

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Přírodovědecká fakulta
Katedra fyzikální a makromolekulární chemie

**FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ STANOVENÍ
KONSTANT STABILITY KAPILÁRNÍ
ZÓNOVOU ELEKTROFORÉZOU**

Diplomová práce
studijního oboru klinická a toxikologická analýza

PRAHA 2008

IVA VELHARTICKÁ

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně, pod vedením školitelky RNDr. Ivy Zuskové, CSc. (a konsulantky RNDr. Kateřiny Ušelové, PhD.), a že jsem všechny použité prameny řádně citovala.

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

V Praze dne...2...9...2008.....

.....Velhartická'ova.....
podpis

Ráda bych poděkovala své školitelce RNDr. Ivě Zuskové, CSc. a konzultantce RNDr. Kateřině Ušelové, PhD. za cenné rady, ochotu, trpělivost a pomoc při vypracování diplomové práce.

Dále bych chtěla poděkovat panu G. Vighovi a jeho kolegům z chemické katedry Univerzity Texas A&M v USA za poskytnutí PEMEDA- a HS- β -CD.

Zvláštní poděkování patří rodičům za umožnění vysokoškolského studia.

OBSAH

KLÍČOVÁ SLOVA	5
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	6
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ	8
1 ÚVOD A CÍL PRÁCE	12
2 TEORETICKÁ ČÁST	13
2.1 Kapilární elektroforéza – základní pojmy	13
2.2 Konstanta stability a její stanovení	17
2.2.1 Experimentální uspořádání a metody pro stanovení konstanty stability	20
2.2.2 Vyhodnocení experimentálních dat	21
2.2.3 Faktory ovlivňující stanovení konstanty stability	23
2.3 Cyklodextriny	28
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	31
3.1 Použité přístroje a chemikálie	32
3.2 Experimentální podmínky a postupy	33
4 VÝSLEDKY A DISKUZE	38
4.1 Komplex α -cyklodextrinu s <i>p</i> -nitrofenolem	38
4.2 Komplex nabitého cyklodextrinu s neutrálním analytem	52
4.2.1 Komplex PEMEDA- β -cyklodextrinu se sekundárním fenethylalkoholem	52
4.2.2 Komplex HS- β -cyklodextrinu s <i>p</i> -nitrofenolem	61
5 ZÁVĚR	64
SUMMARY	66
LITERATURA	67

KLÍČOVÁ SLOVA

KAPILÁRNÍ ZÓNOVÁ ELEKTROFORÉZA

KONSTANTA STABILITY

IONTOVÁ SÍLA

VISKOZITA

CYKLODEXTRINY

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

A	analyt
AC	komplex vytvořený z analytu a komplexačního činidla
ACE	afinitní kapilární elektroforéza
BGE	základní elektrolyt
C	komplexační činidlo
CCD	bezkontaktní vodivostní detektor
CD	cyklodextrin
DAD	detektor s diodovým polem
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EOF	elektroosmotický tok
FA	frontální analýza
FACCE	kontinuální frontální analýza v kapilární elektroforéze
HD	Hummelova-Dreyerova metoda
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HS- β -CD	heptakis-6-O-sulfo- β -cyklodextrin
NMR	nukleární magnetická resonance
<i>p</i> -NP	para-nitrofenol
PEMEDA- β -CD	mono (6-deoxy-6-N,N,N',N',N'-pentamethylethylendiammonium)- β - -cyklodextrin)
PreMCE	tlakem zprostředkovaná separace v CE
sec-fenethylalkohol	R-sekundární fenethylalkohol
UV	ultrafialové záření (400 – 10 nm)
VIS	viditelné záření (790 – 390 nm)

VACE	vakantní afinitní kapilární elektroforéza
VP	metoda vakantních píků
α -CD	α -cyklodextrin

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ

a	nejkratší vzdálenost, na kterou se mohou přiblížit středy iontu a jeho protitiontu[m]
a_A	aktivita analytu
a_{AC}	aktivita komplexu
a_C	aktivita komplexačního činidla
a_i	aktivita i -tého iontu
A	konstanta v Debyeově-Hückelově vztahu [$0,509 (\text{mol dm}^{-3})^{-1/2}$]
B	konstanta v Debyeově-Hückelově rozšířeném vztahu a Onsangerově rozšířeném vztahu [$3,291 \times 10^9 \text{ m}^{-1}(\text{mol dm}^{-3})^{-1/2}$]
B_1	konstanta v Onsangerově limitním zákoně [$0,7853 (\text{mol dm}^{-3})^{-1/2}$]
B_2	konstanta v Onsangerově limitním zákoně [$31,42 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}(\text{mol dm}^{-3})^{-1/2}$]
c	molární koncentrace [mol dm^{-3}]
c°	standardní koncentrace 1 mol dm^{-3} při teplotě $25 \text{ }^\circ\text{C}$
c_A	celková (analytická) koncentrace analytu [mol dm^{-3}]
c_{CD}	celková (analytická) koncentrace cyklodextrinu [mol dm^{-3}]
c_i	molární koncentrace i -tého iontu [mol dm^{-3}]
c_j	molární koncentrace j -tého iontu [mol dm^{-3}]
$c_{p\text{-NP}}$	celková koncentrace p -NP [mol dm^{-3}]
E	intenzita elektrického pole [V m^{-1}]
e	elementární náboj [$1,6022 \times 10^{-19} \text{ C}$]
F	Faradayova konstanta [$9,649 \times 10^4 \text{ C mol}^{-1}$]
I	iontová síla [mol dm^{-3}]
I	proud procházející kapilárou naplněnou BGE bez ligandu [A]

I_{BGE}	iontová síla BGE [mol dm^{-3}]
I_{c}	proud procházející kapilárou naplněnou BGE s danou koncentrací ligandu [A]
K	termodynamická konstanta stability
K'	zdánlivá konstanta stability [$(\text{mol dm}^{-3})^{-1}$]
l_{celk}	celková délka kapiláry [m]
l_{DAD}	vzdálenost vstupního konce kapiláry a detektoru s diodovým polem [m]
M	poměr mobilit
N_{A}	Avogardova konstanta [$6,022 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$]
$\text{p}K_{\text{a}}$	záporný dekadický logaritmus disociační konstanty
q	parametr v Onsangerově rovnici
r_{A}	hydrodynamický poloměr aniontu analytu [m]
r_{AC}	hydrodynamický poloměr aniontu komplexu [m]
r_{i}	hydrodynamický poloměr i-tého iontu [m]
R	univerzální plynová konstanta [$8,314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$]
t	detekční čas [s]
t	čas potřebný k protlačení zóny kapilárou naplněnou BGE bez ligandu [s]
t_{c}	čas potřebný k protlačení zóny kapilárou naplněnou BGE s danou koncentrací ligandu [s]
Δt	rozdíl detekčních časů [s]
t_2	čas, po který je vloženo napětí [s]
t_3	čas potřebný k protlačení zóny kapilárou v metodě PreMCE [s]
$t_{\text{i, DAD}}$	detekční čas i-tého iontu zaznamenaný detektorem s diodovým polem [s]
T	termodynamická teplota [K]
U	napětí vkládané na kapiláru [V]
z_{+}	nábojové číslo kationtu

z	nábojové číslo aniontu
z_i	nábojové číslo i-tého iontu
z_j	nábojové číslo j-tého iontu
$[A]$	rovnovážná koncentrace analytu [mol dm^{-3}]
$[AC]$	rovnovážná koncentrace komplexu [mol dm^{-3}]
$[C]$	rovnovážná koncentrace komplexačního činidla [mol dm^{-3}]
γ_A	aktivitní koeficient analytu
γ_{AC}	aktivitní koeficient komplexu
γ_C	aktivitní koeficient komplexačního činidla
γ_i	aktivitní koeficient i-tého iontu
ε	permitivita prostředí [F m^{-1}]
ζ	zéta potenciál na stěně kapiláry [V]
η	viskozitní koeficient prostředí [Pa s]
η	viskozitní koeficient BGE bez přídavku ligandu [Pa s]
η_c	viskozitní koeficient BGE s danou koncentrací ligandu [Pa s]
μ	elektroforetická mobilita (pohyblivost) [$\text{m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$]
μ	elektroforetická mobilita v BGE bez přídavku ligandu [$\text{m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$]
μ_-	mobilita aniontu [$\text{m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$]
μ^0	limitní mobilita [$\text{m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$]
μ_-^0	limitní mobilita aniontu [$\text{m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$]
μ_+^0	limitní mobilita kationtu [$\text{m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$]
μ_A	mobilita analytu [$\text{m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$]
$\mu_{A,c}$	mobilita analytu v BGE s danou koncentrací ligandu [$\text{m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$]
μ_{AC}	mobilita komplexu [$\text{m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$]
$\mu_{AC,c}$	mobilita komplexu v BGE s danou koncentrací ligandu [$\text{m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$]

$\mu_{A, \text{eff}}$	efektivní mobilita analytu [$\text{m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$]
$\mu_{A, \text{eff, cor}}$	efektivní mobilita analytu korigovaná na změny viskozitního koeficientu BGE [$\text{m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$]
μ_{app}	pozorovaná mobilita [$\text{m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$]
μ_{c}	elektroforetická mobilita v BGE s danou koncentrací ligandu [$\text{m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$]
μ_{eff}	efektivní mobilita [$\text{m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$]
μ_{EOF}	mobilita elektroosmotického toku [$\text{m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$]
$\mu_{\text{EOF, c}}$	mobilita elektroosmotického toku v BGE s danou koncentrací ligandu [$\text{m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$]
μ_{i}	mobilita i-tého iontu [$\text{m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$]
μ_{i}^0	limitní mobilita i-tého iontu [$\text{m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$]
$\mu_{\text{i, app, DAD}}$	pozorovaná mobilita i-tého iontu vypočtená ze záznamu detektoru s diodovým polem [$\text{m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$]
ν	viskozitní korekční faktor
ν	rychlost migrace [m s^{-1}]
ν_{i}	rychlost migrace i-tého iontu [m s^{-1}]
$ \mu_{A, \text{eff}} $	absolutní hodnota efektivní mobility analytu [$\text{m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$]
$ \mu_{A, \text{eff, cor}} $	absolutní hodnota efektivní mobility analytu korigované na změny viskozitního koeficientu BGE [$\text{m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$]

1 ÚVOD A CÍL PRÁCE

Konstanty stability jsou důležitým zdrojem fyzikálně-chemických vlastností při studiu vazebných interakcí. Nekovalentní interakce se hojně vyskytují v přírodě, využívají se ke zvýšení selektivity separačních metod, klíčovou roli hrají ve farmakologii, kde schopnost určit rozsah interakce mezi receptorem a ligandem patří k základním informacím při vývoji léčiv.¹

Během posledních dvaceti let bylo vyvinuto mnoho metod pro stanovení konstant stability, většina z nich je založena na separaci za rovnovážných podmínek. Mezi nimi je kapilární elektroforéza novou atraktivní analytickou metodou nevyžadující dlouhou dobu analýzy ani velké množství vzorku či pufry, která má zároveň velkou účinnost. Pro stanovení vazebných parametrů jsou v kapilární elektroforéze používány principy vycházející ze separace interagujících složek na základě rozdílu v jejich mobilitě.² Kapilární elektroforézou lze stanovovat konstanty stability velkého množství analytů od velkých molekul proteinů nebo DNA molekul až po malé ionty kovů.³

V posledních šedesáti letech bylo publikováno velké množství odborných článků a studií, které se zabývají stanovováním konstant stability a popisem vazebných interakcí mezi molekulami pomocí kapilární elektroforézy. Několik autorů publikovalo přehledové články^{4,5,6}, ve kterých shrnuli základní informace a teze z tohoto množství literatury. V přehledovém článku Ušelové-Včelákové a kol.⁷ jsou uvedeny hodnoty publikovaných konstant stability stanovených převážně metodami kapilární elektroforézy za posledních deset let. Vzhledem k velkému rozpětí publikovaných hodnot konstant stability stejných komplexů je nutno zabývat se faktory, které ovlivňují jejich stanovení.

Cílem diplomové práce bylo určit, jakou měrou jsou ovlivněny hodnoty konstanty stability stanovené kapilární zónovou elektroforézou faktory, jako je viskozita a iontová síla prostředí a běžně používaná aproximace ztotožňující analytickou koncentraci ligandu s rovnovážnou koncentrací volného (v komplexu nevázaného) ligandu. Ke studiu těchto faktorů použít komplex jednak neutrálního cyklohextrinu s nabitým analytem (navázat na předchozí měření v bakalářské práci) a dále složitější druhy komplexů (kladně a záporně nabitého cyklohextrinu s neutrální látkou).

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Kapilární elektroforéza – základní pojmy

Kapilární elektroforéza (CE) je elektromigrační separační metoda, jejímž základním separačním principem je rozdílná rychlost pohybu elektricky nabitých částic v roztoku vystavenému působení vnějšího stejnosměrného elektrického pole. Tento pohyb se označuje jako migrace, resp. elektroforetická migrace. Separace probíhá v tenkých, zpravidla křemenných kapilárách, které dovolují aplikaci vysokých napětí a vyžadují pouze velmi malé objemy vzorku o nízké koncentraci analytů. Výsledkem je krátká doba experimentu a vysoká účinnost a citlivost těchto metod.

V kapilární zónové elektroforéze probíhá analýza v kontinuálním elektrolytickém systému, kdy je tzv. základním elektrolytem (BGE) naplněna kapilára i obě elektrodové nádoby. Jako základní elektrolyt se zpravidla používá pufr. Po nadávkování vzorku do kapiláry a vložení separačního napětí začnou jednotlivé analyty vyputovávat z dávkované zóny do BGE. Pokud se dostatečně liší jejich migrační rychlosti, rozdělí se do samostatných zón, které se již dále pohybují konstantní rychlostí.

Dominantní veličinou všech kapilárních elektromigračních metod je elektroforetická pohyblivost (mobilita) μ , definovaná jako rychlost migrace v při jednotkové intenzitě elektrického pole. V elektrickém poli o intenzitě E je mobilita i -tého iontu μ_i dána vztahem

$$\mu_i = \frac{v_i}{E}. \quad (1)$$

Za předpokladu, že odpor roztoku v kapiláře je podél celé kapiláry konstantní a představuje jediný příspěvek k odporu celého systému, lze intenzitu elektrického pole vyjádřit jako podíl velikosti vnějšího napětí U a celkové délky kapiláry l_{celk} :

$$E = \frac{U}{l_{\text{celk}}}. \quad (2)$$

Mobilitu i -tého iontu v ideálním roztoku lze vyjádřit vztahem

$$\mu_i = \frac{z_i e}{6\pi\eta r_i}, \quad (3)$$

ze kterého vyplývá její přímá úměra na náboji iontu (součinu nábojového čísla iontu z_i a elementárního náboje e) a nepřímá úměra na hydrodynamickému poloměru iontu r_i a viskozitě prostředí η . Mobilita iontu je zde uvažována jako kladná veličina pro kationty a záporná pro anionty.

V reálném roztoku se však uplatňují vzájemné – především elektrostatické – interakce mezi ionty, v jejichž důsledku se mobilita daného iontu stává funkcí koncentrací a mobilit všech iontů přítomných v roztoku. Mobilita iontů v daném roztoku se označuje jako aktuální mobilita. V ideálním (nekonečně zředěném) roztoku nabývá mobilita maximální hodnoty nazývané limitní mobilita μ^0 . Limitní mobility jsou při teplotě 25 °C tabelovány jako fyzikálně-chemické charakteristiky iontů.

Pro látky tvořené více formami, mezi nimiž dochází k rychlému ustavování rovnováhy (tzn. rychlost ustavování rovnováhy je mnohem větší než migrační rychlost), byla zavedena tzv. efektivní mobilita μ_{eff} , která vystihuje mobilitu dané látky jako celku a je definována vztahem

$$\mu_{\text{eff}} = \sum_i \frac{c_i \mu_i}{c}, \quad (4)$$

ve kterém c_i a μ_i označují koncentraci a aktuální mobilitu i -té iontové formy dané látky, jejíž celková látková (analytická) koncentrace je c .

V CE se kromě migrace iontů uplatňuje další transportní jev – elektroosmotický tok. Elektroosmotický tok (EOF) neboli elektroosmóza je tok kapaliny kapilárou vyvolaný působením stejnosměrného elektrického pole. Příčinou EOF je povrchový náboj na vnitřní stěně kapiláry, který vzniká v důsledku disociace ionogenních skupin obsažených v povrchu kapiláry a/nebo selektivní adsorpcí jednoho druhu iontů na stěnu kapiláry. V křemenné kapiláře naplněné roztokem elektrolytu dochází k vytvoření silanolových skupin hydrolyzou siloxanových skupin, které jsou následně v závislosti

na pH roztoku disociovány. Na vnitřním povrchu kapiláry se tedy vytvoří záporný náboj a oxoniové ionty vzniklé disociací vytvoří pozitivně nabitou vrstvu v roztoku při vnitřní stěně kapiláry, vzniká tzv. elektrická dvojvrstva. Po vložení napětí se hydratované oxoniové ionty pohybují směrem ke katodě a strhávají s sebou i roztok v kapiláře, čímž vzniká elektroosmotický tok. Elektroosmotický tok má téměř pravoúhlý rychlostní profil a nepřispívá tedy k celkové disperzi (rozšiřování a deformaci) zón analytu. Elektroosmotický tok unáší všechny přítomné ionty i neutrální částice stejnou rychlostí, nepůsobí tedy selektivně na separaci iontů, ale výrazně ovlivňuje výslednou rychlost přítomných analytů a tím i účinnost separace a dobu analýzy.

