

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra fyzikální a makromolekulární chemie

---

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Chemie v přírodních vědách



Magda Ördögová

## Interakce pesticidů – kyseliny 1-naftyloctové a 1-naftylacetamidu – s cucurbit[7]urilem a vybranými cyklodextriny

Interaction of pesticides – 1-naphthylacetic acid and  
1-naphthylacetamide – with cucurbit[7]uril and selected cyclodextrins

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: Mgr. Pavel Dubský, Ph.D.

Konzultanti: prof. RNDr. Bohuslav Gaš, CSc.

Mgr. Ludmila Müllerová

Praha 2013

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně citovala všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci mimo Univerzitu Karlovu v Praze, je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 25. května 2013.

.....

podpis

## Poděkování

Ráda bych poděkovala svému školiteli Mgr. Pavlovi Dubskému, Ph.D. za ochotný a trpělivý přístup při vedení mé práce, Prof. RNDr. Bohuslavu Gašovi, CSc. za možnost pracovat v jeho výzkumné skupině a Mgr. Ludmile Müllerové za významnou pomoc a rady.

Zároveň děkuji i všem ostatním kolegům z pracovní skupiny za ochotu a skvělé pracovní prostředí.

Poděkování patří i mým rodičům za vytrvalou podporu při studiu na vysoké škole.

## **Abstrakt**

Předkládaná práce posuzuje a porovnává interakci 1-naftyloctové kyseliny a 1-naftylacetamidu s vybranými komplexujícími látkami. 1-naftyloctová kyselina a 1-naftylacetamid nacházejí použití jako pesticidy. Z ekologického hlediska je zajímavá možnost regulace rozkladu obou látek na denním světle, která může být zajištěna například jejich interakcí s různými komplexujícími látkami. Jako komplexující látky byly zvoleny cyklodextriny známé svou schopností interagovat se širokým spektrem látek. Dále byl zvolen cucurbit[7]uril, jehož interakce může být podle literatury silnější než v případě cyklodextrinů.

Interakce byly studovány metodou afinitní kapilární zónové elektroforézy. Byla porovnána síla jednotlivých interakcí a pro ty systémy, kde to bylo možné, byla stanovena hodnota zdánlivé konstanty stability vznikajícího komplexu.

## **Abstract**

This work evaluates and compares interaction of 1-naphthylacetic acid and 1-naphthylacetamide with selected complexing agents. 1-naphthylacetic acid and 1-naphthylacetamide are used as pesticides. From the viewpoint of ecology, the possibility of regulation of the photodecomposition of these pesticides is interesting. Such regulation could be achieved by complexation. Cyclodextrins, known for their good capability of interaction with wide spectrum of substances, were chosen as the complexing agents. Another chosen complexing agent was cucurbit[7]uril that, according to literature, could be capable of even stronger interaction than cyclodextrins.

Interactions were studied by affinity capillary zone electrophoresis. The strenght of particular interactions was compared and the stability constants of the complexes were determined, if possible.

# Obsah

1	Teoretický úvod.....	8
1.1	Kyselina 1-naftyloctová a 1-naftylacetamid .....	8
1.2	Látky tvořící inkluzní komplexy.....	8
1.3	Kapilární zónová elektroforéza.....	13
1.4	Stanovení konstant stability kapilární zónovou elektroforézou.....	17
1.5	Použití komplexačních činidel v CZE .....	19
2	Cíle práce.....	21
3	Experimentální část.....	22
3.1	Použité chemikálie .....	22
3.2	Instrumentace.....	22
3.3	Základní elektrolyt.....	24
3.4	Vzorky .....	25
3.5	Vyhodnocování dat .....	25
4	Výsledky a diskuze.....	26
4.1	Systémy s nativními CD .....	26
4.2	Systém s 6-monodeoxy-6-monoamino- $\beta$ -CD.....	30
4.3	Systém s cucurbit[7]urilem.....	32
4.4	Srovnání interakcí pro jednotlivé selektory .....	35
5	Závěr.....	36
	Reference.....	37

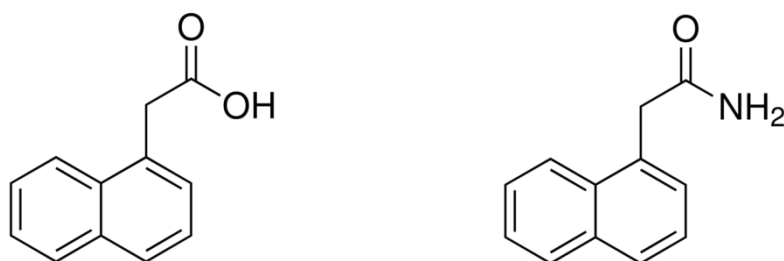
## Použité zkratky a symboly

- 1-NAA – 1-naftyloctová kyselina  
1-NAAm – 1-naftylacetamid  
 $a_i$  – aktivita látky  $i$   
BGE – základní elektrolyt (*background electrolyte*)  
 $c$  – molární koncentrace  
CD – cyklodextrin  
CB – cucurbituril  
CB[ $n$ ] – cucurbit[ $n$ ]uril  
 $E$  – velikost intenzity elektrického pole  
EMD – elektromigrační disperze  
EOF – elektroosmotický tok (*electroosmotic flow*)  
 $\gamma_i$  – aktivitní koeficient látky  $i$   
 $\Delta_r G^\ominus$  – molární reakční Gibbsova energie  
HVL funkce – Haarhoffova – Van der Lindeho funkce  
 $I$  – iontová síla  
 $K$  – rovnovážná konstanta  
 $K'$  – zdánlivá rovnovážná konstanta  
 $\kappa$  – vodivost BGE  
 $l_D$  – délka kapiláry k detektoru  
 $l_C$  – celková délka kapiláry  
mAU – absorpční jednotka (*miliabsorption unit*)  
 $\mu_i$  – elektroforetická mobilita látky  $i$   
 $\mu_{eff}$  – efektivní elektroforetická mobilita  
 $\mu_{EOF}$  – mobilita elektroosmotického toku  
 $R$  – molární plynová konstanta ( $R = 8,314\ 462\ \text{J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$ )  
 $S_i$  – *relative velocity slope* látky  $i$   
 $t$  – migrační čas  
 $t_{EOF}$  – migrační čas EOF  
 $T$  – termodynamická teplota  
Tris – 2-amino-2-hydroxymethyl-propan-1,3-diol  
 $v$  – rychlost  
 $U$  – elektrické napětí  
 $x_i$  – molární zlomek látky  $i$   
 $z_i$  – nábojové číslo částice  $i$

# 1 Teoretický úvod

## 1.1 Kyselina 1-naftyloctová a 1-naftylacetamid

1-naftyloctová kyselina (1-NAA) a její derivát 1-naftylacetamid (1-NAAm) (Obrázek 1) se hojně využívají v oblasti agrochemie jako pesticidy a také jako regulátory růstu rostlin (zabraňují předčasnému padání nedozrálých plodů) [1,2]. Oba dva pesticidy podléhají v roztoku fotolýze; například 1-NAA se kompletně rozloží po čtyřech dnech vystavení slunečnímu záření [2]. Z ekologického hlediska je zajímavá možnost regulace rozkladu obou látek na denním světle. Taková regulace může být zajištěna například interakcí uvedených pesticidů s různými komplexujícími látkami [3].



Obrázek 1: 1-naftyloctová kyselina a 1-naftylacetamid

## 1.2 Látky tvořící inkluzní komplexy

Jako inkluzní sloučeniny (také *host-guest* komplexy) jsou označovány krystaly tvořené dvěma částmi: hostitelskou (*host*) a hostující (*guest*) molekulou. Jejich vzájemná asociace se od jiných komplexů liší ve dvou zásadních věcech: v geometrii a typu vazby [4].

- i) Hostující molekula je uzavřena v kavitě, která je součástí molekulární struktury hostitelské molekuly.
- ii) *Host-guest* asociace není zajištěna kovalentní nebo iontovou vazbou; na její tvorbě se mohou podílet vodíkové vazby, Van der Waalsovy interakce nebo disperzní síly.

V roztoku se vždy ustanoví dynamická rovnováha mezi komplexem (CA), volným komplexačním činidlem (C) a volnou hostující látkou (A). Ta je popsána následující rovnicí (pokud komplexace probíhá v poměru 1:1) [5]:



Pro tuto interakci je možné vyjádřit termodynamickou rovnovážnou konstantu  $K$ :

$$K = \frac{a_{CA}}{a_A a_C} \quad (2)$$

kde  $a_i$  jsou aktivity jednotlivých složek, definované výrazem:

$$a_i = x_i \gamma_i \quad (3)$$

$x_i$  je molární zlomek  $i$ -té složky a  $\gamma_i$  je aktivní koeficient  $i$ -té složky. Aktivní koeficient iontu je možné určit například z rozšířeného Debye-Hückelova zákona:

$$\log \gamma_{\pm} = -\frac{A|z_+ z_-| \sqrt{I}}{1 + B \sqrt{I}} + CI \quad (4)$$

kde  $A$ ,  $B$  a  $C$  jsou konstanty,  $z_i$  jsou nábojová čísla a  $I$  je iontová síla roztoku.

Závislost rovnovážné konstanty na teplotě je popsána rovnicí:

$$K = e^{-\frac{\Delta_r G^\ominus}{RT}} \quad (5)$$

Kde  $\Delta_r G^\ominus$  je standardní reakční Gibbsova energie,  $R$  je molární plynová konstanta a  $T$  je termodynamická teplota.

Rovnovážná konstanta  $K$  reakce popsané rovnicí (1) je konstantou stability pro daný komplex (*complex stability constant*, v literatuře se též označuje jako *complexation constant*, *binding constant*, *association constant*, *affinity constant*) [6].

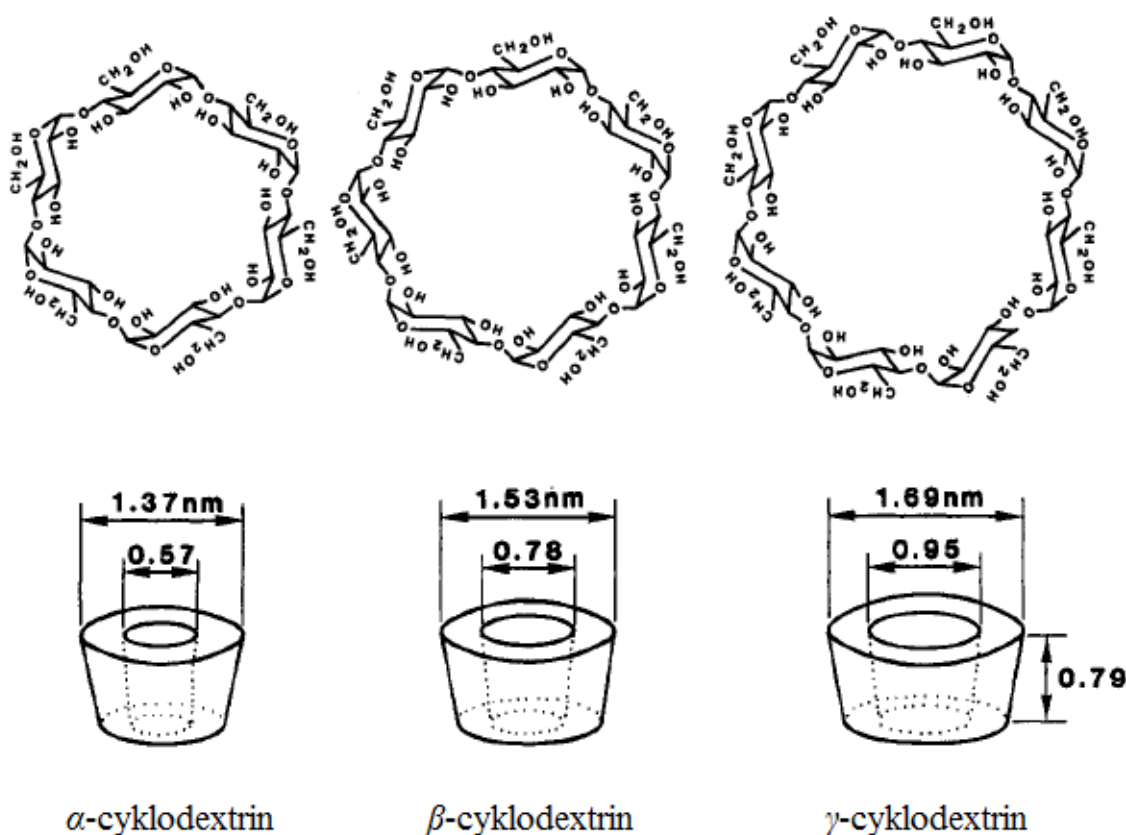
V praxi se místo termodynamické konstanty často používá zdánlivá rovnovážná konstanta  $K'$ , kde jsou aktivity nahrazeny rovnovážnými koncentracemi jednotlivých forem (označeny v hranatých závorkách). Zdánlivá rovnovážná konstanta je platná pouze za podmínek, při kterých byla stanovena. Aktivity lze s rovnovážnými koncentracemi ztotožnit v případě, že se aktivní koeficienty zúčastněných složek blíží jedné, což obecně platí ve velmi zředěných roztocích.

