

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

**URČOVÁNÍ ASOCIAČNÍCH KONSTANT KOMPLEXŮ
ENANTIOMERŮ DIPEPTIDU β -ALA-D,L-TYR
A JEHO DERIVÁTŮ
S 2-HYDROXYPROPYL- β -CYKLODEXTRINEM
KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZOU**

Diplomová práce

v rámci studijního oboru
Chemie životního prostředí

Praha 2008

Tereza Schimperková

Souhrn

V rámci diplomové práce byly metodou kapilární elektroforézy (CE) stanoveny asociační konstanty komplexů enantiomerů antimikrobiálního dipeptidu β -Ala-D,L-Tyr a jeho derivátů, *N*-Ac- β -Ala-D,L-Tyr, β -Ala-D,L-Tyr-NH₂ a β -D-fruktopyranosyl- β -Ala-D,L-Tyr, se stereoselektivním komplexačním činidlem pro chirální CE separace těchto analytů, 2-hydroxypropyl- β -cyklodextrinem. Asociační konstanty byly vypočítány z experimentálně změřené závislosti efektivní mobility analytů na koncentraci cyklodextrinu v základním elektrolytu nelineární regresní analýzou. Efektivní pohyblivosti peptidů byly korigovány na standardní teplotu 25 °C a na viskozitu základního elektrolytu měnící se s přidavkem 2-hydroxypropyl- β -cyklodextrinu v základním elektrolytu. V rámci experimentální části byla proměřena závislost rozlišení chirálních CE separací analyzovaných látek na pH v kyselé i alkalické oblasti. Bylo ověřeno, že kapilární elektroforéza je vhodná metoda pro separace enantiomerů peptidů a pro stanovení asociačních konstant komplexů peptidů s cyklodextriny v mikroměřítku.

Předmětová slova: analýza peptidů, elektromigrační metody

Klíčová slova: antimikrobiální peptidy, asociační konstanty komplexů, cyklodextriny, chirální separace, kapilární elektroforéza, β -Ala-D,L-Tyr

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně, pod vedením školitelky doc. RNDr. Evy Tesařové, CSc., a konzultanta RNDr. Václava Kašičky, CSc., a že jsem všechny použité prameny řádně citovala.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze a Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i., je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity a Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i.

V Praze dne

.....

Poděkování

Ráda bych poděkovala své školitelce doc. RNDr. Evě Tesařové, CSc., a svému konzultantovi RNDr. Václavu Kašíčkovi, CSc., za odborné vedení při vypracování této práce a při naplňování jejích cílů, poskytnutí konzultací a za cenné rady a konstruktivní připomínky k textu.

Mé poděkování patří také mojí rodině za poskytnuté zázemí a trpělivost po celou dobu studia.

OBSAH

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	7
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ.....	9
1 ÚVOD	12
2 TEORETICKÁ ČÁST	13
2.1 KAPILÁRNÍ ELEKTROMIGRAČNÍ METODY	13
2.1.1 <i>Princip kapilární zónové elektroforézy.....</i>	<i>14</i>
2.1.2 <i>Elektroforetická pohyblivost a elektroosmotický tok.....</i>	<i>15</i>
2.1.3 <i>Disperzní jevy</i>	<i>18</i>
2.1.4 <i>Separační účinnost a rozlišení.....</i>	<i>20</i>
2.2 ASOCIAČNÍ KONSTANTA KOMPLEXU.....	22
2.3 METODY KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZY PRO URČOVÁNÍ ASOCIAČNÍ KONSTANTY.....	24
2.3.1 <i>Kapilární afinitní elektroforéza</i>	<i>25</i>
2.3.1.1 <i>Vyhodnocení experimentálních dat</i>	<i>29</i>
2.3.2 <i>Metoda vakantního píku</i>	<i>32</i>
2.3.3 <i>Vakantní afinitní kapilární elektroforéza</i>	<i>32</i>
2.3.4 <i>Hummelova-Dreyerova metoda.....</i>	<i>33</i>
2.3.5 <i>Frontální analýza</i>	<i>33</i>
2.4 PEPTIDY.....	35
2.4.1 <i>Analýza peptidů kapilární elektroforézou.....</i>	<i>35</i>
2.4.2 <i>Dipeptid β-Ala-D,L-Tyr a jeho deriváty</i>	<i>37</i>
2.5 CYKLODEXTRINY.....	38
2.5.1 <i>Základní charakteristiky a využití.....</i>	<i>38</i>
2.5.2 <i>Cyklodextriny v nativním stavu.....</i>	<i>39</i>
2.5.3 <i>Derivatizované cyklodextriny</i>	<i>41</i>
3 VÝZKUMNÉ CÍLE.....	45
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	46
4.1 CHEMIKÁLIE.....	46
4.2 ÚPRAVA VZORKŮ.....	46
4.3 PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ.....	46
5 VÝSLEDKY A DISKUZE	48
5.1 ANALÝZA A SEPARACE ENANTIOMERŮ β -ALA-D,L-TYR A JEJICH DERIVÁTŮ	48
5.1.1 <i>Volba základních elektrolytů a chirálního selektoru.....</i>	<i>48</i>
5.1.2 <i>Separace enantiomerů v kationické formě v kyselém pH</i>	<i>49</i>
5.1.3 <i>Separace enantiomerů v anionické formě v zásaditém pH.....</i>	<i>53</i>
5.2 STANOVENÍ ASOCIAČNÍCH KONSTANT KOMPLEXŮ ENANTIOMERŮ β -ALA-D,L-TYR A JEHO DERIVÁTŮ S 2-HYDROXYPROPYL- β -CYKLODEXTRINEM	56
5.2.1 <i>Stanovení efektivních pohyblivostí.....</i>	<i>56</i>
5.2.2 <i>Závislost efektivních pohyblivostí na koncentraci cyklodextrinu – stanovení asociační konstanty</i>	<i>58</i>

5.2.3	<i>Srovnání asociačních konstant získaných nelineární regresní analýzou a lineárním vynesním dat pro β-Ala-D,L-Tyr při pH 2,50.....</i>	64
6	ZÁVĚR	67
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	68

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

BGE	základní elektrolyt (background electrolyte)
CAE	kapilární afinitní elektroforéza (capillary affinity electrophoresis)
CD	cyklodextrin/y
CE	kapilární elektroforéza (capillary electrophoresis)
CZE	kapilární zónová elektroforéza (capillary zone electrophoresis)
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DOPA	3,4-dihydroxyfenylalanin
EOF	elektroosmotický tok (electroosmotic flow)
ESI	ionizace elektrosprejem (electrospray ionization)
FA	frontální analýza (frontal analysis)
FACCE	kapilární elektroforéza s kontinuální frontální analýzou (frontal analysis continuous capillary electrophoresis)
GC	plynová chromatografie (gas chromatography)
HD	Hummelova-Dreyerova metoda (Hummel-Dreyer method)
HETP	výškový ekvivalent teoretického patra (height equivalent to a theoretical plate)
HIA	kyselina hydroxyindol-3-octová
HPCE	vysokoučinná kapilární elektroforéza (high-performance capillary electrophoresis)
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie (high-performance liquid chromatography)
HVA	kyselina homovanilová
ID	vnitřní průměr (inner diameter)
LIF	laserem indukovaná fluorescence (laser-induced fluorescence)
MALDI	ionizace laserem za přítomnosti matrice (matrix-assisted laser desorption/ionization)
MEKC	micelární elektrokinetická chromatografie (micellar electrokinetic chromatography)
MS	hmotnostní spektrometrie (mass spectrometry)

NMR	nukleární magnetická resonance (nuclear magnetic resonance)
RSD	relativní standardní odchylka (relative standard deviation)
SD	standardní odchylka (standard deviation)
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
UV	ultrafialová oblast světelného záření
Vis	oblast viditelného světla
VP	metoda vakantního píku (vacancy peak method)
VCAE	vakantní kapilární afinitní elektroforéza (vacancy affinity capillary electrophoresis)

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ

A	analyt
$[A]$	rovnovážná koncentrace analytu [mol l^{-1}]
$[A_f]$	koncentrace analytu nevázaného v komplexu [mol l^{-1}]
$[A_{tot}]$	celková koncentrace analytu [mol l^{-1}]
a_A, a_{AL}, a_L	aktivita analytu, aktivita komplexu analyt-ligand, aktivita ligandu
AL	komplex analyt-ligand
$[AL]$	rovnovážná koncentrace komplexu analyt-ligand [mol l^{-1}]
c_A^0, c_{AL}^0, c_L^0	standardní koncentrace, $c_x^0 = 1 \text{ mol l}^{-1}$
c_{opt}	optimální koncentrace chirálního selektoru při separacích enantiomerů [mol l^{-1}]
D	difúzní koeficient [$\text{m}^2 \text{ s}^{-1}$]
\bar{D}	průměrný difúzní koeficient [$\text{m}^2 \text{ s}^{-1}$]
E	intenzita elektrického pole [V m^{-1}]
F_e	síla elektrického pole [N]
F_f	frikční síla prostředí [N]
H	výškový ekvivalent teoretického patra (HETP)
I	iontová síla roztoku
k	rychlostní konstanta vzniku komplexu
k'	rychlostní konstanta zániku komplexu
k	retenční faktor
K_{AS}^0	normalizovaná asociační konstanta
K_{AS}	stechiometrická asociační konstanta
K_{AS}^{th}	termodynamická asociační konstanta
$K_{AS,D}$	asociační konstanta komplexu D-enantiomeru [M^{-1}]
$K_{AS,L}$	asociační konstanta komplexu L-enantiomeru [M^{-1}]
L_t	celková délka kapiláry [m]
L_{eff}	efektivní délka kapiláry [m]
L	ligand
$[L]$	rovnovážná koncentrace ligandu [mol l^{-1}]

$[L_f]$	koncentrace ligandu nevázaného v komplexu $[\text{mol l}^{-1}]$
$[L_{tot}]$	celková koncentrace ligandu $[\text{mol l}^{-1}]$
m_a	mobilita (pohyblivost) látky a $[\text{m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}]$
$m_{cor,\eta}$	mobilita korigovaná na viskozitu $[\text{m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}]$
m_{eff}	efektivní mobilita látky $[\text{m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}]$
m_{eof}	mobilita elektroosmotického toku $[\text{m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}]$
m_{exp}	experimentálně změřená mobilita analytu $[\text{m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}]$
Δm	rozdíl mobilit
\bar{m}	průměrná mobilita $[\text{m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}]$
M	molarita
M_r	relativní molekulová hmotnost
n	počet vazebných míst
N	počet teoretických pater
\bar{N}	průměrná hodnota počtu teoretických pater
pH	záporný dekadický logaritmus aktivity vodíkových iontů
pK_A	záporný dekadický logaritmus acidobazické disociační konstanty
q	náboj [C]
r_i	poloměr iontu i [m]
r	poměr koncentrace analytu vázaného v komplexu a celkové koncentrace analytu
R	rozlišení
t	migrační čas [s]
U	napětí [V]
v	rychlost migrace látky v elektrickém poli $[\text{m s}^{-1}]$
v_{eof}	rychlost elektroosmotického toku $[\text{m s}^{-1}]$
v_k	korekční faktor
w	efektivní průměr iontu
w_z	šířka píku u základny
$w_{1/2}$	šířka píku v polovině výšky
x_i	molární zlomek i -té iontové formy látky
z	nábojové číslo iontu
z_i	nábojové číslo i -té složky roztoku

β, β^0, β^h	celkové asociační konstanty (stechiometrická, normalizovaná, termodynamická)
$\gamma_A, \gamma_{AL}, \gamma_L$	aktivitní koeficienty analytu, komplexu analyt-ligand, ligandu
γ_{\pm}	střední aktivitní koeficient
ε	permitivita [$F m^{-1}$]
ζ	elektrokinetický potenciál [V]
η	viskozita [$N s m^{-2}$]
η^0	viskozita roztoku pufru [$N s m^{-2}$]
σ	standardní odchylka píku
σ_{celk}^2	celkový rozptyl
σ_{DIF}^2	rozptyl způsobený difúzí
σ_{INJ}^2	rozptyl způsobený dávkováním
σ_{TEPL}^2	rozptyl způsobený teplotním gradientem
σ_{ADS}^2	rozptyl způsobený adsorpcí
σ_{DET}^2	rozptyl způsobený detekcí
σ_{EMD}^2	rozptyl způsobený elektromigrační disperzí

1 ÚVOD

Asociační, vazebná, komplexotvorná konstanta nebo také konstanta stability charakterizuje sílu interakcí mezi dvěma látkami tvořícími komplex, a tedy i stabilitu vytvořeného komplexu. Stanovení asociačních konstant má velký význam pro charakterizaci komplexů biomolekul obecně. Jde například o interakce hormonů a léčiv s receptory, enzymů se substráty a inhibitory a protilátek s antigeny. Znalost asociačních konstant je také významná při separacích stereoizomerů a zejména optických izomerů, kdy je možné ze vztahu mezi asociačními konstantami jednotlivých enantiomerů a koncentrací chirálního selektoru vypočítat optimální koncentraci chirálního selektoru vhodnou pro separaci enantiomerů.

Pro stanovení vazebných konstant se používá řada metod. Lze uvést například elektroforetické a chromatografické metody [1–4], spektrofotometrii [5], kalorimetrii [6], potenciometrické metody [7,8] či NMR [9]. Velký potenciál mají elektroforetické metody, a to zejména kapilární afinitní elektroforéza.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Kapilární elektromigrační metody

Kapilární elektromigrační metody jsou účinné separační techniky, založené na rozdílné rychlosti pohybu iontů v elektrickém poli v tenké kapiláře naplněné základním elektrolytem. Hlavními přednostmi těchto metod jsou vysoká separační účinnost (dosahuje stovky tisíc až miliony teoretických pater), citlivost (na úrovni femtomol-zeptomol), rychlost analýzy (jednotky až desítky minut), malá spotřeba vzorku (nano- až pikolitry) a široké uplatnění. Kapilární elektromigrační metody jsou někdy stručně označovány jako CE (resp. HPCE) podle anglického *capillary electrophoresis* (resp. *high performance capillary electrophoresis*) [10].

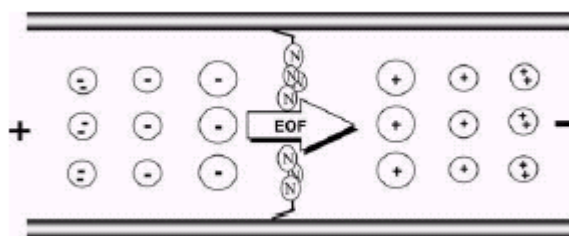
Kapilární elektromigrační metody nacházejí uplatnění v rámci mnoha analytických aplikací. Příkladem je jejich použití při analýzách proteinů a peptidů, aminokyselin, sacharidů, oligonukleotidů, fragmentů DNA, buněk a virů, léčiv, vitamínů, potravinářských barviv, anorganických iontů, pesticidů a detergentů [11–16].

V historii vývoje kapilárních elektromigračních metod bylo důležitým krokem zmenšení vnitřního průměru kapiláry. Zpočátku se používaly skleněné trubičky o průměru 3 mm [17]. V 70. letech 20. století se začaly používat plastové kapiláry s průměrem 0,5 - 0,2 mm v izotachofóze [18] i v zónové elektroforéze [19,20]. Zásadním průlomem byla práce Jorgensona a Lukacsově v roce 1981 a použití křemenných kapilár o vnitřním průměru 50 - 100 μm v elektrickém poli o intenzitě 30 kV m^{-1} [21].

Kapilární elektromigrační metody zahrnují šest základních módů, které se liší mj. typem média přítomného v separační kapiláře a vlastním mechanismem separace. Jsou to kapilární zónová elektroforéza, kapilární izotachofóza, kapilární izoelektrická fokusace, kapilární afinitní elektroforéza, kapilární elektrokinetická chromatografie a kapilární elektrochromatografie.

2.1.1 Princip kapilární zónové elektroforézy

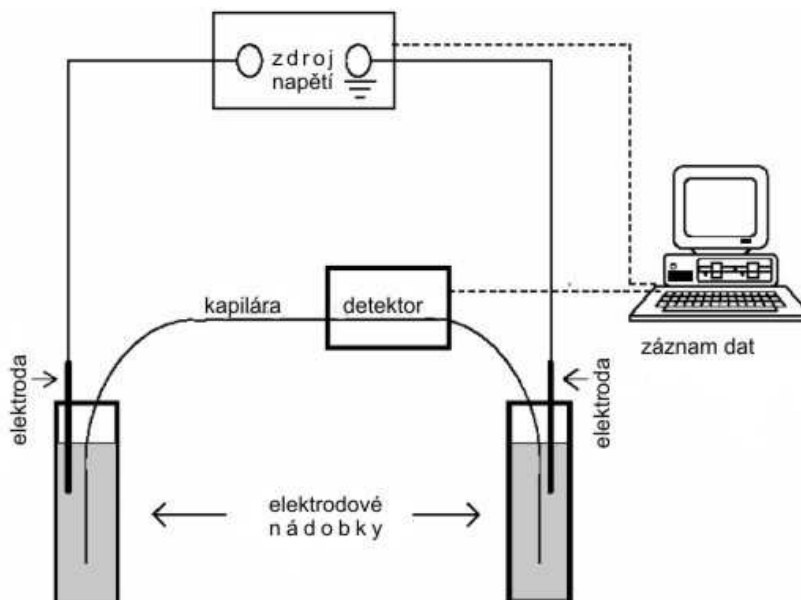
Kapilární zónová elektroforéza (CZE) je elektromigrační metoda, při které se pro separaci používají zejména křemenné kapiláry nejčastěji s vnitřním průměrem 25 – 75 μm , vnějším průměrem okolo 360 μm a délkou 20-80 cm. Princip separace spočívá v rozdílné rychlosti migrace látek v elektrickém poli (Obr. 2.1). Vzhledem k tomu, že separační prostor má vhodný poměr povrchu k objemu, dochází k účinnému odvodu Jouleova tepla, a tudíž je možné použít vysoké intenzity elektrického pole (až 100 kV/m). Tím se dosahuje vysoké účinnosti a rychlosti analýzy. Díky malým rozměrům kapiláry se snižuje spotřeba vzorku i používaných chemikálií.



Obr. 2.1 Migrace látek v CZE - Rychlost migrace nabité molekuly/iontu v elektrickém poli je přímo úměrná jejímu náboji a nepřímo úměrná velikosti. Všechny molekuly (nabité i nenabité) jsou unášeny elektroosmotickým tokem. Z toho vyplývá, že v tomto uspořádání (elektroosmotický tok se pohybuje směrem ke katodě) putují nejvíce nabitě malé kationty ke katodě nejrychleji, zatímco velké méně nabitě kationty putují pomaleji. Stejně tak málo nabitě velké anionty jsou přitahovány k anodě slaběji než silně nabitě malé anionty, a tudíž za působení elektroosmotického toku putují ke katodě rychleji než malé silně nabitě anionty, ovšem pomaleji než neutrální látky, které jsou unášeny rychlostí elektroosmotického toku.

Schéma přístroje pro CZE i ostatní CE techniky je zobrazeno na Obr. 2.2. Před začátkem experimentu je kapilára několikrát promývána. Poté je naplněna *základním elektrolytem* (tzv. background electrolyte, BGE). Po nástřiku vzorku jsou konce kapiláry ponořeny do elektrodových nádobek a na elektrody je vloženo napětí. Působením elektrického pole a elektroosmotického toku putují látky k detektoru, kde jsou zaznamenány. K detekci se často používá UV absorpční detektor vzhledem k tomu, že většina látek záření v UV oblasti absorbuje. Dále je v CE možno použít například fluorescenční detekci, laserem indukovanou

fluorescenci, elektrochemickou detekci (konkrétně potenciometrickou, vodivostní a amperometrickou detekci), měření indexu lomu a hmotnostní spektrometrii (MS) [22–25]. Záznam signálu z detektoru se nazývá *elektroforegram* nebo *elektroferogram*.



Obr. 2.2 Schéma zařízení pro kapilární elektromigrační metody

V CE metodách jsou možné dva způsoby dávkování. *Hydrodynamického dávkování* je dosaženo buď přetlakem na vstupu či podtlakem na výstupu kapiláry. Změnu tlaku lze uskutečnit gravitačním tokem, působením tlaku na roztok nebo vakuovým odsáváním. Druhý typ dávkování je *elektrokinetické*. Elektroda je umístěna do mikrozkuhavky se vzorkem a poté je na ni po krátkou dobu vloženo napětí. Působením napětí je vzorek vtažen do kapiláry. Nevýhodou elektrokinetického dávkování je selektivita vůči různě nabitým látkám [25].

2.1.2 Elektroforetická pohyblivost a elektroosmotický tok

Elektroforetická pohyblivost (mobilita) m je definována jako rychlost pohybu nabitých částic v kapalném prostředí ve stejnosměrném elektrickém poli o jednotkové intenzitě (rovnice 2.1).

$$m = v / E \quad [\text{m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}] \quad (2.1)$$

kde v je rychlost iontu v elektrickém poli o intenzitě E , která je rovna podílu napětí U a délky kapiláry L_t :

$$E = U / L_t \quad [\text{Vm}^{-1}] \quad (2.2)$$

Čas t , za který látka doputuje k detektoru, umístěnému ve vzdálenosti L_{eff} od počátku kapiláry, je dán vztahem:

$$t = \frac{L_{eff}}{v} = \frac{L_{eff} \cdot L_t}{m \cdot U} \quad [\text{s}] \quad (2.3)$$

Síly, které na analyt během elektroforetické separace působí, jsou síla elektrického pole F_e (rovnice 2.4) a frikční síla prostředí F_f (rovnice 2.5).

$$F_e = q \cdot E \quad (2.4)$$

kde q je náboj iontu.

$$F_f = -6\pi \cdot \eta \cdot r \cdot v \quad (2.5)$$

kde η je viskozita prostředí, r je poloměr iontu a v je rychlost pohybu iontu. V ustáleném stavu se obě síly rovnají, a proto lze pro mobilitu odvodit rovnici:

$$m = q / 6\pi \cdot \eta \cdot r \quad (2.6)$$

Z rovnice 2.6 je zřejmé, že mobilita iontu je přímo úměrná jeho náboji a nepřímo úměrná jeho poloměru a viskozitě roztoku. Z toho vyplývá, že malé silně nabitě ionty mají vysokou pohyblivost. Pro velké slabě nabitě ionty platí opak.

Elektroforetická pohyblivost iontů v nekonečně zředěném roztoku se nazývá *limitní pohyblivost*. Hodnoty limitních pohyblivostí při teplotě 25 °C jsou tabelovány jako fyzikálně-chemické parametry iontů. V případě slabých elektrolytů je pohyblivost závislá na stupni jejich disociace a tudíž na pH prostředí. Pohyblivost slabých elektrolytů vztažená k danému pH, iontové síle a teplotě separačního prostředí se nazývá *efektivní pohyblivost*. Elektromigrační separace slabých elektrolytů a amfolytů (peptidů, bílkovin) se provádí při takovém pH, při kterém jsou rozdíly v efektivních pohyblivostech separovaných látek maximální [10]. Efektivní elektroforetickou pohyblivost lze vypočítat z migračních časů analytu a markeru elektroosmotického toku:

$$m_{eff} = \frac{L_{eff} \cdot L_t}{U} \left(\frac{1}{t_A} - \frac{1}{t_{eof}} \right) \quad (2.7)$$

kde t_A je migrační čas analytu a t_{eof} je migrační čas markeru elektroosmotického toku.

