm. Vložené napětí bylo 20 kV a kapilára byla termostatována na teplotu 25 $^{\circ}\text{C}$. Vzorky byly dávkovány hydrodynamicky tlakem 50 mbar po dobu 6 s. Detekce probíhala při vlnových délkách 210 nm a 254 nm.
- Kalibrační závislosti byly měřeny metodou s vnitřním standardem. Koncentrační rozmezí měřené pro pyridin bylo 0,104 – 10,415 $\mu\text{g/ml}$, korelační koeficient byl 0,9988. Pro isochinolin byla změřena kalibrační závislost pro koncentrace 0,100 – 9,981 $\mu\text{g/ml}$ a korelační koeficient byl 0,9972.
- Limit detekce pro pyridin byl 0,06 $\mu\text{g/ml}$ a pro isochinolin 0,02 $\mu\text{g/ml}$.
- Opakovatelnost metody byla ověřena pro koncentrace pyridinu 9,56 $\mu\text{g/ml}$, isochinolinu 6,56 $\mu\text{g/ml}$, pro přibližnou koncentraci 1-dodecylpyridinium bromidu 0,1 mg/ml a 2-dodecylisochinolinium bromidu 0,1 mg/ml. Relativní směrodatné odchylky ($n = 4$) byly: 1,61%; 1,66%; 1,76% a 1,91% (pro migrační časy) a 2,0%; 0,96%; 1,49%; a 1,53% (pro poměry ploch píků).
- Průměrný migrační čas pyridinu byl 3,69 min, isochinolinu 3,91 min, 1-dodecylpyridinium bromidu 4,34 min a 2-dodecylisochinolinium bromidu 4,53 min. IS migroval jako první v čase 3,06 min.

- Rozlišení mezi jednotlivými píky byla v rozmezí 1,72 – 8,65. Počet teoretických pater se pohyboval mezi 25 445 – 43 415.
- Vypracovaná metoda byla použita ke stanovení obsahu nečistot ve vzorcích kvartérních amoniových sloučenin. Nečistota ve vzorku 1-dodecylpyridinium bromidu tvoří 0,677%, RSD = 3,52%. Vzorek 2-dodecylisochinolinium bromidu obsahoval 0,32% isochinolinu, RSD = 3,56%.
- Správnost metody byla ověřena metodou analýzy vzorku s přidavkem standardních látek. Hodnota recovery pro stanovení pyridinu je 104,95% a vyhovuje požadovanému rozmezí, recovery pro isochinolin dosahuje hodnoty 115,5%.

7. Seznam použitých zkratk

BGE	základní elektrolyt
CEC	kapilární elektrochromatografie
CGE	kapilární gelová elektroforéza
CIEF	kapilární izoelektrická fokusace
CITP	kapilární izotachoforéza
CZE	kapilární zónová elektroforéza
DAD	detektor s diodovým polem
DI	2 – dodecylisochinolinium bromid
DP	1 – dodecylpyridinium bromid
EOF	elektroosmotický tok
HPCE	vysokoučinná kapilární elektroforéza
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
ID	vnitřní průměr
IS	vnitřní standard
MEKC	micelární elektrokinetická chromatografie
MeOH	methanol
MF	mobilitní fáze
MS	hmotnostní spektrometrie
NaOH	hydroxid sodný
PEG	polyethylenglykol
t_m	migrační čas

8. Seznam literatury

- 1) Elektroforéza. Dostupné z <http://en.wikipedia.org/wiki/Electrophoresis>, datum náhledu 22.4.2011.
- 2) Gaš, B. Kapilární elektroforéza – Separační analytická metoda pro věk mikročipů, In *Vesmír*, 2001, roč. 80, č. 7, s. 370-372.
- 3) Westermeier, R. *Electrophoresis in practice*. 4. vydání. Weinheim: Wiley-VCH, 2005. 120 s. ISBN 3-527-31181-5. Dostupné z http://www.google.com/books?hl=cs&lr=&id=Q9WhXKwT6c0C&oi=fnd&pg=PP15&dq=Westermeier+Electrophoresis+in+Practice&ots=aCl5kMehSy&sig=SqmF3Up_-YqEh-A8cRaFuZs149E#v=onepage&q&f=false, datum náhledu: 22.4.2011.
- 4) Český lékopis 2009. Praha: Grada Publishing, 2009. 3968 s. ISBN 978-80-247-2994-7. s. 138-143.
- 5) Pavonič, M. Možnosti využití metod kapilární elektroforézy pro analýzu malých iontů ve vodách. 1. vydání. Praha: Výzkumný ústav vodohospodářský T. G. Masaryka, 2002. 80 s. ISBN 80-85900-45-9.
- 6) Kašička, V. Teoretické základy a separační principy kapilárních elektromigračních metod. In *Chemické listy*, 1997, roč. 91, č. 5, s. 320-329.
- 7) Dolník, V. Úvod do kapilární elektroforézy. 1. vydání. Brno: AV ČR a společnost Chromspec s.r.o., 1994. 67 s.
- 8) Klouda, P. *Moderní analytické metody*. 1. vydání. Ostrava: Nakladatelství Pavel Klouda, 1996. 203 s. ISBN 80-902155-0-5.
- 9) Pavlíková, L., Brozmanová, H., Kvasnička, F., Grundmann, M. Terapeutické monitorování léků pomocí elektromigračních metod. In *Klinická farmakologie a farmacie*, 2007, roč. 21, č. 2, s. 79-83.
- 10) Plaček, L. *Základy kapilární elektroforézy*. Dostupné z http://placek.lukas.sweb.cz/pdf_soubory/CEzakl.pdf, datum náhledu 3.5.2011.
- 11) Churáček, J. et al. *Nové trendy v teorii a instrumentaci vybraných analytických metod*. Praha: Akademia, 1993. 387 s. ISBN 80-200-0010-0.
- 12) Jouleovo teplo. Dostupné z http://en.wikipedia.org/wiki/Joule_heating, datum náhledu 25.4.2011.
- 13) Khaledi, M. G. *High performance capillary electrophoresis*. 2. vydání. USA: John Wiley and Sons, Inc., 1998. 1047 s. ISBN 0-471-14851-2.

