

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie
Studijní obor: Analytická chemie



Martina Havlíková

NOVĚ SYNTETIZOVANÉ PERMANENTNĚ POZITIVNĚ NABITÉ
MONOSUBSTITUOVANÉ DERIVÁTY β -CYKLODEXTRINU JAKO
CHIRÁLNÍ SELEKTORY V KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZE

Newly synthesized permanently positively charged
monosubstituted β -cyclodextrin derivatives as chiral
selectors in capillary electrophoresis

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: doc. RNDr. Zuzana Bosáková, CSc.

Konzultanti: RNDr. Tomáš Křížek, Ph.D.

Ing. Gábor Benkovics

Praha 2014

Tato diplomová práce vznikla za finanční podpory Grantové Agentury České republiky, grant č. 13-01440S.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla 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 20. května 2014.

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala doc. RNDr. Zuzaně Bosákové, CSc., RNDr. Tomáši Křížkovi, Ph.D. a Ing. Gáborovi Benkovicsovi za odborné vedení, cenné rady a pomoc při zpracování této diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat celému kolektivu z laboratoří 118 a 119 za příjemné prostředí při zpracovávání mé práce a v neposlední řadě mé rodině a partnerovi za veškerou podporu během studia.

Abstrakt

Tato diplomová práce se zabývá využitím dvou permanentně kladně nabitých monosubstituovaných β -cyklodextrinových derivátů (PEMEDA- β -CD a PEMPDA- β -CD) jako chirálních selektorů v kapilární elektroforéze. Použití PEMPDA- β -cyklodextrinu v kapilární elektroforéze nebylo dosud v odborné literatuře uvedeno. Vlastnosti PEMEDA- β -cyklodextrinu byly již dříve známé, ale jeho použití pro separaci enantiomerů aminokyselin a jejich derivátů ještě publikováno nebylo.

Cyklodextrinové deriváty byly testovány jako aditivum v různých pufrch o různém pH s případnými přísadkami organického modifikátoru. Jako vhodný základní elektrolyt, byl zvolen 15 mmol·l⁻¹ borátový pufr o pH = 9,5 bez přísadky organického modifikátoru. Dále byl sledován vliv koncentrace chirálního selektoru na separaci a případnou enantioseparaci vybraných analytů. Přísadky cyklodextrinových derivátů se pohybovaly v rozmezí koncentrací 0,0 – 5,0 mmol·l⁻¹. Bylo otestováno čtrnáct anionogenních analytů, mezi ně patřily nativní aminokyseliny, *N*-blokované aminokyseliny a profeny, které byly detekovány pomocí UV-VIS detektoru při optimálních vlnových délkách 214, 254 nebo 280 nm.

Oba chirální selektory byly vhodné pro enantioseparaci *N*-*boc*-D,L-tryptofanu, který se dělil na základní linii již při 0,5 mmol·l⁻¹ koncentraci chirálního selektoru. U testovaných aminokyselin blokovaných *tert*-butoxykarbonylem a u D,L-ketoprofenu docházelo k částečnému dělení. Oba selektory se však zejména kvůli značnému ovlivnění elektroosmotického toku a jejich nestabilitě pro použití v kapilární elektroforéze příliš neosvědčily.

Klíčová slova

kapilární elektroforéza, chirální separace, chirální selektory, monosubstituované cyklodextrinové deriváty

Abstract

This diploma thesis deals with the application of two permanently positively charged monosubstituted β -cyclodextrin derivatives (PEMEDA- β -CD, PEMPDA- β -CD) as chiral selectors in capillary electrophoresis. Use of PEMPDA- β -cyclodextrin in capillary electrophoresis has not been reported in literature. Properties of PEMEDA- β -cyclodextrin are already known, but its application for separation of amino acid enantiomers has not been published yet.

Cyclodextrin derivatives were tested as additives in different buffers of different pH and with eventual addition of organic modifier. As suitable background electrolyte 15 mmol·l⁻¹ borate buffer, pH = 9.5 without organic modifier was chosen. Furthermore the influence of chiral selector on separation and eventual enantioseparation of chosen analytes was evaluated. Addition of cyclodextrin derivatives in concentration range 0.0 – 5.0 was tested. Fourteen anionogenic analytes, including native amino acids, *N*-blocked amino acids and profens, were detected with UV-VIS detector at optimal wavelength 214, 254 or 280 nm.

Both chiral selectors were suitable for enantioseparation of *N*-*boc*-D,L-tryptophan, which was baseline separated at concentration of selector as low as 0.5 mmol·l⁻¹. Tested amino acids blocked with *tert*-butoxycarbonyl and D,L-ketoprofen were partially separated. Both selectors were not suitable for use in capillary electrophoresis, due to their influence on electroosmotic flow and their low stability.

Keywords

capillary electrophoresis, chiral separation, chiral selectors, monosubstituted cyclodextrin derivatives

Obsah

1. ÚVOD	10
2. TEORETICKÝ ÚVOD	12
2.1 ELEKTROFORÉZA	12
2.1.1 Historie	12
2.1.2 Základy kapilární zónové elektroforézy	12
2.1.3 Elektroosmotický tok	13
2.1.4 Ovlivnění separace	16
2.2 CHIRALITA	17
2.3 CHIRÁLNÍ SEPARACE V KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZE	18
2.4 CYKLODEXTRINY	20
2.5 CYKLODEXTRINY A JEJICH DERIVÁTY JAKO SELEKTORY V KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZE	23
2.5.1 Obecné informace	23
2.5.2 Neutrální cyklodextrinové deriváty	24
2.5.3 Záporně nabitě cyklodextrinové deriváty	25
2.5.4 Kladně nabitě cyklodextrinové deriváty	25
2.5.5 PEMEDA- β -cyklodextrin	26
2.5.6 PEMPDA- β -cyklodextrin	27
2.6 CHARAKTERIZACE CYKLODEXTRINŮ	28
2.7 CÍLE PRÁCE	30
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	31
3.1 MATERIÁL	31
3.1.1 Cyklodextriny	31
3.1.2 Standardy	31
3.1.3 Ostatní chemikálie	33
3.2 ZAŘÍZENÍ	33
3.3 PŘÍPRAVA STANDARDŮ	33
3.4 PŘÍPRAVA ZÁKLADNÍHO ELEKTROLYTU	34
3.5 CE ANALÝZA	35
3.6 DETEKCE ROZPADOVÝCH PRODUKTŮ CYKLODEXTRINOVÝCH DERIVÁTŮ	35
3.7 OVĚŘENÍ STABILITY PH ZÁKLADNÍHO ELEKTROLYTU	36
4. VÝSLEDKY A DISKUSE	37
4.1 VÝBĚR VHODNÝCH ANALYTŮ	37
4.2 SEPARACE VYBRANÝCH ANALYTŮ BEZ PŘÍDAVKU CHIRÁLNÍHO SELEKTORU	37
4.2.1 Výběr základního elektrolytu	37
4.2.2 Separace vybraných analytů v 15 mmol·l ⁻¹ borátovém pufru o pH = 9,5	39
4.3 VLIV PŘÍDAVKU PEMPDA-B-CYKLODEXTRINU DO ZÁKLADNÍHO ELEKTROLYTU	40
4.3.1 Výběr vhodného separačního pufru	40
4.3.2 Vliv koncentrace chirálního selektoru na elektroosmotickou pohyblivost	40
4.4 VLIV PŘÍDAVKU PEMEDA-B-CYKLODEXTRINU DO ZÁKLADNÍHO ELEKTROLYTU	41
4.4.1 Vliv koncentrace chirálního selektoru na elektroosmotickou pohyblivost	41
4.5 OVĚŘENÍ STABILITY CHIRÁLNÍHO SELEKTORU	42
4.5.1 Stabilita PEMPDA- β -cyklodextrinu	42
4.5.2 Stabilita PEMEDA- β -cyklodextrinu	44
4.6 OVĚŘENÍ STABILITY ZÁKLADNÍHO ELEKTROLYTU	46
4.7 PEMPDA-B-CYKLODEXTRIN JAKO CHIRÁLNÍ SELEKTOR V KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZE	46
4.7.1 Vliv koncentrace chirálního selektoru na elektroforetickou pohyblivost analytů a enantioselektivitu	47
4.8 PEMEDA-B-CYKLODEXTRIN JAKO CHIRÁLNÍ SELEKTOR V KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZE	55
4.8.1 Vliv koncentrace chirálního selektoru na elektroforetickou pohyblivost analytů a enantioselektivitu	55
4.9 DUÁLNÍ SYSTÉM	60

5. ZÁVĚR.....	61
6. LITERATURA	62

Seznam zkratek a symbolů

ACN	acetonitril
boc	terc-butoxykarbonyl
<i>c</i>	molární koncentrace
CD	cyklodextrin
CZE	kapilární zónová elektroforéza
d_i	vzdálenost uražená <i>i</i> -tým analytem od startu v TLC
d_m	vzdálenost uražená čelem mobilní fáze od startu v TLC
<i>E</i>	intenzita elektrického pole
EOF	elektroosmotický tok
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
<i>I</i>	procházející elektrický proud
K_1	konstanta stability komplexu 1
K	úplná koeluce píků
L_c	celková délka separační kapiláry
L_d	délka separační kapiláry od vstupního konce k detektoru
MeOH	methanol
N	hodnota, kterou nabylo možné odešíst ze záznamu, vzhledem ke spojení zóny analytu se značkovačem elektroosmotického toku
ND	nedetekováno
NMR	nukleární magnetická rezonance
PEMEDA-β-CD	dichlorid mono-6-deoxy-6- <i>N,N,N',N',N'</i> -pentamethyl-ethylen-diamonio-cyklomaltoheptosy
PEMPDAβ-CD	dichlorid mono-6-deoxy-6- <i>N,N,N',N',N'</i> -pentamethyl-propylen-diamonio-cyklomaltoheptosy
Q_i	náboj částice <i>i</i>
r_i	poloměr částice <i>i</i>
R_F	retardační faktor
$t_{mig,i}$	migrační čas látky <i>i</i>
t_{EOF}	migrační čas elektroosmotického toku
TLC	tenkovrstvá chromatografie
<i>U</i>	elektrické napětí

UV	ultrafialové záření
v	objemová procenta
$v_{\text{ef},i}$	rychlost částice i v elektrickém poli
v_{EOF}	rychlost elektroosmitického toku v elektrickém poli
VIS	viditelné záření
α	separační selektivita
ε	relativní permitivita prostředí
ζ	zeta potenciál
η	viskozita prostředí
λ	vlnová délka
$\mu_{\text{ef},i}$	elektroforetická pohyblivost látky i
μ_{EOF}	elektroosmotická pohyblivost

1. Úvod

V posledních třiceti letech se stupňuje zájem o separaci a následně i kvantifikaci optických isomerů v různých vzorcích z oblastí farmacie, potravinářství, životního prostředí či klinické praxe. Tento jev je způsoben zejména tím, že často bývá jeden enantiomer biologicky neaktivní, popřípadě má jiný, někdy dokonce i negativní účinek. Bylo vyvinuto mnoho technik, zejména vysokoúčinných separačních, které jsou schopné rozdělit enantiomery, ale kapilární elektroforéza má oproti plynové chromatografii nebo vysokoúčinné kapalinové chromatografii mnoho výhod. Například to, že stabilita analytů není omezena tolik teplotou, dochází k menším spotřebám rozpouštědel a vzorků, analýzy jsou účinnější a kratší, stačí jednodušší přístrojové vybavení a v neposlední řadě existuje mnoho způsobů uspořádání této metody¹.

V průběhu let bylo připraveno mnoho chirálních selektorů, ale nejrozšířenější skupinou jsou jednoznačně cyklodextriny a jejich deriváty. Těch se každoročně syntetizuje a využije při enantioseparacích značné množství.

Cyklodextriny jsou cyklické oligosacharidy, které ve vodném prostředí tvoří inkluzní komplexy s mnoha látkami. Toho se využívá při chirálních separacích, ale také se používají k transportu léků k cílovým tkáním, katalyzám, k ovlivnění rozpustnosti či maskování. Chemickými modifikacemi lze poměrně snadno specificky upravit jejich fyzikální a chemické vlastnosti, jako je rozpustnost či možnosti jejich interakcí. Existuje již velké množství různých derivátů, které jsou komerčně dobře dostupné. Ve většině případů se však jedná o náhodně substituované deriváty. U takového produktu není možné přesně popsat jeho vlastnosti a výsledky s nimi dosažené mají tudíž horší reprodukovatelnost. Proto je snaha syntetizovat monosubstituované deriváty cyklodextrinů. Jejich syntéza je sice náročnější, ale tyto látky jsou pak mnohem více regioselektivní, což je pro stereoselektivitu podstatné^{2,3}.

Při použití nabitých cyklodextrinových derivátů lze separovat i nenabité analyty. Navíc u permanentně nabitých derivátů je sice nutné zajistit konstantní hodnotu pH základního elektrolytu během analýzy, ale tu lze volit v mnohem širším rozsahu a lze tak k separaci využít i coulombické interakce.

Jak již bylo zmíněno výše, syntéza monosubstitovaných derivátů je poměrně náročná, a tak i výtěžky nejsou příliš vysoké, většinou se jedná o miligramová množství. Proto je

výhodné ke studiu vlastností těchto cyklodextrinů používat kapilární elektroforézu, kde lze snadno měnit podmínky analýzy a spotřeba zásobních roztoků je minimální.

2. Teoretický úvod

2.1 Elektroforéza

2.1.1 Historie

První principy, na kterých je založena separace látek pomocí elektrického pole, byly popsány již v roce 1892 zjištěním, že se anorganické částice v koloidním roztoku v elektrickém poli pohybují. Následně se pohyb částic v elektrickém poli potvrdil u proteinů putujících ve vodných roztocích. A v třicátých letech dvacátého století bylo zkonstruováno první zařízení, které bylo tímto způsobem schopno rozdělit proteiny krevního séra. Za tuto práci dostal v roce 1948 Arne Tiselius Nobelovu cenu. Kapilární elektroforéza, při které byla použita křemenná kapilára s vnitřním průměrem 75 μm , byla popsána až roku 1981 J. W. Jorgensonem a K. D. Lukacsovou a byl tak zahájen velký rozvoj této metody^{4,5}. První komerční přístroj pro kapilární elektromigrační metody se začal prodávat v roce 1988⁶.

Dnes existuje šest základních kapilárních elektromigračních separačních technik, které se dělí zejména dle mechanismu separace a dále dle média přítomného v separační kapiláře. Jedná se o:

- kapilární zónovou elektroforézu
- kapilární gelovou elektroforézu
- micelární elektrokinetickou kapilární chromatografii
- elektrochromatografii v naplněných kapilárách
- kapilární izoelektrické fokusování
- kapilární izotachoforézu⁶

2.1.2 Základy kapilární zónové elektroforézy

Kapilární zónová elektroforéza patří do skupiny elektromigračních metod, které k separaci nabitých složek vzorku využívají vlivu elektrického pole. Jedná se o jednu z nejjednodušších metod z této skupiny, protože k rozdělení látek dochází v kapiláře, která je nejčastěji křemenná, v homogenním prostředí základního elektrolytu na základě různých pohyblivostí jednotlivých ionogenních látek a tento pohyb se nazývá migrace⁷.

Nabité částice jsou v elektrickém poli urychleny silou, která je přímo úměrná náboji částice Q [C] a intenzitě elektrického pole E [$\text{V}\cdot\text{m}^{-1}$]. Proti této síle, jejíž směr je dán znaménkem náboje, působí síla třecí. Velikost této síly závisí na poloměru částice r_i [m]

a na viskozitě prostředí η [$\text{kg}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$], ve kterém se pohybuje. V rovnováze se tyto síly sobě rovnají a rychlost pohybu částice je tak přímo úměrná náboji částice a intenzitě elektrického pole a nepřímo úměrná velikosti částice a viskozitě prostředí⁵. Vlastnosti prostředí a parametry i -tého iontu lze zahrnout do jedné proměnné nazývané elektroforetická pohyblivost $\mu_{\text{ef},i}$ (rovnice 1). Výslednou rychlost i -tého iontu, lze tedy vyjádřit vztahem (rovnice 2)⁶.

$$\mu_{\text{ef},i} = Q_i / 6\pi r_i \eta \quad [\text{m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}] \quad (1)$$

$$v_{\text{ef},i} = E \mu_{\text{ef},i} \quad [\text{m} \cdot \text{s}^{-1}] \quad (2)$$

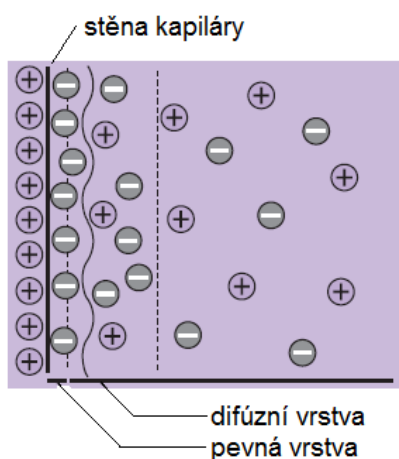
Intenzita elektrického pole v kapiláře se udává jako poměr vloženého napětí U [V] na koncích kapiláry a délky kapiláry L [m] (rovnice 3).

$$E = U/L \quad [\text{V} \cdot \text{m}^{-1}] \quad (3)$$

Z rovnice (1) je vidět, že malé látky s větším nábojem mají vyšší mobilitu, než látky velké a méně nabitě. K separaci tedy dochází díky rozdílným molekulovým hmotnostem, tvaru a náboji mezi látkami, popřípadě stupni solvatace molekul. Kapilární zónová elektroforéza se ale nehodí pro separace nenabitých látek⁶.

2.1.3 Elektroosmotický tok

Mezi transportní jevy uplatňující se v elektroforéze patří elektroforetická pohyblivost



Obrázek 2.1 Elektrická dvojvrstva na stěně kapiláry⁵

jednotlivých látek a dále elektroosmotický tok. Ten vzniká působením stejnosměrného elektrického pole na difúzní část elektrické dvojvrstvy, která se nachází na rozhraní mezi pevnou a kapalnou částí vnitřní strany kapiláry (obr. 2.1). Imobilizovaná část dvojvrstvy vzniká adsorpcí jednoho druhu iontů na stěně kapiláry či disociací ionogenních skupin na stěně kapiláry; u křemenných kapilár se jedná o silanolové skupiny⁷. Tento náboj na stěně kapiláry je kompenzován tenkou vrstvou opačného náboje a

vzniká tak pevná elektrická dvojvrstva, zvaná také Helmholtzova vrstva, a dále difuzní vrstva. Mezi stěnou kapiláry a vrstvou k ní přiléhající tak vzniká potenciál označovaný jako zeta-potenciál. Po vložení napětí na kapiláru se ionty začnou pohybovat k příslušné elektrodě a díky vnitřnímu tření prostřednictvím solvátových obalů v kapalině jsou schopné s sebou strhnout celý objem roztoku přítomný v separační kapiláře. Elektroosmotický tok unáší veškeré ionty v separační kapiláře stejnou rychlostí, nepřispívá tedy k separaci, ale ovlivňuje migrační rychlost analytů a celkově tedy dobu analýzy a účinnost separace. Rychlost elektroosmotického toku vyjadřuje rovnice (4):

$$v_{\text{EOF}} = (\varepsilon \cdot \zeta / \eta) \cdot E \quad [\text{m} \cdot \text{s}^{-1}] \quad (4)$$

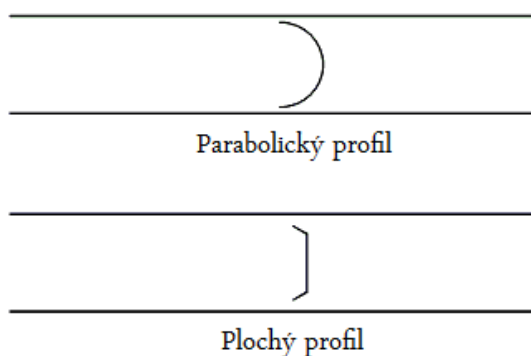
kde ε je relativní permitivita základního elektrolytu, η je jeho viskozita [$\text{kg} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$] a ζ je potenciál vnitřního povrchu kapiláry tedy zeta potenciál [V]⁸.

Do jedné proměnné nazývané elektroosmotická pohyblivost μ_{EOF} můžeme opět shrnout vlastnosti prostředí (rovnice 5).

$$\mu_{\text{EOF}} = \varepsilon \cdot \zeta / \eta \quad [\text{m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}] \quad (5)$$

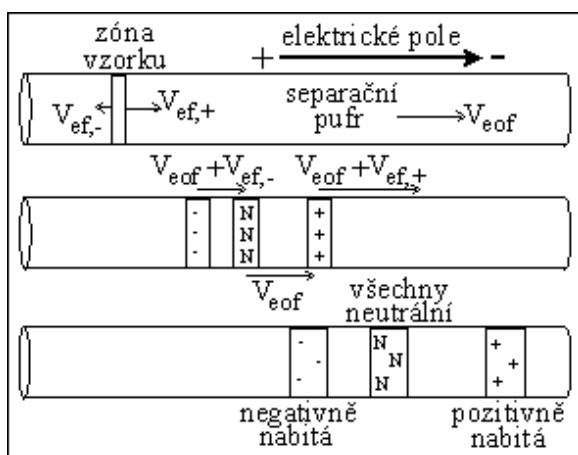
Zeta potenciál je závislý na velikosti náboje na stěně kapiláry, a protože je tento náboj závislý na pH, je i velikost elektroosmotického toku závislá na pH základního elektrolytu. Stěna nepokryté křemenné kapiláry je více deprotonovaná při vysokém pH a generuje se tak větší elektroosmotický tok, který se dle pH v rozmezí hodnot 2 až 12 může lišit i více jak o řád⁵.