Dalším transportním jevem v CE je *elektroosmotický tok* (EOF). Ten vzniká působením elektrického pole na difúzní část elektrické dvojvrstvy na rozhraní pevné a kapalné fáze u vnitřní stěny kapiláry. Vznik elektrické dvojvrstvy je důsledkem selektivní adsorpce jednoho druhu iontů na stěnu kapiláry a/nebo disociace ionogenních skupin na vnitřním povrchu kapiláry (např. silanolových skupin v případě nejčastěji používaných křemenných kapilár). Adsorbované nebo disociací vzniklé ionty vytváří na stěně imobilizovanou část elektrické dvojvrstvy, zatímco v její difúzní části směrem do roztoku zůstává přebytek volného náboje. Tím se v blízkosti stěny vytváří potenciální rozdíl, jehož část vyskytující se v difúzní oblasti elektrické dvojvrstvy se nazývá elektrokinetický potenciál nebo též *zeta* potenciál. Působením stejnosměrného pole v podélném směru kapiláry se uvádí do pohybu nejen difúzní část elektrické dvojvrstvy, ale i veškerý roztok přítomný v kapiláře. EOF unáší všechny přítomné ionty stejnou rychlostí, to znamená, že z hlediska separace působí jako neselektivní síla, významně však ovlivňuje výslednou migrační rychlost přítomných analytů a tím i účinnost separace a dobu analýzy [10].

Pro rychlost EOF v_{eof} pak platí:

$$v_{\text{eof}} = m_{\text{eof}} \cdot E \quad (2.8)$$

$$\text{a } m_{\text{eof}} = \varepsilon \cdot \zeta / \eta, \quad (2.9)$$

kde m_{eof} je mobilita EOF, ζ je elektrokinetický potenciál a ε je permitivita roztoku.

Elektrokinetický potenciál je v podstatě určen povrchovou hustotou náboje na vnitřní stěně kapiláry. Jelikož disociace ionogenních silanolových skupin na vnitřním povrchu křemenných kapilár je závislá na pH roztoku, jímž je kapilára naplněna, je EOF v křemenných kapilárách silně závislý na pH nosného elektrolytu. Mezi pH 3-8 EOF několikanásobně (čtyřikrát až pětkrát) stoupá a elektroosmotická pohyblivost převyšuje elektroforetickou pohyblivost i rychlých malých iontů.

Elektrokinetický potenciál a tudíž i EOF lze regulovat změnou složení nosného elektrolytu (pH, iontová síla), úpravou vnitřního povrchu kapiláry (kvalitní nebo dynamické povlaky) nebo též vnějším příčným elektrickým polem [10].

Význačnou předností EOF ve srovnání s laminárním prouděním hydrodynamického toku je jeho téměř pravoúhlý rychlostní profil v celém průřezu kapiláry na rozdíl od parabolického rychlostního profilu hydrodynamického toku, takže jeho příspěvek k celkové disperzi zón analytů je zanedbatelný [26].

2.1.3 Disperzní jevy

Problematika disperzních jevů je v CE důležitá vzhledem k tomu, že v důsledku rozšiřování zón analytů dochází k ovlivnění citlivosti a účinnosti separace.

V CZE může být disperze způsobena několika různými faktory. Významné jsou: podélná difúze, změna teploty v důsledku vzniku Jouleova tepla, elektromigrační disperze, rozšíření zón v důsledku dávkování a detekce, nerovnoměrný EOF a interakce analytu se stěnou kapiláry. Celkový rozptyl je pak popisován jako suma jednotlivých rozptylů souvisejících s různými vlivy (rovnice 2.10) [27].

$$\sigma_{\text{celk}}^2 = \sigma_{\text{DIF}}^2 + \sigma_{\text{INJ}}^2 + \sigma_{\text{TEPL}}^2 + \sigma_{\text{ADS}}^2 + \sigma_{\text{DET}}^2 + \sigma_{\text{EMD}}^2 + \dots \quad (2.10)$$

Indexy u jednotlivých rozptylů přísluší podélné difúzi, dávkování, teplotě, adsorpci, detekci a elektromigrační disperzi.

Podélná difúze je jev, kdy dochází k rozmývání zón v důsledku koncentračního spádu. Po určitém čase t od nadávkování vzorku jsou výsledkem difúze koncentrační profily „gaussovského“ tvaru. Lze je charakterizovat rozptylem σ^2 či standardní odchylkou zóny σ danou vztahem

$$\sigma = \sqrt{2Dt}, \quad (2.11)$$

kde t je čas a D je difúzní koeficient.

Jouleovo teplo je teplo, které vzniká ve vodiči průchodem elektrického proudu. Zahřívání vodiče lze vysvětlit předáváním části kinetické energie částic způsobujících elektrický proud částicím, které se elektrického proudu neúčastní. Nárůst teploty je závislý na vloženém napětí, protékajícím proudu, vodivosti pufu a rozměrech kapiláry. Velikost Jouleova tepla Q_J vznikajícího ve vodiči, jímž prochází elektrický proud I po dobu t a na jehož koncích je napětí U , se vypočte ze vztahu:

$$Q_J = UIt = RI^2t = \frac{U^2}{R}t, \quad (2.12)$$

kde R je odpor vodiče.

Teplotní gradient v kapiláře způsobuje změnu viskozity pufu. Teplotu v kapiláře lze ovlivnit vnitřním průměrem kapiláry a tloušťkou stěny kapiláry a polyimidového povlaku. Kromě toho je závislá na koeficientu přenosu tepla z vnější stěny kapiláry do okolí. Jouleovo teplo je možné omezit snížením intenzity elektrického pole, použitím kapiláry s menším

vnitřním průměrem, snížením iontové síly nebo koncentrace pufru. Teplota kapiláry se reguluje chlazením.

K rozšíření zóny analytu dochází také při jeho dávkování. K tomu dochází na vstupu kapiláry, kdy je vzorek dávkován vytvořením rozdílu tlaků na obou koncích kapiláry. Dávkovaná zóna je rozmyta působením hydrodynamického toku během dávkování. Příspěvek dávkování k celkovému rozptylu je dán rovnicí 2.13 [27]:

$$\sigma_{\text{INJ}}^2 = \frac{w_i^2}{12}, \quad (2.13)$$

kde w_i je délka zóny dávkovaného vzorku. Ideálně by w_i mělo být menší než standardní odchylka zóny způsobená difúzí $\sqrt{2Dt}$. Vhodná délka zóny dávkování je cca 1-2 % celkové délky kapiláry. Pro kapiláru o délce 50 cm je tedy vhodná délka zóny vzorku rovna 5 mm, což se při ID 50 μm rovná objemu 10 nl.

Adsorpce na křemennou stěnu je jev v CZE poměrně častý, zejména pak u vysokomolekulárních látek. Je způsoben iontovými interakcemi mezi ionizovanými skupinami na povrchu kapiláry a ionty analytu s opačným nábojem. Podle síly interakcí analytu se stěnou kapiláry se může vyskytnout buď chvostování píku nebo celková adsorpce analytu na stěnu kapiláry. Rozptyl způsobený adsorpcí je dán rovnicí

$$\sigma_{\text{ADS}}^2 = \frac{k \cdot v_{\text{eot}} L_{\text{eff}}}{(L_{\text{eff}} + k)^2} \cdot \left(\frac{r^2 \cdot k}{4D} + \frac{2}{K_d} \right), \quad (2.14)$$

kde k je retenční faktor a K_d je disociační konstanta 1. řádu. Retenční faktor je definován

$$\text{jako } k = \frac{t_r - t_0}{t_0}, \quad (2.15)$$

kde t_r je migrační čas sorbujícího se analytu a t_0 je migrační čas nesorbujícího se analytu. Rozptyl je závislý na hodnotě retenčního faktoru. I slabé interakce analytu mohou vést ke změně separační účinnosti. Při separacích proteinů bývají hodnoty retenčních faktorů mezi 0,01 a 0,1 [27].

Sorbující se látky mohou zároveň změnit rozložení náboje podél stěny kapiláry, a tím lokálně ovlivnit elektroosmotický tok, což může vést k rozmývání zón separovaných látek a někdy i zcela znemožnit analýzu.

Adsorpce analytu na povrch kapiláry může být regulována zvýšením koncentrace či změnou pH základního elektrolytu. Použitím pufru o vyšší iontové síle se snižuje rychlost

EOF a tím se prodlužuje čas pobytu analytu v kapiláře. Vhodným způsobem je použití základního elektrolytu o takovém pH, aby měly analyt i stěna kapiláry náboj se stejným znaménkem a nedocházelo ke vzájemným interakcím [27]. Další vhodnou metodou pro snížení adsorpce analytu je pokrytí povrchu kapiláry různými látkami. Podle způsobu připojení pokryvu na stěnu kapiláry rozlišujeme pokrytí dynamické a statické. Dynamické pokrytí je založeno na adsorpci pokrývacího činidla (ionogenní nebo neionogenní detergenty a různé polymery) na povrch kapiláry. Při statickém pokrytí se pokrývací činidlo váže na stěnu kapiláry kovalentně. Jako činidla pro statické pokrytí separační kapiláry se používají různé hydrofilní a hydrofóbní polymery [28].

Elektromigrační disperze způsobuje deformaci zóny v důsledku nelineární podstaty elektromigračních dějů. Dochází k ní ve chvíli, kdy je analyt dávkován v takové koncentraci, že ovlivňuje vodivost nebo pH základního elektrolytu a tudíž i celkovou elektrickou vodivost. Rozdíly ve vodivosti zóny vzorku a základního elektrolytu pak způsobují asymetrické píky [29].

2.1.4 Separační účinnost a rozlišení

Separační účinnost může být vyjádřena jako počet teoretických pater N , pro který platí

$$N = \left(\frac{L_{eff}}{\sigma} \right)^2 \quad (2.16)$$

nebo jako výškový ekvivalent teoretického patra (HETP) H , který je roven:

$$H = \frac{L_{eff}}{N} \quad (2.17)$$

Za ideálních podmínek (malý objem dávkovaného vzorku, omezení interakcí analytu se stěnou kapiláry atd.) je rozšiřování zóny analytu způsobeno pouze podélnou difúzí. Pak je možné rozptyl detekované zóny vyjádřit následující rovnicí:

$$\sigma^2 = 2 D \cdot t = \frac{2D \cdot L_{eff} \cdot L_t}{m \cdot U} \quad (2.18)$$

kde D je difúzní koeficient a L_{eff} a L_t je efektivní a celková délka kapiláry. Dosazením do předchozích rovnic dostaneme:

$$N = \frac{m \cdot U \cdot L_{eff}}{2D \cdot L_t} = \frac{m \cdot E \cdot L_{eff}}{2D} \quad (2.19)$$

Z této rovnice je patrné, že účinnost je přímo úměrná aplikovanému napětí a že velké molekuly jako např. DNA a proteiny, které mají nízké difúzní koeficienty, budou vykazovat menší disperzi než malé molekuly. Počet teoretických pater může být stanoven přímo z elektroforegramu za použití rovnice:

$$N = 5.54 \left(\frac{t}{w_{1/2}} \right)^2 \quad (2.20)$$

kde t je migrační čas a $w_{1/2}$ je šířka píku v polovině výšky. Tato rovnice však platí pouze pro symetrické (Gaussovské) píky.

Rozlišení dvou složek vzorku 1 a 2 je definováno vztahem:

$$R = \frac{2(t_2 - t_1)}{w_1 + w_2} = \frac{t_2 - t_1}{4\sigma} \quad (2.21)$$

kde t je migrační čas, w je šířka píku při základně a σ je standardní odchylka koncentrační distribuce. Na základě výše uvedených rovnic je možné odvodit vztah mezi rozlišením a počtem teoretických pater:

$$R = \frac{1}{4} \sqrt{\bar{N}} \cdot \left(\frac{\Delta m}{\bar{m}} \right). \quad (2.22)$$

Dosažením rovnice pro výpočet účinnosti získáme vztah:

$$R = \frac{\Delta m}{4} \cdot \sqrt{\frac{U}{2\bar{D} \cdot (\bar{m} + m_{\text{cof}})}} \quad (2.23)$$

přičemž

$$\Delta m = m_2 - m_1, \quad \bar{m} = \frac{m_1 + m_2}{2}, \quad \bar{N} = \frac{N_1 + N_2}{2} \quad \text{a} \quad \bar{D} = \frac{D_1 + D_2}{2}. \quad (2.24)$$

Dvě složky analyzované směsi jsou považovány za plně separované, je-li R větší než 1,5 [27].

2.2 Asociační konstanta komplexu

Vznik komplexu v poměru 1:1 (analyt:ligand) je popsán následujícím schématem:



kde A je analyt, L je ligand a AL je komplex analyt-ligand.

Bezrozměrnou termodynamickou asociační konstantu K_{AS}^{th} lze vyjádřit:

$$K_{AS}^{th} = \frac{k}{k'} = \frac{a_{AL}}{a_A a_L}, \quad (2.26)$$

kde k a k' jsou rychlostní konstanty tvorby a zániku komplexu AL a a_A , a_L a a_{AL} jsou příslušné aktivity analytu, ligandu a komplexu analyt-ligand. Pro schéma vzniku komplexu musí platit předpoklad, že složky A a L vcházejí do rovnováhy v jedné chemické formě a že A, L a AL nepodléhají jiným reakcím. Z rovnice 2.26 je evidentní, že silnější interakce zvyšují stabilitu komplexu, a tudíž i hodnotu K_{AS}^{th} .

Aktivita složky souvisí s její koncentrací v roztoku. Pro A, L a AL platí, že

$$a_A = \frac{[A]}{c_A^0} \cdot \gamma_A \quad (2.27)$$

$$a_L = \frac{[L]}{c_L^0} \cdot \gamma_L \quad (2.28)$$

$$a_{AL} = \frac{[AL]}{c_{AL}^0} \cdot \gamma_{AL}, \quad (2.29)$$

kde $[A]$, $[L]$ a $[AL]$ jsou rovnovážné koncentrace v mol l⁻¹, c_A^0 , c_L^0 a c_{AL}^0 jsou standardní koncentrace, jejichž hodnota se obvykle volí 1 mol l⁻¹. Bezrozměrné veličiny γ_A , γ_L a γ_{AL} se nazývají aktivitní koeficienty a vyjadřují aktivity příslušných složek v roztoku za standardních podmínek (tj. za teploty 25 °C a tlaku 0,1 MPa).

Analogicky podle termodynamické asociační konstanty jsou definovány stechiometrická (zdánlivá) asociační konstanta K_{AS} a normalizovaná asociační konstanta

K_{AS}^0 :

$$K_{AS} = \frac{[AL]}{[A][L]} \quad (2.30)$$

$$K_{AS}^0 = \frac{[AL]}{[A][L]} \cdot \frac{c_A^0 c_L^0}{c_{AL}^0} \quad (2.31)$$

Z předchozích rovnic lze odvodit vztah:

$$K_{AS}^{th} = K_{AS}^0 \cdot \frac{\gamma_{AL}}{\gamma_A \gamma_L} = K_{AS}^0 \cdot \frac{c_A^0 c_L^0}{c_{AL}^0} \cdot \frac{\gamma_{AL}}{\gamma_A \gamma_L} = \frac{[AL]}{[A][L]} \cdot \frac{c_A^0 c_L^0}{c_{AL}^0} \cdot \frac{\gamma_{AL}}{\gamma_A \gamma_L} \quad (2.32)$$

Stechiometrická rovnovážná konstanta je závislá na rovnovážné koncentraci složek A, L a AL za konkrétních podmínek. Její hodnota závisí na teplotě, tlaku a iontové síle roztoku. Tuto konstantu lze poměrně jednoduše stanovit. Vypočtená hodnota konstanty platí pouze pro dané experimentální podmínky. Díky normalizaci rovnovážných koncentrací [A], [L] a [AL], při použití c_A^0 , c_L^0 a c_{AL}^0 rovných 1 mol l^{-1} se eliminuje závislost asociační konstanty na tlaku. Závislost na teplotě a iontové síle roztoku zůstává.

Závislost na iontové síle roztoku je odstraněna při použití konstanty K_{AS}^{th} . Její hodnotu je však obtížné stanovit vzhledem k neznalosti aktivitních koeficientů jednotlivých složek soustavy.

Dalším problémem při výpočtu asociačních konstant je platnost předpokladu, že žádná ze složek nevstupuje do jiné reakce. Tento předpoklad není při použití chirálního selektoru často splněn. V CE jsou totiž běžné interakce chirálního selektoru se složkami základního elektrolytu a s aditivou v BGE. Pokud se některá ze složek soustavy A, L a AL účastní jiných interakcí, není možné vypočítat reálnou hodnotu termodynamické asociační konstanty [2].

Pokud složky soustavy vytvářejí komplex v jiném poměru než 1:1, je taková reakce popsána elementárními kroky podle rovnice 2.25. Jednotlivé konstanty takových kroků se nazývají konsektivní konstanty. Celkové konstanty β , β^0 a β^{th} , popisující celkový proces tvorby komplexu, mohou být vypočítány z naměřených dat nebo z hodnot jednotlivých konsektivních konstant. Pro celkovou stechiometrickou konstantu β , která popisuje proces tvorby komplexu sestávající z n elementárních kroků, charakterizovaných konstantami K_1 , K_2 , ... K_n platí

$$\beta = K_1 K_2 \cdots K_n = \prod_{K_n}^n K_n \quad (2.33)$$

Výpočet asociační konstanty je důležitý mj. u chirálních separací, kdy je třeba získat maximální možný rozdíl mobilit komplexů chirálního selektoru s enantiomery. Z asociačních

konstant komplexů enantiomerů lze podle rovnice 2.34 snadno vypočítat optimální koncentraci chirálního selektoru, při které je rozdíl mobilit komplexů s enantiomery nejvyšší [2].

$$c_{\text{opt}} = (K_{AS,D}K_{AS,L})^{-0,5} \quad (2.34)$$

2.3 Metody kapilární elektroforézy pro určování asociační konstanty

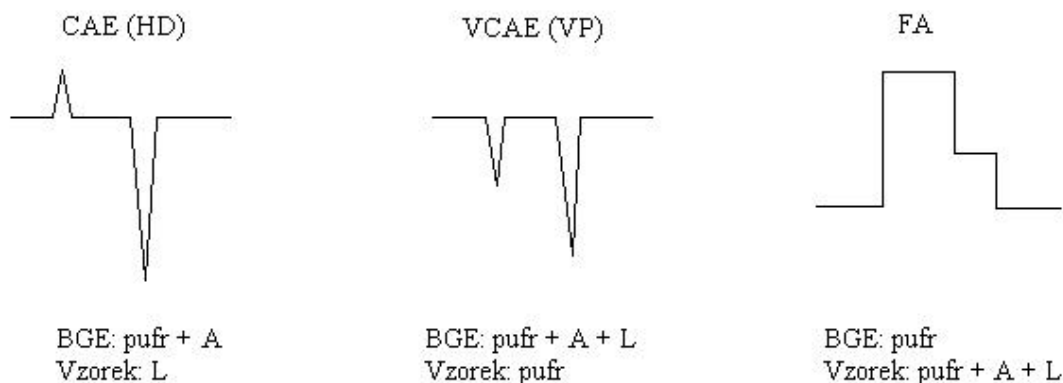
Klasické elektroforetické metody se pro stanovení asociačních konstant, zejména komplexů ion-ligand používají několik desetiletí [1]. V dnešní době jsou studovány různé interakce, jako například protein-protein [30,31], léčivo-protein [32–36], protein-sacharid [37], peptid-antibiotikum [38], antigen-protilátka [39], cyklodextrin-enantiomer [40–44], cyklodextrin-steroidní hormon [45] a další [3,46]. Řada elektroforetických metod k určování asociační konstanty K_{AS} byla vyvinuta z kapalinové chromatografie [1,3]. Metody CE používané k určování asociačních konstant jsou shrnuty v Tab. 2.1.

Tab. 2.1 CE metody používané ke stanovení asociačních konstant komplexu analyt-ligand (AL)

Metoda ^a	Vzorek	Roztok	Stanovení K_{AS}
CAE	A	Pufr + L	Změna mobility A
	L	Pufr + A	Změna mobility L
VCAE	Pufr	Pufr + A + L	Změna mobility A nebo L (vakantní pík)
HD	Pufr + A + L	Pufr + L (nebo A)	Plocha vakantního píku odpovídající [AL]
VP	Pufr	Pufr + A + L	Plocha vakantního píku odpovídající [A]
FA	Pufr + A + L	Pufr	Výška píku odpovídající [A]

^a CAE (kapilární afinitní elektroforéza), VCAE (vakantní kapilární afinitní elektroforéza), HD (Hummel-Dreyerova metoda), VP (metoda vakantního píku), FA (frontální analýza) (upraveno podle [3])

Kromě VCAE byly všechny metody odvozeny z afinitní chromatografie. Všech pět metod uvedených v tabulce 2.1 se používá pro stanovení asociačních konstant. Metodami VCAE, VP, FA a HD je možné také stanovit počet vazebných míst [3,35].



Obr. 2.3 Schématické eluční profily metod používaných ke stanovení asociačních konstant

Asociační konstanty lze stanovit buď ze změny plochy či výšky píku nebo ze změny elektroforetické pohyblivosti látek obsažených v systému. V HD a VCAE závisí plocha píku lineárně na koncentraci analytu, proto se koncentrace volného ligandu $[L_f]$ počítá z plochy píku jako funkce koncentrace analytu. V FA získáme širokou zónu obsahující plato vzhledem k tomu, že je dávkováno relativně velké množství vzorku (běžně 100 – 200 nl). Výška zóny s platem je lineárně závislá na koncentraci analytu. Ve VCAE a CAE je asociační konstanta vypočítána ze závislosti elektroforetické mobility na koncentraci volného a vázaného analytu. Tento způsob je přesnější a není třeba připravovat kalibrační přímkou [3].

2.3.1 Kapilární afinitní elektroforéza

Kapilární afinitní elektroforéza (CAE) je nejpopulárnější CE metoda pro určování asociačních konstant. Mimo jiné je často používána pro analýzu a separaci enantiomerů.

Výzkumem afinitní elektroforézy jako experimentální techniky se zabýval v šedesátých letech minulého století Nakamura [47] se svými kolegy. Roku 1966 publikovali práci, ve které popisovali použití techniky nazvané „křížová elektroforéza“ („cross

electrophoresis“). V jejich metodě byly dva vzorky dávkovány na filtrační papír do dvou nerovnoběžných řádek. Po spuštění elektroforézy se tyto látky zkřížily. Interakce mezi oběmi látkami byly vyhodnoceny na základě deformace řádků v bodě křížení. Na základě této metody Nakamura a jeho spolupracovníci zkoumali množství specifických interakcí jako například protilátky-antigeny, lektiny-glykoproteiny, trypsin-inhibitor trypsinu a enzym-substrát [48]. Pro stanovení asociačních konstant na základě afinitních interakcí byla několik let poté použita gelová elektroforéza na agarosových a polyakrylamidových gelech [49,50] a následně byly odvozeny základní rovnice pro výpočet vazebných konstant [48].