Elektroosmózu lze regulovat prostřednictvím experimentálních podmínek, například změnou složení používaného základního elektrolytu, pH nebo iontové síly. Dále je možno elektroosmózu ovlivnit modifikací vnitřního povrchu kapiláry. Přídavkem povrchově aktivních látek přímo do používaného pufru lze vytvořit tzv. dynamický povlak (dynamic coating), který je během experimentu kontinuálně regenerován a po ukončení experimentu může být z kapiláry vymyt. Druhým typem modifikace je tzv. permanentní (kovalentní) povlak, který je většinou realizován polymery vázanými k povrchu kovalentními vazbami. Tento povlak musí být odolný vůči promývání kapiláry. V obou případech lze v závislosti na struktuře modifikátoru docílit zvýšení, snížení, eliminace či dokonce obrácení směru elektroosmózy.

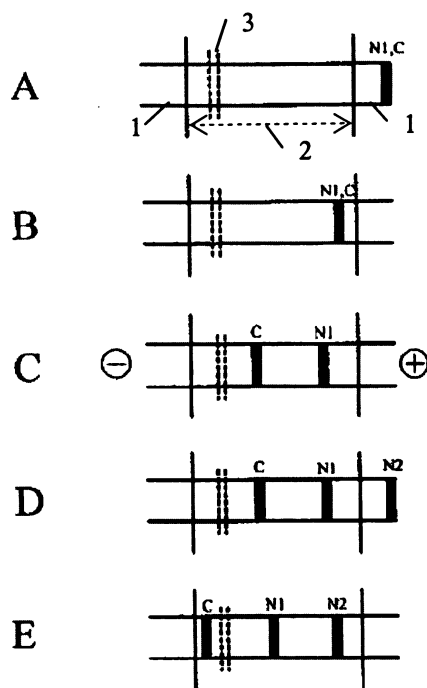
Významným jevem uplatňujícím se v CZE jsou tzv. systémové zóny, resp. systémové píky, které neodpovídají žádnému analytu. Jsou způsobeny samostatnou migrující zónou, jejíž složení se liší od původního základního elektrolytu pouze koncentrací jeho složek. Vznikají jako důsledek poruchy v původně homogenním prostředí základního elektrolytu, která je vyvolána nadávkováním vzorku. Pro mobilitu těchto zón navrhl Gaš pojem systémová eigenmobilita. Podle Štědrého a kol.⁸ se v základním elektrolytu s N konstituenty vytváří N systémových eigenmobilit, z nichž některé však mohou mít prakticky nulovou hodnotu. Podrobná klasifikace systémových zón je uvedena v přehledovém článku Gaše a Kenndlera.⁹

Důležitým faktorem ovlivňujícím citlivost detekce a účinnost separace je disperze, která rozšiřuje zóny analytů a tím i rozšiřuje a deformuje píky. Vyplývá z rozdílu v rychlostech analytu uvnitř zóny. Mezi jevy způsobující disperzi patří podélná difúze, Joulovovo teplo, adsorpce analytu na stěnu kapiláry a elektromigrační

disperze. Při separaci je nutno tyto jevy minimalizovat a dosáhnout tak píků co možná nejužších a symetrických.

TLAKEM ZPROSTŘEDKOVANÁ SEPARACE V CE (PreMCE)

Williams a Vigh popsali metodu¹⁰, která umožňuje rychlé a reprodukovatelné měření elektroforetických mobilit aniontů i kationtů v jednom experimentu bez ohledu na směr a velikost EOF. Zároveň předchází problémům se změnou EOF během experimentu nebo se změnou mobility látek způsobenou nekonstantní teplotou na vstupním a výstupním konci kapiláry. Postup pro stanovení kationtů je znázorněn na obrázku 2.1, stanovení mobility aniontů je analogické.

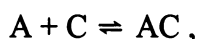


OBR. 2.1¹⁰

Kroky pro stanovení mobility kationtů: A – nadávkování zóny analytu a markeru EOF, B – zatlačení zóny do termostatované části kapiláry konstantním tlakem, C – aplikace separačního napětí, D – nadávkování zóny markeru EOF a E – protlačení zón detektorem konstantním tlakem. N₁, N₂ označují marker EOF, C kationtový analyt, 1 – netermostatovanou část kapiláry, 2 – termostatovanou část kapiláry a 3 – detektor.

2.2 Konstanta stability a její stanovení

Konstanta stability nebo též asociační konstanta je rovnovážná konstanta popisující tvorbu komplexu AC z komplexující částice (analytu) A a komplexotvorného činidla (ligandu) C. V případě nejjednodušší stechiometrie A:C = 1:1, která je uvažována ve většině publikovaných prací, a za předpokladů¹¹, že A a C vstupují do reakce v jedné chemické formě a interagují pouze spolu navzájem bez dalších vedlejších reakcí, rovnováhu vystihuje rovnice



pro kterou je termodynamická konstanta stability vyjádřena jako

$$K = \frac{a_{AC}}{a_A a_C}. \quad (5)$$

Aktivity jednotlivých složek a_i korelují s jejich koncentrací v roztoku vztahem

$$a_i = \frac{c_i}{c^\circ} \gamma_i, \quad (6)$$

kde c_i je molární koncentrace i -tého iontu, c° standardní koncentrace 1 mol dm⁻³ (platí pro teplotu 25 °C). Hodnotu bezrozměrného aktivitního koeficientu γ_i je možno získat pomocí Debyeova-Hückelova rozšířeného vztahu^{11,12}, který lze pro vodné roztoky při teplotě 25 °C psát ve tvaru

$$-\log \gamma_i = \frac{Az_i^2 \sqrt{I}}{1 + Ba\sqrt{I}}, \quad (7)$$

kde z_i je nábojové číslo i -tého iontu, a parametr, představující nejkratší vzdálenost, na kterou se mohou přiblížit středy i -tého iontu a jeho protiiontu, A a B konstanty, které

pro vodné roztoky a teplotu 25 °C nabývají hodnot $A = 0,509 (\text{mol dm}^{-3})^{-1/2}$,
 $B = 3,291 \times 10^9 \text{ m}^{-1} (\text{mol dm}^{-3})^{-1/2}$ a I iontová síla roztoku definovaná vztahem

$$I = \frac{1}{2} \sum_j c_j z_j^2 . \quad (8)$$

Rovnice (7) představuje přibližný vztah, který je platný pouze pro nízké iontové síly (pro univalentní ionty do iontové síly přibližně 0,01 mol dm⁻³). V praxi se proto často používá zdánlivá konstanta stability K' , vyjádřená rovnovážnými molárními koncentracemi složek (mající tedy jednotku (mol dm⁻³)⁻¹)

$$K' = \frac{[\text{AC}]}{[\text{A}][\text{C}]}, \quad (9)$$

kteřá ovšem platí jen pro dané experimentální podmínky a její hodnota je závislá na teplotě a iontové síle roztoku.

Komplex neutrálního ligandu s nabitým analytem

Rovnováhu vzniku komplexu neutrálního ligandu s analytem nesoucím náboj z , můžeme popsat rovnicí



Pro tuto rovnováhu lze termodynamickou konstantu vyjádřit jako

$$K = \frac{[\text{AC}]c^\circ \gamma_{\text{AC}}}{[\text{A}][\text{C}] \gamma_{\text{A}} \gamma_{\text{C}}}. \quad (11)$$

Za předpokladu, že aktivní koeficient neutrální částice je jednotkový, platí

$$K = K' c^{\circ} \frac{\gamma_{AC}}{\gamma_A}. \quad (12)$$

Hodnoty aktivních koeficientů komplexu γ_{AC} a analytu γ_A se budou lišit pouze v důsledku rozdílné velikosti částic A a AC.

Komplex nabitého ligandu s neutrálním analytem

Druhou možností je interakce mezi ligandem s nábojem z a neutrálním analytem popsaná rovnicí



Analogicky jako v předchozím případě, lze termodynamickou konstantu vyjádřit ve tvaru

$$K = \frac{[AC] c^{\circ} \gamma_{AC}}{[A][C] \gamma_C}. \quad (14)$$

Za předpokladu, že komplex a ligand jsou přibližně stejně velké částice, lze číselnou hodnotu zdánlivé konstanty stability ztotožnit s hodnotou konstanty termodynamické. U inkluzních komplexů cyklodextrin-analyt lze očekávat, že bude tento předpoklad splněn.

2.2.1 Experimentální uspořádání a metody pro stanovení konstanty stability

Bylo popsáno několik variant kapilární elektroforézy vhodných pro stanovení konstant stability – afinitní kapilární elektroforéza (ACE), Hummelova-Dreyerova metoda (HD), vakantní afinitní kapilární elektroforéza (VACE), metoda vakantních píků (VP), frontální analýza (FA) a kontinuální frontální analýza v kapilární elektroforéze (FACCE). S výjimkou VACE byly tyto metody před aplikací do kapilární elektroforézy vyvinuty v HPLC (vysokoúčinné kapalinové chromatografii).

Metody se liší svým experimentálním uspořádáním a experimentální veličinou sloužící k určení konstanty stability. Jejich stručný přehled je uveden v tabulce (2.1). Vždy se provádí série měření, v níž se koncentrace jedné komponenty (např. komplexotvorného činidla) mění a koncentrace druhé komponenty (analytu) zůstává konstantní. K výpočtu se pak využívá závislosti buď elektroforetické mobility nebo koncentračního poměru volného a v komplexu vázaného analytu na příslušné proměnné koncentraci komplexotvorného činidla.⁴

TAB. 2.1

Metody CE a jejich experimentální uspořádání pro stanovení konstant stability⁴.

metoda	dávkový vzorek	základní elektrolyt	stanovení K
ACE	A	pufr + C	ze změny mobility A
ACE	C	pufr + A	ze změny mobility C
VACE	pufr	pufr + A + C	ze změny mobility A nebo C (vakantní pík)
HD	pufr + A (nebo C)	pufr + C (nebo A)	z plochy vakantního píku odpovídajícího [AC]
VP	pufr	pufr + A + C	z plochy vakantního píku odpovídajícího [A]
FA	pufr + A + C	pufr	z výšky plata odpovídajícího [A]
FACCE	pufr + A + C	pufr	z výšky plata odpovídajícího [A]

Pozn.: použité zkratky a symboly jsou uvedeny v textu.

Afinitní kapilární elektroforéza (ACE)

ACE je nejčastěji aplikovanou metodou, lze ji použít nejen ke stanovení konstant stability, ale i k separaci enantiomerů (jako selektory pro separaci se nejvíce používají cyklodextriny a jejich deriváty).⁴

V experimentálním uspořádání metody ACE je jedna komponenta přidávána do pufru v různé koncentraci a druhá komponenta je dávkována, přičemž koncentrace dávkované komponenty se nemění. Sleduje se mobilita dávkované komponenty, která je funkcí koncentrace komponenty v pufru.

Podle Rundletta a Armstronga⁵ je pro stanovení konstanty stability nutné, aby změna mobility dávkované látky byla způsobena pouze vazbou této látky na látku v pufru, tedy aby bylo možno stanovit konstantu stability, musí dávkovaná látka měnit svou mobilitu pouze v důsledku komplexace a ustanovení rovnováhy musí být rychlejší než čas potřebný pro separaci. Dávkovaná složka pak migruje efektivní mobilitou, která představuje vážený průměr mobilit volné složky a komplexu. Mobilita komplexu μ_{AC} často není známa ani měřitelná, proto bývá nahrazena maximální pozorovanou mobilitou dávkované komponenty za přítomnosti nejvyšší koncentrace komponenty v pufru. Konstanty stability nelze touto metodou stanovit, pokud je citlivost stanovení nízká v důsledku příliš velké odezvy základního elektrolytu, nebo pokud je změna mobility dávkované komponenty příliš malá po vytvoření komplexu.

ACE lze uspořádat dvěma způsoby. První spočívá v přidavku ligandu do pufru a dávkování analytu, druhá v přidavku analytu do pufru a dávkování ligandu. V případě, že ligand a komplex mají stejnou mobilitu, lze použít pouze první uspořádání, neboť v druhém uspořádání nebude pozorována změna v mobilitě ligandu po vzniku komplexu ligand-analyt.

2.2.2 Vyhodnocení experimentálních dat

Pro stanovení konstanty stability metodou ACE se využívá změny efektivní mobility analytu resp. ligandu, v závislosti na proměnné koncentraci ligandu resp. analytu. V dalším popisu je uvažován případ, kdy je sledována závislost efektivní mobility analytu na koncentraci ligandu. Při stechiometrii A:C = 1:1 lze efektivní mobilitu analytu $\mu_{A,eff}$ vyjádřit pro systém A s nábojem z a C bez náboje ve tvaru

$$\mu_{A,eff} = \frac{[A]}{[A] + [AC]} \mu_A + \frac{[AC]}{[A] + [AC]} \mu_{AC}, \quad (15)$$

kde μ_A vyjadřuje elektroforetickou mobilitu volného analytu, tj. mobilitu analytu za nepřítomnosti ligandu, a μ_{AC} elektroforetickou mobilitu komplexu. Pro systém A neutrální a C s nábojem z pro efektivní mobilitu analytu platí

$$\mu_{A,\text{eff}} = \frac{[AC]}{[A] + [AC]} \mu_{AC} \quad (16)$$

Kombinací těchto vztahů s výrazem pro zdánlivou konstantu stability (rovnice (9)) lze pro systém A s nábojem z a C bez náboje odvodit rovnici

$$\mu_{A,\text{eff}} = \frac{\mu_A + \mu_{AC} K' [C]}{1 + K' [C]}, \quad (17)$$

a pro systém A bez náboje a C s nábojem z z rovnici

$$\mu_{A,\text{eff}} = \frac{\mu_{AC} K' [C]}{1 + K' [C]}, \quad (18)$$

kteří jsou používány jako regresní funkce při vyhodnocování experimentálních dat metodou nelineární regrese, kdy se do grafu vynáší efektivní elektroforetické mobility analytu proti měnící se koncentraci ligandu v základním elektrolytu.

Rovnice (17) a (18) lze algebraickými úpravami převést na rovnice přímky a ty pak použít k lineární regresi odpovídajícím způsobem transformovaných experimentálních hodnot. Byly publikovány^{4,5,13,14} různé formy lineárních závislostí: metoda poměru rozdílů mobilit (tzv. mobility ratio difference method)⁵; dvojitá reciproční metoda (double reciprocal method), též nazývaná jako Bensiiova-Hildebrandova ve spektrofotometrii, nebo Lineweaverova-Burkova v enzymových studiích; y -reciproční metoda (y -reciprocal method) a x -reciproční závislost (x -reciprocal method), v enzymové kinetice nazývaná jako Eadieho závislost nebo v proteinových vazebných studiích jako Scatchardova analýza.

Bowser a kol.^{15,16} studovali pomocí počítačových simulací vliv použití lineárních metod při vyhodnocování naměřených dat na hodnotu stanovené konstanty. Ačkoliv

metody nelineární regrese a metody používající linearizaci vycházejí ze stejných vztahů, často dostali odlišné hodnoty konstant i intervalů spolehlivosti při vyhodnocování stejných počátečních dat. Linearizace nerespektuje některé předpoklady, které jsou brány v úvahu při nelineární regresi, zároveň transformuje chybu měření v nezávisle proměnnou, změnu rozdělení dat v negaussovské a přiřadí jinou váhu datům z určitých měření. Těmto problémům lze v některých případech předejít, pokud jsou data zkorigována pro danou transformaci. Vzhledem ke složitým komplexním regresním výpočtům je těžké zjistit analyticky, jakým způsobem se mění chyba při použití jednotlivých metod. Bylo prokázáno, že při použití metody nelineární regrese je minimalizována chyba i odchylka stanovených konstant, autoři^{15,16} proto doporučují metody nelineární regrese.

Rovněž Kermode¹⁷ zdůraznil, že aplikace lineární regrese na stanovení vazebných parametrů nemůže být přijímána jako vhodný kvantitativní přístup a též v práci Oravcové a kol.¹⁸ je upřednostňováno grafické vyhodnocení získaných nepřetransformovaných dat.

2.2.3 Faktory ovlivňující stanovení konstant stability

V rovnicích (17) a (18) lze K' interpretovat jako konstantu stability pouze v případě, že měřená efektivní mobilita analytu se mění s koncentrací ligandu pouze v důsledku tvorby komplexu. Tento předpoklad však ve většině případů není splněn.

Viskozita

Jako komplexační činidlo se velmi často používají velké organické molekuly či dokonce polymery. Jejich přidavek do BGE způsobí změnu viskozitního koeficientu prostředí, na kterém závisí jak elektroforetické mobility iontů (rovnice (3)), tak i elektroosmotická mobilita. S rostoucí koncentrací komplexačního činidla v BGE se pozorovaná mobilita analytu nemění tedy pouze v důsledku rostoucího stupně komplexace, ale také v důsledku rostoucího viskozitního koeficientu prostředí. Rovnice (17) a (18) proto nelze využít přímo k regresní analýze, neboť mobility komplexu

a analytu nejsou konstantami. Před vlastní regresní analýzou je třeba naměřené hodnoty korigovat i při malém přídávku komplexačního činidla do BGE.