$$K' = \frac{[CA]}{[C][A]} \quad (6)$$

## Cyklodextriny

Cyklodextriny (CD) jsou makromolekuly, které jsou dobře známé pro svou schopnost tvořit komplexy s širokým spektrem jiných molekul. Poprvé byly připraveny v roce 1891, ale detailně popsány a studovány byly až po roce 1903 F. Schardingerem [7].

Jedná se o cyklické oligosacharidy, které mohou být složeny z 6–50 glukopyranózových (glc) jednotek [8]. Nejběžnější a nejpoužívanější jsou ale tři základní typy,  $\alpha$ -CD (6 glc),  $\beta$ -CD (7 glc) a  $\gamma$ -CD (8 glc). Všechny glukopyranózové jednotky mají stejnou židličkovou konformaci a jsou propojené  $\alpha$ -1,4 vazbou. V důsledku toho mají  $\alpha$ -,  $\beta$ - a  $\gamma$ -CD tvar komolého kužele. Jejich strukturu ukazuje Obrázek 2.



**Obrázek 2:** Strukturální vzorec a ilustrace kónického tvaru –  $\alpha$ -,  $\beta$ - a  $\gamma$ -CD. Převzato a upraveno z [9].

Počet glukopyranózových jednotek zároveň určuje i velikost kavity daného CD. Vnitřní povrch kavity je hydrofobní, zatímco vnější povrch cyklodextrinu je spíše hydrofilní. Sekundární hydroxylové skupiny sousedních uhlíků jsou propojeny vodíkovými vazbami, což zvyšuje stabilitu cyklodextrinů. V  $\beta$ -CD tvoří vodíkové vazby komplexní pás po obvodu celé molekuly, čímž  $\beta$ -CD získává extrémně pevnou strukturu. Tím se také vysvětluje nejnižší rozpustnost  $\beta$ -CD ve vodě mezi cyklodextriny. Naproti tomu, v  $\alpha$ -CD je pás nekompletní, protože jedna glukózová jednotka je oproti ostatním pootočená.  $\gamma$ -CD má nejflexibilnější

strukturu, proto je také nejlépe rozpustný ze všech tří CD. Cyklodextriny jsou stabilní v alkalickém prostředí, v kyselém prostředí podléhají hydrolyze, nicméně za normálních experimentálních podmínek ( $\text{pH} > 3,5$ , teplota  $< 60\text{ }^\circ\text{C}$ ) zůstávají stabilní. Jsou rovněž odolné proti rozkladu na světlo, včetně UV a IR záření. Tabulka 1 ukazuje některé základní charakteristiky cyklodextrinů.

**Tabulka 1:** Přehled některých charakteristik  $\alpha$ -,  $\beta$ - a  $\gamma$ -CD [7].

	$\alpha$ -CD	$\beta$ -CD	$\gamma$ -CD
<b>počet glc jednotek</b>	6	7	8
<b>molární hmotnost <math>M</math></b>	972	1135	1297
<b>rozpuštěnost ve vodě [mM]</b>	149,2	16,3	178,9
<b>vnitřní průměr kavity [Å]</b>	4,7 – 5,3	6,0 – 6,5	7,5 – 8,3
<b>hloubka kavity [Å]</b>	7,9 $\pm$ 0,1	7,9 $\pm$ 0,1	7,9 $\pm$ 0,1
<b>přibližný objem kavity [Å<sup>3</sup>]</b>	174	262	427

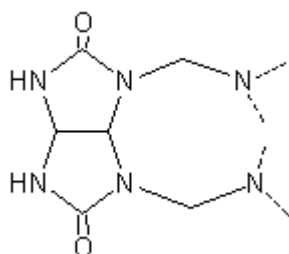
Ve vodném roztoku je hydrofobní kavita cyklodextrinu obsazena molekulami vody, což je energeticky nevýhodné. Proto mohou cyklodextriny snadno přijmout do své kavity jinou molekulu, která je méně polární než voda. Komplexace však nezávisí jen na polaritě hostující molekuly, je ovlivněna také vznikem vodíkových vazeb mezi hydroxylovými skupinami cyklodextrinu a nabitými funkčními skupinami hostujících molekul. Dalším faktorem, který přispívá ke stabilitě výsledného komplexu, je sterické hledisko. Příliš malé molekuly mohou kavitu snadněji opustit a naopak příliš velké molekuly interagují s CD pouze částečně, kavitu obsadí jen některé funkční skupiny nebo postranní řetězce. Stabilita komplexu také výrazně závisí na teplotě, jak vyplývá z rovnice (5).

Schopnost cyklodextrinů interagovat s hostujícími látkami je možné zlepšit také chemickou modifikací samotného CD. Derivatizováním cyklodextrinů se mohou rovněž významně změnit jejich další vlastnosti, jako rozpustnost, reaktivita, elektrochemické nebo spektrální vlastnosti.

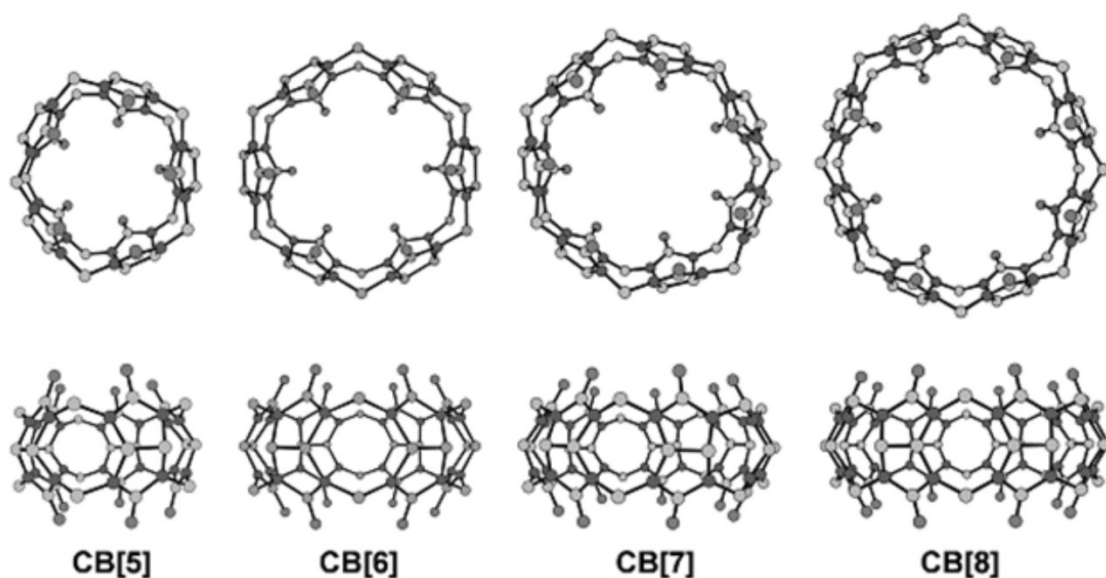
V analytické chemii i v průmyslu mají cyklodextriny a jejich deriváty široké použití, protože komplexace s CD často výrazně ovlivňuje určité vlastnosti hostující látky (rozpuštěnost, chemickou reaktivitu, difúzní koeficient, spektrální vlastnosti). Kvůli svým vlastnostem jsou CD hojně využívány při separacích, v chromatografických a elektrokinetických metodách [7, 9].

## Cucurbiturily

Cucurbiturily (CB) jsou makrocyclické sloučeniny, které bývají často srovnávány s cyklodextriny kvůli své schopnosti vytvářet komplexy s jinými látkami [10]. Jsou tvořeny glykolurilovými skupinami, které jsou navzájem propojeny dvěma methylenovými můstky. Na rozdíl od cyklodextrinů nemají cucurbiturily kónický tvar, ale tvoří symetrický prstenec; jejich tvar bývá přirovnáván k dýni, z čehož také pochází jejich název (čeleď *tykvovité*, lat. *cucurbitaceae*). Monomerní jednotku cucurbiturilu i strukturní vzorce homologů ukazují Obrázky 3 a 4. V názvech jednotlivých homologů se počet glykolurilových jednotek uvádí v hranatých závorkách, například cucurbit[7]uril, CB[7].



**Obrázek 3:** Monomerní jednotka cucurbiturilu – glykoluril se dvěma methylenovými můstky.



**Obrázek 4:** Strukturní vzorce jednotlivých homologů CB[5] – CB[8]. Převzato z [11].

Cucurbit[6]uril byl poprvé připraven v roce 1905 R. Behrendem [12], chemie CB se však začala výrazněji rozvíjet až v devadesátých letech 20. století, v návaznosti na syntézu nových

homologů CB[5], CB[7], CB[8] a CB[10]•CB[5]. Přestože konstanty stability komplexů s CB jsou často o několik řádů vyšší, než konstanty pro komplexy s CD, nebyly CB dlouhou dobu považovány za lukrativní molekuly.

CB jsou všeobecně špatně rozpustné ve vodě, CB[6] a CB[8] jsou prakticky nerozpustné (rozpustnost < 0,02 mM). Rozpustnost CB se však dramaticky zvyšuje v koncentrovaných roztocích kyselin. Kyslíky tvořící vstup do kavity CB nesou parciální záporný náboj. Proto CB, na rozdíl od CD, preferují interakci s kationickými hostujícími molekulami. V Tabulce 2 jsou uvedeny některé základní vlastnosti jednotlivých homologů CB.

**Tabulka 2:** Základní charakteristiky známých homologů CB [10].

	CB[5]	CB[6]	CB[7]	CB[8]	CB[10]
<b>molární hmotnost <math>M</math></b>	830	996	1163	1329	1661
<b>rozpustnost ve vodě [mM]</b>	20 - 30	0,018	20 - 30	< 0,01	-
<b>vnitřní průměr kavity [Å]</b>	2,4	3,9	5,4	6,9	9,0 - 11,0
<b>hloubka kavity [Å]</b>	9,1	9,1	9,1	9,1	9,1
<b>přibližný objem kavity [Å<sup>3</sup>]</b>	82	164	279	479	-

CB vytvářejí s hostujícími molekulami komplexy v poměru 1 : 1 nebo 1 : 2 (CB : hostující látka). U některých CB byla také pozorována schopnost tvořit v roztoku agregáty (dimery, trimery) [13].

