

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

**Katedra analytické chemie**

---

**STUDIUM NOVÝCH CHIRÁLNÍCH SELEKTORŮ NA BÁZI  
MONOIZOMERNÍCH CYKLODEXTRINŮ METODOU KAPILÁRNÍ  
ZÓNOVÉ ELEKTROFORÉZY**

Bakalářská práce

studijního programu Klinická a toxikologická analýza

Praha 2008

Aleš Dvořák

## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval samostatně, pod vedením školitele RNDr. Radomíra Čabaly, Dr. 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

Na tomto místě bych chtěl poděkovat svému školiteli RNDr. Radomíru Čabalovi, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost, s níž se mi věnoval a pomoc při zpracování výsledků této bakalářské práce.

Tato bakalářská práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru MSM 0021620857.

# OBSAH

<b>1. ÚVOD</b>	... 5
<b>2. TEORETICKÁ ČÁST</b>	... 6
<b>2.1. Cyklodextriny</b>	... 6
2.1.1. Inkluzní komplexy	... 7
2.1.2. Modifikované cyklodextriny	... 8
2.1.3. Chirální separace v kapilární elektroforéze	... 9
2.1.4. Nechirální separace	... 10
2.1.5. Separace cyklodextrinů a jejich derivátů	... 10
<b>2.2. Kapilární zónová elektroforéza</b>	... 11
<b>2.3. Vyhodnocení elektroferogramů</b>	... 14
<b>2.4. Statistické vyhodnocení analytických výsledků</b>	... 15
<b>3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b>	... 18
3.1. Chemikálie	... 18
3.2. Přístroje a pomůcky	... 18
3.3. Příprava roztoků	... 19
3.4. Podmínky měření	... 20
3.5. Postup práce	... 21
<b>4. Výsledky a diskuze</b>	... 22
4.1. Separace kresolů bez přídavku 3'-KM-β-CD	... 22

<b>4.2. Separace kresolů s přídavkem 3'-KM-β-CD</b>	<b>... 24</b>
<b>4.3. Srovnání rozlišení mezi jednotlivým peaky o-kresolu a p-kresolu v pufrech s 3'-KM-β-CD a bez 3'-KM-β-CD</b>	<b>... 28</b>
<b>4.4. Otočení pořadí migrace kationtů a aniontů na použité kapiláře</b>	<b>... 29</b>
<b>5. ZÁVĚR</b>	<b>... 31</b>
<b>6. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY</b>	<b>... 32</b>
<b>Seznam použitých zkratk</b>	<b>... 34</b>

# 1. ÚVOD

Historie cyklodextrinů sahá až do 19. století. Právě na konci tohoto století byl cyklodextrin poprvé izolován. Tím vstoupila tato molekula do povědomí vědců a od té doby se mnoho lidí z mnoha zemí věnuje jeho poznávání. Byly objeveny jeho zajímavé vlastnosti v separaci, jeho struktura, možnost úpravy molekuly cyklodextrinu pro účinnější oddělení analytů. Tím vznikají různě derivatizované molekuly, které mají další zajímavé vlastnosti, kterým se opět věnuje mnoho vědeckých expertů. V podstatě má tato molekula neomezené možnosti modifikace a proto je nevyčerpatelným zdrojem zájmu.

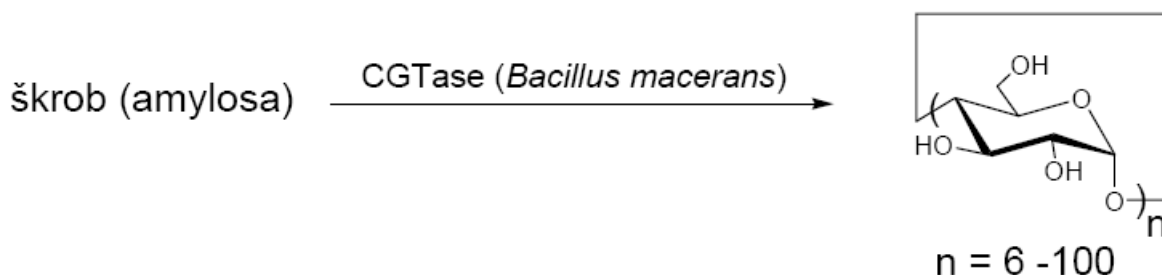
V posledních letech by se zájem o cyklodextriny dal nazvat jistým boomem. Za posledních asi 15 let roste počet článků věnovaných cyklodextrinům exponenciálně. V současnosti se jich na internetu a ve vědeckých žurnálech pohybují desítky tisíc. Navíc je cena cyklodextrinu velmi nízká, jen pro zajímavost, v roce 2004 stál  $\beta$ -cyklodextrin pouhých 10 amerických dolarů za 1 kilogram<sup>1</sup>. Roku 1994 se podařilo týmu vědců syntetizovat cyklodextrin o pěti glukozových jednotkách, protože má lepší energetické vlastnosti<sup>2</sup>. Podle počítačové simulace je možné syntetizovat i cyklodextriny s méně jednotkami<sup>3</sup>.

Cílem mojí práce byla studie funkce cyklodextrinů jako selektorů v kapilární zónové elektroforéze. Pro studii jsme zvolili dva různé polohové izomery jedné látky, které nejsou za běžných podmínek metodou CZE oddělitelné. Pomocí cyklodextrinu, dodaného doc. Jindřichem, jsem tyto izomery (o-kresol, p-kresol) chtěl oddělit od sebe.

## 2. TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1. Cyklodextriny

Cyklodextríny (CD) byly poprvé izolovány v roce 1891 jako produkty enzymatické degradace škrobu.



Obrázek 1: Schéma syntézy cyklodextrinů enzymatickou degradací<sup>1</sup>

Trvalo dalších 45 let, než byla postulována jejich cyklická struktura. Tato struktura je složena z několika D-glukopyranozových jednotek spojených do kruhu  $\alpha$ -1,4-glykosidickými vazbami. Počet jednotek je různý. Nejčastěji používané cyklodextriny jich mají 6 (tzv.  $\alpha$ -cyklodextríny), 7 ( $\beta$ -cyklodextríny) nebo 8 ( $\gamma$ -cyklodextríny)<sup>1,4</sup>. Tvar  $\alpha$ -,  $\beta$ - a  $\gamma$ -CD je v podstatě stejný, ovšem liší se velikostí (průměrem dutiny). Tvarem připomíná komolý jehlan nebo torus.<sup>1</sup>

Tabulka 1: Základní charakteristiky cyklodextrinů<sup>5</sup>

Charakteristika	$\alpha$ -CD	$\beta$ -CD	$\gamma$ -CD
Počet glukozových jednotek	6	7	8
Objem dutiny( $10^6 \text{ pm}^3$ )	174	262	427
Relativní molekulová hmotnost	973	1135	1297
Optická otáčivost	153	162	176,1
Vnitřní průměr dutiny[nm]	0,57	0,78	0,95
Vnější průměr dutiny[nm]	1,37	1,53	1,69
Výška torusu[nm]	0,78	0,78	0,78
Rozpustnost ve vodě [mol/l]	0,114	0,016	0,179

Jak už napovídá tabulka 1, cyklodextriny mají velmi specifické vlastnosti a v chemii, ať už analytické nebo v jiné, jsou velmi využívány, například jako složka stacionární fáze v HPLC a GC nebo jako složka základního elektrolytu v CE a CZE. O cyklodextrinech existuje nespočet publikovaných prací ve všemožných vědeckých časopisech a knihách, které popisují jejich široké využití. Jedna z velmi důležitých vlastností, která se využívá při separaci analytů, je tvorba inkluzních komplexů.

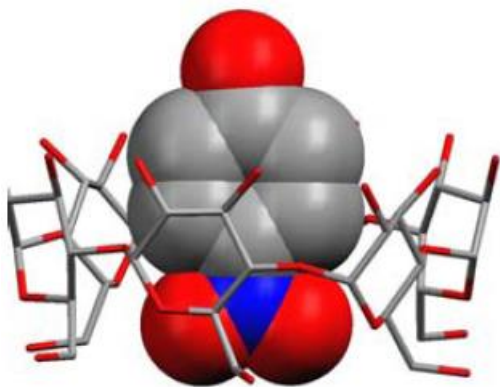
### 2.1.1. Inkluzní komplexy

Tento komplex vzniká tak, že je organická nebo anorganická molekula (host) inkludována (vstupuje) do kavity cyklodextrinu (hostitel). Tento děj probíhá nejčastěji ve vodě nebo ve směsi vody a jiného polárního rozpouštědla. Děj může probíhat i na rozhraní pevné a plynné fáze.

Stechiometrie komplexů závisí na velikosti kavity a charakteru hosta, přičemž komplexy různých stechiometrií mohou v roztoku koexistovat v rovnováze. Fyzikálně-chemickými metodami (NMR, kalorimetrie, UV) byly stanoveny asociační konstanty a termodynamické parametry několika tisíc inkluzních komplexů převážně nativních cyklodextrinů. Ve většině případů je hnací silou tvorby komplexu enthalpický zisk ( $\Delta H^\circ$  záporná). V literatuře je uváděn především "neklasický" hydrofobní efekt spočívající v uvolnění nepolární molekuly hosta z polárního vodného prostředí a jeho transfer do semipolární kavity cyklodextrinu. Host je v makrocyklu stabilizován van der Waalsovými, disperzními, případně vodíkovými vazbami. Předpokládá se, že významným příspěvkem je uvolnění izolovaných molekul vody s vysokou energií z nepolárního prostředí kavity a jejich integrace do okolní vody. Orientaci hosta v kavitě lze v roztoku většinou zjistit detekcí dipolárních interakcí vhodnou metodou, např. NMR. Studie inkluzních komplexů  $\beta$ -cyklodextrinu se steroidními deriváty prokázaly jejich vysoce dynamický charakter – molekuly hosta v dutině cyklodextrinu rotují kolem osy  $C_7$  a kmitají rovnoběžně s touto osou<sup>1</sup>.