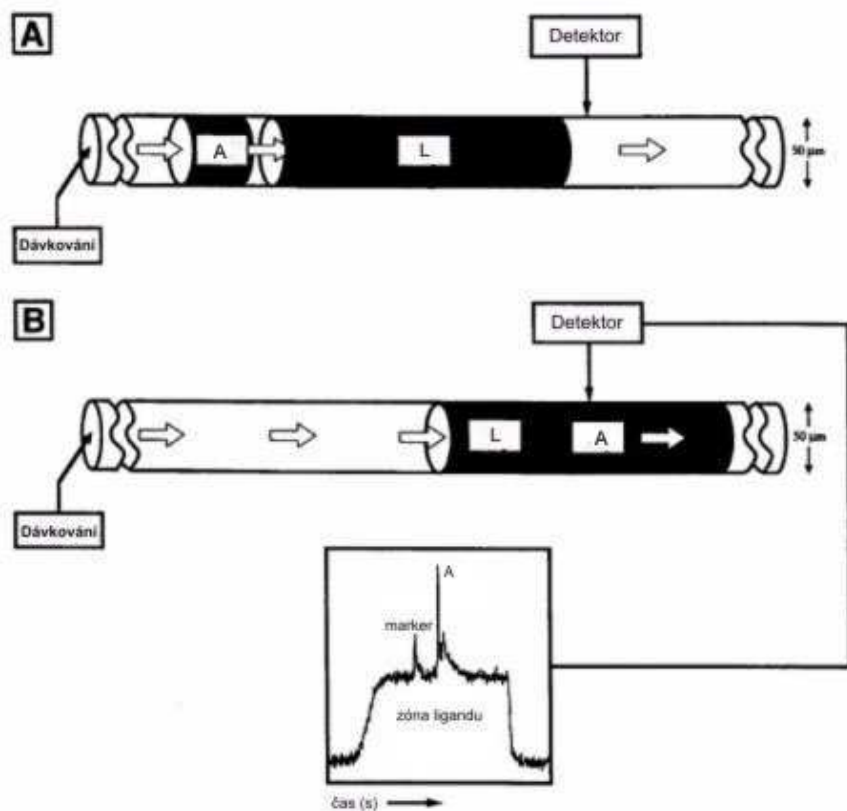
Metoda CAE je založena na faktu, že se elektroforetická pohyblivost mění v závislosti na afinitních interakcích mezi ligandem a analytem. Tyto afinitní interakce jsou způsobeny elektrostatickými vazbami, vodíkovými můstky, hydrofóbním efektem a van der Waalsovými interakcemi [51].

CAE lze provádět dvěma způsoby. Buď obě složky A a L interagují v homogenním roztoku nebo je jedna ze složek imobilizována na stěnách kapiláry, v gelu či na chromatografickém nosiči (kapilární elektrochromatografie). Technika prováděná v homogenním roztoku je více používána, protože je aplikovatelná na široký rozsah analytů [52].

Při použití metody CAE je kapilára naplněna pufrům obsahujícím ligand o různých koncentracích. Dávkováno je malé množství analytu, jehož koncentrace se nemění. Se zvyšující se koncentrací ligandu mobilita analytu postupně klesá. Po ustanovení rovnováhy závisí efektivní mobilita analytu na asociační konstantě. Asociační konstanta je tudíž vypočtena ze změny efektivní mobility analytu. Metoda CAE může být také použita v provedení, kdy je do pufru přidán analyt a v malém množství je dávkován ligand. Výhody CAE jsou následující: potřeba malého množství analytu a ligandu, dávkovaný analyt nebo ligand nemusí být vysoce čistý a asociační konstanty různých analytů nebo ligandů mohou být určovány simultánně. Při CAE může být dávkován i racemát. V posledních letech se CAE uplatňuje ve farmacii při měření fyzikálně chemických parametrů léčiv a při charakterizaci interakcí mezi léčivy a jejich receptory [3].

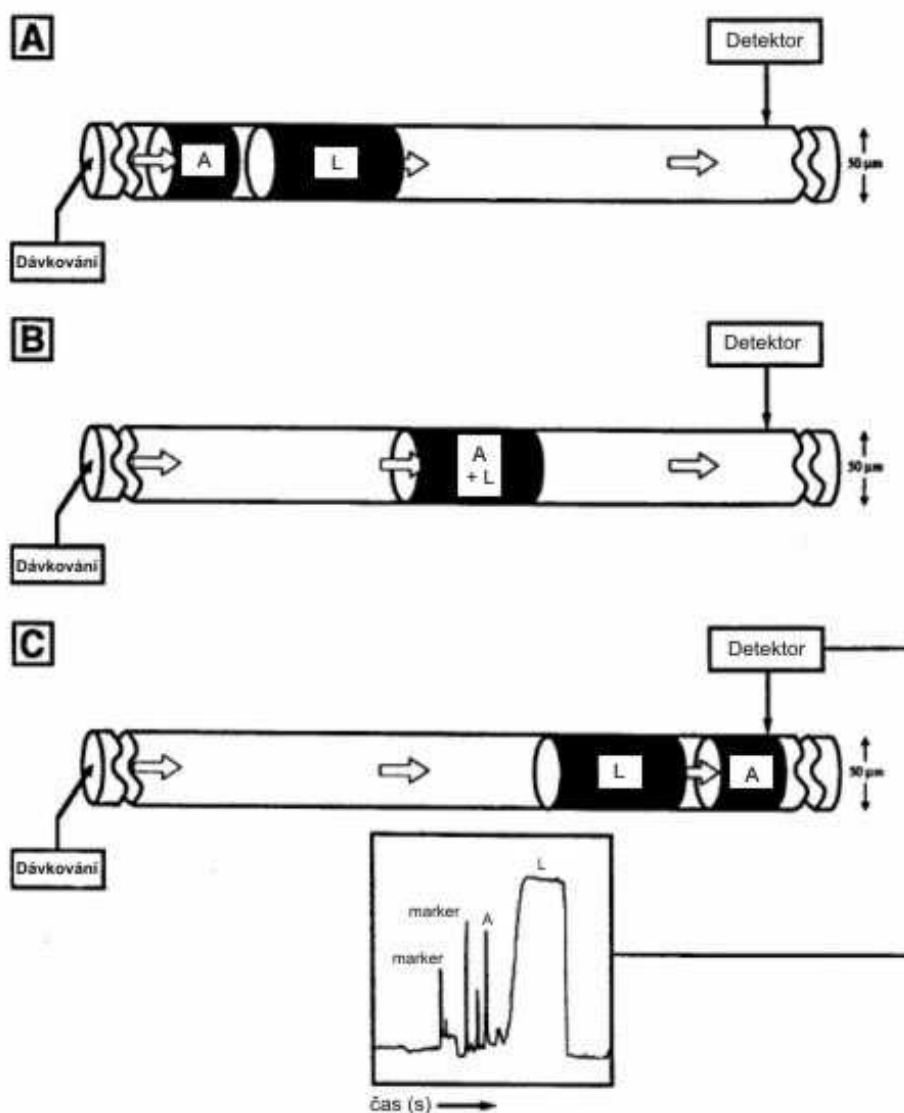
Relativně novou technikou kapilární afinitní elektroforézy je *CAE s částečným plněním* (Partial-filling CAE, Obr. 2.4), kdy je kapilára zčásti naplněna ligandem a posléze je dávkován analyt. Obě zóny po spuštění napětí migrují kapilárou. Rovnováha nastane ve

chvíli, kdy zóna analytu migruje skrz zónu ligandu a obě zóny jsou pak společně detekovány. Asociační konstanta je určena z mobility analytu a ligandu.



Obr. 2.4 CAE s částečným plněním (L -ligand, A – analyt) (upraveno podle [53])

Technika PFCAE, kdy zóna analytu migruje kompletně skrz zónu ligandu, se nazývá *průtoková CAE s částečným plněním* (Flow-through partial-filling CAE, Obr. 2.5) [54].

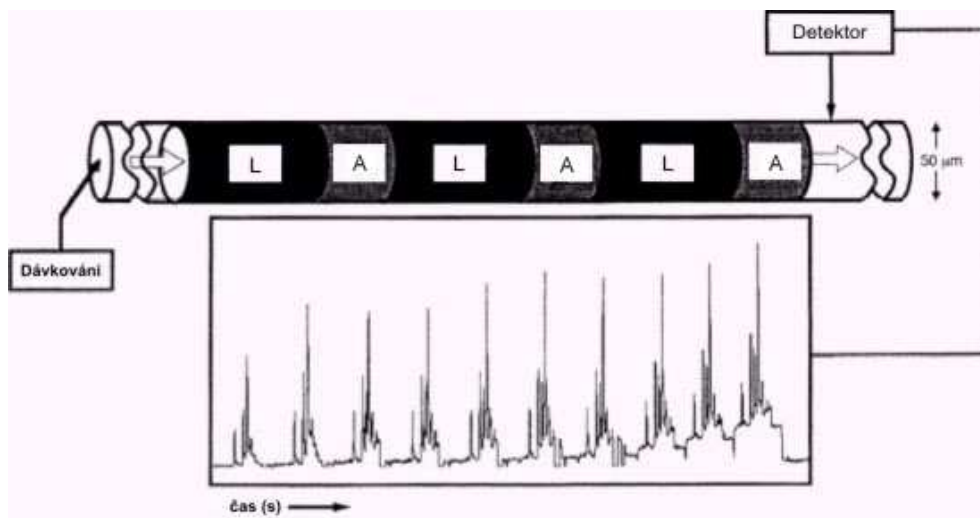


Obr. 2.5 Průtoková CAE s částečným plněním (A - analyt, L - ligand) (upraveno podle [53])

Dalšími možnými provedeními CAE s částečným plněním jsou *kompetitivní průtoková CAE s částečným plněním* (Competitive flow-through partial-filling CAE) a *CAE s částečným plněním se syntézou ligandu v kapiláře* (On-column ligand synthesis partial-filling CAE) [53].

Dále se pro stanovení asociačních konstant používá *CAE s několikanásobným dávkováním ligandu* (analytu) (Multiple-step ligand (analyte) injection capillary affinity electrophoresis, Obr. 2.6) [51], kdy je nejprve dávkována zóna vzorku obsahující neinteragující standard. Za ní následují několikanásobné zóny vzorku obsahující analyt. Nakonec se dávkuje vzorek obsahující sekundární standard. Mezi každým dávkováním

vzorku je dávkována malá zóna pufru, který obsahuje ligand, jehož koncentrace se postupně zvyšuje. Tato metoda umožňuje rychlejší stanovení asociačních konstant než tradiční CAE. Nevýhodou je nutnost použití delší kapiláry [54].



Obr. 2.6 CAE s několikanásobným dávkováním ligandu (A - analyt, L - ligand) (upraveno podle [53])

2.3.1.1 Vyhodnocení experimentálních dat

Efektivní mobilita látky (m_{eff}) přítomné v roztoku v i formách, které jsou v rovnováze, je rovna součtu efektivních mobilit jednotlivých iontových forem, tj. součtu součinů iontových pohyblivostí a molárních zlomků jednotlivých iontových forem (rovnice 2.35).

$$m_{eff} = \sum_i m_i \cdot \frac{c_i}{c} = \sum_i m_i x_i, \quad (2.35)$$

kde m_i je mobilita i -té formy přítomné v roztoku v koncentraci c_i , x_i je molární zlomek i -té iontové složky a $c = c_1 + c_2 + c_3 \dots$.

Pro reakci probíhající podle rovnice 2.25 platí

$$c = [A_f] + [AL]. \quad (2.36)$$

Efektivní mobilita analytu $m_{eff,A}$ je vyjádřena rovnicí 2.37:

$$m_{eff,A} = \frac{[A_f]}{[A_{tot}]} \cdot m_A + \frac{[AL]}{[A_{tot}]} \cdot m_{AL} \quad (2.37)$$

Tu lze dále upravit:

$$m_{eff,A} = \frac{1}{1 + K_{AS}[L_f]} \cdot m_A + \frac{K_{AS}[L_f]}{1 + K_{AS}[L_f]} \cdot m_{AL} \quad (2.38)$$

Pro výpočet asociační konstanty se používá vztah 2.38, který může být použit jako regresní funkce pro metodu nelineární regresní analýzy nebo může být převeden na tři lineární formy (rovnice 2.39, 2.40, 2.41) [1,4,29,55]:

1. Dvojitě reciproké vynesení (Benesi-Hildebrandovo ve spektrofotometrii nebo Lineweaver-Burkovo v enzymových studiích [56])

$$\frac{1}{m_{eff} - m_A} = \frac{1}{(m_{AL} - m_A) \cdot K_{AS}} \cdot \frac{1}{[L_f]} + \frac{1}{m_{AL} - m_A} \quad (2.39)$$

2. y-reciproké vynesení

$$\frac{[L_f]}{m_{eff} - m_A} = \frac{1}{(m_{AL} - m_A)} \cdot [L_f] + \frac{1}{(m_{AL} - m_A) \cdot K_{AS}} \quad (2.40)$$

3. x-reciproké vynesení (Scatchardovo ve studiích vazebného chování proteinů nebo Eadieho v enzymové kinetice [56])

$$\frac{m_{eff} - m_A}{[L_f]} = -K_{AS} \cdot (m_{eff} - m_A) + K_{AS} \cdot (m_{AL} - m_A) \quad (2.41)$$

Asociační konstanta je získána lineárním vynesením experimentálních dat (Tab 2.2) a výpočtem založeným na rovnicích použitých pro linearizaci (rovnice 2.39, 2.40, 2.41) nebo zpracováním dat nelineární regresní analýzou provedenou pomocí počítače. Použití počítače je dnes považováno za nejefektivnější. Převedení K_{AS} na K_{AS}^0 nebo na K_{AS}^{th} je dalším krokem výpočtu.

Tab. 2.2 Získání K_{AS} z grafu (podle [29,57])

Vynesení	Osy	K_{AS}
Dvojitě reciproké	1/y vs. 1/x	b/a
y-reciproké	x/y vs. x	a/b
x-reciproké	y/x vs. y	$-a$

$y = ax + b, y = m_{eff} - m_A, x = [L_f]$

Mobilita volného analytu m_A je dosažitelná experimentálně. To však neplatí pro mobilitu m_{AL} . Stanovení asociační konstanty z jednoho experimentu při koncentraci ligandu $[L_f] \neq 0$ je možné pouze tehdy, známe-li hodnotu m_A a pokud se mobilita komplexu, m_{AL} blíží mobilitě ligandu.

K_{AS}^{th} lze získat extrapolací stechiometrických konstant, získaných při různých iontových silách roztoku. Vynesení logaritmu K_{AS}^0 proti iontové síle I , nebo odmocnině iontové síly $I^{1/2}$, je lineární. Pro roztoky o nízké iontové síle $I \leq 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ (iontové síly BGE používaných v elektroforéze mohou se pohybují v řádech 10^{-2} až $10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$) lze použít tzv. Debye-Hückelův limitní zákon (rovnice 2.42), z něhož lze vypočítat střední aktivitní koeficient, γ_{\pm} pro komplexy 1:1

$$\log \gamma_{\pm} = -\frac{az_1z_2\sqrt{I}}{1+bw\sqrt{I}} \quad (2.42)$$

Koeficienty a a b jsou parametry závislé na teplotě a na permitivitě kapalného média a jsou tabelovány; z_1 a z_2 jsou nábojová čísla iontů tvořících elektrolyt a w je efektivní průměr iontu.

Iontová síla je vyjádřena rovnicí 2.43:

$$I = \frac{1}{2} \sum_i c_i z_i^2 \quad (2.43)$$

kde c_i a z_i jsou koncentrace a nábojové číslo i -té složky roztoku. Běžně se pro zředěný roztok zavádí, že individuální aktivitní koeficient γ je roven střednímu aktivitnímu koeficientu, γ_{\pm} . Pro zředěné vodné BGE při teplotě 25 °C, jejichž iontová síla se pohybuje v řádech milimolů, je tvar Debye-Hückelova limitního zákona následující:

$$\log \gamma_{\pm} = -\frac{0,585 z^2 \sqrt{I}}{1+0,3281 w \sqrt{I}} \quad (2.44)$$

kde z je nábojové číslo iontu. Hodnota efektivního průměru iontu, w není většinou známa. Jako obecně použitelná je doporučena přibližná hodnota 0,5 nm pro malé ionty. Tato hodnota je také používána při výpočtu acidobazických disociačních konstant slabých elektrolytů z efektivních mobilit měřených elektroforeticky [2].

2.3.2 Metoda vakantního píku

Při metodě vakantního píku (VP) jsou analyt a ligand rozpuštěny v BGE. Koncentrace jedné složky je zachována konstantní, koncentrace druhé složky se mění. Po nadávkování pufru bez obsahu analytu nebo ligandu se objeví dva negativní píky. Jeden souvisí s koncentrací volného analytu, druhý s koncentrací komplexu AL a koncentrací volného ligandu [35,58]. Asociační konstanta se vypočítá z koncentrace volného analytu, kterou určíme z plochy (nebo výšky) píku [1,35].

2.3.3 Vakantní afinitní kapilární elektroforéza

Vakantní afinitní kapilární elektroforéza (VCAE) je relativně nová metoda pro stanovení asociačních konstant. Kapilára je plněna puftrem obsahujícím analyt i ligand, dávkován je pufr bez přídavku ligandu nebo analytu [1,3,51,59]. Průběžně se mění koncentrace jedné složky (běžně se nechává konstantní koncentrace analytu) [3,59]. Přítomnost analytu a ligandu v pufru způsobuje velkou odezvu na detektoru [51,59]. V elektroforegramu jsou stejně jako u metody VP zaznamenány dva negativní píky [1]. Jeden odpovídá zóně, která je deficitní na analyt, druhý odpovídá zóně deficitní na ligand [51,59]. Migrační čas odpovídá stupni komplexace [51]. Asociační konstanta je stanovena ze změny migračního chování analytu v závislosti na změně koncentrace ligandu, stejně jako u CAE. VCAE metoda je obzvlášť vhodná pro stanovení asociačních konstant analytů špatně rozpustných ve vodě, vzhledem k tomu, že rozpustnost analytu v přítomnosti ligandu v pufru stoupá. VCAE se používá kromě stanovení asociačních konstant také pro stanovení počtu vazebných míst [3,59].

2.3.4 Hummelova-Dreyerova metoda

V Hummelově-Dreyerově metodě (HD) je kapilára naplněna puftrem obsahujícím analyt, zatímco ligand je dávkován jako vzorek. Komplex AL migruje a nechává za sebou zónu se sníženou koncentrací analytu, která je detekována jako negativní pík a její plocha souvisí s koncentrací navázaného analytu. Druhý, pozitivní pík přísluší komplexu AL [1,34,35]. Asociační konstanta je posléze vypočtena z plochy vakantního píku odpovídajícího koncentraci analytu [48]. Vzhledem k tomu, že se měří koncentrace navázaného ligandu, je metodou HD možné stanovit stechiometrii interakce [35].

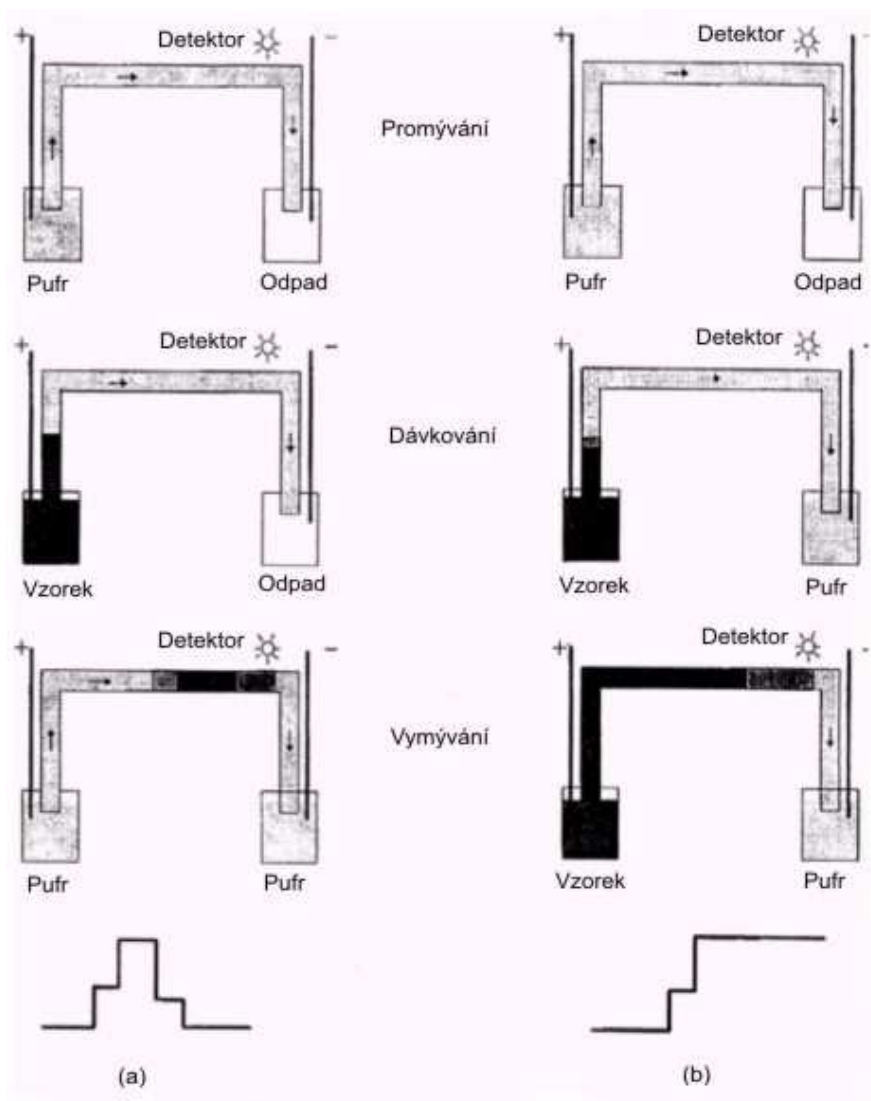
2.3.5 Frontální analýza

Frontální analýza (FA) byla poprvé použita roku 1964 při studiu interakcí protein-protein gelovou filtrací [60]. V CE formátu se frontální analýza objevila roku 1992 [61]. Princip metody je následující: Analyt a ligand jsou smíchány před analýzou a posléze jsou dávkovány jako jedna rozsáhlá zóna (asi 60-200 nl) do kapiláry naplněné BGE [1,58]. Po vytvoření rovnováhy jsou od sebe separovány volné a vázané složky soustavy [32]. Důležité je, aby mobilita analytu byla dostatečně odlišná od mobility ligandu a mobility komplexu AL [1]. Stejně jako u CAE zůstává koncentrace jedné látky konstantní, koncentrace druhé látky se v průběhu analýzy mění [58]. Asociační konstanta je vypočítána z mobility volného analytu. FA lze použít pro komplexy s asociačními konstantami v rozmezí $10^3 - 10^8 \text{ M}^{-1}$. U slabších interakcí (konstanty menší než 10^3 M^{-1}) je obtížné experimentálně zjistit rozdíl mezi frontálními zónami komplexu AL a analytu. V takovém případě je vhodné použít CAE. Na druhou stranu, pokud je asociační konstanta větší než 10^8 M^{-1} , bude koncentrace analytu ve srovnání s koncentrací komplexu nízká a výška píku, který přísluší analytu, příliš malá [3].

FA se stejně jako ostatní metody používá při separaci enantiomerů. Rozdělení enantiomerů je dosaženo již ve vialce se vzorkem. Díky tomu jsou při analýze dosaženy rozdílné mobility enantiomerů jako funkce rozdílných asociačních konstant [3].