Cucurbiturily jsou dnes využívány v chemické katalýze, v oblasti nanostruktur a molekulárních strojů a také v biochemii, ke komplexaci DNA [10]. Jiná literatura dokládá i jejich použití jako selektory v kapilární elektroforéze [14] (viz dále).

### 1.3 Kapilární zónová elektroforéza

Interakce obou pesticidů s komplexujícími látkami byla studována pomocí kapilární zónové elektroforézy (CZE), což je separační metoda založená na rozdílné pohyblivosti nabitých částic ve vnějším elektrickém poli. Kapilární elektroforéza je v současnosti jednou z nejúčinnějších a nejcitlivějších analytických separačních metod. Podrobný přehled o základních pojmech a principech kapilární elektroforézy podává literatura [15].

Ve vnějším elektrickém poli se nabitě částice pohybují rychlostí  $v$ , která je tím větší, čím větší je intenzita tohoto pole  $E$ . Mezi aktuální intenzitou elektrického pole a rychlostí nabitě částice

se zavádí konstanta úměrnosti – elektroforetická pohyblivost (mobilita) částice  $\mu$ .

$$v = \mu \cdot E \quad (7)$$

Dá se ukázat [15], že pohyblivost iontu je přímo úměrná jeho náboji a nepřímo úměrná jeho velikosti a viskozitě roztoku. Pohyblivost iontů v roztoku o nekonečném zředění se nazývá limitní pohyblivost  $\mu_{\text{lim}}$  a pro teplotu 25 °C jsou limitní pohyblivosti iontů tabelovány jako fyzikálně chemické konstanty.

U iontů slabých elektrolytů je pohyblivost navíc závislá na stupni disociace, tedy na pH. Pohyblivost iontu při daném pH, iontové síle roztoku a teplotě se nazývá efektivní pohyblivost  $\mu_{\text{eff}}$ .

### *Elektroosmotický tok*

Významným jevem v CZE je elektroosmotický tok (*electroosmotic flow*, EOF). Vzniká v důsledku působení vnějšího stejnosměrného elektrického pole na elektrickou dvojnásobu na rozhraní pevné a kapalně fáze u vnitřní stěny kapiláry. V případě křemenné kapiláry tvoří vnitřní povrch kapiláry silanolové skupiny, které vzniknou hydrolyzou siloxanových skupin. V roztoku dojde k jejich disociaci a na stěně zůstanou záporně nabitě silanolové anionty, zatímco poblíž stěny vzniká přebytek volných kationtů. Při aplikaci vnějšího napětí se tato vrstva s přebytkem kationtů začne pohybovat směrem ke katodě. Díky vnitřnímu tření v kapalině se uvede do pohybu i veškerý roztok přítomný v kapiláře. EOF má v celé kapiláře stejnou rychlost, což znamená, že nepřispívá k separaci iontů, ale ovlivňuje výslednou migrační rychlost přítomných látek a tím i dobu a účinnost separace. Důležitou vlastností EOF je jeho téměř pravoúhlý rychlostní profil, na rozdíl od parabolického profilu hydrodynamického toku. EOF tím pádem významně nepřispívá k celkové disperzi (rozmytí) zón analytů.

Pohyblivost EOF  $\mu_{\text{EOF}}$  se definuje jako rychlost EOF vztažená na jednotkovou intenzitu elektrického pole. Pohyblivost analytu, kterou pozorujeme v kapiláře, (zjevná, aparentní)  $\mu_{\text{app}}$  je dána jako součet efektivní mobility analytu a mobility EOF.

$$\mu_{\text{app}} = \mu_{\text{eff}} + \mu_{\text{EOF}} \quad (8)$$

### *Experimentální uspořádání*

Separace v CZE se provádí v základním elektrolytu (*background electrolyte*, BGE). Vzorek obsahující jeden nebo více analytů je nadávkován jako úzká zóna na začátek kapiláry

(obvykle tlakem, tedy hydrodynamicky). Poté se na konce kapiláry vloží vysoké napětí, které uvnitř kapiláry vytváří elektrické pole, považované za homogenní. V důsledku rozdílných mobilit jednotlivých iontů dojde k separaci všech přítomných analytů. Neutrální látka se nepohybuje skrz roztok a může být využita ke stanovení rychlosti EOF (EOF marker). Pohyb jednotlivých zón v kapiláře je zaznamenáván detektorem, který je umístěn u výstupního konce kapiláry (nejčastěji fotometrický, nebo vodivostní detektor). Výstupem z detektoru je elektroforeogram, záznam odezvy detektoru na čase v průběhu experimentu. Z elektroforeogramu je možné přímo odečíst migrační časy analytů i EOF markeru. Efektivní mobility a mobilitu EOF lze poté stanovit z následujících vztahů:

$$\mu_{\text{eff}} = \frac{l_T l_D}{tU} - \mu_{\text{EOF}} \quad (9)$$

$$\mu_{\text{EOF}} = \frac{l_T l_D}{t_{\text{EOF}} U} \quad (10)$$

kde  $l_T$  je celková délka kapiláry,  $l_D$  je délka k detektoru,  $U$  je vložené napětí,  $t$  je migrační čas analytu,  $t_{\text{EOF}}$  je migrační čas EOF markeru.

### *Coating kapiláry*

EOF je možné regulovat úpravou vnitřního povrchu kapiláry (*coating*). Kovalentní coating je založen na kovalentním navázání žádoucích skupin na vnitřní stěnu kapiláry, a je tedy nevratný. Nekovalentní statický coating využívá nekovalentní adsorpce vybrané látky, nejčastěji polymeru, na stěny kapiláry. V obou případech se výrazně změní vlastnosti vnitřního povrchu kapiláry. Výhodou těchto metod je, že po dobu vlastního experimentu nejsou v kapiláře přítomny další volné molekuly kromě molekul BGE a analytu. Jinou možností je dynamický coating, při kterém dochází k přidání povrchově aktivní látky přímo do roztoku, kterým je kapilára naplněna během elektroforetického experimentu. Všechny tři způsoby umožňují snížit nebo zvýšit rychlost EOF, umožnit EOF nezávislý na pH nebo úplně obrátit směr EOF (vzniká anionický EOF) [16].

## Disperze zón v CZE

Disperze (rozmývání) způsobuje rozšiřování zón analytů a deformaci jejich píků. Disperzi může způsobovat několik jevů [17]:

- a) Difúze
- b) Elektromigrační disperze (EMD)
- c) Interakce analytu se stěnami kapiláry
- d) Teplotní efekty (generování Jouleova tepla)
- e) Vliv neideálního tvaru kapiláry (zatočení)
- f) Výchylky toku v kapiláře (nepravidelný EOF, vznik laminárního proudění)
- g) Mimokolonové vlivy

V případě že je dominantním disperzním jevem difúze, mají píky symetrický Gaussovský tvar a jsou dobře vyhodnotitelné. [18]

Teplotní efekty je možné minimalizovat, pokud kapilárou neprochází příliš vysoký proud a je použito aktivní chlazení.

Mezi disperzní jevy, které v některých případech není možné eliminovat a které komplikují správné určení polohy píku na elektroforeogramu (a tedy správného migračního času), patří EMD a interakce analytu s povrchem kapiláry.

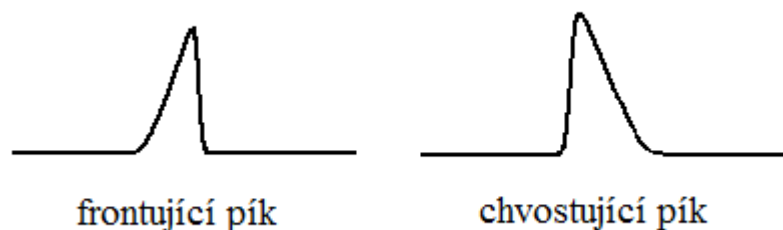
EMD způsobuje charakteristickou trojúhelníkovou deformaci píku analytu. Veličina, která popisuje elektromigrační disperzi  $i$ -té složky je definována jako *relative velocity slope*,  $S_i$ :

$$S_i = \frac{\kappa}{v_i} \left( \frac{dv_i}{dx_i} \right)_{x_i \rightarrow 0} \quad (11)$$

kde  $\kappa$  je vodivost BGE,  $v_i$  je migrační rychlost analytu a  $x_i$  je jeho molární zlomek.

Pro silné elektrolyty se druhý člen ve výrazu (11) blíží jedné a  $S_i$  je určena pouze poměrem vodivosti BGE a migrační rychlosti analytu. V případě slabých elektrolytů přispívá k EMD také disociace analytu. V takovém případě může existovat systém, kde je EMD minimální, přestože dávkovaný analyt výrazně mění vodivost BGE. Naopak je možný i systém, kde je EMD velká i při minimální koncentraci analytu. EMD může být navíc v některých případech ovlivněna i dalšími jevy, například komplexací [19, 20].

Pokud  $S_i > 0$ , vytváří se chvostující (*tailing*) pík, v případě  $S_i < 0$ , se jedná o frontující (*fronting*) pík (Obrázek 5).



**Obrázek 5:** Elektromigrační disperze – frontující a chvostující pík.

V případě frontujícího nebo chvostujícího píku není možné odečíst migrační čas přímo z elektroforeogramu, protože čas maxima deformovaného píku neodpovídá reálnému migračnímu času. Ten je možné určit použitím Haarhoff – Van der Lindeovy funkce (HVL funkce), kterou lze interpolovat píky deformované elektromigrační disperzí. HVL funkce je superpozicí původního Gaussova píku (bez EMD) a nelineární složky (vlivu EMD) a poskytuje tak parametry, jaké bychom obdrželi v případě Gaussovského píku bez vlivu elektromigrační disperze. Funkce je dána následujícím vztahem [21]:

$$f(t) = \frac{\frac{a_0 a_2}{a_1 a_3 \sqrt{2\pi}} \exp\left[-\frac{1}{2} \left(\frac{t - a_1}{a_2}\right)^2\right]}{\frac{1}{\exp\left(\frac{a_1 a_3}{a_2^2}\right) - 1} + \frac{1}{2} \left[1 + \operatorname{erf}\left(\frac{t - a_1}{\sqrt{2} a_2}\right)\right]} \quad (12)$$

kde  $a_0$  je plocha píku,  $a_1$  je střed píku Gaussovské složky,  $a_2$  je směrodatná odchylka Gaussovské složky a  $a_3$  je míra nelinearity píku,  $t$  je čas a jednotky parametrů  $a$  odpovídají jednotkám  $t$ . Parametr  $a_1$  potom udává hledaný migrační čas analytu odpovídající rovnicím (9) a (7).

#### 1.4 Stanovení konstant stability kapilární zónovou elektroforézou

V rámci CZE existuje mnoho metod, které umožňují kvantifikovat interakci analytu s komplexačním činidlem. Vždy jsou založeny na provedení série experimentů, při níž se mění koncentrace komplexačního činidla při konstantní koncentraci analytu (či naopak).

Tyto metody je možné rozdělit do tří základních skupin, podle kinetiky komplexace [22]:

- i) Rychlá dynamická rovnováha: ustavení rovnováhy je mnohem rychlejší než migrace analytu.
- ii) Pomalá rovnováha: doba ustanovení rovnováhy je výrazně větší než migrační čas (lze přímo separovat volnou a komplexovanou formu).

iii) Mezní rovnováha: relaxační čas je srovnatelný s migračním časem.

