

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

KATEDRA FYZIKÁLNÍ A MAKROMOLEKULÁRNÍ CHEMIE

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

V OBORU CHEMIE A MATEMATIKA SE ZAMĚŘENÍM NA VZDĚLÁVÁNÍ

**ZÁVISLOST POHYBLIVOSTI NABITÝCH CYKLODEXTRINŮ
NA IONTOVÉ SÍLE**

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Iva Zusková, CSc.

Praha 2008

Martin Beneš

UNIVERZITA KARLOVA v Praze
Přírodovědecká fakulta
Oborová knihovna chemie
Albertov 6, 128 43 Praha 2
IČO: 00216208, DIČ: CZ00216208
UK 22

*pr.č. 7b / OS stud
(did. ob)*

Klíčová slova


kapilární zónová elektroforéza, cyklodextriny, iontová síla, elektroforetická pohyblivost

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval samostatně, pod vedením školitelky RNDr. Ivy Zuskové, CSc., a že jsem všechny použité prameny řádně citoval.

Jsem si vědom 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 9.6.2008.....



.....

Podpis

Rád bych poděkoval všem, kteří mi pomáhali při vypracování bakalářské práce, především své školitelce RNDr. Ivě Zuskové, CSc. a RNDr. Kateřině Ušelové, PhD., za nezměrnou trpělivost, ochotu a cenné rady. Dík patří Prof. Gyulu Vighovi (Texas A&M University) za darování cyklodextrinů. A v neposlední řadě bych chtěl poděkovat Mgr. Janě Svobodové především za pomoc s překonáním počátečních obtíží.

Abstrakt

V rámci této práce byla proměřena závislost elektroforetických pohyblivostí dvou nabitých cyklodextrinů na iontové síle separačních elektrolytů kapilární zónovou elektroforézou. Získaná experimentální data byla zpracována regresní analýzou. Výstupem jsou empirické rovnice popisující příslušnou závislost, přičemž jeden z jejich parametrů má význam limitní pohyblivosti stanovovaných cyklodextrinů.

Abstract

In frame of this work, dependences of electrophoretic mobilities of two charged cyclodextrins on the ionic strength of separation electrolytes were measured by capillary zone electrophoresis. Obtained experimental data were processed by regression analyzes. The empiric equations describing appropriate dependences are derived from these regressions. The limiting mobilities of the cyclodextrins are the end point of this work.

Seznam použitých zkratk

BGE	separační elektrolyt, (background electrolyte)
CCD	bezkontaktní vodivostní detektor (contactless conductivity detektor)
CE	kapilární elektroforéza
CZE	kapilární zónová elektroforéza
DAD	spektrofotometrický detektor s diodovým polem
DMSO	dimethylsulfoxid
EOF	elektroosmotický tok
HS	heptakis-6-O-sulfo-cyklomalto-heptaose heptasodná sůl
HVL	Haarhoffova – van der Lindeho funkce
ID	vnitřní průměr kapiláry
PEMEDA	mono-6-deoxy-6-N,N,N',N',N'-pentamethylethylenediammonio-cyklomaltoheptaose dichlorid
PreMCE	tlakem zprostředkovaná kapilární elektroforéza
UV – VIS	ultrafialová a viditelná oblast spektra

Obsah

1	ÚVOD A CÍL PRÁCE	2
2	TEORETICKÁ ČÁST	3
2.1	Kapilární zónová elektroforéza	3
2.1.1	Základní pojmy	3
2.1.2	Tlakem zprostředkovaná kapilární elektroforéza (PreMCE)	11
2.1.3	Vliv iontové síly BGE na elektroforetickou mobilitu analytu	13
2.2	Cyklodextriny	17
2.2.1	Struktura a vlastnosti cyklodextrinů	17
2.2.2	Využití cyklodextrinů	19
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	21
3.1	Použité chemikálie a přístroje	21
3.2	Experimentální podmínky a postupy	22
4	VÝSLEDKY A DISKUSE	24
4.1	Aniontový cyklodextrin - HS	24
4.1.1	Proměření závislosti pohyblivosti HS na iontové síle BGE	24
4.1.2	Regresní analýza experimentálních dat, stanovení limitní pohyblivosti	30
4.1.3	Diskuse	31
4.2	Kationtový cyklodextrin - PEMEDA	32
4.2.1	Proměření závislosti pohyblivosti analytu PEMEDA na iontové síle BGE	32
4.2.2	Regresní analýza experimentálních dat, stanovení limitní pohyblivosti	36
4.2.3	Diskuse	38
5	ZÁVĚR	39
6	LITERATURA	40

1 Úvod a cíl práce

Kapilární zónová elektroforéza se v posledních letech stala komerčně hojně využívanou separační metodou. Mnohé složitější aplikace této metody jsou náročné na volbu základních parametrů separace. K těmto účelům byly vyvinuty různé počítačové programy sloužící k simulaci kapilární elektroforézy. Jedna z pracovních skupin působících na Katedře fyzikální a makromolekulární chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze se mimo jiné zabývá právě vývojem simulačních programů kapilární elektroforézy. Tento simulační program by měl být doplněn o komplexační rovnováhy. Nezbytnými vstupními údaji pro takový program poté budou konstanty stability, limitní pohyblivosti komplexu a v případě ionogenního komplexačního činidla též jeho limitní pohyblivost. Pro stanovení konstant stability ionogenního komplexačního činidla kapilární zónovou elektroforézou bude třeba znát též závislost jeho elektroforetické pohyblivosti na iontové síle prostředí a to do vysokých hodnot iontových sil. Častými komplexačními činidly používanými především k chirálním separacím jsou cyklodextriny.

Cíle této práce lze shrnout do několika bodů:

- teoretické i praktické pochopení a osvojení si základních principů kapilární zónové elektroforézy,
- shrnutí různých přístupů k modelování závislosti elektroforetické pohyblivosti nabitých částic na iontové síle prostředí,
- shrnutí základních vlastností cyklodextrinů včetně jejich využití,
- proměření elektroforetické pohyblivosti vybraných nabitých cyklodextrinů v závislosti na iontové síle prostředí,
- vyhodnocení experimentálních dat pomocí vhodně vybrané regresní funkce, včetně určení limitních pohyblivostí.

2 Teoretická část

2.1 Kapilární zónová elektroforéza

Kapilární zónová elektroforéza patří do skupiny kapilárních elektromigračních separačních metod. Pro tyto metody je typické, že k pohybu vzorku kapalným separačním prostředím, respektive k separaci nabitých komponent, dochází vlivem působení elektrického pole. Vlastní separace probíhá zpravidla v křemenných kapilárách. Výhody kapilárních elektromigračních metod (CE) jsou především nízká spotřeba vzorku a činidel potřebných pro separaci, vysoká účinnost separace a rychlost analýzy. Naopak k nevýhodám těchto technik patří horší reprodukovatelnost experimentů.

Kapilární zónová elektroforéza (CZE) je nejjednodušší elektromigrační metodou, umožňující separaci a stanovení anorganických i organických ionogenních látek. CZE se úspěšně uplatňuje v oblasti farmacie při laboratorní kontrole čistoty léčiv; především při kontrole optické čistoty léčiv, u nichž jeden z enantiomerů projevuje odlišnou biologickou aktivitu. V posledních letech také rapidně vzrůstá počet aplikací kapilární elektroforézy v oblasti analýzy anorganických iontů.⁽¹⁾

2.1.1 Základní pojmy

Elektroforetická pohyblivost^(2, 3, 4)

Na nabitou částici (ion s nábojem q) působí v elektrickém poli síla F_e , jejíž velikost je dána vztahem:

$$F_e = |q| \cdot E, \quad (1)$$

ve kterém E je intenzita elektrického pole. Tato je dána podílem napětí U připojeného ke koncům kapiláry a její celkové délky l_c :

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

Elektrická síla je hybnou silou, která kationtům udílí zrychlení směrem ke katodě, aniontům pak k anodě. Pohyb iontů vyvolaný vlivem elektrického pole se nazývá migrace. Migrace iontu o poloměru r je v prostředí o nenulové viskozitě η bržděna frikční silou prostředí, F_f , jejíž velikost je dána Stokesovým vztahem:

$$F_f = 6\pi\eta r v, \quad (3)$$

ve kterém v je rychlost migrace iontu.

Za ustáleného stavu se velikosti těchto dvou sil rovnají ($F_e = F_f$), částice se pohybuje rovnoměrným pohybem, pro jehož rychlost platí:

$$v = \frac{|q|E}{6\pi\eta r}. \quad (4)$$

Rychlost migrace daného iontu v daném prostředí o dané teplotě (η je funkcí teploty) je přímo úměrná intenzitě elektrického pole. Pro porovnávání rychlostí migrace konkrétních iontů byla zavedena veličina elektroforetická pohyblivost (mobilita), μ , vztahem:

$$\mu = \frac{v}{E}. \quad (5)$$

Elektroforetická pohyblivost tedy představuje rychlost migrace nabitě částice v kapalném prostředí vystaveném působení stejnosměrného elektrického pole o jednotkové intenzitě. Porovnáním rovnic (4) a (5) potom pro elektroforetickou pohyblivost iontu μ plyne výraz:

$$\mu = \frac{q}{6\pi\eta r}, \quad (6)$$

který již respektuje obvyklou konvenci, podle níž má pohyblivost kladnou hodnotu pro kationty a zápornou pro anionty. Tento vztah však platí pouze v ideálně zředěném roztoku, neboť při jeho odvození nebyly uvažovány vzájemné interakce iontů. V reálných roztocích elektroforetická pohyblivost závisí na iontové síle roztoku (viz odstavec 2.1.3).

Elektroforetická pohyblivost iontů vztahená k iontové síle prostředí a teplotě se nazývá aktuální pohyblivost. Elektroforetická mobilita iontů v nekonečně zředěném roztoku se označuje jako limitní pohyblivost, μ_0 . Limitní pohyblivosti jsou tabelovány zpravidla při teplotě 25°C jako fyzikálně chemické konstanty iontů.

Pro látky, které jsou tvořeny více formami, mezi nimiž dochází k rychlému ustavení rovnováhy (rychlost ustanovení rovnováhy je mnohem vyšší než migrační rychlost), se definuje efektivní mobilita μ_{eff} , která popisuje mobilitu dané látky jako celku:

$$\mu_{\text{eff}} = \sum_i \frac{c_i \mu_i}{c}, \quad (7)$$

kde c_i a μ_i označují koncentraci a aktuální mobilitu i -té iontové formy látky, jejíž analytická koncentrace je rovna c .

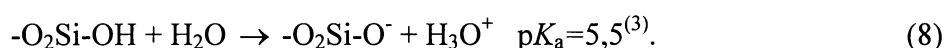
V případě slabých elektrolytů je efektivní pohyblivost závislá prostřednictvím stupně disociace na pH prostředí. Slabá kyselina HA bude vykazovat nejvyšší mobilitu v roztoku o

takovém pH, při kterém bude plně disociována. Za takových experimentálních podmínek naměříme pohyblivost příslušného aniontu μ_{A^-} .

Závislosti elektroforetické pohyblivosti na pH se v praxi často využívá. Pro separace slabých elektrolytů a amfolytů se volí takové pH, při kterém jsou rozdíly v efektivních pohyblivostech maximální.

Elektroosmotický tok^(2, 3, 4)

Dalším transportním jevem vyskytujícím se v kapilárních elektromigračních metodách je elektroosmotický tok. Elektroosmotický tok (EOF) je tok kapaliny kapilárou, na jejíž konce je vloženo napětí. Konkrétně v křemenné kapiláře naplněné vodným roztokem elektrolytu dojde na vnitřní stěně nejprve k hydrolyze siloxanových skupin za vzniku silanolových skupin. Následnou disociací těchto skupin je vnitřní povrch kapiláry tvořen záporně nabitými křemičitanovými skupinami:



Uvolněné oxoniové kationty vytvářejí v roztoku kladně nabitou přilehlou vrstvu. Při vložení elektrického napětí na kapiláru dochází k pohybu oxoniových iontů ke katodě. Tyto ionty jsou solvatované a prostřednictvím svých solvátových obalů s sebou strhávají veškerý roztok uvnitř kapiláry směrem ke katodě, čímž vzniká elektroosmotický tok. Elektroosmotický tok je neselektivním jevem, unáší všechny komponenty roztoku stejnou rychlostí, nepřispívá tedy k separaci. Výrazným způsobem ale ovlivňuje dobu separace. Další výhodou elektroosmotického toku je jeho takřka pravouhlý pístový profil v celém průřezu kapiláry, tedy jeho příspěvek k rozmyvání zón analytů během separace je minimální.

Směr a stálá rychlost elektroosmotického toku jsou jedním z největších problémů, s jakými se při elektroforéze potýkáme. Rychlost elektroosmotického toku je úměrná povrchové hustotě náboje na vnitřní stěně kapiláry. Jelikož disociace silanolových skupin je závislá na pH roztoku, jímž je kapilára naplněna, je elektroosmotický tok v křemenných kapilárách silně závislý na pH použitého roztoku. Čím vyšší je pH, tím větší negativní náboj je lokalizován na vnitřní stěně kapiláry a tím rychlejší elektroosmotický tok pozorujeme. Okolo pH = 3-4 se elektroosmóza výrazně zpomaluje, případně obrací směr.

Na rychlost elektroosmózy má vedle pH separačního elektrolytu vliv také jeho iontová síla. Nižší iontová síla roztoku vede k rychlejšímu EOF. Příliš zředěné elektrolyty však mohou být zdrojem nespolehlivých výsledků, neboť příliš zředěné pufrý nejsou schopny zajistit konstantní pH po celé délce kapiláry.

