

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Přírodovědecká fakulta

Katedra fyzikální a makromolekulární chemie

**Stanovení konstant stability komplexů s nabitými
cyklodextriny kapilární zónovou elektroforézou**

Diplomová práce
studijního oboru Učitelství chemie a matematiky pro střední školy

PRAHA 2010

MARTIN BENEŠ

Klíčová slova

Kapilární zónová elektroforéza, konstanta stability, iontová síla, viskozita, cyklodextriny

Key words

Capillary zone electrophoresis, stability constant, ionic strength, viscosity, cyclodextrins

Prohlášení

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

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

V Praze dne

.....
podpis

Rád bych poděkoval své školitelce RNDr. Ivě Zuskové, CSc. za cenné rady a trpělivost, za ochotu a zájem, za pečlivý, osobní a pedagogický přístup a za nezměrnou pomoc při vypracovávání této diplomové práce.

Také děkuji kolegům a spolupracovníkům v pracovní skupině za skvělé pracovní podmínky a výtečnou atmosféru.

A všem ostatním kamarádům, že mě v tom nenechali.

Zvláštní poděkování patří mojí rodině, která mi umožnila vysokoškolské studium tohoto učitelského oboru.

Děkuji firmě Cyclolab, Budapešť, Maďarsko, za darování cyklodextrinu PABCD.

Děkuji za financování výloh spojených s realizací této diplomové práce z dlouhodobého výzkumného plánu Ministerstva školství České Republiky MSM 0021620857 a Grantové agentury Univerzity Karlovy, grant č. 101309101309.

Obsah

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	5
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ	6
1 ÚVOD A CÍL PRÁCE	10
2 TEORETICKÁ ČÁST	11
2.1 KAPILÁRNÍ ZÓNOVÁ ELEKTROFORÉZA	11
2.1.1 ZÁKLADNÍ POJMY	11
2.1.2 TLAKEM ZPROSTŘEDKOVANÁ KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZA (PREMCE)	20
2.1.3 VLIV IONTOVÉ SÍLY BGE NA ELEKTROFORETICKOU MOBILITU ANALYTU	22
2.2 KONSTANTY STABILITY A JEJICH URČENÍ	25
2.2.1 KONSTANTY STABILITY	25
2.2.2 EXPERIMENTÁLNÍ METODY URČENÍ KONSTANTY STABILITY	26
2.2.3 VYHODNOCOVÁNÍ EXPERIMENTÁLNÍCH DAT, URČENÍ KONSTANTY STABILITY	27
2.2.4 PROBLÉMY PŘI URČOVÁNÍ KONSTANT STABILITY	29
2.3 CYKLODEXTRINY	34
2.3.1 STRUKTURA A VLASTNOSTI CYKLODEXTRINŮ	34
2.3.2 VYUŽITÍ CYKLODEXTRINŮ	37
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	39
3.1 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE A PŘÍSTROJE	39
3.2 EXPERIMENTÁLNÍ PODMÍNKY A POSTUPY	40
4 VÝSLEDKY	45
4.1 VLIV TEPLoty	45
4.2 KOREKCE DAT HVL FUNKCÍ	46
4.3 SYSTÉM S KONSTANTNÍ IONTOVOU SILOU	47
4.4 SYSTÉM S PROMĚNLIVOU IONTOVOU SILOU	53
4.5 KONCENTRACE LIGANDU	57
5 DISKUSE	58
6 ZÁVĚR	60
7 SUMMARY	61
LITERATURA	62

Seznam použitých zkratk

A	analyt
AC	komplex vytvořený z analytu a komplexačního činidla
ACE	afinitní kapilární elektroforéza
BGE	základní elektrolyt
BMP	3-brom-2-methylpropan-1-ol
C	komplexační činidlo
CCD	bezkontaktní vodivostní detektor
CD	cyklodextriny
CE	kapilární elektroforéza
CZE	kapilární zónová elektroforéza
DAD	detektor s diodovým polem
DMSO	dimethylsulfoxid
EOF	elektroosmotický tok
erf ()	chybová funkce obsažená ve funkci HVL
FA	frontální analýza
FACCE	kontinuální frontální analýza v kapilární elektroforéze
HB	hydrobenzoin
HD	Hummel-Dreyerova metoda
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HVL	Haarhoffova – van der Lindeho funkce
ID	vnitřní průměr kapiláry
NMR	nukleární magnetická rezonance
PABCD	6-monodeoxy-6-mono(3-hydroxy)propylamino- β -cyclodextrin chlorid
PreMCE	tlakem zprostředkovaná kapilární elektroforéza
UV	ultrafialová oblast spektra
VACE	vakantní afinitní kapilární elektroforéza
VIS	viditelná oblast spektra
VP	metoda vakantních píků

Seznam použitých symbolů

[A]	rovnovážná koncentrace analytu
[AC]	rovnovážná koncentrace komplexu
[C]	rovnovážná koncentrace komplexačního činidla
A	konstanta v Debyově-Hückelově vztahu
a	nejkratší vzdálenost, na kterou se mohou přiblížit středy iontu a jeho protiiontu
a_0	plocha píku
a_1	střed píku
a_2	standardní odchylka Gaussova rozdělení
a_3	zakřivení píku
a_A	aktivita analytu
a_{AC}	aktivita komplexu
a_C	aktivita komplexačního činidla
B	konstanta v Debyově-Hückelově rozšířeném vztahu a Onsagerově rozšířeném vztahu
B_1	konstanta v Onsagerově limitním vztahu a rozšířeném modelu
B_2	konstanta v Onsagerově limitním vztahu a rozšířeném modelu
b_0	odezva detektoru pro základní linii
c	molární koncentrace
c^\ominus	standardní molární koncentrace
c_{CD}	celková koncentrace cyklodextrinu
c_i	koncentrace i -té iontové formy látky, i -té látky
E	intenzita elektrického pole
F	Faradayova konstanta
F_e	elektrická síla
F_f	frikční síla prostředí
I	iontová síla prostředí
K	termodynamická konstanta stability
K'	zdánlivá konstanta stability
l_C	celková délka kapiláry

l_{DAD}	délka kapiláry k DAD
l_k	vzdálenost analytu a markeru v kapiláře
M	poměr mobilit
N_A	Avogadrova konstanta
p_t	protlačovací tlak
q	náboj iontu
q	parametr v Onsagerově limitním vztahu a rozšířeném modelu
r	hydrodynamický poloměr iontu
R	univerzální plynová konstanta
$s(\mu_{\text{eff, kor}})$	směrodatná odchylka efektivní pohyblivosti analytu korigované na viskozitu
$s^2(\mu_{\text{eff}})$	rozptyl efektivních pohyblivostí analytu
$s^2\left(\int_{t_1}^{t_2} p dt\right)$	rozptyl hodnot určitého integrálu průběhu tlaku při protlačování zóny markeru kapilárou naplněnou separačním pufrem s přídatkem PABCD o dané koncentraci
$s^2\left(\int_{t_1}^{t_2} p dt\right)^0$	rozptyl hodnot určitého integrálu průběhu tlaku při protlačování zóny markeru kapilárou naplněnou separačním pufrem bez přídatku PABCD
T	termodynamická teplota
t	čas nutný k protlačení nadávkované zóny markeru kapilárou naplněnou separačním pufrem s přídatkem ligandu konstantním tlakem
t^0	čas nutný k protlačení nadávkované zóny markeru kapilárou naplněnou separačním pufrem bez přídatkem ligandu konstantním tlakem
t_D	časová korekce mezi počátkem aplikace vztahu a startem zápisu
t_{INJ}	časová korekce dávkování
t_K	detekční čas analyzovaného kationtu
t_{migr}	doba migrace

t_{N1}	detekční čas prvního markeru
t_{N2}	čas, který uplynul mezi počátkem aplikace tlaku p_t ve finálním kroku a časem, kdy druhý marker prošel přes detektor
$t_{\text{ramp up/down}}$	čas, po který napětí lineárně rostlo/klesalo na naprogramovanou hodnotu
U	napětí vložené na kapiláru
V	objem
v_h	rychlost hydrodynamického toku
x_A	molární zlomek volného analytu
x_{AC}	molární zlomek komplexu AC
z_-	náboj protiiontu
z_+	náboj kationtu
z_i	nábojové číslo i -tého iontu
γ_{AC}	aktivitní koeficient komplexu
γ_C	aktivitní koeficient komplexačního činidla
γ_i	aktivitní koeficient i -tého iontu
ε	permitivita prostředí
ζ	zéta potenciál na stěně kapiláry
η	viskozitní koeficient prostředí
η^0	viskozitní koeficient prostředí bez přídavku komplexačního činidla
κ	specifická vodivost
μ	elektroforetická pohyblivost (mobilita)
μ_+	aktuální pohyblivost kationtu
μ_0	limitní pohyblivost
μ_{A^-}	pohyblivost aniontu A^-
$\mu_{A, \text{eff}}$	efektivní pohyblivost analytu
μ_{AC}	pohyblivost komplexu AC
μ_{app}	pozorovaná pohyblivost
μ_{eff}	efektivní pohyblivost
$\mu_{\text{eff, kor}}$	efektivní pohyblivost korigovaná na viskozitu
μ_{EOF}	pohyblivost elektroosmotického toku

μ_i	pohyblivost i -té iontové formy látky
$\mu_{0,+}$	limitní pohyblivost kationtu
ν	relativní viskozitní koeficient
v	rychlost migrace

1 Úvod a cíl práce

Konstanta stability je rovnovážná konstanta popisující rovnováhu mezi analytem a komplexačním činidlem. Slouží ke kvantifikaci jejich vazebné interakce. Na tvorbě komplexů je založena funkce celé řady procesů v živých organismech. Vazebné interakce mají však nezastupitelnou roli i při separaci jinak nerozdělitelných směsí, např. enantiomerů. Komplexačním činidlem často využívaným k tvorbě komplexů s nejrůznějšími analyty patří cyklodextriny. V rámci studia konstant stability metodami kapilární elektroforézy se postupně přenáší zájem od nenabitých cyklodextrinů (jejichž vazebné interakce s různými analyty jsou obecně silnější) k nabitým cyklodextrinům. Jejich použití umožňuje studovat vazebné interakce i neutrálních analytů. Při studiu vazebných interakcí elektroforetickými metodami jsou však experimentální data významně ovlivňována i dalšími interakcemi, především vzájemnými interakcemi iontů a interakcemi s molekulami rozpouštědla. Tyto další interakce je nutné kvantifikovat a experimentální data vhodným způsobem korigovat. Jedině tak lze získat termodynamické konstanty stability, které se řadí mezi základní fyzikálně-chemické charakteristiky závislé pouze na teplotě, a jsou obecně využitelné v různých analytických metodách.

Cílem této práce bylo stanovení termodynamických konstant stability modifikovaného jednomocného kationtového β -cyklodextrinu s neutrálními analyty kapilární zónovou elektroforézou. Ke splnění tohoto cíle bylo zapotřebí věnovat pozornost faktorům ovlivňujícím experimentální data, a to především viskozitnímu koeficientu a iontové síle prostředí.

2 Teoretická část

2.1 Kapilární zónová elektroforéza

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

Kapilární zónová elektroforéza (CZE) je jednoduchou elektromigrační metodou, umožňující separaci a stanovení anorganických i organických ionogenních látek. CZE se úspěšně uplatňuje v oblasti farmacie při laboratorní kontrole čistoty léčiv; např. při kontrole optické čistoty léčiv, u nichž jeden z enantiomerů projevuje odlišnou biologickou aktivitu. Kapilární elektroforéza (CE) se postupně začíná také uplatňovat v oblasti analýzy anorganických iontů.⁽¹⁾

2.1.1 Základní pojmy

Základní pojmy kapilární zónové elektroforézy jako elektroforetická pohyblivost, elektroosmotický tok, disperzní jevy i základní princip a uspořádání různých metod jsou podrobně rozebrány v mnoha přehledových článkách^(2,3,4).

Elektroforetická pohyblivost

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

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

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

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

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

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

ve kterém v je rychlost migrace iontu.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

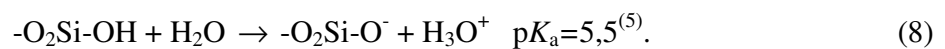
kde c_i a μ_i označují koncentraci a aktuální mobilitu i -té iontové formy látky, jejíž analytická koncentrace je rovna c .

V případě slabých elektrolytů je efektivní pohyblivost závislá prostřednictvím stupně disociace na pH prostředí. Slabá kyselina HA bude vykazovat nejvyšší mobilitu v roztoku o takovém pH, při kterém bude plně disociována. Za takových experimentálních podmínek naměříme pohyblivost příslušného aniontu μ_{A^-} .

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

Elektroosmotický tok

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



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

elektroosmotického toku je jeho takřka pravoúhlý pístový profil v celém průřezu kapiláry, tedy jeho příspěvek k rozmývání zón analytů během separace je minimální.

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

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

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

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

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

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

Disperzní jevy v kapilární zónové elektroforéze

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

Nejvýznamnější příspěvky k celkové disperzi představují:

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

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

Elektrický proud procházející kapilárou vyvolává vznik Joulova tepla, které ohřívá elektrolyt. V důsledku toho vznikají v kapiláře teplotní gradienty a lokální změny viskozity prostředí, které deformují píkový profil elektroosmotického toku a ovlivňují elektroforetické mobility analytů. Omezení vzniku Joulova tepla je možné zmenšením elektrického pole, redukcí průměru kapiláry nebo snížením vodivosti základního elektrolytu.

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

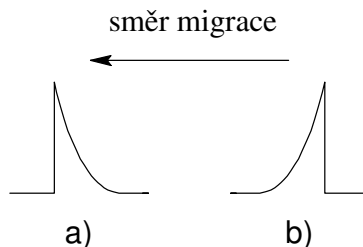
Elektromigrační disperze způsobuje deformaci ideálního gaussovského píku na charakteristický pík trojúhelníkovitý. Projeví se ale pouze tehdy, pokud se analyt nadávkuje v koncentraci, která ovlivní vodivost a pH základního elektrolytu v zóně analytu.

Pro popis elektromigrační disperze i -té složky byla definována veličina S_i (relative velocity slope)⁽⁶⁾:

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

kde κ představuje specifickou vodivost v zóně složky. Pokud s rostoucí koncentrací složky roste také její rychlost, veličina S bude mít kladnou hodnotu. Pík bude mít ostrou náběžnou a

rozmytou závěrečnou hranu - píky chvistují (tailing). V opačném případě pozorujeme pík frontující, viz Obr. 1.



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

V případě, že vzorkem je silný elektrolyt, má na tvar píku zásadní vliv mobilita koiontu. Koion je takový ion základního elektrolytu, který migruje stejným směrem jako ion analytu, který nás zajímá.⁽³⁾ Pokud je mobilita analytu vyšší než mobilita jemu příslušného koiontu, pak v místě o vyšší koncentraci analytu bude vyšší specifická vodivost než v okolí. Dojde ke snížení potenciálového spádu a snížení migrační rychlosti. Budeme pozorovat frontující pík. Za předpokladu, že mobilita analytu je nižší než mobilita jemu příslušného koiontu, pozorujeme chvistující pík. U slabých elektrolytů je situace složitější, neboť jejich migrační rychlost může být významně ovlivněna hodnotou pH.