V podstatě lze říci, že inkluzivní komplex tvoří všechny molekuly, které se do kavity cyklodextrinu vejdou. Pochopitelně se komplexy liší vlastnostmi. Je důležité si uvědomit, že tvorbou těchto komplexů se změní vlastnosti analytů<sup>6</sup>. Jako příklad je na obr.2 zobrazena struktura inkluzního komplexu 4-nitrofenolu a  $\alpha$ -cyklodextrinu.



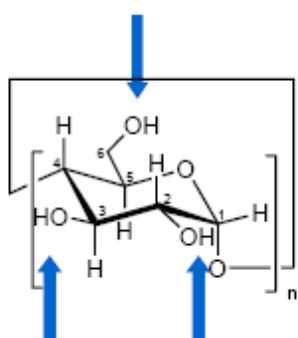


Obrázek 2: Model struktury inkluzního komplexu 4-nitrofenolu a  $\alpha$ -cyklodextrinu <sup>1</sup>

### 2.1.2. Modifikované cyklodextriny

Ačkoli získaly nativní cyklodextriny velkou oblibu v průmyslu, je často výhodné je nějakým způsobem modifikovat. Můžeme upravovat velikost kavity, kvůli lepší separaci určité látky. Lze vytvořit derivatizované cyklodextriny, které mají specifické funkce a separační vlastnosti.

Nejčastější reakcí je substituce, která může být klasifikována vzhledem ke glukosové jednotce. Liší se především tím na jakém uhlíku substituce proběhne a také kolik jednotek glukosy bude modifikováno. Nejreaktivnější místa jsou na hydroxylových skupinách a liší se svou reaktivitou (obr.3).



Obrázek 3: Označení tří hydroxylových skupin lišící se svojí reaktivitou ve struktuře cyklodextrinu <sup>1</sup>

Z těchto reakčních míst zcela jasně plyne, že lze připravit jak monosubstituované cyklodextriny, tak i několikanásobně substituované. Dokonce můžeme řídit, kde substituce

proběhne, na kolika glukosových jednotkách i na jakém uhlíku. Výtěžek konečného produktu nebývá ale nikdy 100%ní a vzniká mnoho vedlejších produktů, které je nutno dále oddělit od požadované látky. K separaci cyklodextrinů a jejich derivátů je možno využít například kapilární elektroforézu s nepřímou UV nebo vodivostní detekcí<sup>7</sup>

Příprava modifikovaných cyklodextrinů je výhodná v tom, že je lze vyrobit „na míru“ pro konkrétní separovaný analyt a tím významně zvýšit účinnost separace.

### **2.1.3. Chirální separace v kapilární elektroforéze s použitím cyklodextrinů**

Časté využití cyklodextrinů se týká právě chirální separace, tedy separace opticky aktivních látek.

Byl publikován ohromný počet separací s využitím nativních cyklodextrinů, jejich většímu rozšíření však brání jejich malá rozpustnost ve vodě<sup>10</sup>, současně neustále roste počet publikací o separaci neutrálních analytů s využitím nabitých derivatizovaných cyklodextrinů. Záporně nabitě cyklodextriny jsou nativní cyklodextriny substituované různě dlouhými alkyly a zakončené různými funkčními skupinami, jako například –COOH, –SO<sub>3</sub>H (sulfoskupina), atd. Jako příklad záporně nabitých cyklodextrinů bych uvedl karboxymethyl-β-cyklodextrin, karboxyethyl-β-cyklodextrin a sulfobutyl-β-cyklodextrin. Tyto sloučeniny jsou ethery beta cyklodextrinů, ovšem v chirálních separacích jsou užívány jen výjimečně. V literatuře se uvádí, že kladně nabitě CD mají oproti záporně nabitým některé výhody, jako např. lepší elektrostatická interakce s aniontem, relativní jednoduchost substituce do vyšších stupňů, lepší a specifitější zabudování nabitých skupin do kavity cyklodextrinu, atd.<sup>8</sup>. Tento výčet výhod není určitě úplný.

Kladně nabitě cyklodextriny se užívají nejčastěji pro separaci aniontů a neutrálních látek. Stupeň a druh substituce cyklodextrinu má vliv na enantioselektivitu a rozlišení. Při různé substituci se různí i rozlišení (za stejného elektroosmotického toku). Výhodou kapilární elektroforézy je, oproti HPLC, její vysoká účinnost. Lehce změnitelné separační podmínky dovolují snažší a vyšší enantiorozlišení aniontů, i při podobných vazebných konstantách<sup>9</sup>.

Byla publikována práce o chirální selekci R a S efaroxanu, při které se využívá tzv. duální systém. Jedná se o použití kombinace neutrálního cyklodextrinu a záporně nabitěho cyklodextrinu, která přispívá k mnohem lepšímu rozlišení R a S izomerů. Pro separaci se využívá dimethyl-β-cyklodextrin a karboxymethyl-β-cyklodextrin<sup>13</sup>.

#### 2.1.4. Nechirální separace

Často popisovaná separace je separace směsi benzenu, toluenu, ethylbenzenu a xylenů (o-, m-, p-), pro kterou je používána zkratka BTEX. Tyto sloučeniny jsou totiž sledované u podzemních vod, půdy, atd. Tyto látky lze separovat pomocí cyklodextrinů a z podzemních vod a půd je můžeme odstranit např. extrakcí. Při použití HPLC k separaci je důležité si uvědomit, že látky obsažené ve směsi BTEX mají podobnou strukturu i vlastnosti. Tudíž je velmi obtížné je separovat, pokud není cyklodextrin obsažen ve stacionární fázi. Z toho plyne, že se stacionární fáze, musí modifikovat anebo se cyklodextrin přidá do mobilní fáze<sup>11</sup>.

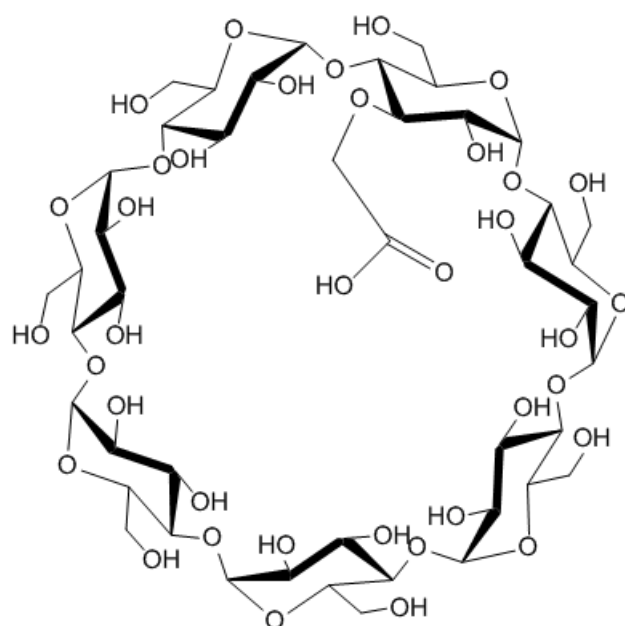
Při sledování metabolitů benzenu, toluenu, xylenů a ethylbenzenu (kyselina hippurová, močová, S-fenylmerkapturová, methylhippurová, kreatinin, atd.) lze využít také separaci pomocí  $\beta$ -cyklodextrinu. Při využití kapilární elektroforézy získáme vysokou účinnost separace, rozlišení a hlavně krátký čas separace<sup>12</sup>.

#### 2.1.5. Separace cyklodextrinů a jejich derivátů pomocí kapilární elektroforézy

Kapilární elektroforéza je výkonná analytická metoda, která je stále populárnější díky její vysoké účinnosti separace, dobrému rozlišení a nízké spotřebě materiálu<sup>13</sup>.

Jelikož jsem si vybral ke své práci nabitý derivatizovaný cyklodextrin (mono 3'-O-karboxymethyl- $\beta$ -cyklodextrin), tak jsem se při studii literatury zajímal i o separaci tohoto nabitého cyklodextrinu (obr.4). Separaci popsali ve své práci Pumera M., Jelínek I., Jindřich J.. Nabité cyklodextriny, 2'-O-karboxymethyl- $\beta$ -cyklodextrin, 3'-O-karboxymethyl- $\beta$ -cyklodextrin, 6'-O-karboxymethyl- $\beta$ -cyklodextrin, mají téměř stejnou hodnotu pKa, tudíž je jejich separace prakticky nemožná bez užití selektivního komplexotvorného činidla. Tímto činidlem je 40 mM (1S)-1-fenylethylamin titrovaný 2-[N-morfolino]ethansulfonovou kyselinou do pH 5,6. Tyto hodnoty byly zjištěny jako optimální kompromis mezi dosažením rozlišení a citlivosti nepřímé UV detekce. Analyty migrovaly v pořadí 6'-O-karboxymethyl- $\beta$ -cyklodextrin, 2'-O-karboxymethyl- $\beta$ -cyklodextrin, 3'-O-karboxymethyl- $\beta$ -cyklodextrin<sup>7</sup>.

Jedna z možných separací směsi  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ -cyklodextrinů je vytvoření komplexu s 2-anilinonaftalen-6-sulfonovou kyselinou a následná separace kapilární elektroforézou. Zvýšení fluorescence 2-anilinonaftalen-6-sulfonové kyseliny v komplexu způsobí vizualizaci separovaných cyklodextrinů. Rozlišení jednotlivých cyklodextrinů lze ovlivnit změnou koncentrace 2-anilinonaftalen-6-sulfonové kyseliny v roztoku<sup>14</sup>.