Nejúčinněji lze elektroosmotický tok regulovat úpravou vnitřního povrchu kapiláry (coating). Tzv. dynamický povlak (dynamic coating) lze vytvořit přidávkem povrchově aktivních látek přímo do používaného pufru. Druhým typem je tzv. permanentní (kovalentní) povlak, který bývá většinou prováděn polymery vázanými k vnitřnímu povrchu kapiláry kovalentními vazbami. V obou případech je možné podle struktury modifikátoru snížit, eliminovat či dokonce obrátit směr elektroosmózy.

Neutrální analyty mají nulovou elektroforetickou mobilitu a v kapiláře se pohybují pouze vlivem elektroosmózy. Používají se jako markery pro určení rychlosti resp. pohyblivosti elektroosmotického toku (μ_{EOF}). Pohyblivost EOF je definována jako rychlost elektroosmotického toku v kapalném prostředí vystaveném působení stejnosměrného elektrického pole o jednotkové intenzitě. Elektroforetickou mobilitu EOF, který směřuje ke katodě, definujeme jako kladnou hodnotu, mobilitu EOF směřující k anodě jako zápornou hodnotu.

Pozorovaná pohyblivost analytu v kapiláře (μ_{app}) je dána součtem vlastní elektroforetické pohyblivosti analytu a pohyblivosti elektroosmózy:

$$\mu_{\text{app}} = \mu_{\text{EOF}} + \mu_{\text{eff}} \quad (9)$$

Disperzní jevy v CZE^(5, 6, 7)

Disperze je negativní jev v CZE, který způsobuje rozšiřování a deformaci píků, čímž ovlivňuje citlivost a účinnost separace. Základní podstata disperze spočívá v rozdílných rychlostech analytu v rámci zóny. Celková disperze je dána jako součet jednotlivých disperzních příspěvků. Máme snahu tyto příspěvky minimalizovat a tak docílit pokud možno co nejužších a nejsymetričtějších píků.

Nejvýznamnější příspěvky k celkové disperzi představují:

- podélná difúze,
- teplotní efekty (Joulovo teplo),
- adsorbce analytu na stěnu kapiláry,
- elektromigrační disperze.

Difúzí rozumíme transport hmoty vyvolaný koncentračními gradienty. V CZE způsobuje symetrické rozmývání píků. Jedná se o přirozený jev a nikdy jej nelze úplně eliminovat.

Elektrický proud procházející kapilárou vyvolává vznik Joulova tepla, které ohřívá elektrolyt. V důsledku toho vznikají v kapiláře teplotní gradienty a lokální změny viskozity prostředí, které deformují píkový profil elektroosmotického toku a ovlivňují elektroforetické mobility

analytů. Omezení vzniku Joulova tepla je možné zmenšením elektrického pole, redukcí průměru kapiláry nebo snížením vodivosti základního elektrolytu.

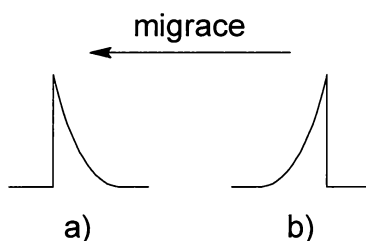
Deformaci píků způsobuje též reverzibilní adsorpce na stěnu kapiláry. Ireverzibilní adsorpce vede ke ztrátě analytu a znehodnocení separace. Interakce mezi analytem a stěnou kapiláry lze omezit zvýšením koncentrace základního elektrolytu nebo úpravou povrchu vnitřní stěny kapiláry.

Elektromigrační disperze způsobuje deformaci ideálního gaussovského píku na charakteristický pík trojúhelníkovitý. Elektrodisperze je vyvolána rozdílnou pohyblivostí iontů analytu a základního elektrolytu. Projeví se ale pouze tehdy, pokud se analyt nadávkuje v koncentraci, která ovlivní vodivost a pH základního elektrolytu v zóně analytu.

Pro popis elektromigrační disperze i -té složky byla definována veličina S_i (relative velocity slope)⁽⁸⁾:

$$S_i = \frac{\kappa}{c_i} \left(\frac{dv_i}{dc_i} \right)_{c_i \rightarrow 0}, \quad (10)$$

kde κ představuje specifickou vodivost v zóně složky. Pokud s rostoucí koncentrací složky roste také její rychlost, veličina S bude mít kladnou hodnotu. Pík bude mít ostrou náběžnou a rozmytou závěrečnou hranu - píky chvostují (tailing). V opačném případě pozorujeme pík frontující, viz Obr. 1.



Obr. 1 Tvary trojúhelníkovitých píků: a) tailing b) fronting.

V případě, že vzorkem je silný elektrolyt, má na tvar píku zásadní vliv mobilita koiontu. Koion je takový ion základního elektrolytu, který migruje stejným směrem jako ion analytu, který nás zajímá⁽⁵⁾. Pokud je mobilita analytu vyšší než mobilita jemu příslušného koiontu, pak v místě o vyšší koncentraci analytu bude vyšší specifická vodivost než v okolí. Dojde ke snížení potenciálového spádu a snížení migrační rychlosti. Budeme pozorovat frontující pík. Za předpokladu, že mobilita analytu je nižší než mobilita jemu příslušného koiontu, pozorujeme chvostující pík. U slabých elektrolytů je situace složitější, neboť jejich migrační rychlost může být významně ovlivněna hodnotou pH.

U píků deformovaných elektromigrační disperzí není detekční čas maxima píku analytu správným údajem pro výpočet pohyblivosti analytu v daném prostředí. K výpočtu pohyblivosti analytu je třeba znát čas odpovídající středu píku. Ten lze určit proložení píku Haarhoffovou – van der Lindeho (HVL) funkcí, která je dána vztahem:

$$f(x) = \frac{\frac{a_0 a_2}{a_1 a_3 \sqrt{2\pi}} \exp\left[-\frac{1}{2} \left(\frac{x - a_1}{a_2}\right)^2\right]}{\frac{1}{\exp\left(\frac{a_1 a_3}{a_2^2}\right) - 1} + \frac{1}{2} \left[1 + \operatorname{erf}\left(\frac{x - a_1}{\sqrt{2} a_2}\right)\right]}, \quad (11)$$

kde a_0 je plocha píku, a_1 je střed píku, a_2 je standardní odchylka Gaussova rozdělení a a_3 reprezentuje zkřivení píku. Dále x představuje čas nebo vzdálenost a jednotky jednotlivých parametrů a jsou konzistentní s jednotkou x .⁽⁶⁾ Zkratka $\operatorname{erf}()$ představuje chybovou funkci danou předpisem:

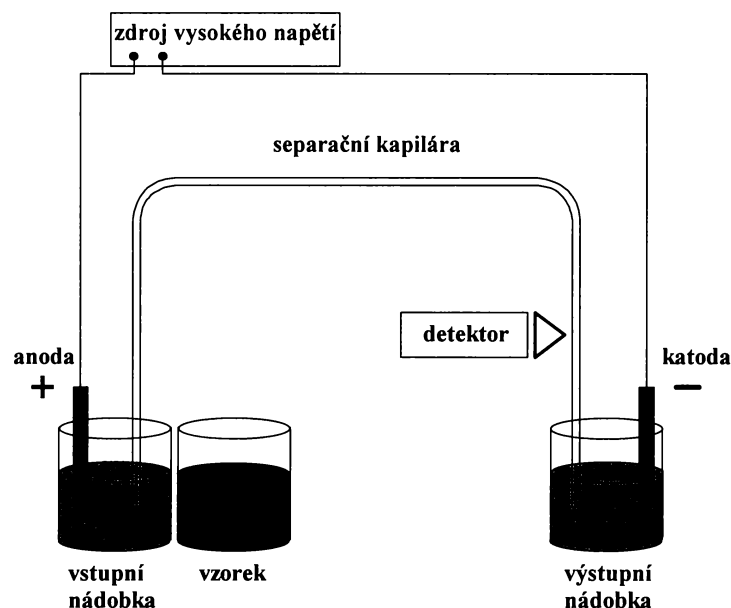
$$\operatorname{erf}(z) = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_0^z e^{-t^2} dt. \quad (12)$$

Parametr a_1 je tedy hledanou hodnotou pro výpočet pohyblivosti analytu.

Základní princip a uspořádání CZE^(2, 3, 9)

Základní uspořádání přístroje pro kapilární zónovou elektroforézu je znázorněno na Obr. 2. Toto uspořádání může být využito i pro ostatní techniky kapilární elektroforézy. Analýza probíhá v tenkých křemenných kapilárách (vnitřní průměr ID = 25–100 μm) o délce většinou 30 - 80 cm. Vnější povrch kapiláry je obalen vrstvičkou polyimidu, který odstraňuje její křehkost. Separace v kapiláře umožňuje účinný odvod Joulova tepla, což dovoluje práci s vysokými intenzitami elektrického pole (desítky kV/m). Tím je dosaženo vysoké účinnosti a rychlosti separace. Zmenšení separačního prostoru je také základem vysoké citlivosti těchto metod.

Před započítím experimentu je nejprve vstupní nádobka (inlet vial), kapilára i výstupní nádobka (outlet vial) naplněna separačním elektrolytem (BGE, background electrolyte). Tímto bývá nejčastěji vhodný pufr. Poté se vstupní nádobka vymění za nádobku s roztokem vzorku a velmi krátký úsek vstupního konce kapiláry je jím naplněn.



Obr. 2 Schéma přístroje pro kapilární elektroforézu (překresleno podle ⁽³⁾).

Dávkování lze realizovat dvěma způsoby. Při hydrodynamickém dávkování je roztok vzorku do kapiláry natlačen vytvořením přetlaku na hladinu v nádobce se vzorkem. Méně často používaným způsobem je dávkování elektrokinetické. Na elektrody je vloženo dávkovací napětí a vlivem elektroosmózy vzorek napuťuje do kapiláry. Po nadávkování vzorku je kapilára opět vnořena do nádoby s pufrem a k systému je připojen zdroj stejnosměrného napětí. Celá zóna vzorku je unášena elektroosmotickým tokem, a to v nemodifikované křemenné kapiláře směrem ke katodě. Nabitě složky vzorku vyputují z nadávkované zóny a rozdělí se v důsledku rozdílných elektroforetických rychlostí. Rozdělené složky se poté pohybují v oddělených zónách konstantní rychlostí. Neutrální látky zůstávají po celou dobu trvání experimentu v nadávkované zóně a slouží k určení rychlosti elektroosmotického toku. Pohyb vzorku v kapiláře je sledován detektorem umístěným u výstupního konce kapiláry a napojeným na počítač, který zaznamenává průběh detekce – elektroferogram. Nejčastěji používaným detektorem je absorpční fotometrický detektor umožňující práci v ultrafialové (UV) a viditelné oblasti spektra (VIS). Pokud při zvolené vlnové délce detekce analyt absorbuje více než separační elektrolyt, na elektroferogramu se jeho přítomnost projeví jako kladný pík. V takovém případě mluvíme o přímé absorpční detekci. Pro analyty nedostatečně absorbující záření v UV – VIS oblasti spektra lze využít nepřímou fotometrickou detekci, kdy se jako základní elektrolyt zvolí pufr, který obsahuje výrazně absorbující složku. Průchod analytu detektorem se poté projeví jako negativní pík. Jinou používanou detekční technikou je vodivostní detekce. Tato je založena na měření změn elektrické vodivosti BGE v kapiláře -

nejčastěji bezkontaktním vodivostním detektorem⁽¹¹⁾. Elektroferogram poskytuje o analytu informaci jak kvalitativní (migrační čas píku), tak kvantitativní (plocha píku).

Systemové zóny a píky^(12, 13, 14)

Systemové píky jsou zaznamenány detektorem, ale nepřísluší žádnému separovanému analytu. Fakticky jsou rušivým jevem, doprovázejícím separaci v CZE. Jedná se o pohyblivé poruchy v původně jednotné koncentraci BGE, které byly způsobeny nadávkováním vzorku do kapiláry. Systemové píky jsou detekovány pouze za použití detekční metody, jejíž odezva je citlivá vůči jedné či více složkám BGE. Takovými metodami jsou typicky nepřímá UV – VIS nebo vodivostní detekce.