Velikou výhodou elektroosmotického toku je jeho plochý profil (obr. 2.2). Elektroosmotický tok tak nepřispívá k rozmývání píků. Toho u jiných separačních technik, které používají k vytvoření toku externí pumpy, nelze docílit a jejich tok má pak parabolický profil. Toto je jeden z důvodů, proč je elektroforéza v řadě případů účinnější než chromatografie.



Obrázek 2.2 Typy profilů

Elektroosmotický tok unáší látky pouze jedním směrem a je tedy možné při jedné analýze rozseparovat kladně i záporně nabitě ionty. Při klasickém uspořádání kapilární zónové elektroforézy a při použití křemenné nepokryté kapiláry, po vložení napětí na její konce v řádech desítek kV, dochází k pohybu kationtů ke katodě konstantní elektroforetickou rychlostí a aniontů směrem k anodě. Protože ve většině případů je elektroosmotický tok větší než elektroforetická pohyblivost aniontů, tak i ty doputují ke katodě, kde bývá většinou umístěný detektor (obr. 2.3)^{6,7}.

Obrázek 2.3 Princip CZE separace nabitých složek vzorku⁶

V praxi se elektroosmotická pohyblivost μ_{EOF} a elektroforetické pohyblivosti $\mu_{ef,i}$ separovaných kationtů a aniontů při zvolených experimentálních podmínkách, jako je teplota, viskozita, iontová síla a pH základního elektrolytu, vypočítají pomocí rovnice (6) a rovnice (7):

$$\mu_{EOF} = L_d \cdot L_c / U \cdot t_{EOF} \quad [\text{cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}] \quad (6)$$

$$\mu_{ef,i} = L_d \cdot L_c / U \cdot (1/t_{mig,i} - 1/t_{EOF}) \quad [\text{cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}] \quad (7)$$

kde L_d je délka separační kapiláry od vstupního konce k detektoru [cm], L_c je celková délka separační kapiláry [cm], U je vložené napětí během analýzy [V], $t_{\text{mig},i}$ je pozorovaný migrační čas i -tého analytu [s] a t_{EOF} je migrační čas značkovače elektroosmotického toku [s]^{6,9}.

Separací selektivitu α dvojice separovaných složek lze vypočítat z poměru pozorovaných migračních časů později a dříve eluující složky $t_{\text{mig},2}$ a $t_{\text{mig},1}$, od kterých je odečten migrační čas značkovače elektroosmotického toku t_{EOF} (rovnice 8)⁸.

$$\alpha = (t_{\text{mig},2} - t_{\text{EOF}}) / (t_{\text{mig},1} - t_{\text{EOF}}) \quad (8)$$

2.1.4 Ovlivnění separace

Na separaci má značný vliv elektroosmotický tok, tedy i jeho změna. Té lze snadno docílit změnou typu základního elektrolytu nebo jeho hodnotou pH. Velikost elektroosmotického toku může ovlivnit i iontová síla, tedy koncentrace základního elektrolytu. Čím více je iontů v roztoku, tím více se zahustí elektrická dvojvrstva a sníží se tak elektroosmotický tok. Při nižších koncentracích se ale bohužel snižuje pufrací kapacita základního elektrolytu⁵.

Ke snížení elektroosmotického toku přispívá většinou přidávek organického modifikátoru do základního elektrolytu, protože ovlivňuje zeta potenciál⁶. Tento přidávek má i další vlivy. Často zamezuje případným coulombickým interakcím složek základního elektrolytu se stěnou kapiláry, což je pozitivní. Na druhou stranu u separací, které využívají komplexaci, může mít i negativní vliv, jelikož se modifikátor může komplexovat lépe než analyt.

Vliv na elektroosmotický tok mají i jiná aditiva základního elektrolytu, například povrchově aktivní látky adsorbující se na stěnu kapiláry⁵.

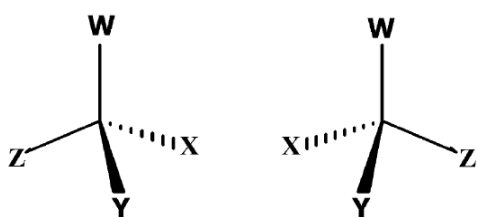
Další možností, jak ovlivnit separaci, je vložení většího napětí na kapiláru, ale tato možnost může mít omezení z důvodu zvýšení Jouleova tepla. Jedná se o zvyšování teploty roztoku směrem do středu kapiláry vlivem proudu, který při analýze prochází kapilárou. Čím je tedy napětí vyšší a kapilára širší, tím více tepla se musí odvést do okolí, jinak dochází k deformaci plochého profilu toku vlivem vytvoření parabolického teplotního gradientu uvnitř kapiláry⁶. Zvyšováním teploty dochází i ke snižování viskozity základního elektrolytu, a to až o 2 – 3 % na 1 °C⁵.

Pro analýzu mohou být použity i pokryté kapiláry, a to komerčně dostupné nebo

připravené v laboratorních podmínkách dynamickým pokrytím křemenné kapiláry vhodným činidlem. Vhodnou modifikací stěny kapiláry lze zastavit nebo i obrátit směr elektroosmotického toku, je-li to žádoucí. Bohužel tyto kapiláry mají nižší životnost a nevydrží takové výkyvy pH jako ty nepokryté⁵.

2.2 Chiralita

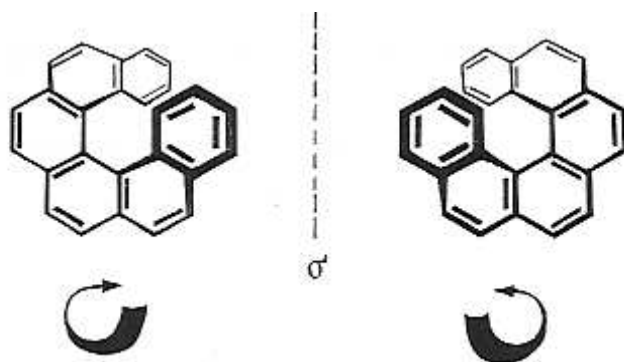
Pojem chiralita byl definován v roce 1904 lordem Kelvinem. Chirální sloučeniny jsou takové látky, které existují ve dvou formách a tyto formy jsou z hlediska konektivity atomů v molekule stejné, ale prostorovým uspořádáním se liší a jsou si svými zrcadlovými obrazy. Chiralita se tedy netýká pouze jednoho atomu v molekule, ale jedná se o vztah celé molekuly ke svému zrcadlovému obrazu. Existence jednoho prvku chiralitity sice vede k chiralitě celé molekuly, ale obsahuje-li molekula více prvků chiralitity, už chirální být nemusí. Může dojít k jejich vzájemnému vyrušení. Jednotlivé prvky chiralitity jsou popisovány pomocí tzv. absolutní konfigurace a jsou jim přiřazovány symboly *R* nebo *S*, dle prostorového uspořádání v molekule¹⁰. Enantiomery jsou opticky aktivní a stáčí rovinu polarizovaného světla o stejný úhel, ale v opačném směru. Podle toho na jakou stranu stáčí rovinu polarizovaného světla, se rozdělují na pravotočivé (*d*) a levotočivé (*l*) enantiomery. Látka, která obsahuje ekvimolární množství obou enantiomerů se nazývá racemát a nevykazuje optickou aktivitu. Enantiomery se v achirálním prostředí jeví jako totožné, ale v chirálním prostředí se liší ve svých vlastnostech^{11,12}.



Obrátek 2.4 Příklad centrální chiralitity¹³

Chiralitu lze dělit dle prvku chiralitity, který se v molekule uplatňuje. Existuje tedy chiralita centrální (molekula obsahuje chirální centrum – obr. 2.4), axiální (chirální osu) a planární (chirální rovinu). Existuje ještě chiralita helikální, která patří mezi inherentní chiralitu, což znamená, že v molekule není žádný prvek chiralitity, ale chiralita je dána stavbou molekuly z achirálních částí. Nejvýznamnějšími představiteli jsou helicity, u

kterých se od nejbližších k nejbližším částem lze dostat pohybem po asymetrické šroubovici (obr. 2.5).



Obrázek 2.5 Příklad helikální chiralitě u hexahelicenu¹⁴

Většina přírodních látek je chirálních a i živé organismy jsou chirálním prostředím a umí rozlišovat jednotlivé enantiomery. I když mají enantiomery stejné chemické složení a fyzikální vlastnosti, vykazují rozdíly v biologické aktivitě, tedy ve farmakologii, toxikologii, metabolismu aj. Z toho vyplývá, že jeden enantiomer může být méně biologicky aktivní nebo zcela neaktivní, v horším případě může mít i nežádoucí či dokonce toxické účinky. Proto je dostatečná enantioseparace zejména farmaceuticky významných látek velmi žádoucí, jak uvádí příklad chirálního thalidomidu. Ten byl prodáván ve formě racemátu pod obchodním názvem Contergan, Distaral, Softenin, aj. a jeho *S*-(-) forma měla teratogenní účinky^{13,15}.

Jako další příklad z praxe lze uvést různé chirální pesticidy. U některých vykazuje požadovanou aktivitu pouze jeden z enantiomerů a u některých má každý z enantiomerů jinou degradační cestu, z nichž jedna může vést k toxickým produktům¹⁶.

2.3 Chirální separace v kapilární elektroforéze

Jako první upozornil na možnost uplatnění kapilární elektroforézy v chirálních separacích roku 1985 Gassman, když se mu podařilo enantioseparovat dansylované aminokyseliny v krátkém čase pomocí přídavku chirálního činidla (komplexu měďnatých iontů s L-histidinem) do základního elektrolytu¹⁷. Od té doby se počet publikací na toto téma rychle zvýšil a dnes více než polovina prací, zaměřujících se na chirální separace, využívá kapilární elektroforézu jako separační techniku¹⁶. Jako chirální činidla se používají komplexy mědi s aminokyselinami, makrocyclická antibiotika, chirální crown ethery, proteiny, oligo- a polysacharidy, cyklofruktany,

cyklodextriny a jejich deriváty nebo různé chirální micely^{1,18}.

Enantiomery nemohou být separovány na základě rozdílných elektroforetických pohyblivostí bez přidání chirálního selektoru do základního elektrolytu nebo bez předchozí derivatizační reakce s chirálním činidlem, protože jejich fyzikálně chemické vlastnosti jsou v achirálním prostředí stejné a pohybují se tedy v separační kapiláře stejně rychle.

Enantioseparace je možné provádět přímým anebo nepřímým způsobem. U nepřímého způsobu je nutné nejprve provést chirální derivatizaci pomocí opticky čistého činidla za vzniku diastereoisomerního páru. Derivatizované enantiomery lze následně separovat v nechirálním separačním systému. Tato metoda vyžaduje použití vysoce opticky čistého derivatizačního činidla a optimalizování derivatizační reakce. Proto je tento postup využíván v praxi méně.

U přímé separace se využívá přednostně metody přidání chirálního selektoru do základního elektrolytu. Při separaci se využívá toho, že chirální selektor je schopen interagovat s jedním z enantiomerů více než s druhým, a to pomocí vodíkových můstků, interakcí přenosu náboje, hydrofobními interakcemi, elektrostatickými nebo dipól-dipól interakcemi aj. Vznikají tak labilní (přechodné) komplexy mezi jednotlivými enantiomery a chirálním selektorem (diastereoisomerní páry), které se liší v konstantě stability, a může tak dojít k jejich separaci.

I přímá separace má několik nevýhod. Během separace může docházet k interakci chirálního selektoru se stěnou kapiláry, může se příliš zvýšit celková vodivost systému a tak i Jouleovo teplo, selektor může být v separačních podmínkách nestabilní či špatně rozpustný, může i značně absorbovat v UV oblasti, což vede ke snížení citlivosti UV detekce. Přidání organického modifikátoru do základního elektrolytu může zlepšit rozpustnost a někdy i stabilitu selektoru, popřípadě omezit interakci se stěnou kapiláry. Většinou stačí i přídavek malého množství^{1,6}.

Teoretický model pro přímé separace byl poprvé popsán Wrenem a Rowem na začátku devádesátých let, kteří matematicky odvodili optimální koncentraci cyklodextrinu vhodnou pro maximální rozlišení¹⁹. Vigh pak v roce 1993 zahrnul mezi separační parametry kromě typu a koncentrace chirálního selektoru i pH základního elektrolytu²⁰. Oba modely pracují se systémem, kdy je koncentrace základního elektrolytu mnohonásobně vyšší než koncentrace cyklodextrinu (chirálního selektoru) a

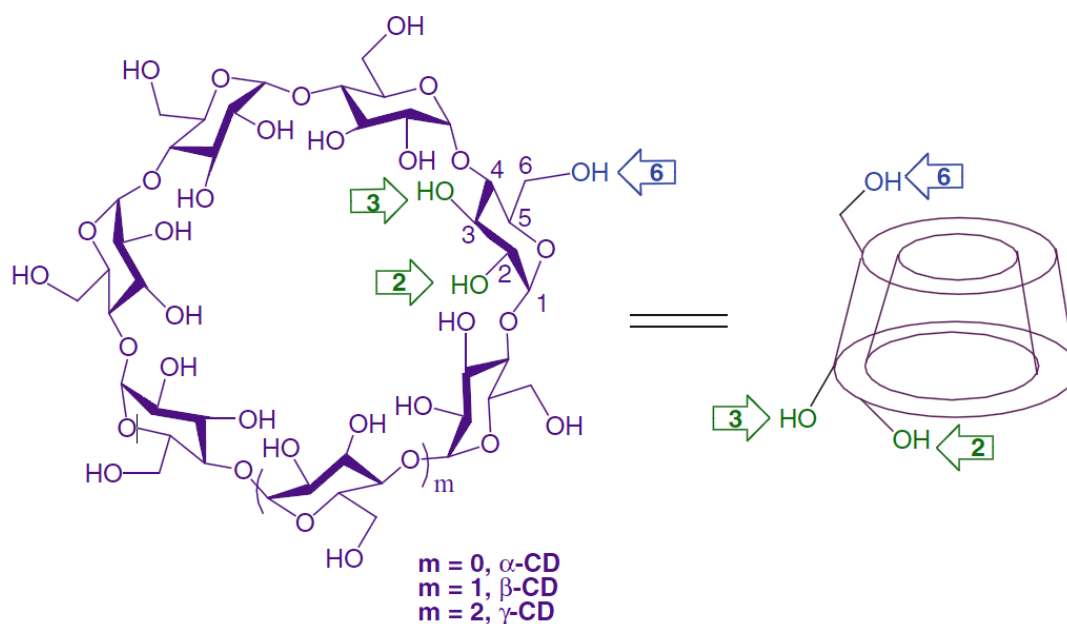
jeho koncentrace je vyšší než koncentrace analytu. Takže lze předpokládat, že analytická koncentrace cyklodextrinu je skoro stejná jako koncentrace komplexu cyklodextrin-pufr a nezmění se i když se do roztoku přidá analyt. Při analýzách většinou platí, že stechiometrie interakce mezi analytem a chirálním selektorem je 1:1. Potom je možné určit rozdíl v mobilitách mezi jednotlivými enantiomery pomocí rovnice (9):

$$\Delta\mu = \mu_1 - \mu_2 = (\mu_E + \mu_{E1S}K_1[S])/(1 + K_1[S]) - (\mu_E + \mu_{E2S}K_2[S])/(1 + K_2[S]) \quad (9)$$

kde μ_1 a μ_2 jsou elektroforetické pohyblivosti prvního a druhého enantiomeru, μ_E je elektroforetická pohyblivost obou nekomplexovaných enantiomerů v roztoku, μ_{E1S} a μ_{E2S} jsou elektroforetické pohyblivosti jednotlivých komplexů enantiomer-chirální selektor, K_1 a K_2 jsou konstanty stability komplexů jednotlivých enantiomerů s chirálním selektorem a $[S]$ je rovnovážná koncentrace chirálního selektoru. K dobré chirální separaci dochází, pokud je komplexační rovnováha rychlá a vratná¹. Z rovnice (6) vyplývá, že k rozdělení enantiomerů je nutné, aby měl každý z nich jinou mobilitu v asociovaném stavu nebo se lišily jejich konstanty stability. Kdyby se lišila mobilita jen mezi volnou a asociovanou formou, ale ve výsledku by to byl stejný rozdíl pro oba enantiomery, a konstanty stabilit K_1 a K_2 byly stejné, nedocházelo by k separaci²¹.

2.4 Cyklodextriny

Cyklodextriny byly objeveny v roce 1891, ale detailně byly popsány až v roce 1903 Schardingerem²². Jedná se o cyklické oligosacharidy složené z D-(+)-glukopyranosových jednotek spojených vazbou α -(1,4). Nativní cyklodextriny, využívané v analytické chemii, se sestávají ze šesti, sedmi či osmi glykopyranosových jednotek a jsou označovány vzestupně dle jejich počtu jako α -, β - a γ -cyklodextriny (obr. 2.6)²³.

Obrázek 2.6 Struktura cyklodextrinů²²

Cyklodextriny mají tvar toroidu (dutého kužele), který má na užším okraji primární a na širším okraji sekundární hydroxylové skupiny. Vnitřek toroidu, nazývaný kavita, má lipofilní charakter způsobený orientací nepolární vazby do kavity. Oproti tomu vnější strana je dostatečně hydrofilní, což způsobuje, že je cyklodextrin rozpustný ve vodě. Velikost kavity je pro každý typ cyklodextrinu jiná a polarita uvnitř dutiny klesá s jejím rozměrem^{22,24}. Základní charakteristiky α -, β - a γ -cyklodextrinu shrnuje tabulka 2.1.

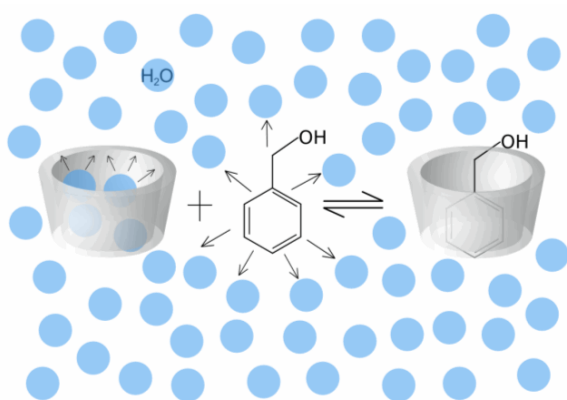
Tabulka 2.1 Vlastnosti cyklodextrinů²²

	α -CD	β -CD	γ -CD
počet glukosových jednotek	6	7	8
molární hmotnost [g·mol ⁻¹]	973	1135	1297
rozpustnost ve vodě při 25 °C [g/100 ml]	14,5	1,85	23,2
průměr kavity: horní/dolní [nm]	0,47/0,52	0,60/0,64	0,75/0,83
přibližný objem kavity [nm ³]	1,74	2,62	4,27

Cyklodextriny se i v nativní formě liší svojí rozpustností ve vodě. β -Cyklodextrin je přibližně o řád méně rozpustný než zbylé dva cyklodextriny. Jeho rozpustnost lze výrazně zvýšit přidáním močoviny, soli, nebo organického modifikátoru (zejména dimethylsulfoxidu) do roztoku²⁵. Nízká rozpustnost β -cyklodextrinu je způsobena

tvorbou intramolekulárních vodíkových vazeb mezi hydroxylovými skupinami na C-2 jedné glukopyranosové jednotky a hydroxylovými skupinami na C-3 u sousední glukopyranosové jednotky. Tyto vazby pak tvoří souvislý pás a molekula je tak velmi rigidní. Oproti tomu u α -cyklodextrinu pás vodíkových vazeb není úplný, ze šesti možných vazeb se tvoří pouze čtyři z důvodu drobné deformace jedné glukopyranosové jednotky, a proto je více rozpustný. γ -Cyklodextrin je z těchto tří oligosacharidů nejvíce rozpustný díky své flexibilní struktuře²⁶.

Důležitou vlastností cyklodextrinů je jejich schopnost tvořit inkluzní komplexy tzv. hostitel-host komplexy (obr. 2.7). Látka s vhodnými strukturálními vlastnostmi (host) je schopná interagovat s kavitou hostitele. Vzniklé komplexy nejsou trvalé, podléhají dynamické rovnováze, kdy vznikají a zanikají nekovalentní vazby mezi nepolárními skupinami hosta s dutinou cyklodextrinu¹⁸. K oddělení enantiomerů musí ale přispívat i další interakce, a to mezi substituenty asymetrického centra analytu a hydroxylovými skupinami na okraji cyklodextrinu²². Asi nejvíce sloučenin je vhodným hostem pro β -cyklodextrin, a proto je komerčně nejdostupnějším. Vhodnými látkami, které dobře zapadají do jeho kavity, jsou ty, co obsahují jeden až dva aromatické kruhy. Pro látky s maximálně jedním aromatickým kruhem či lineárním alkylovým řetězcem se zase více hodí α -cyklodextriny a γ -cyklodextriny se využívají pro separace látek s více komplexní strukturou¹⁸. Pokud vznikne komplex hostitel-host, tak je tento komplex hydrofilnější než samotný host a toho se využívá třeba ve farmacii pro zvýšení rozpustnosti některých léků ve vodě²⁶.



Obrázek 2.7 Vznik inkluzního komplexu mezi cyklodextrinem a analytem s naznačením repulzních sil²⁷.