- 14) Marina, M. L., Ríos, A., Valcárcel, M. Analysis and detection by capillary electrophoresis. 1. vydání. Amsterdam: Elsevier, 2005. 767 s. ISBN 0-444-517118-9.
- 15) Červinková, J., Ježková, Z. Kapilární zónová elektroforéza. Praha, 2006 dostupné z <http://old.mssch.cz/clanky/files/1168936400.cervjezk.pdf.pdf>, datum náhledu: 10.4.2011.
- 16) Elektroforéza. Dostupné z <http://biochemie.sweb.cz/x/metody/elektroforeza.htm>, datum náhledu 28.4.2011.
- 17) Štulík, K. et al. Analytické separační metody. 1. vydání. Praha: Karolinum, 2004. 264 s. ISBN 80-246-0852-9. s. 180-208.
- 18) Lauer, H. H., Rozing, G. P. High performance capillary electrophoresis. 2. vydání. Německo: Agilent Technologies, 2010. 174 s.
- 19) Kvartérní amoniové sloučeniny. Dostupné z <http://www.answers.com/topic/quaternary-ammonium-compound>, datum náhledu 6.5.2011.
- 20) Online databáze chemikálií. Dostupné z <http://www.chemblink.com/products/104-73-4.htm>, datum náhledu 3.5.2011.
- 21) Databáze chemikálií. Dostupné z http://www.chemicalbook.com/ProductChemicalPropertiesCB0506360_EN.htm, datum náhledu 3.5.2011.
- 22) Wikipedia: The free Encyklopedia. Dostupné z <http://en.wikipedia.org/wiki/Pyridine>, datum náhledu 3.5.2011.
- 23) Saha, S., Mistri, R., Ray, B. C. Determination of pyridine, 2-picoline, 4-picoline and quinoline from mainstream cigarette smoke by solid-phase extraction liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. In *Journal of Chromatography A*, 2010, roč. 3, č. 1217, s. 307-311.
- 24) Wikipedia: The free Encyklopedia. Dostupné z <http://en.wikipedia.org/wiki/Isoquinoline>, datum náhledu 3.5.2011.
- 25) Kočí, K. Separace azaarenů vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií. Disertační práce, 2008. Dostupné z http://www.vutbr.cz/www_base/zav_prace_soubor_verejne.php?file_id=10989
- 26) Steinheimer, T. R. Determination of Selected Azaarenes in Water by

Bonded-Phase Extraction and Liquid Chromatography. In *Analytical Chemistry*, 1986, roč. 58, str. 1839-1844.

27) Bednář, P. Selektivita v kapilární elektroforéze. Habilitační práce, 2005.

Dostupné z http://www.prf.upol.cz/fileadmin/user_upload/PrF-dokumenty/Vedecka_rada/Habilitace_a_profesury/ukon_hab_prof/Bednar_Petr/hab.prace-Bednar.pdf

Zdroje obrázků:

Obr. 1 Schéma zařízení pro kapilární elektroforézu. Dostupné z

http://www.google.cz/imgres?imgurl=http://elchem.kaist.ac.kr/vt/chem-ed/sep/electrop/graphics/cap-elec.gif&imgrefurl=http://elchem.kaist.ac.kr/vt/chem-ed/sep/electrop/cap-el.htm&usq=__oyKonJ1D0rGA-w4DXkSy_q4eqn8=&h=225&w=272&sz=5&hl=cs&start=0&zoom=1&tbnid=q2z14xXMqljyM:&tbnh=150&tbnw=181&ei=vQ3FTf00O5GBswbB59WBDw&prev=/search%3Fq%3Dcapillary%2Belectrophoresis%26hl%3Dcs%26biw%3D1276%26bih%3D627%26gbv%3D2%26tbnid%3Ddisch&itbs=1&iact=hc&vpx=812&vpy=98&dur=2908&hovh=180&hovw=217&tx=115&ty=81&page=1&ndsp=15&ved=1t:429,r:3,s:0

