

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra fyzikální a makromolekulární chemie



**Popis elektroforetických separačních systémů,  
využití systémových píků k charakterizaci vlastností surfaktantů  
a optimalizace složitějších systémů pomocí modelu LFER**

DISERTAČNÍ PRÁCE

**Jana Lokajová**

Praha 2008

Předkládaná disertační práce shrnuje výsledky, které byly získány v letech 2004 – 2008 během mého doktorského studia vykonávaného ve Skupině elektromigračních separačních metod na Katedře fyzikální a makromolekulární chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze. Disertační práce je založena na šesti původních publikacích otištěných v recenzovaných časopisech, jejichž plná znění jsou uvedena v příloze, a jedné připravované publikaci.

Prohlašuji, že jsem tuto disertační práci vypracovala samostatně, pod vedením školitelky Doc. RNDr. Evy Tesařové, CSc. a konzultanta Prof. RNDr. Bohuslava Gaše, CSc., a že jsem všechny použité prameny řádně citovala.

Disertační práce ani její podstatná část nebyla použita k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 20. června 2008

.....

Jana Lokajová

## **Předmětová hesla**

separační systémy, elektroforéza, micelární systémy, kapalinová chromatografie

## **Klíčová slova**

CMC, systémové píky, MEKC, amplitudy, LFER

## **Poděkování**

Na tomto místě bych ráda poděkovala svým školitelům Doc. RNDr. Evě Tesařové, CSc. a Prof. RNDr. Bohuslavu Gašovi, CSc. za cenné rady a četné odborné konzultace, které mi poskytovali během vedení této disertační práce.

Zvláštní dík patří RNDr. Vlastimilu Hruškovi, RNDr. Kateřině Ušelové, Ph.D. a RNDr. Ivě Zuskové, CSc. nejen za jejich ochotu a pomoc, ale i za spoluvytváření přátelské atmosféry, ve které bylo příjemné pracovat.

Velmi si cením trpělivé podpory svých rodičů a Mgr. Lukáše Cholevy, od nichž jsem mohla čerpat povzbuzení, kdykoli bylo potřeba.

## OBSAH

Předmětová hesla a klíčová slova .....	3
Poděkování .....	4
Seznam zkratek .....	6
Seznam symbolů .....	7
1 Úvod .....	9
2 Úvod do problematiky .....	10
2.1 Pohyb iontů v elektrickém poli .....	10
2.2 Elektroosmotický tok a jeho úprava .....	11
2.3 Systémové píky .....	13
2.4 Micelární systémy .....	14
2.4.1 Způsoby určení kritické micelární koncentrace .....	16
2.5 Optimalizace separace .....	17
2.5 LFER .....	17
3 Motivace a výzkumné cíle .....	20
4 Výsledky a diskuze .....	21
4.1 Amplitudy systémových píků (publikace I) .....	21
4.2 Stanovení kritické micelární koncentrace pomocí systémových píků v kapilární elektroforéze (publikace II) .....	25
4.3 Mobilizace systémových píků vlivem iontové síly (připravovaná publikace) .....	29
4.4 Interpolymerní micelární nanočástice stabilizované specifickou interakcí: Blokovaný kopolymer polystyren-kyselina poly(metakrylová) s lineárním homopolymerem poly(2-vinylpyridinem) ve vodném prostředí (publikace III a IV) .....	34
4.5 Separační systémy se stacionárními fázemi (publikace V a VI) .....	38
4 Závěry .....	41
5 Seznam použité literatury .....	42
Seznam publikací .....	45
Příspěvky na konferencích .....	46
Životopis .....	48

## Seznam zkratk

AFM	mikroskopie atomárních sil
BGE	základní elektrolyt
CE	kapilární elektroforéza
CMC	kritická micelární koncentrace
CSP	chirální stacionární fáze
CZE	kapilární zónová elektroforéza
EOF	elektroosmotický tok
HVL	Haarhoff–Van der Linde funkce
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
LiDS	dodecylsulfát litný
LC	kapalinová chromatografie
LFER	lineární vztahy volných energií
LS	rozptyl světla
MeOH	methanol
MEKC	micelární elektrokinetická chromatografie
MOPS	morfolinopropansulfonová kyselina
MTAG	methylovaný teikoplanin aglykon
NCSS	statistický program
PVP	poly(2-vinylpyridin)
PMA	poly(metakrylová kyselina)
PS-PMA	bloková kopolymerní micela polystyren-kyselina polymetakrylová
PS-PMA/PVP	blokový kopolymer polystyren-kyselina polymetakrylová /poly(2-vinylpyridin)
SMIL	vícevrstvé pokrytí stěny kapiláry
SDS	dodecylsulfát sodný
SDS-PAGE	polyakrylová gelová elektroforéza s dodecylsulfátem sodným
T	teikoplanin
TAG	teikoplanin aglykon
TEAA	triethylaminacetátový pufr

UV	ultrafialový
UV-Vis	ultrafialový-viditelný

## Seznam symbolů

$a$	stupeň disociace
$\Sigma a_2^H$	charakteristika protondonní schopnosti analytu pro tvorbu vodíkové vazby
$\Sigma b_2^H$	charakteristika protonakceptorní schopnosti analytu pro tvorbu vodíkové vazby
$\epsilon$	permitivita prostředí
$\eta$	viskozita
$l$	Debyeova délka
$m_{act}$	aktuální iontová pohyblivost, aktuální iontová mobilita
$m_{eff}$	efektivní pohyblivost, efektivní mobilita
$m_{eof}$	pohyblivost elektroosmotického toku, mobilita elektroosmotického toku
$m_{im}$	limitní iontová pohyblivost, limitní iontová mobilita
$m_{mic}$	elektroforetická pohyblivost (mobilita) komplexu PS-PMA/PVP
$p_2^H$	dipolarita/polarizibilita
$s$	plošná hustota elektrického náboje na povrchu pevné fáze
$x$	poměr segmentů poly(2-vinylpyridinu) ku polymetakrylové kyselině
$\zeta$	elektrokinetický neboli zeta potenciál
<b>a, b, r, s, v</b>	regresní koeficienty rovnice LFER
$c$	molární koncentrace
<b>c</b>	úsek regresní rovnice
$e$	elementární náboj
$E$	intenzita elektrického pole
$F$	Faradayova konstanta
$F_e$	elektrická síla
$I_s$	iontová síla roztoku
$k$	retenční faktor
$l_C$	délka kapiláry

$N_{AG}$	agregační číslo
$pK_a$	záporný dekadický logaritmus kyselá disociační konstanty
$q_{mic}$	elektrický náboj komplexu PS-PMA/PVP
$r$	poloměr kulovité částice (tzv. Stokesův poloměr)
$R$	molární plynová konstanta
$R_2$	rozsah molární refrakce
$T$	termodynamická teplota
$U$	elektrické napětí
$v$	rychlost iontu
$v_{eof}$	rychlost elektroosmotického toku
$V_x$	McGowanův charakteristický objem solutu
$z$	nábojové číslo iontu



## 1 Úvod

Kapilární elektromigrační metody představují vysokoúčinné a vysoce citlivé separační techniky, které jsou stále cennějším nástrojem v analytických laboratořích. Prvopočátky elektroforézy sahají do konce devatenáctého století. Největší rozvoj zaznamenaly elektromigrační metody v osmdesátých a počátkem devadesátých let 20. století a dodnes jsou úspěšně používány v široké řadě aplikací (rutinně pro chirální separace, analýzy fragmentů DNA, klinické aplikace, analýzy anorganických iontů, aj.).

Přes značnou aplikační škálu však není řada jevů v kapilární elektroforéze podrobně popsána a správně vysvětlena. Cílem této disertační práce je objasnění některých doposud nevysvětlených jevů doprovázejících elektroforetické separační procesy, dále rozšíření a aplikace simulačních programů na reálné elektroforetické systémy umožňující následnou optimalizaci, jejíž součástí je také předpověď výskytu a chování systémových píků. Popis chování systémových píků v micelárním prostředí přispěl k vytvoření nové metody pro stanovení kritické micelární koncentrace.

Micelární systémy, využívající tzv. pseudostacionární fáze a tudíž chromatografický interakční mechanismus, představují v širším kontextu separačních metod již jen krok k chromatografickým systémům se stacionárními fázemi. Druhá část této práce se proto zaměřuje na objasnění interakčního mechanismu v chromatografických separačních systémech-konkrétně využívajících chirální stacionární fáze. Tyto systémy mají významné uplatnění především v oblasti vývoje, produkce a využití léčiv.

## 2 Úvod do problematiky

### 2.1 Pohyb iontů v elektrickém poli

Kapilární zónová elektroforéza (CZE – capillary zone electrophoresis) patří mezi elektromigrační separační analytické metody, jejichž separační princip je založen na rozdílné migrační rychlosti nabitých částic v elektrickém poli. Migrační rychlost pohybu iontu je dána rovnováhou mezi silami, které na iont nacházející se ve stejnosměrném elektrickém poli působí. První příspěvek představuje elektrická síla  $F_e$ , která je dána působícím elektrickým polem,

$$F_e = z_i e E, \quad (1)$$

kde  $z_i$  je nábojové číslo iontu  $i$ ,  $e$  elementární náboj a  $E$  intenzita elektrického pole, definovaná rovnicí (2),

$$E = \frac{U}{l_c}, \quad (2)$$

ve které  $U$  je vložené napětí a  $l_c$  délka kapiláry.

Ve viskózním kapalném prostředí je však pohyb iontu brzděn silou  $F_s$ , která je dle Stokesova zákona

$$F_s = 6\pi\eta r_i v_i \quad (3)$$

kde  $r_i$  představuje poloměr kulovité částice (tzv. Stokesův poloměr) pohybující se prostředím o dynamické viskozitě  $\eta$  rychlostí  $v_i$ .

V systému dojde záhy k ustavení rovnováhy mezi těmito dvěma silami a ion se pohybuje konstantní rychlostí  $v_i$ , která je úměrná intenzitě elektrického pole  $E$ ,

$$v_i = E m_i, \quad (4)$$

kde  $m_i$  představuje elektroforetickou pohyblivost iontu  $i$ . Elektroforetická pohyblivost je klíčovým pojmem všech elektroforetických metod a je definovaná jako migrační rychlost iontu  $i$  v elektrickém poli o jednotkové intenzitě. Z rovnosti působící třecí a elektrické síly ji lze vyjádřit rovnicí (5)

$$m_i = \frac{ze}{6\pi\eta r_i}. \quad (5)$$

Elektroforetická pohyblivost iontu je tedy dána vlastními parametry iontu, tzn. nábojem a velikostí iontu, ale také vlastnostmi prostředí (viskozita). Pohyblivost iontů se zvyšuje s hodnotou náboje daného iontu a klesá s jeho rostoucím hydrodynamickým poloměrem a viskozitou prostředí. Díky především coulombickým interakcím iontů je mobilita též funkcí iontové síly. Maximální tzv. limitní hodnoty  $m_{im,i}$  nabývá v nekonečně zředěném roztoku. Pohyblivost při konečné iontové síle se pak nazývá aktuální  $m_{act,i}$ . Pro látky tvořené více formami, mezi nimiž dochází k rychlému ustavování rovnováhy (např. slabé elektrolyty, kineticky labilní komplexy) byla zavedena tzv. efektivní pohyblivost  $m_{eff}$ , která vystihuje pohyblivost dané látky jako celku a je definována vztahem

$$m_{eff} = \sum_{i=1}^m m_{act,i} a_i \operatorname{sgn} z_i, \quad (6)$$

kde  $a_i$  je stupeň disociace,  $z_i$  nábojové číslo iontu  $i$  a  $m_{act,i}$  aktuální pohyblivost  $i$ -té iontové formy dané látky.

## 2.2 Elektroosmotický tok a jeho úprava

Významným fenoménem uplatňujícím se v elektromigračních metodách je elektroosmotický tok (EOF). Předpokladem vzniku elektroosmotického toku je existence elektrické dvojvrstvy na rozhraní kapiláry a vodného roztoku [1,2]. Po vložení napětí se volná část elektrické dvojvrstvy počínaje rovinou stříhu popsanou Sternovým modelem [3] uvede do pohybu s rychlostí  $v_{eof}$  a třecí silou s sebou strhne celý obsah kapiláry. Elektrická dvojvrstva vzniká vytvořením náboje na stěně kapiláry, k čemuž dochází v případě nejčastěji používaných křemených kapilár disociací silanolových skupin kapiláry ve vodných roztocích. Disociační konstanta  $pK_a$  silanolových skupin se pohybuje z důvodu tvorby polyaniontů v rozmezí pH 4,5-5,5 a velikost EOF je proto dána hodnotou pH BGE.

Pro popis elektroosmotického toku je zavedena mobilita elektroosmotického toku  $m_{eof}$ , která je popsána Helmholtzovou-Smoluchowskiho rovnicí (7).

$$m_{eof} = \frac{v_{eof}}{E} = -\frac{eZ}{h} \quad (7)$$

$\zeta$  vyjadřuje elektrokinetický neboli zeta potenciál, tj. elektrický potenciál v rovině stříhu elektrické dvojvrstvy a  $\epsilon$  permitivitu prostředí.

Příznivou vlastností elektroosmotického toku je jeho téměř kolmý rychlostní profil, který oproti parabolickému tlakovému profilu v chromatografických metodách zachovává symetrii píků a zvyšuje potenciál použití elektroforetických metod před chromatografickými.