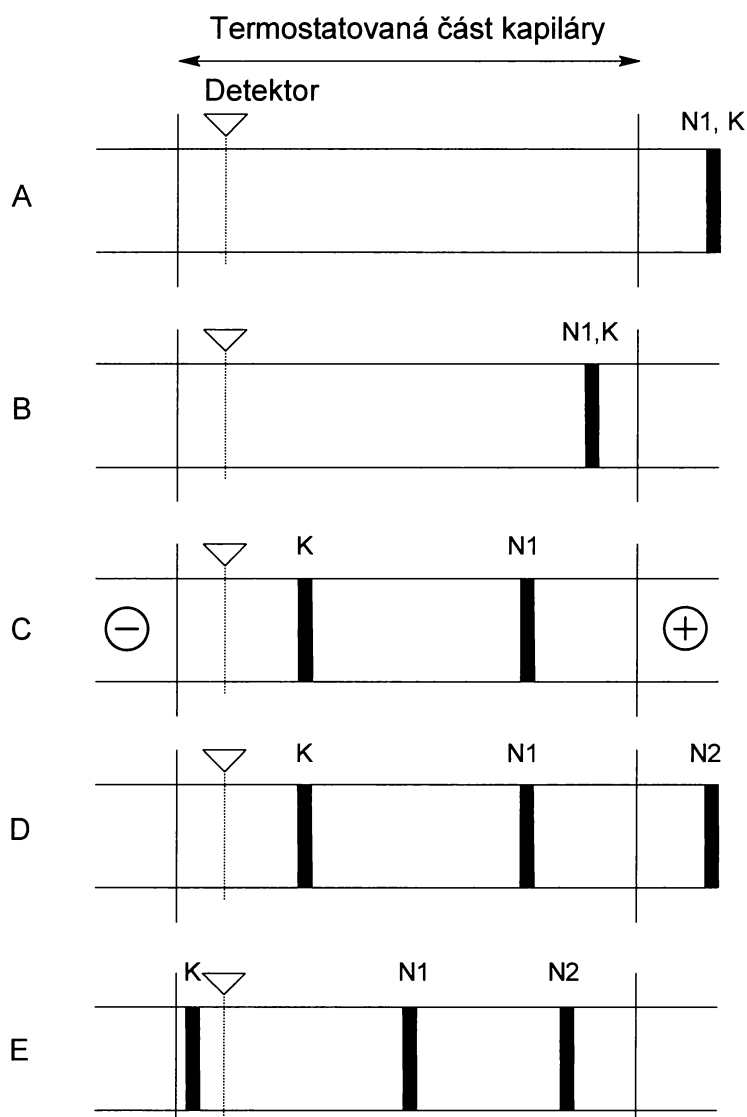
V práci Štědrého a kol.⁽¹⁵⁾ byl představen lineární model elektromigrace, založený na linearizovaných rovnicích zachování hmoty, acidobazických rovnováh a podmínky elektroneutality. Lineární model byl představen a zkoumán nejprve na systémech se silnými elektrolyty⁽⁸⁾, uni-univalentními slabými elektrolyty⁽¹⁶⁾ a později byla odstraněna veškerá omezení týkající se složení systému a valence jednotlivých složek⁽¹⁵⁾. Tento model umožňuje předpovědět existenci systemových zón, jejich mobilitu a další verze⁽¹⁷⁾ i amplitudy jim odpovídajících píků. Tento model spočívá ve výpočtu vlastních čísel určitých matic. Tato vlastní čísla mají rozměr elektroforetických mobilit a jsou nazývány systemové eigenmobility (vlastní číslo = eigenvalue). Existence těchto systemových eigenmobilit naznačuje, že určité zóny – systemové zóny nebo systemové eigenzóny – se v separační kapiláře pohybují právě s těmito mobilitami. Počet systemových eigenzón je stejný jako počet konstituentů BGE, přičemž konstituent je definován jako kyselina, báze či amfolyt jakékoli valence a síly. Žádná z těchto systemových zón nemá pohyblivost rovnu nule. Za určitých podmínek jsou ale některé z nich nule blízké a dají se použít jako markery EOF⁽¹³⁾. Problém ovšem nastává, pokud se některá ze systemových zón pohybuje s pohyblivostí blízkou pohyblivosti analytu. Systemový pík potom může překrýt pík analytu a tím celou separaci zhatit. Systemové píky proto vnímáme spíše jako rušivé fenomény. Přesto se jich dá využít například pro elegantní a přesné stanovení kritické micelární koncentrace v micelárních systémech⁽¹²⁾. Podrobnější klasifikace systemových zón je uvedena například v přehledových článcích^(13, 14).

Linearizovaný model elektromigrace byl implementován do počítačového programu Peakmaster⁽¹⁸⁾, který je volně ke stažení na internetu⁽¹⁹⁾. Tento program umožňuje po zadání vstupních parametrů separace (koncentrace, limitní iontové mobility a disociační konstanty konstituentů BGE, dávkovaný vzorek a technické parametry separace) vypočítat například pH prostředí, efektivní pohyblivost analytu, elektromigrační disperzi, existenci a migrační časy

systemových zón včetně amplitud jim odpovídajících píků. Pro náročnější simulace dynamické separace byl vyvinut program Simul⁽²⁰⁾, umožňující například také simulace méně obvyklých modů CZE.

2.1.2 Tlakem zprostředkovaná kapilární elektroforéza (PreMCE)^(21,22)

Byla vyvinuta metoda, která odstraňuje některé obtíže elektroforéze vlastní. Především se jedná o určování elektroforetické mobility za kolísavého EOF a separaci v netermostatované části kapiláry. Tato metoda navíc umožňuje měřit nízké elektroforetické mobility i za velice nízkého EOF rychle a reprodukovatelně. V normálním módu takové experimenty mohou trvat i několik hodin. Kationty a anionty můžeme měřit v rámci jednoho experimentu a to bez ohledu na směr a velikost EOF. Přesné určení elektroforetických mobilit touto metodou je



Obr. 3 Pořadí kroků při použití metody PreMCE k určení mobility kationtu (překresleno podle ⁽²¹⁾).

závislé na konstantní aplikaci tlaku na kapiláru, což komerční přístroje v omezené míře umožňují.

Na Obr. 3 je znázorněn postup při určování elektroforetické mobility kationtu touto metodou. Jako první krok (A) se do kapiláry naplněné BGE nadávkuje dávkovacím tlakem vzorek, který obsahuje analyt a neutrální marker rozpuštěný v BGE. Poté, v kroku B, je zóna se vzorkem natlačena konstantním tlakem p_t do termostatované části kapiláry. Během kroku C je aplikováno napětí U po dobu t_{migr} . V tomto kroku dochází k samotné migraci. Neutrální marker se pohybuje v nadávkované zóně s mobilitou elektroosmotického toku směrem ke katodě (v případě kationického EOF). Kation vzorku vyputuje z nadávkované zóny a pohybuje se směrem ke katodě s kombinací své efektivní mobility a mobility EOF. Po vypnutí naprogramovaného napětí je v kroku D nadávkována zóna neutrálního markeru rozpuštěného v BGE. A nakonec, během kroku E, je veškerý objem kapiláry protlačen přes detektor konstantním tlakem p_t

Rychlost hydrodynamického toku v_h , kterou je celý obsah kapiláry v konečném kroku protlačen přes detektor lze vypočítat dle vztahu:

$$v_h = \frac{l_c}{t_{N2} + t_{inj}/2 - t_d}, \quad (13)$$

kde t_{N2} je čas, který uplynul mezi počátkem aplikace tlaku p_t ve finálním kroku a časem, kdy druhý marker prošel přes detektor, $t_{inj}/2$ koriguje časové nadávkování markeru a t_d je časová korekce zdržení mezi začátkem aplikace tlaku a startem zápisu. Tyto dvě korekce jsou zanedbatelné při dostatečně dlouhém čase t_{N2} . Ve třetím kroku došlo k separaci analytu a markeru. Jejich vzájemná vzdálenost v kapiláře, l_k , vyplývá ze vztahu:

$$l_k = (t_{N1} - t_k)v_h, \quad (14)$$

kde t_{N1} je detekční čas prvního markeru a t_k je detekční čas analyzovaného kationtu. Potom efektivní elektroforetickou mobilitu kationtu můžeme spočítat jako

$$\mu_{eff}^k = \frac{l_k l_c}{U(t_{migr} - t_{ramp-up}/2 - t_{ramp-down}/2)}. \quad (15)$$

Časové korekce $t_{ramp-up}$ a $t_{ramp-down}$ představují čas, kdy napětí lineárně rostlo (klesalo) z nuly na naprogramovanou hodnotu.

Obrázek i rovnice byly uvedeny pro analyt kation, pro anion platí všechny vztahy analogicky.

Bylo ukázáno, že rychlost hydrodynamického toku v_h během experimentu nijak významně nekolísá, přestože aplikovaný tlak na komerčních aparaturách konstantní nikdy být nemůže, už jenom kvůli principu aplikace tlaku.

2.1.3 Vliv iontové síly BGE na elektroforetickou mobilitu analytu

Kapilární zónová elektroforéza se v posledních desítkách let stala uznávanou a hojně využívanou metodou. V souvislosti s optimalizací experimentálních podmínek byl studován vliv pH separačního elektrolytu na elektroforetickou pohyblivost slabých kyselin a zásad, vliv vodivosti BGE na vznik Joulova tepla a tyto efekty byly dobře vysvětleny. Dokonce byly vyvinuty matematické modely umožňující výpočet elektromigrační disperze a existence systémových píků (viz výše). Byl popsán vliv iontové síly na účinnost a míru relativního rozlišení separace⁽²³⁾. Na druhou stranu právě vliv iontové síly BGE na mobilitu analytu je zatím zpracován nedostatečně. Tomuto studiu chybí obecná zastřešující teorie. Výzkum v posledních letech se soustředil spíše na odvození empirických vztahů pro konkrétní skupinu analytů a konkrétní BGE⁽²⁴⁾. Přitom právě tato závislost nám výrazně chybí při snaze předpovídat hodnoty elektroforetické mobility a korektně simulovat elektromigrační procesy.

Onsagerův limitní zákon^(25, 26)

Onsagerův limitní zákon byl odvozen jako analogie k Debyeově – Hückelově teorii výpočtu aktivitních koeficientů iontů. Onsagerův limitní zákon pro elektroforetickou pohyblivost aniontu lze psát ve tvaru:

$$\mu_- = \mu_{0,-} - \left(\mu_{0,-} B_1 z_+ |z_-| \frac{q}{1 + \sqrt{q}} + |z_-| B_2 \right) \sqrt{I}, \quad (16)$$

kde μ_- je aktuální iontová mobilita aniontu a $\mu_{0,-}$ je limitní mobilita aniontu, z_+ a z_- jsou nábojová čísla aniontu a jeho protiiontu, I je iontová síla. Konstanty B_1 a B_2 jsou definovány pomocí vztahů:

$$B_1 = \frac{\sqrt{2}F^3}{12\pi N_A (\epsilon RT)^{\frac{3}{2}}}, \quad (17)$$

$$B_2 = \frac{\sqrt{2}F^2}{6\pi N_A \eta (\epsilon RT)^{\frac{1}{2}}}, \quad (18)$$

kde F je Faradayova konstanta, N_A je Avogadrova konstanta, ϵ je permitivita prostředí a η dynamický viskozitní koeficient prostředí, R je univerzální plynová konstanta a T je termodynamická teplota. Parametr q je dán výrazem:

$$q = \frac{z_+ |z_-|}{z_+ + |z_-|} \frac{\mu_{0,+} + \mu_{0,-}}{|z_-| \mu_{0,+} + z_+ \mu_{0,-}}. \quad (19)$$

Iontová síla je definována jednoduchým vztahem:

$$I = \frac{1}{2} \sum_i c_i z_i^2, \quad (20)$$

ve kterém c_i je koncentrace a z_i je nábojové číslo i -tého iontu v roztoku.

Podle Onsagerova limitního zákona je aktuální mobilita lineární funkcí druhé odmocniny iontové síly BGE.

Rozšířený Onsagerův model^(25, 26)

Onsagerův limitní vztah je platný do maximální iontové síly $1 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Ve vyšších koncentracích je už ale třeba počítat s konečnou velikostí iontů. Analogicky k zakomponování tohoto parametru do Debyeova – Hückelova zákona dostáváme rozšířený Onsagerův model:

$$\mu_- = \mu_{0,-} - \left(\mu_{0,-} B_1 z_+ |z_-| \frac{q}{1 + \sqrt{q}} + |z_-| B_2 \right) \frac{\sqrt{I}}{1 + Ba\sqrt{I}}, \quad (21)$$

kde a je parametr velikosti iontu, daný jako nejkratší vzdálenost středu iontu a středu jeho protiiontu. Konstanta B je dána vztahem:

$$B = \frac{\sqrt{2}F}{(\epsilon RT)^{1/2}}. \quad (22)$$

Ostatní symboly jsou stejné jako v rovnicích (17) až (20). Konstanty B_1 , B_2 a B nabývají pro vodné roztoky při 25°C následujících hodnot: $B_1 = 0,7853 \text{ dm}^{3/2} \text{ mol}^{-1/2}$, $B_2 = 31,38 \cdot 10^{-9} \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ dm}^{-3/2} \text{ mol}^{-1/2}$, $B = 3,287 \cdot 10^9 \text{ m}^{-1} \text{ dm}^{3/2} \text{ mol}^{-1/2}$.

V této aproximaci parametr iontové velikosti a charakterizuje sférický ion o vysoké povrchové hustotě náboje. V CZE ale velmi často pracujeme s nesymetrickými organickými molekulami o nízké povrchové hustotě náboje.

K analogickému vztahu jako je rozšířený Onsagerův zákon dospěli Lucy a kol.⁽²⁶⁾ s využitím Pittova vztahu odvozeného též z rozšířeného Debyeova-Hückelova zákona. Strukturně analogický vztah využívali Survay a kol.⁽²⁷⁾ pro popsání závislosti mobility univalentních oligopeptidů na iontové síle prostředí. Z jeho výsledků se dá usuzovat, že tento přístup bude aplikovatelný i pro další systémy s univalentními analyty. Obecně je ale zatím možno konstatovat, zvláště pro určování limitní iontové mobility, že obdržené hodnoty významně závisejí na modelu, který k výpočtu použijeme. Při použití Onsagerova rozšířeného modelu, rovnice (21), hraje významnou roli přístup, jakým určíme hodnotu Ba .

Onsagerův model byl vyvinut pro popis závislosti elektrické vodivosti silného binárního elektrolytu (jeden kation a jeden anion) na jeho koncentraci. V CZE ale často analyty migrují prostředím, které obsahuje více iontových konstituentů. Při aproximaci podle Onsagerova modelu počítáme pouze s protiiontem analytu obsaženým v BGE. Mnohem složitější aproximace zahrnující směs vícevalentních iontů byla vypracována Onsagerem a Fuosseem. Tento model byl zakomponován Jarošem a kol.⁽²⁸⁾ do počítačové simulace elektroforézy v programu Peakmaster.

Empirické vztahy^(24, 27)

Bylo ukázáno, že závislost experimentálně určené aktuální iontové mobility na iontové síle prostředí mnohdy vykazuje odchylky od klasické Onsagerovy teorie. Analyty v CZE totiž bývají velice často asymetrické organické molekuly s nízkou povrchovou hustotou náboje. Především z těchto důvodů se Friedl a kol.⁽²⁴⁾ rozhodli empiricky odvodit vztah pro efekt iontové síly na mobilitu.