2.5 Cyklodextriny a jejich deriváty jako selektory v kapilární elektroforéze

2.5.1 Obecné informace

Cyklodextriny jako chirální látky neabsorbující v UV oblasti jsou i díky poměrně dobré rozpustnosti a relativně snadné modifikaci oblíbenými chirálními selektory¹. Například nativní β -cyklodextrin má 35 různých chirálních center²¹. Poprvé byly využity ve spojení s isotachoforézou v roce 1987 Jelínkem a kol. jako aditivum v základním elektrolytu²⁸ a o rok později byla stejnou separační metodou úspěšně provedena chirální separace Snopkem a kol.²⁹. Ve spojení s kapilární zónovou elektroforézou byly cyklodextriny využity Fanalim v roce 1989³⁰. Dnes již dochází i k vývoji rychlých chirálních elektroforetických separací s použitím mikročipů, které využívají jako chirální selektory cyklodextriny^{31,32}.

Výhodou použití elektroforézy při chirálních separacích je nízká spotřeba vzorků i selektoru, který lze v případě jeho přidávání do základního elektrolytu rychle měnit. Analýzy bývají rychlé a probíhají při nízkých teplotách, takže lze separovat široké spektrum vzorků. Navíc se díky plochému profilu elektroosmotického toku dosahuje vysoké účinnosti²¹. Na druhé straně oproti ostatním separačním metodám poskytuje kapilární elektroforéza nižší selektivitu, vyšší limity detekce a může docházet i k předávkování kapiláry¹.

Samotné enantioselektivní dělení pak lze snadno ovlivňovat pomocí změn v koncentraci či typu cyklodextrinu, dále složením a hodnotou pH základního elektrolytu či přidáním aditiv, teplotou kapiláry, aplikovaným napětím aj.¹⁸. Cyklodextriny lze také používat v duálních systémech, a to v různých kombinacích či ve spojení s jinými chirálními selektory jako třeba s crown ethery^{1,33}.

Lze pracovat s vodnými, polárně organickými či nepolárními pufrů, a to pokaždé s jinou selektivitou. Nevodné systémy navíc nabízejí možnost tvorby iontových párů, především ty jsou pak zodpovědné za chirální dělení²¹. A pro nativní a neutrální cyklodextriny jsou kvůli jejich nízké rozpustnosti ve vodě velmi vhodné^{34,35}.

Deriváty cyklodextrinů lze rozdělit na neutrální, pozitivně nabitě, negativně nabitě, amfoterní a polymerizující¹. Existuje velké množství funkčních skupin, kterými se již podařilo nativní cyklodextriny zmodifikovat. Jejich výčet shrnuje mnoho vydaných přehledných článků^{1,3,18,21,36}. Modifikací cyklodextrinů se změní i jejich vlastnosti, lze tak zvýšit jejich rozpustnost, zlepšit komplexační schopnosti a jiné vlastnosti. Zejména

rozpustnost je klíčová při jejich použití v kapilární elektroforéze, kdy je výhodné využívat cyklodextriny derivatizované skupinami, které jsou ionizovatelné či mají permanentní náboj. Tak lze docílit lepší interakce mezi ionizovatelným analytem a selektorem³. Navíc má takto modifikovaný selektor při vhodném pH v elektrickém poli svou vlastní elektroforetickou pohyblivost¹⁸.

Cyklodextriny lze rozdělit i dle počtu substituovaných hydroxylových skupin na:

1. monosubstituované
2. definovaně několikanásobně substituované
3. několikanásobně náhodně substituované
4. persubstituované

U monosubstituovaných je v celé molekule cyklodextrinu substituována pouze jedna hydroxylová skupina na definované pozici. U definovaně několikanásobně substituovaných cyklodextrinů jsou derivatizovány některé hydroxylové skupiny v určitých pozicích, ale ne všechny, na rozdíl od náhodně substituovaných, které tvoří směs cyklodextrinů substituovaných do různých stupňů. V případě persubstituovaných cyklodextrinů jsou substituovány všechny hydroxylové skupiny.

V posledních letech se zaměřuje pozornost na monosubstituované cyklodextriny, kdy jsou všechny molekuly ekvivalentní. Je tak možné docílit větší reprodukovatelnosti a selektivity při separacích a lépe pochopit děje, které k separaci, respektive enantioseparaci vedou, například jaký vliv má i drobná modifikace. Je ale samozřejmé, že samotná syntéza takovýchto derivátů je mnohem obtížnější a nákladnější³. Většina komerčně dostupných cyklodextrinových derivátů je náhodně substituovaných. Nejedná se tedy o chemické individuum, ale o směs polohových isomerů a různě substituovaných homologů (mono-, di-, tri- a více substituovaných derivátů), kdy každý má trochu jiné separační schopnosti. Takovéto produkty jsou charakterizovány pomocí stupně substituce, který udává průměrný počet substituentů na cyklodextrinovém kruhu^{3,18,21}.

2.5.2 Neutrální cyklodextrinové deriváty

Neutrální cyklodextrinové deriváty nemají oproti nabitým derivátům tak dobrou rozpustnost a selektivitu, ale přidáním různých modifikátorů a zejména jejich použitím v duálních systémech je jejich využití poměrně široké³⁷. Nejpoužívanějším z těchto

derivátů je pravděpodobně hydroxypropyl- β -cyklodextrin, který vykazuje vysokou selektivitu, protože substituent obsahuje jak polární, tak i nepolární skupinu a jedno chirální centrum navíc. Dále se zejména v duálních systémech uplatňují částečně nebo i úplně methylované cyklodextriny^{1,21}.

2.5.3 Záporně nabitě cyklodextrinové deriváty

Negativně nabitě cyklodextriny mají větší spektrum využití než kladně nabitě deriváty, a to zejména díky jejich snadnější přípravě a tomu, že většina analyzovaných látek jsou léčiva, která bývají spíše bazického charakteru. Navíc je lze v případě špatně ve vodě rozpustných léčiv používat i při nevodných analýzách³⁶. Nejpoužívanějšími a pravděpodobně nejefektivnějšími jsou sulfatované a vysoce sulfatované cyklodextrinové deriváty²¹. Při vhodných koncentracích lze u některých analytů dosáhnout nekonečného rozlišení. Vzhledem k vysoké vodivosti těchto roztoků však může docházet k elektrodiperzi a tedy ke ztracení účinnosti. Tento problém většinou vyřeší přidání organického modifikátoru či použití duálního systému zejména s neutrálními deriváty cyklodextrinů¹.

Matthijs a kol. porovnali schopnost enantioseparace vysoce sulfatovaných cyklodextrinů s různými neutrálními cyklodextrinovými deriváty a následně i s jejich vzájemnými kombinacemi u 25 různých analytů a zjistili, že kombinací neutrálního a nabitěho cyklodextrinu lze dosáhnout lepších výsledků. Bylo ověřeno, že je těžké pomocí teoretického modelu odhadnout tu nejvhodnější kombinaci cyklodextrinů, protože se při dělení uplatňuje mnoho vlivů³⁸.

Většinou je výhodné používat deriváty se skupinami, které jsou silnými elektrolyty. Poté je totiž možné upravit pH základního elektrolytu v poměrně širokém rozsahu dle potřeb analytu bez ovlivnění náboje cyklodextrinu. Častěji se pak využívají základní elektrolyty s nízkým pH a v těchto případech dochází k potlačení elektroosmotického toku a ovlivnění enantioseparace¹.

2.5.4 Kladně nabitě cyklodextrinové deriváty

Kladně nabitý cyklodextrin mono-(6- β -aminoethylamino-6-deoxy)- β -cyklodextrin ve spojení s elektroforézou, konkrétně s elektrokinetickou chromatografií, použil poprvé v roce 1989 Terabe³⁹. Dnes jejich využití, a to zejména monoderivátů β -cyklodextrinu,

v analytické chemii narůstá, protože jejich syntéza nebývá tolik náročná jako u jinak nabitých monoderivátů. Nejčastěji se substituují hydroxylová skupina na pozici C-6, ale existují i deriváty se substitucí na pozici C-2 nebo C-3¹. Kationtové cyklodextriny mohou být silnými elektrolyty, pokud mají jako substituenty kvartérní amoniové soli, anebo slabé elektrolyty, když obsahují primární, sekundární či terciální aminoskupiny⁴⁰.

Jejich používání je často limitováno jejich možnou adsorpcí na záporně nabitou stěnu kapiláry, což může komplikovat separaci¹. Další problém u nabitých derivátů, a to u několikanásobně kladně ale i záporně nabitých, bývá velká ztráta separační účinnosti způsobená nevhodnými interakcemi mezi cyklodextrinem a základním elektrolytem²¹.

U kladně nabitých cyklodextrinů dochází ke zlepšování separace s nárůstem jejich koncentrace až do dosažení maxima, po kterém už se enantioseparace nezlepšuje a někdy dokonce i zhoršuje. Je to způsobeno zejména rychlým nárůstem iontové síly až do dosažení rovnováhy tvorby komplexu cyklodextrinu s analytem. A kvůli ovlivnění elektroosmotického toku tak vzniklý komplex začíná putovat pomaleji. Tento trend potvrzuje teoretický model Wrena a Rowa popisující existenci maximální selektivity při určité koncentraci selektoru^{1,41}.

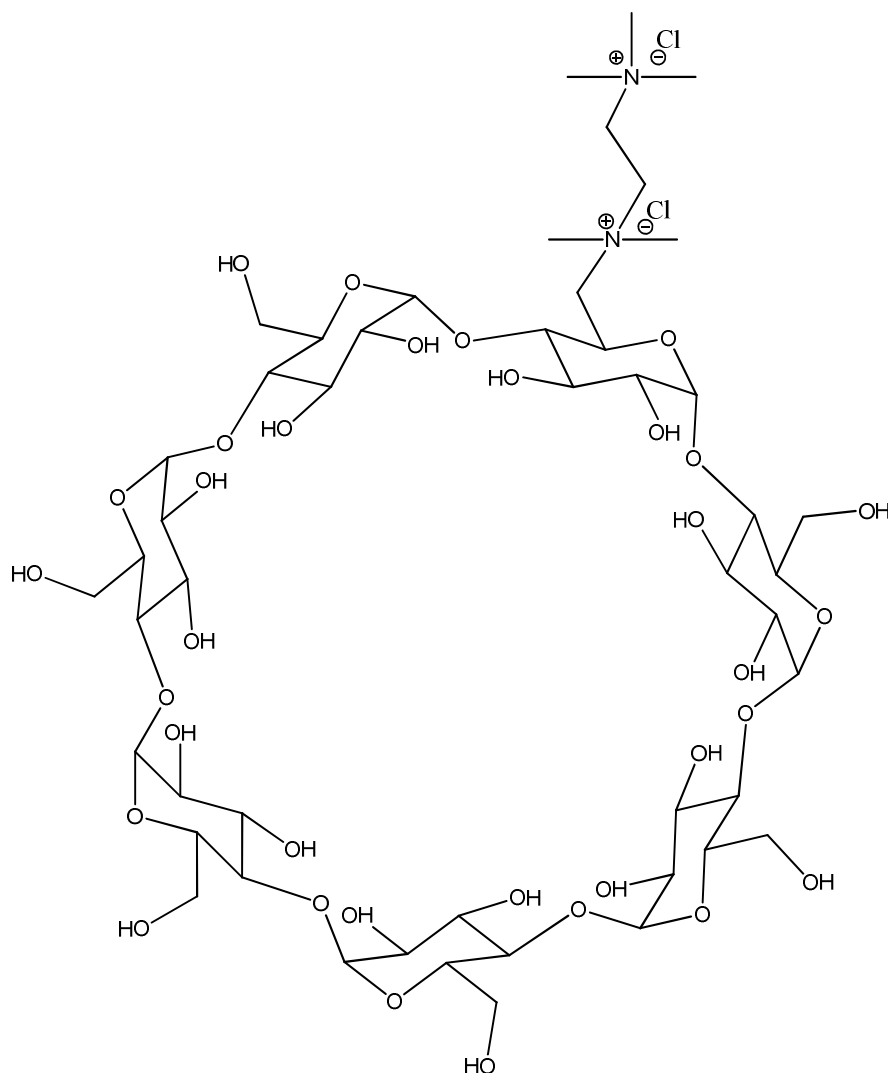
Kationtové cyklodextriny lze poměrně snadno připravovat jako permanentně nabitě a u těch je velkou výhodou, že není bezpodmínečně nutné udržovat přesnou hodnotu pH základního elektrolytu, ale naopak lze upravit jeho hodnotu tak, aby efektivní mobility komplexovaného a volného analytu byly opačné. Tak lze docílit co nejlepší enantioselektivní separace a i větší stability vzniklého komplexu. Navíc při použití monosubstituovaných cyklodextrinových derivátů je náboj a následně elektrostatická interakce mezi analytem a cyklodextrinem lokalizovaná vždy na stejném místě, takže to též přispívá k větší nesymetrii prostředí^{3,40}.

2.5.5 PEMEDA- β -cyklodextrin

PEMEDA- β -cyklodextrin (obr. 2.8) je monosubstituovaný permanentně dvakrát kladně nabitý derivát β -cyklodextrinu a jeho systematický název je mono(6-deoxy-6-*N,N,N',N',N'*-pentamethyl-ethylen-diamonium) derivát cyklomaltoheptosy. Substituent na pozici 6 obsahuje dvě kvartérní amoniové soli, které jsou od sebe vzdáleny přes dva uhlíky. Syntézu této látky podrobně popisuje publikace skupiny Jindřicha a Popra^{40,42}. Nejčastěji se syntetizuje ve formě diiodidu, ale je možná i varianta ve formě dichloridu,

kteřá se častěji používá pro analytické účely. Anion soli lze poměrně snadno zaměnit pomocí iontově-výměnné chromatografie.

PEMEDA- β -cyklodextrin je ve vodném roztoku náchylný k tzv. Hofmannově eliminaci, při které dochází k odštěpení koncové amoniové skupiny zejména za vysoké teploty a v bazickém pH⁴².



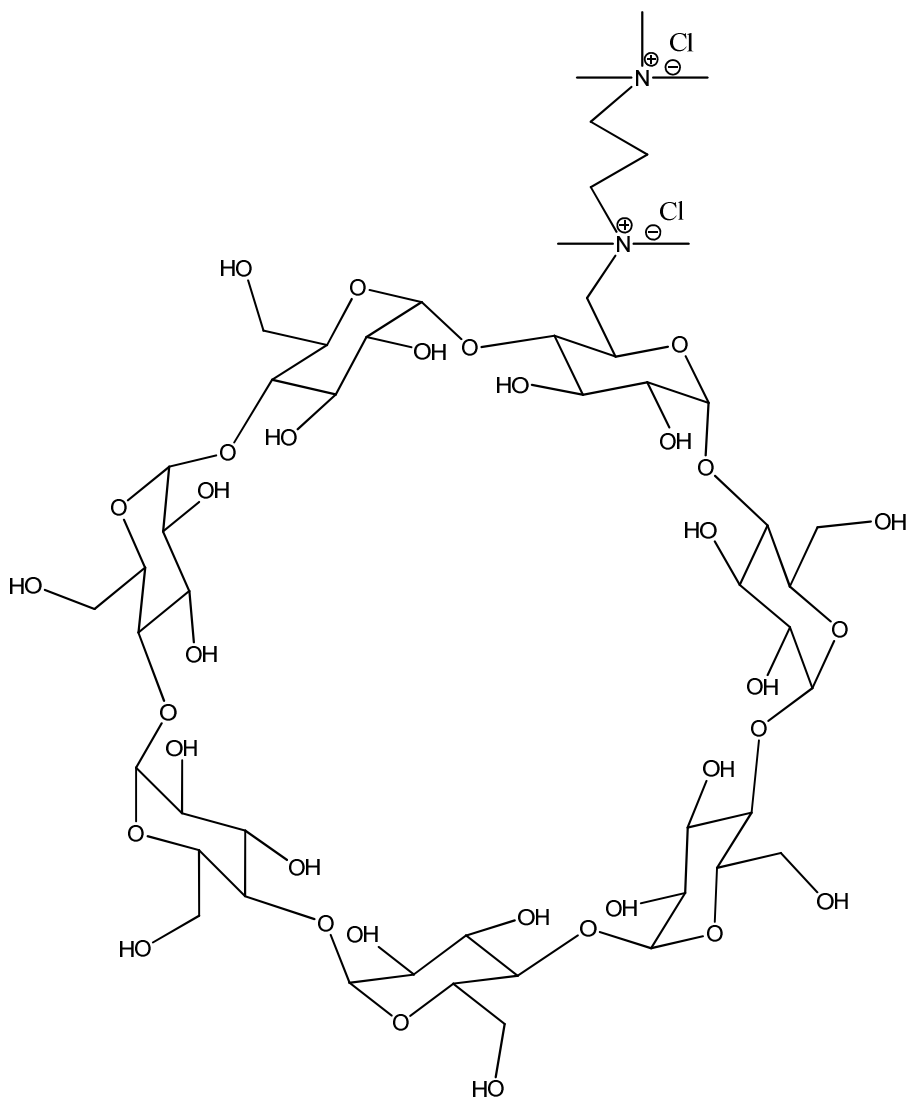
Obrázek 2.8 Strukturní vzorec PEMEDA- β -cyklodextrin dichloridu

2.5.6 PEMPDA- β -cyklodextrin

PEMPDA- β -cyklodextrin (obr. 2.9) je monosubstitovaný permanentně dvakrát kladně nabitý derivát β -cyklodextrinu a jeho systematický název je mono(6-deoxy-6-*N,N,N',N'*-pentamethyl-propylen-diamonium) derivát cyklomaltoheptosy. Substituent, který se nachází v pozici 6 na cyklodextrinu, tedy obsahuje dvě kvartérní amoniové soli, které jsou od sebe vzdáleny o tři uhlíky. Jako první popsal syntézu Popr,

Jindřich a kol., kterým se podařilo tuto látku syntetizovat s vysokými výtěžky a bez nutnosti dalšího přečišťování chromatografickými metodami⁴².

PEMPDA- β -cyklodextrin je stejně jako PEMEDA- β -cyklodextrin náchylný k Hofmannově eliminaci, ale měl by být odolnější vzhledem k tomu, že vzdálenost mezi kladně nabitými dusíky je o jeden uhlík delší než v případě PEMEDA- β -cyklodextrinu.



Obrázek 2.9 Strukturální vzorec PEMPDA- β -cyklodextrin dichloridu

2.6 Charakterizace cyklodextrinů

Při syntéze cyklodextrinů lze nejjednodušeji jejich čistotu či správný průběh syntézy ověřit pomocí tenkovrstvé chromatografie. Stacionární fáze, nejčastěji silikagel či alumina, je nanášena v tenké vrstvě na vhodné destičce, na jejíž okraj se nanáší vzorek. Destička se poté nechává v nádobě, která je nasycená parami mobilní fáze, jež se

nachází na dně nádoby, a vzlínáním mobilní fáze vrstvami stacionární fáze destičky dochází k unášení analytu vzhůru a k jeho rozdělování mezi stacionární a mobilní fázi. Před dosažením konce destičky mobilní fázi je analýza ukončena a po vysušení destičky dochází k vyhodnocení skvrn, tedy k určení místa, kam doputoval analyt, vhodnou zobrazovací technikou. Jako základní veličina, která určuje polohu separovaných zón, se používá tzv. retardační faktor R_F , který se vypočítá dle rovnice (10):

$$R_F = d_i / d_m \quad (10)$$

kde d_i znamená vzdálenost, kterou urazil i -tý analyt od startu [cm] a d_m je vzdálenost uražená čelem mobilní fáze od startu [cm]. Reprodukovatelnost tohoto faktoru není příliš velká a velmi závisí na podmínkách vyvíjení. Proto je při každé analýze vhodné vyvíjet kromě vzorku i standard a poté výsledky porovnat^{6,43}.

Další chromatografické techniky, které lze pro charakterizaci cyklodextrinů použít, jsou vysokoúčinná kapalinová chromatografie a kapilární elektroforéza. U těchto technik bývá problém, že cyklodextriny neabsorbují UV záření, a proto je nutné při použití UV detektoru využít nepřímé detekce¹⁸. Tanaka a Terabe použili techniku kapilární elektroforézy s nepřímou detekcí za použití pyridinium chloridu přidaného do základního elektrolytu k rozseparování komerčně dostupného tetraalkylamonium- β -cyklodextrinu (QA- β -CD). Následně bylo pomocí hmotnostní spektrometrie určeno, že se jedná o směs různých cyklodextrinových derivátů, které se liší ve stupni substituce⁴⁴. Cyklodextriny lze tedy analyzovat i pomocí spektrálních metod.

Dalšími významnými technikami pro charakterizaci cyklodextrinů jsou nukleární magnetická rezonance a fotonová kolerační spektroskopie. Pomocí fotonové kolerační spektroskopie, která využívá fluktuace intenzity rozptylu světla laseru v suspenzích, lze určit velikost molekuly v roztoku. U cyklodextrinů se tímto ověřuje, zda tyto molekuly spolu neagregují⁴⁵. NMR využívá magnetických vlastností jader některých izotopů a používá se k ověřování struktur a určení poloh substituentů na cyklodextrinech⁴⁶.

2.7 Cíle práce

1. Otestovat možnosti použití PEMEDA- β -cyklodextrinu a PEMPDA- β -cyklodextrinu jako chirálních selektorů v kapilární elektroforéze a porovnat jejich enantioselektivní schopnosti u vybraných analytů.
2. Optimalizovat podmínky elektroforetického měření pro chirální separace vybraných analytů.