Jako přímočará se jeví korekce elektroforetické mobility pomocí tzv. viskozitního korekčního faktoru ν ^{3,4, 14, 19, 20, 21}

$$\nu = \frac{\eta_c}{\eta}, \quad (19)$$

kde η je viskozitní koeficient BGE bez přidaného komplexačního činidla a η_c je viskozitní koeficient BGE s danou koncentrací komplexačního činidla. Tyto hodnoty lze získat externím měřením (např. Ulbelohdeovým viskozimetrem) nebo přímo v aparatuře pro CZE z časů potřebných k protlačení nadávkované zóny (např. markeru EOF) k detektoru konstantním tlakem v BGE bez přídávku komplexačního činidla a v BGE s danou koncentrací přidaného komplexačního činidla.^{14,22,23} Za předpokladu, že elektroforetická mobilita je nepřímo úměrná viskozitnímu koeficientu prostředí (rovnice (3)), platí

$$\frac{\mu}{\mu_c} = \frac{\eta_c}{\eta} = \frac{t_c}{t}, \quad (20)$$

kde μ , η , t jsou mobilita analytu, viskozitní koeficient BGE a čas nutný k protlačení nadávkované zóny k detektoru konstantním tlakem kapilárou naplněnou BGE bez přídávku komplexačního činidla a μ_c , η_c , t_c symbolizují totéž ovšem v kapiláře naplněné BGE s danou koncentrací komplexačního činidla. Tento předpoklad však obecně neplatí. Odpor pro pohyb iontů v roztoku sice vzrůstá, ovšem ne přímo úměrně viskozitě prostředí. Přímá úměra platí pouze v případě, že pohybující se částice je srovnatelně velká s částicí způsobující zvýšení viskozitního koeficientu.²⁴

Další používaný způsob, který nevyžaduje žádné další měření, využívá poměru mobilit M ^{4,25,26,27, 28}

$$M = \frac{\mu_{\text{app}}}{\mu_{\text{EOF}}} = \frac{\mu_{\text{eff}} + \mu_{\text{EOF}}}{\mu_{\text{EOF}}}, \quad (21)$$

ve kterém μ_{app} je pozorovaná mobilita analytu, μ_{eff} efektivní mobilita analytu a μ_{EOF} mobilita elektroosmotického toku. K této korekci postačí jen data z elektroforetického experimentu, ovšem lze ji využít pouze pokud má μ_{app} stejnou závislost na viskozitě jako μ_{EOF} a jejich poměr je na viskozitě nezávislý.

Někteří autoři navrhli určit změnu viskozity pomocí markeru elektroosmotického toku^{13,23} poměrem mobility EOF při nulové koncentraci komplexačního činidla ku mobilitě při dané koncentraci komplexačního činidla, který použili jako viskozitní korekční faktor (násobili jím efektivní mobilitu). Ovšem podle definice:

$$\mu_{\text{EOF}} = \frac{\varepsilon\zeta}{4\pi\eta}, \quad (22)$$

se mobilita EOF může změnit nejen v důsledku změny viskozity roztoku, ale i působením jiných faktorů (permitivity prostředí ε a zéta potenciálu na stěně kapiláry ζ). Pro použití μ_{EOF} ke korekci viskozity je nutné dokázat, že je změna mobility EOF ve stejném poměru se změnou viskozity.¹⁴

V některých publikacích se objevila korekce viskozity pomocí poměru proudu procházejícího kapilárou, která je naplněna pufrům bez přidaného komplexačního činidla (I) a proudu I_c , kdy je do pufru přidáno dané množství komplexačního činidla.^{23,29,30,31,32} Hodnota proudu je již přímo ovlivňována mobilitou iontů a to všech iontů přítomných v roztoku. Tato korekce tedy představuje jakési zprůměrování vlivu na mobilitu iontů. Nelze ovšem použít pro ionogenní komplexotvorná činidla přidávaná do BGE.

Shibukawa a kol.²³ stanovovali vliv viskozity prostředí na mobilitu iontů pomocí přímého měření viskozity, času potřebného k protlačení dávkované zóny konstantním tlakem, mobility markeru EOF, proudu a pomocí mobility nabitého markeru viskozity (kyseliny askorbové) v BGE bez přídavku a s přídavkem γ -cyklodextrinu. Závěrem jejich práce bylo konstatování, že ačkoliv se hodnoty korekčních faktorů získané z poměru časů potřebných k protlačení zóny kapilárou $\frac{t}{t_c}$ a poměrů mobilit EOF $\frac{\mu_{\text{EOF},c}}{\mu_{\text{EOF}}}$ shodují, vykazují při vyšších koncentracích cyklodextrinu pozitivní odchylku

od hodnot získaných z poměru proudů $\frac{I_c}{I}$. Autoři proto dávají přednost korekci iontové mobility pomocí poměru proudů nebo pomocí měření mobility viskozitního markeru (kyseliny askorbové).

Oproti tomu Bowser a kol.¹⁴ upřednostňují přímé měření viskozity a tvrdí, že po korekci pomocí mobility EOF markeru či pomocí proudu není možné porovnávat výsledky získané měřením za jiných podmínek (na jiné kapiláře nebo v jiném pufru).

Iontová síla

Na iontové síle jsou závislé zdánlivé konstanty stability a to především pro komplex neutrálního ligandu s nabitým analytem, viz. str. 18 a 19.

Iontová síla má však vliv i na elektroforetické mobility. Tato závislost je popsána Debyeovou-Hückelovou-Onsagerovou rovnicí (Onsagerův limitní zákon)³³. Pro aktuální mobilitu aniontu μ_- při dané iontové síle platí:

$$\mu_- = \mu_-^0 - \left(\mu_-^0 B_1 z_+ |z_-| \frac{q}{1 + \sqrt{q}} + |z_-| B_2 \right) \sqrt{I}, \quad (23)$$

kde μ_-^0 je limitní mobilita aniontu, z_- a z_+ jsou nábojová čísla aniontu a jeho protiontu a I je iontová síla. Konstanty B_1 a B_2 jsou definovány jako

$$B_1 = \frac{\sqrt{2}F^3}{12\pi N_A (\varepsilon RT)^{3/2}}, \quad (24)$$

$$B_2 = \frac{\sqrt{2}F^2}{6\pi N_A \eta (\varepsilon RT)^{1/2}}, \quad (25)$$

ve kterých F je Faradayova konstanta, N_A Avogardova konstanta, ε permitivita prostředí, η dynamický viskozitní koeficient prostředí, R univerzální plynová konstanta

a T termodynamická teplota. Parametr q lze vypočítat z nábojových čísel z_- a z_+ a limitních mobilit aniontu a kationtu μ_-^0 a μ_+^0 :

$$q = \frac{z_+ |z_-|}{z_+ + |z_-|} \frac{\mu_+^0 + \mu_-^0}{|z_-| \mu_+^0 + z_+ \mu_-^0}. \quad (26)$$

Při odvození Onsagerova limitního zákona nebyl uvažován vlastní objem iontů, lineární závislost aktuální mobility iontu na odmocnině z iontové síly je tedy platná pouze pro iontovou sílu do 1 mmol dm^{-3} . Ovšem v CZE se běžně používají pufrы s iontovou silou v rozmezí 10 až 100 mmol dm^{-3} . Zahrnutím parametru a do Onsagerova limitního zákona

$$\mu_- = \mu_-^0 - \left(\mu_-^0 B_1 z_+ |z_-| \frac{q}{1 + \sqrt{q}} + |z_-| B_2 \right) \frac{\sqrt{I}}{1 + Ba\sqrt{I}}, \quad (27)$$

byla rozšířena jeho platnost až do 75 mmol dm^{-3} iontové síly, ovšem pro univalentní elektrolyty.³⁴ Pro konstantu B platí:

$$B = \frac{\sqrt{2}F}{(\epsilon RT)^{1/2}}, \quad (28)$$

ostatní symboly jsou stejné jako v rovnicích (24) a (25). Pro vodné roztoky při teplotě $25 \text{ }^\circ\text{C}$ jsou hodnoty konstant: $B = 3,291 \times 10^9 \text{ m}^{-1} (\text{mol dm}^{-3})^{-1/2}$,

$$B_1 = 0,7853 (\text{mol dm}^{-3})^{-1/2},$$

$$B_2 = 31,42 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1} (\text{mol dm}^{-3})^{-1/2}.$$

Koncentrace ligandu

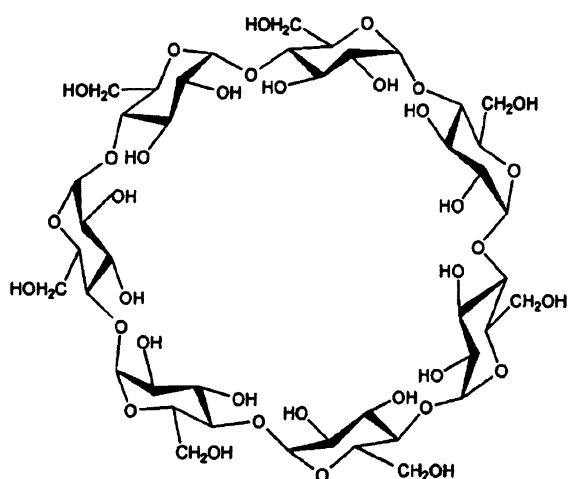
Rovnice (17) a (18) se používají jako regresní funkce k analýze experimentálních závislostí efektivních mobilit na celkové koncentraci komplexačního činidla v BGE. V těchto rovnicích však vystupuje rovnovážná koncentrace volného (v komplexu nevázaného) komplexačního činidla. Ztotožnění rovnovážné koncentrace volného činidla s koncentrací celkovou je dalším faktorem, který může ovlivnit hodnotu stanovované konstanty. Její hodnota není zdatelně ovlivněna, pokud je celková koncentrace ligandu mnohem větší než celková koncentrace analytu nebo pokud není hodnota konstanty stability příliš vysoká.³⁵ V ostatních případech je nutno koncentraci volného ligandu určit. Pro stechiometrii vazby 1:1 je možno postupovat iteračním způsobem³⁵. Použitím celkové koncentrace ligandu k vyhodnocení naměřených dat pomocí nelineární regrese lze získat odhad konstanty stability. Koncentraci volného ligandu lze poté vypočítat z regresní funkce (rovnice (17) a (18)) a získanou hodnotu znovu použít do nelineární regrese. Postup je opakován, dokud dochází ke změně konstanty stability.

2.3 Cyklodextriny

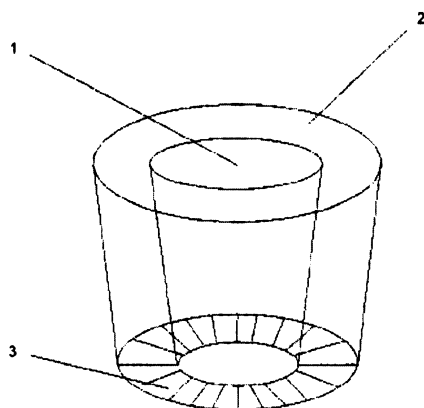
Cyklodextriny (CD) jsou používány v kosmetickém, farmaceutickém i chemickém průmyslu, jsou využívány jako selektory nejen v kapilární elektroforéze, ale i v dalších separačních metodách. Mají nízkou toxicitu, jsou vyráběny z obnovitelných zdrojů a jsou biologicky odbouratelné. Jedná se o oligosacharidy připravené enzymatickou degradací z bramborového škrobu (amylasy)³⁶. Vzniká směs CD, kterou lze rozdělit pomocí chromatografie nebo krystalizace.

Ve vodných roztocích připomínají CD tvarem dutý komolý kužel, jehož průměr a objem vnitřní kavity se liší dle typu CD (tabulka 2.2). Na vnějším širším okraji tohoto kužele se nachází sekundární 2- a 3-hydroxylové skupiny, užší okraj je obklopen primárními 6-hydroxyly. Vnější povrch kavity je proto hydrofilní a vnitřní hydrofóbní (lipofilní) z důvodu přítomnosti atomů vodíku a ethericky vázaných atomů kyslíku.

Ačkoliv byly připraveny nativní (přirozené cyklické) CD o šesti až dvanácti jednotkách glukosy, používají se v současné době CD s šesti, sedmi a osmi jednotkami nazývané α -, β - (obrázek 2.2) a γ -CD. Fyzikální vlastnosti (šířka kavity, rozpustnost, molekulová hmotnost) těchto tří CD jsou odlišné (tabulka 2.2).



a)



b)

OBR. 2.2³⁷

Struktura β -CD (a) a tvar jeho kavity ve vodném prostředí (b): 1 – vnitřek kavity zpevněný glykosidickými kyslíkovými můstky, s vysokou elektronovou hustotou, 2 – sekundární 2- a 3-hydroxylové skupiny a 3 – primární 6-hydroxyly.

TAB. 2.2

Fyzikální vlastnosti^{38,39} α -, β - a γ -CD.

	α -CD	β -CD	γ -CD
počet jednotek glukosy	6	7	8
relativní molekulová hmotnost	972	1135	1297
vnitřní průměr kavity [nm]	0,57	0,78	0,95
hloubka kavity [nm]	0,78	0,78	0,78
rozpustnost [g/ 100 ml vody]	14,2	1,85	23,2
pK _a	12,23	12,2	12,08
optická rotace α_D [°]	+150,5	+162,5	+177,4

CD vytváří intermolekulární komplexy s velkým množstvím látek anorganické i organické povahy, především byly popsány komplexy β -CD s řadou farmaceuticky významných látek.³⁸ Molekuly α -, β - a γ -CD mají ve své molekule 18, 21 a 24 hydroxylových skupin, a proto se může látka na molekulu CD navázat prostřednictvím vodíkových můstků, hydrofobních, dipól-dipól a van der Waalsových interakcí.³⁹

Substitucí nativních CD lze získat deriváty s různým stupněm substituce. Příprava čistých a definovaných derivátů je náročná, složení modifikovaných CD závisí na podmínkách reakce, typu a množství reagentu.³⁸ Chemickou modifikací CD dochází zároveň ke změně jejich fyzikálně-chemických vlastností, význam se především klade na zvýšení selektivity při separaci enantiomerů (např. zvýšením jejich rozpustnosti ve vodě, možnost tvorby různých sekundárních vazeb, možnost analýzy neutrálních látek nebo změna hydrofobity kavity).³⁸ Pro separace pomocí CE se používá široké spektrum derivátů CD. Mezi neutrálními lze jmenovat methyl-, hydroxyethyl-, hydroxypropyl- či acetyl-CD. K aniontovým derivátům patří methylamino-, sulfobutylether-, karboxymethyl-, sulfatované a fosfatované CD a mezi kationtové CD se řadí amino- a ammoniové deriváty, stejně jako CD obsahující imidazol či pyrimidin.

V CZE lze neutrální CD, ať nativní nebo jejich deriváty, použít výhradně k separaci nabitých látek. Oproti tomu nabitě CD mají svou vlastní elektroforetickou mobilitu a lze je tudíž použít i pro separaci látek neutrálních.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Záměrem experimentální části diplomové práce bylo určit vliv faktorů, především viskozity, iontové síly a ztotožnění koncentrace volného (v komplexu nevázaného) ligandu s jeho koncentrací celkovou, na stanovení konstanty stability komplexů s CD. Při použití neutrálního CD s nabitým analytem (α -CD s *p*-nitrofenolem) navázat na experimenty provedené v rámci bakalářské práce. Dále se zabývat složitějšími typy komplexů nabitých CD s neutrálním analytem (záporně nabitým heptakis-6-O-sulfo- β -CD s *p*-nitrofenolem a kladně nabitým mono (6-deoxy-6-N,N,N',N',N'-pentamethylethylendiammonium)- β -CD se sekundárním fenethylalkoholem).

Experimentální podmínky použité v bakalářské práci

Cílem bakalářské práce bylo zreprodukovat experimenty popsané v práci Armstronga a kol.¹³, kteří stanovovali (mimo jiné) konstanty stability *p*-nitrofenolu a *m*-nitrofenolu s α -CD metodou ACE. Analýzy prováděli v 50 mM fosfátovém pufru o pH 11 s proměnnou koncentrací α -CD 0-15 mmol dm⁻³. V bakalářské práci byl použit pufr obsahující Na₂HPO₄ o koncentraci 45 mmol dm⁻³ a Na₃PO₄ 5 mmol dm⁻³ o pH 10,7 a iontové síle 162 mmol dm⁻³, ke kterému byl přidáván α -CD o koncentracích 0, 2, 3, 6, 9, 12, 15 a 20 mmol dm⁻³. Dávkovaný vzorek se skládal z *p*- nebo *m*-nitrofenolu o koncentraci 0,5 mmol dm⁻³, 0,2% DMSO (dimethylsulfoxidu), KCl o koncentraci 2,5 mmol dm⁻³ a fosfátového pufru a byl dávkován hydrodynamicky tlakem 15 mbar po dobu 15 sekund. Na kapiláru bylo vkládáno napětí 8 kV. Procházející proud byl přibližně 43 μ A. Ze získaných hodnot efektivních mobilit pro dané koncentrace CD byly stanoveny konstanty stability pro *p*- i *m*-nitrofenol pomocí lineárních metod i nelineární regrese.