3'-O-carboxymethyl-β-cyclodextrin

Chemical Formula: C<sub>44</sub>H<sub>72</sub>O<sub>37</sub>

Exact Mass: 1192,38

Molecular Weight: 1193,02

m/z: 1192,38 (100,0%), 1193,38 (49,8%), 1194,38 (19,7%), 1195,38 (3,7%), 1195,39 (2,0%), 1196,39 (1,1%)

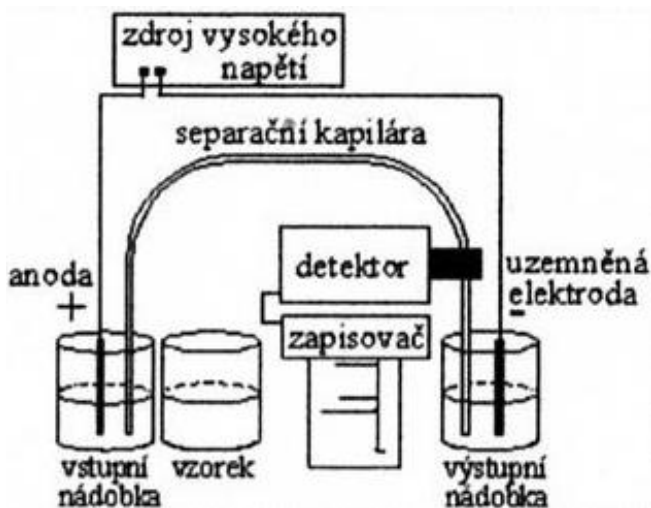
Elemental Analysis: C, 44.30; H, 6.08; O, 49.62

Obrázek 4: Strukturální vzorec 3'-O-karboxymethyl-β-cyklodextrinu a jeho základní charakteristika

## 2.2. Kapilární zónová elektroforéza (CZE)

Zónová elektroforéza i kapilární elektroforéza se řadí do tzv. elektromigračních metod. Patří sem i například elektrokinetická chromatografie, izoelektrická fokusace, izotachoforéza, atd. Všechny tyto metody mají společné to, že k separaci nabitých látek v analytu dochází díky vlivu elektrického pole.

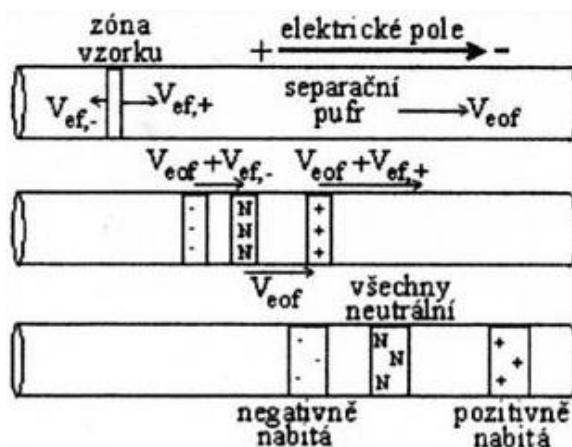
Zónová elektroforéza a kapilární zónová elektroforéza pracují na stejném principu, jen je u kapilární elektroforézy odlišné právě provedení elektroforézy v kapilárním uspořádání<sup>15</sup>.



Obrázek 5: Schéma experimentálního uspořádání kapilární zónové elektroforézy<sup>16</sup>

Dávkování vzorku provádíme buď hydrodynamicky nebo elektrokineticky. Hydrodynamické dávkování je oproti ostatním typům dávkování mnohem méně přesné, ale je nejjednodušší<sup>15</sup>.

Nadávkovaná směsná zóna vzorku se v separačním prostoru pohybuje vlivem elektrického pole. V průběhu migrace dochází k oddělování komponent vzorku s odlišnou elektroforetickou pohyblivostí, které se soustřeďují do samostatných zón<sup>15</sup>.



Obrázek 6: Princip CE separace nabitých komponent analytu<sup>16</sup>

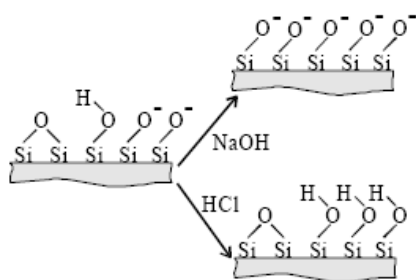
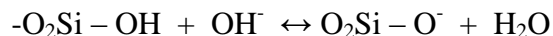
Detektor registruje pohyb jednotlivých zón na konci separačního prostoru a výsledek se zaznamenává ve formě elektroferogramu<sup>15</sup>. Vlivem záporně nabitého povrchu kapiláry a vlivem vkládaného elektrického napětí sledujeme na elektroferogramu, že kladně nabité částice vstupují do cely detektoru jako první, poté vstupují neutrální částice a na závěr

záporně nabité částice. Obvykle se záměrně volí známá neutrální sloučenina, která slouží jako indikátor elektroosmotického toku. Existují metody, pomocí kterých můžeme změnit pořadí migrace kationtů a aniontů tím, že změníme záporný náboj na povrchu kapiláry na kladný a přepólujeme polaritu vysokého napětí. Takto otočíme elektroosmotický tok, ale směr separace od vstupu k detektoru zůstane stejný.

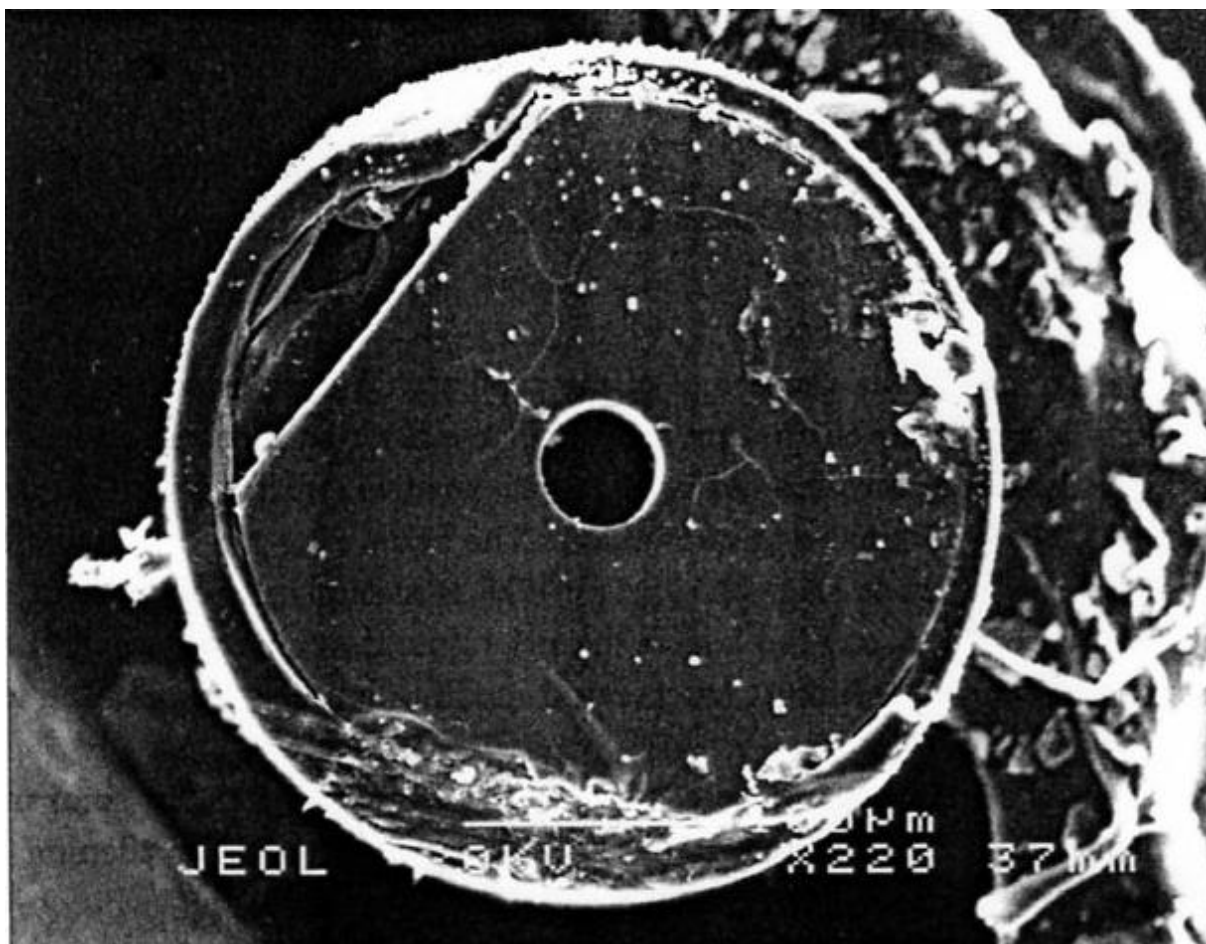
Měrnou celou detektoru je nejčastěji samotná kapilára, zbavená polyimidového obalu, tudíž je v tomto místě velmi křehká. Malý průměr kapiláry má tu výhodu, že umožňuje efektivně odvádět teplo a tím snižuje rozmývání zón<sup>15,17</sup>, na druhou stranu ovšem je optická dráha měřícího paprsku velmi krátká.

Nejčastěji se používá křemenná kapilára o vnitřním průměru 50-100 μm, potažená polyimidem, který propůjčí kapiláře pružnost. Kapilára by se před použitím měla aktivovat, což se dělá roztokem hydroxidu. Velmi často využívaným louhem je NaOH o koncentraci 0,1mol/l nebo 1mol/l, kterým kapiláru promýváme. Promývání tímto roztokem způsobí, že vzroste a ustálí se počet O<sup>-</sup> (na jednotku plochy) vázaných na stěny kapiláry (obr.5)<sup>17</sup>.

Princip vzniku záporného náboje na vnitřním povrchu křemenné kapiláry vlivem NaOH:



Obrázek 7: Schéma aktivace vnitřních stěn kapiláry<sup>16</sup>



Obrázek 8: Pohled elektronovým mikroskopem na průřez křemennou kapilárou potaženou polyimidem, vnitřní průměr 50  $\mu\text{m}$ , vnější průměr 360  $\mu\text{m}$ <sup>17</sup>

Jak již jsem řekl, k separaci dochází vlivem elektrického pole. Velikost napětí můžeme regulovat a tím ovlivňovat rychlost elektroosmotického toku. Pro analýzu se volí nejmenší možné napětí a proud, aby se zamezilo Jouleovu ohřevu a disperzi zón.