V nedávné době se z FA vyvinula metoda nazvaná *kapilární elektroforéza s kontinuální frontální analýzou* (Frontal analysis continuous capillary electrophoresis, FACCE). Rozdíl mezi FA a FACCE spočívá v tom, že při FACCE je vzorek dávkován po

celou dobu analýzy (Obr. 2.7). Výhodou FACCE jsou nižší detekční limity. Nevýhodou oproti FA je větší spotřeba vzorku [3].



Obr. 2.7 Schéma běžně používané FA (a) a FACCE (b) (upraveno podle [3])

2.4 Peptidy

2.4.1 Analýza peptidů kapilární elektroforézou

Peptidy jsou organické sloučeniny složené ze dvou a více aminokyselin spojených peptidovými vazbami nebo disulfidovými můstky. Peptidy představují velkou skupinu biologicky aktivních látek. Velkou roli hrají v řízení a regulaci mnoha procesů v živých organismech. V organismu se vyskytují například jako hormony, neurotransmitery, koenzymy, enzymové substráty a inhibitory, léčiva, toxiny a antibiotika [62].

Náboj a tvar peptidů závisí na počtu a typu aminokyselinových zbytků a na jejich pořadí v peptidovém řetězci. Z tohoto důvodu se různé peptidy liší svojí elektroforetickou pohyblivostí a tím pádem jsou elektromigrační metody vhodné pro jejich separaci. Jejich efektivní elektroforetická pohyblivost je funkcí vlastností peptidu (tvar, velikost, přítomnost ionogenních skupin), vlastností základního elektrolytu (složení, pH, viskozita aj.) a interakcí peptidu se složkami média [63].

Z fyzikálně-chemického hlediska jsou peptidy amfolytické (poly)elektrolyty neboli (poly)amfolyty. Amfolyty nesou kladný, záporný nebo nulový náboj podle pH okolního prostředí. Efektivní náboj peptidů je dán sumou nábojů všech iontových skupin přítomných v polypeptidovém řetězci. Z přítomných iontových skupin v polypeptidovém řetězci a jejich disociačních konstant je možné odhadnout, které skupiny jsou disociovány v daném pH a jak přispívají k efektivnímu náboji. Aminokyseliny asparagová a glutamová kyselina způsobují přítomnost záporného náboje na peptidovém řetězci, lysin, arginin a histidin jsou zdrojem kladného náboje na peptidovém řetězci [63].

Důležitou vlastností peptidů je jejich izoelektrický bod (pI). Jde o pH roztoku, při kterém je efektivní náboj peptidu nulový (počet kladných nábojů je roven počtu záporných nábojů), a tudíž i jeho efektivní mobilita se při tomto pH rovná nule. pI lze určit z acidobazických disociačních konstant ionogenních skupin peptidu, pK_i :

$$pI = \frac{\sum_{i=1}^n pK_i}{i} \quad (5.1)$$

Elektroforetická pohyblivost peptidů je popsána vztahem:

$$m = k \cdot \frac{q}{M_r^a} \quad (5.2)$$

kde m je elektroforetická pohyblivost, k je konstanta proporcionality, q je efektivní náboj, M_r je relativní molekulová hmotnost a a je konstanta nabývající hodnoty od 1/3 do 2/3. Hodnota čísla a se mění podle vlastností peptidu a separačního prostředí [64].

Nejčastěji používanou detekcí peptidů v CE je UV-absorpční detekce v oblasti, ve které absorbuje peptidová vazba, tedy v rozsahu vlnových délek 200 až 220 nm. Čím delší je peptidový řetězec a větší počet peptidových vazeb, tím intenzivnější je odezva signálu při stejné molární koncentraci. Citlivost se může též zvýšit použitím speciálních typů detekčních cel, jako jsou například cely ve tvaru Z, U, „sleeve“ nebo bubliny. Peptidy obsahující v řetězci aromatické aminokyselinové zbytky mohou být detekovány při vlnové délce 275-280 nm anebo s nižší citlivostí při 254 nm. Nejvyšší molární absorpční koeficient mají tryptofan a tyrosin, nižší hodnotu molárního absorpčního koeficientu má fenylalanin [63].

Citlivou detekční technikou v CE je laserem indukovaná fluorescenční detekce (LIF). Její citlivost je o dva až tři řády vyšší než UV-absorpční detekce. Pro tuto detekci je nutné provést derivatizaci peptidů fluorescenčními značkami. Peptidy a proteiny obvykle obsahují více derivatizačních center v molekule a tudíž může docházet ke vzniku více produktů derivatizační reakce jedné látky. Často používaná derivatizační činidla reagující s aminoskupinou jsou naftalen-2,3-dikarboxyaldehyd, furoylchinolin-3-karboxyaldehyd, fluorescein isothiokyanát a (4-karboxybenzoyl)chinolin-2-karboxyaldehyd. Bez derivatizace mohou být detekovány pouze peptidy obsahující aromatické aminokyseliny s excitační vlnovou délkou 240-280 nm [63].

Elektrochemická detekce není příliš používanou detekcí v kapilární elektroforéze peptidů. Do elektrochemické detekce můžeme zařadit detekci amperometrickou, voltmetrickou a vodivostní. Amperometrická a voltmetrická detekce, jsou techniky vysoce citlivé i selektivní a používají se pro peptidy obsahující oxidovatelné a redukovatelné funkční skupiny, tedy pro peptidy obsahující aminokyseliny jako tyrosin, cystein nebo tryptofan. Univerzální bezkontaktní vodivostní detekcí lze detekovat všechny peptidy bez omezujících požadavků na jejich strukturu [63].

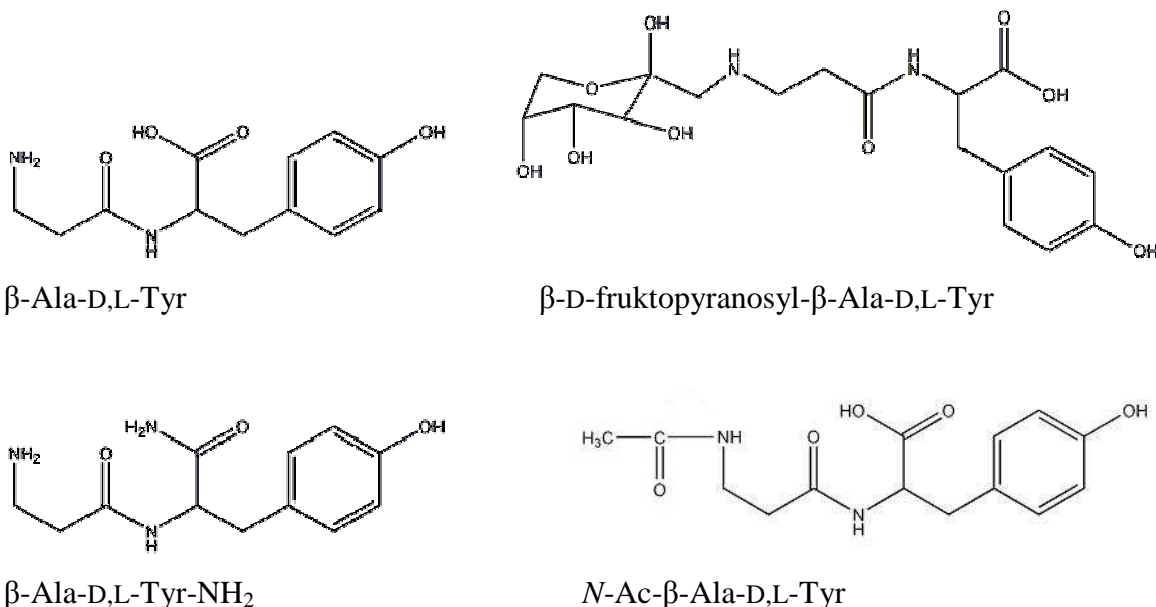
Hmotnostní spektrometrie (MS) je ideální detekční postup pro analýzu a určování struktury peptidů a bílkovin. Nejběžněji používaným iontovým zdrojem při spojení CZE-MS je elektrosprej (ESI) a ionizace laserem za přítomnosti matrice (MALDI), které umožňují

nejen rychlou charakterizací elektroforeticky separovaných peptidů jejich relativními molekulovými hmotnostmi, ale také poskytují důležité informace o struktuře a sekvenci aminokyselin v řetězci, o post-translačních modifikacích, peptidových mapách bílkovin a o nekovalentních interakcích peptidů [63].

2.4.2 Dipeptid β -Ala-D,L-Tyr a jeho deriváty

β -Alanyl-D,L-tyrosin (β -Ala-D,L-Tyr), dipeptid složený ze dvou aminokyselin β -alaninu a tyrosinu, byl nalezen v hemolymfě larev masařky *Neobellieria bullata*. Tento dipeptid patří do skupiny antimikrobiálních peptidů, které jsou v poslední době studovány jako slibní kandidáti pro nová antibiotika. Jeho antimikrobiální aktivita byla prokázána u bakterií *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* a *Pseudomonas aeruginosa* v milimolárních koncentracích. V těle dospělých jedinců masařky a jiného hmyzu způsobuje paralýzu až smrt [65].

V rámci diplomové práce byly metodou CAE určovány asociační konstanty pro komplexy enantiomerů dipeptidu β -Ala-D,L-Tyr a jeho derivátů s chirálním selektorem 2-hydroxypropyl- β -cyklodextrinem. Struktury analyzovaných peptidů jsou zobrazeny na Obr. 2.8.

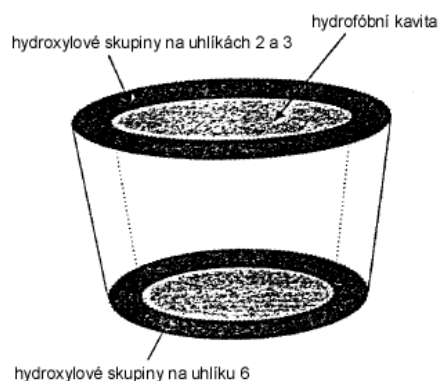


Obr. 2.8 Struktury analyzovaných dipeptidů

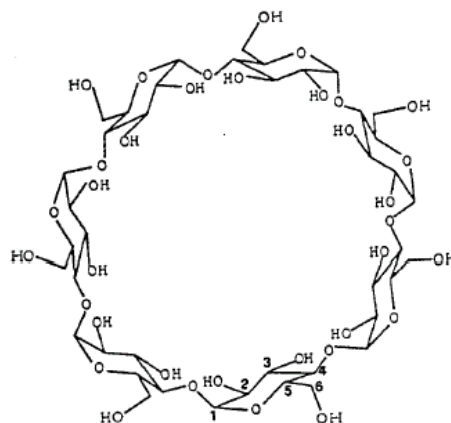
2.5 Cyklodextriny

2.5.1 Základní charakteristiky a využití

Cyklodextriny (CD) jsou neutrální cyklické neredukující oligosacharidy mající tvar komolého kužele (Obr. 2.9). Obsahují 6 až 13 glukopyranózových jednotek (Obr. 2.10) [66–68].



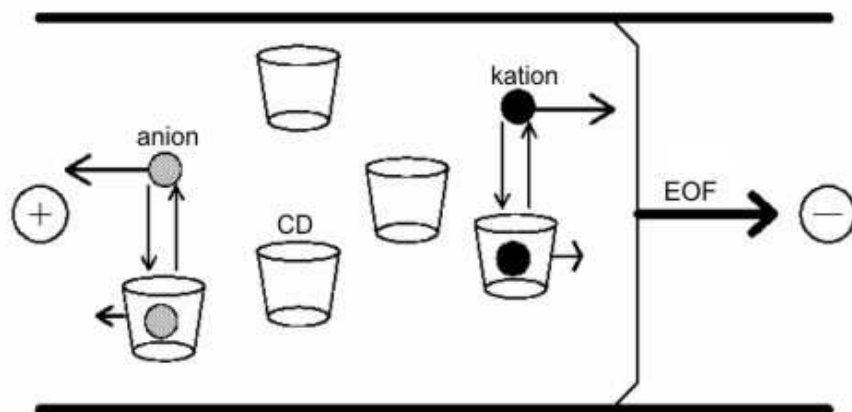
Obr. 2.9 Schematická struktura CD



Obr. 2.10 Chemická struktura β -cyklodextrinu

CD jsou známy již dlouhou řadu let. Poprvé je připravil Villiers roku 1891 rozkladem škrobu za pomoci bakterie *Bacillus amylobacter* [69]. Roku 1903 Schardinger potvrdil jejich cyklickou strukturu [70]. V dnešní době je komerčně dostupných více než 50 různých cyklodextrinů [66–68].

CD vytvářejí s řadou látek inkluzní (host-guest) komplexy (Obr. 2.11), které jsou stabilizovány sekundárními vazbami mezi okrajem CD a funkčními skupinami analytu [41]. CD jsou populárními selektory v CE a dalších separačních metodách. Významné je jejich použití při enantiomerních separacích, kdy dochází k rozdílné interakci enantiomerů s molekulou cyklodextrinu a k vytvoření diastereoizomerních sloučenin. CD se používají k enantioseparacím nejen v kapilární elektroforéze, ale i v HPLC a GC. Kromě toho se používají ke zlepšení separační selektivity pro poziční izomery a jiné achirální látky mající podobné struktury [68,71]. Jsou to mj. peptidy, proteiny a malé achirální molekuly [68]. Přednostmi CD jsou: dobrá rozpustnost ve vodných roztocích, nízká absorpce záření v UV oblasti, nízká cena, vysoká selektivita a možnost derivatizace [29,41,72,73].



Obr. 2.11 Schéma tvorby inkluzního komplexu kationtu a aniontu s neutrálním CD v CE a rychlosti migrace vytvořeného komplexu, volného kationtu a aniontu a EOF

Vhodné vlastnosti CD (zvýšení rozpustnosti špatně rozpustného analytu, stabilizace labilních hostujících molekul, kontrola těkavosti a sublimace, změna chuti a vůně maskováním nepříjemných zápachů a příchutí aj.) umožňují jejich použití v řadě oborů a oblastí. Používají se například v potravinách a ochucovadlech, kosmetice, textilním průmyslu, při výrobě léčiv ve farmaceutickém průmyslu, při výrobě obalů, při kvasných a katalytických procesech atd. [74].

Použití cyklodextrinů je významné také v oblasti životního prostředí. Zde se používají ke zlepšení rozpustnosti organických polutantů ve vodě a k odstranění organických látek a těžkých kovů z půdy, vody a ovzduší. Díky tvorbě inkluzních komplexů mohou být odstraněny toxické látky z odpadních vod z průmyslových výrob [74]. Rovněž bylo diskutováno jejich použití při bioremediaci půdy ex-situ [75]. Další aplikace CD v oblasti životního prostředí jsou popsány v přehledném článku [74].

CD se používají v nativním stavu, chemicky modifikované, polymerizované nebo ve směsích [67,72,73].

2.5.2 Cyklodextriny v nativním stavu

Pro separace se používají cyklodextriny α , β a γ , které obsahují 6, 7 a 8 glukózových jednotek [66,68,76]. Tyto CD mají rozdílné rozměry dutiny, rozpustnost a relativní molekulovou hmotnost (Tab. 2.3). Hloubka dutiny je však stejná, a to 0,79 nm [66]. Molekula nebo její část, která se vmezeří do kavity cyklodextrinu, může být poměrně velká [72].

Rozpustnost CD závisí na počtu α -1,4-glykosidicky vázaných glukopyranóz [73]. Z cyklodextrinů, které se používají např. pro enantioseparace, je nejméně rozpustný β -CD [68]. CD mají relativně hydrofóbní kavitu, avšak z vnější strany jsou díky hydroxylovým skupinám hydrofilní [66,68]. Každá D-glukózová jednotka obsahuje pět asymetrických uhlíků, z čehož vyplývá, že cyklodextrinový makrocyklus je chirální [68].

Tab. 2.3 Vlastnosti cyklodextrinů (podle [25,68,76])

	α -cyklodextrin	β -cyklodextrin	γ -cyklodextrin
Počet glukózových jednotek	6	7	8
Počet hydroxylových skupin	18	21	24
Počet primárních hydroxylů	6	7	8
Počet sekundárních hydroxylů	12	14	16
Relativní molekulová hmotnost	972	1135	1297
Vnitřní průměr dutiny (nm)	0,47 – 0,52	0,60 – 0,64	0,75 – 0,83
Vnější průměr dutiny (nm)	1,46 \pm 0,04	1,54 \pm 0,04	1,75 \pm 0,04
Hloubka dutiny (nm)	0,79 – 0,80	0,79 – 0,80	0,79 – 0,80
Objem dutiny (nm ³)	0,176	0,346	0,510
Počet molekul vody v kavitě	5	11	17
Bod tání (K)	551	572	540
Rozpustnost ve vodě při 25°C (g/100 ml)	14,5	1,85	23,2
p <i>K</i> _a rozpětí hydroxylových skupin	12,1 – 12,6	12,1 – 12,6	12,1 – 12,6
Specifická rotace, [α] _D ²⁵	150,5 \pm 0,5	162,5 \pm 0,5	177,4 \pm 0,5
Hustota (g/cm ³)	1,42 – 1,45	1,42 – 1,45	1,42 – 1,45

Často používaným komplexačním činidlem je β -CD. Do jeho kavity se může vmezeřit mnoho typů hydrofóbních organických sloučenin nebo také hydrofilní ionty [68]. Molekuly, které vytvářejí s β -CD komplexy, jsou například alifatické uhlovodíky, aldehydy, ketony, alkoholy, karboxylové kyseliny, aromatické uhlovodíky, halogeny, oxokyseliny, aminy [74].

Neutrální CD mohou být v CE použity pouze pro separaci nabitých analytů. Ve chvíli, kdy analyt vytvoří s cyklodextrinem komplex, je jeho mobilita snížena v důsledku změny velikosti molekuly (Obr. 2.11).

Jedna z důležitých aplikací neutrálních CD je CE separace peptidů. Separace peptidů se stejným nebo podobným poměrem relativní molekulové hmotnosti a náboje je obtížná. Při použití CD se selektivita separace zvyšuje. Pomocí CD se také separují barviva z potravin [77,78], léčiva z biologických vzorků [79], aromatické polohové izomery [80], rostlinné látky [81,82] a další chemické látky [68].

2.5.3 Derivatizované cyklodextriny

Derivatizace CD probíhá na primárních a sekundárních hydroxylech molekuly, přičemž primární (C-6) hydroxyly jsou reaktivnější než sekundární (C-2 a C-3). Selektivní substituce lze dosáhnout použitím přímých selektivních reakcí nebo nepřímo, neselektivními reakcemi doprovázenými selektivním chráněním funkčních skupin. Chemické modifikace CD vedou ke vzniku heterogenních směsí CD, které musejí být před použitím separovány a čištěny [68].

Podle charakteru funkční skupiny se dělí derivatizované cyklodextriny na nenabitě a nabitě. Nenabitě funkční skupiny jsou např. methyl, hydroxyethyl a acetyl. Tyto skupiny modifikují hloubku a otevření kavity. Nabité funkční skupiny jsou karboxyl, fosfát, alkylsulfát, methylaminoskupiny a další. Tyto skupiny rovněž mění parametry kavity a navíc jsou schopny coulombických interakcí [29].

Zavedením funkční skupiny do molekuly CD lze dosáhnout změny jeho vlastností. Například methylovaný CD je stabilnější než jeho mateřský cyklodextrin. Při substituci hydroxyly např. methylem, hydroxyethylem, hydroxypropylem nebo acetylem se také zvyšuje rozpustnost CD ve vodě [40,68]. Většina derivatizovaných cyklodextrinů jsou β -CD [68].

Použití nabitých CD umožňuje CE analýzu nabitých i nenabitých analytů. Separace a detekce neutrálních analytů je velmi důležitá v analýze životního prostředí, protože některé polutanty a toxiny jsou nenabitě a nerozpustné ve vodě, jako například polychlorované bifenyly, polychlorované dibenzodioxiny a polycyklické aromatické uhlovodíky a jejich deriváty [68]. Jednou z možných aplikací CE se záporně nabitými CD je separace a detekce fenolických sloučenin z kontaminované vody a půdy [83] nebo detekce směsí karcinogenních polycyklických aromatických uhlovodíků, kdy lze také použít směs neutrálních a záporně

nabíých CD [84]. Při použití CD k separaci enantiomerů různých typů je účinnost separace ovlivněna použitím cyklodextrinů s různými substituenty a s různým počtem hydroxylových skupin [72].

Kladně nabitě mohou být například CD obsahující aminoskupinu, alkylaminoskupinu nebo jinak vázaný atom dusíku. Mezi záporně nabitě CD patří například ty, které obsahují sulfoskupiny, karboxymethyl, karboxyethyl, sukcinyl, sulfoethyl a sulfobutyl [68].

V závislosti na použité funkční skupině, může být CD nabitý při nízkém pH (při použití CD obsahujících aminoskupinu), vysokém pH (funkční skupinou je například karboxyl, karboxyethyl a sukcinyl) a v celé škále pH (funkční skupinou může být sulfát nebo sulfobutylether) [41].

CD je možné také použít v polymerní formě. Největší výhodou použití polymerů CD je vyšší rozpustnost oproti monomerům. Nevýhodou je nutnost použití polymerizačních činidel. Schopnost enantioselekce není stejná jako u monomeru [73]. Polymery CD se mohou adsorbovat na stěnu kapiláry a tím ovlivňovat rychlost a směr elektroosmotického toku [41].

V Tab. 2.4 jsou uvedeny příklady nativních a derivatizovaných CD použitých k stereoselektivním a enantioselektivním separacím různých analytů, zejména pak peptidů a aminokyselin.