3. Experimentální část

3.1 Materiál

3.1.1 Cyklodextriny

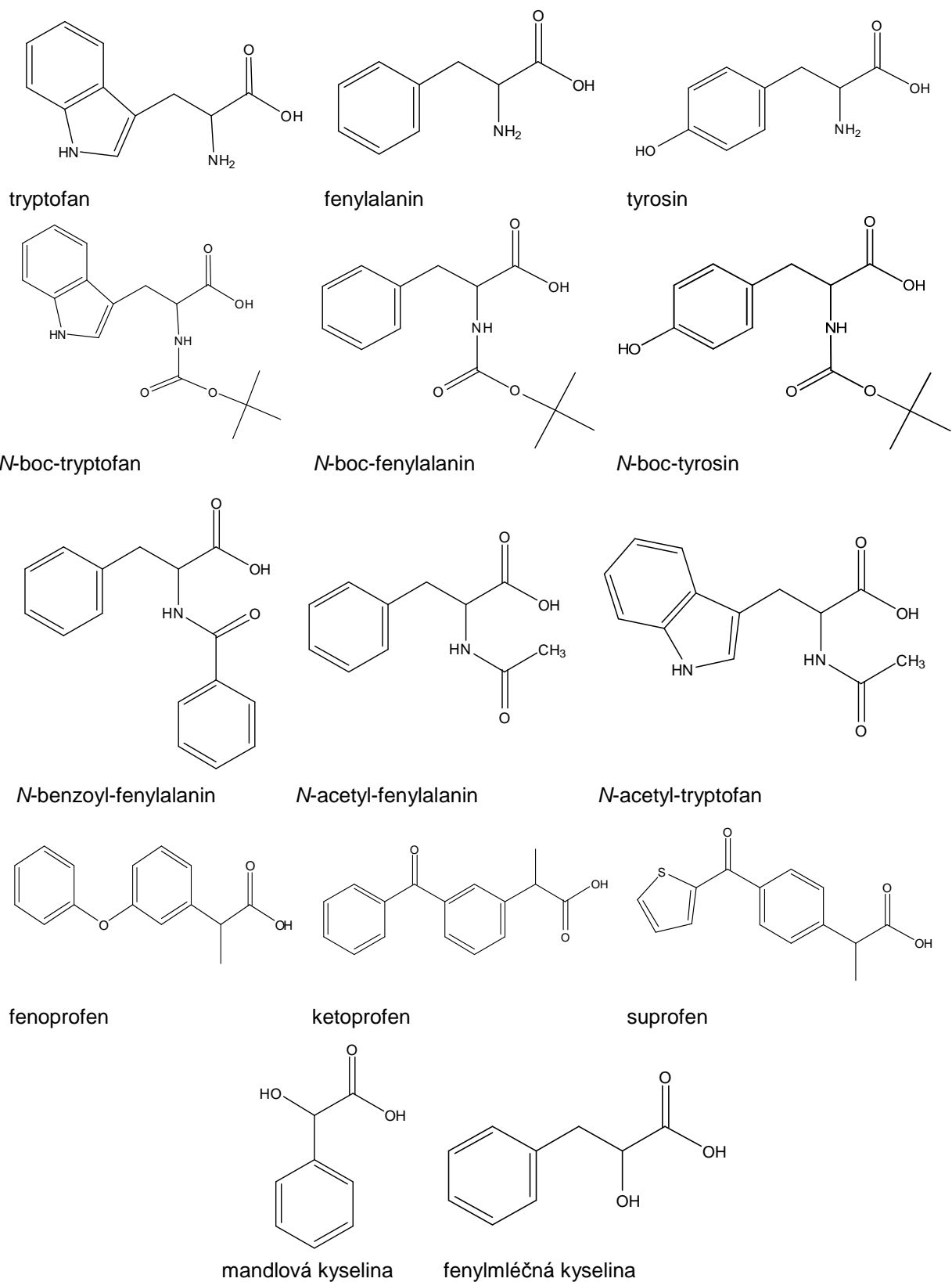
β -Cyklodextrin (čistota ≥ 97 %) byl získán od firmy Sigma-Aldrich, USA.

PEMEDA- β -cyklodextrin dichlorid byl získán převedením PEMEDA- β -cyklodextrin diiodidu pomocí iontově-výměnné chromatografie provedené na Katedře organické chemie, PřF UK. PEMEDA- β -cyklodextrin diiodid byl syntetizován skupinou doc. RNDr. Jindřicha, CSc. z Katedry organické chemie, PřF UK podle zatím nepublikovaného postupu⁴² s výtěžkem 98 %. Charakterizace s určením přesné polohy substituentů byla provedena pomocí 2D NMR metody na téže katedře.

PEMPDA β -cyklodextrin diiodid byl syntetizován také skupinou doc. RNDr. Jindřicha, CSc. podobným postupem s 98 % výtěžkem a následnou charakterizací pomocí 2D NMR metody. PEMPDA- β -cyklodextrin dichlorid byl následně získán převedením PEMEDA- β -cyklodextrin diiodidu pomocí iontově-výměnné chromatografie provedené na Katedře organické chemie, PřF UK.

3.1.2 Standardy

D,L-Fenoprofen (čistota ≥ 97 %), D,L-suprofen (čistota $\geq 98,0$ %), D,L-ketoprofen (čistota $\geq 98,0\%$), *N*-*boc*-L-tyrosin (čistota $\geq 98,0\%$), *N*-*boc*-D-tryptofan (čistota $\geq 98,0$ %), *N*-*boc*-L-tryptofan (čistota $\geq 99,0$ %), D,L-tryptofan (čistota $\geq 99,0$ %), D,L-fenylalanin (čistota 99%), *N*-*boc*-D-fenylalanin (čistota $\geq 99,0$ %), *N*-*boc*-L-fenylalanin (čistota $\geq 99,0$ %), *N*-acetyl-L-tryptofan (čistota $\geq 99,0$ %), *N*-acetyl-D,L-tryptofan (čistota $\geq 99,0$ %), *N*-acetyl-D-fenylalanin (čistota 99 %), *N*-acetyl-L-fenylalanin (čistota 99 %), mandlová kyselina (čistota 99 %), *R*-(-)-mandlová kyselina (čistota 98 %), D,L-3-fenylmléčná kyselina (čistota 98 %), L-(-)-3-fenylmléčná kyselina (čistota 98 %), *N*-benzoyl-L-fenylalanin (čistota $\geq 99,0$ %) a *N*-benzoyl-D-fenylalanin (čistota $\geq 99,0$ %) byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich, USA. D,L-Tyrosin (čistota 99 %) a *N*-*boc*-D-tyrosin (čistota $\geq 98,0$ %) byly získány od firmy Fluka, USA. Jejich strukturní vzorce shrnuje obrázek 3.1.



Obrázek 3.1 Strukturní vzorce testovaných analytů

3.1.3 Ostatní chemikálie

Thiomočovina (čistota p.a.) byla získána od firmy Merck, USA. Tetraboritan disodný, dekahydrát (čistota p.a.) a dihydrogenfosforečnan draselný (čistota p.a.) byly zakoupeny u firmy Lachema, ČR. Hydroxid sodný (čistota p.a.), kyselina chlorovodíková 35% (čistota p.a.), kyselina sírová 96% (čistota p.a.), octan amonný (čistota p.a.), tris(hydroxymethyl)aminomethan (čistota > 98 %) byly získány od firmy Lach-Ner, ČR. Methanol pro HPLC (čistota $\geq 99,9$ %) a acetonitril pro HPLC (čistota $\geq 99,9$ %) dodala firma Sigma-Aldrich, USA a hydroxid draselný (čistota p.a.) a octovou kyselinu 99,8% (čistota p.a.) firma Penta, ČR. Deionizovaná voda Milli Q byla odebrána z přístroje Millipore, Milford, USA.

3.2 Zařízení

Složky pufrů byly váženy na analytických vahách APX-100, Denver Instrument, USA a standardy na vahách Precisa Instrument 290SCS, Precisa, Švýcarsko.

Hodnoty pH roztoků byly měřeny pomocí pH metru 3510 Jenway, UK se skleněnou pH elektrodou Jenway, UK, popřípadě pomocí univerzálních indikátorových papírků pH 0 – 12, Lachema, ČR.

Roztoky pufrů byly fitrovány přes filtry Nylon 66 Membranes 0,2 μm x 47 mm, Supelco Analytical, USA s využitím membránové pumpy typu M401, Kovovýrova F. Novotný, Kojetice na Moravě, ČR. K odplynění roztoků a zlepšení rozpustnosti vzorků byl použit ultrazvuk LC30H, Elma, ČR.

Detekce cyklodextrinových derivátů a jejich rozpadových produktů byla provedena na silikagelových destičkách, DCAlufolien Kieselgel 60 F254, Merck, Německo.

Elektroforetická měření byla provedena na přístroji PrinCE 250 autosampler, PrinCE Technologies B.V., Nizozemsko s UV-VIS spektrometrickým detektorem: Spectra 100, Thermo Separation Products, USA za použití nemodifikované křemenné kapiláry s vnitřním průměrem 75 μm a vnějším průměrem 375 μm CACO, Slovensko.

3.3 Příprava standardů

Byly připraveny zásobní roztoky standardů testovaných analytů o koncentraci 0,5 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Fenoprofen, suprofen a ketoprofen byly rozpuštěny v 100% methanolu a ostatní standardy ve směsi 1:1 čistého methanolu a 0,015 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ borátového pufru o

pH = 9,5. Pro analýzu bylo nutné vzorky ještě naředit pomocí 0,015 mol·l⁻¹ borátového pufru o pH = 9,5 na výslednou koncentraci 0,25 mg·ml⁻¹.

Zásobní roztok thiomochoviny byl připraven jejím rozpuštěním v deionizované vodě na výslednou koncentraci 0,1 mg·ml⁻¹.

3.4 Příprava základního elektrolytu

Borátový pufr byl připraven z vodného roztoku dekahydrátu tetraboritanu disodného o koncentraci 0,015 mol·l⁻¹ a pomocí 0,1 mol·l⁻¹ hydroxidu sodného bylo upraveno pH roztoku na pH = 9,5.

Fosfátový pufr byl připraven z vodného roztoku dihydrogenfosforečnanu draselného o koncentraci 0,025 mol·l⁻¹ a pomocí 1 mol·l⁻¹ hydroxidu draselného bylo upraveno pH roztoku na pH = 8,5 a 6,5.

Tris pufr byl připraven pomocí vodného roztoku tris(hydroxymethyl)aminomethanu o koncentraci 0,025 mol·l⁻¹ a pomocí naředěné 36% kyseliny chlorovodíkové v poměru 1:1 s vodou bylo pH roztoku upraveno na pH = 9,5.

Všechny tlumivé roztoky byly před použitím přefiltrovány přes komerční filtry Nylon 66 Membranes 0,2 μm x 47 mm, aby se zabránilo případnému ucpání kapiláry.

Roztoky cyklodextrinu a cyklodextrinových derivátů byly připraveny rozpuštěním příslušného množství selektoru v základním elektrolytu, tak aby byly získány požadované následující koncentrace:

β-cyklodextrin	borátový pufr pH = 9,5:	15 mmol·l ⁻¹
PEMPDA-β-CD	fosfátový pufr pH = 8,5:	1,0 mmol·l ⁻¹
	fosfátový pufr pH = 6,5:	1,0 mmol·l ⁻¹
	borátový pufr pH = 9,5:	0,1 mmol·l ⁻¹
		0,5 mmol·l ⁻¹
		1,0 mmol·l ⁻¹
		1,5 mmol·l ⁻¹
		2,5 mmol·l ⁻¹
		3,0 mmol·l ⁻¹
5,0 mmol·l ⁻¹		
PEMEDA-β-CD	borátový pufr pH = 9,5:	0,1 mmol·l ⁻¹
		0,5 mmol·l ⁻¹
		1,0 mmol·l ⁻¹
		2,5 mmol·l ⁻¹
		5,0 mmol·l ⁻¹

Tyto roztoky nebylo možné připravovat ve větších objemech do zásoby vzhledem k špatné stabilitě cyklodextrinových derivátů v zásaditých roztocích.

3.5 CE analýza

Pro CE měření byla použita nepokrytá křemenná kapilára s vnitřním průměrem 75 μm o celkové délce 66,5 cm a efektivní délce 51,5 cm. Vzorky byly dávkované tlakem 100 mbar po dobu 2,5 sekundy. Napětí vložené na kapiláru bylo 15 kV a kapilára byla termostatována na 20 °C. UV absorpční spektra byla snímána pomocí detektoru při vlnových délkách 214, 254 nebo 280 nm podle měřeného analytu. Jako marker elektroosmotického toku byl použit methanol, ve kterém byly vzorky rozpuštěny.

Každý den byla kapilára na počátku měření kondicionována nejprve 2 minuty deionizovanou vodou, poté 4 minuty 1 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ roztokem hydroxidu sodného, dále 2 minuty opět deionizovanou vodou a nakonec 6 minut základním elektrolytem. Následně byla provedena zkušební analýza thiomocoviny, jakožto markeru elektroosmotického toku, bez přidání cyklodextrinu do základního elektrolytu, k ověření průchodnosti kapiláry. Mezi jednotlivými analýzami byla kapilára promývána 2 minuty pouze roztokem základního elektrolytu, případně i s přídavkem chirálního selektoru. Po ukončení měření byla kapilára přes noc uchovávána prázdná, bez základního elektrolytu, po předchozím následujícím promytí: 2 minuty deionizovanou vodou, 3 minuty 1 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ roztokem hydroxidu sodného, 6 minut deionizovanou vodou a 6 minut vzduchem.

Pro vyhodnocení dat byly použity softwary Clarity, DataApex, ČR, Origin 8, OriginLab Corporation, USA a Microsoft Excel 2003, Microsoft Corporation, USA.

3.6 Detekce rozpadových produktů cyklodextrinových derivátů

Byl připraven roztok PEMPDA- β -cyklodextrinu a PEMEDA- β -cyklodextrinu o koncentraci 2,5 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ v 15 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ borátovém pufru o $\text{pH} = 9,5$ a objemu 200 μl , na který bylo vloženo napětí a stejný roztok, na nějž napětí vloženo nebylo a který byl určený jako zásobní roztok k porovnávání. Na testované roztoky bylo vždy 4 hodiny vkládáno napětí 15 kV a po každých 30 minutách byl proveden odběr 5 μl ze vstupní vialky, který byl použit k provedení tenkovrstvé chromatografie. TLC separační

soustava se skládala ze silikagelových destiček o délce 4 cm a směsi metaholu, octové kyseliny a 1% vodného roztoku octanu amonného v poměru 10:1:9 (v/v/v) jako vyvíjecí soustavy. Na každé destičce byl separován vzorek, na který bylo vloženo napětí, současně se vzorkem k porovnávání. K vyvolání chromatografických skvrn byla po vysušení destičky použita karbonizační detekce, prováděná ponořením destičky do 50% kyseliny sírové s následným zahřátím. Nakonec byly porovnány a odečteny vzdálenosti skvrn od startu a vypočítány retardační faktory.

3.7 Ověření stability pH základního elektrolytu

Bylo připraveno 200 μl 15 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ borátového pufru o $\text{pH} = 9,5$. Na tento roztok bylo vloženo po dobu 4 hodin napětí 20 kV a poté bylo vzhledem k jeho malému objemu změřeno jeho pH pomocí pH papírku.

4. Výsledky a diskuse

4.1 Výběr vhodných analytů

Vzhledem k použití UV-VIS detektoru bylo nutné jako analyty používat látky obsahující vhodný chromofor pro detekci, jako je například aromatické jádro. Jelikož testované β -cyklodextrinové deriváty obsahují dvě permanentně kladně nabitě amoniové skupiny, byly jako analyty vybrány látky obsahující karboxylovou funkční skupinu, jako jsou aminokyseliny či profeny, aby při vhodných hodnotách pH mohlo dojít k elektrostatické interakci mezi chirálním selektorem a analytem. Aby se tato interakce ještě podpořila, tvořily jednu skupinu aminokyseliny, které mají různými funkčními skupinami blokovanou aminovou skupinu.

4.2 Separace vybraných analytů bez přídavku chirálního selektoru

4.2.1 Výběr základního elektrolytu

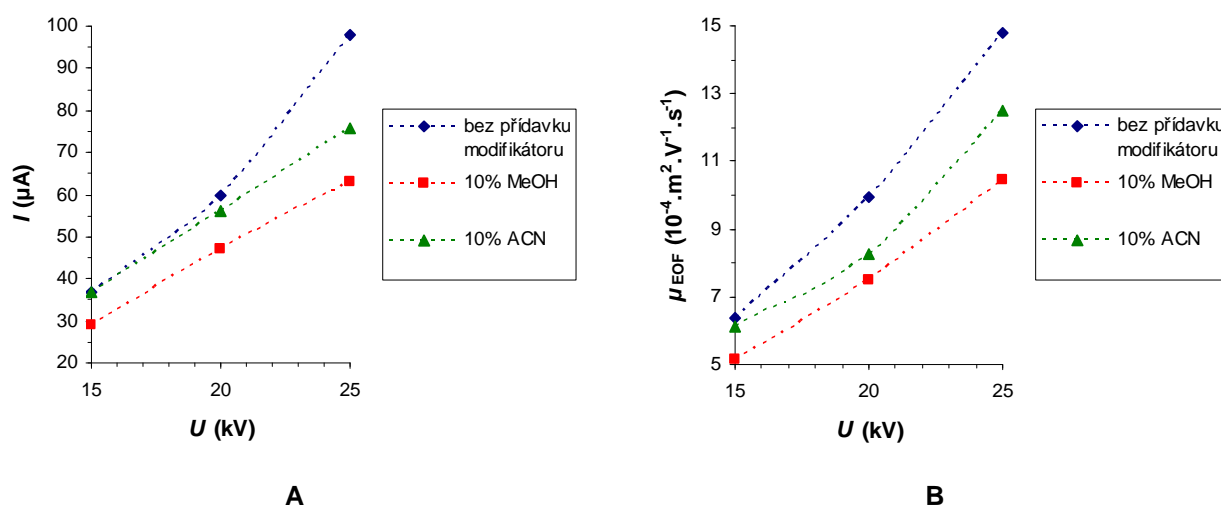
Výběr separačního pufru a jeho hodnoty pH byl vzhledem k podpoře disociace karboxylové skupiny přítomné v molekule analytů orientován na zásaditou oblast. Vlastnosti pufrů byly zkoušeny s využitím roztoku thiomčoviny jakožto markeru elektroosmotického toku a dále pro několik zástupců jednotlivých skupin vybraných analytů.

Jako nevhodný pro analýzu zvolených analytů i bez přídavku chirálního selektoru byl vyhodnocen $25 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ TRIS-chloridový pufr o $\text{pH} = 9,5$. Bylo sice dosaženo nízkých proudů během analýzy, při napětí 15 kV byl procházející proud pouze $1,9 \text{ }\mu\text{A}$, ale nebylo docíleno akceptovatelného tvaru píků vybraných analytů, které byly příliš široké.

Použitím $25 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ fosfátového pufru o $\text{pH} = 8,5$ bylo dosaženo vhodného tvaru píků, ale při generaci poměrně vysokého proudu, a to až $82 \text{ }\mu\text{A}$ při napětí 15 kV. Poté byl vyzkoušen fosfátový pufr o stejné koncentraci, ale o $\text{pH} = 6,5$. U tohoto pufru došlo k snížení proudu při 15 kV na $34 \text{ }\mu\text{A}$ a srovnatelnému tvaru píků. Oba pufrы pak byly dále použity i s přídavkem chirálního selektoru.

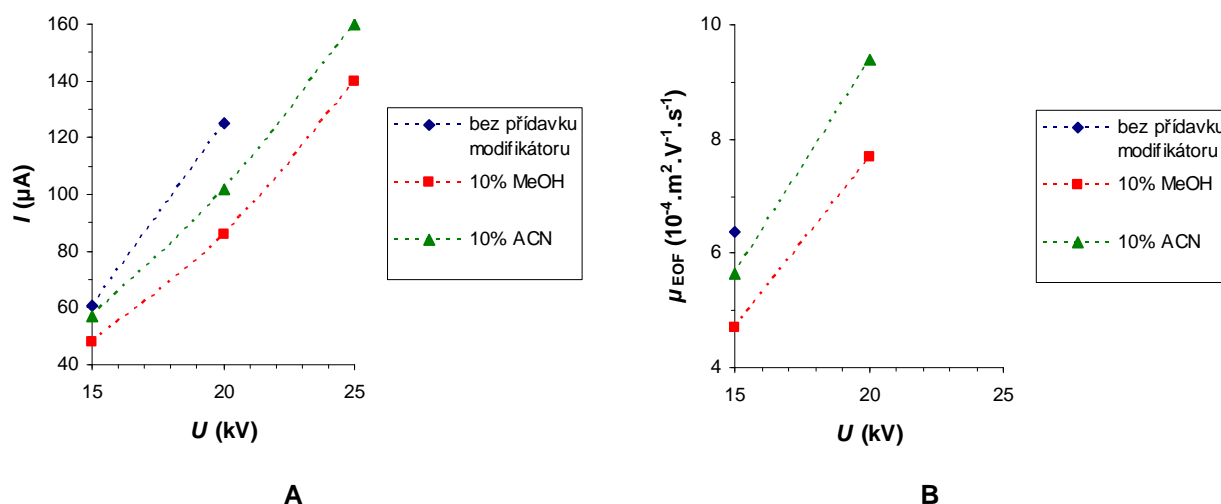
Jako poslední byl vyzkoušen borátový pufr o $\text{pH} = 9,5$, který se jevil jako vhodný. Proto byly testovány dvě jeho koncentrace, a to $25 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a $15 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Dále byl vyzkoušen i vliv přídavku organického modifikátoru (deseti objemových procent) a napětí na velikost proudu a rychlost elektroosmotického toku. Výsledky pro nižší

koncentraci borátového pufru shrnuje obrázek 4.1:



Obrázek 4.1 Vliv přídavku organického modifikátoru a napětí na velikost proudu (A) a velikost elektroosmotického toku (B) při použití 15 mmol·l⁻¹ borátového pufru o pH = 9,5.