Elektroosmotický tok významně ovlivňuje migrační časy analytů, a tím jejich separaci a rozlišení. Vhodnou úpravou směru a velikosti elektroosmotického toku, v závislosti na náboji a rozdílu pohyblivostí analyzovaných látek ve vzorku, můžeme danou separaci optimalizovat [4,5]. Úprava stěny kapiláry je vhodná nejen pro optimalizaci, ale i pro stabilizaci elektroosmotického toku a řeší problém nízké opakovatelnosti elektroforetických experimentů. Nestabilita elektroosmotického toku je způsobena tím, že volné silanolové skupiny i záporně nabitý povrch kapiláry nabízejí možnost interakce s analyty, dochází k "lepení" analytu, či složek základního elektrolytu na stěnu kapiláry a ke změnám EOF. Použitím nejrůznějších povrchových úprav (coating) stěny kapiláry můžeme nežádoucí interakci analytu se stěnou kapiláry omezit a získat stabilní elektroosmotický tok [6].

Způsob povrchové úpravy se dělí na dynamický a statický. Dynamické povrchové úpravy využívají fyzikální interakce a provádějí se promýváním, či elektrokinetickou sorpcí na stěny kapiláry. Pro udržení stabilního povrchu se malé množství povrchové úpravy přidává také do základního elektrolytu. Statické povrchové úpravy jsou založeny na kovalentní vazbě činidla na stěnu kapiláry. Aplikuje se před měřením a vytváří stabilní vrstvu. Existují i komerčně dostupné povrchové úpravy kapiláry, které jsou však cenově nákladné. Problematika povrchové úpravy je v posledních letech intenzivně studována, od jednovrstvého povrchového úpravu anulujícího náboj povrchu kapiláry, či udělujícího stěně opačné znaménko, po vícevrstvý, tzv. SMIL (Successive Multiple Layer) coating [7]. Neutrální polymery patří k nejčastěji používaným materiálům, protože eliminují elektrostatické interakce mezi analyty a stěnou kapiláry. Nabité povrchové úpravy řeší specifické separační problémy jako je změna směru elektroosmotického toku, rychlá separace, či zabránění specifické interakce kapilární stěny s proteiny.

### 2.3 Systémové píky

Systémové píky představují inherentní součást elektroforetických, ale i jiných separačních technik, jako je kapilární zónová elektroforéza (CZE), micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC) a kapalinová chromatografie (LC). Svým tvarem a chováním mohou imitovat píky analytů, což může vést k chybné interpretaci výsledků a tedy chybné analýze. Navíc mohou interagovat s píky analytů v případě, že mají stejnou pohyblivost a zcela deformovat jejich tvar, případně se v nich analyty mohou „ztratit“. Proto jsou často považovány spíše za rušivý fenomén doprovázející separaci.

Většina elektroforetických systémů poskytuje alespoň jeden systémový pík s vlastní mobilitou, tzv. eigenmobilitou velmi blízkou nule [8]. Tato zóna se prakticky nepohybuje a její odezva v detektoru se označuje termínem stacionární, vodní, či obecněji rozpouštědlový pík, případně také injekční zóna. Stacionární zóny nemají vlastní migraci, a proto mohou být použity jako marker elektroosmotického toku. Přítomnost stacionárních zón je dána existencí regulační funkce pro daný systém. Regulační funkce popisuje zachování určité vlastnosti dané předpisem regulační funkce. Stacionární regulační funkci poskytuje většina elektrolytů. Pouze systémy tvořené slabým vícemocným BGE mimo bezpečnou oblast pH, kdy již nelze zanedbávat oxoniové či hydroxidové ionty, nemusí stacionární pík mít. Tyto systémy se v praxi chovají nepredikovatelně a vysoce nelineárně [8].

Vznik systémových píků je v kapilárních elektromigračních metodách spojen s experimentálním uspořádáním. Před experimentem je separační kapilára naplněna roztokem základního elektrolytu, a poté dochází k nadávkování vzorku obsahujícího analyty a příp. základní elektrolyt do kapiláry. Při vtlačení vzorku do kapiláry vznikne v tomto místě porucha v koncentračních profilech jednotlivých složek základního elektrolytu. Po zapnutí elektrického pole se začnou jednotlivé analyty ze vzorku pohybovat s odlišnými mobilitami, což vede k jejich separaci. Dále dochází k rozdělení poruchy na systémové zóny, z nichž každá migruje vlastní eigenmobilitou. Hodnoty eigenmobilit nejsou rovny mobilitám jednotlivých složek základního elektrolytu, k jejím hodnotám přispívají různou měrou všechny složky BGE.

Výpočet eigenmobilit systémových zón umožňuje linearizovaný model elektromigrace, představený v literatuře poprvé Poppem et al. [9,10,11]. Simulační program PeakMaster, vytvořený v naší laboratoři [12,13], je na linearizaci diferenciálních rovnic kontinuity založen.

PeakMaster umožňuje předpovědět důležité parametry separačního systému a simuluje výsledek separace. Druhý simulační program vyvinutý v naší skupině je program Simul [14], který popisuje dynamiku elektromigračního procesu na základě numerického řešení diferenciálních rovnic popisujících elektromigraci. Program Simul umožňuje detailnější popis elektroforetického systému než program PeakMaster, jeho používání ale klade vyšší nároky na uživatele a na počítač.

Oba simulační programy slouží především pro optimalizaci separace, která spočívá v nalezení separačního systému, ve kterém jednotlivé složky vykazují dobré rozlišení, dostatečný signál detektoru, a který umožňuje separaci v co nejkratším čase. Součástí optimalizace je odstranění rušivých jevů doprovázejících elektroforetické separace. Takovými jevy jsou především systémové píky, které mohou zasahovat do oblasti analytů, nebo vysoká elektromigrační disperze daná nelineární povahou elektroforézy. Ta limituje maximální koncentraci analytu ve vzorku, pod níž nedochází k deformaci píku. V případě překrytí píku analytu s píkem systémovým dochází k rezonanci, jež značně ztěžuje, ne-li přímo vylučuje analýzu daného analytu. Parametry separace, tedy elektroforetické chování analytu i systémových píků v daném základním elektrolytu, lze teoreticky předpovědět na základě řešení modelů elektromigrace. Počítačové simulace nabízejí oproti tradičnímu experimentálnímu postupu optimalizace metodou „pokus – omyl“ výraznou časovou i materiální úsporu. Simulační programy jsou volně dostupné jako freeware na stránkách <http://www.natur.cuni.cz/gas>.

## ***2.4 Micelární systémy***

Pomocí jednotlivých metod kapilární elektroforézy můžeme separovat nejen kladně a záporně nabitě látky, ale i analyty bez náboje. Ty lze separovat za využití módu micelární elektrokinetické chromatografie. Micelární elektrokinetická chromatografie nabízí jednoduché experimentální provedení – do základního elektrolytu jsou přidány surfaktanty (např. nejběžněji dodecylsulfát sodný), které tvoří micely. Nabité micely migrují v hnacím elektrickém poli, a zároveň jsou díky svému nepolárnímu jádru schopny interagovat s neutrálními či hydrofobními analyty a umožnit tak jejich separaci. Separační mechanismus je tedy dán kombinací elektroforetického (vlastní mobilizace vlivem elektrického pole, resp. pohyb díky elektroosmóze) a chromatografického principu (odlišná distribuce analytů mezi vodnou a micelární fází). MEKC zachovává téměř plochý rychlostní profil elektroosmotického toku, a tím i vysokou účinnost separace.

Jak bylo popsáno výše, u doposud více rozšířené kapilární zónové elektroforézy je teoretický model elektromigrace dobře definován a umožňuje většinou plné porozumění jevům vyskytujícím se při praktické aplikaci [12,13]. V případě elektroforézy v micelárním prostředí ale zůstává stále několik problémů nevyřešeno, přestože se tato metoda v analytické praxi nyní často používá [15,16,17]. Jedním z problémů jsou systémové píky [18,19]. To, že systémové píky představují v micelárních systémech vážný problém, dokazuje např. komerčně dodávaný set chemikálií pro separaci proteinů metodou čipové elektroforézy v micelárním síťujícím prostředí SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate – Polyacryl Gel Electrophoresis), kde se v elektroforegramu objevuje systémový pík, který výrobce nazývá „SDS system peak“. Tento pík je na místě, které odpovídá hmotnosti proteinu v oblasti 9 kDa [20] a výrobce se jej snaží, nepřiliš úspěšně, eliminovat složitým softwarem. Mechanismus separace analytu díky distribuci analytu mezi vodnou a micelární pseudostacionární fází je sice znám dávno, avšak chování systémových píků v micelárních systémech ale ještě dobře prozkoumané není.

Elektroforéza v micelárním prostředí je vhodnou separační metodou pro celou řadu nabitých i nenabitých analytů [21,22,23]. Metoda rovněž zajišťuje větší selektivitu separace pro ionty, které jsou těžko separovatelné pomocí klasické kapilární zónové elektroforézy [24] a používá se také pro separaci chirálních analytů [25,26,27]. Protože separační princip elektroforézy v micelárním prostředí není tématem předkládané disertační práce, není v tomto úvodu jeho podrobnější popis uveden.

Micely jsou velmi dynamické útvary, doba jejich života se pohybuje mezi  $10^{-2}$ - $10$  s (frekvence vzniku/zániku odpovídá  $10^{-1}$ - $10^2$  s<sup>-1</sup>). Dynamika micel je také potvrzena výměnou stavebních jednotek surfaktantu s okolním roztokem, přičemž rychlost výměny je v řádu  $10^3$ - $10^6$  s<sup>-1</sup> [28]. Proces tvorby micel popisuje teorie micelizace. Ionické surfaktanty jsou při nízkých koncentracích v roztoku přítomny jako jednotlivé monomery. Při zvyšování koncentrace dochází k samovolnému seskupení monomerů do agregátů, tj. micel. Micela je složena z určitého počtu monomerních jednotek surfaktantu, označovaného jako agregační číslo,  $N_{AG}$ . Vznik micel nastává ve velmi úzkém koncentračním rozmezí označovaném jako kritická micelární koncentrace (CMC). Hodnota kritické micelární koncentrace je důležitá charakteristika pro daný surfaktant. Při koncentraci surfaktantu pod hodnotou CMC existuje surfaktant ve formě monomerů, zatímco

nad hodnotou CMC v roztoku převládají micely. Proces micelizace zahrnuje vznik dimerů, trimerů atd., koncentrace těchto útvarů je však velmi malá. Spontánní seskupení amfifilních molekul je řízeno hydrofobním efektem, který je založen na omezení energeticky nevýhodné interakce nepolárních látek s vodným prostředím. Je známo, že hodnota kritické micelární koncentrace je závislá na typu surfaktantu (délce nepolárního řetězce monomeru, struktuře polární hlavičky) a dále ji ovlivňuje prostředí, tj. pufr, typ protiiontu, přídavek organického modifikátoru, iontová síla, teplota, aj.

Schopnost spontánního seskupení amfifilních molekul, jako jsou surfaktanty a lipidy, může v hydrofilních i v hydrofobních rozpouštědlech vést k vytvoření struktur s velkou vlnitostí velikostí, tvarů, polydisperzity i flexibility. Například velké asociáty blokových kopolymerů tvoří v určitých prostředích tzv. "termodynamicky zamrzlé" micely [29]. Blokované kopolymery se používají v biomedicínských aplikacích jako složky cíleného transportu léčiv, a také jako senzory, tj. látky reagující na podněty [30]. Díky pokrokům v polymerní syntéze byly připraveny nové struktury nanočástic jako například víceblokové kopolymery a hvězdicovité micely [31]. Jedním ze slibných způsobů přípravy komplexních nanostruktur je využití interakcí umožňujících asociaci již stabilní micely s lineárním homopolymerem. Tyto komplexy micel s polymerními strukturami jsou nyní v popředí vědeckého zájmu z důvodu možného využití právě jako senzory [32].

#### **2.4.1 Způsoby určení kritické micelární koncentrace**

Stanovení kritické micelární koncentrace využívá výrazné změny fyzikálně-chemických vlastností roztoku v okolí kritické micelární koncentrace. Různé fyzikálně-chemické vlastnosti roztoků surfaktantů vykazují v okolí CMC změnu směrnice nebo inflexní bod ve výnosu závislosti měřené veličiny na koncentraci surfaktantu. Většina těchto vlastností může být za vhodných podmínek využita ke stanovení CMC [33]. Mezi nejčastěji používané metody patří měření specifické vodivosti [34,35], povrchového napětí [36], elektrického proudu [37], rozptylu světla [38], dále se používá spektrofotometrie [33] (s fluorescenčním barvivem rozpuštěným v micelle), potenciometrie [37] a jiné. Některé z metod jsou ale zatíženy systematickou chybou: např. při měření fluorescence není určována CMC volných micel, nýbrž micel se zabudovaným fluorescenčním barvivem. Další nepřesnost při určování CMC představuje vyhodnocení



závislosti měřené veličiny na koncentraci surfaktantu – změna směrnice při překročení CMC není často dostatečně výrazná a při prokládání křivky experimentálními daty může docházet k dalším chybám.

## ***2.5 Optimalizace separace***

Optimalizaci separace pomocí počítačových programů lze aplikovat na systémy, jejichž chování je známo a precizně popsáno. Ve složitějších systémech, jejichž separační mechanismus je založen na interakci mezi analytem a složkami separačního systému, tj. na chromatografickém principu jako je například pseudostacionární micelární fáze v CE či vysokoúčinná kapalinová chromatografie, můžeme separaci optimalizovat pomocí semiempirického přístupu. Optimalizace takových systémů spočívá ve vhodné volbě separačních podmínek, tj. především stacionární a mobilní fáze, pro jejichž výběr je nutné hlubší poznání interakčních a retenčních mechanismů. Důvodem je složitost chromatografického systému a početnost různých parametrů ovlivňujících retenci. Jedním z komplexních semiempirických přístupů uplatňovaných v analýze retenčního mechanismu je metoda lineárních vztahů volných energií (LFER - Linear Free Energy Relationship) [39].

