

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Chemie životního prostředí



Milan Boublík

STANOVENÍ LIMITNÍCH ELEKTROFORETICKÝCH MOBILIT
NABITÝCH CYKLODEXTRINŮ

Determination of limiting electrophoretic mobilities of charged
cyclodextrins

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Martina Riesová

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval samostatně, pod vedením školitelky RNDr. Martiny Riesové, a že jsem všechny použité prameny řádně citoval. Jsem si vědom toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne

.....

Podpis

Poděkování

Rád bych poděkoval všem, kteří mi pomáhali s vypracováním bakalářské práce, především mé školitelce RNDr. Martině Riesové a také Mgr. Janě Svobodové Ph.D. a Mgr. Pavlu Dubskému Ph.D za ochotu, trpělivost a užitečné rady. Poděkování také patří prof. G. Vighovi (Texas A&M University) za darování studovaných cyklodextrinů.

Abstrakt

V rámci této práce byly změřeny závislosti efektivních elektroforetických mobilit na iontové síle základního elektrolytu pomocí kapilární zónové elektroforézy pro čtyři přesně definované, vícenásobně nabitě, cyklodextriny. Závislost mobility těchto cyklodextrinů na iontové síle nelze popsat Onsagerovým zákonem, a proto je nutné vyšetřit tyto závislosti experimentálně a fitovat je empirickou funkcí. Získané hodnoty limitních elektroforetických mobilit a výsledná funkce popisující vliv iontové síly na mobilitu daného cyklodextrinu jsou nezbytné pro správné stanovení komplexačních konstant těchto cyklodextrinů s různými analyty.

Klíčová slova

kapilární zónová elektroforéza, afinitní kapilární elektroforéza, cyklodextrin, limitní mobilita, iontová síla

Abstract

In the frame of this work, dependences of electrophoretic mobilities of four defined multiple charged cyclodextrins on ionic strength of background electrolyte were measured using capillary zone electrophoresis. Dependencies of mobility on ionic strength do not follow Onsager law in the case of large and multiple charged species. Therefore, empirical fitting function was used to determine limiting mobilities of studied cyclodextrins. Obtained values of limiting mobilities as well as the resulting regression function are essential for correct determination of complexation constants of corresponding cyclodextrins with various analytes.

Keywords

capillary zone electrophoresis, affinity capillary electrophoresis, cyclodextrin, limiting mobility, ionic strength

Obsah

Seznam použitých zkratk	7
1 Úvod	8
2 Teoretická část	9
2.1 Kapilární zónová elektroforéza	9
2.2 Rušivé jevy v CE	10
2.2.1 Systémové píky	10
2.2.2 Disperzní jevy	11
2.2.3 Elektroosmotický tok	12
2.3 Afinitní kapilární elektroforéza	13
2.4 Cyklodextriny	14
2.5 Korekce na iontovou sílu	15
2.5.1 Korekce komplexačních konstant na iontovou sílu	15
2.5.2 Korekce elektroforetických mobilit na iontovou sílu	17
3 Cíle práce	19
4 Experimentální část	20
4.1 Použité chemikálie a přístroje	20
4.2 Experimentální podmínky a postupy	21
5 Výsledky a diskuze	28
5.1 Závislost mobility cyklodextrinů na iontové síle BGE	28
5.1.1 PremCE metoda	28
5.1.2 Klasická metoda	32
5.2 Porovnání a diskuze výsledků získaných metodami PremCE a klasickou CE	36
6 Závěr	39
7 Literatura	40

Seznam použitých zkratk

BGE	základní elektrolyt
CCD	bezkontaktní vodivostní detektor
CZE	kapilární zónová elektroforéza
ACE	afinitní kapilární elektroforéza
DAD	spektrofotometrický detektor s diodovým polem
MO	mesityloxid
EOF	elektroosmotický tok
HVL	Haarhoffova - Van der Lindeho funkce
PremCE	tlakem modifikovaná kapilární elektroforéza
UV - Vis	ultrafialová a viditelná oblast spektra
CD	cyklodextrin
HS	sodná sůl heptakis(6-O-sulfo- β)-cyklodextrinu
HDMS	sodná sůl heptakis(2,3-di-O-methyl-6-O-sulfo)- γ -cyklodextrinu
OS	sodná sůl oktakis(6-O-sulfo)- γ -cyklodextrinu
ODMS	sodná sůl oktakis(2,3-di-O-methyl-6-O-sulfo)- γ -cyklodextrinu

1 Úvod

Kapilární zónová elektroforéza je v posledních letech jednou z hojně používaných analytických separačních metod. Přispívá k tomu i možnost usnadnit hledání a optimalizaci separačních systémů pomocí počítačových programů, které umějí počítat důležité parametry separačních systémů a předpovídat elektroforetické výsledky. Rozšíření použitelnosti kapilární elektroforézy nabízejí i její různé modifikace. V současné době je jednou z nejpoužívanějších variací kapilární elektroforézy afinitní kapilární elektroforéza, která díky komplexačním rovnováhám mezi analytem a přidaným komplexačním činidlem zvyšuje selektivitu nebo umožňuje chirální separaci, pokud je komplexujícím činidlem chirální selektor. Proto již i některé simulační programy obsahují tyto komplexační rovnováhy a umějí predikovat výsledky afinitní kapilární elektroforézy. Spolehlivost těchto předpovědí závisí na kvalitě a správnosti vstupních dat – hodnot disociačních konstant, limitních mobilit iontů a v případě komplexačního módu také příslušných komplexačních parametrů. Tyto hodnoty mohou být s výhodou získány z elektroforetických měření. Používaná komplexační činidla jsou často velké a komplikované molekuly (například cyklodextriny) a mohou nést více elektrických nábojů, a proto se jejich chování často odchyluje od teoretického popisu. Vyšetřování elektroforetického chování takových molekul, například v závislosti na iontové síle základního elektrolytu, je proto více než žádoucí.