Při použití 25 mmol·l⁻¹ borátového pufru docházelo při zvyšování napětí k přesažení proudové hodnoty 100 μA. Takto vysoký proud by mohl způsobit rozklad chirálního selektoru a zhoršit separaci nárůstem Jouleova tepla. Proto byla tato koncentrace pufru vyřazena a vliv organického modifikátoru již nebyl sledován pro vyšší hodnoty napětí. (obr. 4.2).



Obrázek 4.2 Vliv přídavku organického modifikátoru a napětí na velikost proudu (A) a velikost elektroosmotického toku (B) při použití 25 mmol·l⁻¹ borátového pufru o pH = 9,5

4.2.2 Separace vybraných analytů v 15 mmol·l⁻¹ borátovém pufru o pH = 9,5

Mobility všech zvolených analytů byly naměřeny v 15 mmol·l⁻¹ borátovém o pH = 9,5 bez přídavku organického modifikátoru při napětí 15 kV, s využitím methanolu jakožto markeru elektroosmotického toku, který sloužil i jako rozpouštědlo vybraných analytů. Výsledky měření s udáním vlnových délek, při kterých byly detekovány jednotlivé analyty, shrnuje tabulka 4.1. Vlnové délky pro snímání záznamu byly vybrány dle literatury, aby bylo docíleno co největší odezvy^{47,48,49,50}.

Tabulka 4.1 Elektroforetické pohyblivosti (μ_{ef}), migrační časy (t) a vlnové délky UV detekce (λ) sledovaných analytů v 15 mmol·l⁻¹ borátovém pufru o pH = 9,5

analyt	λ nm	t min	μ_{ef} $10^{-4} \cdot \text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$
D,L-fenoprofen	214	9,45	-1,85
D,L-suprofen	254	9,88	-2,02
D,L-ketoprofen	254	9,81	-2,00
D,L-tyrosin	214	8,69	-1,56
<i>N</i> -boc-D-tyrosin	214	9,35	-1,96
<i>N</i> -boc-L-tyrosin	214	9,31	-1,78
<i>N</i> -boc-D,L-tyrosin (1:2)*	214	9,24	-1,63
D,L-tryptofan	214	7,80	-1,15
<i>N</i> -boc-D-tryptofan	214	9,07	-1,84
<i>N</i> -boc-L-tryptofan	214	9,07	-1,86
<i>N</i> -boc-D,L-tryptofan (1:2)	214	8,53	-1,75
D,L-fenylalanin	214	8,59	-1,63
<i>N</i> -boc-D-fenylalanin	214	9,33	-2,04
<i>N</i> -boc-L-fenylalanin	214	9,10	-2,06
<i>N</i> -boc-D,L-fenylalanin (1:2)	214	9,10	-2,07
D,L-mandlová kyselina	214	12,47	-3,03
<i>R</i> -(-)-mandlová kyselina	214	10,91	-2,61
D,L-3-fenylmléčná kyselina	214	10,99	-2,47
<i>L</i> -(-)-3-fenylmléčná kyselina	214	11,31	-2,67
<i>N</i> -acetyl-L-tryptofan	280	9,89	-2,17
<i>N</i> -acetyl-D,L-tryptofan	280	10,45	-2,37
<i>N</i> -acetyl-D-fenylalanin	214	10,18	-2,41
<i>N</i> -acetyl-L-fenylalanin	214	9,97	-2,44
<i>N</i> -acetyl-D,L-fenylalanin (1:2)	214	10,07	-2,43
<i>N</i> -benzoyl-L-fenylalanin	214	9,07	-1,89
<i>N</i> -benzoyl-D-fenylalanin	214	8,86	-1,89
<i>N</i> -benzoyl-D,L-fenylalanin (1:2)	214	9,02	-1,99

*poměr D a L formy je 1:2

Při měření bez přídavku chirálního selektoru nedocházelo k enantioseparaci racemátů ani připravených směsí dvou enantiomerů.

4.3 Vliv přídavku PEMPDA- β -cyklodextrinu do základního elektrolytu

Pro elektroforetická měření byl používán dichlorid tohoto selektoru. Byl vyzkoušen i diiodid, ale bohužel docházelo k velmi rychlému rozkladu PEMPDA- β -cyklodextrinu nejspíš vlivem elektrického proudu, což se projevovalo zejména velkým poklesem absorbance po pár minutách probíhající analýzy a postupným poklesem proudu.

4.3.1 Výběr vhodného separačního pufru

Po přidání chirálního selektoru byl fosfátový pufr vyhodnocen jako nevhodný základní elektrolyt. Pokud byl použit pufr o $\text{pH} = 8,5$ tak již roztok o $1,0 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ koncentraci PEMPDA- β -cyklodextrinu způsobil, že při napětí 15 kV procházel kapilárou proud přesahující $90 \mu\text{A}$, a to už je příliš vysoká hodnota. Navíc nedocházelo k separaci analytů a šum základní linie byl velmi vysoký. Fosfátový pufr o $\text{pH} = 6,5$ již nebyl tak vodivý, ale výsledný elektroforeogram vypadal téměř stejně jako u pufru s vyšším pH , proto již nebyla dále zkoušena nižší koncentrace tohoto pufru.

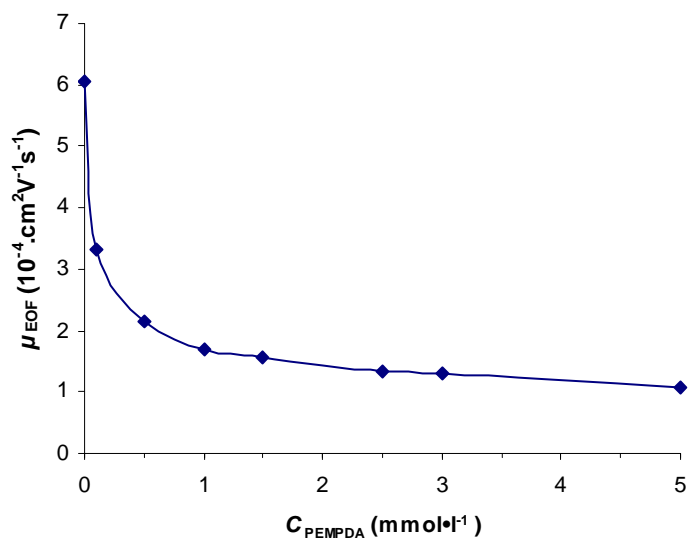
Jako vhodný základní elektrolyt byl vybrán $15 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ borátový pufr o $\text{pH} = 9,5$ bez přídavku organického modifikátoru. Nejprve byl vyzkoušen i vliv přídavku methanolu a acetonitrilu do základního elektrolytu s přídavkem selektoru, a to deseti objemových procent. Bylo však vyhodnoceno, že tento přídavek nepřispívá ke zlepšení separace, ale pouze k jejímu prodloužení kvůli zpomalení elektroosmotického toku (viz obr. 4.1.). Zpomalení mohlo být způsobeno potlačením disociace silanolových skupin na stěně kapiláry, došlo tedy ke změně velikosti zeta potenciálu, anebo změnou viskozity základního elektrolytu. Navíc docházelo k značné nestabilitě elektrického proudu během analýzy.

4.3.2 Vliv koncentrace chirálního selektoru na elektroosmotickou pohyblivost

Velikost elektroosmotického toku byla sledována pomocí methanolu jakožto markeru, protože byl vždy přítomný jako rozpouštědlo v roztocích vzorků. Přidáním chirálního selektoru do základního elektrolytu došlo k značnému ovlivnění velikosti elektroosmotického toku i při velice nízkých koncentracích selektoru. Postupně byla zvyšována koncentrace PEMPDA- β -cyklodextrinu z nuly na $5,0 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Se zvyšující se koncentrací docházelo ke zpomalování elektroosmotického toku, jak je vidět na obrázku 4.3. Tento jev může být způsoben adsorpcí chirálního selektoru na stěnu

křemenné kapiláry vzhledem ke dvěma kladným nábojům ve struktuře selektoru.

Elektroforetickou pohyblivost samotného cyklodextrinového derivátu nebylo možné určit, protože selektor neobsahuje žádný chromofor, který by mohl být při UV detekci využit. Vzhledem k permanentně kladnému náboji molekuly lze předpokládat, že vlastní mobilita PEMPDA- β -cyklodextrinu bude kladná a nezávislá na hodnotě pH prostředí.



Obrázek 4.3 Vliv koncentrace PEMPDA- β -CD na elektroosmotický tok

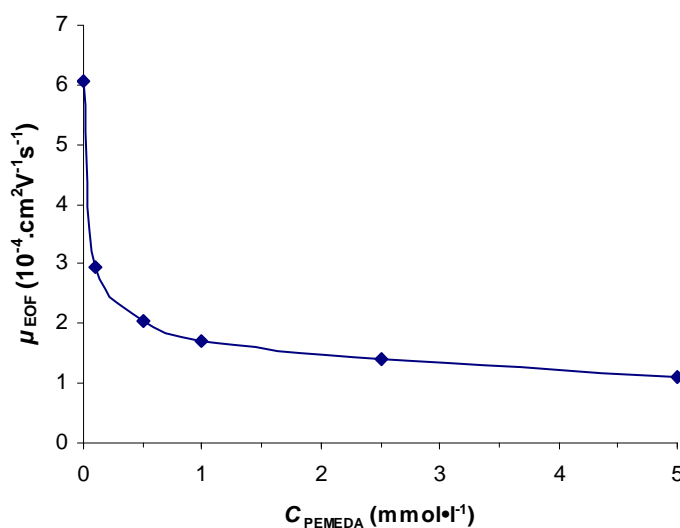
4.4 Vliv přídavku PEMEDA- β -cyklodextrinu do základního elektrolytu

Pro měření byl používán dichlorid tohoto selektoru, protože i PEMEDA- β -cyklodextrinu diiodid se rychle rozkládal. Jako separační pufr byl vzhledem k předchozí optimalizaci zvolen $15 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ borátový pufr o $\text{pH} = 9,5$ bez přídavku organického modifikátoru.

4.4.1 Vliv koncentrace chirálního selektoru na elektroosmotickou pohyblivost

Při použití PEMEDA- β -cyklodextrinu docházelo ke stejnému trendu v ovlivňování velikosti elektroosmotického toku jako při použití PEMPDA- β -cyklodextrinu. Zkoušený rozsah koncentrací byl stejný jako v případě předešlého selektoru, pouze bylo proměřeno méně jeho koncentrací, kvůli nedostatečnému množství pevného selektoru (obr. 4.4). Ale výrazný rozdíl ve velikosti elektroosmotického toku mezi selektory nebyl pozorován. Lze tedy předpokládat, že mechanismus ovlivňující velikost

elektroosmotického toku je analogický jako u PEMPDA- β -cyklodextrinu.



Obrázek 4.4 Vliv koncentrace PEMEDA- β -CD na elektroosmotický tok

4.5 Ověření stability chirálního selektoru

4.5.1 Stabilita PEMPDA- β -cyklodextrinu

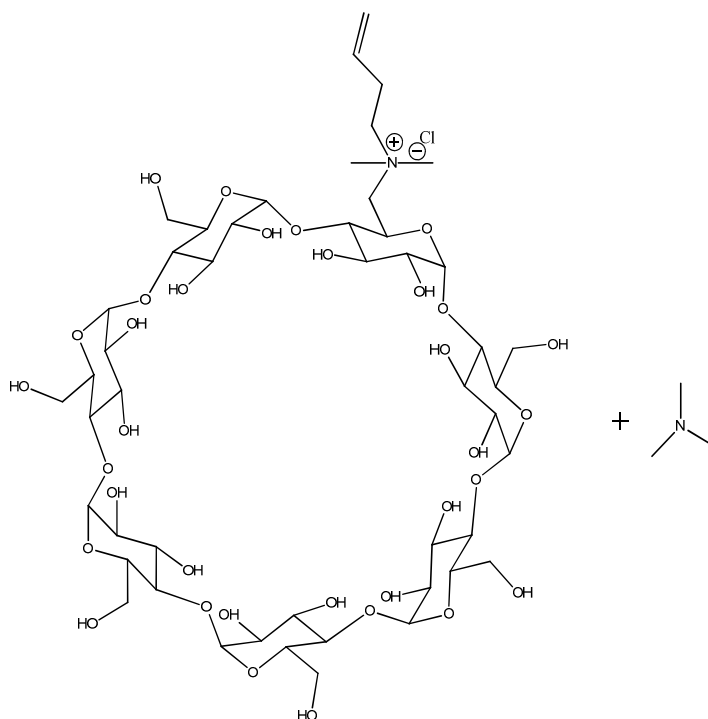
Pomocí techniky tenkovrstvé chromatografie byla sledována stabilita roztoku chirálního selektoru po vložení napětí. Byl zaznamenán pokles absorbance a zároveň byl sledován i pokles proudu v čase. Hodnoty naměřených proudů za tři hodiny a vypočítané retardační faktory detekovaných skvrn shrnuje tabulka 4.2. Hodnota R_F přísluší nanášenému, neelektrolyzovanému roztoku PEMPDA- β -cyklodextrinu. Hodnoty R_{F1} a R_{F2} byly získány z naneseného elektrolyzovaného vzorku PEMPDA- β -cyklodextrinu, přičemž detaily experimentálního uspořádání popisuje oddíl 3.6. Hodnota retardačního faktoru R_{F1} přísluší nerozloženému selektoru, zatímco hodnota R_{F2} patří degradačnímu produktu. Bylo zjištěno, že již po hodině a půl měření je dobře vizuálně patrné, že dochází k částečnému rozkladu PEMPDA- β -cyklodextrinu. Zpočátku je rozklad přibližně v jednotkách procent původního množství, ale po dvou a více hodinách je selektor rozložen až z poloviny (obr. 4.5). Vzniklý předpokládaný degradační produkt je méně polární, protože obsahuje dvojnou vazbu a o jeden náboj méně než PEMPDA- β -cyklodextrin. Vyzvlíná tedy na polárním povrchu silikagelové TLC destičky rychleji než původní chirální selektor a jeho retardační faktor je tedy vyšší. K degradaci pravděpodobně dochází vlivem zvýšené teploty a vysokého pH roztoku, ve kterém je selektor rozpuštěn. Probíhá tedy tzv. Hofmannova eliminace, při

které se odštěpí trimethylamin. Předpokládaná struktura degradačního produktu je znázorněna na obrázku 4.6.

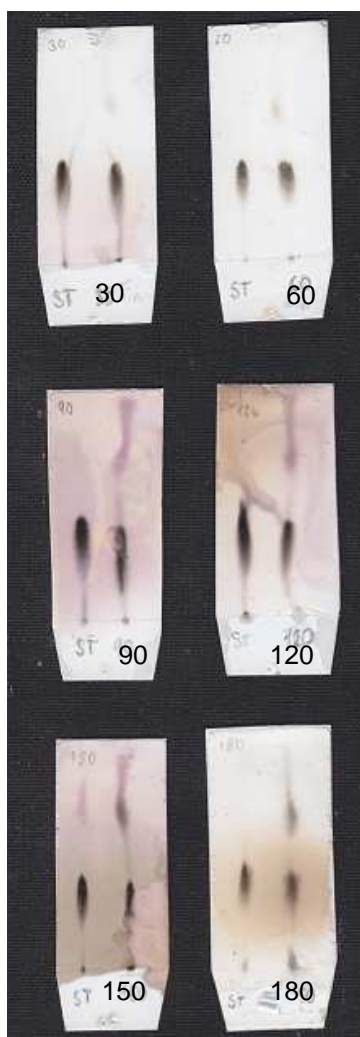
Tabulka 4.2 Výsledky získané elektrolyzou roztoku PEMPDA- β -cyklodextrinu po vložení napětí 15 kV, kde t je čas působení napětí, I je procházející proud. Dále jsou uvedeny jednotlivé hodnoty retardačních faktorů, získaných TLC analýzou, kde R_F přísluší nanášenému, neelektrolyzovanému roztoku PEMPDA- β -cyklodextrinu a z naneseného elektrolyzovaného vzorku byly získány hodnoty R_{F1} příslušející nerozloženému selektoru a R_{F2} patřící degradačnímu produktu.

t min	I μA	standard		vzorek	
		R_F	R_{F1}	R_{F1}	R_{F2}
0	47,6	0,38	0,38	0,38	ND
30	44,4	0,38	0,38	0,38	ND
60	42,0	0,38	0,38	0,35	ND
90	39,4	0,38	0,38	0,35	0,65
120	35,6	0,38	0,38	0,38	0,68
150	31,4	0,35	0,35	0,35	0,68
180	27,7	0,38	0,38	0,35	0,65

ND – nedetekováno



Obrázek 4.6 Navržená struktura degradačního produktu PEMPDA- β -CD



Obrázek 4.5 TLC roztoku PEMPDA- β -cyklodextrinu pořízených odběrem elektrolyzovaného roztoku v třicetiminutových intervalech při vloženém napětí 15 kV (vlevo na každé destičce je standard a vpravo zkoumaný roztok)

4.5.2 Stabilita PEMEDA- β -cyklodextrinu

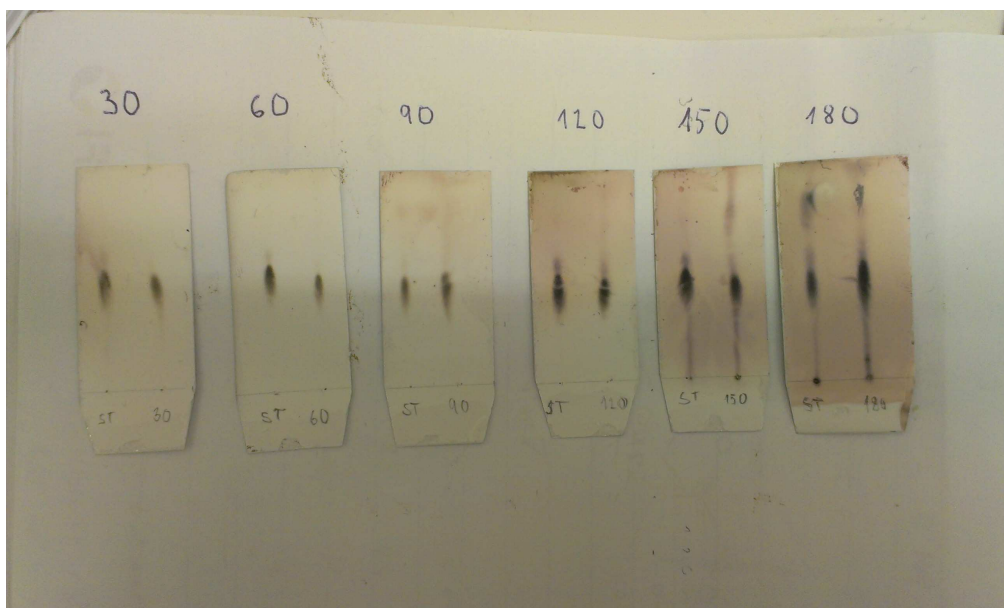
Stabilita PEMEDA- β -cyklodextrinu byla také ověřena pomocí tenkovrstvé chromatografie a to stejným způsobem jako pro PEMPDA- β -cyklodextrin. Pokles proudu za tři hodiny měření a retardační faktory detekovaných skvrn shrnuje tabulka 4.3. Hodnota R_F odpovídá nanášenému, neelektrolyzovanému roztoku PEMEDA- β -cyklodextrinu. Hodnoty R_{F1} a R_{F2} byly získány z naneseného elektrolyzovaného vzorku PEMEDA- β -cyklodextrinu. Hodnota retardačního faktoru R_{F1} přísluší nerozloženému selektoru a hodnota R_{F2} degradačnímu produktu. Tentokrát bylo navzdory předpokladu, že tento selektor bude méně odolný vůči rozkladu oproti PEMPDA- β -cyklodextrinu z důvodu menší vzdálenosti mezi kladně nabitými dusíky v substituentu, zjištěno, že až po více jak dvou hodinách měření je vizuálně dobře patrné, že dochází k částečnému rozkladu PEMEDA- β -cyklodextrinu. Po 150 minutách bylo rozloženo přibližně 10 %

selektoru a po třech hodinách byla rozložena přibližně třetina selektoru (obr. 4.7). Opět dochází k rychlejšímu vyvzlínání degradačního produktu z důvodu jeho nižší polarity. Pravděpodobně tedy také vzniká degradační produkt s dvojnou vazbou na substituentu po odštěpení trimethylaminu ze stejného důvodu jako u PEMPDA- β -cyklodextrinu.

Tabulka 4.3 Výsledky získané elektrolyzou roztoku PEMEDA- β -cyklodextrinu po vložení napětí 15 kV, značení je stejné jako v tab. 4.2.