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

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

kde a_0 je plocha píku, a_1 je střed píku, a_2 je standardní odchylka Gaussova rozdělení a a_3 reprezentuje zakřivení píku. Dále x představuje čas nebo vzdálenost a jednotky jednotlivých parametrů a jsou konzistentní s jednotkou x .⁽⁴⁾ Zkratka $\operatorname{erf}()$ představuje chybovou funkci danou předpisem:

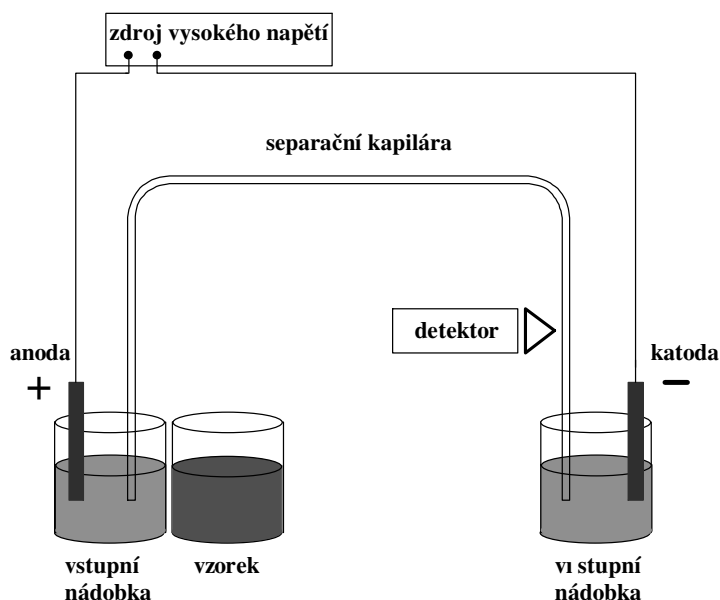
$$\operatorname{erf}(z) = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_0^z e^{-t^2} dt. \quad (12)$$

Parametr a_1 je tedy hledanou hodnotou pro výpočet pohyblivosti analytu.

Základní princip a uspořádání kapilární zónové elektroforézy

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

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



Obr. 2 Schéma přístroje pro kapilární elektroforézu (překresleno podle ⁽⁵⁾).

Dávkování lze realizovat dvěma způsoby. Při hydrodynamickém dávkování je roztok vzorku do kapiláry natlačen vytvořením přetlaku na hladinu v nádobce se vzorkem. Méně často používaným způsobem je dávkování elektrokinetické. Na elektrody je vloženo dávkovací napětí a vlivem elektroosmózy a případné vlastní pohyblivosti vzorek naputuje do kapiláry. Po nadávkování vzorku je kapilára opět vnořena do nádoby s pufrům a k systému je připojen zdroj stejnosměrného napětí. Celá zóna vzorku je unášena elektroosmotickým tokem, a to v nemodifikované křemenné kapiláře směrem ke katodě. Nabité složky vzorku vyputují z nadávkované zóny a rozdělí se v důsledku rozdílných elektroforetických rychlostí. Rozdělené složky se poté pohybují v oddělených zónách konstantní rychlostí. Neutrální látky zůstávají po celou dobu trvání experimentu v nadávkované zóně a slouží k určení rychlosti elektroosmotického toku. Pohyb vzorku v kapiláře je sledován detektorem umístěným u výstupního konce kapiláry a napojeným na počítač, který zaznamenává průběh detekce – elektroferogram. Nejčastěji používaným detektorem je absorpční fotometrický detektor umožňující práci v ultrafialové (UV) a viditelné (VIS) oblasti spektra. Pokud při zvolené vlnové délce detekce analyt absorbuje více než separační elektrolyt, na elektroferogramu se jeho přítomnost projeví jako kladný pík. V takovém případě mluvíme o přímé absorpční detekci. Pro analyty nedostatečně absorbující záření v UV – VIS oblasti spektra lze využít nepřímou fotometrickou detekci, kdy se jako základní elektrolyt zvolí pufr, který obsahuje výrazně absorbující složku. Průchod analytu detektorem se poté projeví jako negativní pík. Jinou používanou detekční technikou je vodivostní detekce. Tato je založena na měření změn elektrické vodivosti prostředí v kapiláře - nejčastěji bezkontaktním vodivostním detektorem⁽⁷⁾. Elektroferogram poskytuje o analytu informaci jak kvalitativní (migrační čas píku), tak kvantitativní (plocha píku).

Systémové zóny a píky

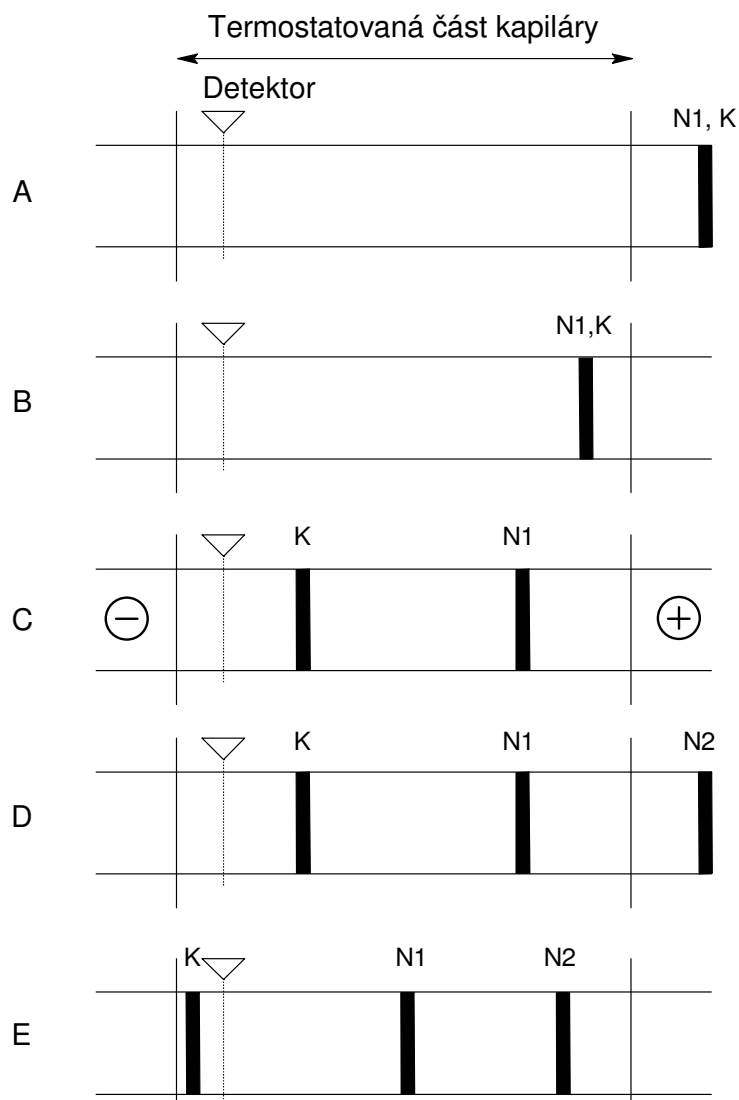
Systémové píky jsou zaznamenány detektorem, ale nepřísluší žádnému separovanému analytu. Jedná se o pohyblivé poruchy v původně jednotné koncentraci BGE, které byly způsobeny nadávkováním vzorku do kapiláry. Systémové píky jsou detekovány pouze za použití detekční metody, jejíž odezva je citlivá vůči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

V práci Štědrého a kol.⁽⁸⁾ byl představen lineární model elektromigrace, založený na linearizovaných rovnicích zachování hmoty a rovnicích popisujících acidobazické rovnováhy a podmínku elektroneutrality. Lineární model byl představen a zkoumán nejprve na systémech se silnými elektrolyty⁽⁶⁾, uni-univalentními slabými elektrolyty⁽⁹⁾ a později byla odstraněna veškerá omezení týkající se složení systému a valence jednotlivých složek⁽⁸⁾. Tento model umožňuje předpovědět existenci systémových zón, jejich mobilitu a další verze⁽¹⁰⁾ i amplitudy jim odpovídajících píků. Tento model spočívá ve výpočtu vlastních čísel (eigenvalues) určitých matic. Tato vlastní čísla mají rozměr elektroforetických mobilit (eigenmobility). Některé z nich ovšem nepřísluší žádnému dávkovanému analytu. Ty jsou potom nazývány systémové eigenmobility. Existence těchto systémových eigenmobilit naznačuje, že určité zóny – systémové zóny nebo systémové eigenzóny – se v separační kapiláře pohybují právě s těmito mobilitami. Počet systémových eigenzón je stejný jako počet konstituentů BGE, přičemž konstituent je definován jako kyselina, báze či amfolyt jakékoli valence a síly.⁽¹¹⁾ Žádná z těchto systémových zón nemá pohyblivost rovnu nule. Za určitých podmínek jsou ale některé z nich nule blízké a dají se použít jako markery EOF.⁽¹²⁾ Problém ovšem nastává, pokud se některá ze systémových zón pohybuje s pohyblivostí blízkou pohyblivosti analytu. Systémový pík potom může překrýt pík analytu a tím celou separaci zhatit. Systémové píky proto vnímáme spíše jako rušivé. Přesto se jich dá využít například pro elegantní a přesné stanovení kritické micelární koncentrace v micelárních systémech.⁽¹¹⁾ Podrobnější klasifikace systémových zón je uvedena například v přehledových člancích.^(12, 13)

Linearizovaný model elektromigrace byl implementován do počítačového programu PeakMaster⁽⁸⁾, který je volně ke stažení na internetu⁽¹⁵⁾. Tento program umožňuje po zadání vstupních parametrů separace (koncentrace, limitní iontové mobility a disociační konstanty konstituentů BGE a dávkovaného vzorku a technické parametry separace) vypočítat například pH základního elektrolytu, efektivní pohyblivost analytu, elektromigrační disperzi, existenci a migrační časy systémových zón včetně amplitud jim odpovídajících píků. Pro náročnější simulace dynamické separace byl vyvinut program Simul⁽¹⁶⁾, umožňující například také simulace méně obvyklých modů CZE.

2.1.2 Tlakem zprostředkovaná kapilární elektroforéza (PreMCE)

Williams a Vigh představili metodu, která odstraňuje některé obtíže elektroforézy vlastní.^(17, 18) Především se jedná o určování elektroforetické mobility za kolísavého EOF a separaci v netermostatované části kapiláry. Tato metoda navíc umožňuje měřit nízké elektroforetické mobility i za velice nízkého EOF rychle a reprodukovatelně. V normálním módu takové experimenty mohou trvat i několik hodin. Kationty a anionty můžeme měřit v rámci jednoho experimentu a to bez ohledu na směr a velikost EOF. Přesné určení elektroforetických mobilit touto metodou je závislé na aplikaci konstantního tlaku na kapiláru, což komerční přístroje v omezené míře umožňují.



Obr. 3 Pořadí kroků při použití metody PreMCE k určení mobility kationtu (překresleno podle⁽¹⁷⁾).

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

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

$$v_h = \frac{l_D}{t_{N_2} + t_{inj}/2 - t_d}, \quad (13)$$

kde l_D je délka kapiláry k detektoru, t_{N_2} je čas, který uplynul mezi počátkem aplikace tlaku p_t ve finálním kroku a časem, kdy druhý marker prošel přes detektor, $t_{inj}/2$ koriguje časové nadávkování markeru a t_d je časová korekce zdržení mezi začátkem aplikace tlaku a startem zápisu. Tyto dvě korekce jsou zanedbatelné při dostatečně dlouhém čase t_{N_2} . Ve třetím kroku došlo k separaci analytu a markeru. Jejich vzájemná vzdálenost v kapiláře, l_k , vyplývá ze vztahu:

$$l_k = (t_{N_1} - t_k)v_h, \quad (14)$$

kde t_{N_1} je detekční čas prvního markeru a t_k je detekční čas analyzovaného kationtu. Potom efektivní elektroforetickou mobilitu kationtu můžeme spočítat jako

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

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

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

Autoři této metody ukázali, že rychlost hydrodynamického toku v_h během experimentu nijak významně nekolísá.

2.1.3 Vliv iontové síly BGE na elektroforetickou mobilitu analytu

Kapilární zónová elektroforéza se v posledních desítkách let stala uznávanou a hojně využívanou metodou. V souvislosti s optimalizací experimentálních podmínek byl studován vliv pH separačního elektrolytu na elektroforetickou pohyblivost slabých kyselin a zásad, vliv vodivosti BGE na vznik Joulova tepla a tyto efekty byly dobře vysvětleny. Dokonce byly vyvinuty matematické modely umožňující výpočet elektromigrační disperze a existence systémových píků (viz výše). Byl popsán vliv iontové síly na účinnost a míru relativního rozlišení separace.⁽¹⁹⁾ Na druhou stranu právě vliv iontové síly BGE na mobilitu analytu je zatím zpracován nedostatečně. Tomuto studiu chybí obecná zastřešující teorie. Výzkum v posledních letech se soustředil spíše na odvození empirických vztahů pro konkrétní skupinu analytů a konkrétní BGE.⁽²⁰⁾ Přitom právě tato závislost nám výrazně chybí při snaze předpovídat hodnoty elektroforetické mobility a korektně simulovat elektromigrační procesy.

Onsagerův limitní zákon

Onsagerův limitní zákon byl odvozen jako analogie k Debyeově – Hückelově teorii výpočtu aktivitních koeficientů iontů.⁽²¹⁾ Onsagerův limitní zákon pro elektroforetickou pohyblivost kationtu lze psát ve tvaru⁽²²⁾:

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

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

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

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

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

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

Iontová síla je definována jednoduchým vztahem:

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

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

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

Rozšířený Onsagerův model

Onsagerův limitní vztah byl odvozen na základě zjednodušujících předpokladů, které jsou splněny pouze při nízkých iontových silách. Ve vyšších koncentracích je už ale třeba počítat s konečnou velikostí iontů. Analogicky k zakomponování tohoto parametru do Debyeova – Hückelova zákona dostáváme rozšířený Onsagerův model⁽²²⁾:

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

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

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

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

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

K analogickému vztahu jako je rozšířený Onsagerův zákon dospěli Lucy a kol.⁽²¹⁾ s využitím Pittova vztahu odvozeného též z rozšířeného Debyeova-Hückelova zákona. Strukturně

analogický vztah využívali Survej a kol.⁽²³⁾ pro popsání závislosti mobility univalentních oligopeptidů na iontové síle prostředí. Z jeho výsledků se dá usuzovat, že tento přístup bude aplikovatelný i pro další systémy s univalentními analyty. Obecně je ale zatím možno konstatovat, zvláště pro určování limitní iontové mobility, že obdržené hodnoty významně závisí na modelu, který k výpočtu použijeme. Při použití Onsagerova rozšířeného modelu, rovnice (21), hraje významnou roli přístup, jakým určíme hodnotu Ba .

Onsagerův model byl vyvinut pro popis závislosti elektrické vodivosti silného binárního elektrolytu (jeden kation a jeden anion) na jeho koncentraci. V CZE ale často analyty migrují prostředím, které obsahuje více iontových konstituentů. Při aproximaci podle Onsagerova modelu počítáme pouze s protiiontem analytu obsaženým v BGE. Mnohem složitější aproximace zahrnující směs vícevalentních iontů byla vypracována Onsagerem a Fuossem. Tento model byl zakomponován Jarošem a kol.⁽²⁴⁾ do počítačové simulace elektroforézy v programu Peakmaster.

2.2 Konstanty stability a jejich určení

2.2.1 Konstanty stability

K nekovalentním molekulovým interakcím dochází v přírodě mezi mnoha různými typy molekul. Rovnovážné konstanty popisující tyto interakce jsou potom základem pro studium takových vazebných poměrů. Například určení rovnovážné konstanty plazmových proteinů s léčivem je klíčové pro vývoj léčiv, protože koncentrace nevázaného léčiva určuje jeho farmakologickou aktivitu.⁽²⁴⁾ Tyto konstanty se potom nazývají konstanty stability, komplexační, asociační, vazebné apod.