O všech typech rovnováhy a použitých metodách lze najít podrobné informace v literatuře [22, 23, 24]. V separačních metodách je často využívána rychlá rovnováha, jejíž rovnovážnou konstantu je možné stanovit například některou z následujících metod: afinitní kapilární elektroforéza (ACE), Hummel-Dreyerova metoda (HDM), frontální analýza (FA).

#### *Metoda ACE*

Pro systém s rychlou rovnováhou je často používána metoda ACE. Je založena na principu měření změny elektroforetické mobility analytu v závislosti na měnící se koncentraci komplexující látky v BGE.

Za předpokladu, že analyt komplexuje se selektorem v poměru 1 : 1 podle rovnice (1), a že změna jeho mobility je způsobena pouze komplexací se selektorem, je možné naměřenou efektivní mobilitu analytu  $\mu_{\text{eff}}$  vyjádřit jako vážený průměr mobility volného analytu  $\mu_A$  a mobility komplexu  $\mu_{AC}$  [25]:

$$\mu_{A,\text{eff}} = x_A \mu_A + x_{AC} \mu_{AC} \quad (13)$$

kde  $x_A$  a  $x_{AC}$  jsou molární zlomky volného analytu a komplexu.

Rovnici (13) je možné přepsat pomocí rovnovážných koncentrací zúčastněných látek ( $[A]$  je rovnovážná koncentrace volného analytu,  $[AC]$  je rovnovážná koncentrace komplexu):

$$\mu_{A,\text{eff}} = \frac{[A]}{[A] + [AC]} \mu_A + \frac{[AC]}{[A] + [AC]} \mu_{AC} \quad (14)$$

Výraz pro zdánlivou konstantu stability (6) může být po využití rovnice (14) upraven na vztah:

$$K'[C] = \frac{[AC]}{[A]} = \frac{\mu_A - \mu_{A,\text{eff}}}{\mu_{A,\text{eff}} - \mu_{AC}} \quad (15)$$

kde  $[C]$  je rovnovážná koncentrace volného selektoru.

Z výrazu (15) můžeme vyjádřit vztah pro efektivní mobilitu analytu:

$$\mu_{A,\text{eff}} = \frac{\mu_A - \mu_{AC} K'[C]}{1 + K'[C]} \quad (16)$$

Tento vztah (16) je již možné použít jako regresní funkci pro vyhodnocení experimentálních dat nelineární regresní analýzou. Za předpokladu, že je koncentrace selektoru výrazně vyšší než koncentrace analytu, je možné ztotožnit rovnovážnou koncentraci volného selektoru  $[C]$  s jeho analytickou koncentrací  $c_C$ . Tento předpoklad je splněn v případě interpolace pík

HVL funkcí, která poskytuje parametry Gaussovského píku při nekonečně nízké koncentraci analytu.

Obecně je tento typ rovnice (16) popsán jako rektangulární hyperbola a používá se ke stanovení veličin souvisejících s chemickou rovnováhou nejen v CZE. Ačkoli lze uvedenou rovnici vhodným způsobem převést na lineární regresi, Bowser a Chen [26] ukázali, že vyhodnocení dat popsaných rektangulární hyperbolou nelineární regresi poskytuje přesnější výsledky, než vyhodnocení některou z metod linearizace.

#### *Nepřesnosti ve stanovení konstant stability metodou ACE*

Při stanovování konstant stability CZE je potřeba vzít v úvahu, že výsledná hodnota konstanty je korektní pouze v případě, že změna mobility analytu je ovlivněna pouze komplexací. V případě, že na změnu mobility mají vliv i další jevy v kapiláře, je potřeba naměřená data před vyhodnocením korigovat.

Změnu mobility analytu může způsobovat:

- a) Změna teploty v kapiláře.
- b) Mění se iontová síla ( $I$ ) BGE pro různé koncentrace komplexačního činidla.
- c) Mění se viskozita BGE.

Změnu teploty je možné různými způsoby eliminovat, jak bylo uvedeno v oddílu *Disperze zón v CZE*. K jejímu zvýšení však vždy dojde a pro stanovení konstanty stability je nutné znát teplotu uvnitř kapiláry. Toho je možné dosáhnout měřením vodivosti [6].

Přidáním rozměrných molekul komplexačního činidla do BGE může dojít ke změně viskozity. Viskozita BGE má vliv na efektivní mobilitu analytu a proto je vhodné v takovém případě použít viskozitní korekci, která je popsána v literatuře [6].

Iontová síla ovlivňuje efektivní mobilitu analytu i hodnotu konstanty stability. Pokud je změna  $I$  pro zvyšující se koncentrace komplexačního činidla minimální, je možné její vliv zanedbat (systém s nenabitým selektorem). V opačném případě je nutné provádět experimenty v BGE s konstantní iontovou silou (mění se složení pufru) nebo použít příčné korekce [6].

## **1.5 Použití komplexačních činidel v CZE**

Zlepšení selektivity při separaci v CZE může být dosaženo přidáním různých aditiv do BGE. Primárně pro separaci neutrálních látek byla vyvinuta metoda elektrokinetické chromatografie, k separaci chirálních látek je možné využít například cyklodextriny, nebo jiné chirální selektory [27].

Z důvodu častého využití komplexujících látek v CZE při separacích je v této práci pro označení komplexující látky přidané do BGE používáno slovo selektor, přestože cílem metody ACE není dosažení selektivity.

#### *Cyklodextriny v CZE*

Cyklodextriny patří mezi nejčastěji využívané komplexující molekuly v CZE. Jsou používány k separaci strukturních izomerů, enantiomerů nebo strukturně podobných látek [28].

Využívají se jak nativní, tak i substituované cyklodextriny, z nichž některé mohou být v roztoku nabitě. Neutrální CD je možné využít pro separace nabitých analytů, které mají v roztoku vlastní elektroforetickou mobilitu. Neutrální analyty takto separovat nelze, k jejich separaci je však možné použít nabitě deriváty cyklodextrinů [9].

#### *Cucurbiturily v CZE.*

Použití cucurbiturilů v CZE není obvyklé, přesto existuje několik publikací které se tímto tématem zabývají [14, 29, 30]. V rozmezí pH 2,5 – 7,5 je cucurbituril v roztoku protonizovaný a tudíž kladně nabitý, což vede k jeho adsorbci na stěny kapiláry a následně ke vzniku reverzního EOF (anionický EOF). CB mají poměrně pevnou strukturu, což vede k vysoké selektivitě při komplexaci. Vysoký náboj CB také způsobuje velký rozdíl mezi mobilitou volného analytu a mobilitou komplexu analytu s CB.

CB[7] je vhodný k použití při separacích v CZE, protože je alespoň mírně rozpustný ve vodě (20 – 30 mM). Velikost jeho kavity je srovnatelná s kavitou  $\beta$ -CD (viz Tabulky 1 a 2). CB[7] je potenciálně perspektivní molekula pro separace neutrálních analytů v CZE.

## 2 Cíle práce

Cílem této práce je posoudit interakci 1-naftyloctové kyseliny a 1-naftylacetamidu s vybranými komplexačními činidly metodou afinitní kapilární zónové elektroforézy. Jako komplexující látky byly zvoleny cyklodextriny, které jsou známy svou schopností interagovat se širokým spektrem analytů. Dále byl zvolen cucurbit[7]uril (nejlépe rozpustný CB), který by na základě literatury [13] mohl vykazovat silnější interakci než běžně používané cyklodextriny.

Cíle této práce lze rozdělit do několika bodů:

- 1) Porovnat sílu interakce 1-naftyloctové kyseliny s nativními cyklodextriny ( $\alpha$ -,  $\beta$ - a  $\gamma$ -CD).
- 2) Zjistit sílu interakce 1-naftyloctové kyseliny a 1-naftylacetamidu s (kladně nabitým) cucurbit[7]urilem.
- 3) Zvolit vhodný kladně nabitý CD s velikostí kavity odpovídající nejlépe interagujícímu nativnímu CD. Zjistit sílu interakce tohoto selektoru s oběma analyty.
- 4) V rámci bodů 1) – 3) stanovit metodou ACE numerickou hodnotu zdánlivé konstanty stability komplexu analytu se selektorem (pokud je to pro daný systém možné).
- 5) Vzájemně srovnat sílu interakce všech selektorů s kyselinou 1-naftyloctovou a porovnat sílu interakce nabitých selektorů s 1-naftylacetamidem.

## 3 Experimentální část

### 3.1 Použité chemikálie

Tris(hydroxymethyl)aminomethan (tris): Sigma Aldrich, Česká republika,  $\geq 99,9$  %

N-[Tris(hydroxymethyl)methyl]glycin (tricin): Sigma Aldrich, Česká republika,  $\geq 99,5$  %

Cucurbit[7]uril hydrát (CB[7]): Stream chemicals, USA,  $\geq 99$  %

$\alpha$ -cyklodextrin ( $\alpha$ -CD): Sigma Aldrich, Česká republika,  $\geq 98,0$  %

$\beta$ -cyklodextrin ( $\beta$ -CD): Sigma Aldrich, Česká republika,  $\geq 98,0$  %

$\gamma$ -cyklodextrin ( $\gamma$ -CD): Sigma Aldrich, Česká republika,  $\geq 99$  %

6-monodeoxy-6-monoamino- $\beta$ -cyklodextrin hydrochlorid (MA- $\beta$ -CD): Cyclolab, Hungary, analytická čistota

Kyselina 1-naftyloctová (5,37 mM vodný roztok): Sigma Aldrich, Česká republika

1-naftylacetamid: Sigma Aldrich, Česká republika, 99,0 %

Dimethylsulfoxid (DMSO): Sigma Aldrich, Česká republika,  $\geq 99,0$  %

Dextran sulfát, sodná sůl (DS): Sigma Aldrich, Česká republika, analytická čistota

Hexadimethrin bromid (*Polybrene*, PB): Sigma Aldrich, Česká republika,  $\geq 94$  %

Methanol: Sigma Aldrich, Česká republika, 99,9 %

Hydroxid sodný (1 M a 0,1 M vodný roztok): Agilent Technologies, Germany

Všechny roztoky byly připravovány z deionizované vody čištěné systémem Ultrapur a Rowapur (Watrex, San Francisco, USA), deionizovaná voda byla používána také na proplachování kapiláry.

### 3.2 Instrumentace

Experimenty byly prováděny na přístroji  $^{3D}$ CE pro kapilární elektroforézu (Agilent Technologies, Německo) s vestavěným UV/VIS spektrofotometrickým detektorem s diodovým polem. K ovládání aparatury a sběru dat byl použit program ChemStation (Agilent Technologies).

### *Parametry experimentů*

Aplikované vnější napětí: 15 kV

Dávkování vzorku: hydrodynamicky, 20 mbar po dobu 10 s

Detekce při vlnové délce: 220 nm

Teplota: 25 °C

### *Parametry kapilár*

Výrobce: Polymicro technologies, USA

Vnitřní průměr: 50 μm

Vnější průměr: 375 μm

#### **Kapilára 1:**

Délka kapiláry: 54,0 cm

Vzdálenost k detektoru: 45,5 cm

#### **Kapilára 2:**

Délka kapiláry: 53,8 cm

Vzdálenost k detektoru: 45,3 cm

Nová kapilára byla vždy promyta 10 minut vodou, 5 minut 1M roztokem hydroxidu sodného a znovu 5 minut vodou.

Část měření (viz Tabulka 3) byla prováděna v kapiláře s nekovalentně modifikovaným vnitřním povrchem. Pokrytím se dosáhlo rychlého anionického EOF (opačného ve srovnání s nemodifikovanou kapilárou).