Důležitým faktorem v CZE je pufr, ovšem je třeba dobře zvážit jeho volbu, protože existuje řada pufrů pro různé škály pH. Pufry obsahují slabou kyselinu (slabou zásadu) a její sůl. Pufry, jakožto základní elektrolyt ovlivňují i velikost elektrického proudu v kapiláře. Koncentrace pufru významně ovlivní rozlišení, mobilitu a také jeho pufrační kapacitu. Tím ovlivní i účinnost separace jednotlivých látek, které chceme analyzovat.<sup>16,18</sup>

## 2.3. Vyhodnocení elektroferogramů

Postup vyhodnocování elektroferogramů je převzato z literatury<sup>16,19</sup>.

Veškeré hodnoty potřebné k dalším výpočtům zjistíme z elektroferogramu. Tedy migrační čas, výšku peaku, plochu peaku, šířku peaku v polovině výšky. Šířka peaku odpovídá šířce zóny, která přichází do detektoru. Šířku v polovině  $w_{0,5}$  je často třeba přepočítat na šířku peaku při základně  $w$ . Ta se vypočítá podle vztahu (3):

$$w = 4 \times \sigma \quad (1)$$

$$w_{0,5} = 2,354 \times \sigma \quad (2)$$

Vztahy (1) a (2) vyplývají z hodnot pro Gaussovský peak. Můžeme z nich odvodit vztah (3):

$$w = 4 \times \frac{w_{0,5}}{2,354} \quad (3)$$

Pokud tedy známe šířku peaku při základně  $w$  a migrační časy  $t_{mig,i}$ , můžeme snadno spočítat rozlišení  $R$ . Samotné migrační časy nemůžeme použít k přímému porovnání elektroferogramů, protože jsou závislé na mnoha experimentálních parametrech, jako např. napětí, délku kolony, teplotu, atd.. Z tohoto důvodu musíme vypočítat rozlišení a elektroforetickou mobilitu, protože pomocí těchto hodnot můžeme vyhodnocovat a porovnávat jednotlivá měření. Rozlišení mezi dvěma peaky se vypočítá ze vztahu (4), kde  $t_{mig}$  je migrační čas a  $w$  je šířka peaku při základně.

$$R_{1/2} = \frac{2 \times (t_{mig,2} - t_{mig,1})}{w_{t,1} + w_{t,2}} \quad (4)$$

Elektroforetickou mobilitu analytu vypočítáme ze vztahu (5), kde  $t_{eof}$  je migrační čas elektroosmotického toku, tedy neutrálního analytu,  $l_d$  je délka kapiláry k detektoru,  $l_c$  je celková délka kapiláry a  $U$  je napětí.

$$m_{ef,i} = \left( \frac{1}{t_{mig,i}} - \frac{1}{t_{eof}} \right) \times \frac{l_d \times l_c}{U} \quad (5)$$



## 2.4. Statistické vyhodnocení analytických výsledků

Statistické vyhodnocení výsledků je převzato z literatury<sup>15,20</sup>.

Odlehlé výsledky jsem vyloučil pomocí Deanova a Dixonova testu pro odlehlé výsledky. Naměřené hodnoty seřadíme od nejmenší k největší ( $x_1 < x_2 < x_3 \dots < \dots x_{n-2} < x_{n-1} < x_n$ ) a vypočítáme rozpětí výsledků  $R$  podle vzorce (6). Zde je  $x_{min}$  nejmenší hodnota,  $x_{max}$  největší.

$$R = x_{max} - x_{min} \quad (6)$$

Poté se vypočítá hodnota kritéria  $Q_1$  a hodnota kritéria  $Q_n$  podle vztahu (7) a (8). Tato kritéria slouží k vyloučení odlehlých výsledků podle Deanova a Dixonova testu.

$$Q_1 = \frac{x_2 - x_1}{R} \quad (7)$$

$$Q_n = \frac{x_n - x_{n-1}}{R} \quad (8)$$

Hodnoty kritérií  $Q_1$  a  $Q_n$  se potom porovnají s tabelovanou hodnotou kritéria  $Q_k$  pro daný počet analytických výsledků  $n$  v souboru. Pokud je  $Q_1 > Q_k$ , pak nejmenší z výsledků  $x_1$  je odlehlý a vyloučí se. Pokud je  $Q_n > Q_k$ , tak je největší z výsledků  $x_n$  odlehlý a rovněž je vyloučen.

Pro malý počet měření se používá medián jako odhad střední hodnoty ( $n \leq 20$ ), pro velký počet měření se užívá aritmetický průměr z naměřených hodnot. Medián se u lichých počtů měření bere jako prostřední hodnota, u sudého počtu měření se vypočítá aritmetický průměr dvou prostředních hodnot.

Směrodatnou odchylku  $s$  pro menší soubor analytických výsledků odhadujeme z vypočítaného rozpětí  $R$  a tabelovaného koeficientu  $k_n$ , který je tabelován pro  $n$  měření. Výpočet je dán vztahem (9)

$$s = k_n \cdot R \quad (9)$$

Relativní směrodatná odchylka  $s_r$  se vypočítá podle vztahu (10), jako podíl odhadované směrodatné odchylky a mediánu.

$$s_r = \frac{s}{\tilde{x}} \quad (10)$$

Přesnost naměřených hodnot můžeme vyjádřit jako interval spolehlivosti  $L_{1,2}$ , který udává interval, v němž se nachází hledaný parametr s jistou pravděpodobností. Při hodnocení souboru výsledků se nejčastěji používá hladina spolehlivosti 0,95. Interval spolehlivosti se vypočítá podle vztahu (11), kde  $K_n$  je tabelovaný koeficient pro soubor  $n$  výsledků.

$$L_{1,2} = K_n \cdot R \quad (11)$$

Tabulka 2: Hodnoty koeficientů  $k_n$  a  $K_n$  a kritické hodnoty  $Q_k$  pro daný soubor analytických výsledků o počtu  $n$  měření, koeficient spolehlivosti 0,95. <sup>18</sup>

$n$	$k_n$	$K_n$	$Q_k$
2	0,886	6,40	–
3	0,591	1,30	0,941
4	0,486	0,72	0,765
5	0,430	0,51	0,642
6	0,395	0,40	0,560
7	0,370	0,33	0,507
8	0,351	0,29	0,468
9	0,337	0,26	0,437
10	0,325	0,23	0,412

# 3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

## 3.1. Chemikálie

Ve své práci jsem požil tyto látky:

$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$

NaOH

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$

$\text{NaH}_2\text{PO}_4$

$\text{CH}_3\text{COOH}$

$\text{CH}_3\text{COONa}$

o-kresol (2-hydroxy-methylbenzen)

p-kresol (4-hydroxy-methylbenzen)

thiomočovina

... (vše Lachema, Neratovice,  
Česká Republika, p.a.)

hexadecyltrimethyl ammonium bromid

... Merck, Schuchardt (Německo), approx.  
99%

3'-O-karboxymethyl- $\beta$ -cyklodextrin

... dodaný doc. RNDr. J. Jindřichem, CSc.  
z katedry organické a jaderné chemie  
PřF UK

## 3.2. Přístroje a pomůcky

Přístroj pro CZE není komerční výroby (obr.9). Jedná se o přístroj „domácí“ výroby a jeho součástí je detektor s nastavitelnou vlnovou délkou (Spectra 100, variable wavelenght detector, Spectra – Physics, model: SC100/023, Linear USA), zdroj vysokého napětí (Elektronik GMBH, Rosenheim, Německo, 35 kV, 1 mA) a kapilára o průměru 75 $\mu\text{m}$  (Agilent technologies, USA).

Software nainstalovaný v počítači, nutný pro sběr dat a obsluhu CZE, byl naprogramován studentem katedry analytické chemie Tomášem Křížkem v systému Labview, verze 8., od firmy Nationals Instruments. Z tohoto programu byla naměřená data exportována

ve formě ASCII souborů a importována do chromatografického programu Clarity (verze 2.2.0.73, Data Apex), který jsem použil pro vyhodnocení elektroferogramů.

Deionizovaná voda byla odebírána z přístroje Millipore ( Milli – Q plus System, USA), kontrolu pH jsem prováděl na pH metru (Conductivity and pH meter firmy Jenway, United Kingdom) a vážil jsem na kalibrovaných analytických vahách (Sartorius, 2004 MP, Edgewood, NY, USA).



Obrázek 9: Pohled na použitý přístroj pro CZE. 1 - ....., 2 - ....., 3 -

### 3.3. Příprava roztoků

#### **Thiomočovina**

Použil jsem zásobní roztok thiomočoviny připravený pro pokročilá praktika o hmotnostní koncentraci 1 mg/ml

#### **Kresoly**

Zásobní roztoky kresolů jsem si připravil do dvou 25 ml odměrných baněk. Do první

odměrné baňky jsem si připravil zásobní roztok o-kresolu o  $c_g = 1,064$  mg/ml a do druhé odměrné baňky jsem si připravil zásobní roztok p-kresolu o  $c_g = 1,02$  mg/ml.

Tabulka 3: Stručná charakteristika kresolů za standardních podmínek.

	CASRN	$M_r$	$pK_a$	$\rho$ (g.cm <sup>-3</sup> )	$t_t$ (°C)	$t_v$ (°C)
<b>o-kresol</b>	95-48-7	108,1378	10,287	1,135	30,94	191,00
<b>p-kresol</b>	106-44-5	108,1378	10,260	1,154	34,74	201,94

### **Pufry**

Připravil jsem si pufry o pH = 5,7,9 a 11. Jejichž koncentrace byla 0,02 mol/l a objem 100 ml.