<i>t</i> min	<i>I</i> μ A	standard		vzorek	
		R_F	R_{F1}	R_{F2}	R_{F2}
0	50,3	0,48	0,48	ND	
30	48,1	0,48	0,45	ND	
60	44,5	0,48	0,45	ND	
90	40,4	0,48	0,48	ND	
120	36,0	0,45	0,45	ND	
150	30,9	0,48	0,45	0,83	
180	22,7	0,45	0,48	0,85	

ND – nedetekováno



Obrázek 4.7 TLC roztoku PEMEDA- β -cyklodextrinu pořízených odběrem elektrolyzovaného roztoku v třicetiminutových intervalech při vloženém napětí 15 kV (vlevo na každé destičce je standard a vpravo zkoumaný roztok)

4.6 Ověření stability základního elektrolytu

Protože byl během měření pozorován poměrně značný pokles proudu, který nemohl být způsoben pouze rozpadem chirálního selektoru, bylo zřejmé, že dochází ke značnému zvyšování odporu během analýzy. To mohlo být způsobeno vznikem agregátů nebo větších shluků. Tato možnost byla u chirálního selektoru vyloučena metodou fotonové kolerační spektroskopie, která byla provedena na externím pracovišti. Další možností je, že dochází k ovlivnění složení základního elektrolytu kvůli průchodu elektrického proudu. Pro urychlení procesu elektrolýzy bylo vkládáno na kapiláru po dobu 4 hodin napětí 20 kV a během toho klesla původní hodnota elektrického proudu z 72 μA na 7,8 μA .

Základní elektrolyt ve vstupní vialce o objemu 200 μl měl před vložení napětí $\text{pH} = 9,5$ a na konci pokusu bylo pomocí univerzálního indikátorového pH papírku naměřeno přibližně $\text{pH} = 6$ (obr. 4.8). Přesnou hodnotu pH nebylo možné určit pomocí skleněné elektrody vzhledem k tomu, že bylo nutné pH naměřit v roztoku o objemu okolo 50 μl , který zbyl ve vstupní vialce. Poměrně razantní pokles pH je způsoben změnou složení základního elektrolytu, u kterého zřejmě dochází k snížení koncentrace hydroxidových iontů a k následnému snižování pH . K tomuto poklesu nedocházelo tak rychle, pokud byl používán základní elektrolyt v mililitrových objemech ve velké vialce, protože větší objem pufru byl schopen tyto výkyvy tlumit.



Obrázek 4.8 Ovlivnění pH základního elektrolytu vlivem průchodu elektrického proudu

4.7 PEMPDA- β -cyklodextrin jako chirální selektor v kapilární elektroforéze

Roztoky o různých koncentracích chirálního selektoru byly připravovány každý týden čerstvé vzhledem k nestabilitě selektoru v zásaditém prostředí. Dále byl po každých třech

až čtyřech analýzách vyměňován používaný roztok kvůli nestabilitě pH základního elektrolytu a i nestabilitě chirálního selektoru.

4.7.1 Vliv koncentrace chirálního selektoru na elektroforetickou pohyblivost analytů a enantioselektivitu

Při optimálních podmínkách základního elektrolytu (15 mmol·l⁻¹ borátový pufr o pH = 9,5 bez přídavku organického modifikátoru) byly proměřeny mobility všech analytů po přídavku PEMPDA-β-cyklodextrinu do základního elektrolytu o třech různých koncentracích, a to 1,0 mmol·l⁻¹, 2,5 mmol·l⁻¹ a 5,0 mmol·l⁻¹.

Tabulka 4.4 Parametry získané pro sledované analyty v 15 mmol·l⁻¹ borátovém pufru o pH = 9,5 s přídavkem 1,0 mmol·l⁻¹ PEMPDA-β-CD, kde t_{EOF} je migrační čas značkovače elektroosmotického toku a μ_{EOF} je elektroosmotická pohyblivost, t_1 a t_2 jsou migrační časy jednotlivých enantiomerů analytů, μ_{ef1} a μ_{ef2} jsou jejich elektroforetické pohyblivosti a α jejich enantioselektivita.

analyt	t_{EOF} min	μ_{EOF} 10 ⁻⁴ ·cm ² V ⁻¹ s ⁻¹	t_1 min	t_2 min	μ_{ef1} 10 ⁻⁴ ·cm ² V ⁻¹ s ⁻¹	μ_{ef2} 10 ⁻⁴ ·cm ² V ⁻¹ s ⁻¹	α
D,L-fenoprofen	23,04	1,65	34,08	K	-0,53	-0,53	1,00
D,L-suprofen	23,32	1,63	34,80	K	-0,57	-0,57	1,00
D,L-ketoprofen	20,81	1,83	66,55	69,17	-1,26	-1,28	1,06
D,L-tyrosin	23,55	1,62	55,84	K	-0,94	-0,94	1,00
<i>N</i> -boc-D-tyrosin	23,55	1,62	84,28	-	-1,17	-	-
<i>N</i> -boc-L-tyrosin	21,90	1,74	-	75,90	-	-1,24	-
<i>N</i> -boc-D,L-tyrosin (1:2)*	24,45	1,56	87,02	93,83	-1,12	-1,15	1,11
D,L-tryptofan	26,14	1,46	77,92	K	-0,97	-0,97	1,00
<i>N</i> -boc-D-tryptofan	23,71	1,60	51,18	-	-0,86	-	-
<i>N</i> -boc-L-tryptofan	21,11	1,80	-	54,31	-	-1,10	-
<i>N</i> -boc-D,L-tryptofan (1:2)	23,03	1,65	58,19	78,78	-1,00	-1,17	1,59
D,L-fenylalanin	19,45	1,96	45,15	K	-1,11	-1,11	1,00
<i>N</i> -boc-D-fenylalanin	22,74	1,67	79,81	-	-1,20	-	-
<i>N</i> -boc-L-fenylalanin	23,82	1,60	-	104,18	-	-1,23	-
<i>N</i> -boc-D,L-fenylalanin (1:2)	20,72	1,84	75,10	83,60	-1,33	-1,38	1,16

K – úplná koeluce, * poměr D a L formy je 1:2

Tabulka 4.5 Parametry získané pro sledované analyty v 15 mmol·l⁻¹ borátovém pufru o pH = 9,5 s přidavkem 2,5 mmol·l⁻¹ PEMPDA-β-CD, značení je stejné jako v tab. 4.4.

analyt	t_{EOF} min	μ_{EOF} 10 ⁻⁴ ·cm ² V ⁻¹ s ⁻¹	t_1 min	t_2 min	μ_{ef1} 10 ⁻⁴ ·cm ² V ⁻¹ s ⁻¹	μ_{ef2} 10 ⁻⁴ ·cm ² V ⁻¹ s ⁻¹	α
D,L-fenoprofen	28,82	1,32	30,40	K	-0,07	-0,07	1,00
D,L-suprofen	32,18	1,18	33,97	K	-0,06	-0,06	1,00
D,L-ketoprofen	30,82	1,23	41,85	42,73	-0,33	-0,34	1,08
D,L-tyrosin	28,28	1,35	91,84	94,59	-0,93	-0,94	1,04
N-boc-D-tyrosin	29,50	1,29	47,67	-	-0,49	-	-
N-boc-L-tyrosin	28,69	1,33	-	55,90	-	-0,65	-
N-boc-D,L-tyrosin (1:2)*	27,56	1,38	53,22	56,54	-0,67	-0,71	1,13
D,L-tryptofan	29,11	1,31	112,32	K	-0,97	-0,97	1,00
N-boc-D-tryptofan	29,46	1,29	38,84	-	-0,31	-	-
N-boc-L-tryptofan	29,14	1,31	-	43,97	-	-0,44	-
N-boc-D,L-tryptofan (1:2)	27,51	1,38	35,00	41,38	-0,30	-0,46	1,85
D,L-fenylalanin	26,73	1,42	ND	ND	-	-	-
N-boc-D-fenylalanin	27,38	1,39	50,31	-	-0,60	-	-
N-boc-L-fenylalanin	28,11	1,35	-	50,14	-	-0,62	-
N-boc-D,L-fenylalanin (1:2)	27,57	1,38	46,92	51,53	-0,57	-0,64	1,24

K – úplná koeluce, * poměr D a L formy je 1:2, ND – nedetekováno

Tabulka 4.6 Parametry získané pro sledované analyty v 15 mmol·l⁻¹ borátovém pufru o pH = 9,5 s přidavkem 5,0 mmol·l⁻¹ PEMPDA-β-CD, značení je stejné jako v tab. 4.4.

analyt	t_{EOF} min	μ_{EOF} 10 ⁻⁴ ·cm ² V ⁻¹ s ⁻¹	t_1 min	t_2 min	μ_{ef1} 10 ⁻⁴ ·cm ² V ⁻¹ s ⁻¹	μ_{ef2} 10 ⁻⁴ ·cm ² V ⁻¹ s ⁻¹	α
D,L-fenoprofen	32,36	1,18	23,57	K	0,44	0,44	1,00
D,L-suprofen	30,35	1,25	25,40	K	0,24	0,24	1,00
D,L-ketoprofen	32,29	1,18	33,34	N	-0,04	-	-
D,L-tyrosin	34,33	1,11	95,80	100,46	-0,71	-0,73	1,08
N-boc-D-tyrosin	36,70	1,04	45,99	-	-0,20	-	-
N-boc-L-tyrosin	38,66	0,98	-	48,68	-	-0,20	-
N-boc-D,L-tyrosin (1:2)*	39,88	0,95	51,67	52,87	-0,22	-0,23	1,10
D,L-tryptofan	34,10	1,12	66,12	K	-0,54	-0,54	1,00
N-boc-D-tryptofan	37,80	1,01	39,51	-	-0,04	-	-
N-boc-L-tryptofan	38,07	1,00	-	42,26	-	-0,10	-
N-boc-D,L-tryptofan (1:2)	37,22	1,02	38,38	43,54	-0,03	-0,15	5,44
D,L-fenylalanin	33,70	1,13	ND	ND	-	-	-
N-boc-D-fenylalanin	30,46	1,25	34,64	-	-0,15	-	-
N-boc-L-fenylalanin	37,36	1,02	-	47,34	-	-0,21	-
N-boc-D,L-fenylalanin (1:2)	31,15	1,22	34,94	37,03	-0,13	-0,19	1,55

K – úplná koeluce, N – hodnotu nebylo možné odečíst ze záznamu vzhledem ke spojení zóny analytu se značkovačem elektroosmotického toku * poměr D a L formy je 1:2, ND – nedetekováno

V tabulkách 4.4 – 4.6 jsou uvedeny všechny analyty, které byly detekovány alespoň při jedné ze zvolených koncentrací, a to i v případě, že u nich nedocházelo k oddělení jednotlivých enantiomerů.

Mandlová kyselina, N-acetyl-tryptofan, N-acetyl-fenylalanin, N-benzoyl-fenylalanin a

fenylmléčná kyselina nebyly vůbec detekovány v roztocích s přidavkem chirálního selektoru. V jejich případě pravděpodobně docházelo k minimální či žádné interakci s cyklodextrinovým derivátem a kvůli výraznému zpomalení elektroosmotického toku se u nich, jakožto aniontů při zvoleném pH, prodloužil migrační čas natolik, že ani po dvou hodinách analýzy nebyla zaznamenána jejich odezva. Píky bylo možné zachytit pouze v případě, kdy bylo k pohybu elektrolytu použito nejen vlivu elektrického pole ale i tlaku 20 mbar. Analýza poté byla poměrně krátká, ale k enantioseparaci nedocházelo.

D,L-Fenoprofen a D,L-suprofen již interagovaly se selektorem, ale při nízkých koncentracích byla tato interakce příliš slabá a nebylo možné určit, kde mají píky přesně vrchol. V tabulkách 4.4 a 4.5 jsou proto uvedené jen orientační hodnoty. Při nízkých koncentracích selektoru se analyty pohybovaly směrem k anodě vlivem jejich záporného náboje, který byl dán disociací karboxylové skupiny. Se zvyšující se koncentrací selektoru na $5,0 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ došlo k velmi dobré interakci se selektorem projevující se kladnou elektroforetickou mobilitou fenoprofenu a suprofenu, která však nebyla enantioselektivní. Je pravděpodobné, že k hlavní interakci docházelo mimo chirální centrum těchto analytů.

D,L-Ketoprofen interagoval se selektorem jiným způsobem, což způsobilo, že se jeho enantiomery začaly částečně dělit. Se zvyšující se koncentrací PEMPDA- β -cyklodextrinu docházelo pouze k větší interakci se selektorem, čímž docházelo k poklesu anodické mobility, ale nezlepšovala se enantioselektivita.

Z neblokovaných aminokyselin bylo nejlepších výsledků dosaženo u D,L-tyrosinu, u kterého se se zvyšující koncentrací začaly částečně oddělovat enantiomery. D,L-Tryptofan interagoval se selektorem, ale nedošlo k separaci enantiomerů a nejslabší interakce bylo dosaženo u D,L-fenylalaninu, který interagoval s PEMPDA- β -cyklodextrinem tak málo, že kvůli zpomalení elektroosmotického toku při vyšších koncentracích již nebylo možné píky detekovat do dvou hodin, kvůli jeho záporné mobilitě. Ani u jedné z neblokovaných aminokyselin nebyly k dispozici standardy jednotlivých enantiomerů, a tak u D,L-tyrosinu, který jako jediný vykazoval částečné dělení, nebylo možné určit, jaký píky odpovídá D formě a jaký L formě.

Nejlepších výsledků bylo dosaženo u aminokyselin blokových terc-butoxykarbonylem na aminové funkční skupině. Proto pro jejich směsi enantiomerů

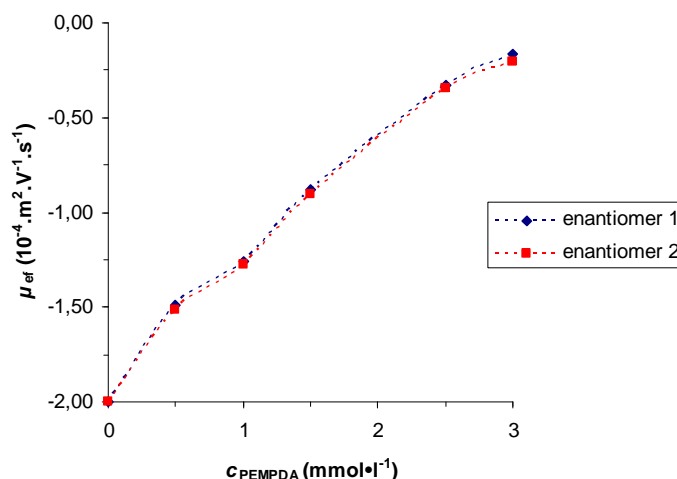
v poměru 1:2 byly proměřeny i další roztoky s jinými koncentracemi chirálního selektoru.

Více koncentrací bylo proměřeno i u D,L-ketoprofenu, u kterého, jak již bylo uvedeno výše, docházelo k částečnému dělení enantiomerů, a to i pro nižší koncentrace chirálního selektoru, avšak píky byly značně široké. Se zvyšující se koncentrací docházelo k zužování píků, ale enantiorozlišení zůstávalo prakticky stejné. Navíc při nejvyšší koncentraci selektoru, tedy $5,0 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, došlo ke spojení zóny ketoprofenu se zónou příslušející značkovači elektroosmotického toku, tedy rozpouštědla, methanolu, a tak nebylo možné přesně určit vrchol píku, popřípadě píků (tab. 4.7 a obr. 4.9). Standardy jednotlivých enantiomerů ketoprofenu nebyly k dispozici. Dostupný byl pouze racemát, proto nebylo možné určit, který z píků odpovídá D a který L formě.

Tabulka 4.7 Parametry získané při separaci D,L-ketoprofenu v $15 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ borátovém pufru o $\text{pH} = 9,5$ s přidavkem PEMPDA- β -CD, značení je stejné jako v tab. 4.4.

C_{PEMPDA} $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$	t_{EOF} min	μ_{EOF} $10^{-4}\cdot\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$	t_1 min	t_2 min	μ_{ef1} $10^{-4}\cdot\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$	μ_{ef2} $10^{-4}\cdot\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$	α
0,0	6,47	5,88	9,81	K	-2,00	-2,00	1,00
0,5	17,73	2,15	58,30	60,58	-1,49	-1,52	1,06
1,0	20,81	1,83	66,55	69,17	-1,26	-1,28	1,06
1,5	24,05	1,58	54,31	55,91	-0,88	-0,90	1,05
2,5	30,82	1,23	41,85	42,73	-0,33	-0,34	1,08
3,0	30,19	1,26	34,78	36,04	-0,17	-0,20	1,27
5,0	32,29	1,18	33,34	N	-0,04	-	-

K – úplná koeluce, N – hodnotu nebylo možné odečíst ze záznamu vzhledem ke spojení zóny analytu se značkovačem elektroosmotického toku



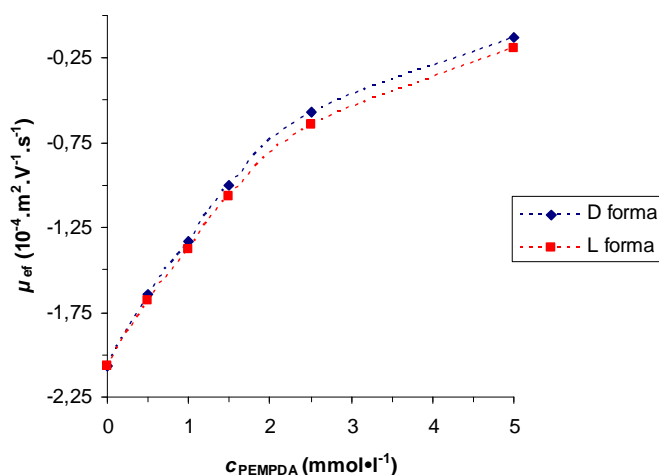
Obrázek 4.9 Vliv koncentrace PEMPDA- β -cyklodextrinu na elektroforetickou pohyblivost jednotlivých enantiomerů ketoprofenu

U fenylalaninu blokovaneho terc-butoxykarbonylem docházelo k lepší interakci se selektorem než u neblokovaného a ještě lepší než u fenylalaninu blokovaneho jinými skupinami. Již při nízkých koncentracích chirálního selektoru docházelo k částečnému dělení jednotlivých enantiomerů, které se však se zvyšující se koncentrací selektoru příliš nezlepšovalo (tab. 4.8 a obr. 4.10). Proto se pravděpodobně dalším zvyšováním koncentrace do maximální možné rozpustnosti selektoru enantioseparace nezlepší, ale pouze dojde ke zkrácení doby analýzy. Píky byly nesymetrické ve vzestupné části a dle poměrů ploch jednotlivých píků bylo určeno, že více interaguje s PEMPDA- β -cyklodextrinem D forma *N*-boc-fenylalaninu.

Tabulka 4.8 Parametry získané při separaci *N*-boc-D,L-fenylalaninu v poměru D a L formy 1:2 v 15 mmol·l⁻¹ borátovém pufru o pH = 9,5 s přídavkem PEMPDA- β -CD, kde t_D a t_L jsou migrační časy jednotlivých enantiomerů analytu, μ_{efD} a μ_{efL} jsou elektroforetické pohyblivosti enantiomerů a dále je značení stejné jako v tab 4.4.

C_{PEMPDA} mmol·l ⁻¹	t_{EOF} min	μ_{EOF} 10 ⁻⁴ ·cm ² ·V ⁻¹ ·s ⁻¹	t_D min	t_L min	$\mu_{ef,D}$ 10 ⁻⁴ ·cm ² ·V ⁻¹ ·s ⁻¹	$\mu_{ef,L}$ 10 ⁻⁴ ·cm ² ·V ⁻¹ ·s ⁻¹	α
0,0	6,09	6,25	9,10	K	-2,07	-2,07	1,00
0,5	18,36	2,07	88,02	97,15	-1,64	-1,68	1,13
1,0	20,72	1,84	75,10	83,60	-1,33	-1,38	1,16
1,5	24,89	1,53	72,04	81,46	-1,00	-1,06	1,20
2,5	27,57	1,38	46,92	51,53	-0,57	-0,64	1,24
5,0	31,15	1,22	34,94	37,03	-0,13	-0,19	1,55

K – úplná koeluce



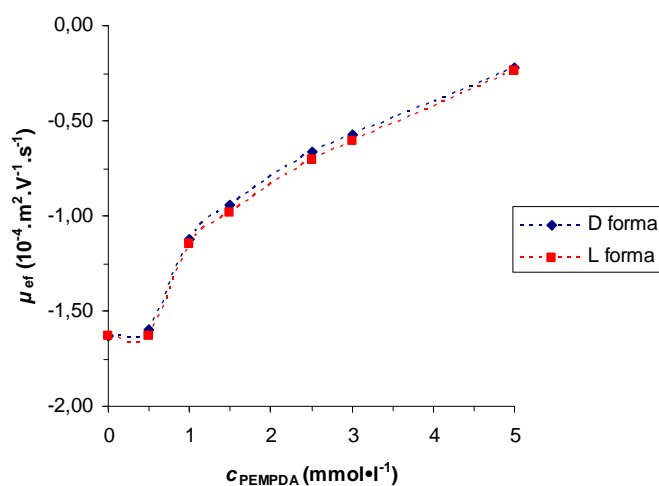
Obrázek 4.10 Vliv koncentrace PEMPDA- β -cyklodextrinu na elektroforetickou pohyblivost D a L formy *N*-boc-fenylalaninu

N-*boc*-D,L-tyrosin se v přítomnosti PEMPDA- β -cyklodextrinu dělil jen částečně a jeho interakce s chirálním selektorem byla nejslabší z takto blokováných vybraných aminokyselin. Stejně jako u *N*-*boc*-D,L-fenylalaninu nedocházelo se zvyšováním koncentrace selektoru k výraznějšímu zlepšení enantioseparace, ale pouze k zlepšení interakce se selektorem a ke zúžení píků (tab. 4.9 a obr. 4.11). Pro 2,5 mmol·l⁻¹ koncentraci selektoru bylo dosaženo maxima enantioselektivity. Dle poměrů ploch píků bylo určeno, že i tentokrát D forma *N*-*boc*-tyrosinu interaguje více než L forma s PEMPDA- β -cyklodextrinem.