Tab. 2.4 Příklady cyklodextrinů použitých k CE separaci různých analytů

	CD	Analyt	Reference	
Nativní CD	α -CD	3-nitrofenol, 4-nitrofenol	[85]	
		kyseliny salicylová a sorbová	[86]	
		fenylalanin, tyrosin, tryptofan	[87,88]	
	β -CD	L-Ala-L-Phe, D-Ala-L-Phe, L-Ala-D-Phe, D-Ala-D-Phe		[71]
		3-nitrofenol, 4-nitrofenol		[85]
		kyseliny salicylová a sorbová		[86]
		guanidin a jeho deriváty		[89]
		DOPA, HVA , HIA		[90]
		di- a tripeptidy		[91]
	γ -CD	guanidin a jeho deriváty		[89]
		deriváty aminokyselin (citrulin, serin, homoserin, tyrosin, fenylalanin, histidin, threonin, leucin, norleucin, izoleucin, valin, norvalin, asparagin, ornithin, lysin, prolin, aspartát, glutamát)		[92]
		peptidy (např. Gly-Met, Gly-Phe)		[91]
Derivatizované CD	Heptakis(2,3-di- <i>O</i> -acetyl)- β -CD	různé aminokyseliny (např. valin)	[93]	
	2,6-di- <i>O</i> -methyl- γ -CD	aminokyseliny	[94]	
	3,6-di- <i>O</i> -methyl- γ -CD	(α -naftalensulfonyl- nebo β -naftalensulfonyl- alanin, valin, norvalin, leucin, norleucin, fenylalanin)		
	Komerční amfoterní β -CD	asparagin, kyselina α -aminobutanová, glutamát, serin, valin, norleucin, leucin, fenylalanin	[95]	
	Karboxymethyl- β -CD	dipeptidy (Asp-PheOMe, β -Asp-PheOMe, Asp-PheNH ₂ , β -Asp-PheNH ₂)	[96,97]	
	Karboxymethyl- β -CD polymer	aminokyseliny (Arg, Lys, His)	[98]	
	Heptakis(2,6-di- <i>O</i> -methyl)- β -CD	3-(3-karboxyfenyl)alanin, 3-karboxyfenylglycin, 3-(3-karboxy-4-hydroxyfenyl)alanin, Trp, Ala, Val, Ile, Met, Pro, Cys, Lys, Ser, Thr, Asn, Gln, Phe, Tyr, His)	[98,99]	
	2-hydroxypropyl- β -CD	deriváty aminokyselin, kyselina dansylasparagová, kyselina dansyl- α -aminokapronové, kyselina 2-fenoxypropanová, dansylfenylalanin		[100]
		D-Dns-Phe, D-Dns-Trp, D-Dns-Val		[101]
L-Dns-Phe, L-Dns-Trp, L-Dns-Val				

CD	Analyt	Reference
(Kvartérní amonium)- β -CD	aminokyseliny (aminobutanová, Glu, Leu, Met, norleucin, norvalin, Phe, Ser, Thr, Trp, Val)	[102]
Trimethylamonio-deoxy- β -CD	acetyl-D-Phe, acetyl-L-Phe	[103]
Sulfobutylether- β -CD	monomery peptidových nukleových kyselin	[104]
6-deoxy-6- <i>N</i> -histamino- β -CD	monomery peptidových nukleových kyselin	[104]
Sulfobutyl(IV)ether- γ -CD	derivatizované aminokyseliny, dansyl (Leu, Val, norvalin)	[105]
Sulfo- β -CD	dipeptidy (Asp-PheOMe, Asp-PheNH ₂)	[106]
	analoga nukleosidů	[107]
	D-Ala-D-Phe, L-Ala-L-Phe, D-Ala-D-Tyr, L-Ala-L-Tyr, D-Asp-D-PheOMe, L-Asp-L-PheOMe, D-Phe-D-Ala, L-Phe-L-Ala, D-Phe-D-Phe, L-Phe-L-Phe	[108]
	D-Phe, D-Trp, D-Tyr	[109]
	Heptakis(2,3,6-tri- <i>O</i> -methyl)- β -CD	aminokyseliny (Ile, Pro, Trp)
Heptakis(6-hydroxy-ethylamino-6-deoxy- β -CD)	aminokyseliny (Glu, Asp)	[111]
Heptakis(2,3-diacetyl-6-sulfato)- β -CD	D-Ala-D-Phe, L-Ala-L-Phe, D-Ala-D-Tyr, L-Ala-L-Tyr, D-Asp-D-PheOMe, L-Asp-L-PheOMe, D-Phe-D-Ala, L-Phe-L-Ala, D-Phe-D-Phe, L-Phe-L-Phe	[108]
Heptakis-6-sulfato- β -CD	D-Ala-D-Phe, L-Ala-L-Phe, D-Ala-D-Tyr, L-Ala-L-Tyr, D-Asp-D-PheOMe, L-Asp-L-PheOMe, D-Phe-D-Ala, L-Phe-L-Ala, D-Phe-D-Phe, L-Phe-L-Phe	[108]
Hydroxypropyl- α -CD	atofin, baklofen, nicardipin, promethazin	[112]

Derivatizované CD

3 VÝZKUMNÉ CÍLE

Hlavním cílem diplomové práce bylo:

- stanovit asociační konstanty komplexů enantiomerů dipeptidu β -Ala-D,L-Tyr a jeho derivátů β -D-fruktopyranosyl- β -Ala-D,L-Tyr (Fru- β -Ala-D,L-Tyr), *N*-Ac- β -Ala-D,L-Tyr a β -Ala-D,L-Tyr-NH₂ s vhodným stereoselektivím komplexačním činidlem (cyklodextrinem) kapilární elektroforézou (CE).

Dílčí cíle této práce byly:

- výběr vhodného stereoselektivního komplexačního činidla (cyklodextrinu) pro chirální separaci výše uvedených látek
- proměření závislosti rozlišení CE separací analyzovaných látek na pH a koncentraci chirálního selektoru
- ze závislosti efektivní mobility analytu na koncentraci cyklodextrinu v základním elektrolytu vypočítat asociační konstanty pro dané látky při určitém pH

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Chemikálie

Všechny použité chemikálie dosahovaly stupně čistoty p. a. a byly dodány těmito firmami:

- 2-hydroxypropyl- β -cyklodextrin firmou Sigma Aldrich (Praha, ČR)
- dimethylsulfoxid (DMSO), kyselina fosforečná, tetraboritan sodný (borax), kyselina mravenčí a hydroxid sodný firmou Lachema (Brno, ČR)
- tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris) firmou Serva (Heidelberg, Německo)

Základní elektrolyty byly filtrovány přes 0,45 μ m filtr (Millipore, Bedford, MA, USA).

4.2 Úprava vzorků

V rámci práce byly analyzovány tyto syntetizované látky β -Ala-D-Tyr, β -Ala-L-Tyr, Fru- β -Ala-D-Tyr, Fru- β -Ala-L-Tyr, *N*-Ac- β -Ala-D-Tyr, *N*-Ac- β -Ala-L-Tyr, β -Ala-D-Tyr-NH₂ a β -Ala-L-Tyr-NH₂. Tyto látky byly syntetizovány v Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR [113]. Byly vytvořeny směsi L a D enantiomerů v poměru L:D = 1:2. Analyty byly rozpuštěny v destilované vodě, koncentrace jejich roztoků byla 1 mg/ml.

4.3 Přístrojové vybavení

Měření bylo provedeno v komerčním zařízení P/ACE MDQ System (Beckman-Coulter, CA, USA). Tento přístroj je plně automatický, jeho řízení, sběr a zpracování dat je prováděno pomocí softwaru P/ACE System MDQ, verze Karat (Beckman-Coulter, Fullerton, CA, USA). Použité křemenné kapiláry vně pokryté polyimidem byly dodané firmou Polymicro Technologies (Phoenix, AR, USA), měly vnitřní průměr 50 μ m, vnější průměr 375 μ m, celkovou délku 394 (resp. 395) mm a efektivní délku 292 (resp. 294) mm. Kapilára byla chlazená kapalinou na standardní teplotu 25 °C. Dávkování vzorku bylo hydrodynamické. Látky byly detekovány UV-absorpčním detektorem s diodovým polem (PDA) s vlnovým rozsahem 190-300 nm.

Kapilára byla postupně promývána 0,1 M hydroxidem sodným (případně 1 M hydroxidem sodným), vodou a základním elektrolytem, a to vždy pod tlakem 1000 mbar po dobu 5-10 minut. Následně byly vnitřní stěny kapiláry a elektroosmotický tok stabilizovány napětím 12 kV po dobu 10 minut. Mezi jednotlivými měřeními byla kapilára promývána základním elektrolytem tlakem 1000 mbar po dobu 2 minut. Velikost separačního napětí se pohybovala od 12 do 25 kV. Vzorky byly dávkovány tlakem 6,9-20,7 mbar po dobu 2-10 s.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Analýza a separace enantiomerů β -Ala-D,L-Tyr a jejich derivátů

5.1.1 Volba základních elektrolytů a chirálního selektoru

Dipeptid β -Ala-D,L-Tyr a jeho deriváty obsahují funkční skupiny typické pro peptidy. Na *N*-konci je aminoskupina $-\text{NH}_2$, která způsobuje kladné nabití peptidu v kyselé oblasti pH. Naopak karboxylová skupina $-\text{COOH}$ na *C*-konci způsobuje v mírně kyselém a zásaditém pH záporný náboj. Ze struktury peptidů na Obr. 2.8 je patrné, že β -Ala-D,L-Tyr a Fru- β -Ala-D,L-Tyr budou kladně nabitě v kyselém a záporně nabitě v zásaditém základním elektrolytu. β -Ala-D,L-Tyr- NH_2 je kladně nabitý pouze v kyselé oblasti pH, vzhledem k přítomnosti volné aminoskupiny na *N*-konci a neionogenní amidové skupiny $-\text{CONH}_2$ na *C*-konci. *N*-Ac- β -Ala-D,L-Tyr má chráněný *N*-konec a volný *C*-konec, a proto je záporně nabitý ve slabě kyselé a v zásadité oblasti pH.

Jako základní elektrolyty byly použity pufrы uvedené v Tab. 5.1 bez přídavku a s přídavkem cyklodextrinu. Byly zvoleny takové hodnoty pH, aby analyty byly proměřeny jako kationty v kyselé a jako anionty v zásadité oblasti podle toho, jaký v daném pH nesou náboj. β -Ala-D,L-Tyr a Fru- β -Ala-D,L-Tyr byly proměřeny ve všech základních elektrolytech uvedených v Tab. 5.1, *N*-Ac- β -Ala-D,L-Tyr byl proměřen v zásaditém pH (pH 9,50 až 10,50) a β -Ala-D,L-Tyr- NH_2 v kyselém (pH 2,00 až 4,00).

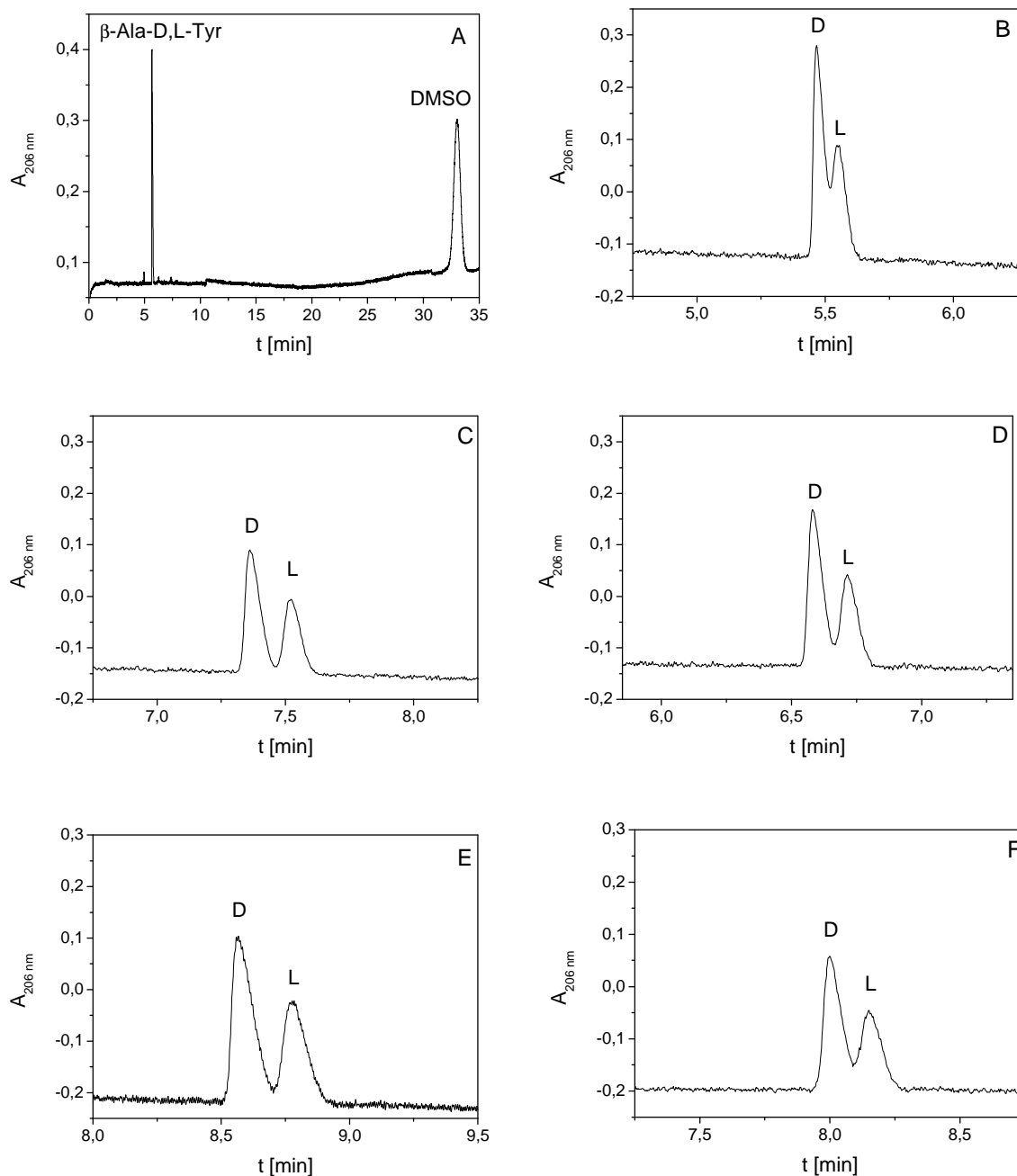
Jako stereoselektivní komplexační činidlo byl vybrán na základě předchozích experimentů [65] 2-hydroxypropyl- β -cyklodextrin (2-HP- β -CD) se stupněm substituce 0,6, který je dobře rozpustný ve vodě a který vykazoval lepší rozlišení než 2-hydroxypropyl- β -cyklodextrin se stupněm substituce 0,9. Koncentrace cyklodextrinu v základním elektrolytu byla volena vždy 0, 10, 20, 30, 40 a 60 mg/ml (resp. 0; 7,25; 14,50; 21,75; 29,00 a 43,50 mM).

Tab. 5.1 Pufrы použité pro přípravu základních elektrolytů

pH	Složení	pH	Složení
2,00	50 mM H_3PO_4 , 15 mM Tris	4,00	25 mM NaOH, 37 mM HCOOH
2,50	50 mM H_3PO_4 , 32 mM Tris	9,50	50 mM borax
2,75	50 mM H_3PO_4 , 40 mM Tris	10,00	50 mM borax + NaOH
3,00	50 mM H_3PO_4 , 44 mM Tris	10,50	50 mM borax + NaOH
3,50	50 mM H_3PO_4 , 48 mM Tris		

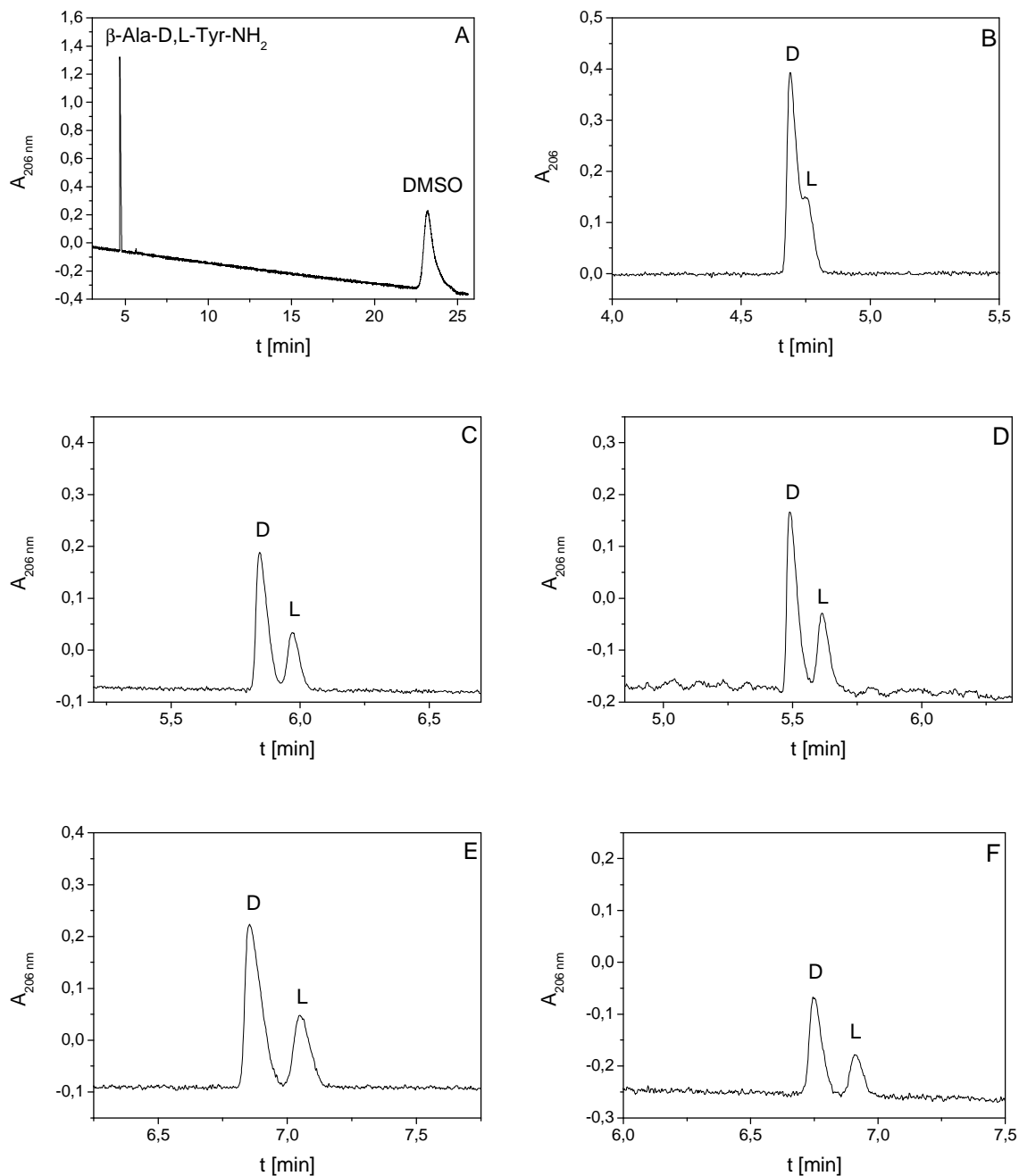
5.1.2 Separace enantiomerů v kationické formě v kyselém pH

V kyselých základních elektrolytech (BGE) byly analyzovány a separovány enantiomery dipeptidů β -Ala-D,L-Tyr, β -Ala-D,L-Tyr-NH₂ a Fru- β -Ala-D,L-Tyr. Tyto látky se v nízkém pH vyskytují jako kationty.



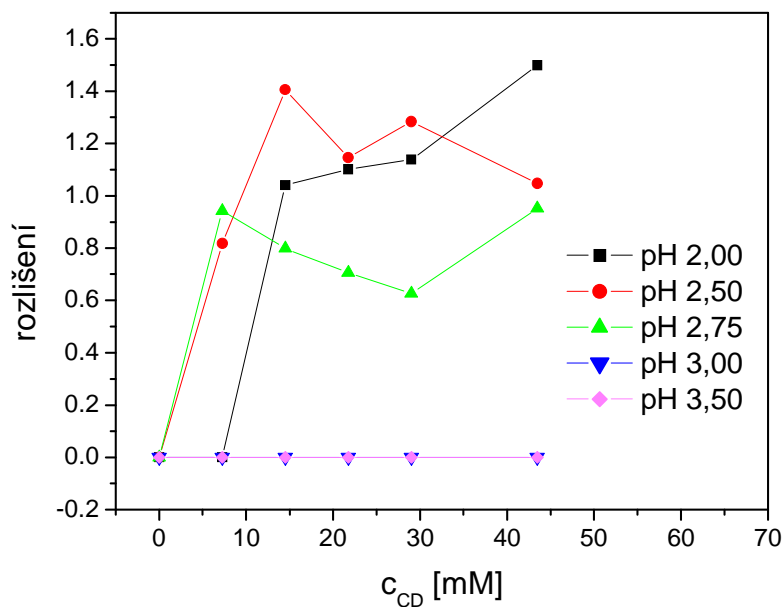
Obr. 5.1 CE separace enantiomerů β -Ala-D,L-Tyr při pH 2,50 a koncentraci 2-HP- β -CD 0 (A), 10 (B), 20 (C), 30 (D), 40 (E) a 60 (F) mg/ml; A_{206} , absorbance při 206 nm, t , migrační čas

Ukázky CE separací v BGE při pH 2,50 jsou uvedeny na Obr. 5.1 (pro enantiomery β -Ala-D,L-Tyr) a Obr. 5.2 (pro enantiomery β -Ala-D,L-Tyr-NH₂). Z těchto ukázek je patrná závislost rozlišení enantiomerů na koncentraci cyclodextrinu.



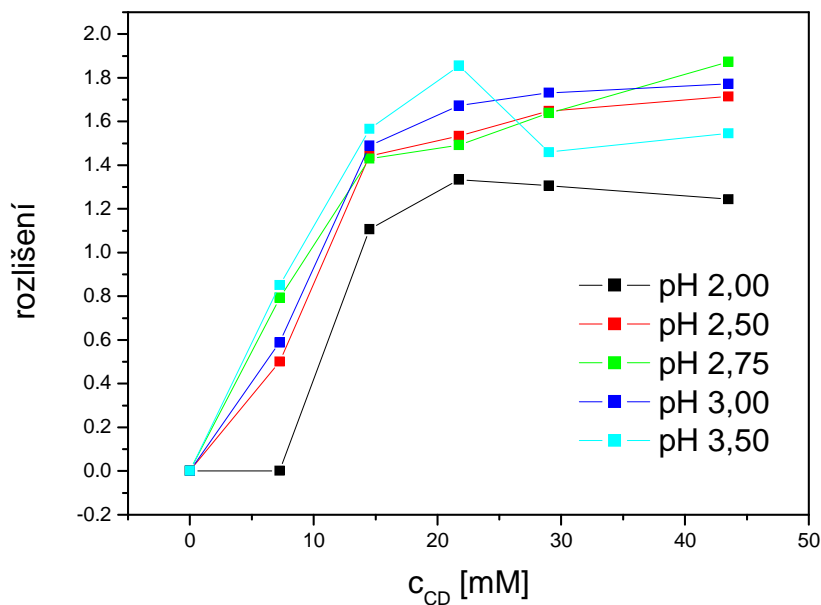
Obr. 5.2 CE separace enantiomerů β -Ala-D,L-Tyr-NH₂ při pH 2,50 a koncentraci 2-HP- β -CD 0 (A), 10 (B), 20 (C), 30 (D), 40 (E) a 60 (F) mg/ml; $A_{206 \text{ nm}}$, absorpance při 206 nm, t , migrační čas

K separaci enantiomerů β -Ala-D,L-Tyr docházelo při pH 2,00, 2,50 a 2,75. Nejlepšího rozlišení bylo dosaženo při pH 2,00 a koncentraci 2-HP- β -CD 60 mg/ml a při pH 2,50 a koncentraci 2-HP- β -CD 40 mg/ml (Tab. 5.2). Závislost rozlišení na koncentraci 2-HP- β -CD je pro enantiomery β -Ala-D,L-Tyr znázorněna na Obr. 5.3.