Konstanta stability je důležitým parametrem popisující tvorbu komplexu AC z volného analytu A a komplexačního činidla (ligandu) C. Pro nejjednodušší a také nejčastěji uvažovanou stechiometrii A:C = 1:1 rovnováhu vystihuje rovnice



Této rovnici odpovídá termodynamická konstanta stability

$$K = \frac{a_{AC}}{a_A a_C}, \quad (24)$$

kde symbol a značí aktivity jednotlivých složek. Tyto aktivity lze určit z jejich koncentrací v roztoku pomocí vztahu

$$a_i = \frac{c_i}{c^\ominus} \gamma_i, \quad (25)$$

kde c^\ominus je standardní koncentrace (1 mol dm^{-3}), c_i molární koncentrace i -té složky. Hodnotu aktivního koeficientu i -tého iontu (γ_i) lze získat například z Debyeova-Hückelova rozšířeného vztahu^(21, 26, 27):

$$-\log \gamma_i = \frac{Az_i^2 \sqrt{I}}{1 + Ba\sqrt{I}}, \quad (26)$$

kde konstanta A nabývá hodnoty $A = 0,509 (\text{mol dm}^{-3})^{-1/2}$ pro vodné roztoky a teplotu 25°C , všechny ostatní veličiny a konstanty mají stejný význam i hodnotu jako v kapitole 2.1.3.

V praxi se ovšem mnohem častěji používá zdánlivá konstanta stability, ve které jsou aktivity nahrazeny rovnovážnými molárními koncentracemi:

$$K' = \frac{[AC]}{[A][C]}. \quad (27)$$

Zdánlivá konstanta stability potom má jednotku $(\text{mol dm}^{-3})^{-1}$. Tato konstanta ovšem platí pouze pro dané experimentální podmínky a závisí jak na teplotě, tak iontové síle systému.

Interakci mezi neutrálním analytem a ligandem nesoucím náboj z lze popsat rovnicí



Za předpokladu, že aktivitní koeficient neutrální částice je jednotkový, můžeme termodynamickou konstantu pro tuto rovnováhu vyjádřit vztahem

$$K = \frac{[AC]c^\ominus \gamma_{AC}}{[A][C] \gamma_C}. \quad (28)$$

Aktivitní koeficienty ligandu a komplexu se budou lišit pouze díky jejich rozdílné velikosti. V případě, že komplex a ligand jsou přibližně stejně velké částice, lze aktivitní koeficienty ztotožnit a číselná hodnota zdánlivé konstanty stability se rovná hodnotě konstanty termodynamické.

2.2.2 Experimentální metody určení konstanty stability

Bylo vyvinuto množství různorodých technik, kterými je možno zkoumat interakce mezi analytem a ligandem, např. UV-VIS spektroskopie, kalorimetrie, potenciometrie, chromatografické metody, NMR či mnohé metody kapilární elektroforézy. V zásadě je použitelná každá metoda či technika, při které se měřená veličina mění v závislosti na koncentraci ligandu respektive stupni komplexace. Každá z uvedených technik má svoje výhody, nevýhody a omezení.

K určení konstant stability se v rámci kapilární elektroforézy používají následující metody: afinitní kapilární elektroforéza (ACE), Hummel-Dreyerova metoda (HD), vakantní afinitní kapilární elektroforéza (VACE), metoda vakantních píků (VP), frontální analýza (FA) či kontinuální frontální analýza v kapilární elektroforéze (FACCE). S výjimkou VACE byly všechny tyto metody vyvinuty v rámci vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) a teprve později použity v kapilární elektroforéze. Podrobný popis jednotlivých metod a experimentálního uspořádání byl podán v mnoha přehledových článcích.⁽²⁸⁻³²⁾

Jednotlivé metody se liší především složením dávkovaného vzorku, pufru v kapiláře a sledovanou veličinou, z jejíž změny je posléze vypočtena konstanta stability. V daném

uspořádání se poté provede série měření, během níž se koncentrace jedné komponenty mění a koncentrace druhé je konstantní. K vyhodnocení se využívá závislosti měřené veličiny (elektroforetické mobility, výšky plata či plochy vakantního píku) na proměnné koncentraci jedné z komponent.

Někteří autoři⁽²⁸⁾ uvádějí podmínky, bez jejichž splnění není možné stanovit konstantu stability žádnou z metod kapilární elektroforézy. Především analyt či ligand musí být za daných experimentálních podmínek nabitý. V případě rychlé rovnováhy (ustavení komplexační rovnováhy je rychlejší než samotná doba separace) je nejčastěji používanou metodou k určení konstanty stability ACE. Existují dvě rozdílná analogická uspořádání ACE. Buď je kapilára plněna BGE s rozpuštěným ligandem o různé koncentraci a je dávkován analyt o konstantní koncentraci nebo naopak. V případě dostatečně rychlé rovnováhy se potom dávkovaná složka pohybuje v jedné zóně efektivní pohyblivosti, která závisí na stupni komplexace. Konstanta je potom určena ze závislosti této pohyblivosti na koncentraci dané složky v BGE.

2.2.3 Vyhodnocování experimentálních dat, určení konstanty stability

Při určování konstanty stability metodou ACE sledujeme změnu efektivní pohyblivosti analytu respektive ligandu v závislosti na měnící se koncentraci ligandu respektive analytu v pufru. V dalších úvahách budeme diskutovat případ, že dávkujeme analyt o konstantní koncentraci a koncentrace ligandu v pufru se mění. Za předpokladu, že stechiometrie reakce je A:C = 1:1, že rychlost komplexace je vyšší než rychlost separace a že změna mobility analytu je způsobena pouze jeho komplexací s ligandem, lze efektivní mobilitu analytu vyjádřit jako vážený průměr mobility analytu volného a vázaného v komplexu⁽²⁸⁾:

$$\mu_{A,\text{eff}} = x_A \mu_A + x_{AC} \mu_{AC}, \quad (29)$$

kde x_A je molární zlomek volného analytu a μ_A jeho elektroforetická pohyblivost, x_{AC} je molární zlomek komplexu analyt:ligand a μ_{AC} jeho pohyblivost. Když dosadíme za molární zlomky, dostáváme rovnici:

$$\mu_{A,\text{eff}} = \frac{[A]}{[A] + [AC]} \mu_A + \frac{[AC]}{[A] + [AC]} \mu_{AC}. \quad (30)$$

Kombinací rovnic (27) a (30) dostaneme rovnici

$$\mu_{A,\text{eff}} = \frac{\mu_A + \mu_{AC}K'[C]}{1 + K'[C]}, \quad (31)$$

kteřá se již používá jako regresní funkce pro nelineární regresní analýzu.

Pro případ komplexu neutrálního analytu s ligandem nesoucím náboj, dostáváme zjednodušenou rovnici:

$$\mu_{A,\text{eff}} = \frac{\mu_{AC}K'[C]}{1 + K'[C]}. \quad (32)$$

Změna efektivní mobility nebývá však způsobena pouze komplexací analytu a ligandu. Zapojuje se například vliv iontové síly, interakce analytu či ligandu se stěnou kapiláry nebo změna viskozity prostředí. Tyto faktory mohou být pro samotnou regresní analýzu eliminovány vhodnou korekcí naměřených dat.

Rovnice (31) a (32) jsou ve tvaru rovnoosé hyperboly, která je používána již dlouhá desetiletí pro modelování nejrůznějších chemických vlastností závislých na nabývání rovnováhy. Je využívána ve spektrofotometrii, NMR, při modelování kinetiky podle rovnice Michaelise – Mentenové či při transportu iontů přes membránu. Obecně ji lze vyjádřit ve tvaru^(28, 33):

$$y = \frac{dx}{f + ex}, \quad (33)$$

kde y je sledovaná a měřená odezva systému, x koncentrace ligandu a d , e a f jsou konstanty. Jedna z konstant vždy popisuje rovnováhu (reprezentuje tedy rovnovážnou konstantu, konstantu stability). Jiná z konstant potom udává maximální rozpětí měřených hodnot (tedy rozdíl mezi maximální a minimální odezvou systému). Hodnoty konstant jsou většinou určeny pomocí série měření za různých koncentrací ligandu následované vhodnou regresní analýzou. Konstanty můžeme získat použitím přímo konkrétního tvaru rovnoosé hyperboly jako regresní funkce, potom hovoříme o nelineární regresní analýze. Druhou možností je převést rovnici (33) na jeden z možných linearizovaných tvarů^(28, 33):

$$\frac{1}{y} = \frac{f}{d} \frac{1}{x} + \frac{e}{d} \quad (34)$$

$$\frac{x}{y} = \frac{e}{d} x + \frac{f}{d} \quad (35)$$

$$\frac{y}{x} = -\frac{e}{f} y + \frac{d}{f} \quad (36)$$

Jednotlivé konstanty se potom určují ze směrnic závislostí a z průsečíků přímk se souřadnicovými osami. Tyto linearizované tvary se v literatuře vyskytují pod různými názvy.^(28,32,33,34) Použití rovnice (34) je známo jako dvojitá reciproční metoda (Lineweaver – Burkova metoda v enzymové kinetice či Benesi – Hildebrandova metoda ve spektrofotometrii), rovnice (35) jako y-reciproční metoda a rovnice (36) jako x-reciproční metoda (jinak známa jako Eadieho metoda v enzymové kinetice nebo jako Scatchardova metoda ve výzkumu vazeb proteinů). Poslední používanou lineární závislostí je metoda poměrů rozdílů mobilit.

Všechny linearizované rovnice i původní hyperbolická rovnice jsou si algebraicky ekvivalentní; jednu můžeme pomocí algebraických úprav převést na druhou. Ovšem jako regresní funkce ekvivalentní nejsou. Aplikovány na stejná data poskytují různé hodnoty konstant i jejich intervalů spolehlivosti. Linearizace totiž nezohledňuje některé předpoklady, které jsou brány v úvahu při nelineární analýze. Navíc linearizace transformuje chybu měření, datům z některých měření přiřadí jinou váhu a změni rozdělení dat na negaussovské. Pokud bychom chtěli těmto problémům předejít a získat lineární regresí správné a přesné výsledky, bylo by třeba data transformovat vhodnou funkcí.^(36, 37) To je ovšem velice obtížný a komplexní analytický problém. Vzhledem ke spletnosti regresních výpočtů je velice obtížné analyticky ukázat, jak se mění rozdělení jednotlivých chyb. Bylo ovšem prokázáno, že použitím metod nelineární regrese je minimalizována jak chyba, tak odchylka určených konstant. Bowser a kol.^(33, 34) zkoumali přesnost a správnost konstant stability určených nelineární regresí a jinými metodami. Pomocí simulace Monte Carlo ukázali, že konstanty stability získané nelineární regresí jsou správnější a přesnější než při použití jiných metod. Také ostatní autoři se přiklánějí k nelineární regresi jako k nejlepšímu možnému způsobu vyhodnocení experimentálních dat.^(28, 32)

2.2.4 Problémy při určování konstant stability

Všechny publikované práce uvádějící konstanty stability můžeme rozdělit do dvou skupin. Práce první skupiny se soustředí přímo na určení konstanty stability, zatímco konstanty stability druhé skupiny jsou pouhým vedlejším produktem úspěšné separace. Autoři se soustředí na nalezení optimálních separačních podmínek a naměřená data již nijak nekorigují. Přitom rovnice (31) a (32) lze použít k určení konstanty stability pouze za předpokladu, že

efektivní mobilita analytu se mění pouze v důsledku komplexace. Tento předpoklad ovšem mnohdy není dobře splněn a naměřená data je třeba před samotným vyhodnocením ještě korigovat.

Iontová síla

Iontová síla prostředí je faktor, který významným způsobem ovlivňuje určování konstant stability. Zdánlivé konstanty stability závisejí na iontové síle prostředí (viz odstavec 2.2.1). I v případě, že zdánlivá konstanta je na iontové síle prostředí nezávislá, elektroforetické mobility jednotlivých složek na iontové síle závisejí (podrobněji viz 2.1.3). Je tedy velice důležité tento faktor zohlednit.

Pokud chceme určit správné hodnoty konstant stability, je třeba vždy počítat s iontovou silou prostředí. Je třeba znát přesné složení pufru, koncentrace všech jeho složek. V praxi je ale pufr často titrován do požadované hodnoty pH bez ohledu na znalost přesného složení, což znesnadňuje přesný výpočet iontové síly prostředí a zohlednění tohoto faktoru během vyhodnocování dat.

V případě snahy počítat s iontovou silou prostředí je komplikací též časté použití pufrů s vysokou iontovou silou, která leží mimo oblast platnosti korekčních vztahů (aktivitní koeficient, rozšířený Onsagerův model). Kromě toho vysoká iontová síla BGE v kapiláře znamená při stejném aplikovaném napětí vyšší procházející proud, který způsobuje vznik většího množství Joulova tepla (více viz odstavec Teplota).

Autoři, kteří se snaží hodnoty na iontovou sílu korigovat, se potýkají s dalším problémem, kterým jsou polyvalentní ligandy a výpočet iontové síly po jejich přidavku do BGE. Někteří autoři⁽³⁸⁾ prosazují teorii, že takové ligandy (např. sulfatované cyklodextriny) neponesou v roztoku maximální teoretický náboj, neboť dojde k částečné asociaci iontů z roztoku. Nastává tedy problém, jak určit příspěvek takových částic k celkové iontové síle prostředí.

Pravdou ovšem zůstává, že mnoho autorů se korekcí na iontovou sílu vůbec nezabývá. Iontová síla a její zvyšování pro ně představuje pouze problém v tom ohledu, že zpomaluje rychlost EOF. Takto získané konstanty stability lze ovšem brát pouze jako hrubý odhad vazebných interakcí.

Viskozita

Ze vztahu (6) jasně plyne, že elektroforetická pohyblivost výrazně závisí na viskozitě prostředí. Již po malém přídavku ligandu do pufru může dojít k významné změně jeho viskozity. Autoři^(28, 39) uvádějí, že při použití cyklodextrinů jako ligandů a pokud je stanovovaná konstanta stability menší než 100 mmol dm^{-3} , změna mobility analytu způsobená vlivem viskozity může být i větší než její změna způsobená komplexací s ligandem. Je tedy jasné, že viskozita je jeden z významných faktorů ovlivňujících stanovení správných konstant stability.

Někteří autoři⁽⁴⁰⁾ pro korekci změn viskozity využívají poměru mobility EOF při absenci ligandu ku mobilitě EOF při dané koncentraci ligandu. K tomuto účelu je nutno vybrat marker EOF, o němž s jistotou můžeme prohlásit, že s ligandem nijak neinteraguje. Mobilita EOF závisí na viskozitním koeficientu prostředí dle vztahu:

$$\mu_{\text{EOF}} = \frac{\varepsilon \zeta}{4\pi\eta}, \quad (37)$$

kde ε je dielektrická konstanta prostředí a ζ představuje zéta-potenciál na stěně kapiláry.

Z tohoto vztahu ovšem plyne, že mobilita EOF se může měnit také vlivem permitivity prostředí či zéta-potenciálu. Před použitím této korekce je tedy třeba dokázat, že mobilita EOF se mění pouze vlivem změny viskozitního koeficientu prostředí.

Jednoduchý způsob korekce založený též na změně mobility EOF využívá poměru mobilit M ^(31, 41, 42):

$$M = \frac{\mu_{\text{app}}}{\mu_{\text{EOF}}} = \frac{\mu_{\text{eff}} + \mu_{\text{EOF}}}{\mu_{\text{EOF}}}, \quad (38)$$

kde μ_{app} je pozorovaná mobilita analytu, μ_{eff} efektivní mobilita analytu a μ_{EOF} mobilita elektroosmotického toku. Tato korekce má tu výhodu, že k ní stačí data z elektroforetického experimentu. Použít ji však lze pouze v případě, že μ_{app} a μ_{EOF} mají stejnou závislost na viskozitním koeficientu a změna pohyblivosti EOF je způsobena pouze změnou viskozitního koeficientu prostředí.