### ***2.5 LFER***

Model LFER vyjadřuje lineární závislost změny Gibbsovy energie, tím i všech s ní souvisejících vlastností (např. retenční faktor), na charakteristikách prostředí. Se změnou Gibbsovy energie systému je v HPLC spojen přenos analytu z mobilní do stacionární fáze. Pro popis vztahů mezi chemickou strukturou analytu a interakcemi, kterých se analyt v chromatografickém systému účastní, je třeba zahrnout celé spektrum fyzikálně–chemických interakcí, které ovlivňují retenci analytu v daném systému. Mezi tyto interakce patří hydrofobní interakce, interakce prostřednictvím vodíkové vazby, elektrostatické interakce, disperzní síly, vazby spojené s přenosem náboje, koordinační vazba či sterické repulze [40,41]. Popis chování analytů z hlediska výše zmíněných interakcí dává možnost predikce retence na základě kvantitativní korelace retence analytu s vlastnostmi stacionární fáze [42,43,44] a strukturou látky [45], či biologickou aktivitou [46]. Obecně se takové postupy řadí mezi modely lineárních vztahů volných energií.

Koncept LFER umožňuje korelaci změny Gibbsovy energie při přenosu analytu mezi fázemi s charakteristikami (deskriptory) analytu a rozdělení na příspěvky jednotlivých typů interakcí [47,48]. Jednotlivé příspěvky jsou považovány za navzájem nezávislé a každý z nich lze vyjádřit jako součin dvou členů: i) fyzikálně-chemických parametrů analytů a ii) vlivu prostředí na danou interakci.

Retence analytu je v systému HPLC určena celkovým součtem všech interakcí analytu se systémem. Pokud je daná interakce analytu silnější se stacionární fází než s mobilní, bude zvyšovat retenci a naopak. Rovnice LFER vyjadřuje korelaci experimentálně získaných logaritmů retenčních faktorů s deskriptory analytů dle rovnice (10):

$$\log k = \mathbf{c} + \mathbf{v} \cdot V_x + \mathbf{a} \cdot \Sigma \mathbf{a}_2^H + \mathbf{b} \cdot \Sigma \mathbf{b}_2^H + \mathbf{s} \cdot \mathbf{p}_2^H + \mathbf{r} \cdot R_2 \quad (10)$$

kde  $k$  je retenční faktor,  $V_x$  je McGowanův charakteristický objem solutu ( $\text{cm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$ ) [49],  $\Sigma \mathbf{a}_2^H$  charakteristika protondonorní schopnosti analytu pro tvorbu vodíkové vazby,  $\Sigma \mathbf{b}_2^H$  charakteristika protonakceptorní schopnosti analytu pro tvorbu vodíkové vazby,  $\mathbf{p}_2^H$  dipolarita/polarizibilita a  $R_2$  rozsah molární refrakce ( $\text{cm}^3$ ). Objem solutu  $V_x$  se dělí stem a rozsah molární refrakce deseti, aby byly deskriptory ve stejném měřítku [50]. Členy  $\mathbf{c}$ ,  $\mathbf{v}$ ,  $\mathbf{a}$ ,  $\mathbf{b}$ ,  $\mathbf{s}$ ,  $\mathbf{r}$  jsou regresní koeficienty rovnice, které budou podrobněji popsány níže.

Deskriptory analytu kvantitativně charakterizují strukturní odlišnosti mezi sloučeninami. Jsou to empirické parametry, které byly publikovány pro velký počet sloučenin [51,52], mají jasný fyzikální smysl a způsob jejich aplikace i získávání je poměrně jednoduchý. V rovnici se vyskytuje pět na sobě nezávislých parametrů, které charakterizují fyzikálně-chemické vlastnosti analytů resp. schopnost analytu podílet se na určitých typech interakcí. *McGowanův objem solutu* ( $V_x$ ) odpovídá za disperzní a kohezivní interakce analytu s chromatografickým systémem (schopnost tvorby kavity) [53]. *Celková nebo efektivní acidita vodíkové vazby solutu* ( $\Sigma \mathbf{a}_2^H$ ) popisuje protondonorní schopnost analytu pro tvorbu vodíkové vazby s molekulami mobilní a stacionární fáze. *Celková nebo efektivní bazicita vodíkové vazby* ( $\Sigma \mathbf{b}_2^H$ ) udává protonakceptorní schopnost pro tvorbu vodíkové vazby analytu s molekulami mobilní či stacionární fáze. *Parametr dipolarity/polarizibility, parametr solubility* ( $\mathbf{p}_2^H$ ) [54] vyjadřuje elektrostatickou interakci a *rozsah molární refrakce* ( $R_2$ ) vyjadřuje disperzní síly [55].

Regresní koeficienty rovnice LFER jsou získávány multidimenzionální lineární regrese pomocí statistických programů (např. NCSS) a reflektují míru citlivosti chromatografického systému vůči dané interakci. Koeficienty jsou charakteristické pro daný systém, tzn. stacionární fázi a složení mobilní fáze. Pokud je při separacích použita fixní mobilní fáze a mění se pouze fáze stacionární, regresní koeficienty charakterizují přímo stacionární fázi. Mobilní fáze sice separaci ovlivňuje, ale pokud je její složení v různých separačních systémech neměnné, regresní koeficienty jsou na toto složení mobilní fáze vztažené a popisují pouze rozdíly ve stacionárních fázích.

Koeficient **v** popisuje rozdíl v hydrofobicitě mezi stacionární a mobilní fází, který závisí na změně kohezivitu obou fází a na rozsahu disperzních interakcí mezi analytem a stacionární fází a analytem a mobilní fází [56,57]. Regresní koeficient **a** odráží rozdíl v bazicitě (schopnost působit jako akceptor vodíku pro vodíkovou vazbu) stacionární a mobilní fáze. Rozdíl ve schopnosti působit jako donor vodíku pro vodíkovou vazbu mezi stacionární a mobilní fází popisuje regresní koeficient **b**. Regresní koeficient **s** odráží rozdíl v dipolaritě/polarizibilitě mezi stacionární a mobilní fází. Tento koeficient vypovídá o schopnosti účastnit se interakcí dipól-dipól a dipól-indukovaný dipól. Regresní koeficient **r** poukazuje na rozdíl mezi stacionární a mobilní fází ve schopnosti interagovat s *n*- a *p*-elektrony solutu. Člen **c** regresní rovnice LFER není vysvětlován solvatačními parametry. Tato konstanta reflektuje změny ve fázovém poměru, tj. poměru objemů stacionární a mobilní fáze. V koeficientu **c** jsou též sečteny různé vlivy na retenci nepokryté ostatními koeficienty LFER [58].

Vlastnosti separačního systému vyjádřené pomocí regresních koeficientů se testují pomocí tzv. testovací sady solutů. Sada testovacích solutů by měla pokrývat celou škálu interakcí vyjádřených molekulovými deskriptory [59]. Soluty mají být tudíž strukturně odlišné, distribuce hodnot jednotlivých deskriptorů by měla být rovnoměrná, aby se nepreferovala žádná z interakcí na úkor jiné [58].

### 3 Motivace a výzkumné cíle

Kapilární elektroforéza je v současnosti velice rozšířená, spolehlivá analytická technika s dobrou instrumentací. Přesto poskytuje široké pole možností pro základní výzkum. Předkládaná disertační práce má být příspěvkem k objasnění některých doposud nevyjasněných jevů doprovázejících elektroforetické separační procesy a navíc má ukázat možné uplatnění získaných poznatků pro praxi. Konkrétní cíle první části disertační práce lze shrnout do následujících bodů:

- Studium systémových píků a jejich využití ke stanovení kritické micelární koncentrace. Stanovení CMC je úzce spjato s teorií systémových píků v micelárním systému. Rozšíření aktuálně platné teorie na micelární systémy objasní výskyt systémových píků a umožní jejich předpověď a případně eliminaci.
- Pro optimalizaci navržené metody je třeba předpovědět amplitudy systémových píků a popsat vliv iontové síly na eigenmobility stacionárních systémových píků, což tvoří dílčí cíle práce.
- Dalším krokem je konfrontace rozšířeného simulačního programu PeakMaster s experimentálními daty.
- Ověření struktur nově syntetizovaných objemných polymerních micel použitím kapilární zónové elektroforézy.

Vysokoučinná kapalinová chromatografie je další významná separační metoda používaná ve většině analytických laboratořích. Pro charakterizaci a následnou optimalizaci chromatografického separačního systému je třeba hledat a využívat sofistikovanější metody než pouhý experiment. Jednou z možností popisu interakcí, které ovlivňují výsledný separační mechanismus, je metoda lineárních vztahů volných energií. V druhé části disertační práce je tento semiempirický přístup použit pro srovnání enantioselektivních separačních mechanismů na třech moderních chirálních stacionárních fázích (CSP) na bázi teikoplaninu. Jedná se o dvě komerčně dostupné kolony a jednu nově vyvinutou CSP.

## 4 Výsledky a diskuze

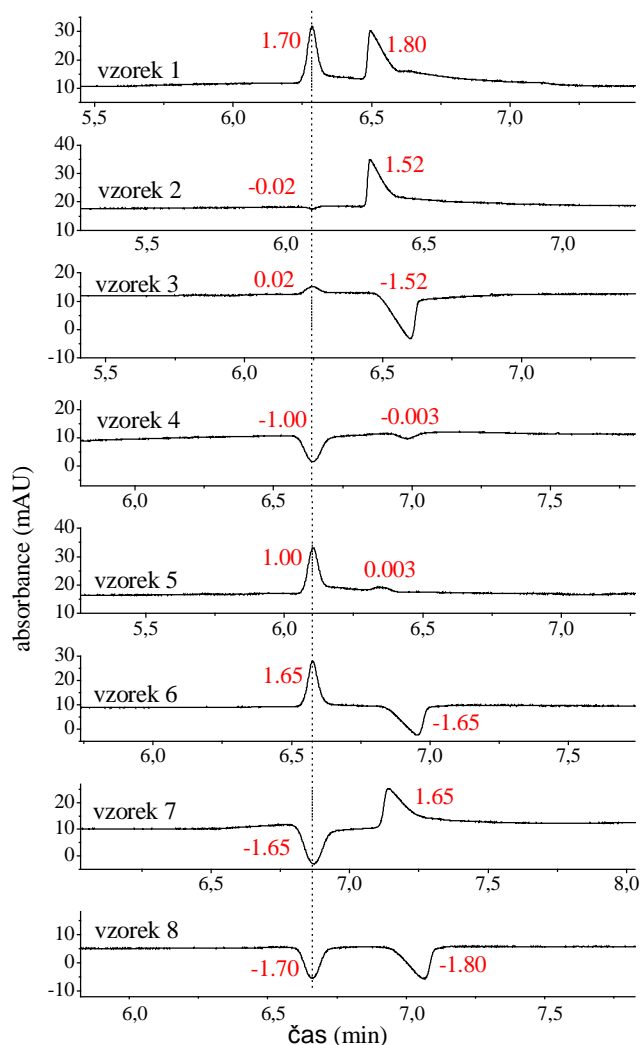
### 4.1 Amplitudy systémových píků (publikace I)

Pomocí simulačního programu PeakMaster můžeme snadno předpovědět existenci a výslednou pozici analytových i systémových píků v elektroferogramu. Amplitudy systémových píků ale dosud simulovány nebyly. Pouze pro jednoduché elektroforetické systémy byly predikovány intenzity systémových píků [60]. Jedná se přitom o důležitý parametr; pomocí změn amplitud můžeme experimentálně odlišit systémový pík od analytového. V případě experimentálního odečítání pozic dvou píků s podobnou mobilitou preferujeme z důvodu přesnosti odečtu amplitudu stejného znaménka u obou píků. Je proto žádoucí popsat polaritu a změnu amplitud nejen analytových, ale i systémových píků.

V této publikaci je popsáno odvození členu pro amplitudy, jejich chování, implementace výpočtů do programu PeakMaster a porovnání simulace s experimentem. Z rovnic popisujících amplitudy píků plyne odlišnost chování systémových píků od píků analytových. Amplitudy píků analytu závisí pouze na koncentraci analytu ve vzorku, zatímco amplitudy systémových píků ovlivňuje koncentrace všech složek ve vzorku. Není tedy možné změnou složení vzorku obrátit polaritu amplitudy analytového píku, můžeme však vhodnou změnou složení vzorku změnit polaritu i amplitudu systémových píků. Jak již bylo řečeno v kapitole 2.3, systémové zóny jsou tvořeny poruchami v základním elektrolytu, a proto je můžeme pozorovat za použití detekce monitorující základní elektrolyt, tj. např. nepřímá fotometrická (UV/Vis) nebo vodivostní detekce. Avšak i při použití přímé detekce můžeme systémové píky zaznamenat, protože koncentrace základního elektrolytu je v porovnání s koncentrací analytu poměrně vysoká a k absorpci dochází i při nízkém absorpčním koeficientu složek základního elektrolytu.