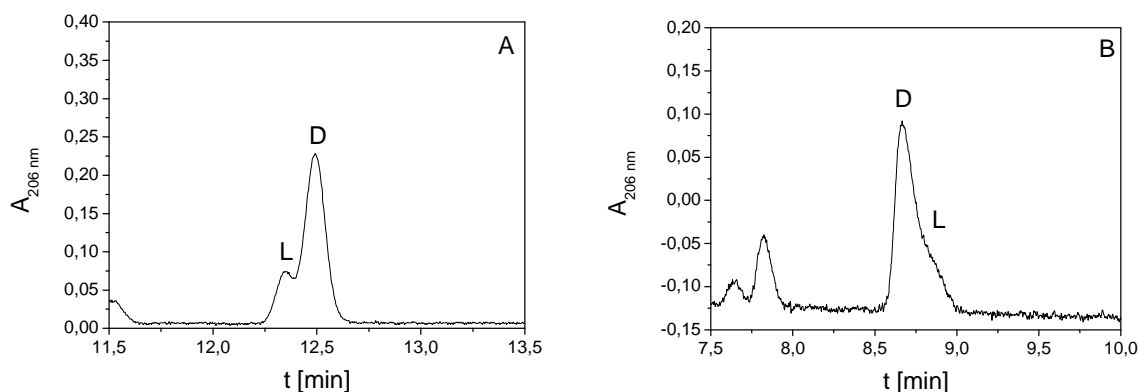
Obr. 5.3 Rozlišení CE separace enantiomerů β -Ala-D,L-Tyr v závislosti na koncentraci chirálního selektoru 2-HP- β -CD, c_{CD} , a při různém pH základního elektrolytu

Pro enantiomery β -Ala-D,L-Tyr-NH₂ je závislost rozlišení jejich CE separací na pH a na koncentraci 2-HP- β -CD zobrazena na Obr. 5.4. K separaci enantiomerů tohoto derivátu docházelo při všech hodnotách pH. Maximálního rozlišení bylo dosaženo při pH 2,75 a koncentraci 60 mg/ml a při pH 3,50 a koncentraci 30 mg/ml (viz Obr. 5.4 a Tab. 5.2).



Obr. 5.4 Rozlišení CE separace enantiomerů β -Ala-D,L-Tyr-NH₂ v závislosti na koncentraci chirálního selektoru 2-HP- β -CD, c_{CD} , a při různém pH základního elektrolytu

Enantiomery derivatizovaného dipeptidu Fru- β -Ala-D,L-Tyr se v těchto podmínkách téměř nedělily. K náznaku dělení docházelo při nižších hodnotách pH, kdy bylo na píku analytu patrné tzv. „rameno“. Částečné oddělení nastalo při použití základního elektrolytu o pH 3,50 a koncentraci 2-HP- β -CD 60 mg/ml (Obr. 5.5 a Tab. 5.2).



Obr. 5.5 CE separace enantiomerů Fru- β -Ala-D,L-Tyr (A, dělení L- a D-enantiomerů při pH 3,50 a c_{CD} 60 mg/ml, B, rameno píku při pH 2,00 a c_{CD} 40 mg/ml; A_{206} , absorbance při 206 nm, t, migrační čas

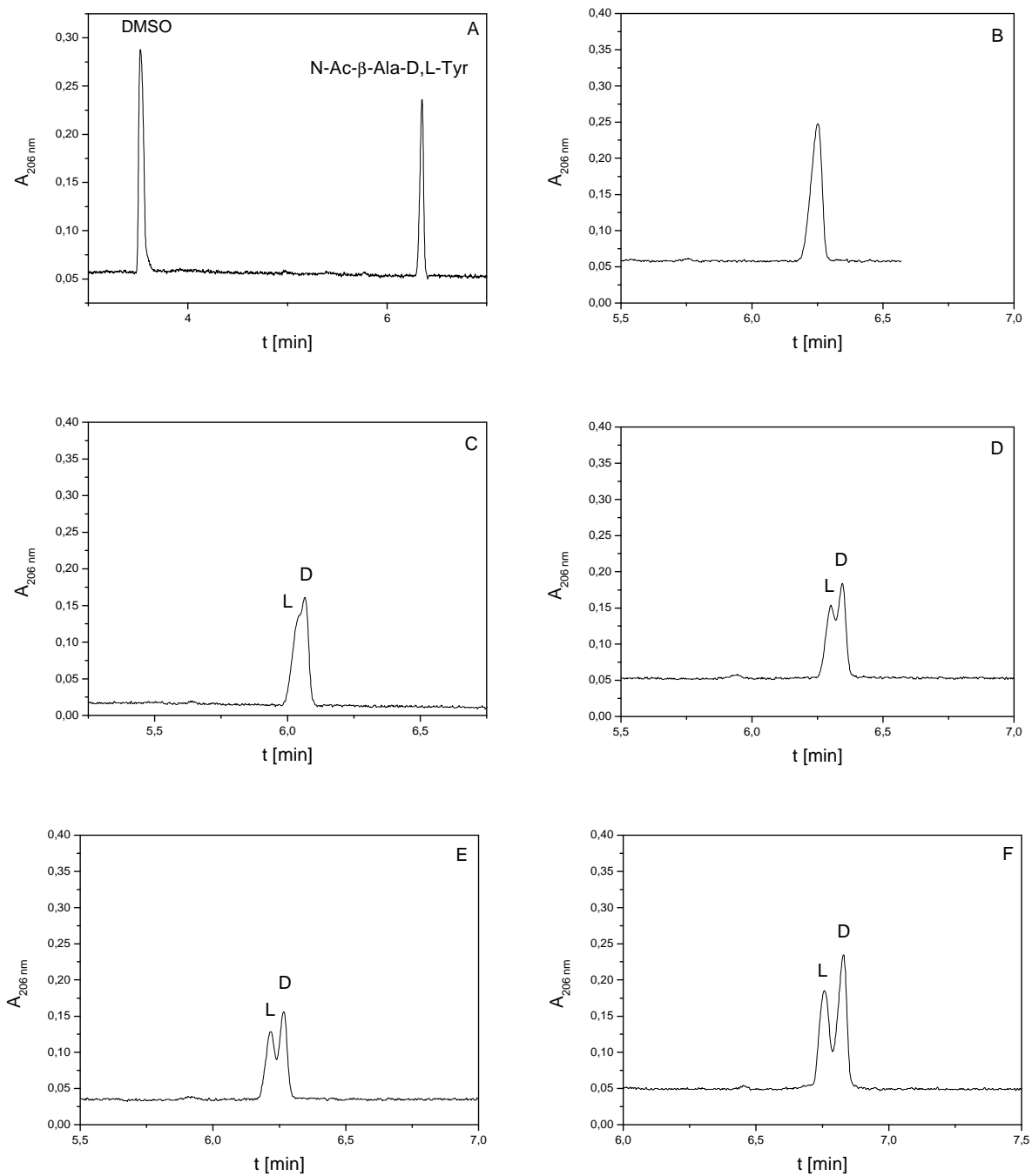
Hodnoty maximálního rozlišení CE separací analyzovaných enantiomerů dipeptidů v kationické formě jsou uvedeny v tabulce 5.2.

Tab. 5.2 Maximální rozlišení CE separací enantiomerů dipeptidů v kationické formě při optimální koncentraci 2-hydroxypropyl- β -cyklodextrinu

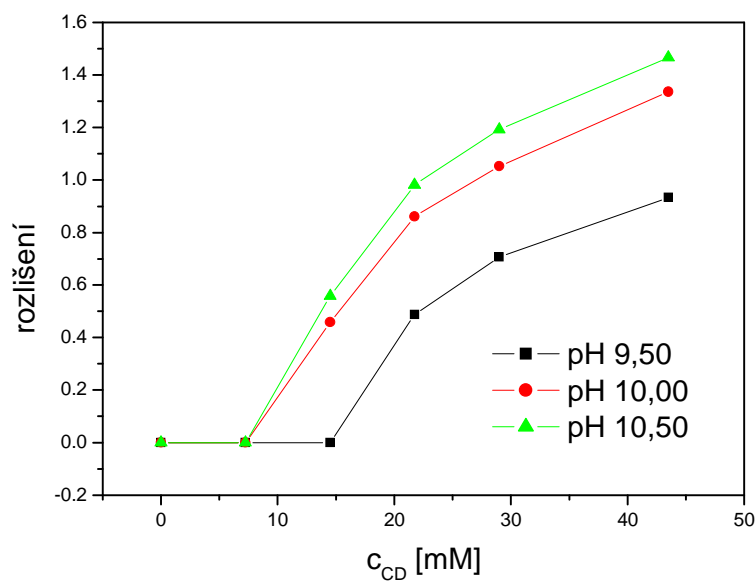
pH	β -Ala-D,L-Tyr		β -Ala-D,L-Tyr-NH ₂		Fru- β -Ala-D,L-Tyr	
	max. rozlišení	optimální c _{CD}	max. rozlišení	optimální c _{CD}	max. rozlišení	optimální c _{CD}
2,00	1,499	60 mg/ml	1,334	30 mg/ml	0	-
2,50	1,406	40 mg/ml	1,714	60 mg/ml	0	-
2,75	0,952	60 mg/ml	1,872	60 mg/ml	0	-
3,00	0	-	1,771	60 mg/ml	0	-
3,50	0	-	1,855	30 mg/ml	0,554	60 mg/ml

5.1.3 Separace enantiomerů v anionické formě v zásaditém pH

V zásaditém pH byly analyzovány a separovány enantiomery dipeptidů β -Ala-D,L-Tyr, Fru- β -Ala-D,L-Tyr a *N*-Ac- β -Ala-D,L-Tyr. Tyto látky se v alkalickém pH vyskytují ve formě aniontů. Enantiomery β -Ala-D,L-Tyr a Fru- β -Ala-D,L-Tyr se v těchto podmínkách nedělily. Ukázky CE separací enantiomerů derivatizovaného dipeptidu *N*-Ac- β -Ala-D,L-Tyr jsou uvedeny na Obr. 5.6. Nejvyššího rozlišení bylo dosaženo při pH 10,50 a koncentraci chirálního selektoru 60 mg/ml (Tab. 5.3). Závislost rozlišení na koncentraci cyklodextrinu byla pro všechny tři hodnoty pH podobná (Obr. 5.7).



Obr. 5.6 CE separace enantiomerů *N*-Ac- β -Ala-D,L-Tyr při pH 9,50 a koncentraci 2-hydroxypropyl- β -cyklodextrinu 0 (A), 10 (B), 20 (C), 30 (D), 40 (E) a 60 (F) mg/ml, A_{206} , absorbance při 206 nm, t , migrační čas



Obr. 5.7 Rozlišení CE separace enantiomerů *N*-Ac- β -Ala-D,L-Tyr v závislosti na koncentraci chirálního selektoru 2-HP- β -CD, c_{CD} , a při různém pH základního elektrolytu

Hodnoty maximálního rozlišení CE separací analyzovaných enantiomerů dipeptidů v alkalickém pH jsou uvedeny v tabulce 5.3.

Tab. 5.3 Maximální rozlišení CE separací enantiomerů dipeptidů v anionické formě při optimální koncentraci 2-hydroxypropyl- β -cyklodextrinu

pH	β -Ala-D,L-Tyr		N-Ac- β -Ala-D,L-Tyr		Fru- β -Ala-D,L-Tyr	
	max. rozlišení	optimální c_{CD}	max. rozlišení	optimální c_{CD}	max. rozlišení	optimální c_{CD}
9,50	0	-	0,993	60 mg/ml	0	-
10,00	0	-	1,336	60 mg/ml	0	-
10,50	0	-	1,466	60 mg/ml	0	-

5.2 Stanovení asociačních konstant komplexů enantiomerů β -Ala-D,L-Tyr a jeho derivátů s 2-hydroxypropyl- β -cyklodextrinem

5.2.1 Stanovení efektivních pohyblivostí

Efektivní pohyblivosti jednotlivých analytů byly vypočteny podle vzorce 2.7. Pohyblivost látek je závislá na teplotě a vzrůstá přibližně o 2 % na 1 °C, proto pro přesné stanovení je nezbytné znát teplotu, při které byla pohyblivost změřena.

Korekce na viskozitu byla provedena vynásobením mobility vypočtené z migračního času poměrem proudu při měření bez přídavku cyklodextrinu a s přídavkem cyklodextrinu podle vztahu:

$$m_{cor,\eta} = m_{exp} \cdot \frac{I_0}{I} \quad (5.1)$$

kde $m_{cor,\eta}$ je mobilita analytu po korekci na viskozitu, m_{exp} je pohyblivost analytu vypočtená ze získaného migračního času, I_0 elektrický proud při CE analýze v BGE bez přídavku cyklodextrinu a I je elektrický proud při analýze v BGE s přídavkem cyklodextrinu.

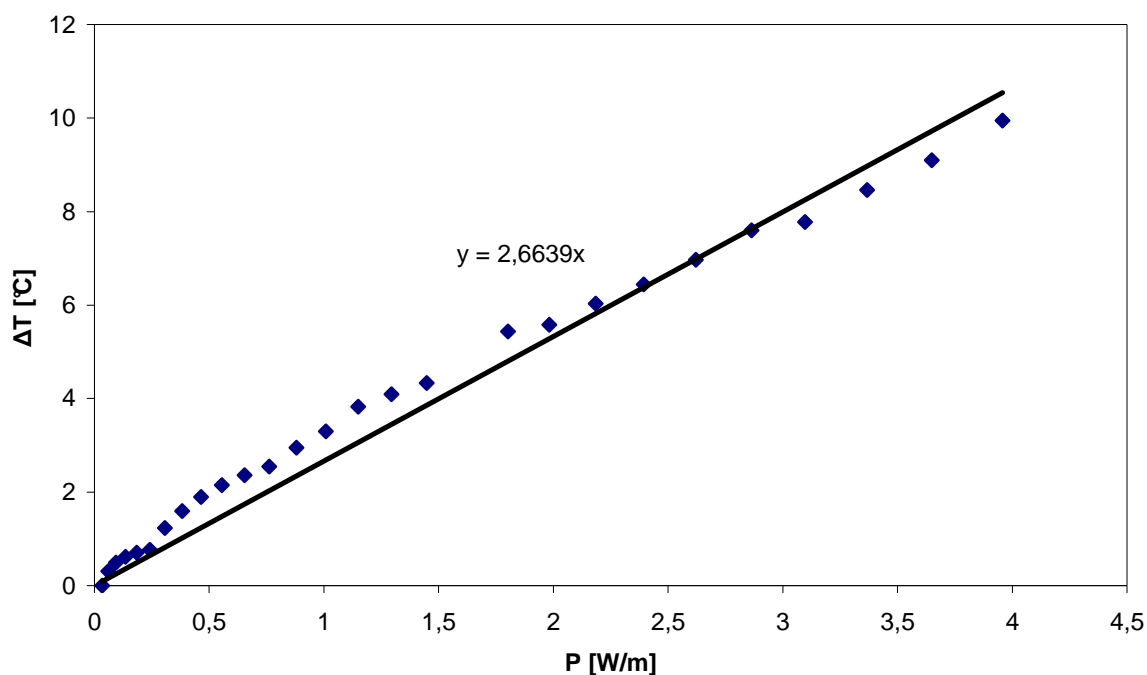
Pro korekci mobilit na teplotu 25 °C byl použit postup [114] založený na měření elektrické vodivosti standardního roztoku 0,02 M chloridu draselného o známé teplotní závislosti elektrické vodivosti. Byla proměřena závislost elektrického proudu v kapiláře naplněné roztokem KCl na vkládaném napětí. Z naměřených hodnot byla spočítána vodivost roztoku KCl, κ , a posléze vypočten procentuální nárůst elektrické vodivosti:

$$(\kappa_i - \kappa_0)/\kappa_0 \cdot 100 \%, \quad (5.2)$$

kde κ_i je vodivost roztoku KCl při postupně se zvyšujících hodnotách příkonu, které způsobují ohřev roztoku v kapiláře, a κ_0 je vodivost roztoku KCl při minimálním příkonu v kapiláře, kdy je ohřev elektrolytu a vzrůst teploty zanedbatelný. Z relativních změn vodivosti roztoku KCl a ze známého koeficientu teplotní závislosti vodivosti tohoto roztoku (nárůst vodivosti o 1,9 % na 1 °C) byl určen vzrůst teploty v kapiláře při postupně se zvyšujících hodnotách příkonu, vztažených na jednotkovou délku kapiláry (rovnice 5.3).

$$\Delta T = \frac{(\kappa_i - \kappa_0) \cdot 100}{1,9 \cdot \kappa_0} \quad (5.3)$$

Závislost vzrůstu teploty na příkonu je znázorněna na Obr. 5.8.



Obr. 5.8 Závislost vzrůstu teploty v kapiláře ΔT na příkonu P vztaženém na jednotkovou délku kapiláry

Rovnice regresní přímky této závislosti byla použita pro výpočet vzrůstu teploty ΔT oproti standardní teplotě 25 °C, na kterou byl chlazen vnější povrch kapiláry cirkulujícím kapalným médiem, při elektroforetické separaci analytů. Z takto získaných hodnot byla vypočtena korigovaná mobilita podle vztahu:

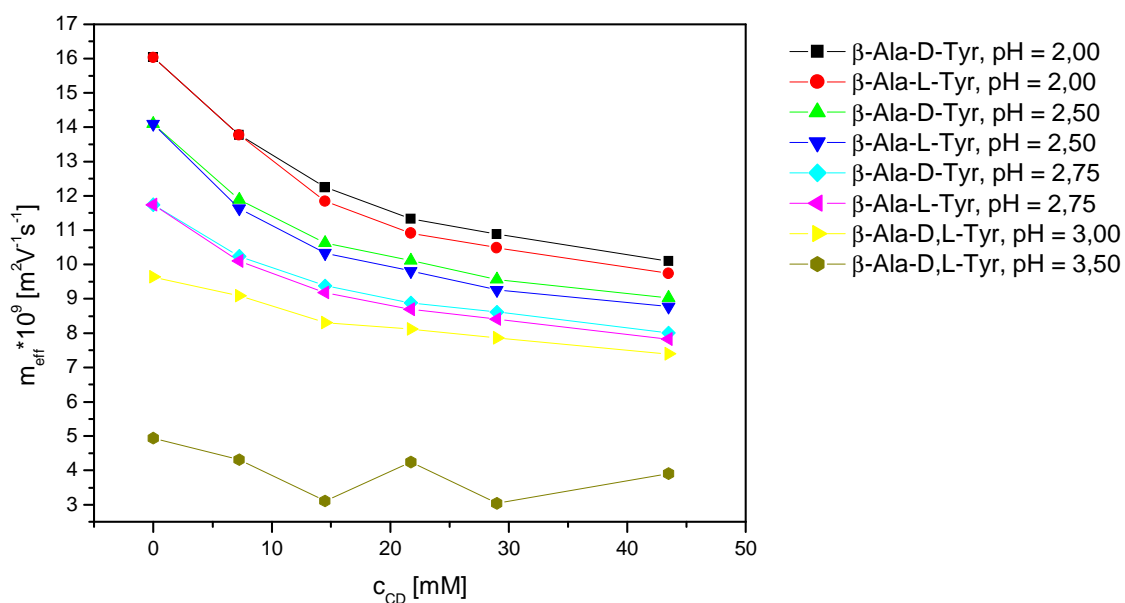
$$m_{25} = m_{\text{exp}}(1 - 0,020 \cdot \Delta T) \quad (5.4)$$

kde m_{25} je mobilita korigovaná na teplotu 25 °C, m_{exp} je mobilita vypočtená z migračního času analytu a ΔT je nárůst teploty uvnitř kapiláry.

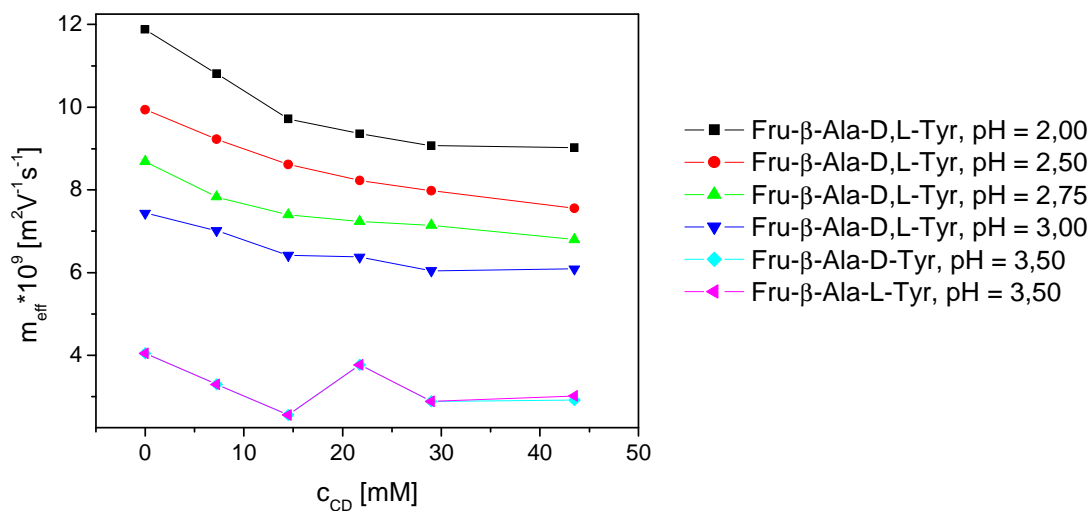
Mobility analytů vypočtené z migračních časů naměřených při pH 9,50, 10,00 a 10,50 byly korigovány pouze na teplotu. Při korekci na viskozitu totiž vznikl vyšší rozptyl naměřených hodnot pohyblivostí, zřejmě v důsledku různého obsahu uhličitánů (absorbovaného CO₂ ze vzduchu) v BGE s různými koncentracemi cyklodextrinu.

5.2.2 Závislost efektivních pohyblivostí na koncentraci cyklodextrinu – stanovení asociační konstanty

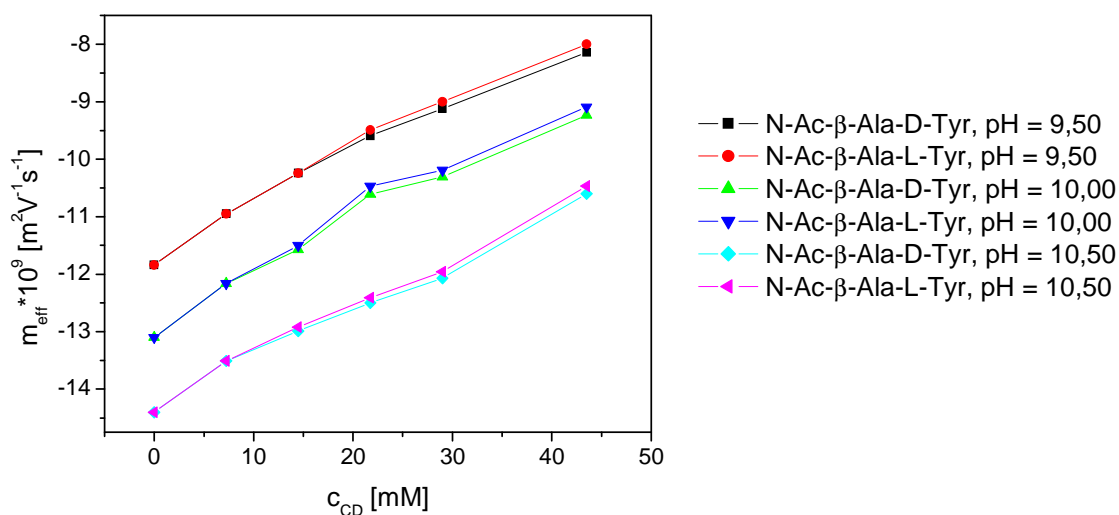
Jak již bylo řečeno, hodnota asociační konstanty vyjadřuje pevnost komplexu vytvořeného interakcí analytu a cyklodextrinu a počítá se ze závislosti efektivní pohyblivosti analytu na koncentraci cyklodextrinu. Příklady těchto závislostí jsou zobrazeny na Obr. 5.9, 5.10 a 5.11.