3.1 Použité přístroje a chemikálie

K přípravě separačních pufrů byla použita kyselina boritá H_3BO_3 (Lachema, ČR), kyselina octová CH_3COOH (Lachema, ČR), kyselina mravenčí HCOOH (Lachema, ČR) a hydroxid litný LiOH (Sigma-Aldrich, Německo). K určení pohyblivosti EOF sloužil dimethylsulfoxid DMSO (Sigma-Aldrich, Německo) nebo nitrometan (Sigma-Aldrich, Německo). Analytem byl *p*-nitrofenol (Lachema, ČR) nebo *R*-sekundární fenethylalkohol (Acros Organics, Belgie), komplexotvorným činidlem α -CD (Biochemical Research Laboratory, Budapešť), HS- β -CD (syntetizovaný Vincentem a kol.⁴⁰) a PEMEDA- β -CD (syntetizovaný Nzeadibem a Vighem⁴¹). Všechny komerční chemikálie byly čistoty p.a. K přípravě roztoků byla použita deionizovaná voda. K proplachování kapiláry byl používán 0,1 M roztok NaOH (Agilent Technologies, Německo) a pro kalibraci pH-metru IUPAC pufrů o hodnotách 1,679, 7,00 a 12,45 (Radiometer, Dánsko).

Elektroforetické experimenty byly realizovány na ^{3D}CE systému pro kapilární elektroforézu (Agilent Technologies, Německo), který je vybaven vestavěným spektrofotometrickým UV/VIS detektorem s diodovým polem (DAD), umožňujícím měření v rozsahu vlnových délek 190 – 600 nm, a dvojitým bezkontaktním vodivostním detektorem (CCD, contactless conductivity detector), jehož měrné cely jsou od sebe vzdáleny 1,479 cm⁴². Součástí aparatury je počítač s nainstalovaným programem Agilent Capillary Electrophoresis, pomocí kterého je řízena aparatura, prováděn sběr a vyhodnocování dat. Experimenty probíhaly v křemenných kapilárách s vnějším průměrem 375 μm a s vnitřním průměrem 50 μm (Polymicroservices technologies, Velká Británie) o celkové délce přibližně 60 cm (konkrétní údaje jsou uvedeny u příslušných obrázků a tabulek).

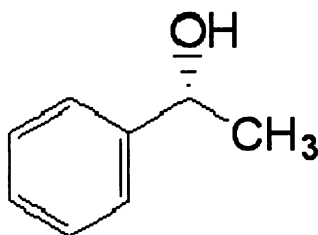
Hodnoty pH pufrů byly měřeny digitálním pH-metrem PHM 220 s kombinovanou skleněnou elektrodou (Radiometer, Dánsko).

Naměřená data byla zpracovávána pomocí programu MS Excel 2003 a grafy závislostí byly sestrojeny a analyzovány verzí 8 programu Origin z roku 2008.

3.2 Experimentální podmínky a postupy

Komplex neutrálního CD s nabitým analytem byl zastoupen α -CD s *p*-nitrofenolem (*p*-NP), kterým jsem se zabývala v bakalářské práci. Aby byl *p*-NP prakticky úplně disociován je nutné zvolit pH základního elektrolytu alespoň o tři jednotky vyšší než je jeho hodnota pK_a (jedná se o slabou kyselinu o pK_a 7,15).

Ke studiu komplexu nabitého CD s neutrálním analytem byl použit záporně nabitý HS- β -CD s *p*-NP a kladně nabitý PEMEDA- β -CD se sekundárním fenethylalkoholem (obrázek 3.1), pH základního elektrolytu bylo zvoleno v tomto případě alespoň o tři jednotky nižší než je pK_a analytů (i sekundární fenethylalkohol je slabou kyselinou), aby byla zajištěna jejich neutralita.



OBR. 3.1

Struktura R-sekundárního fenethylalkoholu.⁴³

Přesné složení, pH a iontová síla BGE (určeno pomocí programu PeakMaster⁴⁴) pro jednotlivé typy komplexů, složení dávkovaných vzorků a koncentrační rozmezí CD přidávaného do BGE je uvedeno v tabulce 3.1.

Roztoky BGE s CD byly připraveny rozpuštěním příslušného množství CD a přefiltrovány přes mikrofiltr (Merck, Německo) o průměru pórů 0,45 μ m.

Nové kapiláry byly před prvním použitím propláchnuty 0,1 M NaOH a bylo na ně vloženo napětí 15 kV na dobu 30 min pro stabilizaci elektroosmotického toku.

Dávkování vzorku bylo hydrodynamické tlakem 10 mbar po dobu 6 sekund.

Při volbě napětí bylo bráno v úvahu Jouleovo teplo a délka experimentu. Za optimální bylo zvoleno napětí 10 kV, při kterém ještě nedocházelo k významné změně odporu separačního pufru s teplotou. Procházející proud se pohyboval kolem

7 μA v BGE s $\alpha\text{-CD}$, v BGE s nabitými CD rostl se zvyšující se koncentrací CD (u HS- $\beta\text{-CD}$ od 4 do 60 μA a u PEMEDA- $\beta\text{-CD}$ od 1,7 do 11 μA).

Pro každou koncentraci CD byly získány alespoň tři vyhodnotitelné experimenty. Z elektroferogramů (příklad na obrázku 3.2) byly odečteny hodnoty detekčních časů píků jednotlivých složek vzorku zaznamenaných na DAD (DMSO, nitrometan a sekundární fenethylalkohol při 214 nm, neutrální $p\text{-NP}$ při 400 nm a nabitý $p\text{-NP}$ při 320 nm).

Pozorované mobility $\mu_{i,\text{app,DAD}}$ jednotlivých složek (u DMSO se jedná o pohyblivost elektroosmotického toku) byly vypočteny ze vztahu

$$\mu_{i,\text{app,DAD}} = \frac{l_{\text{DAD}} l_{\text{celk}}}{t_{i,\text{DAD}} U}, \quad (29)$$

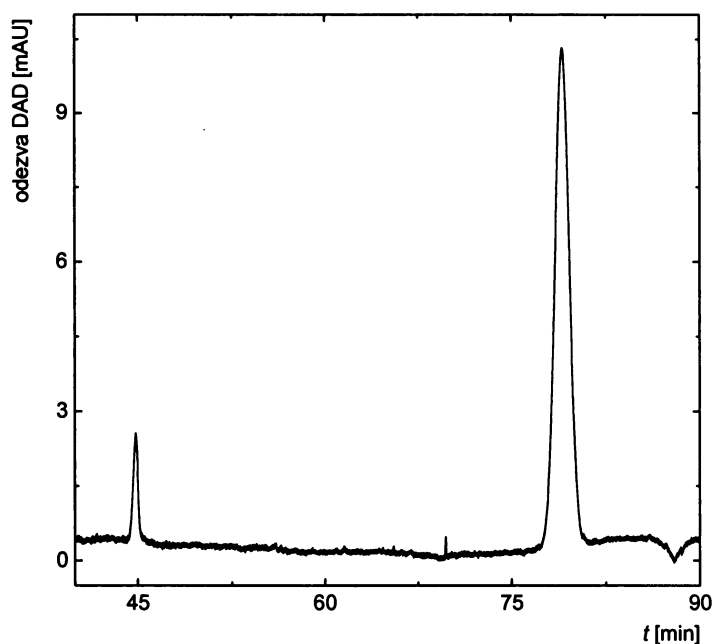
kde l_{celk} je celková délka kapiláry, U napětí vkládané na kapiláru, l_{DAD} značí vzdálenost DAD od vstupního konce kapiláry a $t_{i,\text{DAD}}$ je detekční čas i -té složky zaznamenané DAD.

Elektroforetické mobility (aktuální při nulové koncentraci CD, efektivní při nenulové koncentraci CD) byly vypočteny jako rozdíl pozorovaných mobilit a mobility EOF. Jak bylo uvedeno v teoretické části, mobilita kationtů je v této práci uvažována jako kladná veličina, aniontů záporná. V křemenné kapiláře s nemodifikovaným vnitřním povrchem probíhá EOF směrem ke katodě, je tedy jeho mobilita brána také s kladnou hodnotou. Při uspořádání experimentů s detektorem u katody má též pozorovaná mobilita jak kladně, tak záporně nabitých částic kladnou hodnotu.

U experimentů (platí pro BGE s HS- $\beta\text{-CD}$ a pro BGE s vyšší koncentrací PEMEDA- $\beta\text{-CD}$), které probíhaly metodou PreMCE¹⁰ (příklad elektroferogramu na obrázku 3.3), byly efektivní mobility μ_{eff} jednotlivých složek vypočteny ze vztahu

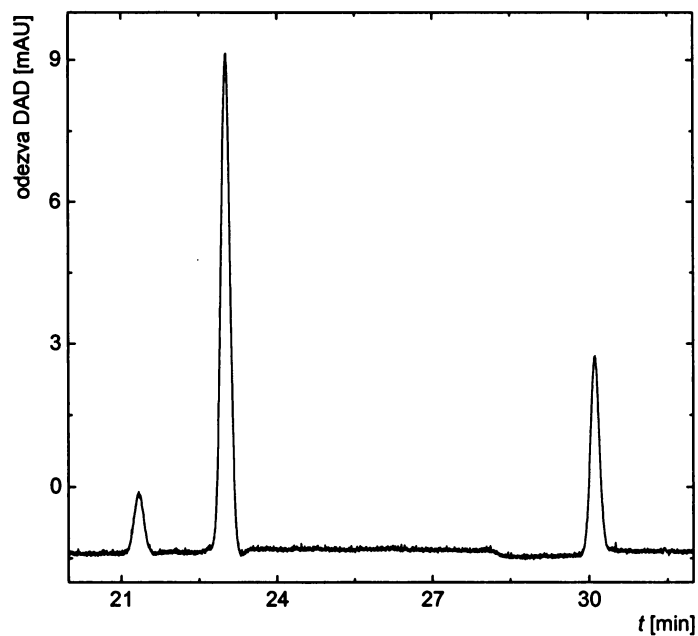
$$\mu_{\text{eff}} = \frac{l_{\text{celk}} l_{\text{DAD}} \Delta t}{U t_2 t_3}, \quad (30)$$

kde l_{celk} je celková délka kapiláry, U napětí vkládané na kapiláru, l_{DAD} značí vzdálenost DAD od vstupního konce kapiláry, Δt rozdíl detekčních časů analytu a markeru EOF, t_2 čas, po který je vloženo napětí a t_3 čas potřebný k protlačení druhé nadávkované zóny markeru EOF tlakem 30 mbar k DAD.



OBR. 3.2

Elektroferogram pořízený DAD při 214 nm pro koncentraci PEMEDA- β -CD 8 mmol dm^{-3} v základním elektrolytu (52 mmol dm^{-3} CH_3COOH a 26 mmol dm^{-3} LiOH , pH 4,6, konstantní iontová síla 50 mmol dm^{-3}). Dávkován byl sekundární fenethylalkohol o koncentraci $0,5 \text{ mmol dm}^{-3}$ a 0,2% DMSO tlakem 10 mbar po dobu 6 sekund. Na kapiláru s vnitřním průměrem $50 \mu\text{m}$ o celkové délce 58,85 cm bylo vkládáno napětí 10 kV, procházející proud se pohyboval kolem $11 \mu\text{A}$. První pík odpovídá sekundárnímu fenethylalkoholu, druhý markeru elektroosmotického toku DMSO.



OBR. 3.3

Elektroferogram pořízený DAD při 214 nm pro koncentraci PEMEDA- β -CD 12 mmol dm⁻³ v základním elektrolytu (28 mmol dm⁻³ CH₃COOH a 14 mmol dm⁻³ LiOH, pH 4,6, konstantní iontová síla 50 mmol dm⁻³). Dávkován byl sekundární fenethylalkohol o koncentraci 0,5 mmol dm⁻³ a 0,2% DMSO tlakem 10 mbar po dobu 6 sekund. Na kapiláru s vnitřním průměrem 50 μ m o celkové délce 58,85 cm bylo vkládáno napětí 10 kV, procházející proud se pohyboval kolem 11 μ A. Experiment byl proveden metodou PreMCE¹⁰. První pík odpovídá sekundárnímu fenethylalkoholu, druhý markeru elektroosmotického toku DMSO a třetí opět DMSO.

TAB.3.1

Tabulka se složením, pH a iontovou silou BGE, koncentračním rozmezím CD přidávaného do BGE a složením dávkovaného vzorku pro jednotlivé typy komplexů.

BGE						
systém	složení	pH	I [mmol dm ⁻³]	C_{CD} [mmol dm ⁻³]	složení vzorku	
α -CD	45 mmol dm ⁻³ Na ₂ HPO ₄ a 5 mmol dm ⁻³ Na ₃ PO ₄	10,7	162	0 – 20	0,5 mmol dm ⁻³ <i>p</i> -NP, 0,2% DMSO	
+	0,3 mmol dm ⁻³ H ₃ BO ₃ a 10 mmol dm ⁻³ LiOH	11,9	10	0 – 20	0,2 mmol dm ⁻³ <i>p</i> -NP, 0,2% DMSO	
<i>p</i> -NP	15 mmol dm ⁻³ H ₃ BO ₃ a 23,5 mmol dm ⁻³ LiOH	11,7	25	0 – 20	0,2 mmol dm ⁻³ <i>p</i> -NP, 0,2% DMSO	
PEMEDA- β -CD	100 mmol dm ⁻³ CH ₃ COOH – 10 mmol dm ⁻³ CH ₃ COOH	4,6	50	0 – 15	0,5 mmol dm ⁻³ sec-fenethylalkohol, 0,2% DMSO	
+	a 50 mmol dm ⁻³ LiOH – a 5 mmol dm ⁻³ LiOH					
sec-fenethylalkohol	10 mmol dm ⁻³ CH ₃ COOH a 5 mmol dm ⁻³ LiOH	4,7	5 – 50	0 – 15	0,5 mmol dm ⁻³ sec-fenethylalkohol, 0,2% DMSO	
HS- β -CD						
+	8,5 mmol dm ⁻³ HCOOH a 5 mmol dm ⁻³ LiOH	3,91	5 – 565	0 – 20	0,5 mmol dm ⁻³ <i>p</i> -NP, 0,01% nitromethan	
<i>p</i> -NP						

Pozn.: k výpočtu iontové síly BGE, ke kterému byl přidáván nabitý CD je použit předpoklad, že CD přispívá k iontové síle všemi svými náboji (HS- β -CD tedy sedmi a PEMEDA- β -CD dvěma).

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Komplex α -cyklodextrinu s *p*-nitrofenolem

Interakce α -CD s *p*-NP byla studována ve třech základních elektrolytech s různou iontovou silou, ke kterým byl přidáván α -CD v rozsahu koncentrací 0 – 20 mmol dm⁻³.

V tabulkách 4.1 a 4.2 jsou shrnuty detekční časy a vypočtené mobility pro BGE s iontovou silou 10 a 25 mmol dm⁻³, hodnoty pro BGE s iontovou silou 162 mmol dm⁻³ jsou obsaženy v bakalářské práci.

Absolutní hodnoty efektivní mobility analytu byly vyneseny do grafu v závislosti na analytické koncentraci α -CD (obrázky 4.1 až 4.3) a body byly proloženy křivkou odpovídající rovnici (17) na str. 22.

Jak je z obrázků patrné, teoretická funkce fituje experimentální data velmi dobře. Veličinu K' v použité regresní funkci však nelze považovat za konstantu stability, rovněž μ_{AC} a μ_A za aktuální mobility komplexu a analytu. Efektivní mobilita *p*-NP v těchto systémech není totiž ovlivňována pouze stupněm komplexace, ale též rostoucí viskozitou roztoku způsobenou rostoucí koncentrací α -CD.