První takový empirický vztah pro mobilitu vztaženou k limitní pohyblivosti μ_0 byl:

$$\mu = \mu_0 \exp(-0,5z^{1,78} \sqrt{I}), \quad (23)$$

kde z je absolutní hodnota nábojového čísla analytu a I je iontová síla prostředí. Tento empirický vztah byl omezen na analyty o nábojových číslech 1 až 3 a iontovou silou prostředí do $0,01 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$.

Pro další výzkum byly za analyty pro jednoduchost zvoleny silné kyseliny s nábojovými čísly v rozmezí 1-6. Jako BGE byl zvolen pufr složený z kyseliny octové a sodných iontů o různých koncentracích ($\text{pH} = 4,75$). Pro odvozování empirického vztahu se vycházelo z rovnice o třech parametrech:

$$\mu = \mu_0 \exp(-az^b I^c), \quad (24)$$

kde a, b a c jsou parametry. Pro další odvozování nebyla uvažována data naměřená pro univalentní analyt. Tato data totiž vykazovala odlišné chování, které se nepodařilo uspokojivě vysvětlit. Celková rovnice, platná pro iontové síly v rozmezí $0,001$ až $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a nábojová čísla od 2 do 6, dostává potom následující tvar:

$$\mu = \mu_0 \exp(-0,85z^{0,49} I^{0,52}). \quad (25)$$

Vzhledem k tomu, že oba parametry b i c byly velice blízké 0,5, byl odvozen a preferován zjednodušený vztah:

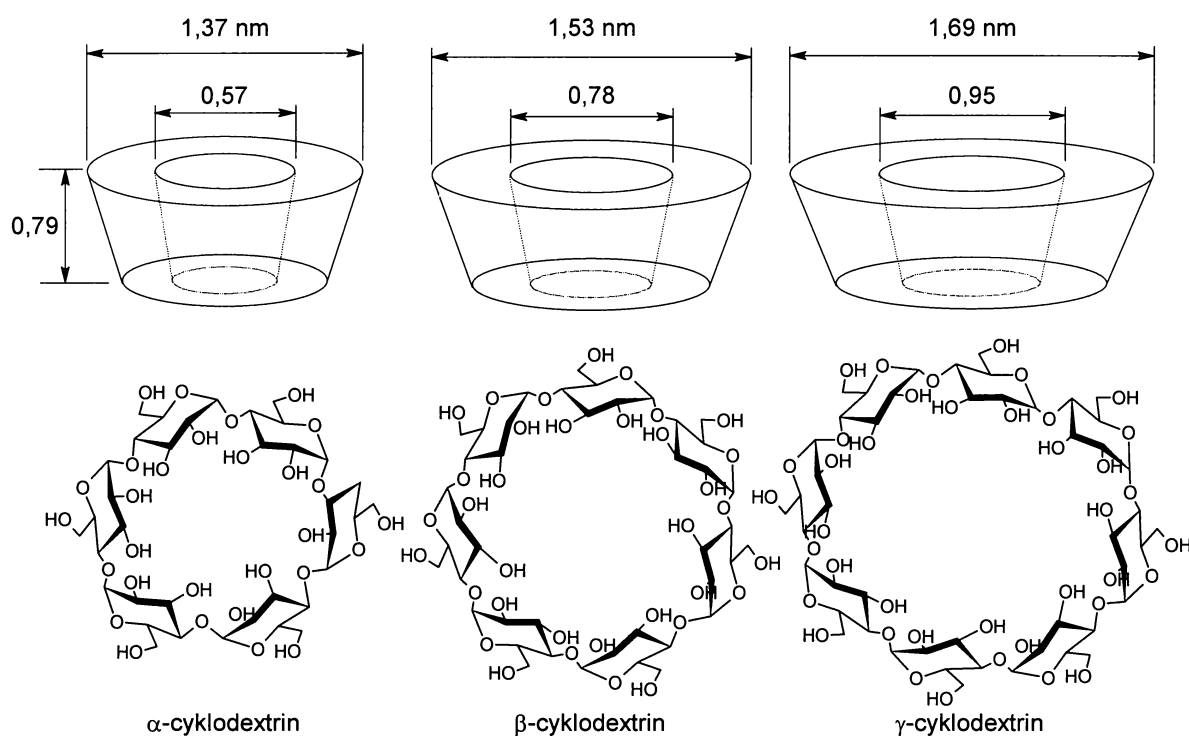
$$\mu = \mu_0 \exp(-0,77\sqrt{zI}). \quad (26)$$

Pro daný systém analytů a BGE poskytoval odvozený empirický vztah excelentní výsledky. Platnost modelu byla prověřována výpočtem mobility při určité iontové síle pomocí experimentálně získané hodnoty mobility při jiné iontové síle. Výborné shody bylo dosaženo, pokud mobilita byla vypočítána pomocí hodnoty při 2-5 krát nižší iontové síle. Navzdory excelentním výsledkům tohoto empirického vztahu lze pouze těžko očekávat jeho spolehlivost pro systémy jiných analytů či pufrů.

2.2 Cyklodextriny

2.2.1 Struktura a vlastnosti cyklodextrinů^(29, 30, 31)

Cyklodextriny patří do skupiny cyklických oligosacharidů, složených z šesti až patnácti jednotek glukózy. Objeveny byly roku 1891 Francouzem Villiersem, poprvé byl proces jejich přípravy a izolace detailně popsán v roce 1903 Schardingerem (někdy jsou také cyklodextriny nazývány Schardingerovy dextriny). V průběhu výroby je škrob enzymaticky degradován. Příslušné enzymy nepůsobí selektivně, produkt tedy obsahuje směs cyklodextrinů. Cyklodextriny obsahující šest, sedm, osm, popřípadě devět glukózových jednotek jsou nazývány α -, β -, γ -, a δ -cyklodextriny. Cyklodextriny obsahující méně než šest glukózových jednotek nejsou známy, takové cyklické struktury by vykazovaly příliš vysoké sterické napětí.



Obr. 4 Molekulární rozměry a struktura α -, β - a γ -cyklodextrinů (překresleno podle ⁽²⁹⁾).

Struktura α -, β -, a γ -cyklodextrinů je znázorněna na Obr. 4. Všechny glukóзовé jednotky jsou v klasické židličkové konformaci, vzájemně spojené α -1,4 vazbou. Tato struktura dává cyklodextrinům charakteristický tvar komolého kužele. Jeho širší část je tvořena sekundárními 2- a 3-hydroxylovými skupinami, užší část primárními 6-hydroxyly. Počet glukózových jednotek určuje rozměry dutiny (kavity) - viz Obr. 4. Dutina obsahuje asymetrické uhlíky, tvoří tedy asymetrické centrum. Vnitřní část kavity je hydrofobní, zato vnější povrch kužele je hydrofilní. V molekule cyklodextrinu je formován kruh

intramolekulových vodíkových vazeb mezi 2- a 3-hydroxylovými skupinami sousedních glukózových jednotek. Tento řetězec vodíkových můstků dává cyklodextrinům poměrně pevnou strukturu.

Následkem výše popsané vnitřní struktury vykazují cyklodextriny zajímavé chemicko-fyzikální vlastnosti. Některé z nich jsou shrnuty v Tabulce I.

Tabulka I Některé fyzikálně-chemické vlastnosti cyklodextrinů.

Charakteristika	α	β	γ
počet glukózových jednotek ⁽²⁹⁾	6	7	8
relativní molekulová hmotnost ⁽²⁹⁾	972	1135	1297
průměr kavity [Å] ⁽²⁹⁾	4,7 – 5,3	6,0 - 6,5	7,5 - 8,3
výška kavity [Å] ⁽²⁹⁾	7,9 ± 0,1	7,9 ± 0,1	7,9 ± 0,1
pK _a ⁽²⁹⁾	12,33	12,2	12,08
rozpustnost ve vodě [g/100 ml] ⁽²⁹⁾	14,5	1,85	23,2
specifická otáčivost α_D [°] ⁽³¹⁾	150,5±0,5	162,5±0,5	177,4±0,5
normální teplota tání [K] ⁽³¹⁾	551	572	540
počet molekul vody pohlčených kavitou ⁽³¹⁾	6	11	17

Cyklodextriny jsou stabilní v alkalickém prostředí, avšak podléhají kyselé hydrolyze. Částečnou kyselou hydrolyzou cyklodextrinů dostaneme glukózu a acyklické oligomaltózy.

Nejvýznamnější vlastností cyklodextrinů je bezesporu jejich schopnost tvořit intermolekulární komplexy, v angličtině nazývané „host – guest“ komplexy. Cyklodextriny tvoří inkluzní komplexy s celou řadou látek organických i anorganických (iontové i neutrální povahy), včetně vzácných plynů. Na tvorbě komplexu se podílejí nekovalentní vazebné síly:

- van der Waalsovy a hydrofobní interakce mezi hydrofobní částí hostující molekuly a kavitou cyklodextrinu
- vodíkové vazby mezi polárními funkčními skupinami hostující molekuly (substrátu) a hydroxylovými skupinami na cyklodextrinu

Ke stabilizaci komplexu přispívá:

- uvolnění molekul rozpouštědla z kavity během procesu komplexace
- uvolnění sterickeho pnutí.

Role vodíkových vazeb není tedy jediným a určujícím faktorem; stabilní komplexy vznikají i s hostujícími molekulami jako je benzen, který vodíkové můstky tvořit nemůže.

Geometrické vlastnosti a polarita hostující molekuly a povaha rozpouštědla určují typ a sílu vazebných interakcí při tvorbě komplexu. Geometrie molekuly má snad na vznik komplexu větší vliv než její chemické vlastnosti. Pokud je hostující molekula příliš malá vůči kavitě

cyklodextrinu, dochází k tvorbě slabých nebo žádných interakcí. Naopak komplexace s molekulou, která je příliš veliká, možná sice je, ale komplex je tvořen pouze s částí molekuly a některými jejími funkčními skupinami.

Stabilita vzniklého inkluzního komplexu významně závisí na polaritě hostující molekuly v porovnání s polaritou rozpouštědla. Za předpokladu, že ke komplexaci dochází ve vodném prostředí, pouze substráty, které jsou méně polární nežli voda, mohou tvořit inkluzní komplex s cyklodextrinem. O komplexech vzniklých v organických rozpouštědlech lze obecně říci, že jsou vázány slabšími interakcemi než ve vodném prostředí.

Stabilita inkluzního komplexu dále silně závisí na teplotě. Obecně se dá říci, že stabilita komplexu klesá s rostoucí teplotou.

Cyklodextriny složené pouze z glukózových jednotek označujeme jako nativní. Nativní cyklodextriny mohou být chemicky modifikovány:

- a) substitucí vodíkových atomů na primárních či sekundárních hydroxylech
- b) substitucí jednoho či více primárních respektive sekundárních hydroxylů
- c) oxidací primárních hydroxylů
- d) štěpením jedné či více C₂-C₃ vazeb periodickou oxidací.

Chemickou modifikací jsou připravovány jak neutrální, tak nabitě cyklodextriny. Neutrální deriváty cyklodextrinů jsou vyráběny použitím methylových a hydroxypropylových skupin jako substituentů. Methylace zvyšuje hydrofobnost kavity. Mezi aniontové cyklodextriny patří karboxyalkylátové, sulfoalkylátové, sulfatované a fosforylované cyklodextriny. Naopak z kationtových derivátů se vyrábějí především amino- a ammoniové deriváty.

Chemickou modifikací cyklodextrinových molekul můžeme výrazně ovlivnit vlastnosti cyklodextrinu včetně schopnosti komplexace.

2.2.2 Využití cyklodextrinů

Tvorby inkluzních komplexů s cyklodextriny se v praxi často využívá, neboť komplexace s cyklodextrinem významnou měrou ovlivňuje určité vlastnosti substrátu – např. rozpustnost ve vodě, chemickou reaktivitu, hodnotu pK_a, difúzní koeficient, spektrální vlastnosti. Tato jedinečná vlastnost cyklodextrinů vede k jejich širokému využití v mnoha průmyslových oblastech. Využívány jsou jak v nativní, tak v substituované podobě.

Ve farmaceutickém prostředí jsou cyklodextriny využívány jako aditiva, která odstraňují negativní vlastnosti léčiv jako například jejich nízkou rozpustnost ve vodě (případně v kombinaci s tvorbou solí).⁽³²⁾ V potravinářském, kosmetickém a tabákovém průmyslu jsou cyklodextriny využívány ke stabilizaci chutí a vůní či k potlačení nepříjemných pachů a

odstranění mikrobiologické kontaminace.⁽²⁹⁾ Širokého uplatnění se cyklodextrinům dostalo v chemické analýze. Jsou využívány například ve spektrálních metodách. Vysoká elektronová hustota v kavitě cyklodextrinu může mobilizovat elektrony hostující molekuly a následkem toho dochází ke změně spektrálních vlastností jak hostující molekuly, tak cyklodextrinu.⁽²⁹⁾ V elektroanalytických metodách jsou cyklodextriny využívány jako chemické modifikátory elektrod, slouží jako efektivní i selektivní vazební činidla.⁽³¹⁾

Širokého uplatnění dosáhly cyklodextriny především v separačních metodách (chromatografické a elektroforetické metody). Jejich schopnost tvořit inkluzní komplexy a chiralita kavity jsou využívány k separaci enantiomerů, strukturních a geometrických izomerů.⁽²⁹⁾

V současné době je 85% všech chirálních CE separací pro biomedicínské účely realizováno užitím cyklodextrinů jako komplexačních činidel.⁽³⁴⁾ V přehledovém článku⁽³³⁾ je uvedena rekapitulace publikovaných hodnot konstant stability komplexů cyklodextrinu a aminokyselin, peptidů a jiných biomolekul za posledních deset let, určených CE metodami.