V literatuře je ovšem nejčastější použití korekčního faktoru reprezentujícího relativní viskozitu v :

$$v = \frac{\eta}{\eta^0}, \quad (39)$$

kde η^0 představuje viskozitní koeficient prostředí bez přídavku ligandu a η viskozitní koeficient prostředí s přídavkem ligandu o dané koncentraci. V literatuře se objevily dva přístupy k tomu, jakým způsobem určit tento faktor. Buď měřit viskozitu externím mikroviskozimetrem^(43, 44) nebo přímo v separační kapiláře, protlačením markeru konstantním tlakem. Tato alternativa má tu výhodu, že k měření viskozity dochází za naprosto stejných podmínek při jakých probíhá experiment. Na základě Poiseullevy rovnice pak korekční faktor určíme dle vztahu^(32, 36, 40, 45, 46):

$$v = \frac{\eta}{\eta^0} = \frac{t}{t^0}, \quad (40)$$

kde t představuje čas nutný k protlačení nadávkované zóny markeru kapilárou za konstantního tlaku v prostředí s přídavkem ligandu o dané koncentraci; t^0 ten samý čas ovšem v kapiláře naplněné pouze separačním pufrem. Při použití této metody je nutné velice opatrně vybrat vhodný marker tak, aby nereagoval s ligandem.

Tento poměr (rovnice (40)) lze ovšem ke korekci použít pouze, pokud pohybující se částice je mnohem větší ve srovnání s částicemi rozpouštědla a srovnatelně veliká s molekulami látky, která způsobuje nárůst viskozitního koeficientu.⁽⁴⁷⁾

Jiní autoři^(37, 39, 40, 41, 42, 48) používají pro určení korekčního faktoru poměr proudu procházejícího kapilárou naplněnou pufrem bez a s přídavkem ligandu. Jedná se opět o korekci, která nevyžaduje žádná dodatečná měření. Bowser a kol.⁽⁴⁰⁾ ovšem uvádějí, že takováto korekce potom není použitelná pro korekci dat získaných byť jenom v jiné kapiláře.

V literatuře se najde několik případů, kdy autoři porovnávali různé přístupy k určení vlivu změny viskozity. Wren a Rowe⁽⁴⁸⁾ došli k výborné shodě v měření poměru procházejícího proudu a přímém měření relativního viskozitního koeficientu. Shibukawa a kol.⁽⁴⁹⁾ určovali vliv viskozity prostředí pomocí mobility nabitého viskozitního markeru, proudu, času potřebného k protlačení dávkované zóny konstantním tlakem kapilárou i přímým měřením viskozity v BGE s přídavkem cyklodextrinu o dané koncentraci a bez něj. Na základě těchto měření autoři preferují určení vlivu viskozity prostředí pomocí poměru proudu nebo měřením mobility viskozitního markeru.

Koncentrace ligandu

V rovnicích (31) a (32) symbol $[C]$ představuje rovnovážnou koncentraci volného ligandu. Ve většině případů se však rovnovážná koncentrace ztotožňuje s celkovou látkovou koncentrací ligandu v BGE. Jak uvádějí někteří autoři^(28, 31, 39), toto zjednodušení je možné pouze v případě, že koncentrace ligandu je nepoměrně větší vůči koncentraci analytu nebo stanovovaná konstanta stability má nízkou hodnotu. Potom můžeme změnu koncentrace ligandu zanedbat bez újmy na správnosti stanovené konstanty. V ostatních případech je třeba postupovat například iteračním způsobem a rovnovážnou koncentrací volného ligandu určit.⁽⁵⁰⁾ Druhá komplikace spojená s koncentrací ligandu je jeho koncentrační rozpětí. Zvolené rozmezí výraznou měrou ovlivní přesnost stanovené konstanty. Optimální rozmezí je dáno silou vzájemných interakcí analyt-ligand. Pomocí simulací Monte Carlo⁽³³⁾ bylo ukázáno, že minimální koncentrační rozpětí je do koncentrace ligandu, při které polovina dávkovaného analytu je ve formě komplexu. Tuto koncentraci můžeme odhadnout jako $[C] = K^{-1}$. Penn a kol.⁽³⁹⁾ doporučují proměřit, pokud je to možné, alespoň dvojnásobné koncentrační rozpětí. Při velmi nízkých konstantách ovšem může významnou měrou ovlivnit pracovní rozpětí koncentrace ligandu jeho rozpustnost (např. u cyklodextrinů).

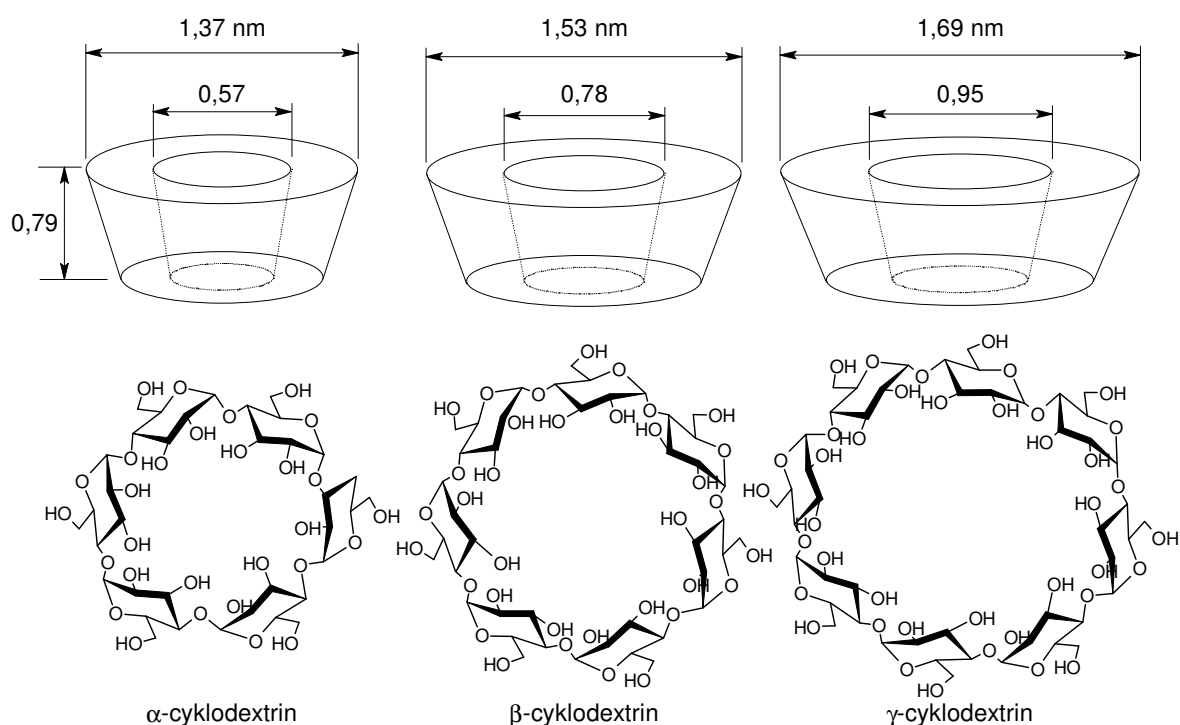
Vzrůst teploty

Při průchodu proudu kapilárou vzniká Joulovo teplo. Při nedostatečném chlazení kapiláry se tedy separační prostředí zahřívá a nejsme schopni sledovat jeho přesnou teplotu. Přitom na teplotě závisí jak elektroforetické mobility jednotlivých složek (mobilita se změní asi o 2% při změně teploty o 1°C, platí ve vodném prostředí⁽²²⁾), tak hodnota samotných termodynamických konstant stability. Tento nárůst lze snížit volbou BGE o nízké vodivosti, použitím kapiláry s nižším vnitřním průměrem, snížením aplikovaného napětí nebo aktivním chlazením kapiláry. Ovšem k nárůstu teploty dojde vždy a je důležité jej sledovat. V literatuře se objevilo několik přístupů: sledování teplotní závislosti mobility EOF⁽⁵¹⁾, Ramanova nebo NMR termometrie⁽⁵¹⁾ či sledováním změny vodivosti roztoku^(26, 51). Při použití vodivostního detektoru je právě tato alternativa nejjednodušší, protože nevyžaduje žádná dodatečná měření.

2.3 Cyklodextriny

2.3.1 Struktura a vlastnosti cyklodextrinů

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



Obr. 4 Molekulární rozměry a struktura α -, β - a γ -cyklodextrinů (překresleno podle ⁽⁵²⁾).

Struktura α -, β -, a γ -cyklodextrinů je znázorněna na Obr. 4. Všechny glukózové jednotky jsou v klasické židličkové konformaci, vzájemně spojené α -1,4 vazbou. Tato struktura dává cyklodextrinům charakteristický tvar komolého kužele. Jeho širší část je tvořena sekundárními 2- a 3-hydroxylovými skupinami, užší část primárními 6-hydroxyly. Počet glukózových jednotek určuje

rozměry dutiny (kavity) - viz Obr. 4. Dutina obsahuje asymetrické uhlíky, tvoří tedy asymetrické centrum. Vnitřní část kavity je hydrofobní, zato vnější povrch kužele je hydrofilní. V molekule cyklodextrinu je formován kruh intramolekulových vodíkových vazeb mezi 2- a 3-hydroxylovými skupinami sousedních glukózových jednotek. Tento řetězec vodíkových můstků dává cyklodextrinům poměrně pevnou strukturu.

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

Tabulka 1 Některé fyzikálně-chemické vlastnosti cyklodextrinů.

Charakteristika	α	β	γ
počet glukózových jednotek	6	7	8
relativní molekulová hmotnost ⁽⁵²⁻⁵⁴⁾	972	1135	1297
průměr kavity / Å ^(52, 53)	4,7 – 5,3	6,0 - 6,5	7,5 - 8,3
výška kavity / Å ^(52, 53)	7,9 ± 0,1	7,9 ± 0,1	7,9 ± 0,1
pK _a ⁽⁵²⁾	12,33	12,2	12,08
rozpustnost ve vodě / (g/100 ml) ⁽⁵²⁻⁵⁴⁾	14,5	1,85	23,2
specifická otáčivost α_D / ° ⁽⁵⁴⁾	150,5±0,5	162,5±0,5	177,4±0,5
normální teplota tání / K ⁽⁵⁴⁾	551	572	540
počet molekul vody pohlčených kavitou ⁽⁵⁴⁾	6	11	17

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

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

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

Ke stabilizaci komplexu přispívá:

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

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

Geometrické vlastnosti a polarita hostující molekuly a povaha rozpouštědla určují typ a sílu vazebných interakcí při tvorbě komplexu. Geometrie molekuly má snad na vznik komplexu větší vliv než její chemické vlastnosti. Pokud je hostující molekula příliš malá vůči kavitě cyklodextrinu, dochází k tvorbě slabých nebo žádných interakcí. Naopak komplexace s molekulou, která je příliš veliká, možná sice je, ale komplex je tvořen pouze s částí molekuly a některými jejími funkčními skupinami.

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

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

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

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

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

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

2.3.2 Využití cyklodextrinů

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

Ve farmaceutickém průmyslu jsou cyklodextriny využívány jako aditiva, která odstraňují negativní vlastnosti léčiv jako například jejich nízkou rozpustnost ve vodě (případně v kombinaci s tvorbou solí).⁽⁵⁵⁾ V potravinářském, kosmetickém a tabákovém průmyslu jsou cyklodextriny využívány ke stabilizaci chutí a vůní či k potlačení nepříjemných pachů a odstranění mikrobiologické kontaminace.⁽⁵²⁾ Širokého uplatnění se cyklodextrinům dostalo v chemické analýze. Jsou využívány například ve spektrálních metodách. Vysoká elektronová hustota v kavitě cyklodextrinu může mobilizovat elektrony hostující molekuly a následkem toho dochází ke změně spektrálních vlastností jak hostující molekuly, tak cyklodextrinu.⁽⁵²⁾ V elektroanalytických metodách jsou cyklodextriny využívány jako chemické modifikátory elektrod, slouží jako efektivní i selektivní vazební činidla.⁽⁵⁴⁾

Širokého uplatnění dosáhly cyklodextriny především v separačních metodách (chromatografické a elektroforetické metody). Jejich schopnost tvořit inkluzní komplexy a chiralita kavity jsou využívány k separaci enantiomerů, strukturních a geometrických izomerů.^(38, 43, 41, 46, 52, 56-63)

V současné době je 85% všech chirálních CE separací pro biomedicínské účely realizováno užitím cyklodextrinů jako komplexačních činidel.⁽⁶⁴⁾ V přehledovém článku⁽³²⁾ je uvedena rekapitulace publikovaných hodnot konstant stability komplexů cyklodextrinu a aminokyselin, peptidů a jiných biomolekul za posledních deset let, určených CE metodami. Cyklodextriny jsou využívány například při kontrole optické čistoty léčiv.⁽⁶⁵⁾

Pro CE separace jsou užívány cyklodextriny nativní i substituované, a to jak neutrální, tak nabitě. Neutrální cyklodextriny se používají pro separaci nabitých analytů. K separaci neutrálních analytů se v CE použít nedají. Cyklodextriny nesoucí náboj se v elektrickém poli pohybují s vlastní nenulovou mobilitou. Hodí se k separaci jak neutrálních, tak nabitých analytů. V poslední době se objevují také polymerní cyklodextriny⁽⁶⁶⁾, které mají ve srovnání s nativními pevnější strukturu a odlišnou konformaci, což může mít vliv na jejich schopnost separovat enantiomery. Polymerní formy také mívají mnohem vyšší rozpustnost ve vodě.

Nativní cyklodextriny jsou užívány ve 32% a jejich deriváty v 68% separací. Poměr množství používaných neutrálních derivátů náhodně substituovaných (není u nich známo kolik substituentů a v jakých polohách je navázáno) a selektivně substituovaných je zhruba 1:1. V případě nabitých cyklodextrinů je až 83% použitých derivátů substituováno náhodně.⁽⁶⁴⁾ Přitom přesná charakterizace derivátů je důležitým faktorem chirálních separací. Rozpoznávací schopnosti cyklodextrinů jsou závislé na poloze a charakteristice substituentů. Například bylo ukázáno, že enantiometrické rozlišení racemické směsi tramadolu je silně závislé na použití konkrétního typu cyklodextrinu.⁽⁶⁷⁾ Byl také představen model závislosti chirální selektivity na pH prostředí a koncentraci cyklodextrinu.⁽⁶⁸⁾

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

3 Experimentální část

Záměrem experimentální části této diplomové práce bylo určit hodnoty termodynamických konstant stability komplexů několika různých analytů s nabitým cyklodextrinem. K získání správných hodnot těchto konstant bylo nutné se velmi pečlivě věnovat faktorům, které ovlivňují toto stanovení, především vlivu viskozity, iontové síly, teploty a ztotožnění koncentrace volného ligandu s jeho celkovou koncentrací. Experimenty byly realizovány v systému s konstantní iontovou silou a v systému, jehož iontová síla se měnila. Abychom prozkoumali různé možnosti korekce dat na proměnlivou iontovou sílu, byla proměřena též závislost aktuální elektroforetické pohyblivosti použitého nabitého cyklodextrinu na iontové síle BGE.

3.1 Použité chemikálie a přístroje

Jako komplexační činidlo byl použit jednomocný kationtový modifikovaný β -cyklodextrin 6-monodeoxy-6-mono(3-hydroxy)propylamino- β -cyclodextrin chlorid, (PABCD) poskytnutý firmou Cyclolab (Maďarsko).