Pozorování systémových píků pomocí nepřímé UV/Vis detekce bylo ukázáno na příkladu pufru složeného z 10,0 mM imidazolu a 20,0 mM octové kyseliny. Pufrační kapacita je při daném složení roztoku dostatečná, pH je 4,7, pufř absorbuje v UV oblasti, použitá vlnová délka  $\lambda=214$  nm detekuje koncentrační profil imidazolu. Protože základní elektrolyt je dvousložkový, budou generovány dvě systémové zóny. První systémová zóna bude mít skoro nulovou eigenmobilitu, druhá bude lehce pozitivní z důvodu kyselého pH základního elektrolytu. Připravili jsme osm vzorků, které obsahovaly stejné složky jako BGE (imidazol a octovou kyselinu), ale lišily se v jejich koncentracích, měly tedy jinou poruchu. Pro každý vzorek byla v programu PeakMaster

určena odezva v koncentračním profilu imidazolu. Poměry vypočtených amplitud systémových píků se velmi dobře shodovaly s experimentálně získanými daty (viz Obr. 1).



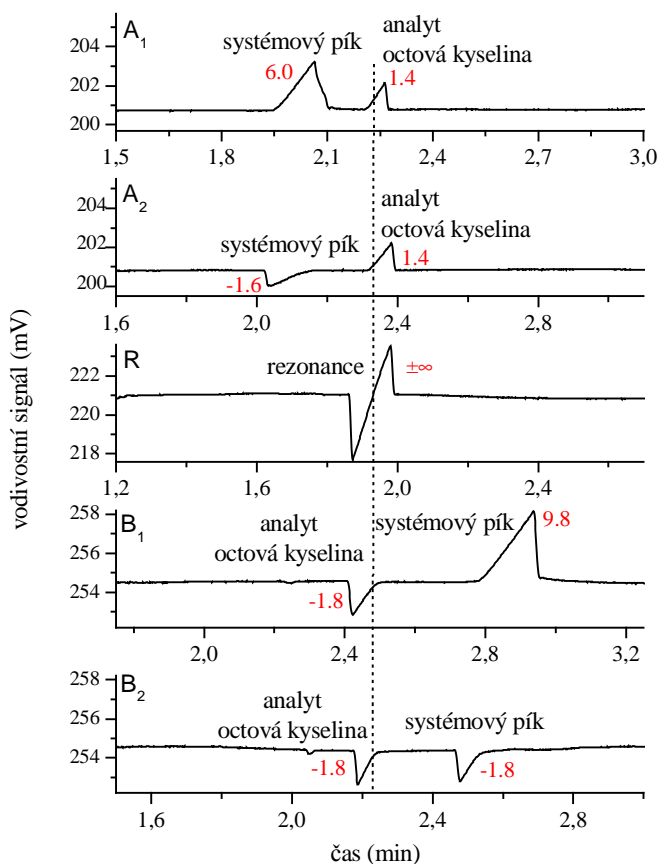
**Obr. 1** Pozorování dvou systémových píků vybuzených nadávkováním různých vzorků do pufru složeného z 10,0 mM imidazolu a 20,0 mM octové kyseliny. Připravené vzorky obsahovaly stejné složky jako BGE (imidazol a octovou kyselinu), ale lišily se v jejich koncentracích. Složení jednotlivých vzorků je uvedeno v publikaci I. Levý pík na elektroferogramech (vyrovnaný na kolmou čáru) je první systémová zóna s téměř nulovou eigenmobilitu, zatímco vpravo je druhý systémový pík s lehce pozitivní eigenmobilitou  $\mu=1,61 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1} \text{ V}^{-1}$ . Červená čísla uvedená u píků odpovídají odezvě v koncentraci imidazolu vypočtené pomocí programu PeakMaster. Elektroferogramy byly zaznamenány UV detekcí při 214 nm. Celková délka kapiláry 72,6 cm, délka k detektoru 64,1 cm. Aplikované napětí dosahovalo -30 kV (anionty migrují k detektoru).

Platnost odvozené teorie amplitud byla pro vodivostní detekci ověřena na příkladu často používaného sodno-fosfátového pufru, jehož složky v UV/Vis oblasti neabsorbují (viz Obr. 2).

Fosfátový pufr v neutrální oblasti generuje rychlý anionický systémový pík, který zasahuje do oblasti anionických analytů a tím značně snižuje robustnost metody. Simulací tohoto systému lze případný překryv systémového píku s analytem předpovědět a pro experiment zvolit vhodnější složení základního elektrolytu.

Koncentrace kyseliny fosforečné v základním elektrolytu byla ve všech experimentech shodná (5,0 mM) zatímco koncentrace sodného kationtu se v jednotlivých BGE měnila. Analyt ve vzorku byl ve všech pokusech stejný a byl tvořen 0,5 mM octovou kyselinou. Ve vodivostním záznamu byla při daném složení elektrolytu a dávkování odlišné poruchy pozorována změna znaménka i velikosti amplitudy rychlého systémového píku, zatímco amplituda analytu (octové kyseliny) zůstala nezměněna. V pufru složeném ze 7,2 mM hydroxidu sodného a 5,0 mM kyseliny fosforečné došlo po nadávkování octové kyseliny k zajímavému jevu, tzv. rezonanci. Rezonance se projevuje deformací píku na tvar "cikcak". Odezva ve vodivostním i UV detektoru nabývá dle teorie nekonečně vysokých hodnot [61], v experimentálních záznamech ale dosáhneme navýšení signálu na určitou hodnotu a pík ve tvaru "cikcak". Výskyt rezonance znemožňuje odečtení pozice analytu a mnohdy vede k rozmytí píku až na linii odezvy základního elektrolytu. K rezonanci dochází, pokud se mobilita systémového píku rovná mobilitě analytu.

Elektroforetický systém vykazující rezonanci, stejně jako změny amplitud, byl navržen programem PeakMaster. Experimentální data byla v dobré shodě se simulací (viz Obr. 2).



Obr. 2 Chování systémového píku a píku analytu v sodno-fosfátových pufrích. Složení jednotlivých BGE se lišilo v koncentraci sodného kationtu a je popsáno v publikaci I. Analyt ve vzorku byl ve všech experimentech stejný a byl tvořen 0,5 mM octovou kyselinou. Pík analytu, octové kyseliny, je v jednotlivých elektroferogramech vycentrován a vyrovnán na kolmou čáru. Červená čísla u píků označují vodivostní odezvy vypočtené v programu PeakMaster. Elektroferogramy byly zaznamenány bezkontaktním vodivostním detektorem, celková délka kapiláry činila 51,8 cm, délka k detektoru 36,5 cm. Dávkovali jsme hydrodynamicky (20 mbar po 10 s), aplikované napětí dosahovalo -25 kV (anionty migrují k detektoru).

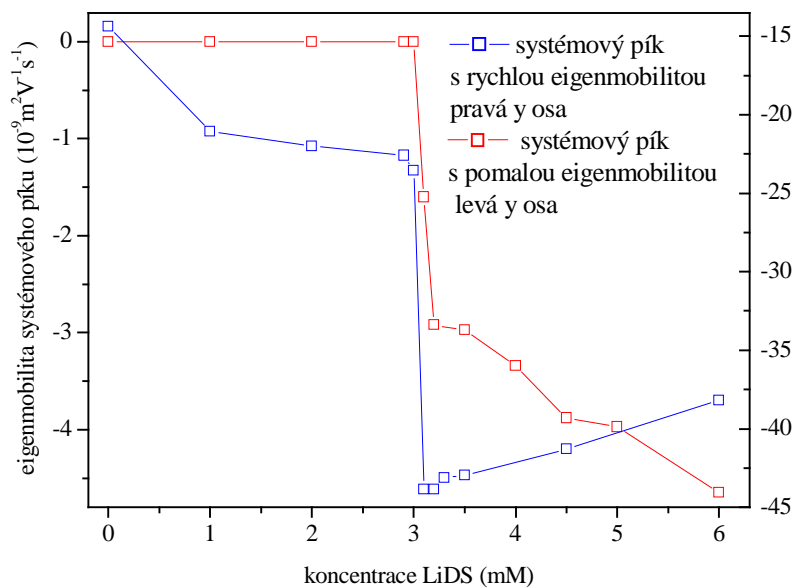


#### ***4.2. Stanovení kritické micelární koncentrace pomocí systémových píků v kapilární elektroforéze (publikace II)***

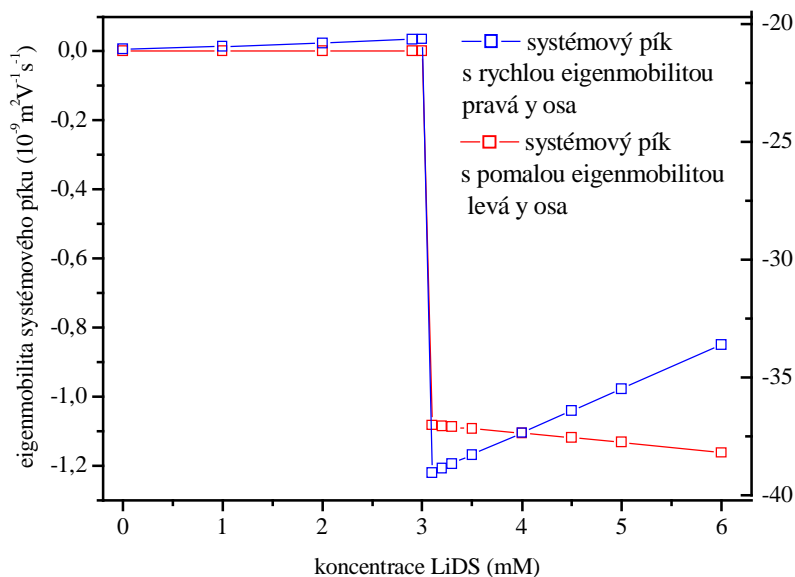
Simulace amplitud v programu PeakMaster byla použita při zpracování tematiky věnující se určení kritické micelární koncentrace. Metoda pro určení CMC je založena na změně mobility určitých systémových píků v okolí kritické micelární koncentrace surfaktantu. Jeden z pozorovaných systémových píků se vyskytuje v oblasti markeru elektroosmotického toku, obě zóny se částečně překrývají a znesnadňují interpretaci elektroferogramu. Pro správný odečet migračních časů systémového píku a píku markeru elektroosmózy je proto důležité, aby amplitudy obou píků měly stejnou polaritu. Toho jsme docílili použitím znalostí z publikace I.

Metoda určující kritickou micelární koncentraci využívá existenci systémových píků a jejich prostřednictvím nahlíží do jevů probíhajících v roztoku. Jedná se tedy o pozitivní využití fenoménu systémových píků, na které je často v separačních metodách nahlíženo negativně, protože systémové píky svými tvarem i chováním imitují píky analytu a mohou proto působit rušivým dojmem.

Základní elektrolyt tvoří nedílnou součást popisu elektroforetického systému a projevem jeho začlenění je existence systémových píků. Přímá souvislost systémových píků se základním elektrolytem nabízí možnost charakterizace základního elektrolytu pomocí pozorování chování systémových píků. Publikace II popisuje využití systémových píků v micelární elektrokinetické chromatografii pro určení kritické micelární koncentrace. Metoda je založena na postupném přidávání surfaktantu do základního elektrolytu, nadávkování vhodné poruchy poskytující amplitudu stejného znaménka jako analyt a pozorování eigenmobilit systémových píků. Z rozboru příspěvků jednotlivých složek BGE vyplývá, že ke stanovení CMC jsou vhodné systémové píky stejného znaménka jako micela, protože jejich eigenmobility jsou výrazně ovlivněny přítomností surfaktantu v základním elektrolytu. V případě anionického detergentu dodecylsulfátu litného tedy sledujeme systémové píky pohybující se stejným směrem jako anionty. Při překročení kritické micelární koncentrace anionické systémové píky skokově mění své eigenmobility. Graf závislosti eigenmobilit vhodných systémových píků na koncentraci surfaktantu vykazuje prudký skok, odpovídající vzniku micel, tzn. hodnotě kritické micelární koncentrace (viz Obr. 3 a Obr. 4).



Obr. 3 Závislost experimentálních hodnot eigenmobilit dvou systémových píků na koncentraci surfaktantu LiDS. Modře jsou vyznačeny eigenmobility systémového píku s nízkou, pomalou hodnotou eigenmobility, které jsou spjaty s levou y osou. Červená barva značí systémový pík s rychlou eigenmobilitou, který je vyznačeny na pravé y ose. Skok v eigenmobilitách označuje CMC.



Obr. 4 Závislost eigenmobilit dvou systémových píků na koncentraci surfaktantu získaná pomocí simulace v programu PeakMaster. Modrá barva označuje vypočtené hodnoty eigenmobilit systémového píku s rychlou

eigenmobilitou, zatímco červeně jsou znázorněny eigenmobility systémového píku s pomalou eigenmobilitou. Jako vstupní parametr pro simulaci byla použita experimentálně získaná hodnota CMC.

Navrhli jsme a otestovali sadu roztoků s dodecylsulfátem litným (LiDS) jako tenzidem ve vhodném základním elektrolytu. Pro vizualizaci systémových píků jsme zvolili absorbující pufr o složení: LiDS, imidazol a morfolinopropansulfonová kyselina (MOPS). Iontová síla roztoku významně ovlivňuje hodnotu CMC, a proto jsme složení jednotlivých základních elektrolytů navrhli tak, aby iontová síla byla udržována na konstantní hodnotě. Příspěvek jednotlivých molekul surfaktantu k iontové síle jsme vyvažovali odebráním silného kationtu (viz "Table 1" v publikaci II), pH základních elektrolytů zůstává stejné. Pro stabilizaci elektroosmotického toku jsme experimenty prováděli v kapiláře upravené vícevrstevným SMIL pokrytím [7]. Nesymetrické píky jsme vyhodnocovali pomocí Haarhoff–Van der Linde (HVL) funkce [62,63].