Pro CE separace jsou užívány cyklodextriny nativní i substituované, a to jak neutrální, tak nabitě. Neutrální cyklodextriny se používají pro separaci nabitých analytů. K separaci neutrálních analytů se v CE použít nedají. Cyklodextriny nesoucí náboj se v elektrickém poli pohybují s vlastní nenulovou mobilitou. Hodí se k separaci jak neutrálních, tak nabitých analytů.

Nativní cyklodextriny jsou užívány ve 32% a jejich deriváty v 68% separací. Poměr množství používaných neutrálních derivátů náhodně substituovaných (není u nich známo kolik substituentů a v jakých polohách je navázáno) a selektivně substituovaných je zhruba 1:1. V případě nabitých cyklodextrinů je až 83% použitých derivátů substituováno náhodně.⁽³⁴⁾ Přitom přesná charakterizace derivátů je důležitým faktorem chirálních separací. Rozpoznávací schopnosti cyklodextrinů jsou závislé na poloze a charakteristice substituentů. Například bylo ukázáno, že enantiometrické rozlišení racemické směsi tramadolu je silně závislé na použití konkrétního typu cyklodextrinu.⁽³⁵⁾ Byl také představen model závislosti chirální selektivity na pH prostředí a koncentraci cyklodextrinu.⁽³⁶⁾

Ve prospěch dalšího využívání cyklodextrinů hovoří jejich komerční dostupnost (jsou vyráběny z obnovitelných zdrojů), nízká toxicita a biologická degradabilita.

3 Experimentální část

Záměrem experimentální části této práce bylo proměřit závislosti aktuální elektroforetické mobility dvou nabitých cyklodextrinů na iontové síle BGE.

3.1 Použité chemikálie a přístroje

Analyty byly modifikované β -cyklodextriny:

- a) heptakis-6-O-sulfo-cyklomalto-heptaose heptasodná sůl (HS), sedmimocný aniontový cyklodextrin,⁽³⁷⁾
- b) mono-6-deoxy-6-N,N,N',N',N'-pentamethylethylenediammonio-cyklomaltoheptaose dichlorid (PEMEDA), dvojmocný kationtový cyklodextrin.⁽³⁸⁾

Oba tyto cyklodextriny nám daroval prof. G. Vigh, Texas A&M University, USA.

Jako základní elektrolyty sloužily formiátový a acetátový pufr. K jejich přípravě byla použita kyselina mravenčí HCOOH (Lach-Ner s.r.o., ČR), kyselina octová CH₃COOH (Penta, ČR) a monohydrát hydroxidu lithného LiOH·H₂O (Fluka, Německo). K určení pohyblivosti EOF sloužily dimethylsulfoxid DMSO (Sigma-Aldrich, Německo) a nitromethan (Fluka, Německo). Všechny tyto chemikálie byly čistoty p.a., k přípravě roztoků byla použita deionizovaná voda. K proplachování kapiláry byl používán 0,1 M roztok NaOH (Agilent Technologies, Německo).

Elektroforetické experimenty byly provedeny na ^{3D}CE systému pro kapilární elektroforézu (Agilent Technologies, Německo), který je vybaven vestavěným spektrofotometrickým UV/VIS detektorem s diodovým polem (DAD), umožňujícím měření v rozsahu vlnových délek 190 – 600 nm, a dvojitým vodivostním detektorem⁽³⁹⁾ (CCD, contactless conductivity detektor). Součástí aparatury je počítač s nainstalovaným programem Agilent Capillary Electrophoresis, pomocí kterého je řízena aparatura, prováděn sběr a vyhodnocování dat. Experimenty probíhaly v křemenné kapiláře s vnějším průměrem 375 μ m a s vnitřním průměrem 50 μ m (Composite metal services LTD, Velká Británie) o celkové délce 49,05 cm. Vzdálenost vstupního konce kapiláry k první vodivostní cele činila 33,95 cm a k DAD 40,55 cm.

Digitálním pH-metrem PHM 220 s kombinovanou skleněnou elektrodou (Radiometer, Dánsko) bylo měřeno pH pufrů.

K analýze experimentálních dat byl využíván program Origin 8 (OriginLab, USA).

3.2 Experimentální podmínky a postupy

Oba stanovované cyklodextriny byly modifikovány silnými funkčními skupinami, jejich elektroforetická pohyblivost by tedy neměla záviset na hodnotě pH separačního elektrolytu. Byly tedy zvoleny separační pufrů, ve kterých byly prováděny experimenty pro stanovení jejich konstant stability.⁽⁴⁰⁾ Pro všechny proměřované iontové síly (0,266-100 mmol*dm⁻³) složení pufrů odpovídalo maximální pufráční kapacitě, tedy poměr koncentrace kyseliny a její soli byl 1:1, iontová síla pufru byla vždy dopočítána v programu PeakMaster.

Velká pozornost byla věnována přípravě vzorků. Cyklodextriny neabsorbují v UV-VIS oblasti záření, k jejich detekci je tedy třeba použít vodivostní detektor. Vzhledem k tomu, že se jedná o univerzální detektor s vysokou citlivostí, jsou pořízené elektroferogramy méně přehledné. Jsou na nich mimo jiné zaznamenány také systémové píky. Pro odlišení systémových píků od píků analytu bylo tedy nutné připravovat roztoky dávkovaných vzorků tak, aby změna koncentrace složek pufru ve vzorku oproti koncentraci složek pufru v BGE byla vždy stejná, a to i při měnící se koncentraci stanovovaného analytu ve vzorku. K těmto účelům byly připraveny zásobní roztoky obou cyklodextrinů o koncentraci 20 mmol*dm⁻³. Vzorek byl pak připravován vždy smísením 510 μl pufru, 30 μl roztoku příslušného markeru EOF a vhodným množstvím zásobního roztoku cyklodextrinu doplněného vodou do 60 μl, tak aby byl pík cyklodextrinu v BGE o konkrétní iontové síle rozlišitelný na elektroferogramu a zároveň byl co nejužší.

Pro oba stanovované cyklodextriny byly experimenty prováděny metodou PreMCE. Z tohoto důvodu bylo třeba připravit také roztok markeru v separačním elektrolytu. Roztok markeru byl připravován stejně jako roztok vzorku, pouze místo zásobního roztoku cyklodextrinu byla použita deionizovaná voda. Roztok markeru byl tedy připraven smísením 510 μl separačního elektrolytu, 30 μl roztoku příslušného markeru EOF a 60 μl vody.

Při iontových silách BGE 20 a 100 mmol*dm⁻³ byla proměřena závislost proudu procházejícího kapilárou na vloženém napětí. Nejvyšší hodnota vloženého napětí, pro kterou je tato závislost ještě lineární, byla stanovena jako nejvyšší možné pracovní napětí. Porušení linearitě této závislosti je způsobeno vznikem příliš velkého Joulova tepla.

Dávkování bylo zvoleno hydrodynamické a činilo zprvu potíže. Při mnoha experimentech se vzorek vůbec nenadávkoval, nebo nadávkované množství neodpovídalo aplikovanému času a tlaku. Relativně reprodukovatelného dávkování bylo dosaženo při dávkování tlakem 10 mbar po dobu 10 sekund.

Kapilára byla před prvním použitím aktivována propláchnutím 0,1 M roztokem NaOH. Pro stabilizaci elektroosmotického toku bylo na kapiláru naplněnou separačním pufrem aplikováno po dobu 20 minut napětí 20 kV.

Detekční časy analytů a detekční čas prvního markeru (marker dávkovaný společně s analytem) byly odečítány na záznamu z vodivostního detektoru. Detekční čas druhého markeru (samostatně dávkovaný marker - viz krok D na Obr.3) byl odečítán na záznamu z DAD při vlnové délce 214 nm.

Pro každou iontovou sílu BGE byly získány alespoň tři vyhodnotitelné experimenty.

4 Výsledky a diskuse

4.1 Aniontový cyklodextrin - HS

4.1.1 Proměření závislosti pohyblivosti HS na iontové síle BGE

Cyklodextrin HS byl stanovován ve formiátovém pufru, jako marker EOF byl použit $5 \cdot 10^{-4}\%$ (obj.) roztok nitromethanu.

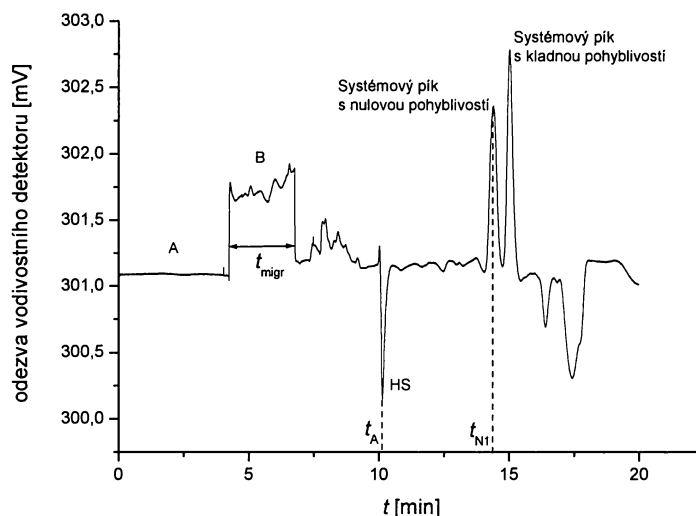
Byla provedena sada experimentů za účelem optimalizace parametrů metody PreMCE tak, aby rozdíl detekčních časů analytu a markeru EOF byl maximální. Hodnoty zvoleného napětí U a doby, po kterou bylo napětí aplikováno, t_{migr} , jsou shrnuty v Tabulce II.

Tabulka II Parametry metody PreMCE. Aplikovaný tlak na kapiláru, p_t , byl zvolen 30 mbar. Záporná hodnota napětí značí, že u výstupního konce kapiláry je kladný pól.

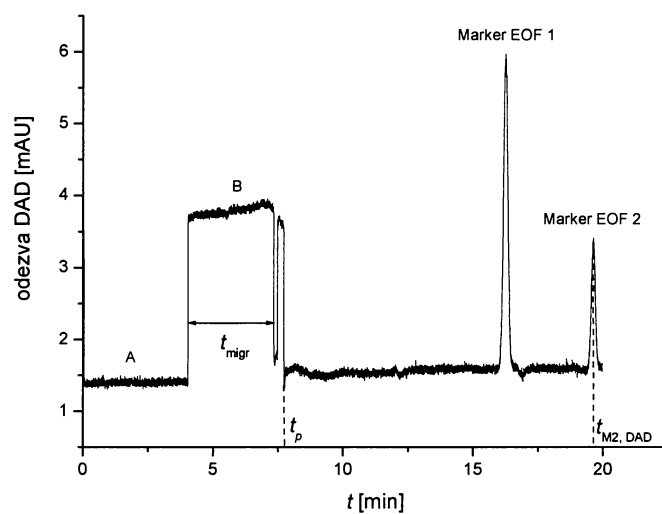
I_{BGE} [mmol*dm ⁻³]	U [V]	t_{migr} [min]
0,338 – 50,3	-10 000	2,5
60,3 - 100	-5 000	5

Poté byla provedena sada experimentů, jejichž cílem byla identifikace píku analytu a píku určujícího rychlost EOF na elektroferogramu. Pro formiátový pufr o iontové síle 20,2 mmol*dm⁻³ předpověděl program PeakMaster existenci pomalého systémového píku s kladnou pohyblivostí a systémového píku s nulovou pohyblivostí. Systémová zóna s nulovou pohyblivostí, stejně jako zóna obsahující nitromethan, se pohybuje k detektorům pouze rychlostí elektroosmotického toku. Vzhledem k tomu, že složky pufru při zvolené vlnové délce (214 nm) neabsorbují, budou systémové píky zaznamenány pouze vodivostním detektorem, pík nitromethanu naopak pouze na DAD. Porovnáním záznamu z CCD a DAD lze určit nulový systémový pík na vodivostním záznamu. K identifikaci systémového píku s kladnou pohyblivostí byla provedena série experimentů s proměnlivou dobou aplikovaného napětí. Zatímco nulový systémový pík stále s jistotou odpovídal píku markeru EOF na DAD, systémový pík s kladnou pohyblivostí putoval dál kapilárou. Pík analytu HS vykazoval na CCD zápornou amplitudu, což bylo vzhledem k jeho očekávané vysoké pohyblivosti překvapující. S jistotou byl pík HS identifikován pomocí série experimentů se vzorky o různé koncentraci HS.

Na Obr. 5 a Obr. 6 jsou ukázky elektroferogramů pro analyt HS při iontové síle BGE 20,2 mmol*dm⁻³.



Obr. 5 Elektroferogram pořízený první celou vodivostního detektoru. Oblast A odpovídá natlačení vzorku do termostátované části kapiláry tlakem p_b , oblast B odpovídá aplikovanému napětí.

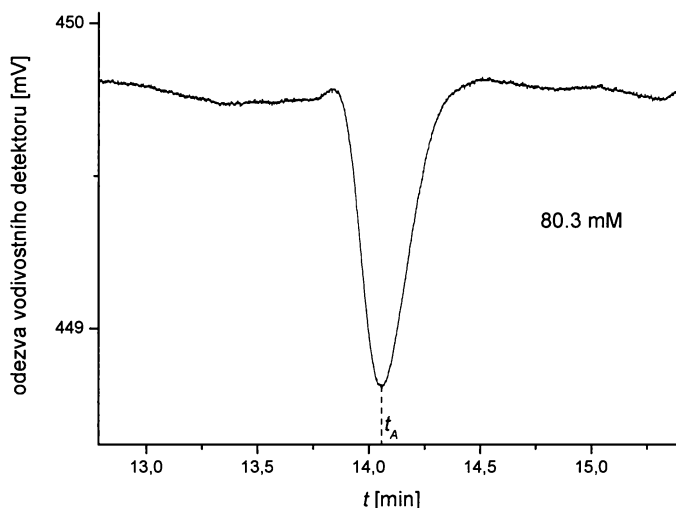


Obr. 6 Elektroferogram pořízený DAD. Oblast A odpovídá natlačení vzorku do termostátované části kapiláry tlakem p_b , oblast B odpovídá aplikovanému napětí.