Jako základní elektrolyt sloužil acetátový pufr. K jeho přípravě byla použita kyselina octová CH_3COOH (Penta, ČR) a monohydrát hydroxidu lithného $\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (Fluka, Německo). K určení pohyblivosti EOF sloužil dimethylsufoxid DMSO (Sigma-Aldrich, Německo). Analyty byly R,R- a S,S-hydrobenzoin (Sigma Aldrich, Německo) a R- a S-3-brom-2-methylpropan-1-ol (Sigma Aldrich, Německo). Všechny tyto chemikálie byly čistoty p.a., k přípravě roztoků byla použita deionizovaná voda. K proplachování kapiláry byl použit 0,1 M roztok NaOH (Agilent Technologies, Německo), pro kalibraci pH-metru IUPAC pufrů o hodnotách pH 1,679 a 7,000 (Radiometer, Dánsko).

Elektroforetické experimenty byly provedeny na $^{3\text{D}}$ CE systému pro kapilární elektroforézu (Agilent Technologies, Německo), který je vybaven vestavěným spektrofotometrickým UV/VIS detektorem s diodovým polem (DAD), umožňujícím měření v rozsahu vlnových délek 190-600 nm, a dvojitým vodivostním detektorem⁽⁷⁾ (CCD). Součástí aparatury je počítač s nainstalovaným programem Agilent Capillary Electrophoresis, pomocí kterého je řízena aparatura, prováděn sběr a vyhodnocování dat. Experimenty byly prováděny v křemenných kapilárách s vnějším průměrem 375 μm a vnitřním průměrem 50 μm (Composite metal

services LTD, Velká Británie) o celkové délce 48,55 cm a 64,40 cm. Nové kapiláry byly před prvním použitím aktivovány propláchnutím 0,1 M roztokem NaOH. Pro stabilizaci EOF bylo na kapiláry naplněné BGE aplikováno po dobu 20 minut napětí 20 kV.

Dávkování vzorku bylo hydrodynamické tlakem 10 mbar po dobu 10 sekund.

Hodnoty pH použitých pufrů byly měřeny digitálním pH-metrem PHM 220 s kombinovanou skleněnou elektrodou (Radiometer, Dánsko).

Experimentální data byla zpracována za pomoci programu MS Excel 2003, grafy jednotlivých závislostí pak byly sestrojeny a analyzovány programem Origin 8 (OriginLab, USA).

3.2 Experimentální podmínky a postupy

a) Komplexy s nabitým cyklodextrinem

Ke studiu vazebných interakcí s kladně nabitým cyklodextrinem byly vybrány analyty, jež jsou v širokém rozmezí pH neutrální, a to R,R- a S,S-hydrobenzoin (HB) a R- a S-3-brom-2-methylpropan-1-ol (BMP). Aby bylo zajištěno, že je veškerý cyklodextrin PABCD v iontové formě, bylo třeba zvolit BGE s pH v kyselé oblasti. Proto byl vybrán acetátový pufr.



Obr. 5 Struktura 3-brom-2-methylpropan-1-olu a hydrobenzoinu. Hvězdičkou jsou označena chirální centra.

Složení, iontová síla a pH základního elektrolytu (určené programem PeakMaster⁽¹⁵⁾) pro jednotlivé systémy a rozmezí koncentrace CD přidávaného do BGE je uvedeno v tabulce 2. V případě systému s konstantní iontovou silou byla určena koncentrace kyseliny octové a hydroxidu lithného tak, aby s přidavkem PABCD byla iontová síla 40 mmol dm⁻³ a poměr koncentrací volné kyseliny a její soli v pufru 1:1. Vzorek obsahoval 0,71 mM HB respektive 0,0077 mM BMP jako analyt a 0,02 % (obj.) DMSO jako marker EOF. Analyty S,S- a R,R-HB se v požadovaných navážkách nedařilo zcela rozpustit ve vodě, proto není známa jejich přesná koncentrace v dávkovaném vzorku. Uvedená hodnota je maximální koncentrace, které by bylo dosaženo při úplném rozpuštění naváženého množství. V literatuře

je uvedeno, že interakce DMSO s kladně nabitými cyklodextriny není detekovatelná.⁽⁶⁹⁾ Proto byl DMSO vybrán jako vhodný marker EOF. Roztoky BGE s přídavkem CD byly připraveny rozpuštěním odpovídajícího množství CD a přefiltrovány přes mikrofiltr (Merc, Německo) o průměru pórů 0,45 μm .

Tabulka 2 Složení, pH, iontová síla a koncentrační rozmezí CD přidávaného do BGE.

Systém	BGE			
	Složení	pH	$\frac{c_{\text{CD}}}{\text{mmol dm}^{-3}}$	$\frac{I}{\text{mmol dm}^{-3}}$
Proměnná iontová síla	20 mM CH ₃ COOH + 10 mM LiOH	4,6	0 – 30	10 – 39,4
Konstantní iontová síla	80 mM CH ₃ COOH + 40 mM LiOH až 20 mM CH ₃ COOH + 10 mM LiOH	4,7	0 – 30	40

Při volbě napětí bylo bráno v úvahu množství vznikajícího Joulova tepla i délka experimentů. Pro experimenty s proměnlivou iontovou silou BGE bylo zvoleno separační napětí 10 kV, pro experimenty s konstantní iontovou silou BGE 20 kV.

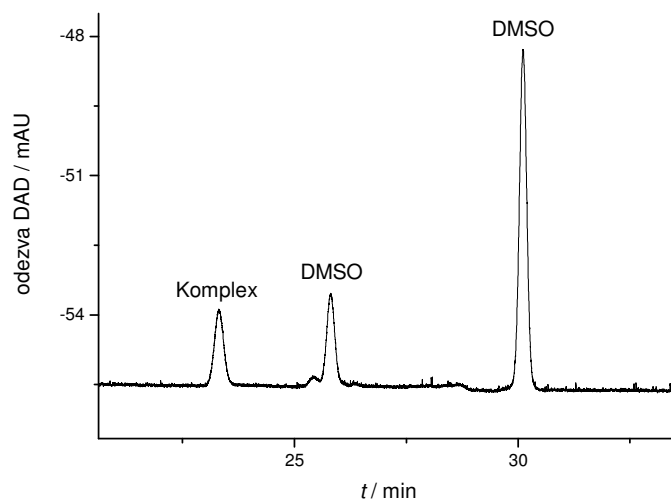
Pro každou koncentraci CD přidávaného do BGE byly získány alespoň při vyhodnotitelné experimenty. Z elektroferogramů (příklad na obr. 6) byly odečteny detekční časy píků jednotlivých složek vzorku zaznamenaných na DAD (DMSO, HB, BMP) při vlnové délce 214 nm.

Všechny experimenty byly provedeny metodou PremCE, proto efektivní mobility jednotlivých zón byly vypočítány dle vztahu

$$\mu_{\text{eff}} = \frac{l_{\text{c}} l_{\text{DAD}} (t_{\text{N1}} - t_{\text{K}})}{U t_{\text{N2}} t_{\text{migr}}}, \quad (41)$$

kde l_{c} je celková délka kapiláry, l_{DAD} délka kapiláry k DAD, t_{N1} je detekční čas prvního markeru, t_{K} detekční čas analyzované zóny, U napětí vkládané na kapiláru, t_{N2} čas potřebný k protlačení druhé nadávkované zóny markeru EOF k DAD tlakem 30 mbar, t_{migr} čas, po který

je aplikováno napětí. Časové korekce t_{inj} , t_d a $t_{ramp-up/ramp-down}$ ze vztahů (13) a (15) jsou vzhledem k povaze experimentů a odečítaných časů zanedbatelné. Z určených hodnot mobility byly poté vypočteny průměrné hodnoty pro jednotlivé koncentrace CD v BGE a tyto průměrné hodnoty byly následně podrobeny regresní analýze.



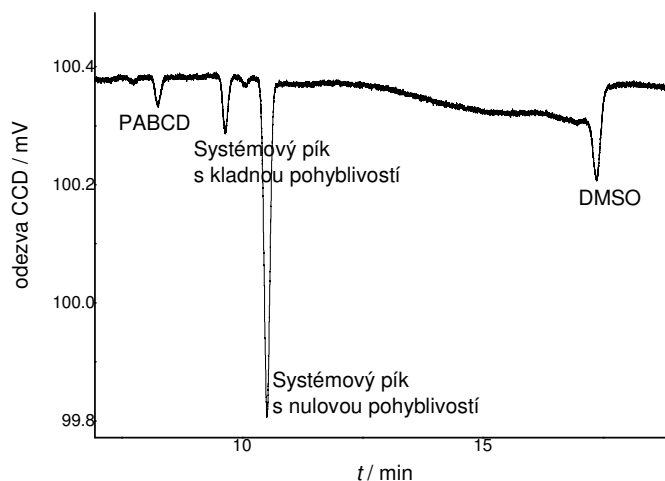
Obr. 6 Výřez elektroferogramu pořízeného DAD při vlnové délce 214 nm pro koncentraci PABCD 20 mmol dm^{-3} . První pík odpovídá komplexu R,R-hydrobenzoinu s PABCD, druhý a třetí markeru elektroosmotického toku DMSO. Podmínky měření: $ID=50 \text{ }\mu\text{m}$, $l_c=64,40 \text{ cm}$, $U=20 \text{ kV}$, $t_{migr}=25 \text{ min}$. Složení BGE: 40 mM kyselina octová, 20 mM hydroxid lithný, konstantní $I=40 \text{ mmol dm}^{-3}$. Dávkování: 100 mbar s. Záporná hodnota odezvy DAD je způsobena nenulováním signálu vzhledem k použitému BGE před experimentem.

b) Aktuální pohyblivost nabitého cyklodextrinu

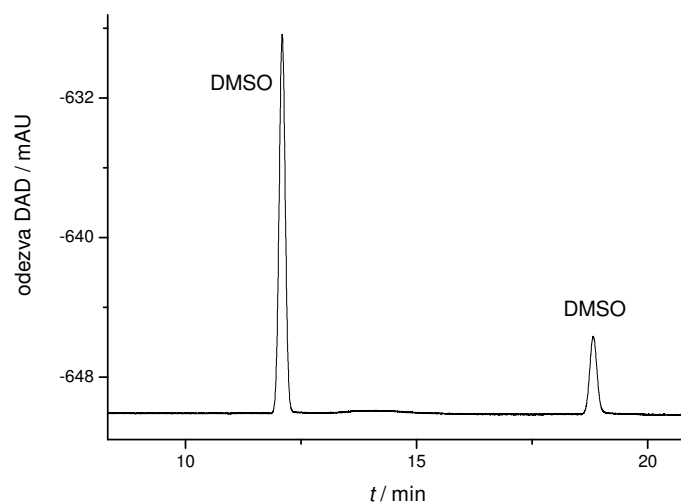
Proměření závislosti aktuální pohyblivosti PABCD na iontové síle prostředí bylo provedeno také v acetátovém pufru (složení odpovídající maximální pufráční kapacitě) o iontových silách $1,02 - 100 \text{ mmol dm}^{-3}$. Dávkován byl PABCD v koncentračním rozmezí $0,0125 - 0,083 \text{ mmol dm}^{-3}$ (koncentrace byla volena tak, aby příslušný pík byl co nejmenší, ale dobře rozeznatelný) a $0,125 \%$ (obj.) DMSO jako marker EOF.

Experimenty byly provedeny v kapiláře o celkové délce $48,55 \text{ cm}$ metodou PremCE, napětí 10 kV bylo aplikováno po dobu $4 - 8 \text{ minut}$.

Pro každou iontovou sílu BGE byly získány alespoň tři vyhodnotitelné experimenty. Detekční časy PABCD a detekční čas prvního markeru byly odečítány ze záznamu CCD. Detekční čas druhého markeru byl odečítán ze záznamu z DAD při vlnové délce 214 nm. Ukázka záznamu z CCD je na obr. 7, z DAD na obr. 8. Efektivní mobility analytu byly vypočteny dle vztahu (41).



Obr. 7 Výřez elektroferogramu pořízeného CCD. První pík odpovídá PABCD, druhý je systémový pík s kladnou pohyblivostí, třetí pík je systémový pík s nulovou pohyblivostí, odpovídající markeru elektroosmotického toku DMSO, čtvrtý pík odpovídá druhé nadávkované zóně DMSO. Podmínky měření: $ID=50 \mu\text{m}$, $l_C=48,55 \text{ cm}$, $U=0 \text{ kV}$, $t_{\text{migr}}=5 \text{ min}$. Složení BGE: 6 mM kyselina octová, 3 mM hydroxid lithný, $I=3 \text{ mmol dm}^{-3}$. Dávkování: 100 mbar s.

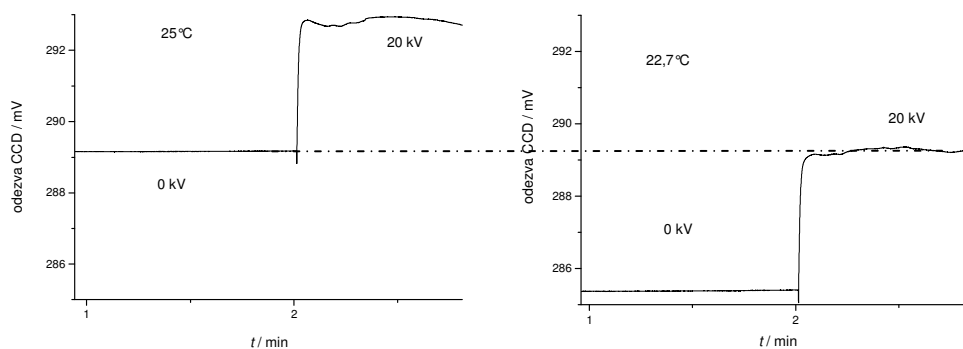


Obr. 8 Výřez elektroferogramu pořízeného DAD při vlnové délce 214 nm. Oba dva píky odpovídají markeru elektroosmotického toku DMSO. Podmínky měření: $ID=50\ \mu\text{m}$, $l_C=48,55\ \text{cm}$, $U=0\ \text{kV}$, $t_{\text{migr}}=5\ \text{min}$. Složení BGE: 6 mM kyselina octová, 3 mM hydroxid lithný, $I=3\ \text{mmol dm}^{-3}$. Dávkování: 100 mbar s. Záporná hodnota odezvy DAD je způsobena nenulováním signálu vzhledem k použitému BGE před experimentem.

4 Výsledky

4.1 Vliv teploty

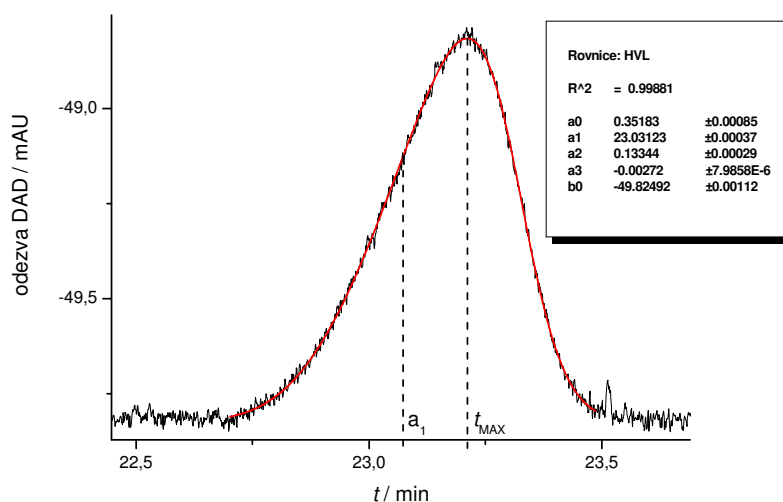
Kapilára v kazetě je u ^{3D}CE systému temperována na zvolenou teplotu proudícím vzduchem. Ochlazován je povrch kapiláry, ale roztok uvnitř kapiláry má teplotu vyšší v důsledku produkce Joulova tepla při průchodu elektrického proudu. V roztoku se vytváří radiální teplotní gradient. Pouze blízko u stěny kapiláry může mít roztok teplotu blízkou nastavené hodnotě. Průměrnou teplotu roztoku v dané kapiláře lze při zvoleném napětí ovlivnit změnou teploty v kazetě. Zvýšená teplota BGE se projeví vyšší vodivostí BGE, kterou jsme schopni sledovat na záznamu vodivostního detektoru. Proto jsme pro každý systém, každou iontovou sílu BGE, každou koncentraci přidaného CD nastavili teplotu chlazení na hodnotu, při které vodivostní signál za aplikovaného separačního napětí odpovídal vodivostnímu signálu daného systému bez aplikovaného napětí při 25°C (viz obr. 9). Tím jsme zaručili, že průměrná teplota roztoku v chlazené části kapiláry bude blízká 25°C a vznik Joulova tepla významně neovlivní naměřené hodnoty elektroforetických mobilit. Nastavená teplota chlazení se v závislosti na složení BGE pohybovala v rozmezí 22,7 – 25,0°C.