Pro sledování vlivu iontové síly na hodnotu CMC jsme testovali dvě sady micelárních systémů, které měly stejné složení základního elektrolytu a lišily se pouze iontovou silou. Hodnota kritické micelární koncentrace v systému s iontovou silou  $I_S = 15.2$  mM dosahovala 3,1 mM (viz. Obr. 3), zatímco systém s vyšší iontovou silou  $I_S = 25.3$  mM poskytoval CMC při hodnotě 2,2 mM.

Protože na hodnotu CMC má vliv i použitý instrument, jako nezávislou referenční metodu pro ověření správnosti naměřených hodnot CMC pomocí systémových píků jsme zvolili obdobu klasické konduktometrie, kterou jsme prováděli na elektroforetickém přístroji. Tuto metodu jsme vybrali záměrně, neboť hodnoty CMC získané alternativními metodami určujícími CMC na elektroforetickém přístroji vykazují značný rozptyl, v řádu až několika set procent [37]. Při konstantní hodnotě vkládaného napětí jsme odečítali elektrický proud pro jednotlivé základní elektrolyty a hodnotu proudu vynesli proti koncentraci surfaktantu v BGE. Změna hodnot elektrického proudu je dána rozdílnou mobilitou monomeru surfaktantu a micel. Experimenty byly provedeny při stejných podmínkách (tj. složení základního elektrolytu, iontové síle, teplotě, hodnotě vkládaného napětí, atd.) jako v metodě založené na pozorování systémových píků, protože všechny vyjmenované parametry významně ovlivňují hodnotu CMC [64]. Závislost elektrického proudu na koncentraci surfaktantu poskytovala dvě polopřímky s odlišnou směrnici. Abychom minimalizovali chybu, výsledky jsme proložili funkcí popisující hladké spojení dvou polopřímek v oblasti průsečíku. Získaný průsečík pak odpovídal CMC. Hodnoty kritických micelárních koncentrací získaných pomocí referenčního konduktometrického měření odpovídaly

hodnotám naměřeným pomocí systémových píků. Pro systém s iontovou silou  $I_S = 15.2$  mM dosahovala hodnota CMC získaná konduktometricky 3,0 mM, pomocí systémových píků pak hodnoty 3,1 mM. Systém s iontovou silou  $I_S = 25.3$  mM vykazoval CMC rovné 2,1 mM při použití konduktometrie a 2,2 mM aplikací metody systémových píků.

Metoda určení hodnoty kritické micelární koncentrace byla navržena pomocí upravené verze programu PeakMaster. Stávající verze simulačního programu PeakMaster nezahrnovala elektroforetický popis micelárních systémů, který by vedl k objasnění výskytu systémových píků. Pro účely matematického popisu elektromigrace v micelárním systému jsme definovali anionický či kationický tenzid jako složku základního elektrolytu se speciální vlastností tvořit micely při koncentraci vyšší než je kritická micelární koncentrace [65]. Implementace této změny do simulačního programu PeakMaster umožnila predikci výskytu systémových píků včetně jejich pozic a předpověď chování micelárního systému. Micelární verze programu PeakMaster tak popisuje vznik micel při překročení kritické micelární koncentrace a umožňuje simulaci jevů spojených s tímto přechodem.

Navrhovaná metoda stanovení CMC pomocí systémových píků by měla dosahovat větší přesnosti a eliminovat některé systematické chyby, kterými trpí některé dosavadní metody. Navržená metoda poskytuje oproti alternativním metodám několik výhod: stanovení je založeno na prudkém skoku v eigenmobilitách, který je snadno identifikovatelný, narozdíl od mnohdy málo výrazné změny směrnice, na které jsou založeny stávající metody [33]. Další výhodou spočívá v tom, že stanovujeme CMC volných micel, zatímco některé jiné metody studují komplex analytu s micelou, jenž se vlastnostmi od původní micely odlišuje [37].

Konfrontací získaných experimentálních dat s teoretickou předpovědí upraveného programu PeakMaster jsme potvrdili platnost navrženého elektroforetického popisu micelárních systémů i hypotézu možnosti stanovení CMC pomocí systémových píků v kapilární elektroforéze. Získané hodnoty CMC odpovídají údajům z literatury, stejně jako trend jejich růstu při klesající iontové síle.

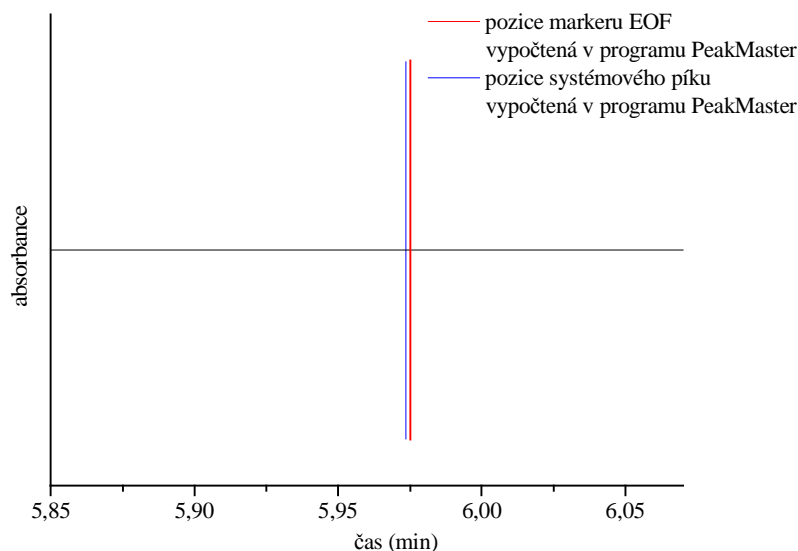
### **4.3 Mobilizace systémových píků vlivem iontové síly (připravovaná publikace)**

Základní elektrolyt v systémech determinujících CMC je složen ze slabých a silných jednomocných kyselin a bazí - dodecylsulfát litný, morpholinopropansulfonová kyselina a imidazol (viz publikace II). Tyto systémy poskytují dvě regulační funkce, dle Jovina, Dismukese a Alberty, které se projevují existencí dvou stacionárních píků [8,66]. Po překročení kritické micelární koncentrace jsou v základním elektrolytu přítomny micely, slabé vícemocné látky. Takové systémy mohou poskytovat nejvýše jednu regulační funkci, tj. jeden stacionární pík. Výsledky skutečně ukázaly, že po překročení CMC dochází ke ztrátě jedné regulační funkce, což se projeví mobilizací jedné stacionární zóny (viz "Figure 3" v publikaci II).

Mobilizace stacionárního systémového píku vlivem micelizace ovšem není jediná, která se v elektroforetických systémech vyskytuje. Během provádění experimentů jsme pozorovali další typ mobilizace systémových píků zapříčiněné působením iontové síly. Mobilizace systémových píků, tzn. změna eigenmobilit, je způsobena závislostí disociačních konstant a iontových mobilit jednotlivých složek základního elektrolytu na iontové síle. Toto primární působení iontové síly, tj. korekce vstupních dat, je v obou simulačních programech obsaženo. Disociační konstanty a iontové mobility složek BGE jsou funkcí iontové síly a tím také funkcí koncentrací jednotlivých složek BGE. Proto jsou také derivace disociačních konstant a iontových mobilit dle koncentrací jednotlivých složek nenulové. Tento sekundární efekt iontové síly (tj. derivace disociačních konstant a iontových mobilit dle koncentrací jednotlivých složek) je z výpočetních důvodů v programu PeakMaster aproximován nulou. Přestože tato korekce na iontovou sílu není úplně přesná, ukazuje se, že určitou odchylku vykazují pouze stacionární systémové píky, zatímco u rychlých systémových píků není mezi výpočtem PeakMasteru a Simulu, který počítá iontovou korekci v každém bodě, prakticky žádný rozdíl.

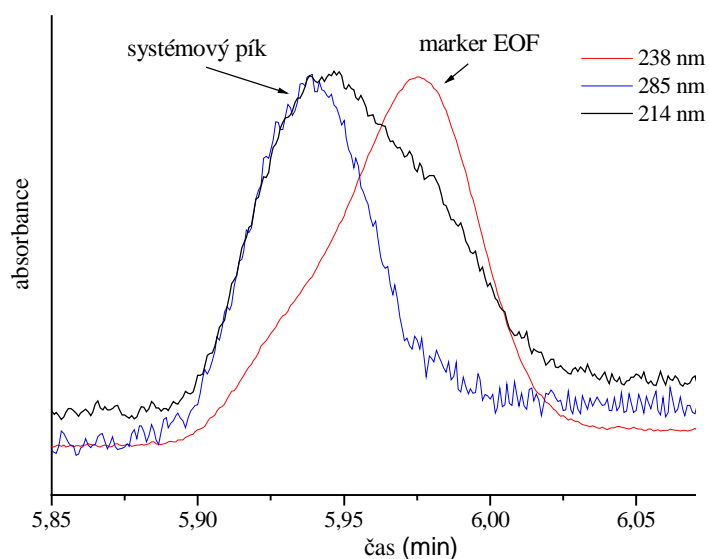
Pozorovaný fenomén mobilizace vlivem iontové síly znesnadňuje interpretaci elektroferogramů. V mnoha případech bylo obtížné odlišit stacionární systémový pík od markeru elektroosmotického toku a odečíst správné hodnoty eigenmobilit. Pokud by iontová síla na eigenmobility systémových píků nepůsobila, pík EOF i stacionární systémové píky by byly na stejné pozici. Nyní však dostáváme dva ne zcela oddělené píky, dané závislostí na typu základního elektrolytu. Pro jednoznačné určení stacionárního systémového píku a EOF markeru

jsme navrhli elektroforetický systém s fotometrickým detektorem, kdy jsme při jedné vlnové délce detekovali marker elektroosmózy a jiná vlnová délka byla vhodná pro monitorování poruch v BGE – systémových píků.

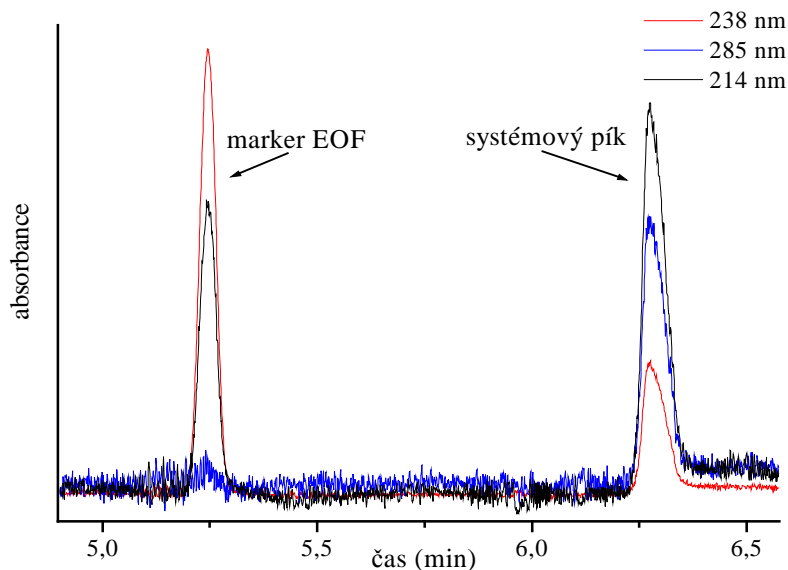


Obr. 5 Simulace elektroferogramu vypočteného pomocí programu PeakMaster. BGE: 12,0 mM ftalát, 19,0 mM  $\text{Li}^+$ , 1,0 mM dodecylsulfát (podmicelární koncentrace). V simulaci nemicelárního systému pomocí programu PeakMaster je kvůli aproximaci v pohybové rovnici pozice EOF markeru i stacionárního systémového píku shodná. Parametry simulace: celková délka kapiláry 49,5 cm, délka k detektoru 41,0 cm, aplikované napětí 15 kV (kationty migrují k detektoru).

Ze sady lokálních absorpčních maxim pro marker EOF a absorbující složku základního elektrolytu byly vybrány 2 vlnové délky; při jedné vlnové délce jsme detekovali marker elektroosmózy a jiná vlnová délka byla vhodná pro monitorování poruch v základním elektrolytu – systémových píků. Základní elektrolyt byl tvořen stejně jako v simulaci UV absorbujícím ftalátem litným a dodecylsulfátem litným. Pro vizualizaci systémových píků jsme zvolili vlnovou délku 285 nm a marker EOF (thiomočovinu) jsme pozorovali při  $\lambda=238$  nm. Mobilizace stacionárního systémového píku vlivem iontové síly je znázorněna na Obr. 6, zatímco na Obr. 7 vidíme mobilizaci systémového píku vlivem micelizace.



**Obr. 6** Mobilizace stacionárního systémového píku vlivem iontové síly. Mobilizace se projevila posunem polohy stacionárního systémového píku od markeru EOF (simulovaná pozice stacionárního systémového píku viz Obr. 5, rozsah časových os je na obou obrázcích shodný). Na elektroferogramu pozorujeme dva ne zcela oddělené píky, stacionární systémový pík a marker EOF. Oba píky se nám podařilo odlišit pomocí fotometrického detektoru, kdy jsme při 285 nm sledovali systémový pík, zatímco při 238 nm pozorujeme kromě částečné absorpce díky ftalátu převážně koncentrační profil thiomochoviny-markeru EOF. První pík je tedy systémový a po něm následuje profil EOF markeru. Černá křivka vykresluje záznam při původní vlnové délce  $\lambda=214$  nm, při které není možné píky identifikovat a odečíst správné hodnoty mobilit. BGE: 12,0 mM ftalát, 19,0 mM  $\text{Li}^+$ , 1,0 mM dodecylsulfát, vzorek: 1,0 mM thiourea (EOF marker), 12,5 mM ftalát, 19,0 mM  $\text{Li}^+$ , 1,0 mM dodecylsulfát. Celková délka kapiláry 49,5 cm, délka k detektoru 41,0 cm. Aplikované napětí dosahovalo 15 kV (kaniony migrují k detektoru). Experimenty jsme prováděli v kapiláře upravené vícevrstevným SMIL pokrytím [7].