Obr. 5.9 Závislost efektivní pohyblivosti enantiomerů β -Ala-D,L-Tyr, m_{eff} , na koncentraci 2-HP- β -CD, c_{CD} , při různých hodnotách pH základního elektrolytu

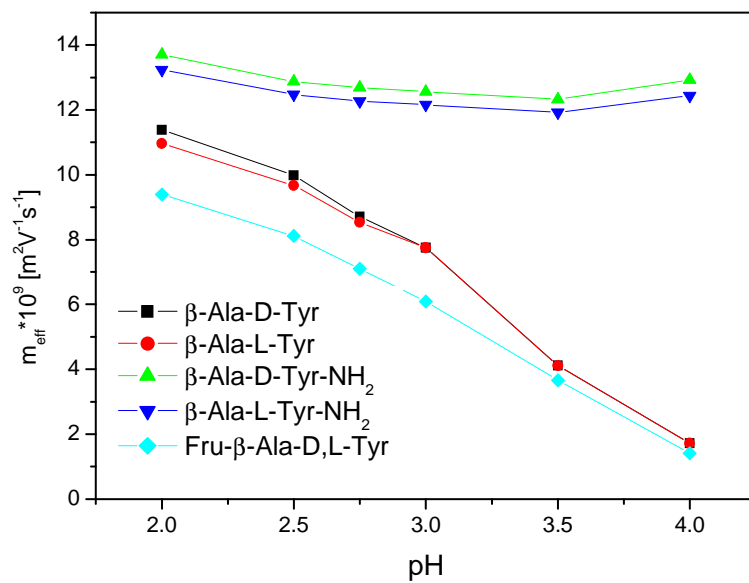


Obr. 5.10 Závislost efektivní pohyblivosti enantiomerů Fru- β -Ala-D,L-Tyr, m_{eff} , na koncentraci 2-HP- β -CD, c_{CD} , při různých hodnotách pH základního elektrolytu

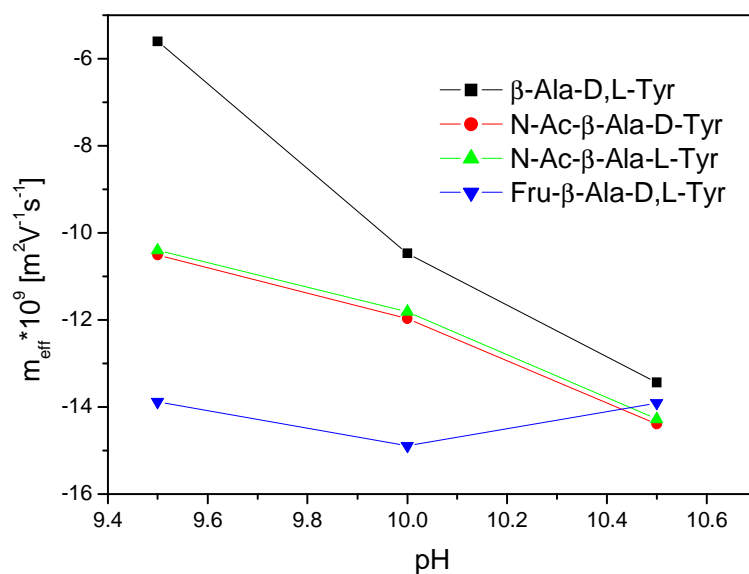


Obr. 5.11 Závislost efektivní pohyblivosti enantiomerů N-Ac- β -Ala-D,L-Tyr, m_{eff} , na koncentraci 2-HP- β -CD, c_{CD} , při různých hodnotách pH základního elektrolytu

Z Obr. 5.12 a 5.13 je patrné, že pohyblivost analytu je také závislá na pH a že tato závislost je pro různé analyty různá. Na pH jsou tedy závislé i asociační konstanty analytů.



Obr. 5.12 Efektivní pohyblivost analytů v závislosti na pH základního elektrolytu, základní elektrolyt s koncentrací selektoru 10 mg/ml



Obr. 5.13 Efektivní pohyblivost analytů v závislosti na pH základního elektrolytu, základní elektrolyt s koncentrací selektoru 30 mg/ml

Pro výpočet asociační konstanty se používá nelineární regresní analýza, kterou provádí k tomu určený software. Korigované hodnoty pohyblivostí byly vloženy do programu Origin 6.1 a vyneseny v závislosti na koncentraci 2-hydroxypropyl- β -cyklodextrinu. Asociační konstanty vypočítané programem podle rovnice 2.38 a jejich standardní a relativní standardní odchylky jsou uvedeny v tabulkách 5.3, 5.4, 5.5 a 5.6.

Pro komplexy enantiomerů β -Ala-D,L-Tyr a 2-HP- β -CD byla nalezena nejvyšší hodnota asociační konstanty při pH 2,50, a to 68,7 [l mol⁻¹] pro komplex D-enantiomeru a 79,1 [l mol⁻¹] pro komplex L-enantiomeru, nejnižší hodnota byla zjištěna při pH 10,00. Z vypočtených hodnot asociačních konstant pro komplexy enantiomerů β -Ala-D,L-Tyr vyplývá, že v případě, kdy dochází k separaci enantiomerů, vytváří L-enantiomer tohoto dipeptidu pevnější komplex s 2-hydroxypropyl- β -cyklodextrinem než D-enantiomer.

Tab. 5.3 Hodnoty asociačních konstant komplexů enantiomerů β -Ala-D,L-Tyr s 2-HP- β -CD při vybraných hodnotách pH a jejich standardní (SD) a relativní standardní odchylky (RSD)

pH	β -Ala-D-Tyr			β -Ala-L-Tyr		
	K_{AS} [l mol ⁻¹]	SD	RSD [%]	K_{AS} [l mol ⁻¹]	SD	RSD [%]
2,00	53,2	7,4	13,9	53,6	6,9	12,9
2,50	68,7	4,3	6,2	79,1	4,6	5,9
2,75	55,9	4,1	7,3	62,5	4,3	6,9
3,00	27,9	8,1	29,0	27,9	8,1	29,0
9,50	19,9	1,1	5,6	19,9	1,1	5,6
10,00	9,8	3,4	34,3	9,8	3,4	34,3

Pro komplexy enantiomerů β -Ala-D,L-Tyr-NH₂ s 2-HP- β -CD byla zjištěna nejvyšší hodnota asociační konstanty při pH 2,75, a to 46,8 [l mol⁻¹] pro komplex D-enantiomeru a 53,7 [l mol⁻¹] pro komplex L-enantiomeru, nejnižší hodnota byla nalezena při pH 2,50. Při pH od 2,50 vytváří enantiomer β -Ala-L-Tyr-NH₂ pevnější komplex s 2-HP- β -CD než D-enantiomer.

Tab 5.4 Hodnoty asociačních konstant komplexů enantiomerů β -Ala-D,L-Tyr-NH₂ s 2-HP- β -CD při vybraných hodnotách pH a jejich standardní (SD) a relativní standardní odchylky (RSD)

pH	β -Ala-D-Tyr-NH ₂			β -Ala-L-Tyr-NH ₂		
	K_{AS} [l mol ⁻¹]	SD	RSD [%]	K_{AS} [l mol ⁻¹]	SD	RSD [%]
2,00	40,8	9,5	23,4	38,6	8,3	21,4
2,50	19,6	3,1	15,7	25,4	3,3	13,0
2,75	46,8	8,4	17,9	53,7	8,7	16,3
3,00	23,5	2,9	12,2	29,2	3,0	10,4
3,50	43,7	7,1	16,2	48,6	7,1	14,6

K nejsilnější interakci Fru- β -Ala-D,L-Tyr s 2-HP- β -CD docházelo při pH 2,75, kdy byla hodnota asociační konstanty rovna 76,8 [l mol⁻¹].

Tab 5.5 Hodnoty asociačních konstant komplexů enantiomerů Fru- β -Ala-D,L-Tyr s 2-HP- β -CD při vybraných hodnotách pH a jejich standardní (SD) a relativní standardní odchylky (RSD)

pH	Fru- β -Ala-D,L-Tyr		
	K_{AS} [l mol ⁻¹]	SD	RSD [%]
2,00	66,4	20,8	31,4
2,50	31,1	2,7	8,8
2,75	76,8	13,3	17,3
3,00	51,9	24,0	46,3
9,50	7,6	1,3	17,4
10,00	9,0	4,3	47,5

Pro komplexy enantiomerů *N*-Ac- β -Ala-D,L-Tyr s 2-HP- β -CD nebyly vypočítané asociační konstanty příliš rozdílné. Jejich hodnoty se pohybovaly mezi 11 a 13 [l mol⁻¹]. Podle dat uvedených v tabulce 5.6 lze říci, že při pH 9,50 byl vytvořen silnější komplex D-enantiomeru s 2-HP- β -CD a při pH 10,00 byla silnější interakce mezi 2-HP- β -CD a L-enantiomerem.

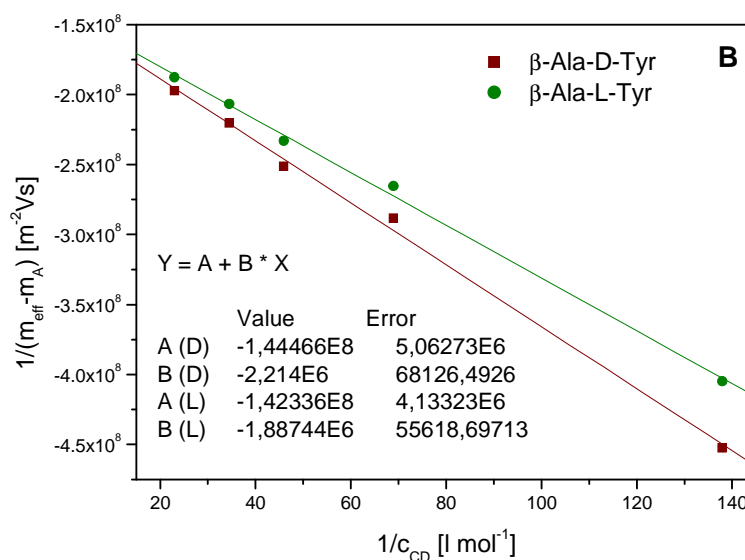
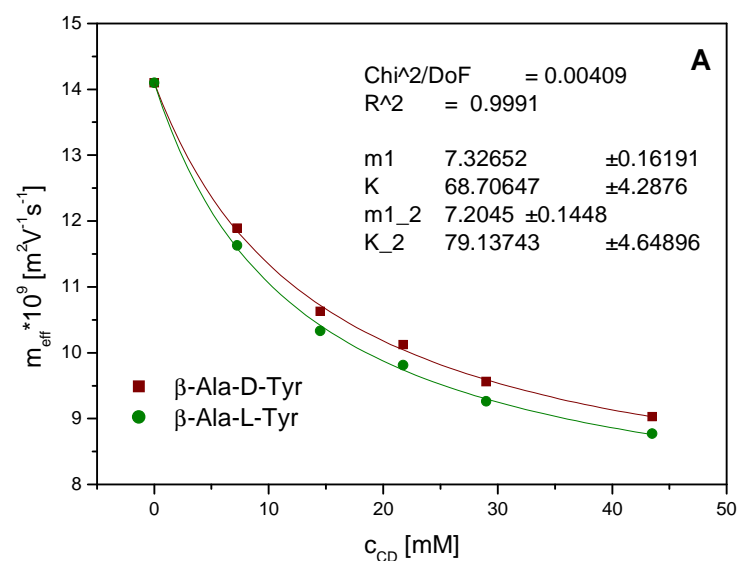
Tab. 5.6 Hodnoty asociačních konstant komplexů enantiomerů *N*-Ac-β-Ala-D,L-Tyr s 2-HP-β-CD při vybraných hodnotách pH a jejich standardní (SD) a relativní standardní odchylky (RSD)

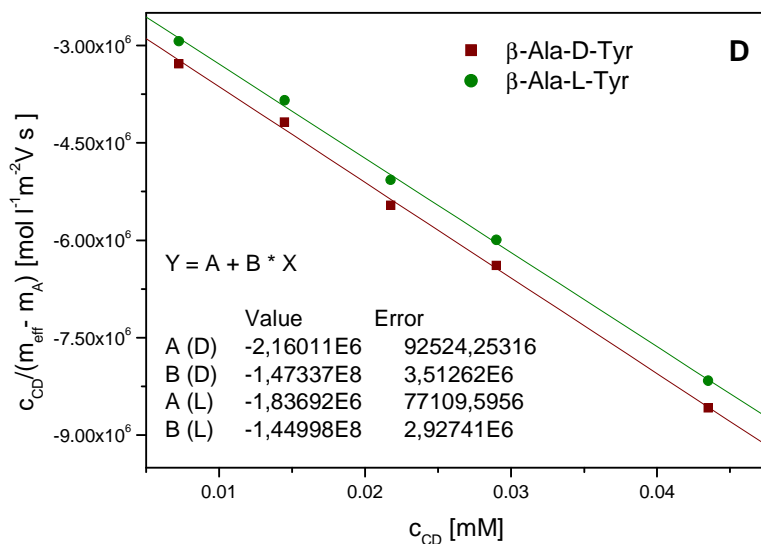
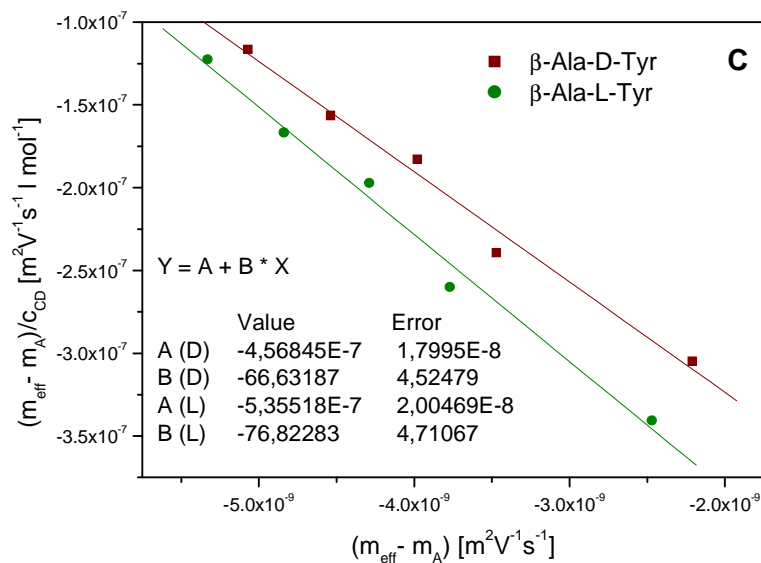
pH	<i>N</i> -Ac-β-Ala-D-Tyr			<i>N</i> -Ac-β-Ala-L-Tyr		
	K_{AS} [l mol ⁻¹]	SD	RSD [%]	K_{AS} [l mol ⁻¹]	SD	RSD [%]
9,50	12,3	1,1	8,9	11,2	1,0	9,0
10,00	11,6	3,7	31,6	12,0	3,6	29,8

Obecně lze srovnáním hodnot uvedených v Tab. 5.3, 5.4, 5.5 a 5.6 říci, že nejsilnější interakci s 2-hydroxypropyl-β-cyklodextrinem v kyselém pH vykazuje Fru-β-Ala-D,L-Tyr a nejslabší β-Ala-D,L-Tyr-NH₂. V alkalickém pH vytváří nejsilnější komplex s 2-HP-β-CD β-Ala-D,L-Tyr a nejslabší Fru-β-Ala-D,L-Tyr.

5.2.3 Srovnání asociačních konstant získaných nelineární regresní analýzou a lineárním vnesením dat pro β -Ala-D,L-Tyr při pH 2,50

Pro enantiomery β -Ala-D,L-Tyr byly ze závislosti jejich efektivních mobilit naměřených při pH 2,50 na koncentraci 2-HP- β -CD stanoveny asociační konstanty jejich komplexů kromě nelineární regresní analýzy také třemi lineárními výnosy. Závislosti, ze kterých byly asociační konstanty získány, jsou zobrazeny na Obr. 5.14.





Obr. 5.14 Vynesení použita pro stanovení asociačních konstant ze závislosti efektivní mobility enantiomerů β -Ala-D,L-Tyr na koncentraci 2-HP- β -CD při pH 2,50: A, nelineární regresní analýza; B, dvojitě reciproké vynesení; C, x-reciproké vynesení; D, y-reciproké vynesení

Asociační konstanty získané nelineární regresní analýzou a asociační konstanty vypočtené podle vztahů uvedených v Tab. 2.2 jsou shrnuty v Tab. 5.7. Hodnotám asociačních konstant komplexů enantiomerů analyzovaného dipeptidu stanoveným nelineární regresní analýzou se nejvíce blíží hodnoty získané y-reciprokým vynesením.

Tab. 5.7 Hodnoty asociačních konstant komplexů enantiomerů β -Ala-D,L-Tyr s 2-HP- β -CD získané nelineární regresní analýzou a třemi lineárními výnosy dat z CE analýz při pH 2,50

	$K_{AS,D}$ [l mol ⁻¹]	$K_{AS,L}$ [l mol ⁻¹]
nelinární vynesení	68,7	79,1
dvojitě reciproké vynesení	65,3	75,4
y-reciproké vynesení	68,2	79,0
x-reciproké vynesení	66,6	76,8

6 ZÁVĚR

V rámci této diplomové práce byly metodou kapilární elektroforézy (CE) stanoveny asociační konstanty komplexů enantiomerů antimikrobiálního dipeptidu β -Ala-D,L-Tyr a jeho derivátů, *N*-Ac- β -Ala-D,L-Tyr, β -Ala-D,L-Tyr-NH₂ a β -D-fruktopyranosyl- β -Ala-D,L-Tyr, se stereoselektivním komplexačním činidlem pro chirální CE separace těchto analytů, 2-hydroxypropyl- β -cyklodextrinem. Asociační konstanty byly určeny z experimentálně změřené závislosti efektivní mobility analytů na koncentraci cyklodextrinu v základním elektrolytu nelineární regresní analýzou. Efektivní pohyblivosti peptidů byly korigovány na standardní teplotu 25 °C a na viskozitu základního elektrolytu měnící se s přidavkem 2-hydroxypropyl- β -cyklodextrinu v základním elektrolytu. Hodnoty asociačních konstant se pohybovaly v rozsahu 7,6-79,1 [l mol⁻¹]. Nejvyšší hodnotu asociační konstanty měl komplex enantiomeru β -Ala-L-Tyr s 2-hydroxypropyl- β -cyklodextrinem při pH 2,50. Nejnižší hodnota byla zjištěna pro komplex β -D-fruktopyranosyl- β -Ala-D,L-Tyr s 2-hydroxypropyl- β -cyklodextrinem při pH 9,50.

V rámci experimentální části byla proměřena závislost rozlišení chirálních CE separací analyzovaných látek na pH v kyselé i alkalické oblasti. Nejlepší rozlišení v kyselé oblasti bylo dosaženo pro enantiomery β -Ala-D,L-Tyr-NH₂ při pH 2,50 a 2,75 a koncentraci 2-hydroxypropyl- β -cyklodextrinu 60 mg/ml. Při těchto experimentálních podmínkách byly také nalezeny největší relativní rozdíly mezi asociačními konstantami komplexů D- a L-enantiomerů. V alkalické oblasti bylo nejlepší rozlišení dosaženo pro enantiomery *N*-Ac- β -Ala-D,L-Tyr při pH 10,50 a koncentraci 2-hydroxypropyl- β -cyklodextrinu 60 mg/ml. Nejhůře se dělily enantiomery β -D-fruktopyranosyl- β -Ala-D,L-Tyr, kdy došlo k částečnému dělení pouze při pH 3,50 a koncentraci 2-hydroxypropyl- β -cyklodextrinu 60 mg/ml.

Asociační konstanty komplexů enantiomerů dipeptidu β -Ala-D,L-Tyr s 2-hydroxypropyl- β -cyklodextrinem při pH 2,50 byly stanoveny kromě nelineární regresní analýzy také linearizovaným x-reciprokým, y-reciprokým a dvojité reciprokým vnesením dat. Hodnotám asociačních konstant komplexů enantiomerů dipeptidu β -Ala-D,L-Tyr stanoveným nelineární regresní analýzou se nejvíce blíží hodnoty získané y-reciprokým vnesením dat.

Bylo ověřeno, že kapilární elektroforéza je vhodná metoda pro separace enantiomerů peptidů a pro stanovení asociačních konstant komplexů peptidů s cyklodextriny v mikroměřítku.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] Rundlett, K. L.; Armstrong, D. W.: Methods for the determination of binding constants by capillary electrophoresis. *Electrophoresis* **22**:7, 1419-1427 (2001).
- [2] Vespaľec, R.; Boček, P.: Calculation of stability constants for the chiral selector-enantiomer interactions from electrophoretic mobilities. *Journal of Chromatography A* **875**:1-2, 431-445 (2000).
- [3] Tanaka, Y.; Terabe, S.: Estimation of binding constants by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography B* **768**:1, 81-92 (2002).
- [4] Rundlett, K. L.; Armstrong, D. W.: Examination of the origin, variation, and proper use of expressions for the estimation of association constants by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A* **721**:1, 173-186 (1996).
- [5] McBryde, W. A. E.: Spectrophotometric Determination of Equilibrium Constants in Solution. *Talanta* **21**:10, 979-1004 (1974).
- [6] Egawa, T.; Tsuneshige, A.; Suematsu, M.; Yonetani, T.: Method for determination of association and dissociation rate constants of reversible bimolecular reactions by isothermal titration calorimeters. *Analytical Chemistry* **79**:7, 2972-2978 (2007).
- [7] Connors, K. A.; Lipari, J. M.: Effect of Cycloamyloses on Apparent Dissociation-Constants of Carboxylic-Acids and Phenols - Equilibrium Analytical Selectivity Induced by Complex-Formation. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **65**:3, 379-383 (1976).
- [8] Miyaji, T.; Kurono, Y.; Uekama, K.; Ikeda, K.: Inclusion Complexation of Barbiturates with Beta-Cyclodextrin in Aqueous-Solution .2. Simultaneous Determination of Complexation Equilibrium-Constants for Conjugated Guest Species by Extended Potentiometric Titration Method - Barbiturate-Beta-Cyclodextrin System. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **24**:6, 1155-1159 (1976).
- [9] Fielding, L.: Determination of association constants (K-a) from solution NMR data. *Tetrahedron* **56**:34, 6151-6170 (2000).
- [10] Kašička, V.: Theoretical bases and separation principles of capillary electromigration methods. *Chemické Listy* **91**:5, 320-329 (1997).
- [11] Dolnik, V.: Capillary electrophoresis of proteins 2005-2007. *Electrophoresis* **29**:1, 143-156 (2008).
- [12] Ravelo-Perez, L. M.; Hernandez-Borges, J.; Rodriguez-Delgado, M. A.: Pesticides analysis by liquid chromatography and capillary electrophoresis. *Journal of Separation Science* **29**:17, 2557-2577 (2006).