Tabulka 4.9 Parametry získané při separaci *N*-*boc*-D,L-tyrosinu v poměru D a L formy 1:2 v 15 mmol·l⁻¹ borátovém pufru o pH = 9,5 s přidavkem PEMPDA- β -CD, značení je stejné jako v tab. 4.8.

C_{PEMPDA} mmol·l ⁻¹	t_{EOF} min	μ_{EOF} 10 ⁻⁴ ·cm ² V ⁻¹ s ⁻¹	t_{D} min	t_{L} min	$\mu_{\text{ef,D}}$ 10 ⁻⁴ ·cm ² V ⁻¹ s ⁻¹	$\mu_{\text{ef,L}}$ 10 ⁻⁴ ·cm ² V ⁻¹ s ⁻¹	α
0,0	6,62	5,75	9,24	K	-1,63	-1,63	1,00
0,5	17,58	2,16	67,65	71,15	-1,60	-1,63	1,07
1,0	24,45	1,56	87,02	93,83	-1,12	-1,15	1,11
1,5	24,53	1,55	62,90	67,45	-0,95	-0,99	1,12
2,5	27,56	1,38	53,22	56,54	-0,67	-0,71	1,13
3,0	28,35	1,34	49,79	51,96	-0,58	-0,61	1,10
5,0	39,88	0,95	51,67	52,87	-0,22	-0,23	1,10

K – úplná koeluce



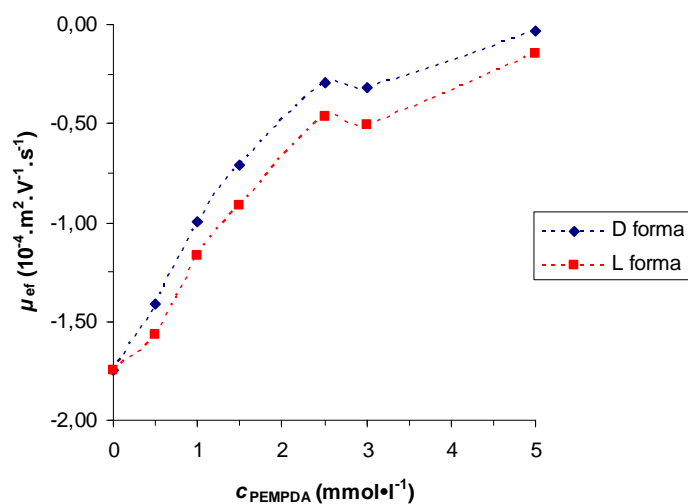
Obrázek 4.11 Vliv koncentrace PEMPDA- β -cyklodextrinu na elektroforetickou pohyblivost D a L formy *N*-*boc*-tyrosinu

Nejlepších výsledků bylo dosaženo pro *N*-*boc*-*D,L*-tryptofan (tab. 4.10 a obr. 4.12), který vykazoval rozdělení jednotlivých enantiomerů na základní linii již při $0,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ koncentraci PEMPDA- β -cyklodextrinu. Na obrázku 4.13 je vidět, jak již přídavek $0,1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ PEMPDA- β -cyklodextrinu značně ovlivnil velikost elektroosmotického toku a z tvaru píku je patrné, že se *D* a *L* forma analytu začíná oddělovat. Zvyšováním koncentrace selektoru docházelo k lepší interakci jednotlivých enantiomerů se selektorem a záporná pohyblivost se zmenšovala. Z poměrů ploch jednotlivých píků bylo určeno, že *N*-*boc*-*D*-tryptofan interagoval s chirálním selektorem silněji. Bohužel zvýšením koncentrace na $5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ došlo k tomu, že se oddělený *N*-*boc*-*D*-tryptofan dostal do zóny rozpouštědla (methanolu) a separace tak byla hůře vyhodnotitelná.

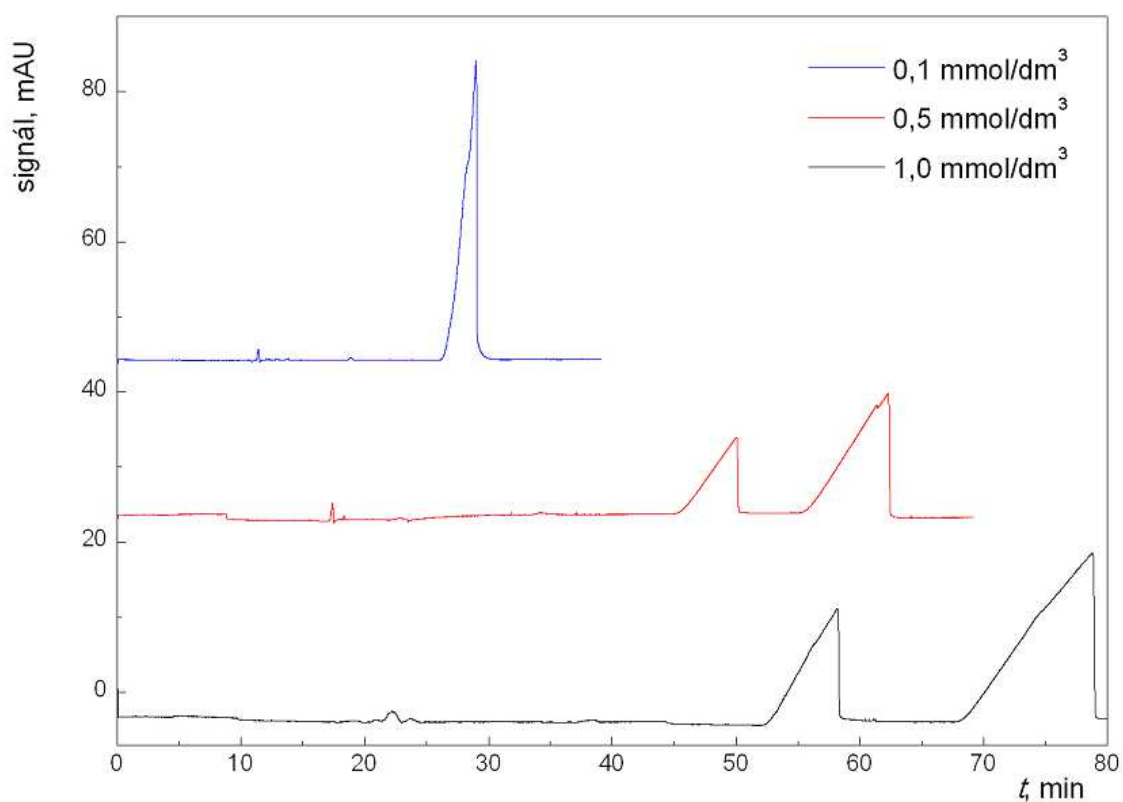
Tabulka 4.10 Parametry získané při separaci *N*-*boc*-*D,L*-tryptofanu v poměru *D* a *L* formy 1:2 v $15 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ borátovém pufru o $\text{pH} = 9,5$ s přídavkem PEMPDA- β -CD, značení je stejné jako v tab. 4.8.

C_{PEMPDA} $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$	t_{EOF} min	μ_{EOF} $10^{-4}\cdot\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$	t_{D} min	t_{L} min	$\mu_{\text{ef,D}}$ $10^{-4}\cdot\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$	$\mu_{\text{ef,L}}$ $10^{-4}\cdot\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$	α
0,0	6,13	6,21	8,53	K	-1,75	-1,75	1,00
0,5	17,49	2,18	50,05	62,28	-1,41	-1,56	1,38
1,0	23,03	1,65	58,19	78,78	-1,00	-1,17	1,59
1,5	24,22	1,57	44,37	58,27	-0,71	-0,92	1,69
2,5	27,51	1,38	35,00	41,38	-0,30	-0,46	1,85
3,0	28,57	1,33	37,48	46,10	-0,32	-0,51	1,97
5,0	37,22	1,02	38,38	43,54	-0,03	-0,15	5,44

K – úplná koeluce

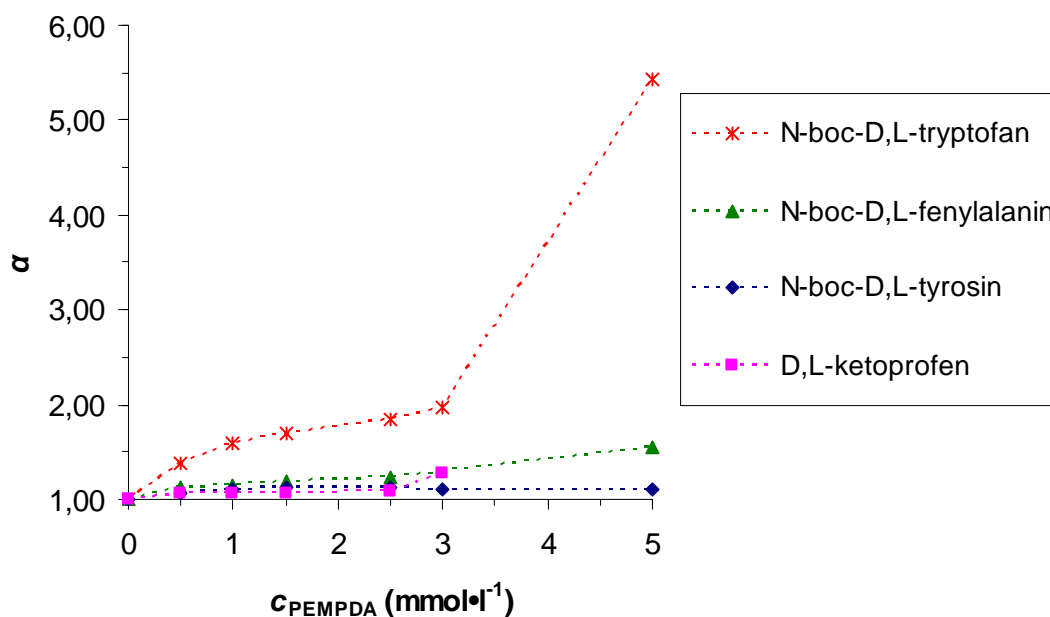


Obrázek 4.12 Vliv koncentrace PEMPDA- β -cyklodextrinu na elektroforetickou pohyblivost D a L formy *N*-*boc*-tryptofanu



Obrázek 4.13 Elektroforeogramy enantioseparace *N*-*boc*-D,L-tryptofanu v poměru D a L formy 1:2 měřené při různých koncentracích přídatku PEMPDA- β -cyklodextrinu do 15 mmol · l⁻¹ borátového pufru o pH = 9,5. Separace probíhala při napětí 15 kV s UV detekcí při 214 nm.

Lze konstatovat, že PEMPDA- β -cyklodextrin se jako nově syntetizovaný selektor osvědčil při enantioseparaci *N*-*boc*-D,L-tryptofanu, jak je vidět na obrázku 4.14. Celkově lze shrnout, že *tert*-butoxykarbonyl jakožto chránící skupina aminoskupiny je vhodná pro interakci těchto látek se selektorem. Ale vzhledem k značnému ovlivňování elektroosmotického toku, způsobeného pravděpodobně interakcí selektoru se stěnou kapiláry, a nutností připravovat vždy čerstvé roztoky pufru a chirálního selektoru se PEMPDA- β -cyklodextrin příliš neosvědčil při použití v kapilární zónové elektroforéze.



Obrázek 4.14 Vliv koncentrace PEMPDA- β -cyklodextrinu na enantiosektivitu vybraných analytů

4.8 PEMEDA- β -cyklodextrin jako chirální selektor v kapilární elektroforéze

Roztoky o různých koncentracích chirálního selektoru byly také připravovány každý týden čerstvé vzhledem k nestabilitě selektoru v zásaditém prostředí. Dále byl po každých třech až čtyřech analýzách vyměňován používaný roztok kvůli nestabilitě pH základního elektrolytu a i nestabilitě chirálního selektoru.

4.8.1 Vliv koncentrace chirálního selektoru na elektroforetickou pohyblivost analytů a enantiosektivitu

Při použití optimalizovaného základního elektrolytu, a to $15 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ borátového pufru o $\text{pH} = 9,5$ bez přídavku organického modifikátoru, byly proměřeny všechny

analyty v roztoku základního elektrolytu s přidavkem PEMEDA- β -cyklodextrinu o třech různých koncentracích tzn. 1,0 mmol·l⁻¹, 2,5 mmol·l⁻¹ a 5,0 mmol·l⁻¹.

Tabulka 4.11 Parametry získané pro sledované analyty v 15 mmol·l⁻¹ borátovém pufru o pH = 9,5 s přidavkem 1,0 mmol·l⁻¹ PEMEDA- β -CD, značení je stejné jako v tab. 4.4.

analyt	t_{EOF} min	μ_{EOF} 10 ⁻⁴ ·cm ² V ⁻¹ s ⁻¹	t_1 min	t_2 min	μ_{ef1} 10 ⁻⁴ ·cm ² V ⁻¹ s ⁻¹	μ_{ef2} 10 ⁻⁴ ·cm ² V ⁻¹ s ⁻¹	α
D,L-fenoprofen	23,13	1,65	30,54	K	-0,40	-0,40	1,00
D,L-suprofen	24,28	1,57	41,60	K	-0,65	-0,65	1,00
D,L-ketoprofen	22,37	1,70	43,81	45,09	-0,83	-0,86	1,06
D,L-tyrosin	23,40	1,63	124,01	K	-1,32	-1,32	1,00
N-boc-D-tyrosin	22,85	1,67	77,03	-	-1,17	-	-
N-boc-L-tyrosin	20,95	1,82	-	77,50	-	-1,33	-
N-boc-D,L-tyrosin (1:2)*	23,20	1,64	79,13	84,30	-1,16	-1,19	1,09
D,L-tryptofan	22,27	1,71	65,88	K	-1,13	-1,13	1,00
N-boc-D-tryptofan	20,87	1,82	53,66	-	-1,11	-	-
N-boc-L-tryptofan	21,44	1,77	-	67,53	-	-1,21	-
N-boc-D,L-tryptofan (1:2)	22,47	1,69	62,44	88,56	-1,08	-1,26	1,65
D,L-fenylalanin	21,73	1,75	70,06	K	-1,21	-1,21	1,00
N-boc-D-fenylalanin	21,34	1,78	77,37	-	-1,29	-	-
N-boc-L-fenylalanin	22,81	1,67	-	106,19	-	-1,31	-
N-boc-D,L-fenylalanin (1:2)	24,74	1,54	107,55	126,73	-1,18	-1,24	1,23

K – úplná koeluce, * poměr D a L formy je 1:2

Tabulka 4.12 Parametry získané pro sledované analyty v 15 mmol·l⁻¹ borátovém pufru o pH = 9,5 s přidavkem 2,5 mmol·l⁻¹ PEMEDA- β -CD, značení je stejné jako v tab. 4.4.

analyt	t_{EOF} min	μ_{EOF} 10 ⁻⁴ ·cm ² V ⁻¹ s ⁻¹	t_1 min	t_2 min	μ_{ef1} 10 ⁻⁴ ·cm ² V ⁻¹ s ⁻¹	μ_{ef2} 10 ⁻⁴ ·cm ² V ⁻¹ s ⁻¹	α
D,L-fenoprofen	28,45	1,34	29,69	K	-0,06	-0,06	1,00
D,L-suprofen	24,84	1,53	23,98	K	0,05	0,05	1,00
D,L-ketoprofen	32,10	1,19	43,53	44,29	-0,31	-0,33	1,07
D,L-tyrosin	27,65	1,38	86,60	K	-0,94	-0,94	1,00
N-boc-D-tyrosin	26,01	1,46	50,76	-	-0,71	-	-
N-boc-L-tyrosin	24,42	1,56	-	52,49	-	-0,83	-
N-boc-D,L-tyrosin (1:2)*	29,26	1,30	60,28	63,52	-0,67	-0,70	1,10
D,L-tryptofan	28,39	1,34	104,32	K	-0,98	-0,98	1,00
N-boc-D-tryptofan	26,32	1,45	40,42	-	-0,50	-	-
N-boc-L-tryptofan	26,73	1,42	-	47,20	-	-0,62	-
N-boc-D,L-tryptofan (1:2)	24,41	1,56	38,25	48,49	-0,56	-0,77	1,74
D,L-fenylalanin	26,05	1,46	ND	ND	-	-	-
N-boc-D-fenylalanin	26,82	1,42	56,69	-	-0,75	-	-
N-boc-L-fenylalanin	25,18	1,51	-	53,49	-	-0,80	-
N-boc-D,L-fenylalanin (1:2)	28,18	1,35	67,05	75,64	-0,78	-0,85	1,22

K – úplná koeluce, * poměr D a L formy je 1:2, ND – nedetekováno

Tabulka 4.13 Parametry získané pro sledované analyty v 15 mmol·l⁻¹ borátovém pufru o pH = 9,5 s přídatkem 5,0 mmol·l⁻¹ PEMEDA-β-CD, značení je stejné jako v tab. 4.4.

analyt	t_{EOF} min	μ_{EOF} 10 ⁻⁴ ·cm ² V ⁻¹ s ⁻¹	t_1 min	t_2 min	μ_{ef1} 10 ⁻⁴ ·cm ² V ⁻¹ s ⁻¹	μ_{ef2} 10 ⁻⁴ ·cm ² V ⁻¹ s ⁻¹	α
D,L-fenoprofen	34,21	1,11	25,99	K	0,35	0,35	1,00
D,L-suprofen	34,68	1,10	27,99	K	0,26	0,26	1,00
D,L-ketoprofen	34,88	1,09	35,94	N	-0,03	-	-
D,L-tyrosin	36,62	1,04	95,69	K	-0,64	-0,64	1,00
<i>N</i> -boc-D-tyrosin	34,65	1,10	52,08	-	-0,37	-	-
<i>N</i> -boc-L-tyrosin	35,93	1,06	-	56,56	-	-0,39	-
<i>N</i> -boc-D,L-tyrosin (1:2) [*]	36,97	1,03	50,20	52,37	-0,27	-0,30	1,16
D,L-tryptofan	33,84	1,12	ND	ND	-	-	-
<i>N</i> -boc-D-tryptofan	34,02	1,12	37,56	-	-0,11	-	-
<i>N</i> -boc-L-tryptofan	35,75	1,06	-	43,74	-	-0,19	-
<i>N</i> -boc-D,L-tryptofan (1:2)	33,83	1,12	37,17	42,81	-0,10	-0,24	2,69
D,L-fenylalanin	33,82	1,13	ND	ND	-	-	-
<i>N</i> -boc-D-fenylalanin	33,27	1,14	45,54	-	-0,31	-	-
<i>N</i> -boc-L-fenylalanin	33,52	1,14	-	46,59	-	-0,32	-
<i>N</i> -boc-D,L-fenylalanin (1:2)	35,04	1,09	44,66	47,39	-0,23	-0,28	1,28

K – úplná koeluce, N – hodnotu nebylo možné odečíst ze záznamu vzhledem ke spojení zóny analytu se značkovačem elektroosmotického toku, * poměr D a L formy je 1:2, ND – nedetekováno

Tabulky 4.11 – 4.13 shrnují hodnoty elektroforetických mobilit a případné enantioselektivity analytů, které alespoň při jedné ze zvolených koncentrací byly detekovány, a to i v případě, že se neoddělily jednotlivé enantiomery.

Mandlová kyselina, *N*-acetyl-tryptofan, *N*-acetyl-fenylalanin, *N*-benzoyl-fenylalanin a fenylmléčná kyselina také nebyly detekovány v roztocích s přídatkem PEMEDA-β-cykloextrinu. Pravděpodobně i tentokrát dochází k minimální či žádné interakci s cykloextrinovým derivátem a kvůli výraznému zpomalení elektroosmotického toku se prodloužil migrační čas tak, že ani po dvou hodinách analýzy nebyla zaznamenána jejich odezva.

D,L-Fenoprofen a D,L-suprofen interagovaly se selektorem velmi podobně a docházelo ke stejným problémům jako u PEMPDA-β-cykloextrinu, kdy při nízkých koncentracích selektoru nebylo možné přesně určit vrchol píku. V tabulkách 4.11 a 4.12 jsou proto opět uvedené jen orientační hodnoty. Se zvyšující se koncentrací selektoru až na 5,0 mmol·l⁻¹, ale došlo k výborné interakci se selektorem bez oddělení enantiomerů a fenoprofen i suprofen tak vykazovaly kladnou elektroforetickou mobilitu. K hlavní interakci dochází pravděpodobně stejně jako u předešlého selektoru mimo chirální centrum analytu.

D,L-Ketoprofen interagoval s PEMEDA- β -cyklodextrinem velice podobně jako s PEMPDA- β -cyklodextrinem a enantioseparace byla dokonce stejná a tedy také částečná. Píky byly též zepředu rozmyté a při zvyšující se koncentraci chirálního selektoru se přibližovaly zóně značkovače elektroosmotického toku (methanolu), se kterou se při $5,0 \text{ mmol} \cdot \text{ml}^{-1}$ spojily.