Pro pH 5 jsem si připravil acetátový pufr (naředěním acetátového pufru o koncentraci 0,5 mol/l, pH jsem upravil kyselinou octovou na pH = 5).

Pro pH 7 jsem si připravil fosforečnanový pufr (navážka pevného NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH jsem upravil 1 mol/l roztokem NaOH).

Pro pH 9 jsem si připravil borátový pufr (navážka pevného Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>.10H<sub>2</sub>O, pH jsem upravil 1 mol/l roztokem NaOH).

Pro pH 11 jsem si připravil fosforečnanový pufr (navážka pevného Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O, pH jsem upravil 1 mol/l roztokem NaOH).

### **Cyklodextrin**

Připravil jsem si 10 ml zásobního roztoku cyklodextrinu o koncentraci 10 mmol/l navážkou pevného mono 3'-O-karboxymethyl- $\beta$ -cyklodextrinu. Jako rozpouštědlo jsem použil deionizovanou vodu. Ovšem jak jsem později zjistil, tento roztok se po delší době v lednici kazí (přibližně týden). Proto jsem si později připravoval roztoky o koncentraci 10 mmol/l a objemu 2 ml a snažil se je spotřebovat nejpozději do týdne.

## **3.4. Podmínky měření**

Jako vzorek pro měření jsem dávkoval do 4 ml vialky 50  $\mu$ l zásobního roztoku o-kresolu, 50  $\mu$ l zásobního roztoku p-kresolu a 50  $\mu$ l zásobního roztoku thiomochoviny, sloužící k monitorování elektroosmotického toku. Tyto odpipetované roztoky jsem doplnil ve vialce

na objem 2 ml roztokem pufru. Výsledná hmotnostní koncentrace o-kresolu je 26,6 µg/ml, p-kresolu 25,5 µg/ml a thiomočoviny 25 µg/ml.

Jako základní elektrolyt jsem použil 2 ml pufru. Pokud jsem měřil s použitím cyklodextrinu, tak jsem pipetoval 200 µl zásobního roztoku mono 3'-O-karboxymethyl – β – cyklodextrinu a přidal 1800 µl roztoku pufru, čímž byla výsledná koncentrace cyklodextrinu 1 mmol/l a koncentrace pufru 18 mmol/l.

### 3.5. Postup práce

Jelikož jsem předpokládal, že při zásaditém pH bude separace lepší, zvolil jsem pH = 11 jako počáteční a postupoval jsem sestupně od pH = 11 k pH = 5. Nejprve jsem proměřil elektroosmotický tok pomocí thiomočoviny. Potom jsem změřil postupně thiomočovinu s jednotlivými kresoly a nakonec jsem změřil směs o-kresolu, p-kresolu a thiomočoviny. U jednotlivých pufrů jsem změřil nejprve vzorek se směsí kresolů a thiomočoviny bez cyklodextrinu a potom tentýž vzorek s přídavkem cyklodextrinu.

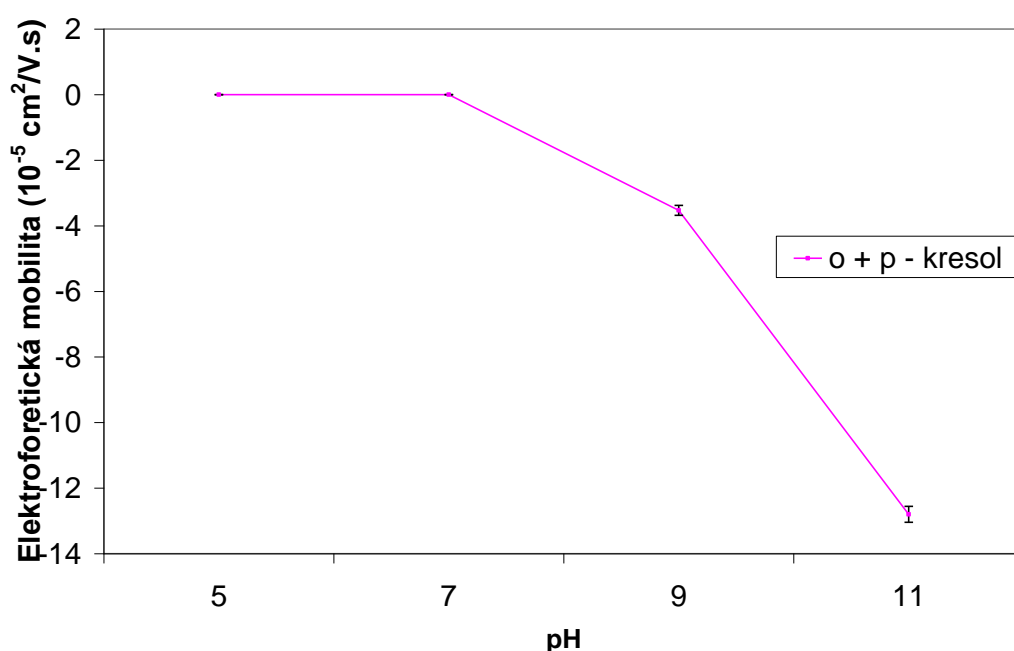
Při změně pH (vstupního roztoku, základního elektrolytu) jsem promýval kapiláru novým roztokem pufru minimálně 10 minut. Při změně „pufr ↔ pufr + cyklodextrin“ jsem promýval alespoň 20 minut.

Vzorek jsem dávkoval hydrodynamicky po dobu 10 s ve výšce 10 cm. Na všechna měření jsem použil stejné napětí,  $U = 22,5$  kV a kapiláru o průměru 75 µm a délce 70 cm (52 cm k detektoru).

## 4. Výsledky a diskuze

### 4.1. Separace kresolů bez přídavku 3'-KM- $\beta$ -CD

Na obr.10 vidíme závislost elektroforetické mobility spolumigrujících peaků o-kresolu a p-kresolu na pH základního elektrolytu a v tab.4 jsou uvedeny hodnoty mobilit.



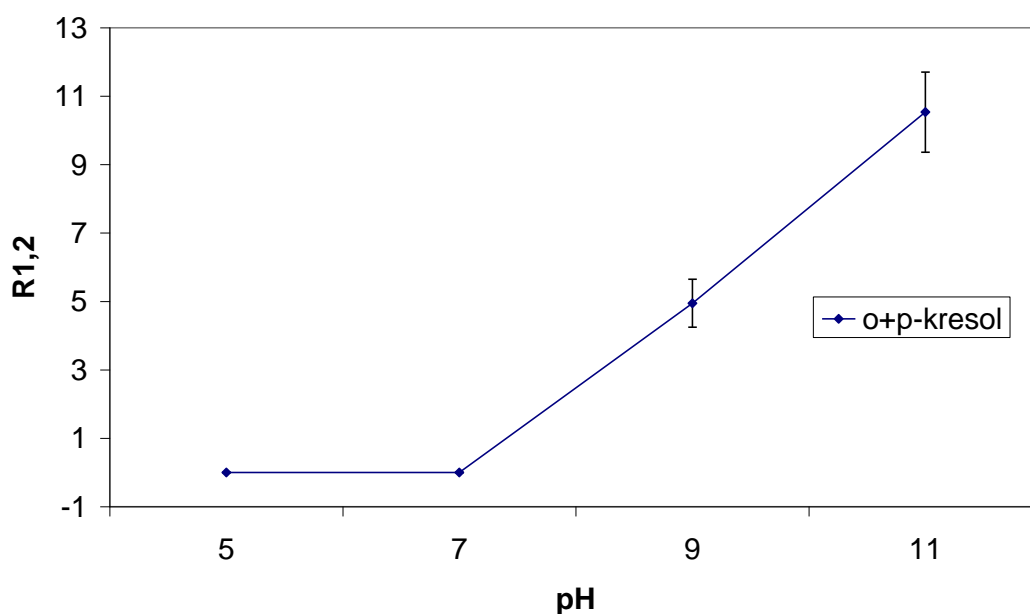
Obrázek 10: Závislost elektroforetické mobility spolumigrujícího o- a p-kresolu na pH použitého základního elektrolytu (bez 3'-KM- $\beta$ -CD)

Ve všech uvedených grafech jsou jednotlivé body spojené přímkami, i když je jasné, že nemusí přesně charakterizovat opravdový průběh závislosti. V textu jsou přesné hodnoty měřených a vypočtených veličin uvedené v tabulkách a pro názornost jsou ještě uvedeny i v grafech.

Tabulka 4: Elektroforetické mobility o- a p-kresolu a jejich směrodatné odchylky při různých hodnotách pH základního elektrolytu (bez 3'-KM-β-CD)

<b>Elektroforetická mobilita <math>m_{ef,i}</math></b> ( $\cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{Vs}$ )				
	<b>o-kresol</b>		<b>p-kresol</b>	
<b>pH</b>	<b><math>m_{ef,i}</math></b>	<b>s</b>	<b><math>m_{ef,i}</math></b>	<b>s</b>
<b>5</b>	0	0	0	0
<b>7</b>	0	0	0	0
<b>9</b>	-3,53	0,24	-3,53	0,24
<b>11</b>	-12,83	0,15	-12,83	0,15

Na obr.11 je znázorněna závislost rozlišení mezi peakem spolumigrujících o- a p-kresolu a peakem thiomočoviny na pH základního elektrolytu. V tab.5 jsou přesné hodnoty  $R_{1,2}$  v jednotlivých základních elektrolytech.