Postup pro nekovalentní modifikaci vnitřního povrchu kapiláry byl následující [31]: kapilára se 50 minut promývala 1M roztokem hydroxidu sodného, poté 20 minut vodou, následně 30 minut 5% roztokem polybrenu a dalších 30 minut 3% roztokem dextran sulfátu. Dalších 30 minut se kapilára promývala polybrenem. Poté se roztok s polybrenem nasadil na oba

konce kapiláry a na dobu 10 minut se aplikovalo napětí 5 kV. Potom se kapilára 10 minut proplachovala vodou.

Vždy před začátkem měření byla kapilára propláchnuta tři minuty vodou a poté buď pět minut 0,1M roztokem hydroxidu sodného (nemodifikovaný povrch) nebo 5% roztokem polybrenu (modifikovaný povrch). Poté byla kapilára propláchnuta pět minut vodou.

Po skončení měření byla kapilára vždy propláchnuta alespoň pět minut vodou a mezi jednotlivými měřeními byla uchovávána naplněná vodou.

V případě měření v modifikované kapiláře (viz Tabulka 3) se před každým jednotlivým experimentem kapilára promývala minimálně 3 minuty 5% roztokem polybrenu a následně minimálně 6 minut základním elektrolytem.

V případě měření v nemodifikované kapiláře (viz Tabulka 3) se před každým experimentem kapilára promývala minimálně 6 minut základním elektrolytem.

#### *Detekce*

U všech měření byla použita přímá detekce. Oba použité analyty dobře absorbují při vlnové délce 220 nm, zároveň při této vlnové délce absorbuje také EOF marker (DMSO). Všechny píky byly proto vyhodnocovány z elektroforeogramu pro tuto vlnovou délku.

### **3.3 Základní elektrolyt**

Všechny základní elektrolyty byly připravovány z tris-tricinového pufru (50 mM tris, 50 mM tricin, pH = 8,23). Navážka příslušného selektoru pro nejvyšší použitou koncentraci se vždy rozpustila v pufru a nižší koncentrace se poté připravovaly ředěním tímto puftrem.

Rozsah použitých koncentrací jednotlivých selektorů v základních elektrolytech je uveden v Tabulce 3.

**Tabulka 3:** Rozsah použitých koncentrací jednotlivých selektorů v BGE, kapilára a úprava jejího povrchu použitá pro měření s tímto selektorem.

<b>selektor</b>	<b>rozsah koncentrací [mM]</b>	<b>kapilára</b>	<b>úprava povrchu</b>
$\alpha$ -CD	5 – 50	kapilára 1	nemodifikovaný povrch
$\beta$ -CD	5 – 25	kapilára 1	nemodifikovaný povrch
$\gamma$ -CD	5 – 50	kapilára 1	nemodifikovaný povrch
MA- $\beta$ -CD	0,5 – 40	kapilára 1	modifikovaný povrch (viz. text)
CB[7]	2 – 16	kapilára 2	nemodifikovaný povrch

Základní elektrolyty byly před použitím filtrovány přes laboratorní filtry o průměru pórů 0,45  $\mu\text{m}$  (Sartorius, Německo) nebo 0,2  $\mu\text{m}$  (Sigma Aldrich, Česká republika).

### **3.4 Vzorky**

Každý vzorek obsahoval vždy

- 1) 12 – 24  $\mu\text{l}$  5,37mM zásobního roztoku kyseliny 1-naftylactové ve vodě (1. analyt),  
nebo  
20 – 60  $\mu\text{l}$  20mM zásobního roztoku 1-naftylacetamidu v methanolu (2. analyt)
- 2) 45 – 90  $\mu\text{l}$  1% zásobního roztoku DMSO ve vodě (EOF marker)
- 3) tris-tricinový pufr (doplněno do 600  $\mu\text{l}$ ).

### **3.5 Vyhodnocování dat**

Data byla zpracována v programu Origin 8.1. Píky, které byly deformovány elektromigrační disperzí a neměly Gaussovský tvar, byly při vyhodnocování prokládány Haarhoffovou – Van der Lindeho funkcí (12). Tak bylo možné eliminovat vliv elektromigrační disperze a dosáhnout přesnějšího určení polohy píku.

K dalšímu zpracování dat byl použit program Microsoft Office Excel 2007. Z polohy píků byl vždy určen migrační čas analytu a z něj byla spočítána efektivní mobilita. Pro každou koncentraci selektoru byla takto vyhodnocena alespoň tři měření. Hodnoty efektivních mobilit byly zprůměrovány a ve výsledcích je vždy uváděna výsledná průměrná hodnota.

## 4 Výsledky a diskuze

Ke stanovení interakce analytů se selektory byla použita metoda ACE, při které bylo zjišťováno, zda mobilita analytu vykazuje závislost na zvyšující se koncentraci selektoru v základním elektrolytu. Pokud to bylo možné, byla stanovena numerická hodnota interakční konstanty.

Bylo zvoleno takové pH základního elektrolytu ( $\text{pH} = 8,2$ ), aby byla 1-naftyloctová kyselina ( $\text{pK}_a = 4,23$ , [32]) v roztoku plně disociována. Z tohoto důvodu bylo možné sledovat interakci kyseliny se všemi zvolenými selektory, protože ve vzorku byla vždy nabitá a měla tudíž nenulovou mobilitu.

Oproti tomu disociace 1-naftylacetamidu ( $\text{pK}_a = 16,10$ , [33]) je při zvoleném pH zanedbatelná a jeho mobilita v roztoku je nulová. Proto bylo možné sledovat pouze interakce amidu s nabitými selektory, tedy s CB[7] a s MA- $\beta$ -CD.

Efektivní mobilita volné kyseliny 1-naftyloctové byla stanovena kapilární zónovou elektroforézou v tris-tricinovém pufru, tedy v systému bez jakéhokoliv selektoru.

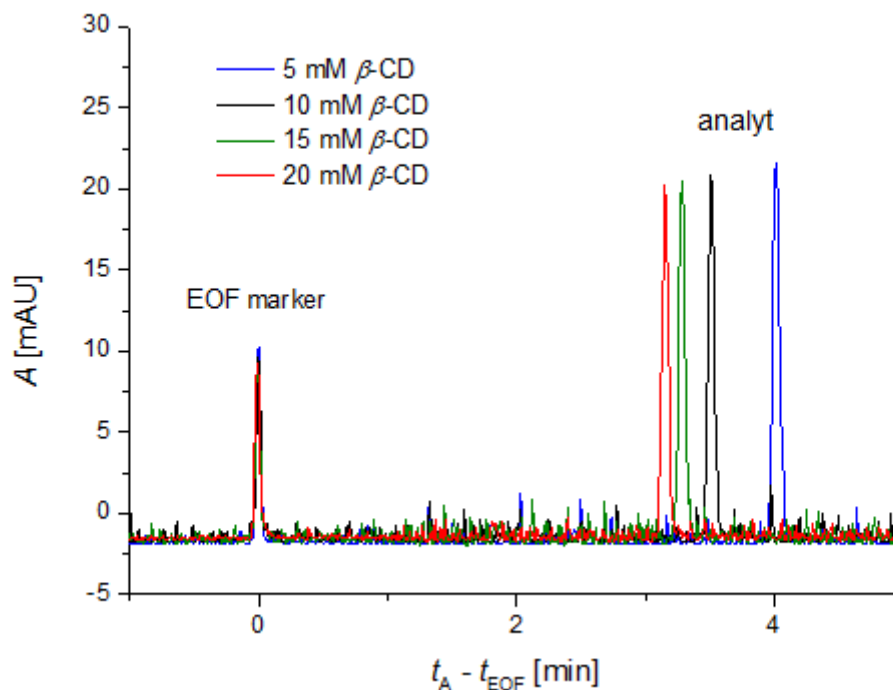
### 4.1 Systémy s nativními CD

Nejvyšší použitá koncentrace  $\alpha$ - a  $\gamma$ -CD byla 50 mM. V případě  $\beta$ -CD byla nejvyšší použitá koncentrace jen 25 mM, protože při vyšších koncentracích již není  $\beta$ -CD v pufru rozpustný. Hodnoty efektivních mobilit získané z měření se všemi připravenými koncentracemi CD jsou uvedeny v Tabulce 4.

**Tabulka 4:** Výsledné hodnoty průměrné efektivní mobility 1-NAA v BGE o různých koncentracích CD.

$c$ (CD) [mM]	$\alpha$ -CD	$\beta$ -CD	$\gamma$ -CD
	$\mu$ (analyt) [ $10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ]	$\mu$ (analyt) [ $10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ]	$\mu$ (analyt) [ $10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ]
5	-22,5	-20,4	-21,0
8		-19,0	
10	-21,9	-18,2	-19,3
12		-17,5	
15	-20,9	-16,6	-18,0
18		-15,9	
20	-20,1	-15,4	-16,6
22		-14,9	
25	-19,4	-14,4	-15,6
30	-18,4		-14,8
35			-14,1
40	-17,6		-13,5
45			-12,8
50	-16,5		-12,1

Z elektroforeogramů (Obrázek 6) i z tabulky je patrné, že efektivní mobility analytu se snižují se zvyšující se koncentrací selektoru. To je očekávaný trend, protože při interakci dojde ke vzniku komplexu, který zpomalí efektivní mobilitu analytu (13). Proto je možné usuzovat, že 1-naftyloctová kyselina se selektory interaguje a tvoří komplex.

**Obrázek 6:** Elektroforeogramy pro měření s 1-naftyloctovou kyselinou pro různé koncentrace  $\beta$ -CD v BGE. Graf byl upraven tak, aby  $t_{\text{EOF}}$  odpovídal nule.

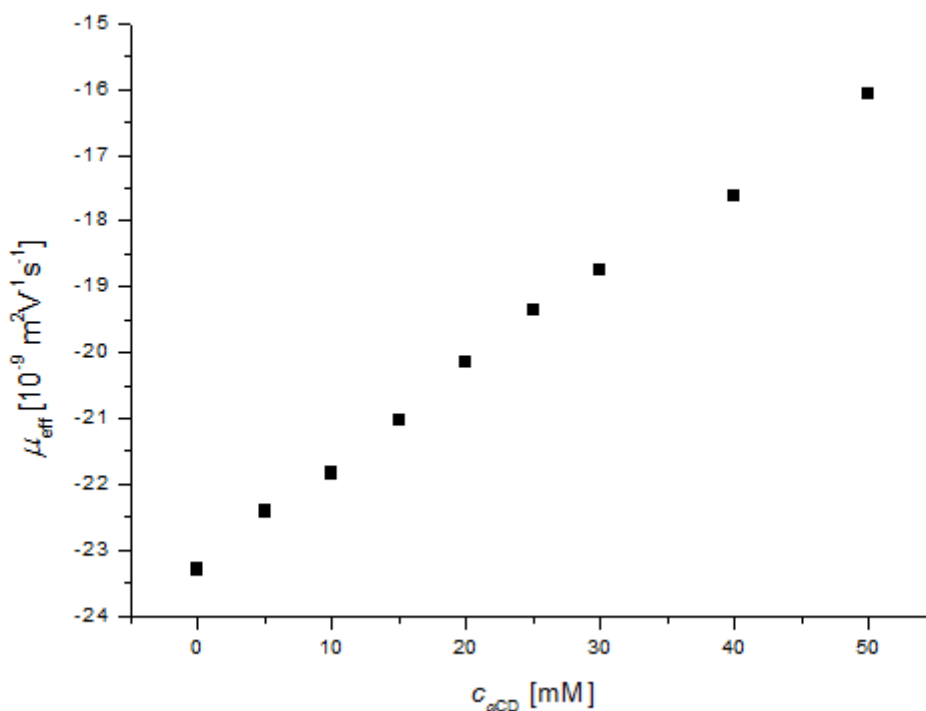
Získané experimentální body závislosti efektivní mobility analytu na koncentraci selektoru byly pro každý selektor zvlášť interpolovány podle vztahu (16), který je možné upravit dosazením analytické koncentrace selektoru za rovnovážnou koncentraci volného selektoru  $c_{CD}$ :