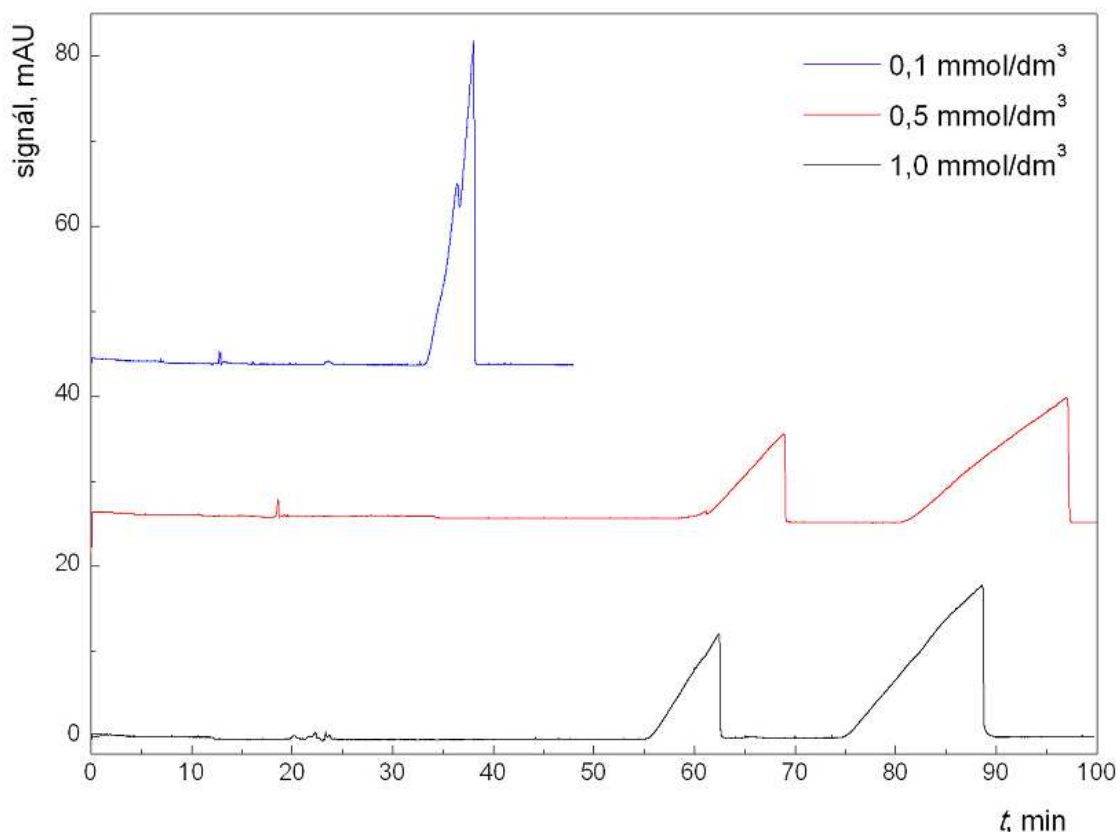
U neblokovaných aminokyseliny byly zjištěny největší rozdíly v interakci s jednotlivými selektory. D,L-Fenylalanin vykazoval slabou interakci s PEMEDA- β -cyklodextrinem a to dokonce ještě slabší ve srovnání s PEMPDA- β -cyklodextrinem, proto byl jeden pík detekován pouze u nejnižší zkoušené koncentrace a to $1,0 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$. Při vyšších koncentracích vlivem zpomalení elektroosmotického toku nebyla detekce analytu možná. D,L-Tryptofan naopak interagoval o trochu lépe s PEMEDA- β -cyklodextrinem, což se projevilo zejména na tvaru píků, které byly více symetrické, ale při koncentraci $5,0 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ již nebyl pík ze stejného důvodu jako u D,L-fenylalaninu zaznamenán. U D,L-tyrosinu byl pozorován největší rozdíl v interakci u zkoušených chirálních selektorů. Při použití PEMEDA- β -cyklodextrinu nedocházelo ani k částečnému dělení enantiomerů a interakce se selektorem byla výrazně slabší, i když se se zvyšující koncentrací selektoru zlepšovala.

Nejlepších výsledků bylo opět dosaženo pro aminokyseliny blokované terc-butoxykarbonylem na aminoskupině.

N-*boc*-D,L-fenylalanin a *N*-*boc*-D,L-tyrosin se po změně selektoru separovaly stejně jako u PEMPDA- β -cyklodextrinu a docházelo tedy pouze k částečnému dělení enantiomerů, které se se zvyšující koncentrací příliš nezlepšovalo. U *N*-*boc*-D,L-tyrosinu ale tentokrát enantiosektivita nedosahovala maxima u zkoušených koncentrací. Pouze se zlepšovala interakce, ale u obou enantiomerů srovnatelně, a docházelo k zúžení píků. Dle poměrů ploch píků bylo opět určeno pro oba analyty, že jejich D forma interaguje se selektorem silněji než L forma.

Pro *N*-*boc*-D,L-tryptofan bylo i tentokrát dosaženo s použitím PEMEDA- β -cyklodextrinu nejlepších výsledků. Proto bylo pouze pro tuto látku provedeno měření s $0,1$ a $0,5 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ koncentrací PEMEDA- β -cyklodextrinu a i tentokrát došlo při použití $0,1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ koncentrace k náznaku enantioseparace a u $0,5 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ koncentrace již došlo k oddělení enantiomerů na základní linii (obr. 4.15). Se zvyšující se koncentrací selektoru docházelo ke zkracování doby analýzy a zužování píků, které

byly zepředu rozmyté. Rozdíl vůči PEMPDA- β -cyklodextrinu byl zejména v tom, že tentokrát při použití nejvyšší zkoušené koncentrace a to $5,0 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ nedocházelo ke spojení zóny analytu se zónou markeru elektroosmotického toku. Dle poměrů ploch pík bylo určeno, že *N*-*boc*-*D*-tryptofan interaguje se selektorem silněji než *N*-*boc*-*L*-tryptofan, ale o trochu slaběji než s PEMPDA- β -cyklodextrinem.



Obrázek 4.15 Elektroforeogramy enantioseparace *N*-*boc*-*D,L*-tryptofanu v poměru *D* a *L* formy 1:2 měřené při různých koncentracích přídavku PEMPDA- β -cyklodextrinu do $15 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ borátového pufru o $\text{pH} = 9,5$. Separace probíhala při napětí 15 kV s UV detekcí při 214 nm.

PEMPDA- β -cyklodextrin byl Nzeadibem a kol.⁴⁰ poprvé syntetizován a testován jako chirální selektor v kapilární elektroforéze pro rozdělení enantiomerů širokého spektra látek, tedy různých slabých kyselin i zásad, vybraných neutrálních látek, aj. Ale u žádného analytu nebylo dosaženo tak dobré enantioselektivity, ani při vyšších používaných koncentracích či jiném pH , jaké bylo dosaženo již u $1,0 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ koncentrace PEMPDA- β -cyklodextrinu při enantioseparaci *N*-*boc*-*D,L*-tryptofanu

v $15 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ borátového pufru o $\text{pH} = 9,5$.

4.9 Duální systém

Závěrem bylo vyzkoušeno, zda by separaci studovaných analytů nezlepšil přídavek nativního cyklodextrinu k cyklodextrinovým derivátům, a to ve vyšší koncentraci než byla koncentrace derivátu, protože využití duálních systémů se dle literatury často osvědčilo. Vzhledem k tomu, že zkoumanými selektory byly deriváty β -cyklodextrinu, byl použit též nativní β -cyklodextrin. Jeho rozpustnost je poměrně nízká, a proto byla zvolena koncentrace přídavku β -cyklodextrinu $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a koncentrace PEMPDA- β -cyklodextrinu nebo PEMEDA- β -cyklodextrinu $2,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Samotný $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ roztok β -cyklodextrinu neseperoval jednotlivé enantiomery a ani výrazně neovlivňoval elektroosmotický tok. Použití směsi cyklodextrinů ve výše udaném složení, ale také nevedlo k zlepšení separace. Docházelo k zvýšení šumu a dále ke kolísání elektrického proudu. Přídavek nativního cyklodextrinu nejspíše negativně ovlivnil elektrostatické interakce mezi analytem a cyklodextrinovým derivátem a pravděpodobně se zhoršila i rozpustnost některých složek roztoku v separační kapiláře, a to negativně ovlivnilo průběh analýzy.

5. Závěr

Metodou kapilární zónové elektroforézy byly testovány separační a enantioseparační vlastnosti PEMEDA- β -cyklodextrinu a PEMPDA- β -cyklodextrinu, zejména schopnost oddělit jednotlivé enantiomery u čtrnácti vybraných anionogenních analytů. PEMPDA- β -cyklodextrin je nově syntetizovaný chirální selektor, který byl poprvé využit pro analytické účely. PEMEDA- β -cyklodextrin byl již dříve použit jako aditivum do základního elektrolytu v kapilární elektroforéze⁴⁰, ale doposud nebyl vyzkoušen pro enantioseparaci aminokyselin a jejich derivátů.

Jako vhodný základní elektrolyt pro separaci byl zvolen $15 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ borátový pufru o $\text{pH} = 9,5$ bez přídavku organického modifikátoru s různými přídávky cyklodextrinového derivátu v rozsahu koncentrací $0,0 - 5,0 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Oba studované selektory vykazovaly výborné enantioseparační vlastnosti pro *N*-*boc*-D,L-tryptofan, u kterého postačila koncentrace $0,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ k oddělení enantiomerů na základní linii. Částečného oddělení enantiomerů bylo dosaženo i pro D,L-ketoprofen, *N*-*boc*-D,L-fenylalanin a *N*-*boc*-D,L-tyrosin. Silná interakce při koncentraci chirálního selektoru $5,0 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ byla zaznamenána pro D,L-suprofen a D,L-fenoprofen, bohužel však neměla enantiodiskriminační charakter.

Největší rozdíl mezi selektory byl pozorován při analýze nederivatizovaných aminokyselin, kdy PEMPDA- β -cyklodextrin vykazoval lepší enantioselektivní vlastnosti a u D,L-tyrosinu byla pozorována částečná enantioseparace.

U většiny testovaných analytů však nebyla zaznamenána interakce s chirálními selektory, protože vzhledem k značnému zpomalení elektroosmotického toku nebylo možné po přídavku selektoru určit jejich elektroforetické pohyblivosti.

Nevýhodou studovaných selektorů byl fakt, že se roztoky základního elektrolytu s přídavkem chirálního selektoru musely připravovat vždy čerstvé, protože selektory nejsou dostatečně stabilní v zásaditém pH a při zvýšené teplotě. Také bylo nutné často vyměňovat elektrolyt ve vstupní vialce, protože v malém objemu, který byl z technických důvodů používán, docházelo i ke změně složení borátového pufru vlivem průchodu elektrického proudu. Tato omezení by mohla eliminovat aplikace metody vysokoúčinné kapilární kapalinové chromatografie.

6. Literatura

1. Tsioupi, D. A.; Stefan-van-Staden, R.-I.; Kapnissi-Christodoulou, C. P.: Chiral selectors in CE: Recent developments and applications. *Electrophoresis* **34**, 178–204 (2013)
2. Del Valle, E. M. M.: Cyclodextrins and their uses: a review. *Process Biochemistry* **39**, 1033–1046 (2004)
3. Cucinotta, V.; Contino, A.; Giuffrida, A.; Maccarrone, G.; Messina, M.: Application of charged single isomer derivatives of cyclodextrins in capillary electrophoresis for chiral analysis. *Journal of Chromatography A* **1217**, 953–967 (2010)
4. Gaš, B.: Kapilární elektroforéza. *Vesmír* **80**, 370–372 (2001)
5. Heiger, D.: *High performance capillary electrophoresis – an introduction*. Německo, Hewlett-Packard Company 1992, ISBN: 59689963E
6. Štulík, K. a kolektiv: *Analytické separační metody*. 1. vydání Praha, Karolinum 2005, ISBN: 80–246–0852–9
7. Kašička, V.: Teoretické základy a separační principy kapilárních elektromigračních metod. *Chemické listy* **91**, 320–329 (1997)
8. Opekar, F.; Jelínek, I.; Rychlovský, P.; Plzák, Z.: *Základní analytická chemie*. 1. vydání Praha, Karolinum 2007, ISBN: 978–80–246–0553–1
9. Fejös, I.; He, Y.; Völgyi, G.; Kazsoki, A.; Sun, J.; Chen, W.; Sohajda, T.; Szente, L.; Jiang, X.; Béni, S.: Tapentadol enantiomers: Synthesis, physico-chemical characterization and cyclodextrin interactions. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **88**, 594–601 (2014)
10. Kroutil, J.: *Problémy ve stereochemii uhlíkatých sloučenin – učební text*. Dostupné z URL: <http://archiv.otevrena-veda.cz/users/Image/default/C1Kurzy/Chemie/27kroutil.pdf> > [cit. 3.2.2014]
11. Nguyen, L. A.; He, H.; Pham-Huy, Ch.: Chiral drugs: An overview. *International Journal of Biomedical Science* **2(2)**, 85–100 (2006)
12. Červinka, O.: Chiralita a pojmy s ní související. *Chemické listy* **93**, 294–305 (1999)
13. Smith, W. S.: Chiral Toxicology: It's the same thing...Only different. *Toxicological Sciences* **110(1)**, 4–30 (2009)
14. Hodačová J. (Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, Praha 6): *Supramolekulární stereochemie – učební text*. Dostupné z URL: http://www.uochb.cas.cz/Zpravy/PostGrad2005/9_Hodacova.pdf > [cit. 3.2.2014]
15. Rajkumar, S. V.: Tahlidomide: Tragic past and promising future. *Mayo Clinic Proceedings* **79(7)**, 899–903 (2004)
16. Hernández-Borges, J.; Rodríguez-Delgado, M. Á.; García-Montelongo, F. J.; Cifuentes, A.: Chiral analysis of pollutants and their metabolites by capillary electromigration methods. *Electrophoresis* **26**, 3799–3813 (2005)
17. Gassmann, E.; Kuo, J. E.; Zare, R. N.: Electrokinetic separation of chiral compounds. *Science* **230**, 213–214 (1985)
18. Fanali, S.: Enantioselective determination by capillary electrophoresis with cyclodextrin as chiral selectors. *Journal of Chromatography A* **875**, 89–122 (2000)
19. Wren, S. A. C.; Rowe, R. C.: Theoretical aspects of chiral separation in capillary electrophoresis: I. Initial evaluation of a model. *Journal of Chromatography A* **603**, 235–241 (1992)

20. Vigh, G.; Rawjee, Y. Y.; Williams, R. L.: Capillary electrophoretic chiral separations using β -cyclodextrin as resolving agent. *Journal of Chromatography A* **652**, 233-245 (1993)
21. Juvancz, Z.; Kendrovics, R. B.; Iványi, R.; Szente, L.: The role of cyclodextrins in chiral capillary electrophoresis. *Electrophoresis* **29**, 1701–1712 (2008)
22. Tang, W.; Ng, S.-Ch.; Sun, D.: *Modified cyclodextrin for chiral separation*. 1. vydání Berlin Heidelberg, Springer-Verlag 2013, ISBN 978–3-642–37648-1
23. Gübitz, G.; Schmid, M. G.: *Chiral separations – Methods and Protocols*. Totowa, New Jersey, Humana Press Inc. 2004, ISBN: 1–59259-648–7
24. Horský, J.; Jidřich, J.: Cyklodextriny ve světě polymerů. *Chemické listy* **107**, 769–776 (2013)
25. Chatjigakis, A. K.; Donzé, C.; Coleman, A. W.: Solubility behavior of β -cyclodextrin in water/cosolvent mixtures. *Analytical Chemistry* **64**, 1632–1634 (1992)
26. Řezanka, M.: Syntéza monosubstituovaných cyklodextrinů. *Diplomová práce*, PŘF UK Praha, 2007
27. Bergische Universität Wuppertal: *Host-Guest Complexes with Cyclodextrins* – učební text. Dostupné z URL: <http://www.chemiedidaktik.uni-wuppertal.de/disido_cy/cyen/info/04_wirtgast_cy.htm> [cit. 8.5.2014]
28. Jelínek, I.; Snopek, J.; Smolková-Keulemansová, E.: Use of cyclodextrins in isotachophoresis: I. Effect of cyclodextrin on the isotachophoretic separation of related penicillins. *Journal of Chromatography* **405**, 379–384 (1987)
29. Snopek, J.; Jelínek, I.; Smolková-Keulemansová, E.: Use of cyclodextrins in isotachophoresis: IV. The influence of cyclodextrins on the chiral resolution of ephedrine alkaloid enantiomers. *Journal of Chromatography* **438**, 211–218 (1988)
30. Fanali, S.: Separation of optical isomers by capillary zone electrophoresis based on host-guest complexation with cyclodextrins. *Journal of Chromatography* **474**, 441–446 (1989)
31. Sánchez-Hernández, L.; Castro-Puyana, M.; Marina, M. L.; Crego, A. L.: Recent approaches in sensitive enantioseparations by CE. *Electrophoresis* **33**, 228–242 (2012)
32. Guihen, E.; Hogan, A.-M.; Glennon, J. D.: High-Speed Microchip Electrophoresis Method for the Separation of (*R,S*)-Naproxen. *Chirality* **21**, 292–298 (2009)
33. Elbashir, A. A.; Suliman, F. O.: Computational modeling of capillary electrophoretic behavior of primary amines using dual system of 18-crown-6 and β -cyclodextrin. *Journal of Chromatography A* **1218**, 5344–5351 (2011)
34. Wang, F.; Khaledi, M. G.: Enantiomeric separations by nonaqueous capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A* **875**, 277–293 (2000)
35. Morin, Ph.; Daguet, D.; Coïc, J. P.; Dreux, M.: Usefulness of methylated- β -cyclodextrin-based buffers for the separation of highly hydrophobic solutes in non-aqueous capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A* **837**, 281–287 (1999)
36. de Boer, T.; de Zeeuw, R., A.; de Jong, G., J.; Ensing, K.: Recent innovations in the use of charged cyclodextrins in capillary electrophoresis for chiral separations in pharmaceutical analysis. *Electrophoresis* **21**, 3220–3239 (2000)
37. Fillet, M.; Hubert, Ph.; Crommen, J.: Enantiomeric separations of drugs using mixtures of charged and neutral cyclodextrins. *Journal of Chromatography A* **875**, 123–134 (2000)

38. Matthijs, N.; Van Hemelryck, S.; Maftouh, M.; Massart, D. L.; Heyden, Y. V.: Electrophoretic separation strategy for chiral pharmaceuticals using highly-sulfated and neutral cyclodextrins based dual selector systems. *Analytica Chimica Acta* **525**, 247–263 (2004)
39. Terabe, S.: Electrokinetic chromatography: An interface between electrophoresis and chromatography. *Trends in Analytical Chemistry* **8**, 129–134 (1989)
40. Nzeadibe, K.; Vigh, G.: Synthesis of mono-6-deoxy-6-*N,N,N',N',N'*-pentamethylethylenediammonio-cyclomaltoheptaose, a single-isomer, monosubstituted, permanently dicationic β -CD and its use for enantiomer separations by CE. *Electrophoresis* **28**, 2589–2605 (2007)
41. Liu, P.; Sun, X.; He, W.; Jiang, R.; Wang, P.; Zhao, Y.; Zhang, S.: Enantioselective separation of chiral vicinal diols in capillary electrophoresis using a mono-6^A-aminoethylamino- β -cyclodextrin as a chiral selector. *Journal of Separation Science* **32**, 125–134 (2009)
42. Popr, M.; Hybelbauerová, S.; Jindřich, J.: A complete series of 6-deoxy-monosubstituted tetraalkylammonium derivatives of α -, β -, and γ -cyclodextrin with 1, 2, and 3 permanent positive charges. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, přijat do tisku (2014)
43. Leonard, J.; Lygo, B.; Procter, G.: *Advanced Practical Organic Chemistry*, 2. vydání Velká Británie, Chapman & Hall 1995, ISBN: 0-7514-0200-1
44. Tanaka, Y.; Terabe, S.: Enantiomer separation of acidic racemates by capillary electrophoresis using cationic and amphoteric β -cyclodextrins as chiral selectors. *Journal of Chromatography A* **781**, 151–160 (1997)
45. Puskás, I.; Schrott, M.; Malanga, M.; Sente, L.: Characterization and control of the aggregation behavior of cyclodextrins. *Journal of Inclusion Phenomena and Makrocyclic Chemistry* **75**, 269–276 (2013)
46. Němcová, I.; Engst, P.; Jelínek, I.; Sejbál, J.; Rychlovský, P.: *Spektrometrické analytické metody II*. 1. vydání Praha, Karolinum 1998, ISBN: 80-7184-586-8
47. Figgemeier, E.; Hiltrop, K.: Intramolecular Hydrogen Bonding of Phenyllactic Acid. UV-Absorption Studies and Conformational Analysis in Micellar and Nonmicellar Systems. *Langmuir* **18**, 1949–1951 (2002)
48. Prokhorova, A.F.; Larin, V. A.; Mikhalyuk, A. N.; Staroverov, S. M.; Shapovalova, E. N.; Shpigun, O. A.: Enantioseparation of organic acids of pharmaceutical interest using eremomycin as a chiral selector. *Electrophoresis* **32**, 2663–2668 (2011)
49. Edelhoch, H.: Spectroscopic Determination of Tryptophan and Tyrosine in Proteins. *Biochemistry* **6**, 1948-1954 (1967)
50. Maruszak, W.; Trojanowicz, M.; Margasińska, M.; Engelhardt, H.: Application of carboxymethyl- β -cyclodextrin as a chiral selector in capillary electrophoresis for enantiomer separation of selected neurotransmitters. *Journal of Chromatography A* **926**, 327–336 (2001)