Obrázek 11: Závislost rozlišení spolumigrujících peaků o- a p-kresolu na pH použitého základního elektrolytu (bez 3'-KM-β-CD)



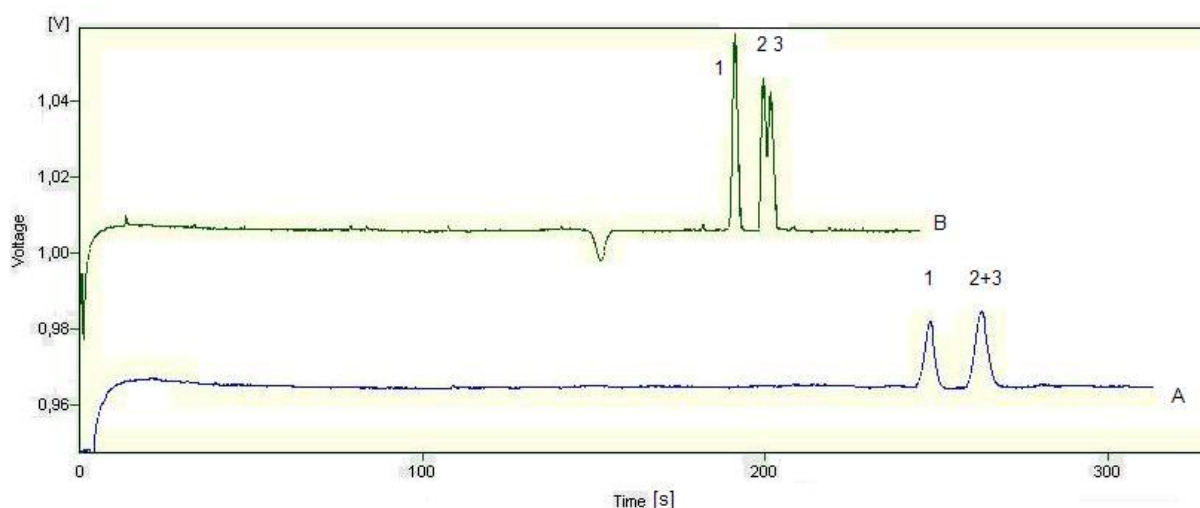
Tabulka 5: Hodnoty rozlišení o- a p-kresolu a jejich směrodatné odchylky při různých hodnotách pH základního elektrolytu (bez 3'-KM-β-CD)

pH	Rozlišení mezi spolumigrujícími peaky o- a p-kresolu a thiomochoviny (bez CD)	s
5	0	0
7	0	0
9	4,95	0,71
11	10,54	1,18

Z grafů a tabulek je jasné, že při pH 5 a 7 se o- a p- kresol neoddělí od peaku thiomochoviny. To znamená, že v tomto pH nemají kresoly žádný náboj. Při pH 9 a 11 se o- a p-kresol oddělí od peaku thiomochoviny, jsou tedy negativně nabitě vlivem ionizace kresolů, avšak oba kresoly spolumigrují. Přestože s rostoucí absolutní hodnotou pohyblivosti rostou migrační časy aniontů o- a p-kresolu a dochází tudíž k rozšiřování migračních zón v důsledku molekulární difúze, dochází v důsledku velkého rozdílu v migračních časech k celkovému nárůstu rozlišení (obr.10).

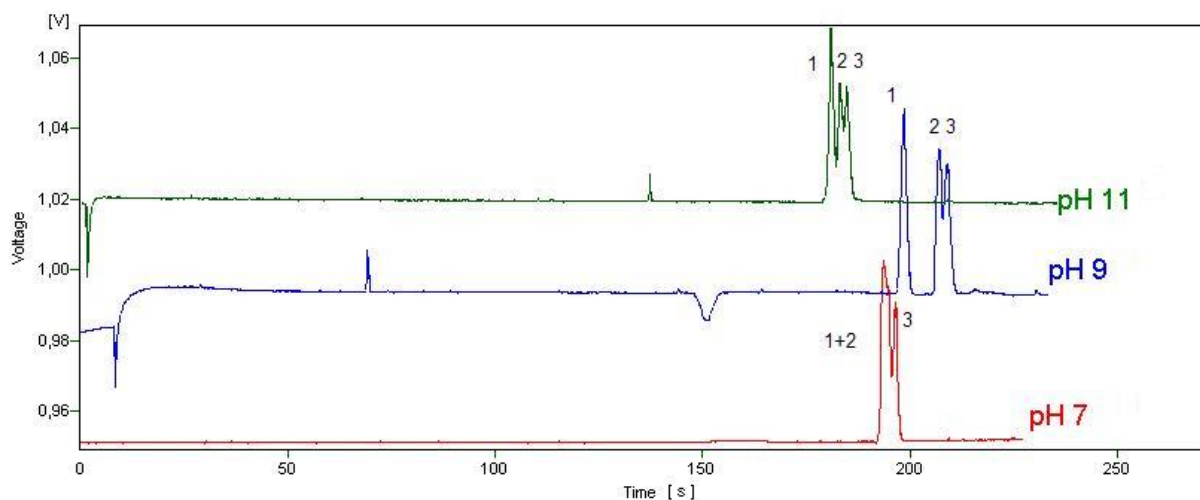
## 4.2. Separace kresolů s přidavkem 3'-KM-β-CD

Na obr. 12 a 13 jsou elektroferogramy separace směsi o- a p-kresolu a thiomochoviny při různých separačních podmínkách.



Obrázek 12: Elektroferogramy separací o- a p-kresolu.

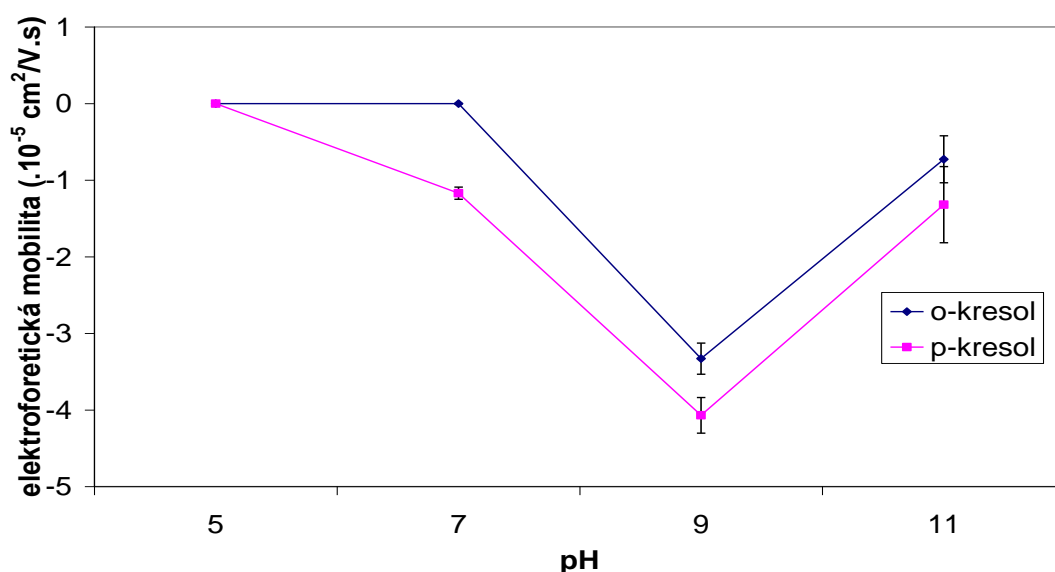
**A** - bez 3'-KM-β-CD, **B** - s 3'-KM-β-CD, **1** – thiomochovina, **2** – o-kresol, **3** – p-kresol. Borátový pufr (pH = 9),  $c_{CD} = 1 \text{ mmol/l}$ ,  $U = 22,5 \text{ kV}$ ,  $l_c = 70 \text{ cm}$ ,  $l_d = 52 \text{ cm}$ ,  $\lambda_d = 220 \text{ nm}$ , hydrodyn. dávkování 10 s v 10 cm.



Obrázek 13: Elektroferogramy separací kresolů v pufrch o různém pH s přidavkem 3'-KM-β-CD (experimentální podmínky kromě pH a použitého pufru stejné jako u obr. 12)

Rozlišení mezi jednotlivými peaky o-kresolu a p-kresolu u pH 9 není nejvyšší (obr.13), ovšem rozlišení vzhledem k thiomocovině je velké, ve srovnání se separacemi při pH 7 a 11.

Na obr. 14 vidíme elektroforetické pohyblivosti peaku o-kresolu a peaku p-kresolu v závislosti na změně pH základního elektrolytu pro daný separační systém, v tab.6 jsou tyto hodnoty pohyblivostí uvedeny číselně.



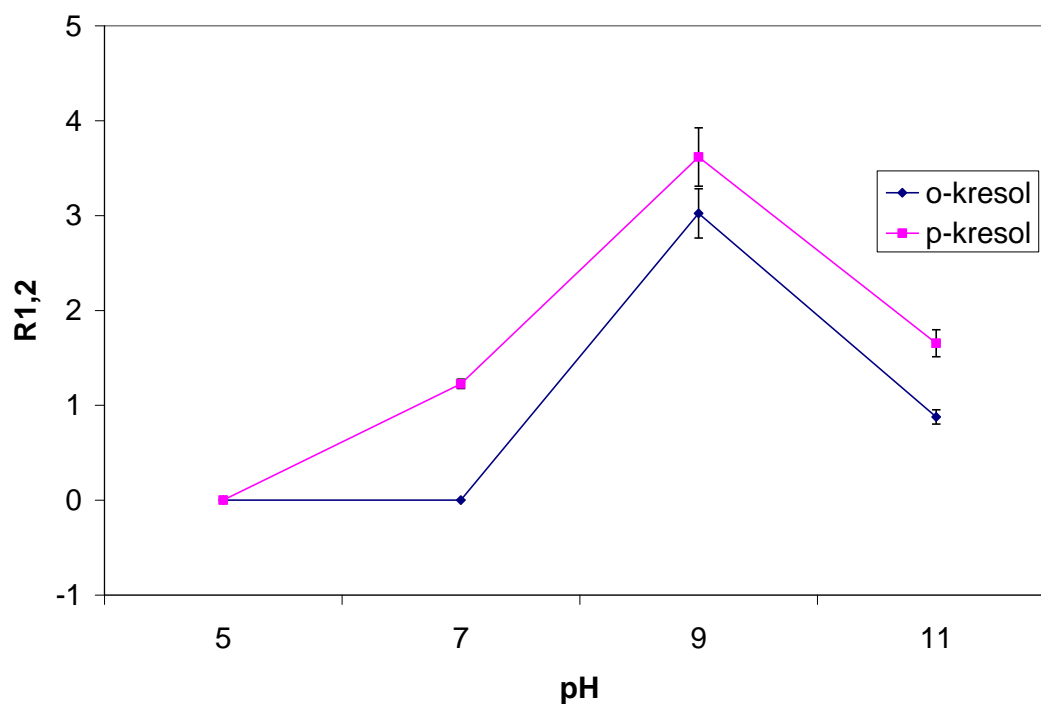
Obrázek 14: Závislost elektroforetické mobility o- a p-kresolu na pH použitého základního elektrolytu (s CD,  $c_{3'-\text{KM}-\beta\text{-CD}}=1 \text{ mmol/l}$ )