$$\mu_{NAA,eff} = \frac{\mu_0 - \mu_K K' c_{CD}}{1 + K' c_{CD}} \quad (17)$$

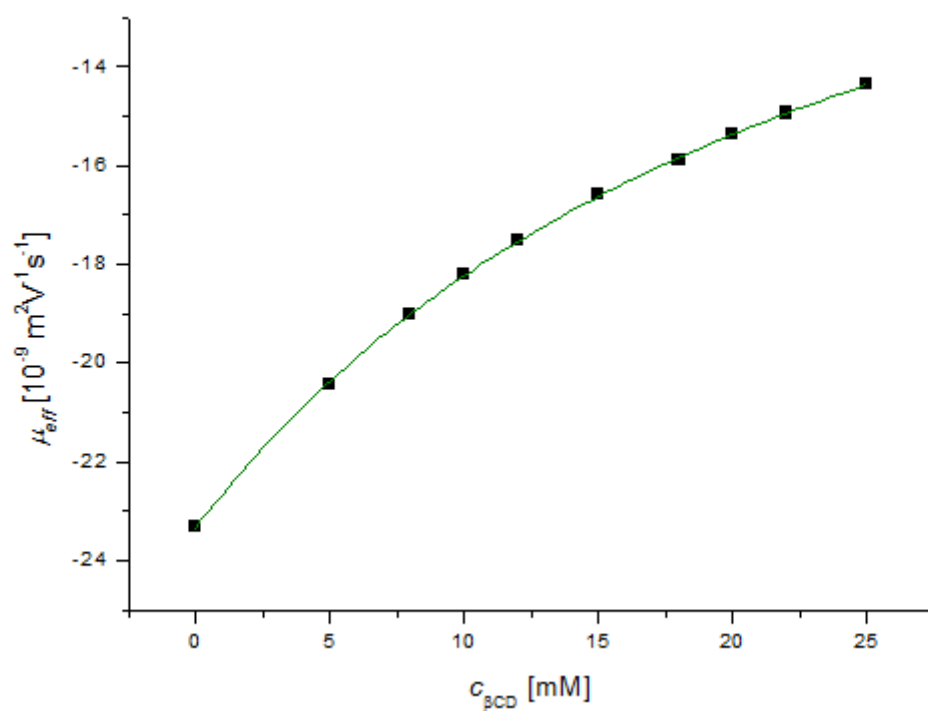
Parametry této funkce jsou mobilita komplexu ( $\mu_K$ ), efektivní mobilita volné 1-naftyloctové kyseliny ( $\mu_0$ ) a zdánlivá konstanta stability komplexu  $K'$ .

Při interpolaci experimentálních hodnot touto funkcí byl parametr  $\mu_0$  fixován na hodnotu  $-23,3 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$  (naměřená hodnota efektivní mobility volné 1-naftyloctové kyseliny). Získané křivky pro  $\beta$ -CD a  $\gamma$ -CD jsou na Obrázcích 8 a 9. Stanovené hodnoty  $K'$  jsou uvedeny v Tabulce 7 (kapitola 5.4).

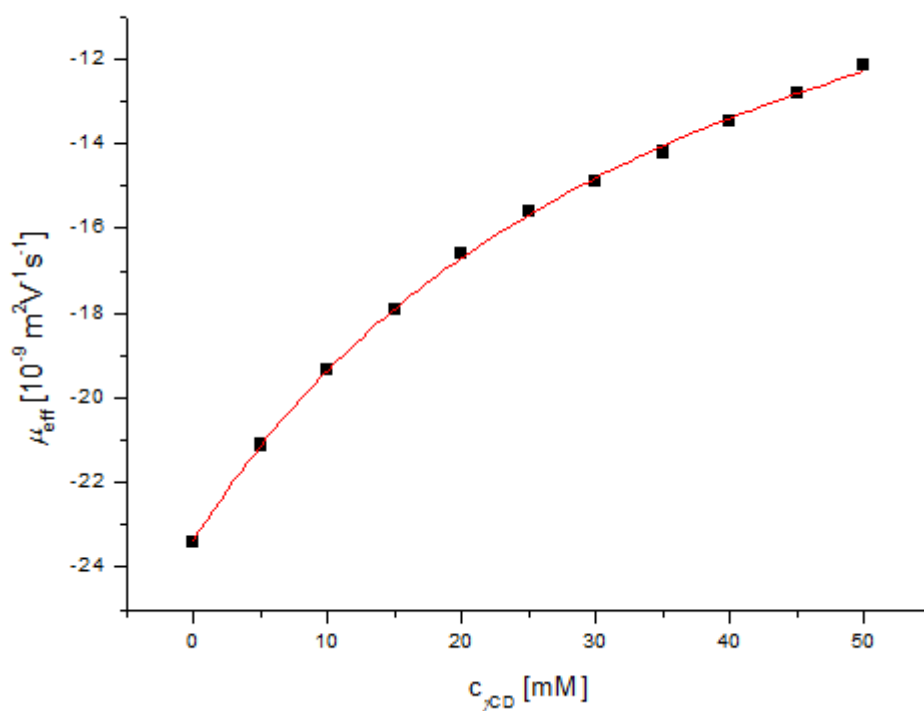
Pro  $\alpha$ -CD se interpolační křivka blíží lineární závislosti, což lze vysvětlit tím, že je konstanta  $K'$  tak malá, že je možné člen  $K' \cdot c_{CD}$  ve jmenovateli vztahu (17) zanedbat vůči jedné. Proto nebylo možné stanovit smysluplnou hodnotu  $K'$  (chyba u interpolaci určené hodnoty je 50 %). Konstanta pro  $\alpha$ -CD tedy není uvedena ve výsledcích. Je možné říci, že interakce 1-NAA s  $\alpha$ -CD je slabá.



**Obrázek 7:** Graf závislosti efektivní mobility 1-NAA na koncentraci  $\alpha$ -CD v BGE.



**Obrázek 8:** Graf závislosti efektivní mobility 1-NAA na koncentraci  $\beta$ -CD v BGE, experimentální body proloženy funkcí (17).



**Obrázek 9:** Graf závislosti efektivní mobility 1-NAA na koncentraci  $\gamma$ -CD v BGE, experimentální body proloženy funkcí (17).

## 4.2 Systém s 6-monodeoxy-6-monoamino- $\beta$ -CD

V případě MA- $\beta$ -CD bylo možné sledovat jeho interakci jak s 1-NAA tak s 1-NAAm, protože tento selektor je v roztoku kladně nabitý.

V nepokryté kapiláře se selektor adsorboval na stěny, v důsledku čehož EOF měnil směr, ale byl příliš pomalý (nebylo možné získat signál EOF markeru do 50-ti minut). Proto byl modifikován povrch kapiláry (viz Experimentální část), čímž bylo dosaženo rychlého stabilního anionického EOF.

Získané hodnoty efektivních mobilit obou analytů jsou uvedeny v Tabulce 5.

**Tabulka 5:** Výsledné hodnoty průměrné efektivní mobility 1-NAA a 1-NAAm v závislosti na různých koncentracích MA- $\beta$ -CD.

$c$ (MA- $\beta$ -CD) [mM]	$\mu$ (1-NAA) [ $10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ]	$\mu$ (1-NAAm) [ $10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ]
1	-21,0	*
3	-19,1	0,8
5	-17,6	1,1
7	-16,2	1,4
8,5	-15,4	1,5
10	-14,7	1,7
15	-12,6	2,1
20	-11,1	2,4
25	-9,9	2,7
30	-9,2	2,8
35	-8,3	3,0
40	-7,5	3,1

\* Pro tuto koncentraci MA- $\beta$ -CD se píky analytu a EOF markeru překrývají (efektivní mobilita analytu se blíží nule).

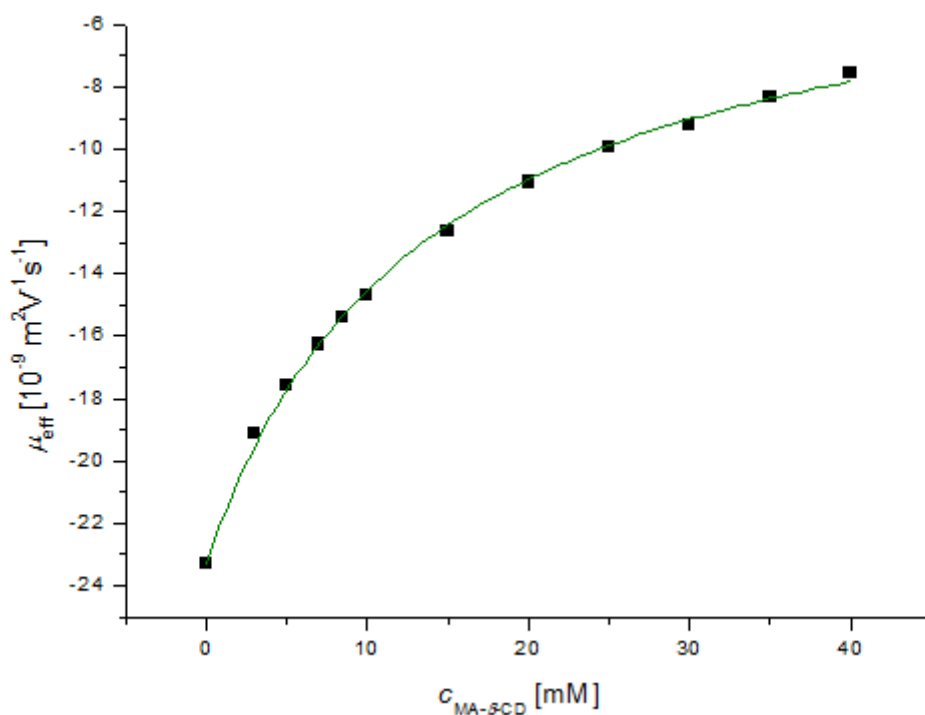
Interakce s MA- $\beta$ -CD má na mobilitu 1-NAA podobný vliv jako interakce s nenabítenými CD – kladně nabitý MA- $\beta$ -CD tvoří s kyselinou komplex, jehož mobilita je výrazně nižší a výsledná efektivní mobilita 1-NAA v BGE obsahujícím MA- $\beta$ -CD je tedy v absolutní hodnotě nižší, než mobilita 1-NAA v BGE bez selektoru. Absolutní hodnota efektivní mobility 1-NAA se tedy s rostoucí koncentrací MA- $\beta$ -CD snižuje.

Oproti tomu efektivní mobilita 1-NAAm se se zvyšující koncentrací MA- $\beta$ -CD zvyšuje, protože volný neutrální amid má mobilitu nulovou.