K výpočtu aktuální pohyblivosti byl použit upravený vztah (15). Časové korekce $t_{inj}/2$ a t_d můžeme zanedbat (viz odstavec 2.1.2). Časové korekce $t_{ramp-up}$ a $t_{ramp-down}$ nebereme vůbec v úvahu, neboť postupný nárůst napětí nebyl při experimentech používán. Kombinací rovnic (13), (14), a (15) dostáváme konečný vztah pro výpočet aktuální pohyblivosti analytu:

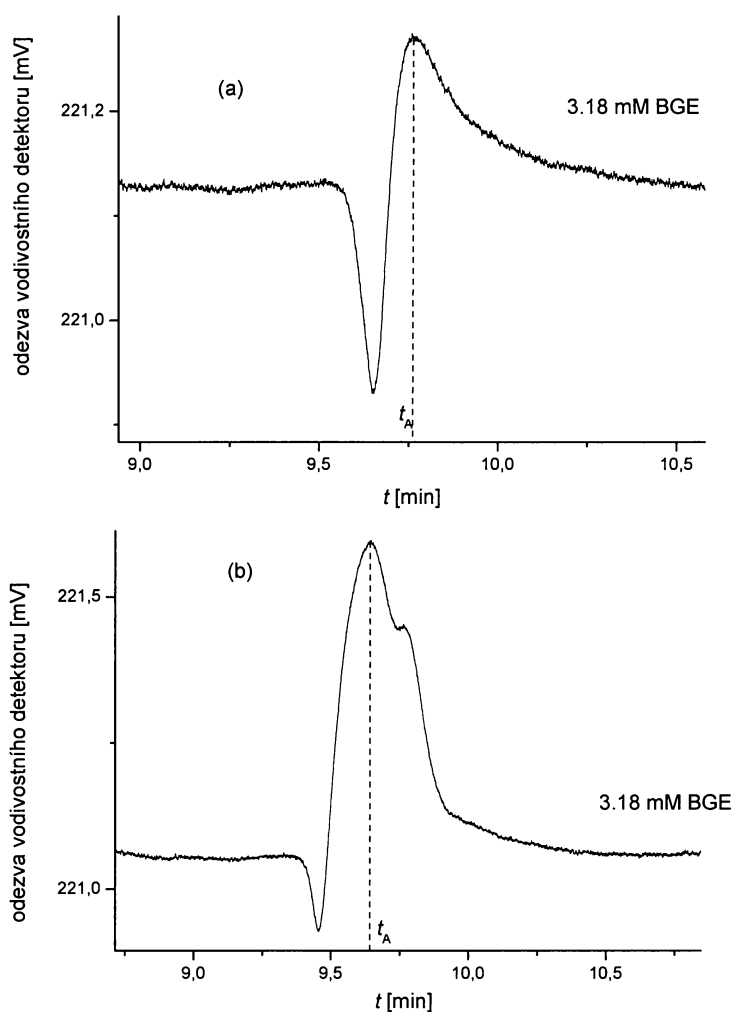
$$\mu_i = \frac{l_{C,DAD}(t_{N1} - t_A)}{Ut_{migr}(t_{M2,DAD} - t_p)}, \quad (27)$$

kde l_{DAD} je délka kapiláry od vstupního konce k DAD a t_A představuje detekční čas analytu. Cyklodextrin HS byl v oblasti iontových sil $5,19 - 100 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ na elektroferogramu reprezentován záporným píkem - viz Obr. 7. Detekční čas analytu z těchto experimentů byl odečítán z minima příslušného píku.

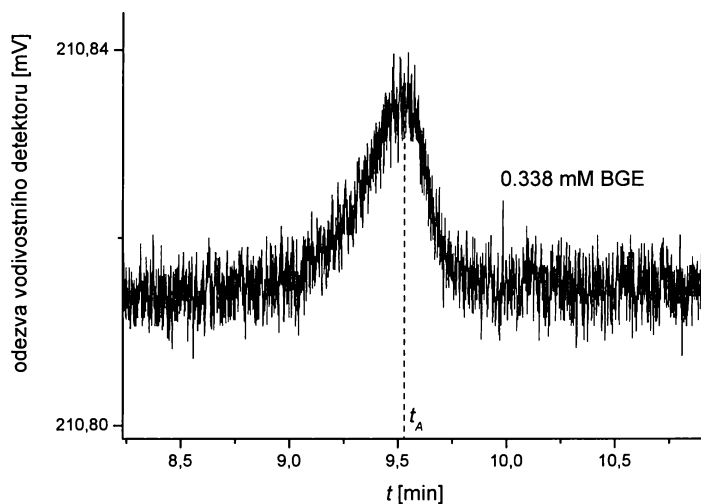


Obr. 7 Část elektroferogramu pro HS a iontovou sílu $80,3 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$.

Při iontových silách $0,616 - 3,18 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ BGE došlo ale k jeho rozštěpení na pík „zig-zag“. Pro iontovou sílu $3,18 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ byla provedena sada experimentů, při nichž byla měněna koncentrace analytu ve vzorku. Tvar píku se mírně měnil podle koncentrace analytu - viz Obr. 8. Získané píky byly integrovány. Hodnoty plochy pouze pro kladnou či zápornou část případně pro jejich součet byly porovnávány s plochou píku markeru EOF. Poměr koncentrací analytu a markeru ve vzorku byl konstantní. Poměr ploch píku analytu a markeru by tedy také měl být konstantní. Tomuto předpokladu nejvíce vyhovovala plocha celého „zig-zag“ píku. Z toho jsme usoudili, že cyklodextrin HS je s největší pravděpodobností reprezentován celým „zig-zag“ píkem. Za místo odečtu detekčního času analytu pro tyto experimenty bylo zvoleno maximum kladné části píku.



Obr. 8 Část elektroferogramu pro HS, iontovou sílu 3,18 mmol*dm⁻³ a různé koncentrace analytu ve vzorku. Při iontové síle BGE 0,338 mmol*dm⁻³ byl cyclodextrin na elektroferogramu reprezentován kladným píkem (Obr. 9). Detekční čas analytu pro tyto experimenty byl odečítán z maxima příslušného píku.



Obr. 9 Část elektroferogramu pro HS a iontovou sílu 0,338 mmol*dm⁻³.

Jak je vidět na Obr. 10 a Obr. 11, rozdílné způsoby odečtu detekčního času analytu se neprojeví žádnými výraznými skoky na proměřované závislosti.

V Tabulce III jsou shrnuty odečtené detekční časy a vypočítané aktuální pohyblivosti analytu HS. Pro lepší grafickou představu je dále zpracovávána absolutní hodnota pohyblivosti.

Tabulka III Tabulka naměřených detekčních časů a vypočítané aktuální pohyblivosti HS pro různou iontovou sílu BGE.

I_{BGE} [mmol*dm ⁻³]	t_A [min]	t_{NI} [min]	$t_{\text{M2,DAD}}$ [min]	t_p [min]	$ \mu $ [10 ⁻⁹ m ² V ⁻¹ s ⁻¹]
0,338	9,19	16,35	21,25	7,74	70,3
0,338	9,08	15,71	20,09	7,75	71,3
0,338	9,19	15,61	19,98	7,74	69,5
0,338	9,12	15,43	19,79	7,76	69,5
0,338	9,11	15,44	19,77	7,75	69,8
0,616	9,37	15,80	20,59	7,75	66,4
0,616	9,55	15,66	20,29	7,75	64,6
0,616	9,31	15,11	19,69	7,76	64,5
0,616	9,40	15,39	19,85	7,75	65,6
1,14	9,67	15,60	20,44	7,75	61,9
1,14	9,51	15,36	20,14	7,75	62,6
1,14	9,42	15,52	20,38	7,75	64,1
2,17	10,19	15,70	20,37	7,74	57,9
2,17	10,19	15,81	20,22	7,75	59,8
2,17	9,75	15,49	20,49	7,75	59,7
2,17	10,59	16,23	20,36	7,75	59,4
3,18	10,05	15,17	19,76	7,74	56,5
3,18	10,74	15,70	19,77	7,75	54,8
3,18	10,92	16,07	20,20	7,74	54,9
3,18	10,23	15,31	19,63	7,44	55,3
3,18	9,77	14,95	19,83	7,44	55,4
3,18	9,73	14,96	19,87	7,44	55,8
3,18	9,65	14,73	19,80	7,44	54,5
5,19	9,91	14,59	19,23	7,43	52,6
5,19	9,77	14,48	19,23	7,43	52,9
5,19	9,97	14,82	19,54	7,44	53,1
5,19	10,07	14,83	19,63	7,43	51,8
5,19	9,72	14,14	18,66	7,43	52,3

Tabulka III – pokračování.

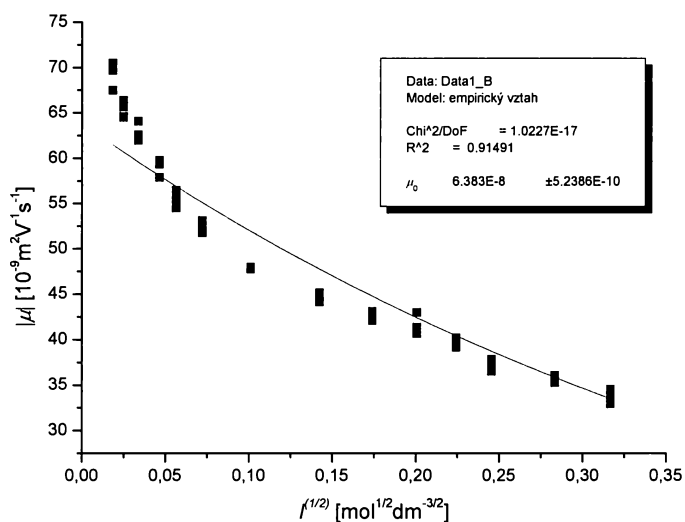
10,2	10,49	14,94	19,74	7,43	47,9
10,2	10,22	14,54	19,38	7,44	48,0
10,2	10,33	14,61	19,30	7,44	47,8
10,2	10,28	14,63	19,55	7,44	47,7
10,2	10,29	14,65	19,57	7,44	47,4
20,2	10,30	14,52	20,28	7,74	44,7
20,2	10,46	14,85	20,79	7,74	44,6
20,2	10,70	14,86	20,22	7,74	44,1
20,2	10,25	14,67	20,73	7,74	45,2
30,2	11,45	15,52	20,36	7,75	42,8
30,2	10,65	14,93	20,91	7,75	43,1
30,2	10,74	14,90	20,85	7,74	42,1
30,2	10,82	14,90	20,55	7,75	42,2
30,2	10,82	14,88	20,65	7,77	41,7
40,3	10,84	14,82	20,55	7,74	41,3
40,3	10,99	14,98	20,76	7,75	40,6
40,3	10,89	14,79	20,26	7,74	41,4
40,3	10,88	15,03	20,55	7,75	43,0
50,3	10,75	14,49	20,07	7,74	40,2
50,3	10,82	14,69	20,50	7,74	40,2
50,3	11,20	15,00	20,43	7,74	39,7
50,3	10,86	14,72	20,83	7,73	39,2
60,3	13,75	17,35	22,88	10,24	37,8
60,3	14,79	18,32	23,10	10,25	36,5
60,3	14,75	18,34	23,02	10,24	37,3
60,3	13,83	17,46	23,05	10,24	37,6
80,3	13,95	17,28	22,71	10,24	35,4
80,3	14,06	17,51	22,91	10,24	36,1
80,3	13,95	17,33	22,76	10,24	35,8
80,3	15,69	19,40	24,19	10,25	35,3
100	13,75	17,03	22,85	10,24	34,5
100	14,11	17,33	22,88	10,24	33,7
100	15,52	18,95	23,91	10,24	33,3
100	14,91	18,11	23,17	10,26	32,9

4.1.2 Regresní analýza experimentálních dat, stanovení limitní pohyblivosti

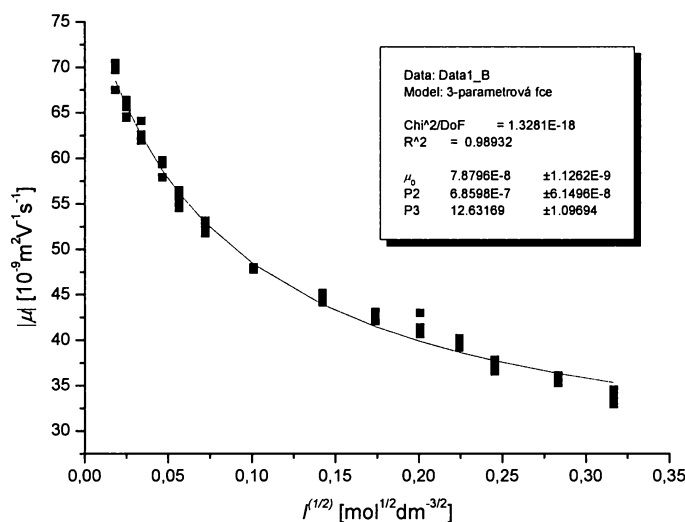
Limitní pohyblivost HS byla stanovena pomocí regrese podle empirické rovnice (26) a regrese podle rovnice se třemi parametry, vycházející z rozšířeného Onsagerova modelu (rov. (21)), která byla použita i v práci Lucy a kol.⁽²⁶⁾:

$$\mu = \mu_0 - \frac{P_1 \sqrt{I}}{1 + P_2 \sqrt{I}}, \quad (28)$$

Grafy závislostí odpovídající použitým regresním funkcím jsou na Obr. 10 a Obr. 11.