Obr. 7 Mobilizace systémového píku vlivem micelizace. Elektroferogram stacionárního systémového píku a EOF markeru při použití rozdílných vlnových délek v micelárním systému. Po překročení CMC dochází ke skokovité změně pozice (eigenmobility) systémového píku, první pík na elektroferogramu označuje EOF marker, zatímco napravo je systémový pík. BGE: 9,5 mM fthalát, 20,3 mM  $\text{Li}^+$ , 6,0 mM dodecylsulfát, vzorek: 1,0 mM thiourea (EOF marker), 10,0 mM fthalát, 20,3 mM  $\text{Li}^+$ , 6,0 mM dodecylsulfát. Celková délka kapiláry 49,5 cm, délka k detektoru 41,0 cm. Aplikované napětí 15 kV (kanionty migrují k detektoru). Kapilára byla upravena vícevrstevným SMIL pokrytím [7].

Působení iontové síly na eigenmobility systémových píků jsme testovali pomocí systémů s různou hodnotou iontové síly. Dále jsme sledovali vliv různých silných kationtů při konstantní iontové síle. Výběr několika použitých elektrolytů včetně eigenmobilit vypočítaných pomocí simulačních programů PeakMaster a Simul a experimentálně zjištěných hodnot eigenmobilit je uveden v Tabulce 1. Protože chyba aproximace v korekci iontové síly se projevuje především u stacionárních systémových píků, kde navíc působí velmi rušivě, zaměřili jsme se právě na pozorování stacionárních systémových píků.



Tabulka 1. Vliv iontové síly a silného kationtu na eigenmobility stacionárních systémových píků pro vybrané základní elektrolyty. Porovnání experimentálních hodnot s hodnotami získanými simulací pomocí simulačních programů PeakMaster a Simul.

složení BGE, v závorce molární koncentrace $c_i$ složky BGE	iontová síla (mM)	experimentálně získané eigenmobility ( $10^{-9}\text{m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ )	eigenmobility získané simulací v programu Simul ( $10^{-9}\text{m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ )	eigenmobility získané simulací v programu PeakMaster ( $10^{-9}\text{m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ )
ftalát (5,0 mM) Cs <sup>+</sup> (7,5 mM)	10,02	0,54	0,90	0,05
ftalát (10 mM) Cs <sup>+</sup> (15 mM)	20,04	0,71	1,16	0,03
ftalát (20 mM) Cs <sup>+</sup> (30 mM)	40,06	1,00	1,48	0,02
ftalát (20 mM) Na <sup>+</sup> (30 mM)	40,06	0,71	0,94	0,02
ftalát (20 mM) Li <sup>+</sup> (30 mM)	40,06	0,38	0,59	0,02

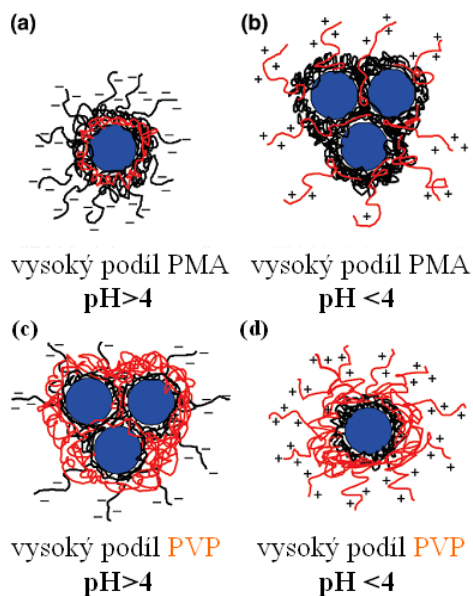
Jak vyplývá z Tabulky 1, mobilizace stacionárního systémového píku při zvyšování iontové síly roste. Stejnou tendenci vykazuje také vliv elektro pozitivnějšího kationtu. Při záměně silného kationtu za rychlejší, elektro pozitivnější, je mobilizace stacionárního píku vyšší a stoupá tedy v řadě ( $\text{Li}^+ < \text{Na}^+ < \text{Cs}^+$ ). Porovnáním experimentálních hodnot se simulovanými v programu Simul zjišťujeme, že Simul předpovídá systematicky vyšší hodnotu mobilizace, než poskytuje experiment. Vysvětlením může být nadhodnocená iontová korekce v simulačním programu, či ne zcela přesná data v integrované databázi. Simulační program PeakMaster mobilizaci vlivem iontové síly nepředpovídá z důvodů výše zmíněné aproximace sekundárního efektu iontové síly.

Pozorovaný fenomén mobilizace systémových píků vlivem iontové síly může způsobit nepřesnosti při využití stacionárního systémového píku jako EOF markeru. Chyba by se projevila obzvláště ve stanovení mobility pomalých analytů. Dále tento jev znesnadňuje interpretaci elektroferogramů, kdy se místo jednoho píku objeví dvě, navíc ne zcela rozdělené zóny. Správná identifikace píků a odečtení hodnot eigenmobilit nejsou proto bez použití detekce při různých vlnových délkách možné.

#### ***4.4 Interpolymerní micelární nanočástice stabilizované specifickou interakcí: Blokový kopolymer polystyren-kyselina poly(metakrylová) s lineárním homopolymerem poly(2-vinylpyridinem) ve vodném prostředí (publikace III a IV)***

Kapilární zónová elektroforéza byla použita jako jedna z experimentálních technik pro pozorování vzniku, chování a předpovězení struktury asociátů blokových kopolymerních micel s lineárním homopolymerem. Tyto látky patří do skupiny intenzivně studovaných komplexů z hlediska možného využití v biomedicínských aplikacích. Příprava nového komplexu využívá interakci vodíkovou vazbou mezi blokovou kopolymerní micelou polystyren-kyselina polymetakrylová (PS-PMA) a lineárním homopolymerem poly(2-vinylpyridinem) (PVP). Použité chemikálie byly vybrány na základě skutečnosti, že jejich chování je dobře známo a částice spolu vytvářejí komplex [67].

Přidáváním lineárního homopolymeru poly(2-vinylpyridinu) k micelárnímu roztoku polystyren-kyselina polymetakrylová vznikají interpolymerní komplexy stabilizované vodíkovou vazbou. Asociáty jsou tvořeny micelami PS-PMA, propojenými poly(2-vinylpyridinem). Velikost a struktura asociátů byla charakterizována pomocí mikroskopu atomárních sil (AFM), kapilární zónové elektroforézy a rozptylu světla (LS) (viz publikace III). Metodou kapilární zónové elektroforézy jsme sledovali vliv podílu přidaného PVP k PS-PMA a vliv délky lineárního řetězce PVP na chování komplexu. Ověřili jsme předpokládané struktury jednotlivých asociátů PS-PMA/PVP v bazickém a kyselém prostředí. Dále jsme metodou CZE určovali frakci volných řetězců protonizovaného  $\text{PVP}^+$  v roztoku PS-PMA/PVP, což nebylo možné určit jinými používanými metodami. Nadávkováním stabilních asociátů PS-PMA/PVP jsme na elektroferogramu získali jak v kyselém ( $\text{pH}=2,5$ ), tak v bazickém ( $\text{pH}=9,2$ ) pufru jeden pík odpovídající jedinému vzniklému asociátu, tj. polymerní micelle. Podíl poly(2-vinylpyridinu) v komplexu i délka řetězce PVP měla pouze malý vliv na mobilitu komplexu. Naměřené hodnoty mobilit nanočástice byly negativní ( $-34 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1} \text{ V}^{-1}$ ) pro bazické pufrы a pozitivní ( $11 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1} \text{ V}^{-1}$ ) v kyselých pufrách. Experimentální hodnoty mobilit odpovídají navrženým strukturám polymerních micel, kdy při  $\text{pH}$  nižším než 4 má micela kladný náboj, zatímco při  $\text{pH}$  vyšším než 4 je micelární obal nabit záporně (viz. Obr. 8).



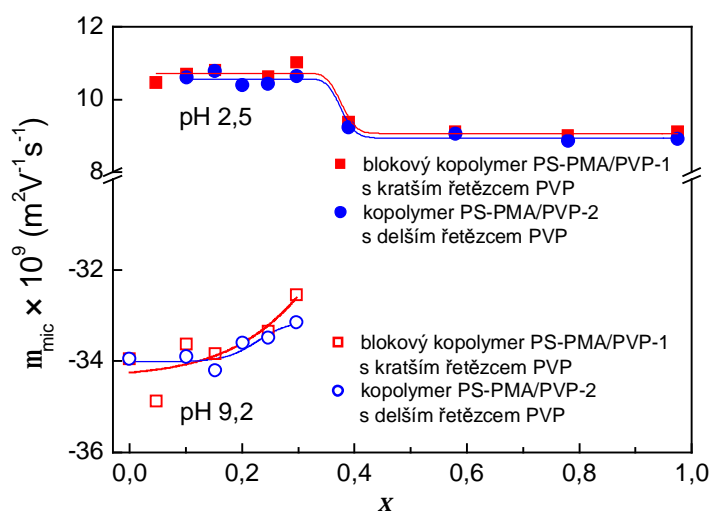
Obr. 8 Navržená struktura PS-PMA/PVP micel s nízkou a vysokou frakcí PVP vůči PMA ( $\xi$ ) v kyselém a bazickém pufru: (a)  $\xi < 0,25$ , pH > 4, (b)  $\xi < 0,25$ , pH < 4, (c)  $\xi > 0,35$ , pH > 4 a (d)  $\xi > 0,35$ , pH < 4. Jednotlivé části micely jsou barevně odlišeny: PS je vyznačen modře, PMA černě a PVP červenou barvou.

Jak je znázorněno na Obr. 8(a), nanočástice komplexu s nízkým podílem PVP vůči PMA ( $\xi < 0,25$ ) existují ve formě jednotlivých micel v pufrch při pH vyšším než 4. Metodou rozptylu světla bylo zjištěno, že velikost vzniklých částic je srovnatelná s velikostí původních PS-PMA micel, přičemž nezáleží na množství přidaného PVP. Tento závěr je v dobré shodě s téměř neměnnou hodnotou elektroforetické mobility komplexu při zvyšování podílu a molární hmotnosti PVP polymerní micely. Vzniklé částice se podobají struktuře původního PS-PMA s tím rozdílem, že komplex PS-PMA/PVP obsahuje ve vnitřní části micelárního obalu vrstvu tvořenou PMA/PVP. Při snižování pH roztoku jsme pozorovali prudké zvýšení molární hmotnosti komplexu, které odpovídá agregaci jednotlivých micel, viz Obr. 8(b). Agregace je vyvolána poklesem rozpustnosti z důvodu nedostatku disociovaných řetězců PMA a stabilizujících  $\text{PVP}^+$  skupin při tomto pH.

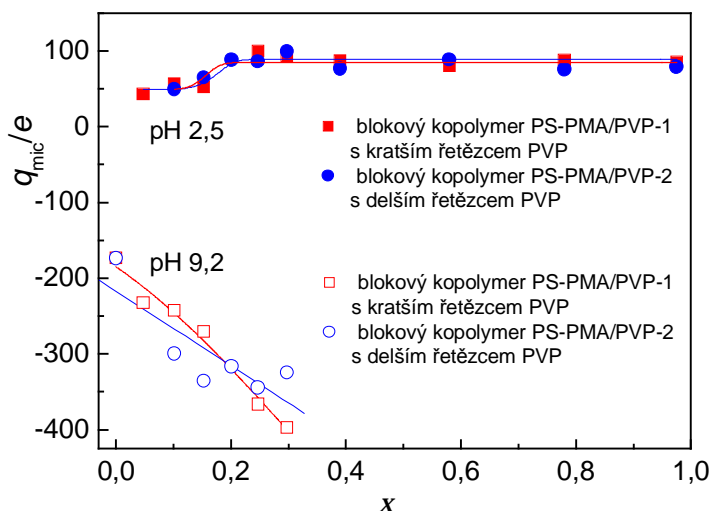
Systémy s vyšším podílem PVP ( $\xi > 0,35$ ) tvoří v bazických a neutrálních pufrch nestabilní polydisperzní agregáty, které se z roztoku po několika týdnech vysrážejí. Tyto vzorky nebylo možné charakterizovat pomocí CZE z důvodu nízké stability - Obr. 8(c). Pokud je disperze

převedena do kyselých roztoků s pH nižším než 4, dochází k tvorbě monodisperzních částic, které obsahují významné množství PVP ve svých micelárních obalech - Obr. 8(d).