Obr. 9 Záznam z CCD základního elektrolytu o složení: 25 mM PABCD, 30 mM CH₃COOH, 15 mM LiOH (*I*= 40 mmol dm⁻³). Levý obrázek představuje signál BGE při 25°C, v čase 2 minuty bylo aplikováno napětí 20 kV. Pravý obrázek představuje signál BGE při 22,7°C, v čase dvě minuty je na kapiláru vloženo napětí 20 kV.

4.2 Korekce dat HVL funkcí

Píky reprezentující jednotlivé analyty (především píky analytu BMP) byly deformovány elektromigrační disperzí. Píky měly charakteristický trojúhelníkový tvar. V takovém případě neodpovídá migrační čas analytu času maxima píku (t_{MAX}), ale ke správnému výpočtu pohyblivosti analytu je třeba znát čas odpovídající středu píku. Ten lze nejjednodušeji získat proložení píku HVL funkcí. K proložení píků byla použita HVL funkce s parametrem b_0 , který určuje hodnotu odezvy detektoru pro základní linii (baseline), klasická HVL funkce má tuto hodnotu rovnu nule. Čas odpovídající středu píku je vyjádřen parametrem a_1 . Pro analyt S,S- a R,R-HB byl rozdíl v migračním čase korigovaném HVL funkcí a čase odečteném z maxima minimální, přesto k vyhodnocování byly vždy použity časy získané proložení píku HVL funkcí. Ukázka proložení deformovaného píku HVL funkcí je na obr. 10.



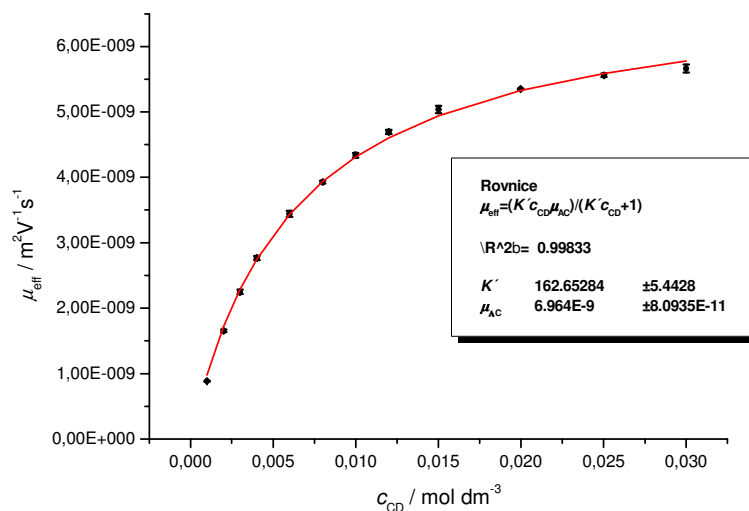
Obr. 10 Ukázka proložení píku S-BMP ($c=0,0077 \text{ mmol dm}^{-3}$) funkcí HVL (červená křivka). Složení BGE: 2 mM PABCD, 38 mM LiOH, 76 mM CH_3COOH , $I=40 \text{ mmol dm}^{-3}$. Parametr a_1 odpovídá času středu píku, který byl použit k výpočtu pohyblivosti analytu. Záporná hodnota odezvy DAD je způsobena nenulováním signálu vzhledem k použitému BGE před experimentem.

4.3 Systém s konstantní iontovou silou

Pro stanovení konstanty stability neutrálního analytu s nabitým CD je nutné analyt dávkovat a CD v proměnné koncentraci přidávat do základního elektrolytu. Opačné uspořádání (dávkování CD a proměnná koncentrace analytu v BGE) nelze využít vzhledem k očekávané prakticky shodné pohyblivosti komplexu a volného CD. Nabitě komplexační činidlo však přispívá k iontové síle BGE. Vzhledem k tomu, že použitý PABCD nese v roztoku pouze jeden kladný náboj, je jeho příspěvek k iontové síle relativně nízký a lze jej určit přímým výpočtem dle vztahu (20). Proto bylo možné provést sérii experimentů za použití BGE o konstantní iontové síle. Do separačního pufru byl postupně přidáván PABCD v rozsahu koncentrací 0 – 30 mmol dm⁻³. Příspěvek cyklodextrinu k iontové síle prostředí byl kompenzován úpravou koncentrace LiOH a CH₃COOH v separačním pufru tak, aby celková iontová síla BGE zůstala konstantní.

V systému s konstantní iontovou silou 40 mmol dm⁻³ byly studovány interakce PABCD a analytů S,S- a R,R-HB a S- a R-BMP. Průměrné hodnoty efektivních pohyblivostí analytů včetně chybových úseček byly vyneseny do grafu v závislosti na koncentraci PABCD přidaného do separačního pufru. Experimentální body byly proloženy regresní funkcí odpovídající rovnici (32). Parametr K' v této rovnici obecně představuje zdánlivou konstantu stability, ale v případě námi stanovovaných komplexů, lze číselnou hodnotu zdánlivé konstanty stability ztotožnit s číselnou hodnotou konstanty termodynamické, jak vyplývá z rovnice (28).

Na obr. 11 je uvedena ukázka proložení experimentálních dat pro analyt S-HB. Z obrázku je patrné, že experimentální body leží na hladké křivce a teoretická funkce ji fituje relativně dobře. Přesto parametr K' v použité regresní rovnici nelze považovat za termodynamickou konstantu stability, stejně jako μ_{AC} nelze vnímat jako aktuální mobilitu komplexu. Efektivní mobilita analytů v těchto systémech je totiž ovlivňována nejen stupněm komplexace, ale též významně rostoucí viskozitou BGE způsobenou přidavkem PABCD.



Obr. 11 Závislost efektivních mobilit S,S-hydrobenzoinu na celkové koncentraci PABCD v systému s udržovanou konstantní iontovou silou 40 mmol dm⁻³. Jako regresní funkce byla použita rovnice (32) $\mu_{\text{eff}} = (K' c_{\text{CD}} \mu_{\text{AC}}) / (K' c_{\text{CD}} + 1)$. Podmínky měření jsou popsány v kapitole Experimentální podmínky a postupy.

Korekce na změnu viskozity

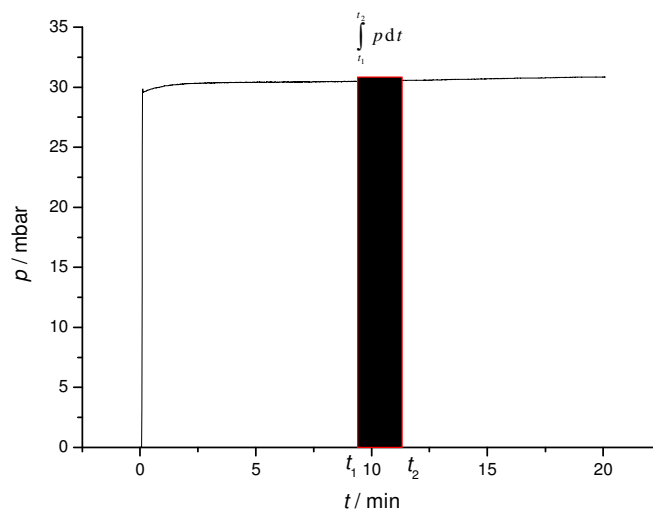
Jak bylo podrobněji popsáno v teoretické části, přidavek PABCD do separačního pufru významnou měrou mění viskozitní koeficient roztoku. Ten ovlivňuje elektroforetické mobility látek putujících tímto prostředím a tím i stanovovanou konstantu stability. Proto bylo nutné experimentální data nějakým způsobem na tyto změny viskozitního koeficientu korigovat.

V našem případě částice způsobující změnu viskozity (molekuly PABCD) jsou mnohem větší než molekuly rozpouštědla a srovnatelně veliké jako pohybující se částice (komplex analytu s PABCD). Lze tedy očekávat, že efektivní mobilita analytu bude nepřímo úměrná viskozitnímu koeficientu prostředí.⁽⁴⁷⁾ Ke korekci dat proto použijeme relativní viskozitu prostředí. Jako nejvhodnější způsob určení relativní viskozity se nám jeví její přímé měření v kapiláře. Viskozitní koeficient lze stanovit měřením doby t , za kterou proteče kapalina o objemu V kapilárou o délce l , při působení tlaku p . Pro viskozitní koeficient platí Poisseuillova rovnice:

$$\eta = \frac{\pi r^4 p}{8Vl} t. \quad (42)$$

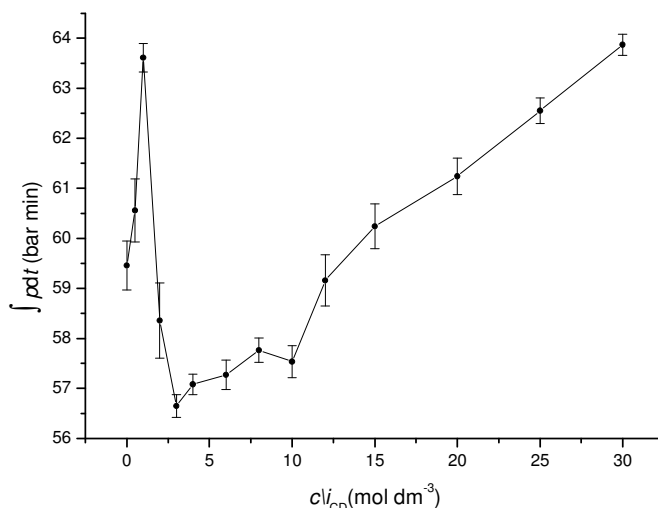
Korekční faktor lze tedy určit jako poměr času potřebný k protlačení nadávkované zóny markeru EOF konstantním tlakem kapilárou naplněnou separačním puftrem s daným

přídavkem CD (t) a pufrem bez přídavku CD (t^0). V našem případě však nebylo možné použít ke korekci přímo čas protlačení, neboť aparatura není schopná udržovat aplikovaný tlak konstantní. Jak vyplývá ze vztahu (42), při kolísání tlaku je pro danou kapiláru při určování relativního viskozitního koeficientu rozhodující součin tlaku a času (ostatní veličiny se vykrátí). Místo časů potřebných k protlačení zóny markeru kapilárou jsme proto použili hodnotu určitého integrálu $\int_{t_1}^{t_2} p dt$, který reprezentuje plochu pod křivkou časového záznamu aplikovaného tlaku na kapiláru. Určitý integrál jsme zprvu určovali od času $t_1 = 0$ po čas průchodu markeru přes DAD. Ovšem taková data stále vykazovala příliš velký rozptyl, pravděpodobně způsobený rozdílnou teplotou prostředí v kapiláře v její termostatované a netermostatované části. Proto jsme zvolili za t_1 čas průchodu markeru přes CCD a za t_2 čas průchodu markeru přes DAD. Tato oblast kapiláry se celá nachází v termostatované kazetě. Taková data již vykazovala určitou závislost a pro jednotlivé koncentrace přídavku PABCD též uspokojivou směrodatnou odchylku. Ukázka grafického určení určitého integrálu je na obr. 12.



Obr. 12 Záznam průběhu aplikovaného tlaku na kapiláru naplněnou BGE o složení: 4mM PABCD, 36 mM LiOH, 72 mM CH₃COOH. Dávkováná zóna obsahovala 0,02 % (obj.) DMSO. Na kapiláru o celkové délce 47,1 cm byl aplikován konstantní tlak 30 mbar. Označené časy t_1 a t_2 postupně odpovídají času průchodu DMSO přes CCD a DAD. Vybarvená oblast odpovídá určitému integrálu $\int_{t_1}^{t_2} p dt$.

Protlačování pro každou přidanou koncentraci PABCD do separačního pufru bylo provedeno osmkrát, k určení relativní viskozity byly použity aritmetické průměry z těchto dat (jsou takřka totožné s mediánem). Aritmetické průměry včetně směrodatných odchylek pro jednotlivé koncentrace PABCD přidaného do separačního pufru jsou znázorněny na obr. 13.



Obr. 13 Průměrné hodnoty vypočtených určitých integrálů včetně chybových úseček pro jednotlivé koncentrace přidaného PABCD do separačního pufru. Koncentrace PABCD v rozmezí 0 – 30 mmol dm⁻³, poměr koncentrací LiOH/CH₃COOH = 0,5; konkrétní hodnoty koncentrací vypočteny tak, aby iontová síla byla 40 mmol dm⁻³. Dávkováná zóna obsahovala 0,02 % (obj.) DMSO. Na kapiláru o celkové délce 47,1 cm byl aplikován tlak 30 mbar.

Závislost hodnoty určitého integrálu $\int_{t_1}^{t_2} p dt$ (jemuž je přímo úměrný viskozitní koeficient prostředí) na koncentraci přídatku PABCD se nám nepodařilo uspokojivě proložit žádnou funkcí popisující koncentrační závislost viskozitního koeficientu prostředí⁽⁴⁷⁾. Proto jsme se rozhodli určit relativní viskozitní koeficient prostředí pro každou koncentraci přidaného PABCD zvlášť a tímto koeficientem korigovat odpovídající průměrnou efektivní pohyblivost analytu.

Relativní viskozitní koeficient jsme určili dle vztahu:

$$v = \frac{\eta}{\eta^0} = \frac{\int_{t_1}^{t_2} p dt}{\left(\int_{t_1}^{t_2} p dt \right)^0}, \quad (43)$$

kde $\int_{t_1}^{t_2} p dt$ představuje hodnotu určitého integrálu průběhu tlaku při protlačování zóny markeru

kapilárou naplněnou separačním pufrem s přidavkem PABCD o dané koncentraci a $\left(\int_{t_1}^{t_2} p dt \right)^0$

hodnotu určitého integrálu průběhu tlaku při protlačování zóny markeru kapilárou naplněnou separačním pufrem bez přidavku PABCD. Korigované hodnoty efektivních mobilit ($\mu_{\text{eff, kor}}$) jsme získali jako součin efektivní mobility a relativního viskozitního koeficientu prostředí.