TAB. 4.1

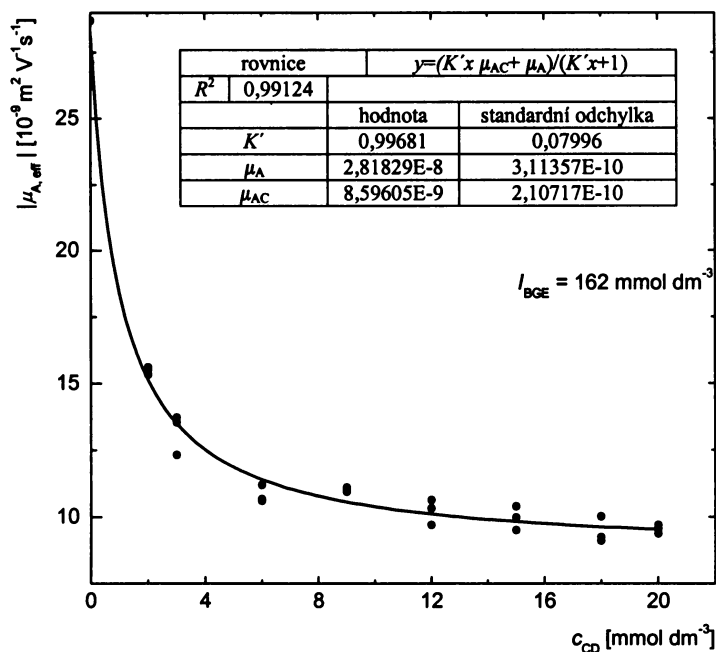
Tabulka naměřených detekčních časů z DAD, pozorované mobility EOF a vypočtených efektivních mobilit pro *p*-NP pro různé koncentrace α -CD (c_{CD}) v základním elektrolytu. BGE obsahoval H_3BO_3 o koncentraci $0,3 \text{ mmol dm}^{-3}$ a $LiOH$ 10 mmol dm^{-3} . Iontová síla BGE činila 10 mmol dm^{-3} a pH 11,90. Dávkován byl *p*-NP o koncentraci $0,2 \text{ mmol dm}^{-3}$ a 0,2% DMSO hydrodynamicky tlakem 10 mbar po dobu 6 sekund na kapiláru s vnitřním průměrem $50 \mu\text{m}$ o celkové délce 60,6 cm. Při vloženém napětí 10 kV se procházející proud pohyboval kolem $7 \mu\text{A}$.

c_{CD} [mmol dm^{-3}]	t [min]		μ [$10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$]	
	EOF	<i>p</i> -NP	EOF	<i>p</i> -NP
0	6,30	10,72	78,4	-32,3
0	6,27	10,55	78,8	-32,0
0	6,16	10,22	80,2	-31,8
0,5	6,12	8,74	80,7	-24,2
0,5	6,42	9,25	76,9	-23,5
0,5	6,19	8,82	79,8	-23,8
1	6,04	8,00	81,8	-20,0
1	6,08	7,98	81,2	-19,3
1	6,24	8,28	79,1	-19,5
2	5,92	7,39	83,4	-16,6
2	6,18	7,79	79,9	-16,5
2	6,04	7,53	81,8	-16,2
3	6,00	7,42	82,3	-15,8
3	6,33	7,91	78,0	-15,6
3	6,11	7,57	80,8	-15,6
4	6,15	7,57	80,3	-15,1
4	6,28	7,70	78,6	-14,5
4	6,15	7,57	80,3	-15,1
5	6,10	7,40	81,0	-14,2
5	6,62	8,33	74,6	-15,3
5	6,16	7,62	80,2	-15,4
6	6,07	7,38	81,4	-14,4
6	6,06	7,35	81,5	-14,3
6	6,02	7,30	82,0	-14,4
9	6,15	7,43	80,3	-13,8
9	6,28	7,61	78,6	-13,7
9	6,32	7,66	78,1	-13,7
12	6,42	7,74	76,9	-13,1
12	6,39	7,69	77,3	-13,1
12	6,42	7,73	76,9	-13,0
15	6,43	7,66	76,8	-12,3
15	6,29	7,48	78,5	-12,5
15	6,39	7,62	77,3	-12,5
18	6,30	7,52	78,4	-12,7
18	6,34	7,56	77,9	-12,6
18	6,32	7,54	78,1	-12,6
20	6,36	7,52	77,6	-12,0
20	6,33	7,49	78,0	-12,1
20	6,31	7,45	78,3	-12,0

TAB. 4.2

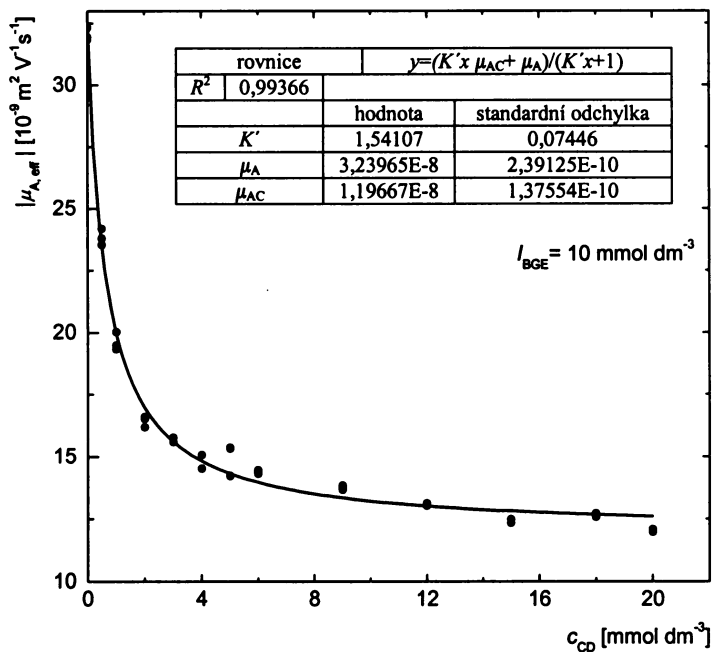
Tabulka naměřených detekčních časů z DAD, pozorované mobility EOF a vypočtených efektivních mobilit pro *p*-NP pro různé koncentrace α -CD (c_{CD}) v základním elektrolytu. BGE obsahoval H_3BO_3 o koncentraci 15 mmol dm^{-3} a $LiOH$ $23,5 \text{ mmol dm}^{-3}$. Iontová síla činila 25 mmol dm^{-3} a pH 11,70. Dávkován byl *p*-NP o koncentraci $0,2 \text{ mmol dm}^{-3}$ a 0,2% DMSO tlakem 10 mbar po dobu 6 sekund. Na kapiláru s vnitřním průměrem $50 \mu\text{m}$ o celkové délce 61 cm bylo vkládáno napětí 10 kV, procházející proud byl přibližně $7 \mu\text{A}$.

c_{CD} [mmol dm ⁻³]	t [min]		μ [10 ⁻⁹ m ² V ⁻¹ s ⁻¹]	
	EOF	<i>p</i> -NP	EOF	<i>p</i> -NP
0	8,10	15,70	65,9	-31,9
0	8,01	15,47	66,6	-32,1
0	8,10	15,92	65,9	-32,4
0,5	8,21	12,84	65,0	-23,4
0,5	8,67	14,26	61,6	-24,1
0,5	8,58	13,78	62,2	-23,5
1	8,57	12,78	62,3	-20,5
1	8,59	12,82	62,1	-20,5
1	8,60	12,58	62,1	-19,6
2	8,24	11,09	64,8	-16,6
2	8,60	11,82	62,1	-16,9
2	8,66	11,88	61,6	-16,7
3	8,61	11,46	62,0	-15,4
3	8,54	11,36	62,5	-15,5
3	8,53	11,30	62,6	-15,3
4	8,15	10,43	65,5	-14,3
4	8,14	10,38	65,6	-14,2
4	8,12	10,36	65,7	-14,2
6	8,26	10,38	64,6	-13,2
6	8,15	10,17	65,5	-13,0
6	8,15	10,14	65,5	-12,9
9	8,29	10,27	64,4	-12,4
9	8,92	11,24	59,8	-12,4
9	8,91	11,26	59,9	-12,5
12	8,69	10,80	61,4	-12,0
12	8,54	10,57	62,5	-12,0
12	8,40	10,34	63,5	-11,9
15	8,64	10,71	61,8	-11,9
15	8,35	10,20	63,9	-11,6
15	8,26	10,00	64,6	-11,2
18	8,77	10,83	60,9	-11,6
18	8,83	10,92	60,4	-11,6
18	9,12	11,31	58,5	-11,3
20	9,00	11,11	59,3	-11,3
20	9,07	11,22	58,8	-11,3
20	8,97	11,04	59,5	-11,2



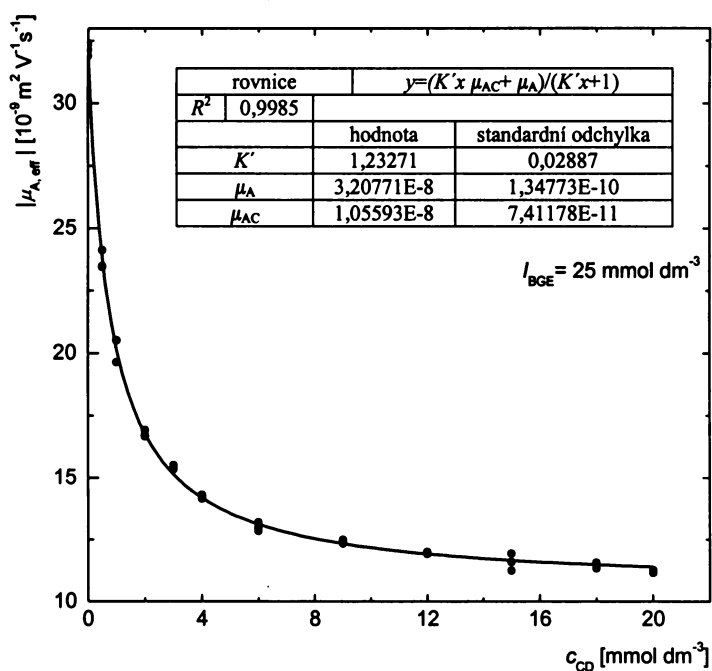
OBR. 4.1

Vyhodnocení naměřených dat z bakalářské práce metodou nelineární regrese, tedy závislost absolutní hodnoty efektivní mobility *p*-NP $|\mu_{A,eff}|$ na celkové koncentraci α -CD (c_{CD}). Naměřeno v základním elektrolytu složeném z Na_2HPO_4 o koncentraci 45 mmol dm^{-3} a Na_3PO_4 5 mmol dm^{-3} , ke kterému byl přidáván α -CD o koncentracích 0, 2, 3, 6, 9, 12, 15 a 20 mmol dm^{-3} . Hodnota pH činila 10,7 a iontové síly 162 mmol dm^{-3} . Vzorek skládající se z *p*-NP o koncentraci $0,5 \text{ mmol dm}^{-3}$ a 0,2% DMSO, byl dávkován hydrodynamicky tlakem 15 mbar po dobu 15 sekund. Na kapiláru s vnitřním průměrem $50 \mu\text{m}$ o celkové délce 33,6 cm bylo vkládáno napětí 8 kV. Procházející proud byl přibližně $43 \mu\text{A}$.



OBR. 4.2

Závislost absolutní hodnoty efektivní mobility *p*-NP $|\mu_{A,eff}|$ na celkové koncentraci α -CD (c_{CD}). Podmínky měření jsou popsány u tabulky 4.1.



OBR. 4.3

Závislost absolutní hodnoty efektivní mobility *p*-NP $|\mu_{A,eff}|$ na celkové koncentraci α -CD (c_{CD}). Podmínky měření jsou popsány u tabulky 4.2.

Viskozita

Přidáváním α -CD do základního elektrolytu se mění viskozitní koeficient roztoku, který ovlivňuje elektroforetické i elektroosmotické mobility látek a tím i konstantu stability, jak je podrobněji popsáno v teoretické části. Pro určení nejlepšího způsobu korekce bylo vyzkoušeno několik metod.

První byla korekce pomocí draselných iontů dávkovaných se vzorkem, jejichž mobilita byla sledována. Draselné ionty sice splňují předpoklad, že neinteragují s CD, ovšem jejich mobility nejevily významný trend s rostoucí koncentrací přidávaného CD pravděpodobně proto, že jsou příliš malé ve srovnání s molekulou CD.

Dalším způsobem korekce byl poměr proudu (I_c), kdy je do pufru přidáno dané množství CD a proudu (I) procházejícího kapilárou naplněnou puftrem bez přidaného CD. Závislost tohoto poměru proudů na koncentraci α -CD pro BGE o iontové síle 25 mmol dm^{-3} je znázorněna na obrázku 4.4. Každý bod představuje aritmetický průměr proudu ze tří měření. Pokles proudu I_c pro koncentraci α -CD 20 mmol dm^{-3} je přibližně 25% oproti hodnotě I . Ve srovnání s literaturou²³ je to hodnota příliš vysoká. Pro zajímavost byl vyhodnocen i poměr proudů pro BGE o iontové síle 162 mmol dm^{-3} . Zde byl pokles proudu srovnatelný s literárními údaji. Při nízké iontové síle BGE je tedy proud ovlivňován ještě jiným efektem, než pouze rostoucí viskozitou. Poměr proudů proto nebyl ke korekci mobilit na rostoucí viskozitu použit.

Posledním způsobem byla korekce pomocí poměru času, který je nutný k protlačení nadávkovaného markeru EOF konstantním tlakem kapilárou naplněnou puftrem bez přídavku CD (t) a puftrem s danou koncentrací přidaného CD (t_c). Tento poměr časů byl vynesena v závislosti na koncentraci α -CD v základním elektrolytu (obrázek 4.5). Experimentální body (aritmetické průměry ze tří měření) byly proloženy přímkou, jejíž rovnice byla využita k dalšímu vyhodnocení. Za předpokladu (viz. rovnice (20), str. 24), že

$$\frac{\mu}{\mu_c} = \frac{t_c}{t}, \quad (31)$$

lze pohyblivosti komplexu a analytu v rovnici (17) na str. 22 vyjádřit jako

$$\mu_{AC,c} = \mu_{AC} \frac{t}{t_c}, \quad \mu_{A,c} = \mu_A \frac{t}{t_c}, \quad (32)$$

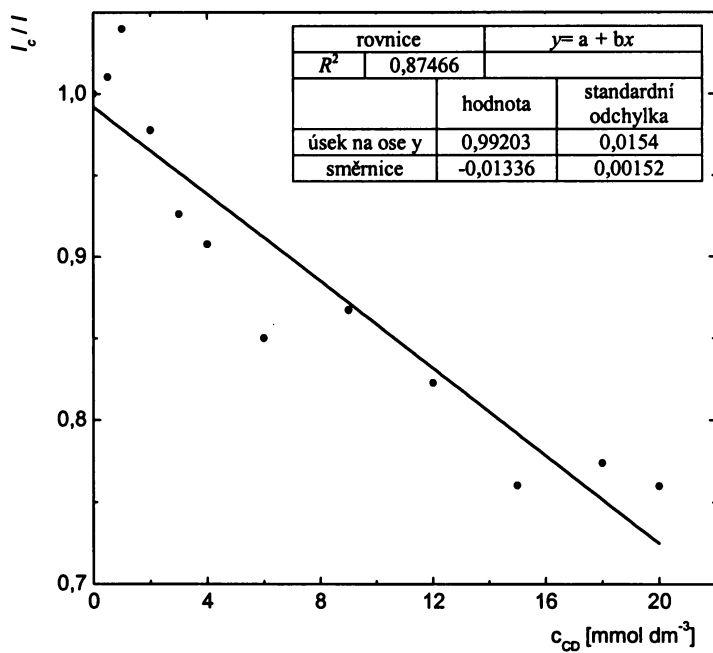
a tedy efektivní mobilitu korigovat na rostoucí viskozitu prostředí podle vztahu

$$|\mu_{A, \text{eff, cor}}| = \frac{|\mu_{A, \text{eff}}|}{\frac{t}{t_c}}. \quad (33)$$

Konkrétně $|\mu_{A, \text{eff, cor}}|$ byla pro jednotlivé hodnoty koncentrace α -CD vypočtena jako

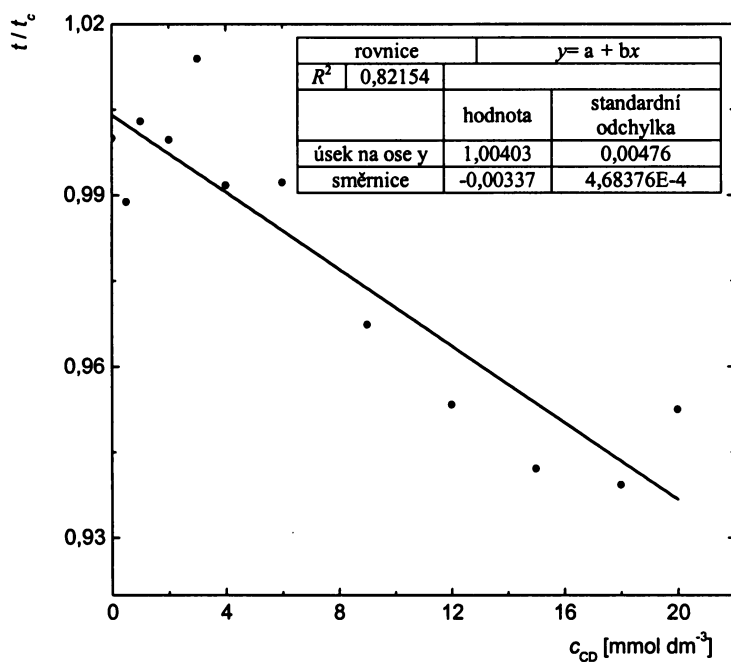
$$|\mu_{A, \text{eff, cor}}| = \frac{|\mu_{A, \text{eff}}|}{1,004 - 0,0034c_{\text{CD}}}, \quad (34)$$

kde jmenovatel je rovnicí přímky z obrázku 4.5 (závislosti poměru časů $\frac{t}{t_c}$ na celkové koncentraci CD). Tato korekce mobilit byla využita ve všech systémech pro stanovení konstanty stability komplexu α -CD s *p*-NP. Jako příklad je uvedeno vyhodnocení nelineární regrese s absolutními hodnotami efektivních mobilit *p*-NP korigovanými na změny viskozitního koeficientu v pufru s iontovou silou 25 mmol dm⁻³ na obrázku 4.6, stejným způsobem byly korigovány mobility i v ostatních dvou systémech.



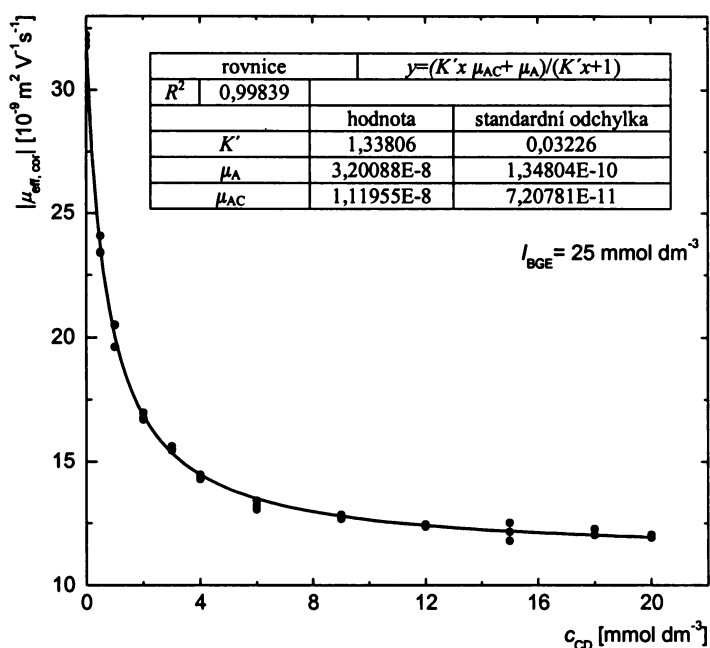
OBR. 4.4

Závislost poměru proudu procházejícího kapilárou naplněnou BGE s danou koncentrací α -CD (I_c) a proudu procházejícího kapilárou naplněnou BGE bez α -CD (I) na celkové koncentraci přidaného α -CD (c_{CD}). Podmínky měření jsou popsány u tabulky 4.2.