V publikaci IV je struktura PS-PMA/PVP micel ve vodných pufrch charakterizována pomocí fluorescence a kapilární zónové elektroforézy a tematicky navazuje na výsledky popsané výše. Fluorescence je použita pro popis hydrofobních micelárních nanodomén a kapilární zónová elektroforéza pro studium struktury a náboje micelárního obalu. Aplikací Einstein-Smoluchowkého rovnice [68] na experimentální hodnoty mobilit a difuzní koeficienty jsme získali hodnoty elektrického náboje komplexu PS-PMA/PVP ( $q_{mic}$ ). Vypočtené hodnoty náboje byly negativní pro bazické pufrы a pozitivní v kyselých pufrch. Vypočtené hodnoty náboje odpovídají navrženým strukturám polymerních micel (viz Obr. 8). Experimentální hodnoty elektroforetické mobility  $m_{mic}$  komplexu PS-PMA/PVP v závislosti na poměru segmentů PVP vůči PMA ( $x$ ) jsou uvedeny na Obr. 9. Podíl náboje  $q_{mic}$  vůči elementárnímu náboji je znázorněn na Obr. 10.



Obr. 9 Závislost elektroforetické mobility  $m_{mic}$  komplexu PS-PMA/PVP na poměru segmentů PVP vůči PMA,  $x$ . Systémy s vyšším podílem PVP v bazických pufrch nebylo možné charakterizovat pomocí CZE z důvodu nízké stability.



Obr. 10 Podíl náboje  $q_{mic}$  vůči elementárnímu náboji  $e$  ( $q_{mic}/e$ ) vyneseny proti poměru segmentů PVP vůči PMA,  $x$ .

Jak vyplývá z Obr. 10, hodnota relativního náboje asociátu výrazně vzrostla pro vyšší hodnoty  $\xi$  oproti systémům s nízkým podílem PVP v kyselých i v bazických pufrch. Hodnoty relativního náboje jsou poměrně nízké ve srovnání s celkovým množstvím segmentů PMA a PVP, které mohou nést náboj. Tento nepoměr je dán silným stínícím efektem protiontů roztoku. Na Obr. 9 pozorujeme změnu elektroforetické mobility komplexu v kyselém pufru v závislosti na zvyšujícím se podílu PVP segmentů. Změna mobility odpovídá strukturální změně micelárního obalu, která v kyselých roztocích nastává při  $\xi > 0,3$ . Výsledek odpovídá poznatkům popsaným v předcházející publikaci III.

Kombinace několika experimentálních technik umožnila předpovědět strukturu a chování interpolymerních micelárních nanočástic PS-PMA/PVP, lišících se různým obsahem PVP, v bazické a kyselé oblasti. Přítomnost slabé vícemocné kyseliny (PMA) a slabé vícemocné báze (PVP) v obalu komplexu umožňuje vytvářet stabilní roztoky v širokém rozmezí pH. Díky stabilitě připravených roztoků nanočástic a komplexních strukturálních přechodů v závislosti na pH nabízí studovaný systém využití v oblasti biomateriálů a senzorů.

#### **4.5 Separační systémy se stacionárními fázemi (publikace V a VI)**

Následující část disertace pojednává o optimalizaci separačních podmínek pomocí multidimenzionální regrese LFER. Tímto semiempirickým přístupem lze charakterizovat separační systémy a popsat interakce mezi analytem a rozpouštědlem, například interakce mezi pseudostacionární micelární fází a BGE v CE, či mezi stacionární a mobilní fází ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii.

Model LFER byl použit pro porovnání tří chirálních stacionárních fází – teikoplaninové, teikoplanin aglykonové a methylované teikoplanin aglykonové ve čtyřech mobilních fázích, které se lišily poměrem methanolu a pufru. Chirální stacionární fáze na bázi teikoplaninu (T) patří mezi často používané chirální stacionární fáze (CSP) ze skupiny makrocyclických antibiotik a jejich struktura je charakterizována velkým počtem možných interakčních míst. Volba vhodné chirální stacionární fáze pro optimalizovanou separaci podle chemické podstaty solutu není dosud beze zbytku možná, protože u řady z nich není dosud znám přesný mechanismus interakce. Volba je tedy často empirická, podepřená jen údaji o separaci podobných sloučenin z dostupné literatury [69]. Separační systémy jsme porovnali a charakterizovali sofistikovaněji aplikací modelu LFER. Tento model převádí experimentálně získané výsledky z úrovně retenčních dat do roviny intermolekulárních interakcí, které jsou základem pro pochopení retenčního mechanismu. Kvantitativním určením jednotlivých interakcí můžeme předpovědět retenci nových solutů a zvolit vhodný typ CSP pro daný typ analytu.

Protože mobilní fáze ovlivňuje převládající typ a sílu jednotlivých interakcí, model LFER jsme aplikovali na systémy s měnící se mobilní fází. Mobilní fáze byla složená z methanolu (MeOH) a 1% triethylaminacetátového pufru (TEAA) o pH 4,20 (v/v). Množství organického modifikátoru v mobilní fázi se pohybovalo v rozmezí od 20 do 80 objemových procent. Použitím pufru o pH 4,20 a přídavkem triethylaminu jsme eliminovali nežádoucí interakce silanolového nosiče a pozorovaná retence analytů byla dána pouze interakcí analyt/chirální selektor resp. analyt/mobilní fáze. Testovací sada solutů obsahovala 34 látek a pokrývala celou škálu interakcí vyjádřených molekulovými deskriptory. Rozložení hodnot jednotlivých deskriptorů bylo rovnoměrné, aby se nepreferoval žádný typ interakce na úkor jiného.

Multidimenzionální lineární regresí jsme pro každý separační systém získali sadu regresních koeficientů. Pro srovnání sledovaných chromatografických systémů byly použity regresní koeficienty optimálních modelů LFER (viz "Fig. 3 a 4" v publikaci V a "Fig. 1-5" v publikaci VI).

Pro všechny studované systémy jsme získali záporné hodnoty regresních koeficientů **a** a **b**, což značí, že daný typ interakce je silnější mezi analytem a mobilní fází než mezi analytem a stacionární fází. Acidita a bazicita tedy patří mezi faktory snižující retenci analytů, které mají předpoklady k těmto typům interakcí. Regresní koeficient **b** je v systému tvořeném mobilní fází MeOH-1% TEAA, pH 4,20, 20/80 (v/v) a TAG CSP statisticky nevýznamný, což znamená, že acidita stacionární a mobilní fáze je velmi podobná.

Hydrofobicita (reprezentovaná koeficientem **v**) rostla v systémech se zvyšujícím se množstvím pufru v mobilní fází. Nejvyšší hodnota koeficientu **v** byla získána pro MTAG CSP ve všech použitých mobilních fázích, což souvisí se zvýšením hydrofobicity daného selektoru methylovanou karboxylovou skupinou a fenolických skupin teikoplanin aglykonu. Pořadí významnosti hydrofobních interakcí bylo MTAG>TAG>T ve všech studovaných separačních systémech.

Schopnost interagovat s *n*- a  $\pi$ - elektrony analytu (vyjádřená regresním koeficientem **r**) také rostla s rostoucím obsahem pufru v mobilní fází. Nižší hodnoty koeficientu **r** ukazovaly, že příspěvek tohoto typu interakce k celkové retenci analytů byl menší než příspěvek hydrofobicity. Nejnižší hodnoty koeficientu **r** byly získány na T CSP (oproti TAG a MTAG CSP při použití stejné mobilní fáze), která má hůře přístupná aromatická jádra a karboxylové skupiny díky přítomnosti cukerných zbytků.

Regresní koeficient **s** byl kladný pro téměř všechny studované systémy, neboť CSP na bázi teikoplaninu obsahují mnoho polárních a polarizovatelných skupin. V mobilní fází obsahující 80% methanolu interakce dipól- dipól a dipól-indukovaný dipól tvořily významný faktor ovlivňující retenci na TAG a MTAG CSP a významností nahradily hydrofobní a *n*- a  $\pi$ -elektronové interakce.

Pomocí metody LFER jsme porovnali a charakterizovali tři chirální stacionární fáze na bázi teikoplaninu ve čtyřech mobilních fázích. Model LFER představuje na rozdíl od řady

používaných chromatografických testů, např. podle Walterse, Tanaky aj., mnohem exaktnější a komplexnější přístup k charakterizaci složitějších separačních systémů.



## 4 Závěry

Během práce byla vyvinuta metoda pro stanovení kritické micelární koncentrace na základě sledování výskytu a chování systémových píků v kapilární elektroforéze. Navrhovaná metoda dosahuje větší přesnosti a eliminuje určité systematické chyby, kterými trpí některé stávající metody. Pro optimalizaci postupu byly využity znalosti teorie amplitud systémových píků.

Implementace procesu micelizace do simulačních programů objasnila výskyt systémových píků v micelárních systémech. Simulační programy nyní umožňují i v těchto systémech předpovědět pozice a chování systémových píků. Konfrontací získaných experimentálních dat s teoretickou předpovědí upraveného programu PeakMaster jsme potvrdili platnost navrženého elektroforetického popisu micelárních systémů a zároveň oprávněnost stanovení CMC pomocí systémových píků.

Objasněn byl rovněž vliv iontové síly na eigenmobility stacionárních systémových píků. Problém jednoznačného odlišení stacionárního systémového píku od markeru EOF a odečtení hodnot jejich mobilit lze řešit spektrofotometricky, kdy se při jedné vlnové délce detekuje marker elektroosmózy, zatímco jiná vlnová délka je vhodná pro monitorování poruch v základním elektrolytu – systémových píků.

Výsledky uvedené v této disertační práci dále ukazují, že kapilární zónová elektroforéza je vhodnou metodou pro ověření struktury nově syntetizovaných objemných polymerních micel. Pomocí kapilární zónové elektroforézy jsme potvrdili předpokládané náboje asociátů PS-PMA/PVP ve vodném roztoku pufru o různých hodnotách pH při zvyšujícím se podílu PVP.

Využit byl také model LFER pro charakterizaci tří chirálních stacionárních fází na bázi teikoplaninu ve čtyřech mobilních fázích. Podařilo se nám charakterizovat interakce rozhodující o interakčním mechanismu na daných CSP a efekt složení mobilních fází na zastoupení jednotlivých typů interakcí. Získané výsledky mohou pomoci při výběru vhodného separačního systému.

## 5 Seznam použité literatury

---

- [1] Wan, H., Blomberg, L.G., *J. Chromatogr. A* 2000, 875, 43.
- [2] Poinot, V., Bayle, C., Couderc, F., *Electrophoresis* 2003, 24, 4047.
- [3] Liu, J.P., Dabrah, T.T., Matson, J.A., Klohr, S.E., Volk, K.J., Kerns, E.H., Lee, M.S., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1997, 16, 207.
- [4] Kenndler, E., *J. Microcol. Sep.* 1998, 10, 273.
- [5] Kar, S., Dasgupta, P.K., *Microchem. J.* 1999, 62, 128.
- [6] Horvath, J., Dolnik, V., *Electrophoresis* 2001, 22, 644.
- [7] Katayama, H., Ishihama, Y., Asakawa, N., *Anal. Chem.* 1998, 70, 2254.
- [8] Hruska, V., Gas, B., *Electrophoresis* 2007, 28, 3.
- [9] Poppe, H., *J. Chromatogr.* 1990, 506, 45.
- [10] Poppe, H., *Anal. Chem.* 1992, 64, 1908.
- [11] Poppe, H., *J. Chromatogr. A* 1999, 831, 105.
- [12] Jaros, M., Hruska, V., Stedry, M., Zuskova, I., Gas, B., *Electrophoresis* 2004, 25, 3080.
- [13] Stedry, M., Jaros, M., Hruska, V., Gas, B., *Electrophoresis* 2004, 25, 3071.
- [14] Hruska, V., Jaros, M., Gas, B., *Electrophoresis* 2006, 27, 984.
- [15] Bechet, I., Fillet, M., Hubert, P., Crommen, J., *Electrophoresis* 1994, 15, 1316.
- [16] Lee, K.J., Heo, G.S., Kim, N.J., Moon, D.Ch., *J. Chromatogr. A*, 1992, 608, 243.
- [17] Nejmanova, J., Coufal, P., Bosakova, Z., Suchankova, J., Tesarova, E., *J. Sep. Sci.* 2007, 30, 2123.
- [18] Gebauer, P., Borecka, P., Bocek, P., *Anal. Chem.* 1998, 70, 3397.
- [19] Gas, B., Kenndler, E., *Electrophoresis* 2004, 25, 3901.
- [20] Bousse, L., Mouradian, S., Minalla, A., Yee, H., Williams, K., Dubrow R., *Anal. Chem.* 2001, 73, 1207.
- [21] Beale, S.C., *Anal. Chem.* 1998, 70, 279R.
- [22] Quirino, J.P., Terabe, S., *J. Chromatogr. A* 1999, 856, 465.
- [23] Khaledi, M.G., *High Performance Capillary Electrophoresis: Theory, Techniques, and applications*, Wiley, New York 1998.
- [24] Molina, M., Silva, M., *Electrophoresis* 2002, 23, 3907.
- [25] Egger, M.D., Liu, Y., Sevcik, J., Tesarova, E., Rozhkov, R., Larock, R.C., Armstrong, D.W., *Electrophoresis* 2003, 24, 2650.
- [26] Okafo, G.N., Bintz, C., Clarke, S.E., Camillery, P., *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1992, 17, 1189.
- [27] Boonkerd, S., Detaevernier, M.R., Michotte, Y., Vindevogel, J., *J. Chromatogr. A* 1995, 704, 238.
- [28] Hassan, S., Rowe, W., Tiddy, G.J.T., *Surfactant Liquid Crystals*. In: *Handbook of Applied Surface and Colloid Chemistry*. Holmberg, K. (Ed.). John Wiley & Sons Ltd., Minnesota 2001, p. 465–504.
- [29] Ryan, A.J., Hamley, I.W., *Morphology of block copolymers*. In: *The Physics of Glassy Polymers*. Young, R.J., Haward, R.N. (Eds.), Chapman and Hall, London, 1997, p. 451-490.
- [30] Cohen Stuart, M.A., Hof, B., Voets, I.K., de Keizer, A. *Curr. Opin. Colloid In.* 2005, 10, 30.