Směrodatnou odchylku korigované efektivní pohyblivosti ($s(\mu_{\text{eff, kor}})$) lze určit jako odmocninu z rozptylu této veličiny, který je dán vztahem⁽⁷⁰⁾:

$$s^2(\mu_{\text{eff, kor}}) = \left[\frac{d}{d\mu_{\text{eff}}} \left(\mu_{\text{eff}} \frac{\int_{t_1}^{t_2} p dt}{\left(\int_{t_1}^{t_2} p dt \right)^0} \right) \right]^2 s^2(\mu_{\text{eff}}) + \left[\frac{d}{d \left(\int_{t_1}^{t_2} p dt \right)} \left(\mu_{\text{eff}} \frac{\int_{t_1}^{t_2} p dt}{\left(\int_{t_1}^{t_2} p dt \right)^0} \right) \right]^2 s^2 \left(\int_{t_1}^{t_2} p dt \right) + \left[\frac{d}{d \left(\int_{t_1}^{t_2} p dt \right)^0} \left(\mu_{\text{eff}} \frac{\int_{t_1}^{t_2} p dt}{\left(\int_{t_1}^{t_2} p dt \right)^0} \right) \right]^2 s^2 \left(\int_{t_1}^{t_2} p dt \right)^0, \quad (44)$$

ve kterém $s^2(\mu_{\text{eff}})$ představuje rozptyl efektivních pohyblivostí analytu, $s^2 \left(\int_{t_1}^{t_2} p dt \right)$ rozptyl

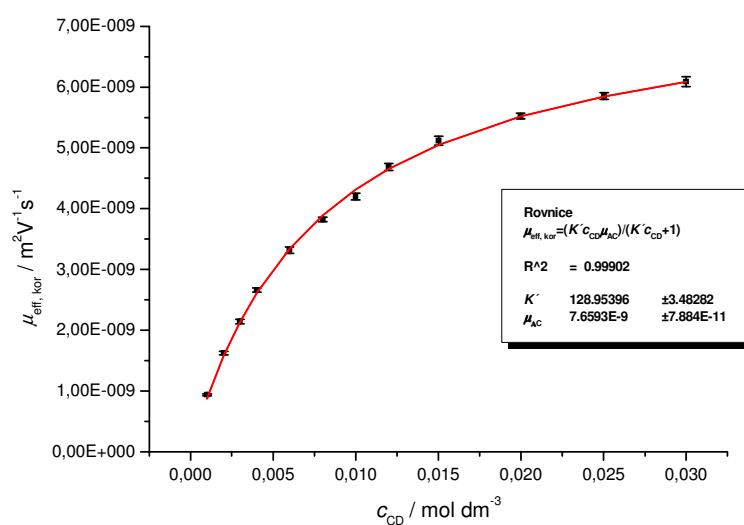
hodnot daného určitého integrálu při protlačování zóny markeru kapilárou naplněnou

separačním pufrem s přidavkem PABCD o dané koncentraci a $s^2 \left(\int_{t_1}^{t_2} p dt \right)^0$ rozptyl hodnot

určitého integrálu při protlačování zóny markeru kapilárou naplněnou separačním pufrem bez

přídavku PABCD. Výpočtem dle tohoto vztahu bylo ověřeno, že tento způsob korekce nijak významně statistickou chybu experimentálních dat neovlivní.

Takto korigované průměrné hodnoty efektivních pohyblivostí včetně chybových úseček pro jednotlivé analyty byly vyneseny proti koncentraci PABCD přidaného do separačního pufru. Body byly proloženy regresní funkcí odpovídající rovnici (32). Na obr. 14 je ukázka takto vyhodnocených dat pro analyt S,S-HB. Přestože viskozitní koeficient roztoku s přídavkem PABCD nemá monotónní průběh, body leží na hladké křivce a funkce ji fituje velice dobře.

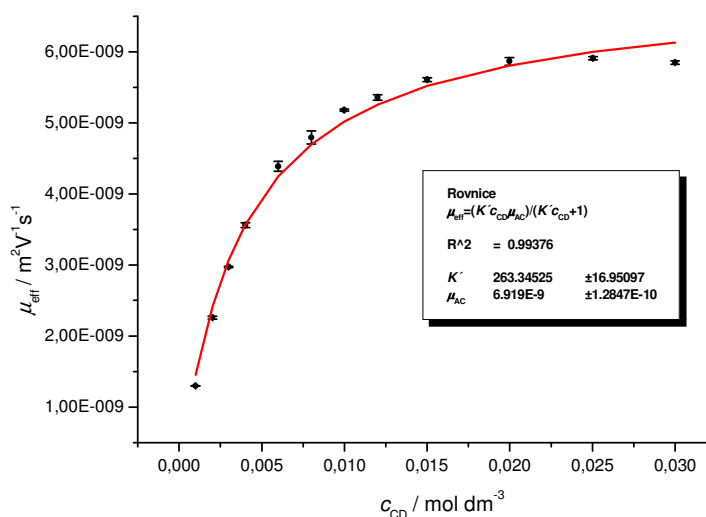


Obr. 14 Závislost korigovaných efektivních mobilit S,S-hydrobenzoinu (včetně chybových úseček) na celkové koncentraci PABCD. Jako regresní funkce byla použita rovnice (32) $\mu_{\text{eff}} = (K' c_{\text{CD}} \mu_{\text{AC}}) / (K' c_{\text{CD}} + 1)$. Podmínky měření jsou popsány v kapitole Experimentální podmínky a postupy.

4.4 Systém s proměnlivou iontovou silou

Vzhledem k tomu, že mnozí autoři uvádějí konstanty stability získané z experimentů, při nichž není iontová síla udržována na konstantní hodnotě, proměřili jsme pro srovnání též závislost efektivní pohyblivosti jednotlivých analytů na koncentraci přidaného PABCD bez kompenzace iontové síly změnou složení separačního pufru. K separačnímu pufru o složení 10 mM LiOH a 20 mM CH₃COOH byl přidáván PABCD v rozmezí koncentrací 10 – 30 mmol dm⁻³. Iontová síla tedy vzrůstala z hodnoty 10 mmol dm⁻³ až na hodnotu 39,4 mmol dm⁻³ (vypočteno programem PeakMaster).

V systému se vzrůstající iontovou silou byly sledovány vazebné interakce PABCD s analyty S,S- a R,R-HB a S- a R-BMP. Průměrné hodnoty efektivních pohyblivostí analytů byly vyneseny do grafů v závislosti na koncentraci přidaného PABCD a proloženy regresní funkcí odpovídající rovnici (32). Na obr. 15 je ukázka vyhodnocení dat pro analyt S,S-HB. Přestože experimentální body leží na hladké křivce, funkce ji nefituje příliš dobře. Parametr K' v použité regresní rovnici nelze považovat za termodynamickou konstantu stability, stejně jako μ_{AC} nelze vnímat jako aktuální mobilitu komplexu. Efektivní mobilita analytu je ovlivněna jak vzrůstající viskozitou prostředí, tak především vrůstající iontovou silou prostředí, obojí způsobené přidávkem PABCD do separačního pufru.



Obr. 15 Závislost efektivních mobilit S,S-hydrobenzoinu na celkové koncentraci PABCD v systému s proměnlivou iontovou silou (10 – 39,4 mmol dm⁻³). Jako regresní funkce byla použita rovnice (32) $\mu_{\text{eff}} = (K' c_{CD} \mu_{AC}) / (K' c_{CD} + 1)$. Podmínky měření jsou popsány v kapitole Experimentální podmínky a postupy.

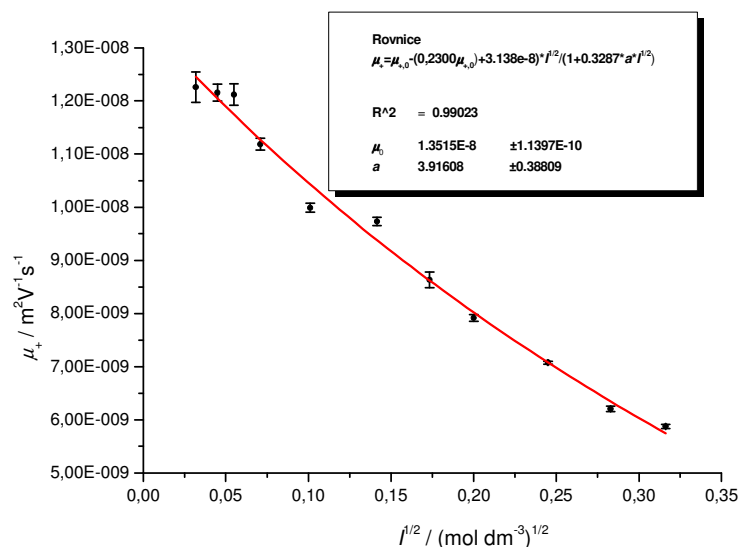
Odhad vlivu iontové síly na aktuální pohyblivost komplexu

Konstanta stability komplexu neutrálního analytu s ligandem nesoucím náboj nezávisí na iontové síle prostředí za předpokladu, že komplex a ligand má srovnatelnou velikost a aktivní koeficient neutrálního analytu je jednotkový. Iontová síla ovlivňuje v takovém případě pouze mobilitu komplexu a tím ovšem i efektivní pohyblivost analytu. Při známé závislosti aktuální pohyblivosti komplexu na iontové síle by bylo možné korigovat efektivní pohyblivosti analytu naměřené při proměnlivé iontové síle a z těchto dat pak stanovit termodynamickou konstantu stability. Závislost aktuální pohyblivosti komplexu na iontové síle je stěží experimentálně dostupná. Za předpokladu srovnatelné velikosti komplexu a volného ligandu lze ovšem očekávat, že tyto částice budou vykazovat srovnatelné elektromigrační chování. Experimentálně byla proto zjištěna závislost aktuální pohyblivosti PABCD na iontové síle prostředí. Experimentální data byla proložena regresní funkcí, jež odpovídá rovnici (21), rozšířenému Onsagerovu vztahu. Vzhledem k tomu, že náboje PABCD a jeho protiontu (acetát) se v absolutní hodnotě rovnají, parametr q (viz rovnice (19)) se rovná 0,5. Dosazením hodnot konstant B_1 , B_2 a B pro vodné roztoky při 25°C a parametru q do rovnice (21) se získá vztah:

$$\mu_+ = \mu_{+,0} - (0,2300\mu_{+,0} + 3,138 \cdot 10^{-8}) \frac{\sqrt{I}}{1 + 0,3287a\sqrt{I}}, \quad (45)$$

který byl následně použit jako regresní funkce. Graf vyhodnocené závislosti aktuální pohyblivosti PABCD na iontové síle prostředí včetně určené limitní pohyblivosti PABCD je uveden na obr. 16.

Ze získané závislosti lze vypočítat aktuální pohyblivost PABCD pro $I = 40 \text{ mmol dm}^{-3}$ a tu porovnat s aktuálními pohyblivostmi komplexů, které vystupují jako parametry regresních funkcí závislosti efektivních pohyblivostí analytů na koncentraci PABCD v základním elektrolytu při konstantní iontové síle 40 mmol dm^{-3} . Zmíněné hodnoty jsou uvedeny v tabulce 3.



Obr. 16 Vyhodnocení závislosti aktuální pohyblivosti PABCD na iontové síle prostředí. Jako regresní funkce použita rovnice (45) odpovídající rozšířenému Onsagerovu vztahu. Podmínky měření jsou popsány v kapitole Experimentální podmínky a postupy.

Tabulka 3 Aktuální pohyblivosti PABCD a komplexů PABCD s jednotlivými analyty

$\mu/10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$				
PABCD	komplex PABCD s			
	S,S-HB	R,R-HB	S-BMP	R-BMP
8,03	7,66	7,94	7,85	7,94

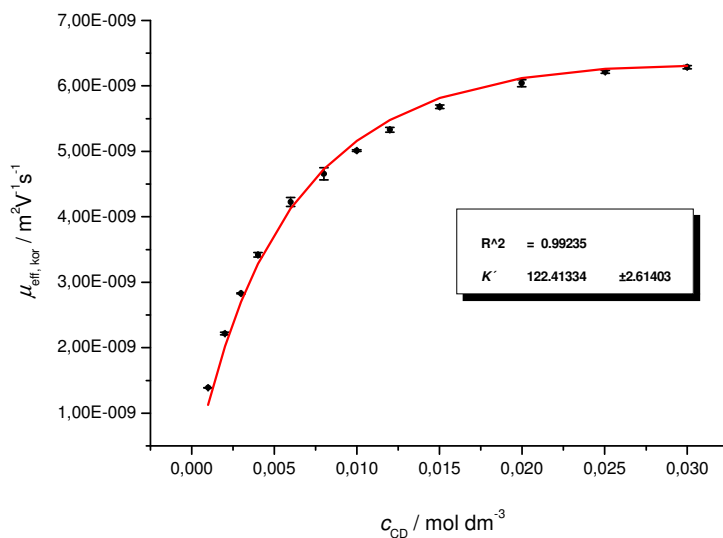
Jak je z tabulky patrné, aktuální pohyblivosti PABCD a jeho komplexů s příslušnými analyty jsou srovnatelné. Využili jsme tedy závislosti aktuální pohyblivosti PABCD na iontové síle k vyhodnocení konstant stability komplexů. Do regresní funkce (rovnice (32)) jsme zabudovali namísto aktuální pohyblivosti komplexu závislost aktuální pohyblivosti PABCD na iontové síle. Získali jsme tak rovnici

$$\mu_{\text{eff}} = \frac{K'c_{\text{CD}} \left[(1,352 \cdot 10^{-8}) - \frac{3,449 \cdot 10^{-8} \sqrt{c_{\text{CD}} + 0,01}}{1 + 1,29 \sqrt{c_{\text{CD}} + 0,01}} \right]}{K'c_{\text{CD}} + 1}, \quad (46)$$

kteřou jsme použili k nelineární regresi dat. Hodnota 0,01 pod odmocninou představuje příspěvek acetátového pufru k iontové síle základního elektrolytu v jednotkách mol dm⁻³. Před

samotným vyhodnocením jsme experimentální efektivní pohyblivosti analytu korigovali na změnu viskozity prostředí výše popsaným způsobem.

Na obr. 17 je uveden příklad regresní analýzy korigovaných dat pro analyt S,S-HB. Hodnota konstanty stability získaná tímto způsobem je srovnatelná s hodnotou konstanty určenou regresí dat získaných v systému s konstantní iontovou silou.



Obr. 17 Závislost efektivních mobilit S,S-hydrobenzoinu na celkové koncentraci PABCD v systému s volnou iontovou silou (10 – 39,4 mmol dm⁻³) korigovaných na viskozitu. Jako regresní funkce byla použita rovnice (46). Podmínky měření jsou popsány v kapitole Experimentální podmínky a postupy.

4.5 Koncentrace ligandu

Ve všech předchozích případech byla pro nelineární regresi ztotožňována rovnovážná koncentrace v komplexu nevázaného cyklodextrinu s jeho celkovou koncentrací v základním elektrolytu. Posledním problémem, na který jsme zaměřili svoji pozornost, tedy bylo posouzení oprávněnosti tohoto zjednodušení.

Konstanty stability komplexů s většinou stanovovaných analytů mají nízkou hodnotu (nižší než $100 \text{ (mol dm}^{-3})^{-1}$), jak je patrné z tabulky 5 v odstavci Diskuse. Navíc dávkované vzorky obsahovaly analyty S- a R-BMP ve velmi nízké koncentraci ($7,7 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$). Ztotožnění rovnovážné koncentrace v komplexu nevázaného PABCD s jeho celkovou koncentrací v těchto případech je tedy zcela oprávněné.