Obr. 2 Vznik elektroosmotického toku. Dostupné z

http://www.google.cz/imgres?imgurl=http://chemwiki.ucdavis.edu/%40api/deki/files/3844/%3DCapillarywall.gif&imgrefurl=http://chemwiki.ucdavis.edu/index.php%3Ftitle%3DWikitexts/UCD_Chem_115_Lab_Manual/Lab_6:Capillary_Electrophoresis%26bc%3D0&usq=__W3R3YrT6CoqQ0YMJ004hozczH0Mc=&h=217&w=436&sz=7&hl=cs&start=49&zoom=1&tbnid=sMbzMl3JBhP5LM:&tbnh=89&tbnw=179&ei=6JFTZjIM4jBswbYx-WMDw&prev=/search%3Fq%3Delectroosmotic%2Bflow%26hl%3Dcs%26biw%3D1276%26bih%3D627%26gbv%3D2%26tbnid%3Ddisch0%2C1263&itbs=1&iact=hc&vpx=286&vpy=358&dur=10283&hovh=158&hovw=318&tx=158&ty=98&page=4&ndsp=20&ved=1t:429,r:1,s:49&biw=1276&bih=627

Obr. 3 Působení EOF na migraci iontů a neutrálních molekul. Dostupné z

<http://www.pragolab.eu/clanek/127/kapilarni-elektroforeza-1-cast-princip>

Obr. 4 Struktura cyklodextrinu α , β a γ . Dostupné z

http://www.google.cz/imgres?imgurl=http://www.pragolab.eu/uploads/assets/PrinCE/serial_o_CE/obr19.jpg&imgrefurl=http://www.pragolab.eu/clanek/131/kapilarni-elektroforeza-4-cast-rozdeleni-kapilarnich-technik-chiralni-separace&usq=__2vwKhLssDgiEn-w3uk0P-2nOtHY=&h=201&w=628&sz=20&hl=cs&start=18&zoom=1&tbnid=EilhC8FX2jRpQM:&tbnh=59&tbnw=185&ei=GlFgTYLbKozHsqafio2FDw&prev=/search%3Fq%3Dcyklodextriny%26hl%3Dcs%26biw%3D1276%26bih%3D627%26gbv%3D2%26tbnid%3Ddisch0%2C470&itbs=1&iact=hc&vpx=795&vpy=178&dur=5299&hovh=127&hovw=397&tx=219&ty=48&page=2&ndsp=18&ved=1t:429,r:4,s:18&biw=1276&bih=627

Obr. 5 Princip separace v CZE. Dostupné z

http://www.google.cz/imgres?imgurl=http://physicalchemistryresources.com/Book3_sections/E_Theory%2520of%2520Capillary%2520Electrophoresis_html_files/image014.jpg&imgrefurl=http://physicalchemistryresources.com/Book3_sections/E_Theory%2520of%2520Capillary%2520Electrophoresis_html_web.htm&usq=__i3hR0PXCWO33xKWnXlxtJihliRU=&h=425&w=410&sz=24&hl=cs&start=0&zoom=1&tbnid=NTFY9zi096mjmM:&tbnh=167&tbnw=165&ei=s-bGTfDdNcXLtAaOlt36Dg&prev=/search%3Fq%3Dseparation%2Bin%2Bcapillary%2Belectrophoresis%26hl%3Dcs%26biw%3D1276%26bih%3D627%26tbnid%3Ddisch&itbs=1&iact=rc&dur=417&page=1&ndsp=20&ved=1t:429,r:12,s:0&tx=90&ty=58

Obr. 6 Izotachoforetická separace směsi tří aniontů. Dostupné z

http://physicalchemistryresources.com/Book4_sections/IS_The%20Basic%20Principal%20of%20Isotachophoresis_IS.htm

Obr. 7 Kvartérní amonný kationt. Dostupné z

http://en.wikipedia.org/wiki/Quaternary_ammonium_cation

Obr. 8 1-dodecylpyridinium bromid. Dostupné z

<http://www.chemblink.com/products/104-73-4.htm>

Obr. 9 2-dodecylisochinolinium bromid. Dostupné z

http://www.chemicalbook.com/ProductChemicalPropertiesCB0506360_EN.htm

Obr. 10 Kapilární elektroforetický systém Agilent CE 7100. Dostupné z

<http://www.chem.agilent.com/Library/datasheets/Public/5990-3962EN.pdf>