Obr. 10 Regrese podle empirického vztahu, rov. (26), pro analyt HS.



Obr. 11 Regrese podle rovnice se třemi parametry, rov. (28), pro analyt HS.

4.1.3 Diskuse

Jak je vidět na Obr. 10, modelování závislosti elektroforetické pohyblivosti HS pomocí empirického vztahu, rov. (26), není prakticky možné. To jenom potvrzuje naši domněnku, že empirický vztah, rov. (26), je použitelný pouze pro analyty a separační pufrů, pomocí nichž byl tento vztah odvozen.

Cyklodextrin HS je modifikován sedmi sulfátovými skupinami, které v roztoku plně disociují. Některé sulfátové skupiny však mohou být asociovány ionty Li^+ .⁽⁴¹⁾ Stupeň asociace závisí na iontové síle prostředí, s měnící se iontovou silou BGE lze tedy očekávat, že se mění náboj cyklodextrinu. Tento předpoklad by mohl být vysvětlením výrazného prohnutí křivky závislosti pohyblivosti na iontové síle BGE. Z tohoto důvodu by tedy nebylo rozumné použít k regresi rozšířený Onsagerův vztah, který byl odvozen pouze na základě tzv. elektroforetického a relaxačního efektu a závislost nábojového čísla na iontové síle nezohledňuje. Za vhodný regresní model lze tedy považovat rov. (28), ve které jsou parametry P1 a P2 pouze empirické hodnoty bez fyzikálního významu, třetí parametr vyjadřuje limitní pohyblivost. Hodnota limitní pohyblivosti cyklodextrinu HS získaná z 3-parametrové regresní funkce, rov. (28), je $79 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

4.2 Kationtový cyklodextrin - PEMEDA

4.2.1 Proměření závislosti pohyblivosti analytu PEMEDA na iontové síle BGE

Cyklodextrin PEMEDA byl stanovován v acetátovém pufru, jako marker EOF byl použit $5 \cdot 10^{-3}\%$ (obj.) roztok dimethylsulfoxidu.

Byla provedena sada experimentů za účelem optimalizace parametrů metody PreMCE a identifikace píků na vodivostním záznamu. Byly použity stejné experimentální postupy jako u analytu HS. Hodnoty zvoleného napětí U a doby, po kterou bylo napětí aplikováno, t_{migr} , jsou shrnuty v tabulce IV.

Tabulka IV Parametry metody PreMCE. Aplikovaný tlak na kapiláru, p_t , byl zvolen 30 mbar. Kladná hodnota napětí značí, že u výstupního konce kapiláry je záporný pól.

I_{BGE} [mmol*dm ⁻³]	U [V]	t_{migr} [min]
0,517	10 000	normální mód
1,02	10 000	4
2,02 - 100	10 000	6

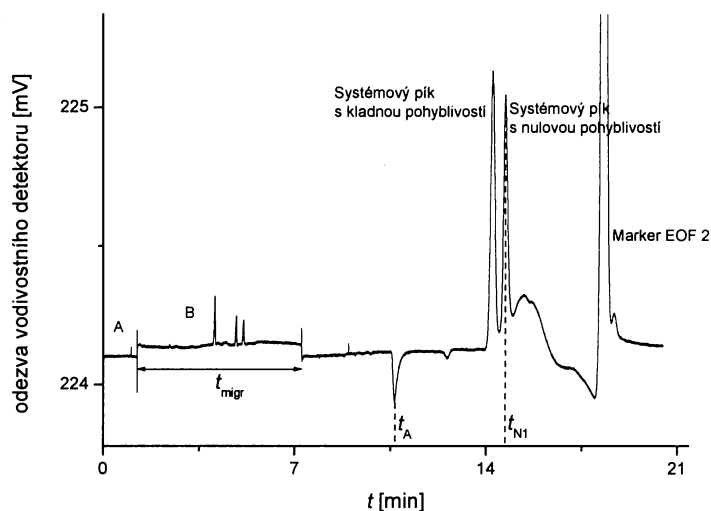
K výpočtu aktuální pohyblivosti byl použit stejný vztah jako u analytu HS, rov. (27). Při iontové síle $0,517 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ však došlo k překrytí píku cyklodextrinu a sytémového píku, což znemožnilo experiment jakkoli vyhodnotit. Vyhodnotitelný elektroferogram byl obdržen při této iontové síle provedením experimentu v normálním modu, aplikované napětí 10 000 V. Pro systém s iontovou silou BGE $0,266 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ nebylo možné získat ani jednou metodou vyhodnotitelný experiment.

Pro iontovou sílu BGE $0,517 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ (normální mód) byla aktuální pohyblivost analytu vypočítána podle vztahu:

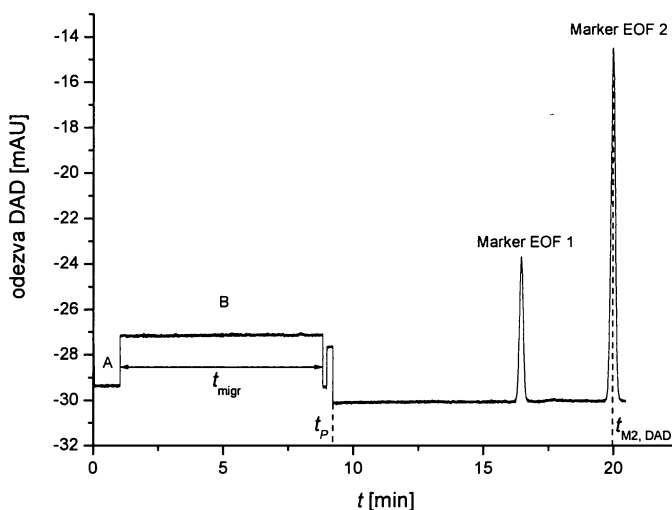
$$\mu_i = \frac{l_{CCDI}}{U} \left(\frac{1}{t_A} - \frac{1}{t_M} \right), \quad (29)$$

kde l_{CCDI} je délka kapiláry od vstupního otvoru k první cele vodivostního detektoru a t_M je detekční čas markeru EOF.

Na Obr. 12 a Obr. 13 jsou ukázky elektroferogramů pro analyt PEMEDA při iontové síle BGE 5,02 mmol*dm⁻³.



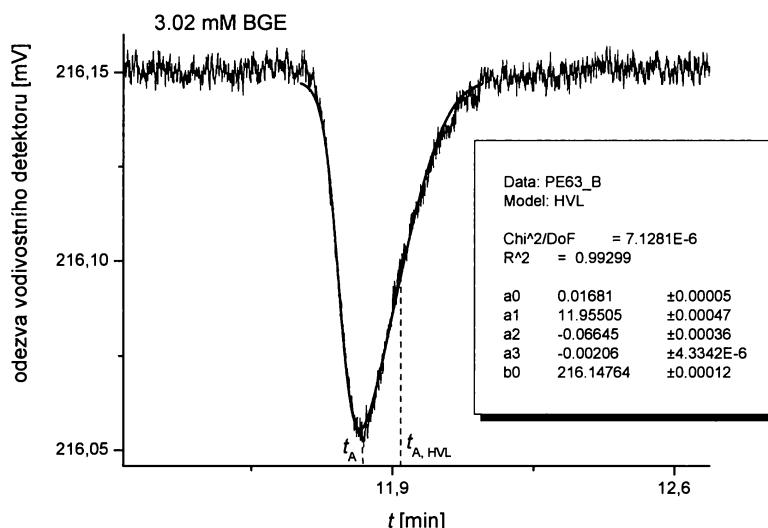
Obr. 12 Elektroferogram pořízený první celou vodivostního detektoru. Oblast A odpovídá natlačení vzorku do termostátované části kapiláry tlakem p_t , oblast B odpovídá aplikovanému napětí.



Obr. 13 Elektroferogram pořízený z DAD. Oblast A odpovídá natlačení vzorku do termostátované části kapiláry tlakem p_t , oblast B odpovídá aplikovanému napětí.

Cyklodextrin PEMEDA byl v celém rozsahu proměřovaných iontových sil BGE reprezentován na elektroferogramu záporným píkem. Pro iontové síly 0,502 – 40,0 mmol*dm⁻³ BGE byl pík výrazně deformován elektromigrační disperzí. Pro posouzení vlivu elektromigrační disperze byly pohyblivosti analytu vypočteny jednak z detekčních časů minima příslušného píku, jednak z času získaného proložením píku HVL funkcí (rov. (11)). Ukázka proložení deformovaného píku HVL funkcí je na Obr. 14. V rámečku na obrázku jsou

zobrazeny získané parametry funkce. Ke korekci byla použita HVL funkce s parametrem b_0 , který určuje hodnotu odezvy detektoru pro základní linii (baseline), klasická HVL funkce má tuto hodnotu rovnu nule. Pro iontové síly 0,502 a 1,02 mmol*dm⁻³ nebylo možné deformované píky korektně HVL funkcí proložit. Pro iontové síly BGE vyšší než 40 mmol*dm⁻³ byl pík analytu symetrický.



Obr. 14 Proložení píku HVL funkcí. Červená linka představuje HVL funkci, černá linka záznam vodivostního detektoru.

V Tabulce V jsou shrnuty odečtené detekční časy a vypočítané hodnoty aktuální pohyblivosti pro analyt PEMEDA, včetně údajů korigovaných HVL funkcí.

Tabulka V Tabulka naměřených detekčních časů a vypočítaných aktuálních pohyblivostí pro analyt PEMEDA, včetně údajů korigovaných HVL funkcí ($t_{A,HVL}$ dané parametrem a_1 v HVL funkci, μ_{HVL}).
xx – data nebylo možné korigovat HVL funkcí

I_{BGE} [mmol*dm ⁻³]	t_A [min]	$t_{A,HVL}$ [min]	t_{N1} [min]	$t_{M2,DAD}$ [min]	t_p [min]	μ [10 ⁻⁹ m ² V ⁻¹ s ⁻¹]	μ_{HVL} [10 ⁻⁹ m ² V ⁻¹ s ⁻¹]
0,517	6,3	xx	12,9			22,4	xx
0,517	6,3	xx	12,5			22,2	xx
0,517	6,2	xx	12,4			22,3	xx
1,02	11,0	xx	14,1	19,3	7,2	21,4	xx
1,02	10,1	xx	14,0	20,1	8,2	22,0	xx
1,02	9,9	xx	13,7	19,9	8,2	21,7	xx
1,02	9,4	xx	14,3	20,8	9,2	23,3	xx
2,02	10,9	11,1	15,7	21,3	9,2	22,0	20,9
2,02	10,8	10,9	15,5	21,1	9,2	22,0	21,3
2,02	10,2	10,5	15,0	21,3	9,2	21,7	20,5
3,02	12,3	12,4	16,8	20,9	9,2	21,3	20,7
3,02	11,8	12,0	16,3	20,8	9,2	21,4	20,7

Tabulka V - pokračování

3,02	12,0	12,2	17,2	22,4	9,2	21,7	21,0
5,02	10,7	10,8	14,7	20,0	9,2	20,9	20,1
5,02	10,6	10,7	14,6	19,9	9,2	20,9	20,1
5,02	10,5	10,7	14,6	20,1	9,2	20,9	20,1
5,02	10,3	10,5	14,4	20,0	9,2	21,0	20,3
10,0	11,2	11,4	15,6	21,3	9,2	19,8	19,2
10,0	10,6	10,8	15,1	21,1	10,2	19,6	18,9
10,0	10,4	10,6	15,0	21,0	10,2	20,2	19,4
10,0	10,5	10,7	15,0	21,0	10,2	19,8	19,0
20,0	12,4	12,5	16,2	23,3	11,2	17,7	17,2
20,0	12,4	12,5	16,4	23,6	11,2	18,0	17,4
20,0	12,4	12,5	16,3	23,3	11,2	17,8	17,2
20,0	12,2	12,3	16,3	23,3	11,2	18,6	18,0
30,0	12,2	12,3	16,0	23,2	11,2	17,8	17,3
30,0	12,2	12,4	16,0	23,4	11,2	17,3	16,7
30,0	12,2	12,3	16,1	23,5	11,2	17,4	17,1
30,0	12,0	12,2	16,0	23,4	11,2	17,9	17,4
40,0	12,4	12,6	16,1	23,4	11,2	16,9	16,2
40,0	12,4	12,5	16,1	23,6	11,2	16,6	16,1
40,0	12,3	12,4	16,0	23,3	11,2	16,8	16,3
40,0	12,2		15,9	23,4	11,2	17,0	
50,0	13,7		17,2	24,4	12,2	15,7	
50,0	13,8		17,3	23,7	11,2	15,7	
50,0	13,7		17,3	24,1	11,2	15,6	
50,0	13,6		17,1	23,4	11,2	15,5	
60,0	13,1		16,3	23,4	11,2	14,7	
60,0	13,2		16,4	23,4	11,2	14,5	
60,0	13,6		16,9	23,6	11,2	14,7	
80,0	13,7		17,0	24,5	11,2	13,9	
80,0	13,6		16,7	23,7	11,2	13,5	
80,0	13,3		16,5	23,7	11,2	13,9	
80,0	13,6		16,6	23,6	11,2	13,6	
100	14,3		17,3	23,6	11,2	13,3	
100	14,3		17,3	23,6	11,2	13,2	
100	14,3		17,4	24,0	11,2	13,2	
100	14,1		17,1	23,5	11,2	13,5	