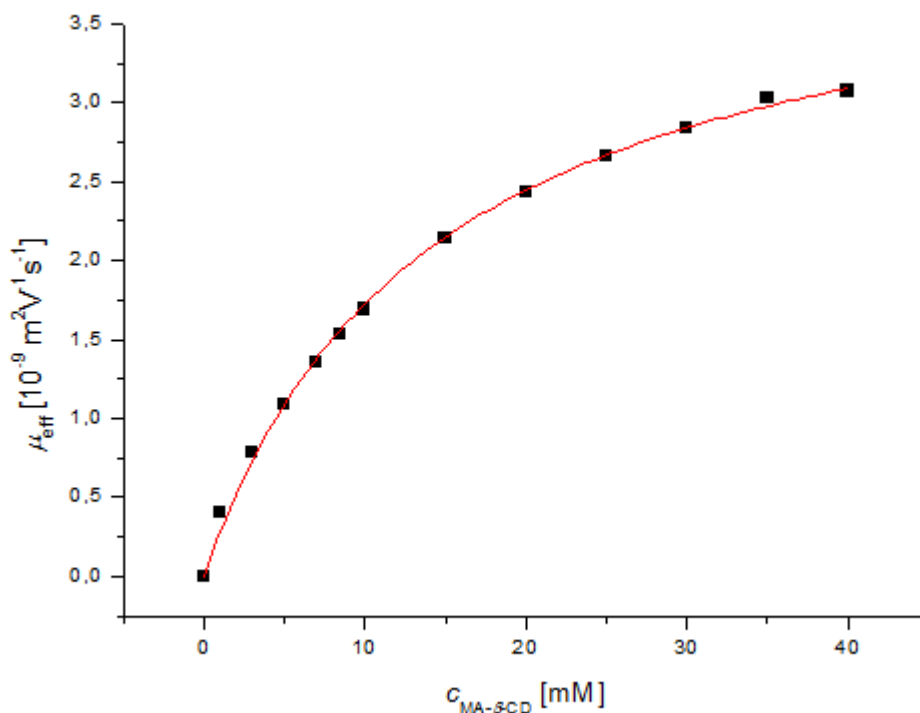
Získané experimentální body závislosti efektivní mobility analytů na koncentraci selektoru byly opět proloženy funkcí (17). Při interpolaci experimentálních hodnot touto funkcí byl (stejně jako v případě interakce s neutrálními CD) parametr  $\mu_0$  kyseliny 1-naftyloctové fixován na hodnotu  $-23,3 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (naměřená hodnota mobility volné kyseliny)

a  $\mu_0$  1-naftylacetamidu na hodnotu  $0 \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ .

Proložené křivky pro oba analyty ukazují Tabulky 10 a 11. Získané hodnoty  $K'$  jsou uvedeny v Tabulce 7 (kapitola 5.4). Tyto hodnoty jsou pouze orientační, protože nebyla provedena korekce na iontovou sílu, která se mění se zvyšující se koncentrací nabitého selektoru v BGE. Nekonstantní iontová síla má vliv na změnu efektivní mobility i na výslednou hodnotu konstanty stability, protože se mění aktivitní koeficienty iontů. Hodnoty  $K$  stanovené v této práci by v důsledku absence korekce na iontovou sílu měly být vyšší, než zdánlivé rovnovážné konstanty korigované patřičnými vztahy podle [6].



**Obrázek 10:** Graf závislosti efektivní mobility 1-NAA na koncentraci MA- $\beta$ -CD v BGE, experimentální body proloženy funkcí (17).



**Obrázek 11:** Graf závislosti efektivní mobility 1-NAAm na koncentraci MA- $\beta$ -CD v BGE, experimentální body proloženy funkcí (17).

### 4.3 Systém s cucurbit[7]urilem

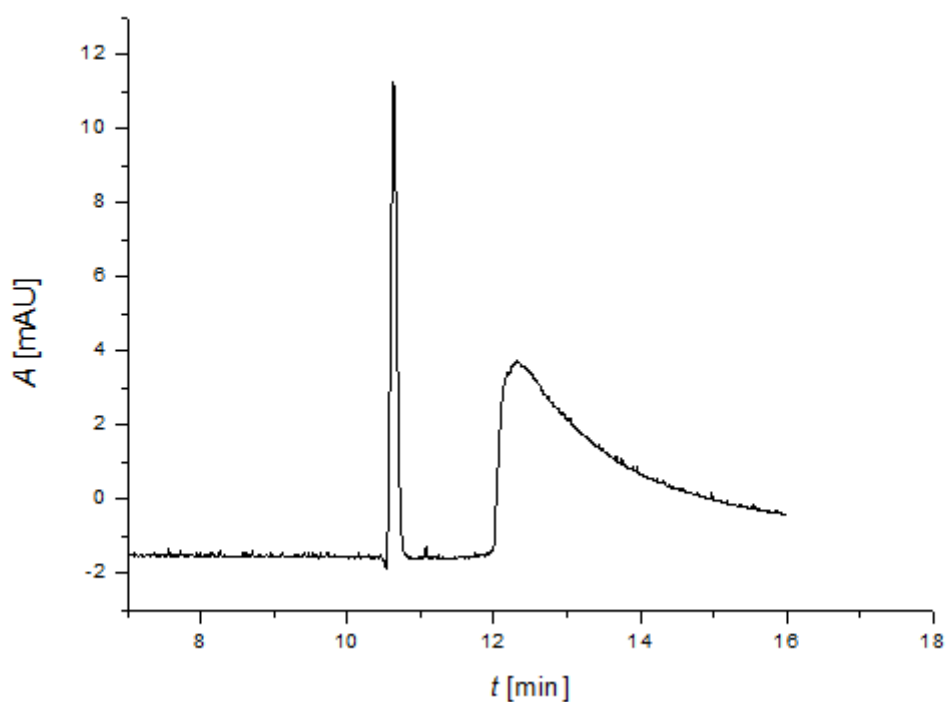
Na základě literatury [14] jsme předpokládali, že i při pH = 8,2 bude cucurbit[7]uril kladně nabitý a bude interagovat s povrchem kapiláry, což bude mít za následek vznik anionického EOF (podobně jako v kapiláře s modifikovaným povrchem). Na základě podobnosti s kladně nabitým MA- $\beta$ -CD byla pro měření nejprve použita modifikovaná kapilára. Cílem bylo získat stabilní reverzní EOF a především zabránit interakci kladně nabitého cucurbiturilu se stěnou kapiláry, což by způsobovalo chvostování píků, které není možné nijak korigovat. Při interakci selektoru se stěnou kapiláry by navíc docházelo k jeho úbytku v BGE a to by ovlivňovalo komplexaci.

I přesto, že povrch modifikované kapiláry byl kladně nabitý, docházelo k interakci CB[7] se stěnou kapiláry (bylo pozorováno chvostování píků) a pro vyšší koncentrace CB[7] byly píky příliš deformované a nebylo možné správně určit migrační čas analytu.

Experimenty byly proto zopakovány v nemodifikované kapiláře, kde přítomnost CB[7] působila jako dynamický modifikátor EOF, takže se ustanovil vyhovující rychlý anionický EOF. Vyhodnotitelnost elektroforeogramů byla při tomto uspořádání lepší, chvostování píků v důsledku interakce se stěnou bylo menší než v případě modifikované kapiláry. Úbytek

koncentrace selektoru v BGE bylo nutné akceptovat, protože z měření v modifikované kapiláře nebylo možné získat požadovaná data. Všechny prezentované výsledky byly získány z měření v nemodifikované kapiláře.

CB[7] byl připraven v maximální koncentraci 16 mM, vyšší koncentrace nebylo možné dosáhnout kvůli nízké rozpustnosti CB[7] v pufru. Při měření s 1-NAAm docházelo k takové deformaci pík analytu, že je nebylo možné vyhodnotit a získat relevantní migrační čas 1-NAAm (Obrázek 12). Proto nemohla být interakce amidu s CB[7] v rámci této práce prostudována.

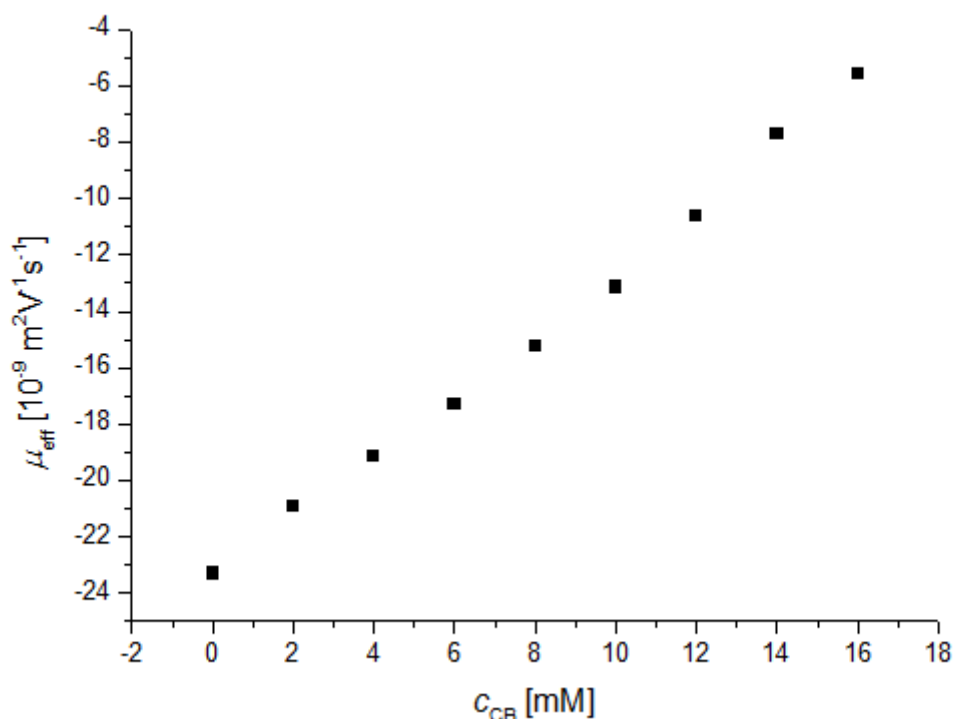


**Obrázek 12:** Elektroforeogram měření s amidem v BGE s 2mM CB[7] – pík deformovaný interakcí CB[7] se stěnou kapiláry.

Naměřené hodnoty efektivních mobilit kyseliny pro jednotlivé koncentrace CB[7] jsou uvedeny v Tabulce 6.

**Tabulka 6:** Výsledné hodnoty průměrné efektivní mobility 1-NAA v závislosti na různých koncentracích CB[7].

$c(\text{CB}[7])$ [mM]	$\mu(1\text{-NAA})$ [ $10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ]
2	-20,9
4	-19,2
6	-17,3
8	-15,2
10	-13,2
12	-10,6
14	-7,7
16	-5,6



**Obrázek 13:** Graf závislosti efektivní mobility 1-NAA na koncentraci CB[7] v BGE.

Efektivní mobilita 1-naftylactové kyseliny se opět v absolutní hodnotě snižovala se vzrůstající koncentrací selektoru. Z grafu na Obrázku 13 je vidět, že získaná závislost efektivních mobilit analytu na koncentraci CB[7] má přibližně lineární průběh, podobně jako v případě interakce s  $\alpha$ -CD, a není ji proto možné fitovat funkcí (17). Ve srovnání s mobilitou volné 1-NAA klesla (v absolutní hodnotě) efektivní mobilita 1-NAA v BGE s 16mM CB[7] na 29 %, podobně jako v BGE se 40mM MA- $\beta$ -CD. V BGE s 50mM  $\alpha$ -CD oproti tomu klesla efektivní mobilita 1-NAA jen na 69 %.

Nemůžeme tvrdit, že interakce 1-naftyloctové kyseliny s CB[7] je slabá. Na základě literatury [13] předpokládáme, že CB[7] nekomplexuje 1-NAA v poměru 1 : 1, ale vznikají vícečetné komplexy, jejichž stechiometrie se může měnit s rostoucí koncentrací selektoru. V takovém případě nejsme schopni závislost vystihnout analytickou funkcí a stanovit numerickou hodnotu rovnovážné konstanty.