OBR. 4.5

Závislost poměru času (t) potřebného k protlačení nadávkovaného 0,2% DMSO kapilárou naplněnou základním elektrolytem (pufr s iontovou silou 25 mmol dm⁻³) a času (t_c) potřebného k protlačení nadávkovaného 0,2% DMSO kapilárou naplněnou základním elektrolytem s danou koncentrací CD tlakem 40 mbar, na koncentraci přidaného CD (c_{CD}). Měřeno na kapiláře o celkové délce 61 cm s vnitřním průměrem 50 μ m.



OBR. 4.6

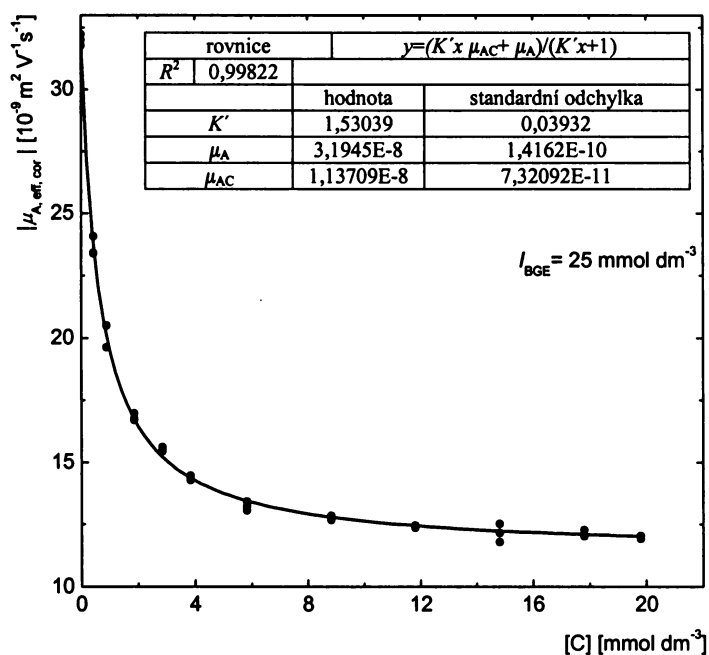
Závislost absolutních hodnot efektivních mobilit *p*-NP $|\mu_{A,\text{eff,cor}}|$ korigovaných na změny viskozity s rostoucí koncentrací CD, na celkové koncentraci α -CD (c_{CD}). Podmínky měření jsou popsány u tabulky 4.2.

Koncentrace ligandu

Ve všech předchozích případech byla pro regresi experimentálních závislostí efektivní mobility analytu na celkové koncentraci CD v základním elektrolytu použita rovnice (17) na str. 22, ve které vystupuje rovnovážná koncentrace volného CD. Byl tedy použit předpoklad, že koncentrace volného CD [C] je totožná s jeho koncentrací celkovou c_{CD} . Hodnota konstanty stability pro tento typ komplexu je poměrně vysoká, a proto není tento předpoklad správný. Dosud stanovené hodnoty zdánlivých konstant stability K' ze závislostí korigované efektivní mobility *p*-NP na změny viskozity prostředí způsobené přidáváním CD do základního elektrolytu byly použity jako odhad konstanty pro výpočet koncentrace volného CD [C] následujícím způsobem. Zdánlivá konstanta stability byla vyjádřena pomocí analytické koncentrace CD (c_{CD}) a analytické koncentrace dávkovaného analytu (c_A) ve tvaru:

$$K' = \frac{[AC]}{[A][C]} = \frac{c_{CD} - [C]}{(c_A - c_{CD} + [C])[C]} \quad (35)$$

Pro jednotlivé analytické koncentrace CD byly z tohoto vztahu vypočteny rovnovážné koncentrace volného CD [C], které byly použity k nelineární regresi (hodnoty c_{CD} tedy byly nahrazeny vypočtenými hodnotami [C]). Tento postup byl opakován, dokud se výrazně měnily hodnoty [C] a K' . Po třetím iteračním kroku již byla odchylka K' oproti předchozí hodnotě zanedbatelná. Výsledná závislost absolutních hodnot efektivní mobility p -NP korigované na změny viskozitního koeficientu BGE na rovnovážné koncentraci volného CD je znázorněna na obrázku 4.7.



OBR. 4.7

Závislost absolutní hodnoty efektivních mobilit p -NP $|\mu_{A,eff,cor}|$ korigovaných na změny viskozity s rostoucí koncentrací CD, na koncentraci volného α -CD ([C]). Podmínky měření jsou popsány u tabulky 4.2.

Iontová síla

Zdánlivé konstanty stability komplexu α -CD s p -NP byly stanoveny ve třech základních elektrolytech o různé iontové síle. Jak je patrné z tabulky 4.3 tyto hodnoty se výrazně liší. Zdánlivé konstanty stability pro tento typ komplexu na iontové síle závisí, byly proto přepočteny na konstanty termodynamické (rovnice (12), str. 19).

Pro získání termodynamické konstanty stability je nutno uvažovat aktivitní koeficienty složek účastnících se rovnováhy. Aktivitní koeficienty neutrálních látek jsou považovány za jednotkové, a proto u komplexu neutrálního CD s nabitým analytem je γ_c roven jedné. Aktivitní koeficienty analytu a komplexu lze vypočítat z Debyeova-Hückelova rozšířeného vztahu (rovnice (7), str. 17). Jedinou neznámou hodnotou pro tento výpočet je parametr a , který lze vypočítat součtem poloměrů r iontu a jeho protiontu v roztoku. Hydrodynamický poloměr migrujícího i -tého iontu je možné vyjádřit pomocí jeho limitní mobility μ_i^0 ve vodném roztoku při 25 °C^{12,33}:

$$r_i = \frac{|z_i|e}{6\pi\eta\mu_i^0}, \quad (36)$$

kde z_i je nábojové číslo, e elementární náboj a η viskozita vodného roztoku při 25 °C. Pro aniont p -NP⁻ byl vypočten poloměr 0,29 nm z jeho limitní mobility ve vodném roztoku při teplotě 25 °C (tabelovaná hodnota), stejně byly vypočteny i poloměry protiiontů v BGE (0,24 nm pro kationt Li⁺ a 0,18 nm pro kationt Na⁺)¹². Poloměr aniontu komplexu r_{AC} byl vypočten z rovnice^{12,29}

$$r_{AC} = r_A \frac{\mu_A}{\mu_{AC}}, \quad (37)$$

kde r_A značí poloměru aniontu analytu a jako mobility analytu a komplexu μ_A a μ_{AC} byly dosazeny hodnoty parametrů rovnice získané z výsledné závislosti nelineární regrese experimentů pro BGE s iontovou silou 10 mmol dm⁻³. Vypočtená hodnota poloměru aniontu komplexu byla 0,73 nm.

Diskuze

V tabulce 4.3 jsou stanovené hodnoty konstant stability pro použité systémy a v tabulce 4.4 jsou uvedeny hodnoty konstant z literatury.

TAB. 4.3

Tabulka stanovených konstant stability pro jednotlivé použité systémy.

I [mmol dm ⁻³]	$K' \times 10^{-3}$ [(mol dm ⁻³) ⁻¹]			$K \times 10^{-3}$
	a	b	c	
162	1,00 ± 0,08	1,10 ± 0,10	1,34 ± 0,12	1,45
25	1,23 ± 0,03	1,34 ± 0,03	1,53 ± 0,04	1,56
10	1,54 ± 0,07	1,70 ± 0,08	2,00 ± 0,09	2,02

Pozn.: a = bez korekcí, b = po korekci na změny viskozity, c = po korekci celkové koncentrace CD na rovnovážnou koncentraci volného CD, d = po korekci na iontovou sílu.

Z uvedených hodnot je patrné, že po korekci efektivních mobilit na viskozitní koeficient BGE vzrostla hodnota konstanty přibližně o 10 %. Vyšší nárůst hodnoty konstanty, a to o 20 %, byl způsoben přepočtem analytické koncentrace CD v BGE na rovnovážnou koncentraci volného (v komplexu nevázaného) CD. Hodnoty zdánlivých konstant stability K' se lišily pro různé iontové síly, byly proto přepočítány na konstanty termodynamické. Hodnoty termodynamických konstant pro vyšší iontové síly se po korekci na iontovou sílu přiblížily natolik, že lze (po zahrnutí intervalů experimentálních chyb hodnot K') jejich odchylku považovat za statisticky nevýznamnou. To bohužel neplatí pro hodnotu termodynamické konstanty stability pro BGE o iontové síle 10 mmol dm⁻³.

TAB. 4.4

Tabulka hodnot konstant stability z literatury (hodnoty konstant K' , K jsou ve formátu, v jakém byly uvedeny v původní literatuře).

K' [(mol dm ⁻³) ⁻¹]	K	metoda	podmínky	zdroj
2400 ± 300	—	a	50 mmol dm ⁻³ fosfátový pufr, pH = 11, $I = 0,157$ mol dm ⁻³ , $C_{p-NP} =$ méně než 0,1 mg/ml	13
1500 ± 200		b		
1500 ± 200		c		
1400 ± 300		d		
1570 ± 20	2018 ± 70	e	50 mmol dm ⁻³ fosfátový pufr, pH = 11,1, $I = 0,15$ mol dm ⁻³ , $C_{p-NP} = 0,086$ mmol dm ⁻³	29
1830 ± 63		f		
		g		
1800 ± 300	2196 ± 366	h	pH = 11, $I = 0,9$ mol dm ⁻³	45
		i		
2290	—	j	—	46
670	—	k	fosfátový pufr, pH = 10, $I = 0,5$ mol dm ⁻³	47
769	—	l	fosfátový pufr, pH = 10, $I = 0,5$ mol dm ⁻³	47
1720 ± 40	2049 ± 48	m	200 mmol dm ⁻³ fosfátový pufr, pH = 8,5, $I = 0,6$ mol dm ⁻³ , $C_{p-NP} = 5$ mmol dm ⁻³	29
		n		

- Pozn.: a = lineární metoda vyhodnocení z poměru mobilit
 b = dvojitá reciproční lineární metoda
 c = y-reciproční lineární metoda
 d = x-reciproční lineární metoda
 e = metoda nelineární regrese, data korigována na změny viskozity pomocí poměru procházejících proudů a provedena korekce celkové koncentrace CD na rovnovážnou koncentraci volného CD
 f = metoda nelineární regrese, data korigována na změny viskozity pomocí poměru procházejících proudů, provedena korekce celkové koncentrace CD na rovnovážnou koncentraci volného CD a na změny teploty
 g = metoda nelineární regrese, data korigována na změny viskozity pomocí poměru procházejících proudů, provedena korekce celkové koncentrace CD na rovnovážnou koncentraci volného CD, na změny teploty a na neideální chování iontů v pufru pomocí Debyeovy-Hückelovy teorie
 h = kalorimetrie, data korigována na změny teploty
 i = kalorimetrie, data korigována na změny teploty, korekce na neideální chování pomocí Debyeovy- Hückelovy teorie
 j = UV spektroskopie
 k = NMR
 l = NMR
 m = HPLC
 n = HPLC, korekce na neideální chování pomocí Debyeovy- Hückelovy teorie

4.2 Komplex nabitého ligandu s neutrálním analytem

U komplexu nabitého ligandu (komplexačního činidla) s neutrálním analytem by bylo výhodné použít druhého možného uspořádání metody ACE, tedy přidávání analytu do BGE a dávkování ligandu. Konstanta stability by byla stanovena na základě změny mobility dávkovaného komplexačního činidla s rostoucí koncentrací analytu v BGE. Uspořádání by přineslo řadu výhod, především by se neměnila iontová síla BGE a dále by byla nižší spotřeba komplexačního činidla. Bohužel u konkrétních komplexů v této práci není možné tohoto uspořádání využít, neboť elektroforetická mobilita komplexačního činidla (CD) a komplexu je téměř stejná. Proto byly experimenty uspořádány stejným způsobem jako u komplexu neutrálního CD s nabitým analytem. S rostoucí koncentrací nabitého CD přidávaného do BGE se však zvyšuje nejen viskozitní koeficient BGE, ale i jeho iontová síla. Elektroforetická mobilita analytu není tedy ovlivněna pouze stupněm komplexace, ale též rostoucí viskozitou a iontovou silou. Se stupněm komplexace se elektroforetická mobilita analytu zvyšuje, ovšem viskozitní koeficient prostředí a iontová síla působí naopak její pokles.

4.2.1 Komplex PEMEDA- β -CD se sekundárním fenethylalkoholem

PEMEDA- β -CD je kationtový CD nesoucí dva náboje. Nízká hodnota nábojového čísla nabízela možnost provést stanovení v základním elektrolytu o konstantní iontové síle. Na základě výsledků z literatury⁴¹ byla jako maximální zvolena koncentrace PEMEDA- β -CD v základním elektrolytu 15 mmol dm⁻³, což odpovídá iontové síle 45 mmol dm⁻³. Iontová síla základních elektrolytů byla zvolena 50 mmol dm⁻³, na této hodnotě byla udržována měnící se koncentrací acetátového pufru. Složení BGE bylo vypočteno programem PeakMaster⁴⁴. Pro porovnání bylo stanovení provedeno též v acetátovém pufru o konstantní koncentraci (s iontovou silou 5 mmol dm⁻³) s měnící se koncentrací PEMEDA- β -CD a tím i měnící se iontovou silou.

Detekční časy a vypočtené efektivní mobility jsou shrnuty v tabulkách 4.7 a 4.8 pro systém, ve kterém byla udržována konstantní iontová síla 50 mmol dm^{-3} a v tabulkách 4.9 a 4.10 detekční časy a vypočtené efektivní mobility pro systém s měnící se iontovou silou v rozmezí $5 - 50 \text{ mmol dm}^{-3}$. Při nižších koncentracích PEMEDA- β -CD byly experimenty prováděny klasickou metodou (tabulky 4.7 a 4.9), při vyšších koncentracích byla použita metoda PreMCE¹⁰ kvůli zvyšujícím se detekčním časům. Možným důvodem byla adheze PEMEDA- β -CD na stěnu kapiláry a jí způsobená změna EOF.⁴¹

Pro korekci na rostoucí viskozitní koeficient BGE byly dále proměřeny časy potřebné k protlačení zóny DMSO kapilárou naplněnou BGE s různou koncentrací PEMEDA- β -CD konstantním tlakem 40 mbar. Korekce byla provedena v obou systémech a to stejným způsobem jako pro stanovení konstanty stability α -CD s *p*-NP. Závislosti korigovaných efektivních mobilit sekundárního fenethylalkoholu na analytické koncentraci PEMEDA- β -CD jsou na obrázcích 4.8 a 4.9. Experimentální body byly proloženy křivkou popsanou rovnicí (18) na str. 22.