Méně příznivá situace je u komplexu PABCD s S,S-HB. Konstanta stability má nejvyšší hodnotu a tento analyt musel být vzhledem k nízké absorbanci dávkován v koncentraci přibližně $0,7 \text{ mmol dm}^{-3}$. Proto jsme pro tuto konstantu provedli odhad rovnovážných koncentrací volného PABCD a s nimi poté vyhodnotili konstantu stability. Tímto iteračním způsobem stanovení se konstanta stability pro maximální hodnotu koncentrace analytu $0,7 \text{ mmol dm}^{-3}$ zvýšila o necelých 8 %. Koncentrace analytu v zóně analytu je však v důsledku difúze významně nižší než je dávkovaná koncentrace. Pro koncentraci analytu $0,4 \text{ mmol dm}^{-3}$ by se hodnota konstanty určená iteračním způsobem již od hodnoty stanovené lišila statisticky nevýznamně. Vzhledem k tomuto faktu a neznámé přesné hodnotě koncentrace analytu v zóně analytu jsme ani pro konstantu stability komplexu PABCD s S,S-HB iterační způsob stanovení neprovedli.

5 Diskuse

V předchozí kapitole bylo představeno několik způsobů stanovení konstant stability modifikovaného kationtového β -cyklodextrinu (PABCD) s neutrálními analyty. Grafické znázornění experimentálních závislostí a jejich vyhodnocení bylo demonstrováno pro analyt S,S- hydrobenzoin. Výsledné hodnoty konstant stability pro všechny použité analyty jsou shrnuty v tabulce 4.

Tabulka 4 Stanovené konstanty pro jednotlivé použité systémy.

Pozn.: x = bez korekce na viskozitu

	K' (mol dm^{-3}) ⁻¹			
	konstantní IS (40 mmol dm ⁻³)		proměnlivá IS (10 – 39,4 mmol dm ⁻³)	
analyt	x	Korekce na viskozitu	x	Korekce na viskozitu a IS
S,S-HB	162,7±5,4	129,0±3,5	263±17	122,4±2,6
R,R-HB	116,8±5,3	92,0±2,3	191,8±9,7	94,9±1,4
S-BMP	113,5±6,5	89,6±3,6	181±11	89,3±1,5
R-BMP	110,9±6,3	87,3±3,6	177±11	87,0±1,5

Z hodnot uvedených ve druhém a třetím sloupci tabulky je patrný vliv změny viskozitního koeficientu prostředí na hodnoty konstant stability. Není-li brán v úvahu fakt, že efektivní pohyblivost analytu je při rostoucí koncentraci PABCD ovlivňována nejen zvyšujícím se stupněm komplexace, ale též změnou viskozitního koeficientu prostředí, jsou získané hodnoty o cca 27% vyšší než termodynamické konstanty stability. Ještě mnohem výrazněji zkrácené hodnoty se získají vyhodnocením efektivních pohyblivostí analytů ovlivněných též rostoucí iontovou silou základních elektrolytů v důsledku rostoucí koncentrace PABCD. Takto získané hodnoty konstant stability uvedené v předposledním sloupci tabulky jsou o více než 100 % vyšší než termodynamické konstanty stability. Hodnoty konstant stabilit v posledním sloupci tabulky však demonstrují, že i z experimentálních dat ovlivněných rostoucí iontovou silou základního elektrolytu lze získat hodnoty, které jsou ve velmi dobré shodě s hodnotami

získanými při konstantní iontové síle, a které lze pro daný typ komplexu ztotožnit s číselnou hodnotou termodynamické konstanty.

Jako vedlejší produkt stanovení konstant stability byly získány pohyblivosti komplexů pro jednotlivé analyty, které jsou pro systém s konstantní iontovou silou 40 mmol dm⁻³ shrnuty v tabulce 5. Opět je demonstrován vliv korekce na změnu viskozity prostředí. Při provedení korekce lze získané hodnoty považovat za aktuální pohyblivosti komplexů při dané iontové síle.

Tabulka 5 Stanovené pohyblivosti komplexů pro systémy s konstantní iontovou silou prostředí.

Pozn.: x = bez korekce na viskozitu

	$\frac{\mu_{AC}}{10^{-9} \text{V}^2 \text{m}^{-1} \text{s}^{-1}}$	
analyt	x	korekce na viskozitu
S,S-HB	6,964±0,081	7,669±0,079
R,R-HB	7,10±0,13	7,944±0,086
S-BMP	7,01±0,16	7,85±0,14
R-BMP	7,08±0,16	7,94±0,14

6 Závěr

V rámci této diplomové práce byly určeny konstanty stability kationtového cyklodextrinu PABCD s neutrálními analyty. Veliká pozornost byla věnována faktorům, které tato stanovení metodou ACE ovlivňují.

Bez ohledu na přístup ke stanovení samotných konstant se jeví jako vhodný a jednoduchý způsob nastavení průměrné teploty roztoku v kapiláře na požadovanou hodnotu 25°C snížením teploty chlazení kapiláry na základě sledování signálu vodivostního detektoru.

Dále byl demonstrován vliv měnící se viskozity a iontové síly prostředí v důsledku přidavku PABCD do základního elektrolytu. Jako vhodná a jednoduchá korekce experimentálních dat na změnu viskozity prostředí se jeví korekce pomocí relativního viskozitního koeficientu prostředí, který je určen měřením viskozitního koeficientu přímo v separační kapiláře. Iontovou sílu prostředí můžeme zohlednit dvěma způsoby: provádět experimenty v systému s konstantní iontovou silou, nebo dodatečně určit závislost aktuální pohyblivosti nabitého cyklodextrinu na iontové síle prostředí a pomocí této naměřená data ze systému s proměnlivou iontovou silou korigovat. V případě, že se jedná o ionogenní ligandy, u nichž je příspěvek k iontové síle prostředí relativně nízký, by měl být preferován první způsob.

Hodnoty konstant stability stanovené v této práci lze prohlásit za hodnoty termodynamických konstant stability daných analytů s PABCD při teplotě 25°C.

7 Summary

Determination of stability constants of charged cyclodextrin complexes by capillary electrophoresis

Stability constant characterizes binding interaction between an analyte and complexation agent. These interactions play very important role in separation processes of, in other way undistinguishable, compounds, e.g. enantiomers. The most widely used complexation agents are cyclodextrins.

Affinity capillary electrophoresis (ACE) belongs to methods suitable for the determination of stability constants. The stability constant is determined from the dependence of the effective mobility of analyte on the increasing concentration of complexation agent in background electrolyte (BGE). If charged CDs are used, the attention must be paid not only to viscosity of the BGE and to the influence of Joule heating on the temperature in the capillary but also to the increasing ionic strength.

The thermodynamic stability constants of R,R- and S,S-hydrobenzoin and R- and S-(3-brom-2-methyl-1-propanol) with cationic modified β -cyclodextrin: 6-monodeoxy-6-mono(3-hydroxy)propylamino- β -cyclodextrin hydrochlorid (PABCD) were determined by affinity capillary electrophoresis. The average temperature (25°C) of the BGE in the capillary was kept constant. This was achieved by decreasing of the cassette temperature (based on the conductivity measurements). The viscosity correction was performed using the viscosity ratio. The increase of ionic strength due to increasing PABCD concentration in the BGE was compensated by changing of the concentration of the separation buffer.

In the next step, the dependence of the analyte effective mobilities on PABCD concentration was measured without the ionic strength compensation to demonstrate the influence of ionic strength on the stability constant. A new procedure was established to estimate stability constants from such data, too. These stability constants are in very good agreement with those obtained at the constant ionic strength.

Literatura

- 1 Pacáková V, Coufal P., Štulík K., Gaš B.: *Electrophoresis* 2003, 24, 1883-1891
- 2 Kašička V.: *Chem. Listy* 1997, 91, 320 – 329
- 3 Gaš B., Kenndler E.: *Electrophoresis* 2000, 21, 3888-3897
- 4 Erny G. L., Bergström E. T., Goodall D. M.: *J. Chromatogr. A* 2002, 959, 229-239
- 5 Štulík K. a kolektiv: *Analytické separační metody*, Karolinum, Praha 2005
- 6 Štědrý M., Jaroš M., Gaš B.: *J. Chromatogr. A* 2002, 960, 187-198
- 7 Gaš B., Zuska J., Coufal P., van de Goor T.: *Electrophoresis* 2002, 23, 3520-3527
- 8 Štědrý M., Jaroš M., Hruška V., Gaš B.: *Electrophoresis* 2004, 25, 3071-3079
- 9 Štědrý M., Jaroš M., Včeláková K., Gaš B.: *Electrophoresis* 2003, 24, 536-547
- 10 Hruška V., Štědrý M., Včeláková K., Lokajová J., Tesařová E., Jaroš M., Gaš B.: *Electrophoresis* 2006, 27, 4610-4617
- 11 Lokajová J., Hruška V., Tesařová E., Gaš B.: *Electrophoresis* 2008, 29, 1189 - 1195
- 12 Gaš B., Kenndler E.: *Electrophoresis* 2004, 25, 3901-3912
- 13 Gaš B., Hruška V., Dittmann M., Bek F., Witt K.: *J. Sep. Sci.* 2007, 30, 1435-1445
- 14 Jaroš M., Hruška V., Štědrý M., Zusková I., Gaš B.: *Electrophoresis* 2004, 25, 3080-3085
- 15 Univerzita Karlova v Praze: PeakMaster [on-line]
Dostupné z URL: <<http://www.natur.cuni.cz/~gas/>> [cit. 3.5.2010]
- 16 Hruška V. Jaroš M., Gaš B.: *Electrophoresis* 2006, 27, 984-991
- 17 Williams B. A., Vigh G.: *Anal. Chem.* 1996, 68, 1174-1180

- 18 Williams B. A., Vigh G.: *Anal. Chem.* 1997, 69, 4445-4451
- 19 Mechref Y., Ostrander G. K., El Rassi Z.: *J. Chromatogr. A* 1997, 792, 75-82
- 20 Friedl W., Reijenga J. C., Kenndler E.: *J. Chromatogr. A* 1995, 709, 163-170
- 21 Li D., Fu S., Lucy Ch. A.: *Anal. Chem.* 1999, 71, 687-699
- 22 Koval D., Kašička V., Zusková I.: *Electrophoresis* 2005, 26, 3221-3231
- 23 Survey M. A., Goodall D. M., Wren S. A. C., Rowe R. C.: *J. Chromatogr. A* 1996, 741, 99-113
- 24 Jaroš M., Včeláková K., Zusková I., Gaš B.: *Electrophoresis* 2002, 23, 2667-2677
- 25 Oracova J. Böhs B. Lindner W.: *J. Chromatogr. B* 1996, 677, 1069-1076
- 26 Koval D., Kašička V., Jiráček J., Collinsová M., Garrow T. A.: *Electrophoresis* 2002, 23, 215-222
- 27 Vespalec R., Boček P.: *J. Chromatogr. A* 2000, 875, 431-445
- 28 Rundlett K. L., Armstrong D. W.: *Electrophoresis*, 1997, 18, 2197-2202
- 29 Busch M. H. A., Kraak J. C., Poppe H.: *J. Chromatogr. A*, 1997, 777, 329-353
- 30 Rundlett K. L., Armstrong D. W.: *Electrophoresis*, 2001, 22, 1419-1427
- 31 Tanaka Y., Terabe S.: *J. Chromatogr. B*, 2002, 768, 81-92
- 32 Ušelová-Včeláková K., Zusková I., Gaš B.: *Electrophoresis* 2007, 28, 2145-2152
- 33 Bowser M. T., Chen D. D. Y.: *J. Phys. Chem. A*, 1998, 102, 8063-8071
- 34 Bowser M. T., Chen D. D. Y.: *J. Phys. Chem. A*, 1999, 103, 197-202
- 35 Shakalisava Y., Regan F.: *Electrophoresis*, 2006, 27, 3048-3056
- 36 Hsiao J., Wu S., Ding W.: *Talanta*, 2006, 68, 1252-1258
- 37 Salvador A., Varesio E., Dreux M., Veuthey J.: *Electrophoresis*, 1999, 20, 2670-9
- 38 Gratz S., Stalcup A. M.: *Anal. Chem.*, 1998, 70, 5166-5171
- 39 Penn S. G., Bergström E. T., Knights I., Liu G., Ruddick A., Goodall D. M.:
J. Phys. Chem., 1995, 99, 3875-3880
- 40 Bowser M. T., Sternberg E. D., Chen D. D. Y.: *Electrophoresis*, 1997, 18, 82-91
- 41 Yang J., Bose S., Hage D. S.: *J. Chromatogr. A*, 1996, 735, 209-220

- 42 Kawaoke J., Gomez F. A.: *J. Chromatogr. A*, 1998, 715, 203-210
- 43 Maynard D. K., Vigh G.: *Electrophoresis*, 2001, 22, 3152-3162
- 44 Süß F., Sängler-van de Griend C. E., Scriba G. K. E.: *Electrophoresis*, 2003, 24, 735, 209-2200
- 45 Baomy P., Morin P., Dreux M., Viaud M. C., BoyeS., Guillaumet G.:
J. Chromatogr. A, 1995, 707, 311-326
- 46 Nhujak T., Sastravaha Ch., Palanuvej Ch., Petsom A.: *Electrophoresis*, 2005, 26, 3814-3823
- 47 Robinson R. A., Stokes R. H.: *Electrolyte Solutions*, 2. přeprac. vyd., Mineola NY, Dever Publications INC, 2002, str. 308
- 48 Wren S. A. C., Rowe R. C.: *J. Chromatogr.*, 1992, 603, 235-241
- 49 Shibukawa A., Lloyd D. K., Wainer I. W.: *Chromatografia*, 1993, 35, 419-429
- 50 Connors K.S.: *Binding Constants – the measurement of molecular komplex stability*. New York, John Wiley & sons 1987, str.42
- 51 Koval D., Kašička V., Jiráček J., Collinsová M.: *Electrophoresis*, 2003, 24, 774-781
- 52 Li S., Purdy W. C.: *Chem. Rev.* 1992, 92, 1457-1470
- 53 Bersier P. M., Bersier J., Klingert B.: *Electroanalysis* 1991, 3, 443-455
- 54 Ferancová A., Labuda J., Barek J., Zima J.: *Chem. Listy* 2002, 96, 856-862
- 55 Redenti E., Szente L., Szejtli J.: *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2001, 90, 979-986
- 56 Lin Ch., Lin S., Cheng H., Fang I., Kuo Ch., Liu Y.: *Electrophoresis*, 2005, 26, 4187-4196
- 57 Lin Ch., Lin S., Liao W., Liu Y.: *J. Chromatogr A*, 2004, 1032, 227-235
- 58 Desiderio C., Rossetti D. V., Perri F., Giardina B., Messina I., Castagnola M.:
J. Chromatogr. B, 2008, 875, 280-287
- 59 Chankvetadze B., Schulte G., Blaschke G.: *J. Chromatogr. A*, 1996, 732, 183-187
- 60 Česla P., Fischer J., Tesařová E., Jandera P., Staněk V.: *J. Chromatogr. A*, 2007, 1149, 358-367
- 61 Li J., Waldron K. C.: *Electrophoresis*, 1999, 20, 171-179

- 62 Chankvetadze B.: *J.Chromatogr. A*, 1997, 792, 269-295
- 63 Tanaka Y., Terabe S.: *J. Chromatogr. A*, 1997, 781, 151-160
- 64 Blaschke G., Chankvetadze B.: *J. Chromatogr. A* 2000, 875, 3-25
- 65 Heegaard N. H. H., Kennedy R. T.: *Electrophoresis*, 1999, 20, 3122-3133
- 66 Eeckhaut A. V., Michotte Y.: *Electrophoresis*, 2006, 27, 2880-2895
- 67 Rudaz S., Veuthey J. L., Fanali S.: *Electrophoresis*, 1998, 19, 2883-2889
- 68 Rawjee Y. Y., Williams R. L., Vigh G.: *J. Chromatogr. A* 1993, 652, 233-245
- 69 Nzeadibe K., Vigh G.: *Electrophoresis* 2007, 28, 2589-2605
- 70 Meloun M., Militký J.: *Kompendium statistického zpracování dat*, Academia, Praha, 2002, str. 33