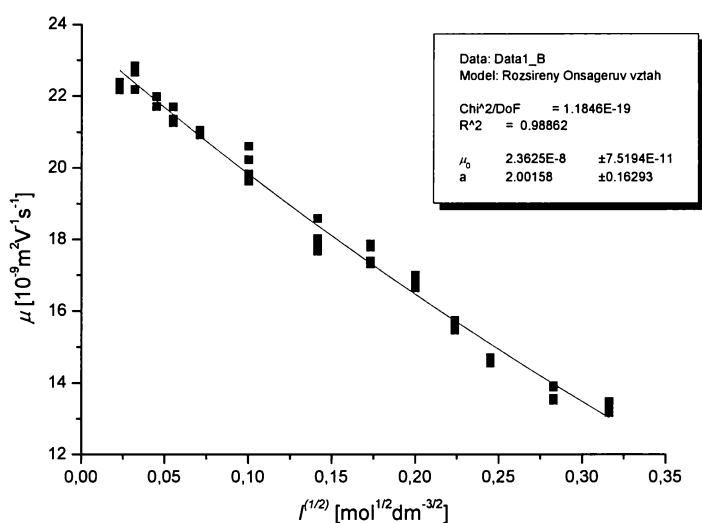
4.2.2 Regresní analýza experimentálních dat, stanovení limitní pohyblivosti

Limitní pohyblivost analytu PEMEDA byla stanovena regresí podle 3-parametrové fce, rov. (28), a také podle rozšířeného Onsagerova vztahu, rov. (21). Výpočet veličiny q byl proveden podle rov. (19) dosazením náboje cyklohexinu PEMEDA za $z_+ = 2$, nábojového čísla protiiontu (acetát) za $z_- = -1$ a dosazením limitní pohyblivosti acetátu za $\mu_0 = 41,4 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Vyčíslením konstant B_1 , B_2 a B a dosazením q do rov. (21) dostáváme vztah:

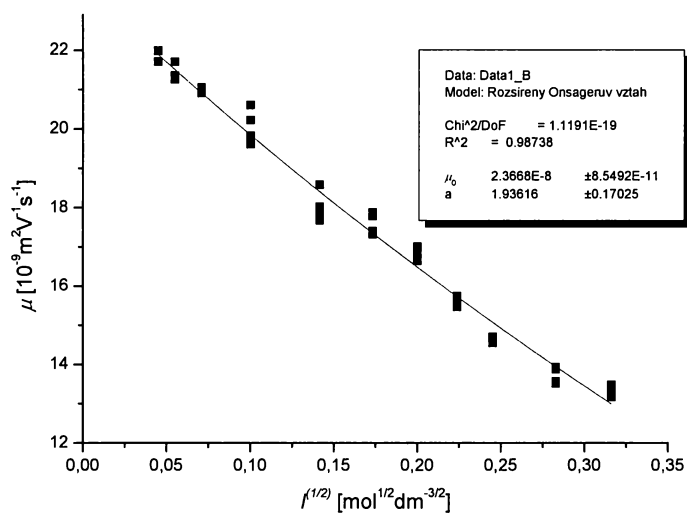
$$\mu = \mu_0 - \left(\frac{1,5634\mu_0 \frac{2\mu_0 + 4,24 \cdot 10^{-8}}{3\mu_0 + 8,28 \cdot 10^{-8}}}{1 + \sqrt{\frac{2\mu_0 + 4,24 \cdot 10^{-8}}{3\mu_0 + 8,28 \cdot 10^{-8}}}} + 3,138 \cdot 10^{-8} \right) \frac{\sqrt{I}}{1 + 0,3287a\sqrt{I}} \quad (30)$$

Grafy závislostí odpovídající použití rozšířeného Onsagerova vztahu jsou na Obr. 15 – Obr. 17.

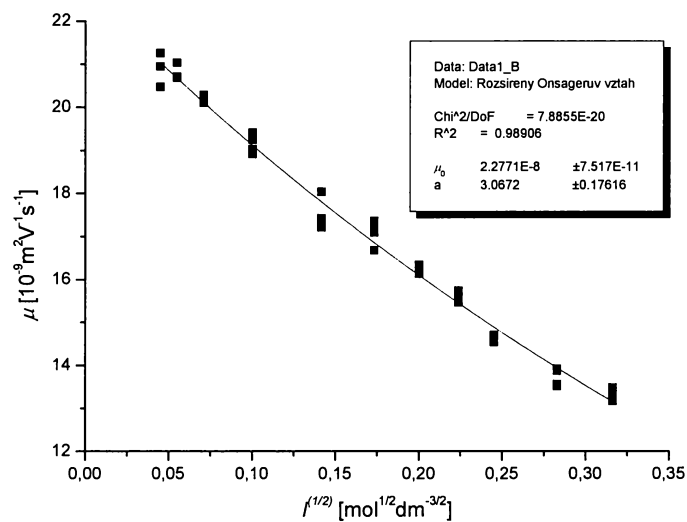
Regresní analýza dat korigovaných HVL funkcí nezahrnuje hodnoty aktuální pohyblivosti pro iontové síly 0,502 a 1,02 mmol*dm⁻³ (Obr. 17). Pro posouzení vlivu těchto experimentálních bodů na vypočtenou hodnotu limitní pohyblivosti byla regresní analýzou zpracována data nekorigovaná HVL funkcí v rozsahu iontových sil 0,517 – 100 mmol*dm⁻³ (Obr. 15) a 2,02 – 100 mmol*dm⁻³ (Obr. 16).



Obr. 15 Regrese podle rozšířeného Onsagerova vztahu, rov. (30), pro analyt PEMEDA (iontová síla BGE 0,517 – 100 mM).



Obr. 16 Regrese podle rozšířeného Onsagerova vztahu, rov. (30), pro analyt PEMEDA (iontová síla BGE 2,02-100 mM).



Obr. 17 Regrese podle rozšířeného Onsagerova vztahu, rov. (30) pro analyt PEMEDA. Data korigovaná HVL funkcí (iontová síla BGE 2,02-100 mM).

Získané hodnoty limitních pohyblivostí pro analyt PEMEDA a jednotlivé použité regresní funkce jsou shrnuty v Tabulce VI.

Tabulka VI Tabulka hodnot limitních pohyblivostí analytu PEMEDA.

Regresní rovnice	$\mu_0 [10^{-9} \text{m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}]$		
	bez korekce HVL funkcí		korekce HVL funkcí
	$I [\text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}]$		
	0,517 - 100	2,02 - 100	
3-parametrová fce, rov. (28)	23,5	23,7	22,7
Rozšířený Onsagerův vztah, rov. (30)	23,6	23,7	22,8

4.2.3 Diskuse

Pro zjištění limitní pohyblivosti analýzou experimentálních dat je vhodné proměřit závislost aktuální pohyblivosti do velmi nízkých iontových sil. Hodnoty pro iontové síly 0,517 a 1,02 $\text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ však nebylo možné korigovat HVL funkcí, nebyly tedy do závislosti zahrnuty. Byla proto vyhodnocena nekorigovaná data v rozsahu iontových sil 0,517 – 100 $\text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ (Obr. 15) a 2,02 – 100 $\text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ (Obr. 16). Porovnáním výsledků těchto regresí se ukázalo, že vynechání experimentálních hodnot pro 0,517 a 1,02 $\text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ má zanedbatelný vliv na vypočtenou hodnotu limitní pohyblivosti. Významnější vliv měla vlastní korekce HVL funkcí. Přestože data korigovaná HVL funkcí představují vzhledem k experimentálním chybám pouze malou odchylku, jedná se o odchylku systematickou, která způsobí snížení limitní pohyblivosti analytu PEMEDA o 5%.

Pro zjištění limitní pohyblivosti analytu PEMEDA byly použity 3-parametrová funkce, rov. (28), i rozšířený Onsagerův vztah, rov. (30). Výsledky jsou pro obě regresní funkce takřka totožné. To není žádným překvapením, neboť 3-parametrové funkce je odvozená z rozšířeného Onsagerova vztahu. Parametr a má v rozšířeném Onsagerově vztahu reprezentovat velikost iontu, danou jako nejkratší vzdálenost středu iontu a středu jeho protiiontu. Tato hodnota je však obtížně dostupná, proto se obvykle za součin Ba dosazuje hodnota $1,5 (\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3})^{-1/2}$, což odpovídá hodnotě $a \doteq 0,5 \text{ nm}$. V regresi dat korigovaných HVL funkcí podle rozšířeného Onsagerova vztahu (Obr. 17) vychází parametr $a \doteq 0,3 \text{ nm}$. Pro cyklodextriny, jako veliké molekuly, bychom očekávali mnohem vyšší hodnoty. Proto také tento parametr v regresní funkci budeme chápat pouze jako nastavitelnou hodnotu bez fyzikálního významu.

5 Závěr

V teoretické části této bakalářské práce je uveden základní teoretický i praktický princip kapilární zónové elektroforézy. Je zde uveden stručný přehled přístupů k modelování závislosti elektroforetické pohyblivosti na iontové síle prostředí a základních vlastností cyklodextrinů, včetně jejich využití. V experimentální části této práce byly proměřeny elektroforetické pohyblivosti v prostředí o různé iontové síle. Tato data byla zpracována pomocí uvedených modelů, byla určena závislost elektroforetické pohyblivosti daných nabitých cyklodextrinů na iontové síle, včetně jejich limitních pohyblivostí.

6 Literatura

1. Pacáková V, Coufal P., Štulík K., Gaš B.: *Electrophoresis* 2003, 24, 1883-1891
2. Kašička V.: *Chemické listy* 1997, 91, 320 – 329
3. Štulík K. a kolektiv: *Analytické separační metody*, Karolinum, Praha 2005
4. Opekar F. a kolektiv: *Základní analytická chemie*, Karolinum, Praha 2005
5. Gaš B., Kenndler E.: *Electrophoresis* 2000, 21, 3888-3897
6. Erny G. L., Bergström E. T., Goodall D. M.: *J. Chromatogr. A* 2002, 959, 229-239
7. Beranová J.: *Diplomová práce – Kapilární zónová elektroforéza, Úloha pro Pokročilé praktikum z fyzikální chemie*, UK Praha, 2002
8. Štědrý M., Jaroš M., Gaš B.: *J. Chromatogr. A* 2002, 960, 187-198
9. Gaš B.: *Elektromigrační separační metody - přednáška*, UK Praha, 2007
10. Friedl W., Kenndler E.: *Anal. Chem.* 1993, 65, 2003-2009
11. Jaroš M., Soga T., van de Goor T., Gaš B.: *Electrophoresis* 2005, 26, 1948-1953
12. Lokajová J., Hruška V., Tesařová E., Gaš B.: *Electrophoresis*, v tisku
13. Gaš B., Kenndler E.: *Electrophoresis* 2004, 25, 3901-3912
14. Gaš B., Hruška V., Dittmann M., Bek F., Witt K.: *J. Sep. Sci.* 2007, 30, 1435-1445
15. Štědrý M., Jaroš M., Hruška V., Gaš B.: *Electrophoresis* 2004, 25, 3071-3079
16. Štědrý M., Jaroš M., Včeláková K., Gaš B.: *Electrophoresis* 2003, 24, 536-547
17. Hruška V., Štědrý M., Včeláková K., Lokajová J., Tesařová E., Jaroš M., Gaš B.: *Electrophoresis* 2006, 27, 4610-4617
18. Jaroš M., Hruška V., Štědrý M., Zusková I., Gaš B.: *Electrophoresis* 2004, 25, 3080-3085
19. <http://www.natur.cuni.cz/~gas/>
20. Hruška V. Jaroš M., Gaš B.: *Electrophoresis* 2006, 27, 984-991
21. Williams B. A., Vigh G.: *Anal. Chem.* 1996, 68, 1174-1180
22. Williams B. A., Vigh G.: *Anal. Chem.* 1997, 69, 4445-4451
23. Mrchref Y., Ostrander G. K., El Rassi Z.: *J. Chromatogr. A* 1997, 792, 75-82

24. Friedl W., Reijenga J. C., Kenndler E.: *J. Chromatogr. A* 1995, 709, 163-170
25. Koval D., Kašička V., Zusková I.: *Electrophoresis* 2005, 26, 3221-3231
26. Li D., Su S., Lucy Ch. A.: *Anal. Chem.* 1999, 71, 687-699
27. Survey M. A., Goodall D. M., Wren S. A. C., Rowe R. C.: *J. Chromatogr. A* 1996, 741, 99-113
28. Jaroš M., Včeláková K., Zusková I., Gaš B.: *Electrophoresis* 2002, 23, 2667-2677
29. Li S., Purdy W. C.: *Chem. Rev.* 1992, 92, 1457-1470
30. Bersier P. M., Bersier J., Klingert B.: *Electroanalysis* 1991, 3, 443-455
31. Ferancová A., Labuda J., Barek J., Zima J.: *Chem. Listy* 2002, 96, 856-862
32. Redenti E., Szente L., Szejtli J.: *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2001, 90, 979-986
33. Ušelová-Včeláková K., Zusková I., Gaš B.: *Electrophoresis* 2007, 28, 2145-2152
34. Blaschke G., Chankvetadze B.: *J. Chromatogr. A* 2000, 875, 3-25
35. Rudaz S., Veuthey J. L., Fanali S.: *Electrophoresis* 1998, 19, 2883-2889
36. Rawjee Y. Y., Williams R. L., Vigh G.: *J. Chromatogr. A* 1993, 652, 233-245
37. Vincent B. J., Kirby D. M., Nguyen T. V., Vigh G.: *Anal. Chem.* 1997, 69, 4419-4428
38. Nzeadibe K., Vigh G.: *Electrophoresis* 2007, 28, 2589-2605
39. Gaš B., Zuska J., Coufal P., van de Goor T.: *Electrophoresis* 2002, 23, 3520-3527
40. Velhartická I.: *Diplomová práce* 2008, v přípravě
41. Gratz S. R., Stalcup A. M.: *Anal. Chem.* 1998, 70, 5166-5171