- 
- [31] Havrankova, J., Limpouchova, Z., Stepanek, M., Prochazka, K., *Macromol. Theor. Simul* 2007, *16*, 386.
- [32] van der Burgh, S., de Keizer, A., Cohen Stuart, M.A. *Langmuir* 2004, *20*, 1073.
- [33] Patist, A., Determining Critical Micelle Concentration. In: *Handbook of Applied Surface and Colloid Chemistry*. Holmberg, K. (Ed.). John Wiley & Sons Ltd., Minnesota 2001, p. 239–249.
- [34] Alargova, R.G., Kochijashky, I.I., Sierra, M.L., Kwetkat, K., Zana, R., *J. Colloid and Interface Science* 2001, *235*, 119.
- [35] Tesarova, E., Tuzar, Z., Nesmerak, K., Bosakova, Z., Gas, B., *Talanta* 2001, *54*, 643.
- [36] Miyagishi, S., Okada, K., Asakawa, T., *J. Colloid. Interf. Sci.* 2001, *238*, 91.
- [37] Lin, C.E., *J. Chromatogr. A* 2004, *1037*, 467.
- [38] Reis, S., Moutinho, C.G., Matos, C., de Castro, B., Gameiro, P., Lima, J.L.F.C., *Anal. Biochem.* 2004, *334*, 117.
- [39] Tan, L.C., Carr, P.W., Abraham, M.H., *J. Chromatogr. A* 1996, *752*, 1.
- [40] Kopecka, K., Thesis. Praha, 2002, p. 15.
- [41] Bekarek, V., Nevecna, T. *Rozpoustedlove vlivy v chemii a jejich hodnoceni*. Academia, Praha, 1992, 129, s. 20.
- [42] Li, L., Carr, P.W., Evans, J.F., *J. Chromatogr. A* 2000, *868*, 153.
- [43] Sandi, A., Szepesy, L., *J. Chromatogr. A* 1998, *818*, 19.
- [44] Abraham, M.H., *Anal. Chem.* 1997, *69*, 613.
- [45] Politzer, P., Murray, J.S. *Quantitative treatment of solute/solvent interactions*. Elsevier, New Orleans 1994, s. 213.
- [46] Markuszewski, M., Kaliszán, R., *J. Chromatogr. B* 2002, *768*, 55.
- [47] Szepesy, L., *J. Chromatogr. A* 2002, *960*, 69.
- [48] Szepesy, L., *J. Sep. Sci.* 2003, *26*, 201.
- [49] Abraham, M.H., McGowan, J.C., *Chromatographia* 1987, *23*, 243
- [50] Abkay, C., Shamsi, S.A., *Electrophoresis* 2004, *25*, 635.
- [51] Abraham, M.H., Haftvan, J.A., Whiting, G.S., Leo, A., Taft, R.S., *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* 1994, *8*, 1777.
- [52] Abraham, M.H., *Chem. Soc. Rev.* 1993, *22*, 73.
- [53] Abraham, M.H., McGowan, J.C., *Chromatographia* 1987, *23*, 243.
- [54] Abraham, M.H., Whiting, G.S., Doherty, R.M., Shuely, W.J., *J. Chromatogr. A* 1991, *587*, 213.
- [55] Zissimos, A., Abraham, M.H., Klamt, A., Eckert, F., Wood, J., *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 2002, *42*, 1320.
- [56] Reta, M., Carr, P.W., Sadek, P.C., Rutan, S.C., *Anal. Chem.* 1999, *71*, 3484.
- [57] Sandi, A., Nagy, M., Szepesy, L., *J. Chromatogr. A* 2000, *893*, 215.
- [58] Vonk, E.C., Lewandowska, K., Claessens, H.A., Kaliszán, R., Cramers, C.A., *J. Sep. Sci.* 2003, *26*, 777.
- [59] Nasal, A., Haber, P., Kaliszán, R., Forgacs, E., Cserhati, T., Abraham, M.H., *Chromatographia* 1996, *43*, 484.
- [60] Sellmeyer, H., Poppe, H., *J. Chromatogr. A* 2002, *960*, 175.
- [61] Stedry, M., Jaros, M., Gas, B., *J. Chromatogr. A* 2002, *960*, 187.
- [62] Erny, G.L., Bergstrom, E.T., Goodall, D.M., *Anal. Chem.* 2001, *73*, 4862.
- [63] Erny, G.L., Bergstrom, E.T., Goodall, D.M., *J. Chromatogr. A* 2002, *959*, 229.
- [64] Myers, D., *Surfaces, Interface and Colloids*, VCH, New York 1991.

- 
- [65] Tesarova, E., Sevcik, J., Gas, B., Armstrong, D.W., *Electrophoresis* 2004, 25, 2693.
- [66] Dismukes, E.B., Alberty, R. A., *J. Am. Chem. Soc.* 1954, 76, 191.
- [67] Topouza, D., Orfanou, K., Pispas, S., *J. Polym. Sci. Pol. Chem.* 2004, 42, 6230.
- [68] Bohme, U., Scheler, U., *Chem. Phys. Lett.* 2007, 435, 342.
- [69] Gilar, M., Tesarova, E., Patzelova, V., Deyl, Z., *Chem. Listy* 1994, 88, 514.

## Seznam publikací

- I. Hruska, V., Stedry, M., Vcelakova, K., **Lokajova, J.**, Tesarova, E., Jaros, M., Gas, B., Eigenmobilities in background electrolytes for CZE. V. Intensity (amplitudes) of system peaks, *Electrophoresis* 2006, 27, 4610–4617.
- II. **Lokajova, J.**, Hruska, V., Tesarova, E., Gas, B., System peaks in micellar electrophoresis: I. Utilization of system peaks for determination of CMC, *Electrophoresis* 2008, 29, 1189–1195.
- III. Matejicek, P., Uchman, M., **Lokajova, J.**, Stepanek, M., Prochazka, K., Interpolymer complexes based on the core/shell micelles. Interaction of polystyrene-*block*-poly(methacrylic acid) micelles with linear poly(2-vinylpyridine) in 1,4-dioxane water mixtures and in aqueous media, *J. Phys. Chem. B* 2007, 111, 8394–8401.
- IV. Matejicek, P., Uchman, M., **Lokajova, J.**, Stepanek, M., Prochazka, K., Multilayer polymeric nanoparticles based on specific interactions in solution: polystyrene-*block*-poly(methacrylic acid) micelles with linear poly(2-vinylpyridine) in aqueous buffers, *Mater. Manuf. Process* 2008, v tisku.
- V. **Lokajova, J.**, Tesarova, E., Armstrong, D.W., Comparative study of three teicoplanin-based chiral stationary phases using the linear free energy relationship model, *J. Chromatogr. A* 2005, 1088, 57–66.
- VI. Kalikova, K., **Lokajova, J.**, Tesarova, E., Linear free energy relationship as a tool for characterization of three teicoplanin-based chiral stationary phases under various mobile phase compositions, *J. Sep. Sci.* 2006, 29, 1476–1485.

## **Příspěvky na konferencích**

### **2008**

- 16th International Symposium on Capillary Electroseparation Techniques ITP 2006, Catania, Italy; Lokajova, J., Hruska, V., Tesarova, E., Gas, B., Mobilization of stationary system peaks as an effect of the background electrolyte ionic strength, poster.
- CEEPUS Summer school, Nitra, Slovakia; Lokajova, J., Hruska, V., Tesarova, E., Gas, B., Determination of CMC by system peaks in electrophoresis considering the effect of the background electrolyte ionic strength, přednáška.
- Studentská konference v rámci grantu GAČR 203/05/H001, Praha, Česká republika; Lokajová, J., Hruška, V., Tesařová, E., Gaš, B., Optimalizace separace v systému kapilární elektroforézy pomocí simulačních programů, přednáška.
- 22nd International Symposium on MicroScale Bioseparations MSB 2008, Berlin, Germany; Lokajova, J., Hruska, V., Tesarova, E., Gas, B., An improved method for the CMC determination considering the influence of ionic strength on the eigenmobilities of the system peaks, poster.

### **2007**

- 13th International Symposium on Separation Sciences (ISSS 2007), Strbske Pleso, Slovakia; Lokajova, J., Hruska, V., Tesarova, E., Gas, B., Utilization of system peaks in electrophoresis for determination of CMC, poster.
- CEEPUS short term attachment, Graz University of Technology, Austria; Lokajova, J., Utilization of system peaks in capillary zone electrophoresis, lecture.
- Pražské Analytické Centrum Inovací Projekt CZ.04.3.07/4.2.01.1/0002 spolufinancovaný ESF a Státním rozpočtem ČR, Praha, Česká republika; Lokajová, J., Kalíková, K., Tesařová, E., Studium interakčních mechanismů v separačních systémech – LFER, přednáška.
- International Symposium Advances in Chromatography and Electrophoresis and Chiral 2007 Olomouc, Czech Republic; Lokajova, J., Kubsova, K., Svobodova, E., Bosakova, Z., Tesarova, E., Capillary electrophoresis of recently isolated hydroxyanthraquinone dyes, poster.
- CEEPUS Summer school, Pecs, Hungary; Lokajova, J., Hruska, V., Tesarova, E., Gas, B., Determination of CMC by system peaks in electrophoresis, přednáška.
- 21st International Symposium on MicroScale Bioseparations MSB 2007, Vancouver, Canada; Lokajova, J., Hruska, V., Tesarova, E., Gas, B., Utilization of system peaks in electrophoresis for determination of CMC, poster.

## 2006

- 15th International Symposium on Capillary Electroseparation Techniques ITP 2006, Paris, France; Lokajova, J., Hruska, V., Vesela, I., Tesarova, E., Gas, B., Interesting electrophoretic behaviour of system peaks in the presence of micelles, poster.
- 20th International Symposium on MicroScale Bioseparations MSB 2006, Amsterdam, Netherland; Vesela, I., Lokajova, J., Hruska, V., Tesarova, E., Gas, B., Determination of CMC by system peaks in electrophoresis, poster.

## 2005

- International Symposium Advances in Chromatography and Electrophoresis 2005 and Chiranal 2005 Olomouc, Czech Republic; Lokajova, J., Kalikova, K., Tesarova, E., Comparison of teicoplanin-based chiral stationary phases using the linear free energy relationship model. The comparison of chiral stationary phases, přednáška.
- Student Conference in the frame of the GACR 203/05/H001, Prague, Czech Republic; Lokajova, J., Kalikova, K., Tesarova, E., Comparative study of three teicoplanin-based chiral stationary phases for HPLC using the LFER model, přednáška.

## 2004

- International Symposium on Chromatography ISC 2004, Paris, France; Lokajova, J., Tesarova, E., Comparative study of teicoplanin based chiral stationary phases for HPLC in the frame of LFER, poster.
- GACR 203/05/H001 Student Conference, Prague, Czech Republic; Lokajova, J., Kalikova, K., Tesarova, E., Comparative study of three teicoplanin-based chiral stationary phases for HPLC using the LFER Model, přednáška.

## Životopis

Jméno a příjmení: Jana Lokajová  
Narozena: 14.5. 1981, Domažlice

### Vzdělání:

- od r. 2004 fyzikální chemie, PhD studium na Katedře fyzikální a makromolekulární chemie PŘF UK v Praze, skupina elektromigračních metod, téma disertační práce: Popis elektroforetických separačních systémů, využití systémových píků k charakterizaci vlastností surfaktantů a optimalizace složitějších systémů pomocí modelu LFER. Školitel: Doc. RNDr. Eva Tesařová, CSc.
- 1999 – 2004 fyzikální chemie, magisterské studium na Katedře fyzikální a makromolekulární chemie PŘF UK v Praze, téma diplomové práce: Charakterizace chirálních stacionárních fází na bázi teikoplaninu pomocí modelu LFER, školitel: Doc. RNDr. Eva Tesařová, CSc.
- 1992 – 1999 Gymnázium J.Š.Baara v Domažlicích

### Oblasti výzkumu:

separace látek pomocí elektromigračních a chromatografických metod, specializace na UV/VIS, vodivostní i MS detekci, optimalizace separace, počítačové simulace, studie interakčního mechanismu v separačním procesu, aplikace multidimenzionální regresní analýzy Linear Free Energy Relationship (LFER)

### Stáže:

- Institute of the Pharmaceutical Chemistry and Pharmaceutical Technology, Faculty of Science, Karl-Franzens-Universitaet Graz, Rakousko, Prof. Gerald Gübitz, (listopad 2004 - leden 2005).
- Graz University of Technology, Institute of Analytical Chemistry and Radiochemistry, Prof. Ernst Lankmayr, (prosinec 2007- leden 2008).

### Další aktivity, dosažené výsledky:

- Hlavní řešitelka grantu GAUK 2006 GA UK 19268, "Teorie systémových píků v elektromigračních metodách v micelárním prostředí" (rok 2007-2008).
- Hlavní řešitelka grantu FRVŠ s názvem Vytvoření nové úlohy do Pokročilého cvičení z fyzikální chemie "Kapilární zónová elektroforéza: simulace a experiment". (rok 2006).
- Ocenění v kategorii nejlepších posterů na mezinárodní konferenci 13th International Symposium on Separation Sciences (ISSS 2007), Strbske Pleso, Slovakia. Název příspěvku: "Utilization of system peaks in electrophoresis for determination of CMC".

### Jazykové dovednosti:

- Angličtina, FCE
- Němčina, ZMP a ZDfB



I