#### 4.4 Srovnání interakcí pro jednotlivé selektory

Interakční konstanty stanovené v rámci této práce jsou uvedeny v Tabulce 7. Konstanty pro interakci  $\beta$ - a  $\gamma$ -CD s 1-NAAm uvedeny nejsou, protože není možné studovat interakci dvou nenabitých látek pomocí CZE. Z důvodů uvedených výše nebylo pro systémy s  $\alpha$ -CD a CB[7] možné stanovit numerickou hodnotu zdánlivé konstanty stability.

**Tabulka 7:** Hodnoty zdánlivých konstant stability pro systémy analyt – selektor, u kterých bylo možné konstantu numericky stanovit.

analyt	selektor	mobilita komplexu $\mu_K$ [10 <sup>-9</sup> m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]	rovnovážná konstanta $K'$ *	chyba
1-NAA	$\beta$ -CD	-5,0	0,039	± 0,0012
	$\gamma$ -CD	-3,7	0,026	± 0,0013
	MA- $\beta$ -CD	-2,6	0,073	± 0,0031
1-NAAm	MA- $\beta$ -CD	4,2	0,070	± 0,0034

\* vztaženo na mol/dm<sup>3</sup>

Z neutrálních cyklodextrinů s kyselinou 1-naftyloctovou nejsilněji interaguje  $\beta$ -CD (hodnota  $K'$  je nejvyšší).

Podle stanovených rovnovážných konstant vykazuje nejsilnější interakci s oběma analyty MA- $\beta$ -CD. Z porovnání obou vypočítaných hodnot  $K'$  je vidět, že hodnota konstanty se pro interakci se záporně nabitou 1-naftyloctovou kyselinou a neutrálním 1-naftylacetamidem liší o méně než regresní chybu. Z toho je možné usuzovat, že elektrostatická interakce mezi záporně nabitou kyselinou a kladně nabitým selektorem je z hlediska komplexace nevýznamná.

Konstantu  $K'$  se v případě interakce analytů s CB[7] stanovit nepodařilo. Pro 1-naftylacetamid nebyly nalezeny experimentální podmínky umožňující spolehlivé vyhodnocení výsledných elektroforeogramů. Z experimentálních dat stanovených pro interakci s kyselinou 1-naftyloctovou pak vyplývá, že interakci není možné popsat vztahem (17). Je pravděpodobné, že CB[7] nekomplexuje s kyselinou v poměru 1:1, navíc může v roztoku docházet k dalším jevům (například vznik agregátů CB) [13].

## 5 Závěr

Pomocí metody ACE byla sledována a porovnána interakce 1-naftyloctové kyseliny s nativními CD.

Pro  $\alpha$ -CD nebylo touto metodou možné stanovit hodnotu konstanty stability z důvodu příliš slabé interakce – je možné říci, že  $\alpha$ -CD interaguje ze všech uvedených CD nejslaběji.

Z hodnot zdánlivých konstant stability stanovených pro  $\beta$ -CD a  $\gamma$ -CD je zřejmé, že interakce je nejsilnější v případě  $\beta$ -CD.

Na základě předešlých výsledků byl pro posouzení interakce s kladně nabitým cyklodextrinem zvolen MA- $\beta$ -CD. Pro tento selektor bylo možné stanovit zdánlivou konstantu stability komplexu s 1-NAA a s 1-NAAm. Z porovnání hodnot těchto konstant s hodnotami konstant pro nativní CD vyplývá, že v případě 1-NAA je interakce s MA- $\beta$ -CD nejsilnější. Dále je možné říci, že tato interakce je podobně silná pro 1-NAA a 1-NAAm.

Interakci 1-NAAm s CB[7] se v rámci této práce nepodařilo charakterizovat.

V případě interakce 1-NAA s CB[7] se nepodařilo stanovit hodnotu zdánlivé konstanty stability. Z experimentálních dat je však možné vyvodit, že interakce nevede ke vzniku komplexu CB a analytu o stechiometrii 1 : 1. Proto by stanovení konstanty stability vyžadovalo použití jiné experimentální metody či jiného matematického modelu. Je možné říci, že interakce 1-NAA s CB[7] má významně odlišný mechanismus než interakce s cyklodextriny.

## Reference

- <sup>1</sup> Vilchez J. L., Blanc R., Navalón A.; Simultaneous spectrofluorimetric determination of 1-naphthylacetic acid and 1-naphthaleneacetamide in commercial formulations and soil samples; *Talanta* 1997, 45, 105 – 111
- <sup>2</sup> Crosby D. G., Tang Ch. S.; Photodecomposition of 1-naphthaleneacetic acid; *J. Agr. Food Chem.* 1969, 17, 1291 – 1293
- <sup>3</sup> Cruickshank D. L., Rougier N. M., Vico R. V., Bourne S. A., Buján E. I., Caira M. R., de Rossi R. H.; Inclusion of the insecticide fenitrothion in dimethylated- $\beta$ -cyclodextrin: unusual guest disorder in the solid state and efficient retardation of the hydrolysis rate of the complexed guest in alkaline solution; *Beilstein J. Org. Chem.* 2013, 9, 106 – 117
- <sup>4</sup> Duchêne D. a kol.; *Cyclodextrins and their industrial use*; Editions de Santé, Paris, 1987
- <sup>5</sup> Atkins P., De Paula J.; *Physical chemistry*; Oxford University Press, New York, 2010
- <sup>6</sup> Beneš M., Zusková I., Svobodová J., Gaš B.; Determination of stability constants of complexes of neutral analytes with charged cyclodextrins by affinity capillary electrophoresis; *Electrophoresis* 2012, 33, 1032 – 1039
- <sup>7</sup> Szjetli J.; Introduction and general overview of Cyclodextrin chemistry; *Chem. Rev.* 1998, 98, 1743 – 1753
- <sup>8</sup> Tohomiro E.; Large-ring Cyclodextrins; *Trends in Glycoscience and Glycotechnology* 2011, Vol.23 No.130, 79 – 92
- <sup>9</sup> Li S., Purdy W. C.; Cyclodextrins and their applications in Analytical Chemistry; *Chem. Rev.* 1992, 92, 1457 – 1470
- <sup>10</sup> Lagona J., Mukhopadhyay P., Chakrabarti S., and Isaacs L.; The Cucurbit[ $n$ ]uril family; *Angew. Chem. Int. Ed.* 2005, 44, 4844 – 4870
- <sup>11</sup> <http://chem10076.wordpress.com/2010/07/03/cucurbituril-cb-dan-supramolecular-chemistry/>, citováno 25. 4. 2013
- <sup>12</sup> Behrend R., Meyer E., Rusche F.; Over Condensation Products From Glycoluril and Formaldehyde; *Justus Liebigs Ann. Chem.* 1905, 339, 1 – 37
- <sup>13</sup> Da Silva J. P., Jayaraj N., Jockusch S., Turro N. J., Ramamurthy V.; Aggregates of Cucurbituril complexes in the gas phase; *Org. Lett.* 2011, Vol. 13, No. 9, 2410 – 2413
- <sup>14</sup> Xu L., Liu S. M., Wu Ch. T., Feng Y. Q.; Separation of positional isomers by cucurbit[7]uril-mediated capillary electrophoresis; *Electrophoresis* 2004, 25, 3300 – 3306
- <sup>15</sup> Kašička V.; Teoretické základy a separační principy kapilárních elektromigračních metod; *Chemické listy*, 91, 320 – 329
- <sup>16</sup> Robb Ch. S.; Applications of physically adsorbed polymer coatings in capillary electrophoresis; *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 2007, 30, 729–759
- <sup>17</sup> Gaš B., Kenndler E.; Dispersive phenomena in electromigration separation methods; *Electrophoresis* 2000, 21, 3888 – 3897
- <sup>18</sup> Gebauer P., Boček P.; Predicting peak symmetry in capillary zone electrophoresis: the concept of the peak shape diagram; *Anal. Chem.* 1997, 69, 1557 – 1563
- <sup>19</sup> Jaroš M., Hruška V., Štědrý M., Zusková I., Gaš B.; Eigenmobilities in background electrolytes for capillary zone electrophoresis: IV. Computer program PeakMaster; *Electrophoresis* 2004, 25, 3080 – 3085

- 
- <sup>20</sup> Beneš M., Svobodová J., Hruška V., Dvořák M., Zusková I., Gaš B.; A nonlinear electrophoretic model for PeakMaster: Part IV. Electromigration dispersion in systems that contain a neutral complex-forming agent and a fully charged analyte. Experimental verification; *Journal of Chromatography A* 2012, 1267, 109 – 115
- <sup>21</sup> Erny G. L., Bergstrom E. T., Goodall D. M.; Predicting peak shape in capillary zone electrophoresis: a generic approach to parametrizing peaks using the Haarhoff-Van der Linde (HVL) function; *Anal. Chem.* 2001, 73, 4862 – 4872
- <sup>22</sup> Jiang Ch., Armstrong D. W.; Use of CE for the determination of binding constants; *Electrophoresis* 2010, 31, 17 – 27
- <sup>23</sup> 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; *J. Chromatogr. A* 1997, 777, 311 – 328
- <sup>24</sup> Østergaard J., Heegaard N. H. H.; Bioanalytical interaction studies executed by preincubation affinity capillary electrophoresis; *Electrophoresis* 2006, 27, 2590 – 2608
- <sup>25</sup> Rundlett K. L., Armstrong D. W.; Methods for the estimation of binding constants by capillary electrophoresis; *Electrophoresis* 1997, 18, 2194 – 2202
- <sup>26</sup> Bowser M. T., Chen D. D. Y.; Monte Carlo Simulation of Error Propagation in the Determination of Binding Constants from Rectangular Hyperbolae. 1. Ligand Concentration Range and Binding Constant; *J. Phys. Chem. A* 1998, 102, 8063 – 8071
- <sup>27</sup> Chiari M.; Enhancement of selectivity in capillary electrophoretic separations of metals and ligands through complex formation; *Journal of Chromatography A* 1998, 805, 1 – 15
- <sup>28</sup> Gūbitz G., Schmid M. G.; Chiral separation by capillary electromigration techniques; *Journal of Chromatography A* 2008, 1204, 140 – 156
- <sup>29</sup> Fang W., Liu S. M., Xu L., Cheng G. Z., Wu Ch. T., Feng Y. Q.; The formation of cucurbit[n]uril (n = 6, 7) complexes with amino compounds in aqueous formic acid studied by capillary electrophoresis; *Electrophoresis* 2005, 26, 2214 – 2224
- <sup>30</sup> Wei F., Feng Y. Q.; Rapid determination of aristolochic acid I and II in medicinal plants with high sensitivity by cucurbit[7]uril-modifier capillary zone electrophoresis
- <sup>31</sup> Katayama H., Ishihama Y., Asakawa N.; Stable Cationic Capillary Coating with Successive Multiple Ionic Polymer Layers for Capillary Electrophoresis; *Anal. Chem.* 1998, 70, 5272 – 5277
- <sup>32</sup> Mollin J., Pavelek Z., Navrátilová J., Recmanová A.; Effect of medium on dissociation of carboxylic acids; *Collection Czechoslovak Chem. Commun.* 1985, 50, 2670 – 2678
- <sup>33</sup> <https://scifinder.cas.org>; citováno 20. 5. 2013; calculated by Advanced Chemistry Development (ACD/Labs) Software V11.02 (© 1994-2013 ACD/Labs)