TAB. 4.7

Tabulka naměřených detekčních časů z DAD, pozorované mobility EOF a vypočtených efektivních mobilit pro sekundární fenethylalkohol pro koncentrace PEMEDA- β -CD (c_{CD}) 0,5 – 8 mmol dm⁻³ v základním elektrolytu. Složení BGE o pH 4,6 se měnilo od koncentrací 100 mmol dm⁻³ CH₃COOH a 50 mmol dm⁻³ LiOH po koncentrace 52 mmol dm⁻³ CH₃COOH a 26 mmol dm⁻³ LiOH, aby byla udržována konstantní iontová síla 50 mmol dm⁻³. Dávkován byl sekundární fenethylalkohol o koncentraci 0,5 mmol dm⁻³ a 0,2% DMSO tlakem 10 mbar po dobu 6 sekund. Na kapiláru s vnitřním průměrem 50 μ m o celkové délce 58,85 cm bylo vkládáno napětí 10 kV, procházející proud se pohyboval kolem 11 μ A.

c_{CD} [mmol dm ⁻³]	t [min]		μ [10^{-9} m ² V ⁻¹ s ⁻¹]	
	sec-fenethylalkohol	DMSO	DMSO	sec-fenethylalkohol
0,5	30,33	30,33	16,3	0,00
0,5	32,84	32,84	15,0	0,00
0,5	27,30	27,30	18,1	0,00
0,5	26,40	26,40	18,7	0,00
0,5	26,57	26,57	18,6	0,00
0,5	28,66	28,66	17,2	0,00
1	44,48	42,04	11,1	0,64
1	40,50	38,54	12,2	0,62
1	38,05	36,33	13,0	0,61
1	38,27	36,48	12,9	0,63
1	34,39	32,92	14,4	0,64
2	56,30	47,92	8,77	1,53
2	36,56	33,71	13,5	1,14
2	36,82	33,23	13,4	1,45
2	35,81	32,29	13,8	1,50
3	56,23	45,61	8,78	2,04
3	56,88	45,73	8,68	2,12
3	40,59	34,55	12,2	2,13
3	40,74	34,74	12,1	2,09
4	77,12	54,60	6,40	2,64
4	49,70	39,23	9,94	2,65
4	44,83	36,55	11,0	2,50
4	47,43	37,52	10,4	2,75
6	66,42	44,14	7,44	3,75
6	59,95	40,99	8,24	3,81
6	60,25	41,18	8,20	3,80
6	60,59	41,39	8,15	3,78
6	61,07	41,66	8,09	3,77
8	78,50	44,42	6,29	4,83
8	78,74	44,68	6,27	4,78
8	87,80	49,85	5,62	4,28
8	79,03	44,81	6,25	4,77

TAB. 4.8

Tabulka naměřených detekčních časů z DAD, vypočtených efektivních mobilit pro sekundární fenethylalkohol pro koncentrace PEMEDA- β -CD (c_{CD}) 10 – 15 mmol dm⁻³ v základním elektrolytu. Složení BGE o pH 4,6 se měnilo od koncentrací 40 mmol dm⁻³ CH₃COOH a 20 mmol dm⁻³ LiOH po koncentrace 10 mmol dm⁻³ CH₃COOH a 5 mmol dm⁻³ LiOH, aby byla udržována konstantní iontová síla 50 mmol dm⁻³. Dávkován byl sekundární fenethylalkohol o koncentraci 0,5 mmol dm⁻³ a 0,2% DMSO tlakem 10 mbar po dobu 6 sekund. Na kapiláru s vnitřním průměrem 50 μ m o celkové délce 58,85 cm bylo vkládáno napětí 10 kV, procházející proud se pohyboval kolem 11 μ A. Experimenty byly provedeny metodou PreMCE¹⁰.

c_{CD} [mmol dm ⁻³]	sec-fenethylalkohol	t [min]			Δt	μ_{eff} [10^{-9} m ² V ⁻¹ s ⁻¹]
		DMSO ₁	DMSO ₂			
10	18,10	18,98	13,16	0,88	5,50	
10	19,64	20,85	13,41	1,21	5,57	
10	21,17	22,67	13,30	1,50	5,57	
10	21,29	22,80	13,35	1,51	5,59	
12	21,40	23,05	13,25	1,65	6,15	
12	21,34	23,01	13,32	1,67	6,19	
12	21,34	23,01	13,35	1,67	6,18	
12	21,43	23,14	13,51	1,71	6,25	
15	21,58	23,51	13,57	1,93	7,02	
15	21,66	23,63	13,70	1,97	7,10	
15	21,70	23,67	13,75	1,97	7,08	
15	21,74	23,67	13,68	1,93	6,97	

TAB. 4.9

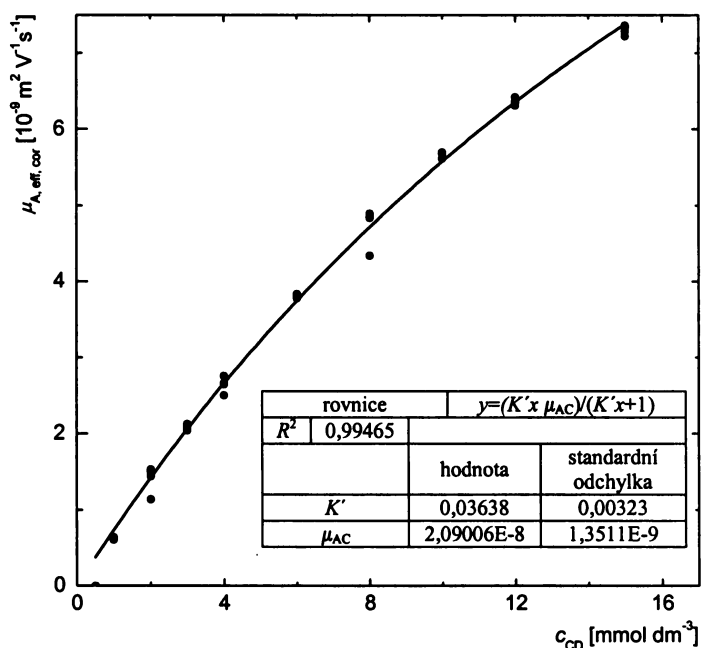
Tabulka naměřených detekčních časů z DAD, pozorované mobility EOF a vypočtených efektivních mobilit pro sekundární fenethylalkohol pro koncentrace PEMEDA- β -CD (c_{CD}) 0 – 6 mmol dm⁻³ v základním elektrolytu. BGE obsahoval 10 mmol dm⁻³ CH₃COOH a 5 mmol dm⁻³ LiOH o pH 4,6. Iontová síla se zvyšovala (5,14 až 23 mmol dm⁻³) s rostoucí koncentrací PEMEDA- β -CD. Dávkován byl sekundární fenethylalkohol o koncentraci 0,5 mmol dm⁻³ a 0,2% DMSO tlakem 10 mbar na dobu 6 sekund. Na kapiláru s vnitřním průměrem 50 μ m o celkové délce 58,85 cm bylo vkládáno napětí 10 kV, procházející proud rostl se zvyšující se koncentrací PEMEDA- β -CD od 1,7 do 6 μ A.

c_{CD} [mmol dm ⁻³]	t [min]		μ [10^{-9} m ² V ⁻¹ s ⁻¹]	
	sec-fenethylalkohol	DMSO	DMSO	sec-fenethylalkohol
0	10,78	10,78	45,8	0,00
0	10,72	10,72	46,1	0,00
0	10,68	10,68	46,2	0,00
0,5	23,42	24,31	20,3	0,77
0,5	23,65	24,56	20,1	0,77
0,5	23,69	24,61	20,1	0,78
1	28,20	30,68	16,1	1,42
1	28,19	30,67	16,1	1,42
1	28,31	30,80	16,0	1,41
2	34,79	42,58	11,6	2,60
2	34,83	42,62	11,6	2,59
2	34,95	42,72	11,6	2,57
3	39,22	55,26	8,94	3,65
3	39,44	55,45	8,91	3,62
3	39,45	55,22	8,94	3,58
4	42,37	68,75	7,18	4,47
4	42,59	68,88	7,17	4,43
4	42,67	68,63	7,20	4,38
6	45,09	92,45	5,34	5,61
6	45,22	92,33	5,35	5,57
6	45,22	91,10	5,42	5,50

TAB. 4.10

Tabulka naměřených detekčních časů z DAD a vypočtených efektivních mobilit pro sekundární fenethylalkohol pro koncentrace PEMEDA- β -CD (c_{CD}) 8 – 15 mmol dm⁻³ v základním elektrolytu . BGE obsahoval 10 mmol dm⁻³ CH₃COOH a 5 mmol dm⁻³ LiOH o pH 4,6. Iontová síla rostla (29 až 50 mmol dm⁻³) se zvyšující se koncentrací PEMEDA- β -CD. Dávkován byl sekundární fenethylalkohol o koncentraci 0,5 mmol dm⁻³ a 0,2% DMSO tlakem 10 mbar na dobu 6 sekund. Na kapiláru s vnitřním průměrem 50 μ m o celkové délce 58,85 cm bylo vkládáno 10 kV, procházející proud rostl se zvyšující se koncentrací PEMEDA- β -CD od 6 do 11 μ A. Experimenty byly provedeny metodou PreMCE ¹⁰.

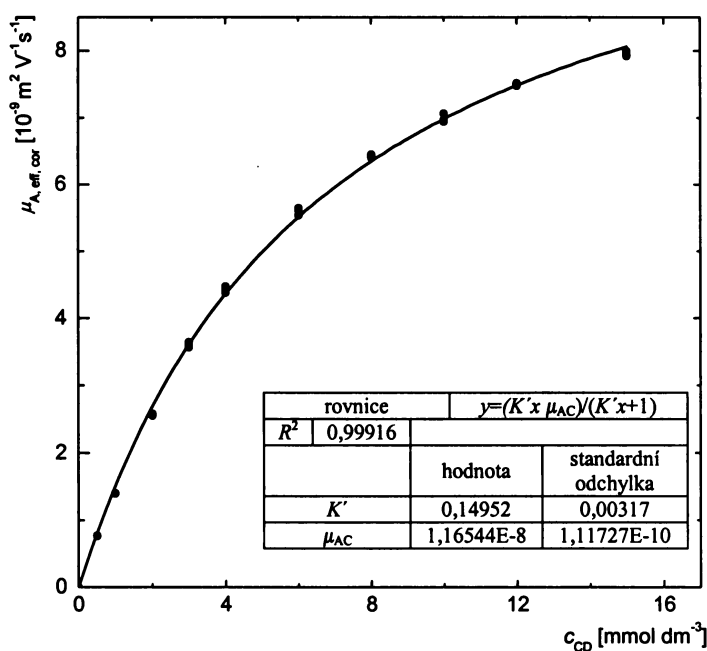
c_{CD} [mmol dm ⁻³]	sec- fenethylalkohol	t [min]			Δt	μ_{eff} [10^{-9} m ² V ⁻¹ s ⁻¹]
		DMSO ₁	DMSO ₂			
8	20,95	22,55	12,51	1,60	6,32	
8	20,94	22,56	12,56	1,62	6,37	
8	21,01	22,63	12,67	1,62	6,31	
10	21,05	22,82	12,62	1,77	6,93	
10	21,16	22,90	12,62	1,74	6,81	
10	21,13	22,89	12,72	1,76	6,83	
12	21,19	23,09	12,81	1,90	7,32	
12	21,31	23,20	12,81	1,89	7,29	
12	21,59	23,60	13,58	2,01	7,31	
15	21,92	24,07	13,85	2,15	7,67	
15	22,00	24,17	13,89	2,17	7,72	
15	21,93	24,06	13,76	2,13	7,64	



OBR. 4.8

Závislost efektivních mobilit sekundárního fenethylalkoholu ($\mu_{A, \text{eff, cor}}$) korigovaných na změny viskozity s rostoucí koncentrací CD, na celkové koncentraci PEMEDA- β -CD (c_{CD}). Podmínky měření jsou popsány u tabulek 4.7 a 4.8.

V systému s konstantní iontovou silou lze stanovenou veličinu K' , jejíž hodnota činí $36 \pm 3 \text{ (mol dm}^{-3}\text{)}^{-1}$, považovat za konstantu stability. Vzhledem k její nízké hodnotě lze očekávat, že použitý zjednodušující předpoklad ztotožňující celkovou koncentraci CD s rovnovážnou koncentrací volného CD bude dobře splněn. Způsobem stejným jako u komplexu α -CD s p -NP bylo ověřeno, že přepočtení celkové koncentrace PEMEDA- β -CD na rovnovážnou koncentraci volného PEMEDA- β -CD nepřináší statisticky významné zpřesnění stanovené hodnoty konstanty stability (po první iteraci byla hodnota K' rovna $37 \pm 3 \text{ (mol dm}^{-3}\text{)}^{-1}$). Vzhledem k rovnici (14) na str. 19 lze tedy číselnou hodnotu konstanty K' považovat za pravou termodynamickou konstantu stability $K = 37$.



OBR. 4.9

Závislost efektivních mobilit sekundárního fenethylalkoholu ($\mu_{A, \text{eff, cor}}$) korigovaných na změny viskozity s rostoucí koncentrací CD, na celkové koncentraci PEMEDA- β -CD (c_{CD}). Podmínky měření jsou popsány u tabulek 4.9 a 4.10.

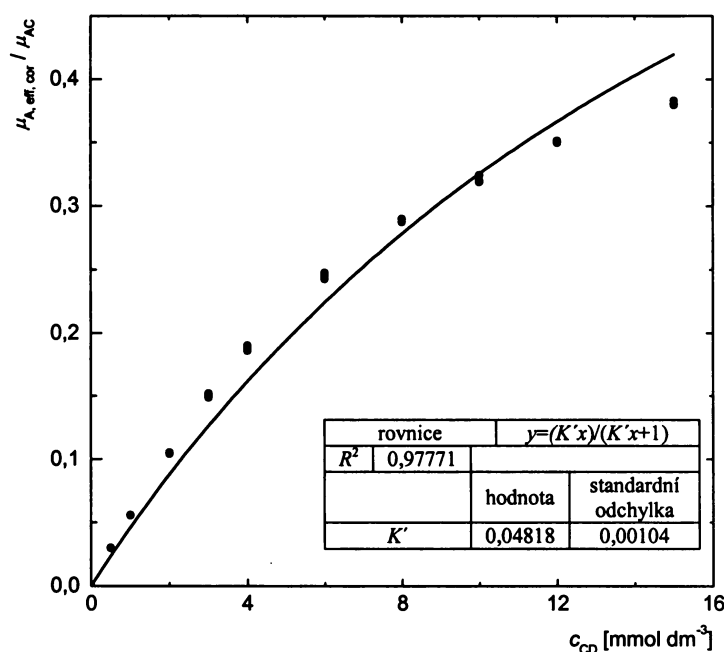
Hodnotu veličiny $K' = 150 \pm 3 \text{ (mol dm}^{-3}\text{)}^{-1}$ stanovenou v systému s proměnnou iontovou silou v závislosti na přidané koncentraci PEMEDA- β -CD nelze interpretovat jako konstantu stability. Měřena byla pouze pro demonstraci velikosti chyby způsobené zanedbáním vlivu iontové síly. Konstanty stability uváděné v literatuře^{27,48,49,50,51,52,53} pro nabitě CD byly totiž stanoveny právě tímto způsobem. Protože M. Beneš v bakalářské práci⁵⁴ proměřil závislost aktuální mobility PEMEDA- β -CD na iontové síle BGE, nabízela se možnost korekce vlivu rostoucí iontové síly BGE na aktuální mobilitu komplexu. Z této závislosti byl použit pouze parametr a (představující nejkratší vzdálenost, na kterou se mohou přiblížit středy iontu a jeho protiiontu v roztoku), o kterém lze předpokládat, že bude mít ve stejném pufru srovnatelnou hodnotu jako komplex. Hodnota $a = 1,08 \text{ nm}$ byla dosazena do Onsangerova rozšířeného vztahu (rovnice (27), str. 27), ze kterého byla vypočtena mobilita komplexu. Jelikož nebylo možné vyjádřit limitní mobilitu komplexu přímo, bylo

postupováno iteračně volbou hodnot limitních mobilit a následným výpočtem mobility aktuální dokud nebylo dosaženo hodnoty aktuální mobility komplexu při iontové síle 50 mmol dm^{-3} stejné jako v rovnici popisující nelineární regresi na obrázku 4.8 ($\mu_{AC} = 20,9 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$). Dosazením vypočtené hodnoty limitní mobility komplexu ($30,2 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$) do Onsangerova rozšířeného vztahu byly napočítány aktuální mobility komplexu pro jednotlivé iontové síly. Poměr efektivních mobilit analytu korigovaných na změny viskozitního koeficientu BGE a vypočtených aktuálních mobilit komplexu v závislosti na celkové koncentraci PEMEDA- β -CD byl vynesena do grafu (obrázek 4.10). Po proložení bodů funkcí

$$\frac{\mu_{A, \text{eff, cor}}}{\mu_{AC}} = \frac{K' c_{CD}}{1 + K' c_{CD}}, \quad (38)$$

byla získána hodnota konstanty stability $48 \pm 1 \text{ (mol dm}^{-3}\text{)}^{-1}$, která je srovnatelná s hodnotou konstanty získané v systému s konstantní iontovou silou.

Ze získaných hodnot je patrné, že pokud je známa závislost aktuální mobility CD na iontové síle a limitní mobilita komplexu, lze data získaná měřením při nekonstantní iontové síle přepočítat a tím získat hodnotu konstanty srovnatelnou s hodnotou stanovenou při udržované konstantní iontové síle. Ovšem velmi důležitou podmínkou, je znalost příspěvku nabitého CD k iontové síle.



OBR. 4.10

Závislost poměru efektivních mobilit sekundárního fenethylalkoholu korigovaných na změny viskozity ($\mu_{A, \text{eff, cor}}$) a aktuálních mobilit komplexu (μ_{AC}) na celkové koncentraci PEMEDA- β -CD (c_{CD}). Podmínky měření jsou popsány u tabulek 4.9 a 4.10.

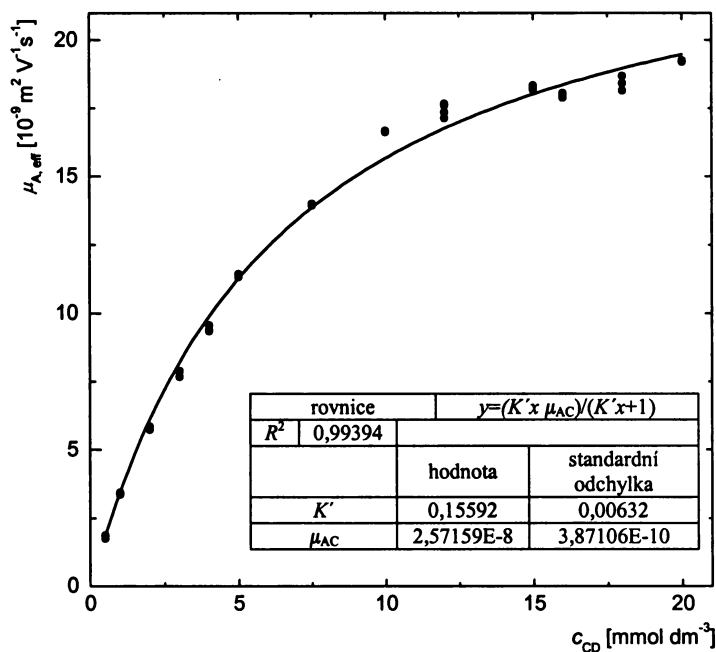
4.2.2 Komplex HS- β -cyklodextrinu s *p*-nitrofenolem

U komplexu záporně nabitého CD s neutrálním analytem nebylo možné udržovat iontovou sílu BGE konstantní jako v předchozím případě, neboť by její hodnota musela být příliš vysoká vzhledem k tomu, že HS- β -CD nese sedm záporných nábojů. Stěžejním problémem u tohoto typu CD je, že není známo, jakým způsobem k iontové síle přispívá a jaký je jeho skutečný náboj v BGE (do jaké míry dochází k asociaci kationtů z BGE na CD a tím snížení jeho nábojového čísla).^{7,20} Interakce HS- β -CD s *p*-NP byla studována v BGE tvořeném formiátovým pufrem, ke kterému byl přidáván HS- β -CD v rozmezí koncentrací 0 – 20 mmol dm⁻³.