- [13] Jager, A. V.; Tonin, F. G.; Tavares, M. F. M.: Optimizing the separation of food dyes by capillary electrophoresis. *Journal of Separation Science* **28**:9-10, 957-965 (2005).
- [14] Ishikawa, F.; Oishi, M.; Kimura, K.; Yasui, A.; Saito, K.: Determination of synthetic food dyes in food by capillary electrophoresis. *Journal of the Food Hygienic Society of Japan* **45**:3, 150-155 (2004).
- [15] Kremser, L.; Blaas, D.; Kenndler, E.: Capillary electrophoresis of biological particles: Viruses, bacteria, and eukaryotic cells. *Electrophoresis* **25**:14, 2282-2291 (2004).
- [16] Tsukagoshi, K.; Obata, Y.; Kanamori, T.; Nakajima, R.: Application of capillary electrophoresis with sensitive detection to analysis for saccharide molecules. *Analytical Sciences* **18**:6, 709-710 (2002).
- [17] Hjerten, S.: Free Zone Electrophoresis - Preliminary Note. *Arkiv for Kemi* **13**:1-2, 151-152 (1958).
- [18] Everaerts, F. M.; Beckers, J. L.; Verheggen, T. P. E. M.: *Isotachophoresis - Theory, Instrumentation and Applications*. Amsterdam, Elsevier 1976, s. 1-418.
- [19] Mikkers, F. E. P.; Everaerts, F. M.; Verheggen, T. P. E. M.: Concentration distributions in free zone electrophoresis. *Journal of Chromatography* **169**: 1-10 (1979).
- [20] Virtanen, R.: Zone Electrophoresis in A Narrow-Bore Tube Employing Potentiometric Detection - Theoretical and Experimental Study. *Acta Polytechnica Scandinavica-Chemical Technology Series* **123**, 1-67 (1974).
- [21] Jorgenson, J. W.; Lukacs, K. D.: Zone electrophoresis in open-tubular glass-capillaries. *Analytical Chemistry* **53**:8, 1298-1302 (1981).
- [22] Nouadje, G.; Amsellem, J.; Couderc, B.; Verdeguer, P.; Couderc, F.: Capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection: optical designs and applications. In *Capillary Electrophoresis in Biotechnology and Environmental Analysis*. Utrecht, VSP 1997, s. 49-72.
- [23] Bryant, B. R.; Swanek, F. D.; Ewing, A. G.: Electrochemical detection in high-performance capillary electrophoresis. In *High-Performance Capillary Electrophoresis: Theory, Techniques, and Applications*. New York, John Wiley&Sons 1998, s. 355-374.
- [24] Swinney, K.; Bornhop, D. J.: Detection in capillary electrophoresis. *Electrophoresis* **21**:7, 1239-1250 (2000).
- [25] Li, S. F. Y.: Capillary Electrophoresis: Principles, Practice and Applications. In *Journal of Chromatography Library, Vol.52*. Amsterdam, Elsevier 1992.
- [26] Gaš, B.; Štědrý, M.; Kenndler, E.: Peak broadening in capillary zone electrophoresis. *Electrophoresis* **18**:12-13, 2123-2133 (1997).

- [27] Heiger, D. N.: *High Performance Capillary Electrophoresis*. Waldbronn, Hewlett-Packard Company 1992, s. 1-136.
- [28] Horváth, J.; Dolník, V.: Polymer wall coatings for capillary electrophoresis. *Electrophoresis* **22**:4, 644-655 (2001).
- [29] Neubert, R. H. H.; Rüttinger, H. H.: *Affinity Capillary Electrophoresis in Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, New York, Basel, Marcel Dekker 2003.
- [30] Uegaki, K.; Taga, A.; Akada, Y.; Suzuki, S.; Honda, S.: Simultaneous estimation of the association constants of glycoprotein glycoforms to a common protein by capillary electrophoresis. *Analytical Biochemistry* **309**:2, 269-278 (2002).
- [31] Kameshita, I.; Ishida, A.; Fujisawa, H.: Analysis of protein-protein interaction by two-dimensional affinity electrophoresis. *Analytical Biochemistry* **262**:1, 90-92 (1998).
- [32] Østergaard, J.; Heegaard, N. H. H.: Capillary electrophoresis frontal analysis: Principles and applications for the study of drug-plasma protein binding. *Electrophoresis* **24**:17, 2903-2913 (2003).
- [33] Erim, F. B.; Kraak, J. C.: Vacancy affinity capillary electrophoresis to study competitive protein-drug binding. *Journal of Chromatography B* **710**:1-2, 205-210 (1998).
- [34] Rudnev, A. V.; Aleksenko, S. S.; Semenova, O.; Hartinger, C. G.; Timerbaev, A. R.; Keppler, B. K.: Determination of binding constants and stoichiometries for platinum anticancer drugs and serum transport proteins by capillary electrophoresis using the Hummel-Dreyer method. *Journal of Separation Science* **28**:2, 121-127 (2005).
- [35] Busch, M. H. A.; Carels, L. B.; Boelens, H. F. M.; Kraak, J. C.; Poppe, H.: Comparison of five methods for the study of drug-protein binding in affinity capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A* **777**:2, 311-328 (1997).
- [36] Oravcová, J.; Böhs, B.; Lindner, W.: Drug-protein binding studies - New trends in analytical and experimental methodology. *Journal of Chromatography B-Biomedical Applications* **677**:1, 1-28 (1996).
- [37] Huang, G. L.; Yang, H.; Mei, X. Y.; Liu, M. X.; Ma, Y. T.: Fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis as detection method for carbohydrate-protein interactions. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **136**:1, 17-22 (2007).
- [38] Rao, J. H.; Whitesides, G. M.: Tight binding of a dimeric derivative of vancomycin with dimeric L-Lys-D-Ala-D-Ala. *Journal of the American Chemical Society* **119**:43, 10286-10290 (1997).
- [39] Tseng, W. L.; Chang, H. T.; Hsu, S. M.; Chen, R. J.; Lin, S. M.: Immunoaffinity capillary electrophoresis: Determination of binding constant and stoichiometry for antibody-antigen interaction. *Electrophoresis* **23**:6, 836-846 (2002).

- [40] Ševčík, J.; Tesařová, E.; Stránský, Z.: Separation of chiral compounds by capillary electrophoresis. *Chemické Listy* **95**:3, 139-146 (2001).
- [41] Van Eeckhaut, A.; Michotte, Y.: Chiral separations by capillary electrophoresis: Recent developments and applications. *Electrophoresis* **27**:14, 2880-2895 (2006).
- [42] Schmitt, U.; Branch, S. K.; Holzgrabe, U.: Chiral separations by cyclodextrin-modified capillary electrophoresis - Determination of the enantiomeric excess. *Journal of Separation Science* **25**:15-17, 959-974 (2002).
- [43] Koppenhoefer, B.; Zhu, X. F.; Jakob, A.; Wuerthner, S.; Lin, B. C.: Separation of drug enantiomers by capillary electrophoresis in the presence of neutral cyclodextrins. *Journal of Chromatography A* **875**:1-2, 135-161 (2000).
- [44] Bressolle, F.; Audran, M.; Pham, T. N.; Vallon, J. J.: Cyclodextrins and enantiomeric separations of drugs by liquid chromatography and capillary electrophoresis: Basic principles and new developments. *Journal of Chromatography B-Biomedical Applications* **687**:2, 303-336 (1996).
- [45] Shakalisava, Y.; Regan, F.: Determination of association constants of inclusion complexes of steroid hormones and cyclodextrins from their electrophoretic mobility. *Electrophoresis* **27**:15, 3048-3056 (2006).
- [46] Zavaleta, J.; Chinchilla, D.; Brown, A.; Ramirez, A.; Calderon, V.; Sogomonyan, T.; Gomez, F. A.: Recent developments in affinity capillary electrophoresis: A review. *Current Analytical Chemistry* **2**:1, 35-42 (2006).
- [47] Perles, R.; Nakamura, S - Cross Electrophoresis . Its Principle and Applications. *Bulletin de la Societe de Chimie Biologique* **49**:7, 913-& (1967).
- [48] Shimura, K.; Kasai, K.: Affinity capillary electrophoresis: A sensitive tool for the study of molecular interactions and its use in microscale analyses. *Analytical Biochemistry* **251**:1, 1-16 (1997).
- [49] Hořejší, V.; Tichá, M.: Qualitative and Quantitative Applications of Affinity Electrophoresis for the Study of Protein Ligand Interactions - A Review. *Journal of Chromatography* **376**: 49-67 (1986).
- [50] Hořejší, V.: Review: Affinity electrophoresis. *Analytical Biochemistry* **112**:1, 1-8 (1981).
- [51] Kašička, V.: Recent developments in capillary electrophoresis and capillary electrochromatography of peptides. *Electrophoresis* **27**:1, 142-175 (2006).
- [52] Pacáková, V.; Štulík, K.; Hubená, S.; Tichá, M.: Affinity capillary electrophoresis. *Chemické Listy* **94**:2, 97-104 (2000).
- [53] Villareal, V.; Kaddis, J.; Azad, M.; Zurita, C.; Silva, I.; Hernandez, L.; Rudolph, M.; Moran, J.; Gomez, F. A.: Partial-filling affinity capillary electrophoresis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **376**:6, 822-831 (2003).

- [54] Chinchilla, D.; Zavaleta, J.; Martinez, K.; Gomez, F. A.: Multiple-injection affinity capillary electrophoresis to estimate binding constants of receptors to ligands. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **383**:4, 625-631 (2005).
- [55] Heegaard, N. H. H.; Nilsson, S.; Guzman, N. A.: Affinity capillary electrophoresis: important application areas and some recent developments- Review. *Journal of Chromatography B* **715**:1, 29-54 (1998).
- [56] Ušelová-Včeláková, K.; Zusková, I.; Gaš, B.: Stability constants of amino acids, peptides, proteins, and other biomolecules determined by CE and related methods: Recapitulation of published data. *Electrophoresis* **28**:13, 2145-2152 (2007).
- [57] Bellini, M. S.; Deyl, Z.; Manetto, G.; Kohlickova, M.: Determination of apparent binding constants of drugs by capillary electrophoresis using beta-cyclodextrin as ligand and three different linear plotting methods. *Journal of Chromatography A* **924**:1-2, 483-491 (2001).
- [58] Busch, M. H. A.; Kraak, J. C.; Poppe, H.: Principles and limitations of methods available for the determination of binding constants with affinity capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A* **777**:2, 329-353 (1997).
- [59] Busch, M. H. A.; Boelens, H. F. M.; Kraak, J. C.; Poppe, H.: Vacancy affinity capillary electrophoresis, a new method for measuring association constants. *Journal of Chromatography A* **775**:1-2, 313-326 (1997).
- [60] Nichol, L. W.; Winzor, D. J.: Determination of Equilibrium Constants from Transport Data on Rapidly Reacting Systems of Type A Plus B to from C. *Journal of Physical Chemistry* **68**:9, 2455-& (1964).
- [61] Kraak, J. C.; Busch, S.; Poppe, H.: Study of Protein Drug Binding Using Capillary Zone Electrophoresis. *Journal of Chromatography* **608**:1-2, 257-264 (1992).
- [62] Karlson, P.: *Základy biochemie*. Praha, Academia 1981.
- [63] Kašička, V.: Recent advances in capillary electrophoresis and capillary electrochromatography of peptides. *Electrophoresis* **24**:22-23, 4013-4046 (2003).
- [64] Kašička, V.: Recent developments in CE and CEC of peptides. *Electrophoresis* **29**:1, 179-206 (2008).
- [65] Sázelová, P.; Šolínová, V.; Kašička, V.; Cencialová, A.; Jiráček, J.: Application of capillary and free-flow electrophoresis to analysis, purification and identification of antimicrobial peptides from freshfly *Neobellieria bullata*. *Journal of Chromatography B* (2008). - in preparation
- [66] Ward, T. J.: Chiral separations. *Analytical Chemistry* **78**:12, 3947-3956 (2006).
- [67] Fanali, S.: Enantioselective determination by capillary electrophoresis with cyclodextrins as chiral selectors. *Journal of Chromatography A* **875**:1-2, 89-122 (2000).

- [68] Luong, J. H. T.; Nguyen, A. L.: Achiral selectivity in cyclodextrin-modified capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A* **792**:1-2, 431-444 (1997).
- [69] Loftsson, T.; Duchene, D.: Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. *International Journal of Pharmaceutics* **329**:1-2, 1-11 (2007).
- [70] Schärddinger, F.: Bildung kristallisierter Polysaccharide (Dextrine) aus Starkekleister durch Microben. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene Abteilung II* **29**: 188-197 (1911).
- [71] Li, J. J.; Waldron, K. C.: Estimation of the pH-independent binding constants of alanylphenylalanine and leucylphenylalanine stereoisomers with beta-cyclodextrin in the presence of urea. *Electrophoresis* **20**:1, 171-179 (1999).
- [72] Chankvetadze, B.: *Capillary Electrophoresis in Chiral Analysis*. Chichester, New York, Weinheim, Brisbane, Singapore, Toronto, John Wiley & Sons 1997.
- [73] Vespalec, R.; Boček, P.: Chiral separations in capillary electrophoresis. *Electrophoresis* **20**:13, 2579-2591 (1999).
- [74] Singh, M.; Sharma, R.; Banerjee, U. C.: Biotechnological applications of cyclodextrins. *Biotechnology Advances* **20**:5-6, 341-359 (2002).
- [75] Fava, F.; Di Gioia, D.; Marchetti, L.: Cyclodextrin effects on the ex-situ bioremediation of a chronically polychlorobiphenyl-contaminated soil. *Biotechnology and Bioengineering* **58**:4, 345-355 (1998).
- [76] Uekama, K.: Design and evaluation of cyclodextrin-based drug formulation. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **52**:8, 900-915 (2004).
- [77] Razee, S.; Tamura, A.; Masujima, T.: Improvement in the determination of food additive dyestuffs by capillary electrophoresis using beta- cyclodextrin. *Journal of Chromatography A* **715**:1, 179-188 (1995).
- [78] Suzuki, S.; Shirao, M.; Aizawa, M.; Nakazawa, H.; Sasa, K.; Sasagawa, H.: Determination of synthetic food dyes by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A* **680**:2, 541-547 (1994).
- [79] Altria, K. D.: Determination of drug-related impurities by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A* **735**:1-2, 43-56 (1996).
- [80] Snopek, J.; Soini, H.; Novotný, M.; Smolková-Keulemansová, E.; Jelínek, I.: Selected Applications of Cyclodextrin Selectors in Capillary Electrophoresis. *Journal of Chromatography* **559**:1-2, 215-222 (1991).
- [81] Liu, J.; Li, S. F. Y.: Separation and determination of auxins by capillary electrophoresis. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* **19**:11, 1697-1713 (1996).

- [82] Stuppner, H.; Ganzera, M.: Application of beta-cyclodextrin for the analysis of the main alkaloids from *Chelidonium majus* by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A* **717**:1-2, 271-277 (1995).
- [83] Groom, C. A.; Luong, J. H. T.: Sulfobutylether-beta-cyclodextrin-mediated capillary electrophoresis for separation of chlorinated and substituted phenols. *Electrophoresis* **18**:7, 1166-1172 (1997).
- [84] Nie, S. M.; Dadoo, R.; Zare, R. N.: Ultrasensitive Fluorescence Detection of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Capillary Electrophoresis. *Analytical Chemistry* **65**:24, 3571-3575 (1993).
- [85] Penn, S. G.; Bergstrom, E. T.; Knights, I.; Liu, G. Y.; Ruddick, A.; Goodall, D. M.: Capillary electrophoresis as a method for determining binding constants: Application to the binding of cyclodextrins and nitrophenolates. *Journal of Physical Chemistry* **99**:11, 3875-3880 (1995).
- [86] Lee, Y. H.; Lin, T. I.: Capillary electrophoretic analysis of cyclodextrins and determination of formation constants for inclusion complexes. *Electrophoresis* **17**:2, 333-340 (1996).
- [87] Fanali, S.; Boček, P.: A practical procedure for the determination of association constants of the analyte-chiral selector equilibria by capillary zone electrophoresis. *Electrophoresis* **17**:12, 1921-1924 (1996).
- [88] Dzygiel, P.; Wieczorek, P.; Jonsson, J. A.: Enantiomeric separation of amino acids by capillary electrophoresis with alpha-cyclodextrin. *Journal of Chromatography A* **793**:2, 414-418 (1998).
- [89] Schuster, A.; Bernhardt, G.; Eibler, E.; Buschauer, A.; Hesselink, W.: Chiral separation of 3-phenyl-3-(2-pyridyl)propylamines, and analogous guanidines and guanidine-N-carboxylic acid esters with high-performance liquid chromatography and capillary zone electrophoresis. *Journal of Chromatography A* **793**:1, 77-90 (1998).
- [90] Kartsova, L. A.; Popova, A. M.; Sidorova, A. A.; Markova, O. I.: Evaluation of the stability constants of acidic and basic organic substances with 18-crown-6 and beta-cyclodextrin using capillary zone electrophoresis. *Journal of Analytical Chemistry* **62**:2, 179-183 (2007).
- [91] Wan, H.; Blomberg, L. G.: Enantiomeric separation of small chiral peptides by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A* **792**:1-2, 393-400 (1997).
- [92] Jin, L. J.; Rodriguez, I.; Li, S. F. Y.: Enantiomeric separation of amino acids derivatized with fluoresceine isothiocyanate isomer I by micellar electrokinetic chromatography using beta- and gamma- cyclodextrins as chiral selectors. *Electrophoresis* **20**:7, 1538-1545 (1999).
- [93] Miura, M.; Kawamoto, K.; Funazo, K.; Tanaka, M.: Chiral separation of several amino acid derivatives by capillary zone electrophoresis with selectively acetylated beta- cyclodextrin derivatives. *Analytica Chimica Acta* **373**:1, 47-56 (1998).

- [94] Miura, M.; Funazo, K.; Tanaka, M.: Chiral separation of several naphthalenesulfonylamino acids by capillary zone electrophoresis with selectively methylated cyclodextrin derivatives. *Analytica Chimica Acta* **357**:3, 177-185 (1997).
- [95] Tanaka, Y.; Terabe, S.: Enantiomer separation of acidic racemates by capillary electrophoresis using cationic and amphoteric beta- cyclodextrins as chiral selectors. *Journal of Chromatography A* **781**:1-2, 151-160 (1997).
- [96] Sabah, S.; Scriba, G. K. E.: Resolution of aspartyl dipeptide and tripeptide stereoisomers by capillary electrophoresis. *Journal of Microcolumn Separations* **10**:3, 255-258 (1998).
- [97] Verleysen, K.; Sabah, S.; Scriba, G.; Sandra, P.: Enantioseparation of aspartyl dipeptides by CE: Comparison between 18-crown-6-tetracarboxylic acid and carboxymethyl- beta- cyclodextrin as chiral selector. *Chromatographia* **49**:3-4, 215-218 (1999).
- [98] Cladrowarunge, S.; Rizzi, A.: Enantioseparation of 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate-derivatized-amino acids by capillary zone electrophoresis using native and substituted beta- cyclodextrins as chiral additives .1. Discussion of optimum separation conditions. *Journal of Chromatography A* **759**:1-2, 157-165 (1997).
- [99] Bjerregaard, C.; Hansen, L. P.; Moller, P.; Sorensen, H.; Sorensen, S.: Chiral separation of aromatic amino acids by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A* **836**:1, 137-146 (1999).
- [100] Nair, U. B.; Rundlett, K. L.; Armstrong, D. W.: Determination of association constants in cyclodextrin or vancomycin-modified micellar capillary electrophoresis. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* **20**:2, 203-216 (1997).
- [101] Rizzi, A. M.; Kremser, L.: Enantioseparation of derivatized amino acids by capillary isoelectric focusing using cyclodextrin complexation. *Electrophoresis* **20**:17, 3410-3416 (1999).
- [102] Wang, F.; Khaledi, M. G.: Nonaqueous capillary electrophoresis chiral separations with quaternary ammonium beta-cyclodextrin. *Journal of Chromatography A* **817**:1-2, 121-128 (1998).
- [103] Yamamura, H.; Akasaki, A.; Yamada, Y.; Kano, K.; Katsuhara, T.; Araki, S.; Kawai, M.; Tsuda, T.: Capillary zone electrophoretic chiral discrimination using a cationic cyclodextrin derivative: Determination of velocity and association constants of each enantiomer of the amino acid derivative with 6-trimethylammonio-deoxy-beta-cyclodextrin. *Electrophoresis* **22**:3, 478-483 (2001).
- [104] Galaverna, G.; Sforza, S.; Tedeschi, T.; Corradini, R.; Dossena, A.; Marchelli, R.: Enantiomeric separation of chiral peptide nucleic acid monomers by capillary electrophoresis with charged cyclodextrins. *Electrophoresis* **24**:15, 2698-2703 (2003).

- [105] Francotte, E.; Brandel, L.; Jung, M.: Influence of the degree of substitution of cyclodextrin sulfobutyl ether derivatives on enantioselective separations by electrokinetic chromatography. *Journal of Chromatography A* **792**:1-2, 379-384 (1997).
- [106] Verleysen, K.; Sabah, S.; Scriba, G.; Chen, A.; Sandra, P.: Evaluation of the enantioselective possibilities of sulfated cyclodextrins for the separation of aspartyl di- and tripeptides in capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A* **824**:1, 91-97 (1998).
- [107] Lipka, E.; Daniel, C.; Vaccher, M. P.; Glacon, V.; Ewing, D.; Mackenzie, G.; Len, C.; Bonte, J. P.; Vaccher, C.: Enantioseparation of new nucleoside analogs, related to d4T and acyclovir, by chiral capillary electrophoresis using highly sulfated beta-cyclodextrins. *Electrophoresis* **25**:3, 444-453 (2004).
- [108] Süß, F.; Sanger-van de Griend, C.; Scriba, G. K. E.: Migration order of dipeptide and tripeptide enantiomers in the presence of single isomer and randomly sulfated cyclodextrins as a function of pH. *Electrophoresis* **24**:6, 1069-1076 (2003).
- [109] Zakaria, P.; Macka, M.; Haddad, P. R.: Optimisation of selectivity in the separation of aromatic amino acid enantiomers using sulfated beta-cyclodextrin and dextran sulfate as pseudostationary phases. *Electrophoresis* **25**:2, 270-276 (2004).
- [110] Kurosu, Y.; Murayama, K.; Shindo, N.; Shisa, Y.; Satou, Y.; Senda, M.; Ishioka, N.: Optical resolution of phenylthiohydantoin-amino acids and identification of phenylthiohydantoin-D-amino acid residue of [D-Ala(2)]-methionine enkephalin by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A* **802**:1, 129-134 (1998).
- [111] Okeeffe, F.; Shamsi, S. A.; Darcy, R.; Schwinte, P.; Warner, I. M.: A persubstituted cationic beta-cyclodextrin for chiral separations. *Analytical Chemistry* **69**:23, 4773-4782 (1997).
- [112] Schmitt, P.; Garrison, A. W.; Freitag, D.; Kettrup, A.: Application of cyclodextrin-modified micellar electrokinetic chromatography to the separations of selected neutral pesticides and their enantiomers. *Journal of Chromatography A* **792**:1-2, 419-429 (1997).
- [113] Ciencialová, A.; Neubauerová, T.; Šanda, M.; Šindelka, R.; Cvačka, J.; Voburka, Z.; Buděšínský, M.; Kašička, V.; Sázellová, P.; Šolínová, V.; Macková, M.; Koutek, B.; Jiráček, J.: Mapping the peptide and protein immune response in the larvae of the fleshfly *Sarcophaga bullata*. *Journal of Peptide Science* (2008).
- [114] Koval, D.; Kašička, V.; Jiráček, J.; Collinsová, M.; Garrow, T. A.: Analysis and characterization of phosphinic pseudopeptides by capillary zone electrophoresis. *Electrophoresis* **23**:2, 215-222 (2002).