Tabulka 6: Elektroforetické mobility o- a p-kresolu a jejich směrodatné odchylky při různých hodnotách pH základního elektrolytu s 3'-KM-β-CD

( $c_{3'-KM-\beta-CD} = 1 \text{ mmol/l}$ )

Elektroforetická mobilita $m_{ef,i}$ ( $\cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{Vs}$ )				
	o-kresol (s CD)		p-kresol (s CD)	
pH	$m_{ef,i}$	s	$m_{ef,i}$	s
5	0	0	0	0
7	0	0	-1,17	0,08
9	-3,33	0,20	-4,07	0,23
11	-0,73	0,31	-1,32	0,24

Na obr.15 vidíme hodnoty rozlišení mezi peaky o- a p-kresolu a thiomocovinou v závislosti na pH základního elektrolytu, v tab. 7 jsou hodnoty rozlišení uvedeny číselně.



Obrázek 15: Závislost rozlišení mezi peaky o- a p-kresolu a peakem thiomocoviny na pH použitého základního elektrolytu (s CD,  $c_{3'-KM-\beta-CD} = 1 \text{ mmol/l}$ )

Tabulka 7: Hodnoty rozlišení mezi o- a p-kresolem a thiomochovinou a jejich směrodatné odchylky při různých hodnotách pH základního elektrolytu s cyklodextrinem

pH	o-kresol - thiomochovina		p-kresol - thiomochovina	
	Rozlišení	s	Rozlišení	s
5	0	0	0	0
7	0	0	1,23	0,05
9	3,02	0,26	3,62	0,31
11	0,88	0,08	1,65	0,14

Rozlišení je vždy vypočteno mezi peakem o-kresolu a peakem thiomochoviny nebo mezi peakem p-kresolu a peakem thiomochoviny.

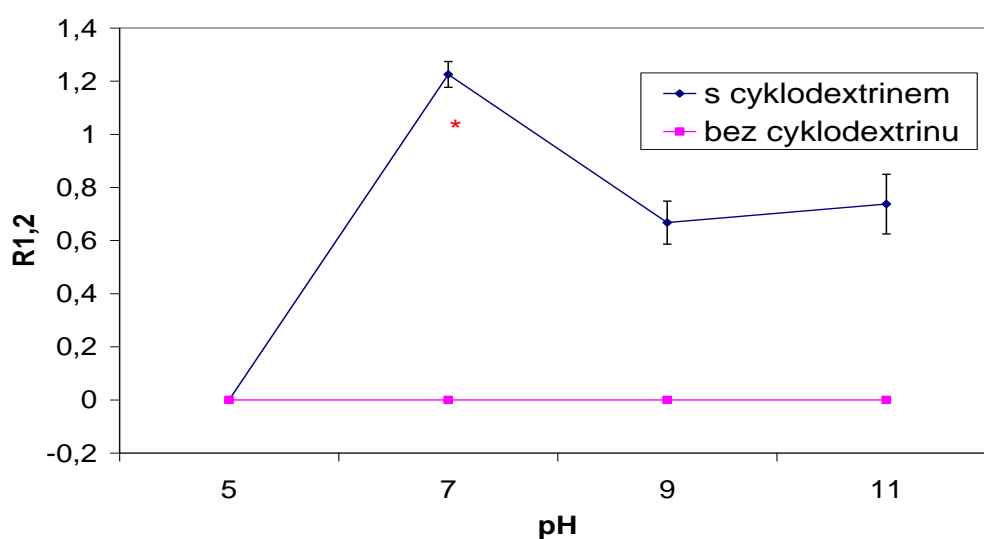
Změny hodnot rozlišení mezi peaky o- a p-kresolu a thiomochovinou v důsledku nárůstu pH přesně kopírují změny absolutní hodnoty elektroforetických pohyblivostí o- a p-kresolu. V kyselém prostředí nedošlo i přes přidavek 3'-KM-β-CD k separaci kresolů od thiomochoviny, stejně jako v případě bez přidavku 3'-KM-β-CD, v důsledku neutrálního náboje o- a p-kresolu. Už při pH 7 se podařilo oddělit peak p-kresolu, zatímco o-kresol dále spolumigruje s thiomochovinou. Při pH 9 se od thiomochoviny oddělí i o-kresol.

Srovnáním obr. 10 a 14 můžeme zjistit, že při pH 9 jsou mobility o- a p-kresolu v systému s přidavkem 3'-KM-β-CD srovnatelné (i když vzájemně nepatrně rozdílné) s hodnotami mobilit v systému bez přidavku 3'-KM-β-CD, zatímco při pH 11 vidíme diametrální rozdílnost mobilit v obou systémech. Zatímco bez přidavku 3'-KM-β-CD je elektroforetická mobilita obou kresolů  $-12,83 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{Vs}$ , klesnou po přidavku 3'-KM-β-CD mobility na hodnoty  $-0,73 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{Vs}$  pro o-kresol a  $-1,32 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{Vs}$  pro p-kresol. Důvodem je zřejmě narůstající intenzita interakce mezi molekulami kresolů a 3'-KM-β-CD se vzrůstajícími hodnotou pH. Otázkou zůstává jaký vliv má hodnota pH separačního pufru na vlastní pohyblivost 3'-KM-β-CD. V důsledku toho, že neznám hodnotu  $pK_a$  nelze přesně předpovědět chování 3'-KM-β-CD v pufrch o různém pH, i když je zřejmé, že v případě 3'-KM-β-CD bude s rostoucím pH absolutní hodnota jeho elektroforetické mobility narůstat (bude záporná).

V důsledku výše zmíněných chybějících údajů nelze přesněji odhadnout druh interakce mezi 3'-KM-β-CD a kresolem zodpovědný za pokles jejich mobilit v systému o pH 11.

### 4.3. Srovnání rozlišení mezi jednotlivými peaky o-kresolu a p-kresolu v pufrch s přidavkem a bez přidavku 3'-KM- $\beta$ -CD

V tomto případě je rozlišení vypočteno mezi peakem o-kresolu a peakem p-kresolu. Na obr.16 vidíme závislost rozlišení mezi o- a p-kresolem v závislosti na pH, vypočtené hodnoty rozlišení jsou uvedeny v tab. 9.



Obrázek 16: Závislost rozlišení mezi peaky o- a p-kresolu na pH použitého základního elektrolytu (\* o-kresol spolumigruje s thiomocovinou)

Tabulka 9: hodnoty rozlišení mezi peaky o- a p-kresolu v pufrch s použitím 3'-KM- $\beta$ -CD a jejich směrodatné odchylky

pH	Rozlišení	
	R <sub>1,2</sub>	s
5	0	0
7	1,23	0,05
9	0,67	0,08
11	0,74	0,11

Z analytického hlediska je potřeba pro stanovení látek rozlišení alespoň 1,5, čemuž se nejvíce blíží systém s přidavkem 3'-KM- $\beta$ -CD o pH 7. V tomto systému ovšem o-kresol spolumigruje s thiomocovinou, takže tato podmínka vlastně není splněna. Hodnota R<sub>1,2</sub> = 0,74, kterou vykazuje systém s přidavkem 3'-KM- $\beta$ -CD a pH 11 nedostačuje ani pro

kvalitativní analýzu, kdy je zapotřebí hodnota rozlišení alespoň 1. Z uvedených výsledků je zřejmé, že tento systém vyžaduje ještě další optimalizaci.

Výsledky separace hovoří vcelku jasně, ovšem nastiňují i spoustu otázek. 3'-O-karboxymethyl- $\beta$ -cyklodextrin má pozitivní vliv na separaci izomerů o- a p-kresolu, ale jeho použití skýtá i mnoho nevýhod. Jeho vlastnosti jsou unikátní a odpovídají tomu i výsledky. 3'-O-karboxymethyl- $\beta$ -cyklodextrin se v zásaditém pH ionizuje stejně jako kresol, ovšem v důsledku neznalosti jeho hodnot  $pK_a$  nevíme v jakém rozsahu, proto je překvapující a zajímavé, že mobilita kresolů s přidavkem CD se vzrůstajícím pH nejprve stoupá, a to ve srovnatelné míře jako bez přidavku CD, ale při pH 11 strmě klesne. Teoreticky vzato by měla být mobilita inkluzních komplexů největší v pH 11, kdy je ionizace největší. Významnou roli u těchto separací hraje určitě i samotný pufr. Například fosforečnanový pufr je méně vodivý než borátový pufr, což je zřejmé z naměřených hodnot elektrického proudu. Je tedy velmi pravděpodobné, že tyto faktory sehrály důležitou roli při separaci, a to jak v pH 11, tak i 9 (obr.13). Při pH 7 jsem použil rovněž fosforečnanový pufr, ale z výsledků je patrné, že zde ovlivnila separaci přítomnost CD, jelikož samotné kresoly se v tomto pH bez CD od peaku thiomocoviny neoddělí.