V tabulce 4.11 jsou shrnuty detekční časy a vypočtené efektivní mobility získané metodou PreMCE¹⁰ pro tento komplex.

Do grafu byly vyneseny efektivní mobility analytu proti analytické koncentraci HS- β -CD a body byly proloženy křivkou popsanou opět rovnicí (18) na str. 22 jako u předchozího komplexu (obrázek 4.11).

Stanovenou veličinu $K' = 156 \pm 6 \text{ (mol dm}^{-3}\text{)}^{-1}$ nelze chápat jako konstantu stability, ale pouze jako parametr dané regresní funkce. Měřená hodnota efektivní mobility analytu je ovlivňována nejen stupněm komplexace, ale též viskozitou a iontovou silou prostředí. S rostoucí koncentrací HS- β -CD v BGE v důsledku zvyšujícího se stupně komplexace se efektivní mobilita analytu zvyšuje, v důsledku rostoucího viskozitního koeficientu prostředí a iontové síly BGE však klesá. Lze tedy očekávat, že konstanta stability bude výrazně nižší než stanovená K' .



OBR. 4.11

Závislost efektivní mobility *p*-NP ($\mu_{A, \text{eff}}$) na celkové koncentraci HS- β -CD (c_{CD}). Podmínky měření jsou popsány u tabulky 4.11.

TAB. 4.11

Tabulka naměřených detekčních časů z DAD a vypočtených efektivních mobilit pro *p*-NP pro různé koncentrace HS- β -CD (c_{CD}) v základním elektrolytu. BGE sestával z HCOOH o koncentraci 8,5 mmol dm⁻³ a LiOH 5 mmol dm⁻³, hodnota pH 3,91. Hodnota iontové síly rostla s koncentrací HS- β -CD od 5 mmol dm⁻³ do 565 mmol dm⁻³. Dávkován byl *p*-NP o koncentraci 0,5 mmol dm⁻³ a 0,01% nitrometan hydrodynamicky tlakem 10 mbar po dobu 6 sekund. Na kapiláru s vnitřním průměrem 50 μ m o celkové délce 44,9 cm bylo vkládáno napětí 10 kV, procházející proud se zvyšoval s rostoucí koncentrací HS- β -CD od 4 do 60 μ A. Experimenty byly prováděny metodou PreMCE¹⁰.

c_{CD} [mmol dm ⁻³]	t [min]				Δt	μ_{eff} [10^{-9} m ² V ⁻¹ s ⁻¹]
	EOF ₁	<i>p</i> -NP	EOF ₂			
0,5	14,07	14,52	8,75	0,45	1,75	
0,5	14,03	14,51	8,83	0,48	1,85	
0,5	14,06	14,55	8,91	0,49	1,87	
1	13,56	14,22	8,78	0,66	3,41	
1	13,50	14,17	8,82	0,67	3,45	
1	13,39	14,04	8,76	0,65	3,37	
2	14,11	15,23	8,83	1,12	5,76	
2	14,05	15,19	8,84	1,14	5,85	
2	14,09	15,22	8,93	1,13	5,74	
3	14,26	15,75	8,82	1,49	7,67	
3	14,20	15,73	8,80	1,53	7,89	
3	14,28	15,82	8,88	1,54	7,87	
4	14,56	16,45	8,97	1,89	9,57	
4	14,57	16,42	8,95	1,85	9,38	
4	14,60	16,47	9,08	1,87	9,35	
5	15,04	17,31	9,09	2,27	11,3	
5	14,96	17,30	9,30	2,34	11,4	
5	14,98	17,27	9,09	2,29	11,4	
7,5	15,09	17,90	9,13	2,81	14,0	
7,5	15,10	17,91	9,15	2,81	13,9	
7,5	15,15	18,03	9,34	2,88	14,0	
10	15,56	19,10	9,66	3,54	16,6	
10	15,57	19,03	9,45	3,46	16,6	
10	15,46	18,94	9,48	3,48	16,7	
12	15,88	19,56	9,63	3,68	17,3	
12	15,62	19,18	9,43	3,56	17,1	
12	16,02	19,70	9,49	3,68	17,6	
15	16,24	20,11	9,63	3,87	18,2	
15	16,33	20,25	9,71	3,92	18,3	
15	16,46	20,34	9,69	3,88	18,2	
16	15,88	19,64	9,48	3,76	18,0	
16	15,91	19,75	9,66	3,84	18,0	
16	15,83	19,63	9,59	3,80	18,0	
18	16,16	20,02	9,52	3,86	18,4	
18	16,18	20,09	9,64	3,91	18,4	
18	16,08	19,98	9,48	3,90	18,7	
20	16,18	20,32	9,77	4,14	19,2	
20	16,18	20,35	9,84	4,17	19,2	
20	16,24	20,43	9,91	4,19	19,2	

5 ZÁVĚR

Byly studovány faktory ovlivňující hodnotu konstanty stability stanovenou kapilární zónovou elektroforézou. Jednalo se o vliv viskozitního koeficientu a iontové síly prostředí a aproximace ztotožňující rovnovážnou koncentraci volného (v komplexu nevázaného) ligandu s jeho koncentrací celkovou.

Jako ligandy byly použity cyklodextriny, neutrální α -cyklodextrin a ionogenními skupinami modifikované β -cyklodextriny. Jejich přidáváním do základního elektrolytu se zvyšuje viskozitní koeficient a tím se mění efektivní mobilita komplexu. Tento vliv lze korigovat pomocí měření časů, potřebných k protlačení nadávkované zóny kapilárou naplněnou základním elektrolytem s danou koncentrací cyklodextrinu, přímo v aparatuře pro CE. Předností této metody korekce je především velice nízká spotřeba drahých cyklodextrinů. Bylo ukázáno, že u komplexu neutrálního ligandu s nabitým analytem se po korekci konstanta stability zvýší, u komplexu nabitého ligandu s neutrálním analytem je tomu právě naopak.

Relativně snadno je možné se vypořádat s běžně používanou aproximací, ztotožňující rovnovážnou koncentraci volného ligandu s jeho koncentrací celkovou. Úspěšně byla aplikována iterační metoda výpočtu rovnovážné koncentrace volného ligandu. Také bylo potvrzeno všeobecné pravidlo o možném ztotožnění koncentrací v případě nízké hodnoty konstanty stability a to u komplexu kladně nabitého PEMEDA- β -CD.

Jako nejproblematictější se při stanovení konstanty stability ukázal vliv iontové síly. Přidáváním neutrálního ligandu do základního elektrolytu se sice iontová síla nemění, není tedy problém s regresní analýzou experimentálních dat, stanovená konstanta stability je však zdánlivá, na iontové síle závislá. Využitím Debyeova-Hückelova rozšířeného vztahu pro aktivní koeficienty lze zdánlivou konstantu stability přepočítat na konstantu termodynamickou. V systémech s iontovou silou 162 a 25 mmol dm⁻³ byly tímto způsobem získány srovnatelné hodnoty. V systému s iontovou silou nejnižší (10 mmol dm⁻³) se nepodařilo dosáhnout tak dobré shody.

Při tvorbě komplexů nabitých ligandů s neutrálními analyty vlastní konstanta stability na iontové síle nezávisí za předpokladu, že komplex a ligand mají přibližně stejnou velikost. Na iontové síle však závisí mobilita komplexu. Pokud je nábojové

číslo ligandu nízké, je možno stanovení provést dvěma způsoby. Snadnějším se jeví stanovení při konstantní iontové síle základního elektrolytu, kdy je rostoucí koncentrace nabitého ligandu kompenzována klesající koncentrací použitého pufru. Druhou možností je příspěvek ligandu k iontové síle základního elektrolytu nekompenzovat a pro každou iontovou sílu vypočítat aktuální mobilitu komplexu. Podmínkou pro možné stanovení tímto druhým způsobem je však znalost hydrodynamického poloměru komplexu (resp. parametr a v Onsangerově rozšířeném vztahu). U obou způsobů stanovení je také nutno přesně znát příspěvek ligandu k iontové síle roztoku. Pro komplex PEMEDA- β -CD se sekundárním fenethylalkoholem byly za předpokladu, že CD přispívá k iontové síle roztoku oběma svými náboji, aplikovány oba principy a bylo dosaženo poměrně dobré shody získaných hodnot konstant stability. U komplexu HS- β -CD s p -nitrofenolem bylo stanovení provedeno pouze druhým způsobem, protože nábojové číslo HS- β -CD je příliš vysoké pro udržování konstantní iontové síly. Stěžejním problémem při vyhodnocení naměřených dat u tohoto CD byla neznalost jeho skutečného náboje a příspěvku k iontové síle. Stanovenou hodnotu nelze proto chápat jako konstantu stability, ale pouze jako parametr regresní funkce. Skutečná hodnota konstanta stability bude pravděpodobně výrazně nižší.

SUMMARY

V rámci diplomové práce byl studován vliv faktorů jako jsou viskozita a iontová síla základního elektrolytu a aproximace ztotožňující celkovou koncentraci ligandu s rovnovážnou koncentrací volného (v komplexu nevázaného) ligandu na stanovení konstant stability kapilární zónovou elektroforézou, kterým je nutno se věnovat, aby získané hodnoty mohly být porovnatelné s literárními hodnotami stanovenými ostatními metodami.

The major factors, like viscosity and ionic strength of the background electrolyte and approximation of the equilibrium free ligand concentration by the total ligand concentration, which influence determination of the stability constants by capillary zone electrophoresis, were presented in this work. It was proved, that it is necessary to pay attention to all of these factors for potential comparison determined constants with literature values gained by the other techniques.

LITERATURA

1. Heintz, J.; Hernandez, M.; Gomez, F.A.: *J. Chromatogr. A* **840**, 261 (1999)
2. Bush, M.H.A.; Kraak, J.C.; Poppe, H.: *J. Chromatogr. A* **777**, 329 (1997)
3. Peng, X.; Bowser, M.T.; Britz-McKibbin, P.; Bebault, G.M.; Morris, J.R.; Chen, D.D.Y.: *Electrophoresis* **18**, 706 (1997)
4. Tanaka, Y.; Terabe, S.: *J. Chromatogr. B* **768**, 81 (2002)
5. Rundlett, K.L.; Armstrong, D.W.: *Electrophoresis* **18**, 2194 (1997)
6. Heegaard, N.H.H.; Kennedy, R.T.: *Electrophoresis* **20**, 3122 (1999)
7. Ušelová-Včeláková, K.; Zusková, I.; Gaš, B.: *Electrophoresis* **28**, 2145 (2007)
8. Štědrý, M.; Jaroš, M.; Včeláková, K.; Gaš B.: *Electrophoresis* **24**, 536 (2003)
9. Gaš, B.; Kenndler, E.: *Electrophoresis* **21**, 3888 (2000)
10. Williams, B. A.; Vigh, G.: *Anal. Chem.* **68**, 1174 (1996)
11. Vespalec, R.; Boček, P.: *J. Chromatogr. A* **875**, 431 (2000)
12. Survej, M.A.; Goodall, D.M.; Wren, S.A.C.; Rowe, R.C.: *J. Chromatogr. A* **741**, 99 (1996)
13. Rundlett, K.L.; Armstrong, D.W.: *J. Chromatogr. A* **721**, 173 (1996)
14. Bowser, M.T.; Sternberg, E.D.; Chen, D.D.Y.: *Electrophoresis* **18**, 82 (1997)
15. Bowser, M.T.; Chen, D.D.Y.: *J.Phys. Chem. A* **102**, 8063 (1998)
16. Bowser, M.T.; Chen, D.D.Y.: *J.Phys. Chem. A* **103**, 197 (1999)
17. Kermode, J.C.: *Biochem. Pharmacol.* **38**, 2953 (1989)
18. Oracová, J.; Böhs, B.; Lindner, W.: *J. Chromatogr. B* **677**, 1 (1996)
19. Penn, S. G.; Bergström, E. T.; Goodall, D. M.: *Anal. Chem.* **66**, 2866 (1994)
20. Gratz, S.R.; Stalcup, A. M.: *Anal. Chem.* **70**, 5166 (1998)
21. Evans, Ch.; Stalcup, A. M.: *Chirality* **15**, 709 (2003)
22. Li, J.; Waldron, K. C.: *Electrophoresis* **20**, 171 (1999)
23. Shibukawa, A.; Lloyd, D. K.; Wainer, I. W.: *Chromatografia* **35**, 419 (1993)
24. Robinson, R.A.; Stokes, R.H.: *Electrolyte Solutions*. 2. přeprac. vyd. Londýn, Butterworths 1965, s. 310
25. Yang, J.; Bose, S.; Hage, D.S.: *J. Chromatogr. A* **735**, 209 (1996)
26. Bose, S.; Yang, J.; Hage, D.S.: *J. Chromatogr. B* **679**, 77 (1997)
27. Kawaoka, J.; Gomez, F.A.: *J. Chromatogr. B* **715**, 203 (1998)
28. Fanali, S.; Boček, P.: *Electrophoresis* **17**, 1921 (1996)

29. Penn, S. G.; Bergström, E. T.; Knights, I.; Liu, G.; Ruddick, A.; Goodall, D. M.: *J. Phys. Chem.* **99**, 3875 (1995)
30. Wren, S. A. C.; Rowe, R. C.: *J. Chromatogr.* **603**, 235 (1992)
31. Amini, A.; Merclin, N.; Bastami, S.; Westerlund, D.: *Electrophoresis* **20**, 180 (1999)
32. Vespalec, R.; Boček, P.: *Electrophoresis* **19**, 276 (1998)
33. Atkins, P.; de Paula, J.: *Atkins' Physical Chemistry*. 7. vyd. New York, Oxford University Press 2002, s. 841 a 836
34. Koval, D.; Kašička, V.; Zusková, I.: *Electrophoresis* **26**, 3221 (2005)
35. Connors, K.A.: *Binding Constants-The Measurement of Molecular Complex Stability*. New York, John Wiley & Sons 1987, s. 42
36. Villiers, A.: *C. R. Acad. Sci.* **112**, 536 (1891)
37. Gaillaume, Y.,C.; Peyrin, E.: *Anal. Chem.* **71**, 2046 (1999)
38. Fanali, S.: *Chromatografia* **875**, 89 (2000)
39. Chankvetadze, B.: *Capillary Electrophoresis in Chiral Analysis* Chichser, Wiley 1997
40. Vincent, J.B.; Kirby, D.M.; Nguyen, T.V.; Vigh G.: *Anal. Chem.* **69**, 4419 (1997)
41. Nzeadibe, K.; Vigh, G.: *Electrophoresis* **28**, 2589 (2007)
42. Novotná, A.: *Bakalářská práce – Využití kapilární zónové elektroforézy ke stanovení pohyblivosti a disociačních konstant látek s nízkou pK*. UK Praha 2003
43. Sigma Aldrich: Katalog [on-line]. Dostupné z URL:
<<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search/ProductDetail/ALDRICH/R426806>>
[cit. 15.4.08]
44. Univerzita Karlova v Praze: PeakMaster [on-line], ver. 5.1.
Dostupné z URL: <<http://natur.cuni.cz/~gas>> [cit. 31.3.08]
45. Bernard, G.L.; Faulkner, Jr, J.R.; Hans, S.M.; Armstrong, D.: *J.Am.Chem.Soc.* **93**, 6863 (1989)
46. Cramer, F.; Saenger, W.; Spatz, H.-Ch.: *J.Am.Chem.Soc.* **89**, 8914 (1967)
47. Inoue, Y.; Okuda, T.; Miyata, Y.; Chûjô, R.: *Carbohydrate Res.* **125**, 65 (1984)
48. Zakaria, P.; Macka, M.; Haddad, P.R.: *Electrophoresis* **25**, 270 (2004)
49. Phuong, N.T.; Lee, K.A.; Kim, K.H.; Choi, J.K.; et al.: *Arch. Pharm. Res.* **12**, 1290 (2004)

50. Lipka, E.; Daniel, C.; Vaccher, M.P.; Glacon, V.; et al.: *Electrophoresis* **25**, 444 (2004)
51. Vaccher, M.P.; Lipka, E.; Bonte, J.P.; Vaccher, C.: *Electrophoresis* **25**, 1111 (2004)
52. Süß, F.; Sängler-van de Griend, C.E.; Scriba, G.K.E.: *Electrophoresis* **24**, 1069 (2003)
53. Vaccher, M.-P.; Lipka, E.; Bonte, J.-P.; Foulon, C.; et al.: *Electrophoresis* **26**, 2974 (2005)
54. Beneš, M.: *Bakalářská práce – Závislost pohyblivosti nabitých cyklodextrinů na iontové síle*. UK Praha 2008