Další zajímavostí je, že směrodatná odchylka elektroforetické mobility u fosforečnanového pufru s cyklodextrinem (pH = 11) je největší. Při ostatních pH, i když jde o pufry s přidavkem CD nebo bez přidavku, jsou směrodatné odchylky podobné. Odpovídá tomu i směrodatná odchylka pro rozlišení mezi peaky o- a p-kresolu (obr. 16). Roli v tom může hrát teplota nebo další fyzikální vlivy, ale vzhledem k tomu, že všechna měření jsem prováděl v relativně stále stejně vytopené laboratoři, tak bych tyto odchylky přisuzoval právě výše popsaným faktorům.

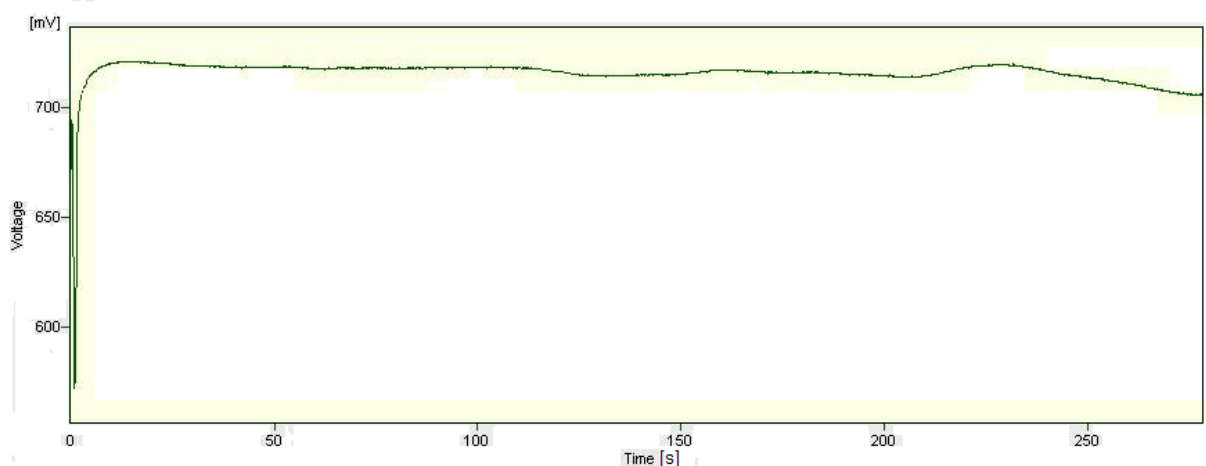
Separace kresolů sice neproběhla v daných koncentracích ideálně (obr. 12.), ale vliv cyklodextrinu je patrný a viditelný.

#### **4.4. Otočení pořadí migrace kationtů a aniontů na použité kapiláře**

Za účelem urychlení separace jsem chtěl metodu modifikovat tak, aby záporně nabitě kresoly nebo jejich záporně nabitě inkluzní komplexy s CD procházely celou detektorem jako první.

Pro změnu náboje povrchu kapiláry jsem použil hexadecyltrimethyl ammonium bromid, jehož roztokem jsem kapiláru propláchnul a poté nechal přibližně půl hodiny adsorbovat na stěnu kapiláry. Po tomto kroku jsem změnil polaritu vysokého napětí a tím jsem změnil uspořádání elektroforézy, takže ve vstupním roztoku byla nyní ponořena katoda.

Měření jsem prováděl v borátovém pufru s přídavkem 3'-KM- $\beta$ -CD, ale separace při použití cyklodextrinu vůbec neproběhla. Záporně nabitý cyklodextrin zřejmě utvořil komplexy s kladným povrchem kapiláry a tím znemožnil separaci (Obr. 17).



Obrázek 17: Elektroferogram separace o- a p-kresolu při současném použití 3'-KM- $\beta$ -CD a hexadecyltrimethyl ammonium bromidu.

## 5. ZÁVĚR

Vytyčeným cílem bakalářské práce byla studie funkce mono 3'-O-karboxymethyl- $\beta$ -cyklodextrinu jako selektoru při separaci o- a p-kresolu metodou CZE. Tohoto cíle jsem v rámci své práce dosáhl. Kresoly jsem od sebe částečně oddělil, i když ne s optimálním rozlišením.

Jako nejlepší z testovaných systémů separace o- a p-kresolu od thiomocoviny (v základním elektrolytu s CD) se ukázal pufr o pH 9, zatímco největšího rozlišení mezi peaky o- a p-kresolu se dosáhlo v pufru o pH 11 s přídatkem CD, a to s rozlišením 0,74.

V důsledku nedostupnosti hodnot  $pK_a$  použitého CD nebylo možno blíže vysvětlit druh interakce mezi kresoly a cyklodextrinem. Toto objasnění bude vyžadovat další experimentální práci.

Pokus o urychlení analýzy pomocí obráceného elektroosmotického toku vyvolaného přídatkem hexadecyltrimethyl ammonium bromidu se nezdařil, protože zřejmě docházelo k sorpci záporně nabitých iontů cyklodextrinu a kresolů na kladně nabitém povrchu separační kapiláry.



## 6. Seznam použité literatury

1. Kraus T., *Cyklodextriny*, Ústav organické chemie a biochemie AV ČR. Dostupné na URL: <http://www.uochb.cas.cz/Zpravy/PostGrad2004/PostGradtable.html> [cit.14.4.2008]
2. Nagakawa T., Ueno K., Kashiwa M., Watanabe J., *Tetrahedron Letters* 35, 1921 (1994)
3. Atwood J., Davies J., MacNicol B., Vogtle F., *Comprehensive Supramolecular Chemistry* (1996) : [??zjistím doma]
4. Krýsl S., Smolková E., *Chemické listy* 79, 919 (1985)
5. Špáňík I., Krupčík J., *Chemické listy* 94, 10 – 14 (2000)
6. Feranová A., Labuda J., Barek J., Zima J., *Chemické listy* 96, 856 – 862 (2002)
7. Pumera M., Jelínek I., Jindřich J., *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 369, 666-669 (2001)
8. Schulte G., Chankvetadze B., Gottfried B., *Journal of Chromatography A*, 771, 259 – 266 (1997)
9. Budanova N., Shapovalova E., Lopatin S., Varlamov V., Shpigun O., *Electrophoresis* 25, 2795 – 2800 (2004)
10. Yang G. S., Chen D. M., Yang Y., Tang B., Gao J. J., Aboul-Enein H. Y., Koppenhoefer B., *Chromatographia* 62, 441 – 445 (2005)
11. Balogh K., Szaniszló N., H-Otta K., Fenyvesi E., *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* 57, 457 – 462 (2007)
12. Chin-Yu Wang, Ching-Te Huang, You-Zung Hsieh, *Journal of Separation Science* 26, 69-74 (2003)
13. Lorin M., Delépée R., Morin P., Ribet J. P., *Analytica Chimica Acta* 592, 139 -145 (2007)
14. Penn S. G., Chiu R. W., Monig C.A., *Journal of Chromatography A* 680, 233-241 (1994)
15. Opekar F., Jelínek I., Rychlovský P., Plzák Z., *Skriptum Základní analytická chemie*, Praha, Karolinum (2003)
16. Coufal P., *Capillary Zone Electrophoresis, CZE*. Dostupný učební text na URL: <http://www.natur.cuni.cz/~pcoufal/cze.html> [cit.14.4.2008]

17. Kellner R., Mermut J.M., Otto M., Balcárek M., Widmer M., in *Analytical chemistry, A Modern Approach to Analytical Science*, Wiley – VLH, Second edition (2004)
18. Beckers J. L., Boček P., *Elektrophoresis* 24, 518 – 535 (2003)
19. Coufal P., *High Performance Liquid Chromatography, HPLC*. Dostupný učební text na URL: <http://www.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.html> [cit.14.4.2008]
20. *Základní praktika z analytické chemie*. Skriptum Univerzity Karlovy v Praze, Katedra analytické chemie, 2004. Dostupné na URL: <http://www.natur.cuni.cz/~analchem/praktika.html> [cit. 14.4.2008]

## Seznam použitých zkratek

3'-KM- $\beta$ -CD	... mono 3'-O-karboxymethyl- $\beta$ -cyklodextrin
BTEX	... směs benzenu, toluenu, ethylbenzenu a o-, m-, p-xylenu
c	... molární koncentrace
CASRN	... registrační číslo látky v CAS
$c_g$	... hmotnostní koncentrace
CD	... cyklodextrin
CE	... kapilární elektroforéza
CZE	... kapilární zónová elektroforéza
GC	... plynová chromatografie
$\Delta H^\circ$	... změna standardní entalpie látky
HPLC	... vysokoúčinná kapalinová chromatografie
$K_n$	... statistický koeficient Deanova a Dixonova testu
$k_n$	... statistický koeficient Deanova a Dixonova testu
$L_{1/2}$	... interval spolehlivosti
$l_c$	... délka celé kapiláry
$l_d$	... délka kapiláry k detektoru
$m_{ef,i}$	... elektroforetická mobilita pro látku i
n	... počet měření
NMR	... nukleární magnetická rezonance
$Q_1$	... hodnota statistického kritéria Deanova a Dixonova testu pro nejnižší výsledek
$Q_n$	... hodnota statistického kritéria Deanova a Dixonova testu pro nejvyšší výsledek
$Q_k$	... kritická hodnota statistického kritéria Deanova a Dixonova testu
R	... rozpětí výsledků
$R_{1/2}$	... rozlišení mezi peaky 1 a 2
s	... směrodatná odchylka
$s_r$	... relativní směrodatná odchylka
$\Delta S^\circ$	... změna standardní entropie látky
$t_{mig,i}$	... migrační čas látky i
$t_{eof}$	... migrační čas elektroosmotického toku

$t_t$	... teplota tání
$t_v$	... teplota varu
U	... elektrické napětí
UV	... ultrafialové záření
V	... objem
w	... šířka peaku při základně
$w_{0,5}$	... šířka peaku v polovině výšky
$x_{max}$	... největší naměřená hodnota
$x_{min}$	... nejmenší naměřená hodnota
$\lambda$	... vlnová délka
$4\sigma$	... šířka peaku při základně pro Gaussovský peak
$\rho$	... hustota