2 Teoretická část

Teoretická část této práce stručně shrnuje základní princip kapilární elektroforézy (CE), její výhody a využití, zmiňuje jevy, které mohou snížit účinnost CE a možnosti jejich potlačení. Dále je zaměřena na afinitní kapilární elektroforézu (ACE), cyklodextriny jako nejčastěji používaná komplexační činidla v ACE a v neposlední řadě na různé přístupy ke korekci na iontovou sílu pro velké a vícenásobně nabitě molekuly.

2.1 Kapilární zónová elektroforéza

Kapilární zónová elektroforéza se řadí do skupiny elektromigračních separačních metod. Princip separace je v této metodě založen na rozdílu rychlosti pohybu nabitých částic v úzké kapiláře naplněné základním elektrolytem (BGE). Mezi výhody kapilárních elektromigračních metod patří nízká spotřeba vzorku a ostatních činidel použitých k separaci, rychlost analýzy a vysoká účinnost separace.^{1,2}

Kapilární elektroforéza nachází široké využití pro separace a stanovení anorganických³ i organických ionogenních⁴, látek včetně proteinů⁵ a ostatních biopolymerů⁶. Uplatnění CE dále rozšiřují její modifikace – afinitní kapilární elektroforéza⁷, micelární elektrokinetická chromatografie⁸, mikroemulsní elektrokinetická chromatografie⁹. Společné těmto módům CE je to, že nabízejí analytům další dodatečné interakční možnosti a tím zvyšují selektivitu. CE lze pak využít i pro analýzu nenabitých látek, které by se za normálních podmínek kapilární zónové elektroforézy nedělily¹⁰. Mezi zmíněnými módy CE je v posledních letech nejvýznamnější ACE, která je široce uplatňována při chirálních separacích¹¹. Nachází tak využití v komerčních laboratořích při nezbytné kontrole enantiomerní čistoty léčiv¹² a potravinových doplňků¹³, často jako doplňková metoda k vysokoúčinné kapalinové chromatografii.

Kromě separací lze CE s výhodou využít ke stanovení fyzikálně-chemických charakteristik analytů. Závislosti efektivní elektroforetické mobility na pH lze v praxi použít ke stanovení disociačních konstant ionogenních látek¹⁴, i jejich iontových a

limitních mobilit¹⁵. V případě ACE lze stanovovat konstanty stability (komplexační konstanty) komplexů analyt-komplexační činidlo¹⁶. Předností stanovení fyzikálně-chemických parametrů pomocí CE je možnost současného měření více analytů, pokud jsou za daných podmínek separovány. Zajímavá je i možnost stanovení kritické micelární koncentrace pomocí CE.¹⁷

Ve srovnání s kapalinovou chromatografií je výhodou pro CE existence predikčních a simulačních počítačových programů, které jsou schopné spolehlivě předpovídat či napodobovat elektroforetické výsledky a slouží tedy k rychlému nalezení optimálních separačních podmínek nebo vysvětlení jevů pozorovaných v experimentální práci. V naší laboratoři byly vyvinuty dva takové programy - Simul¹⁸ a PeakMaster¹⁹.

2.2 Rušivé jevy v CE

Za rušivé jevy lze v CE považovat disperzní jevy, které zapříčiňují rozšiřování, případně deformaci píků a snižují tak účinnost separace, systémové píky a dále sem můžeme zařadit nestabilitu elektroosmotického toku, což může mít za následek nízkou opakovatelnost elektroforetických výsledků.

2.2.1 Systémové píky

Systémové zóny vznikají jako poruchy v koncentraci BGE vzniklé nadávkováním vzorku. Tyto poruchy jsou následně unášeny pomocí elektroosmotického toku (EOF) nebo migrují s vlastní hodnotou elektroforetické mobility. Počet systémových zón je stejný jako počet jednotlivých složek BGE. Systémové zóny mohou být detekovány detektorem jako píky. Tyto píky nepatří žádnému aktuálně separovanému analytu, ale mohou být za ně mylně považovány a mohou tedy zkreslit výsledky separace.²⁰ Pokud mají navíc systémové píky mobilitu blízkou mobilitě analytu, způsobí extrémní rozšíření píku analytu a znemožní tak jeho vyhodnocení.²¹ Existence mobility systémových píků a dokonce i jejich polaritu a tvar lze předpovědět pomocí programu PeakMaster.²²

2.2.2 Disperzní jevy

Celková disperze píku analytu je složena z jednotlivých disperzních příspěvků. Pokud je to možné, je cílem tyto jednotlivé příspěvky eliminovat a dostat tak co nejužší a nejsymetričtější píky.

K celkové disperzi přispívají tyto jevy:

- teplotní gradienty (generace Joulova tepla)
- adsorpce analytu na stěnu kapiláry
- elektromigrační disperze
- podélná difúze

Při průchodu elektrického proudu skrz základní elektrolyt dochází ke generaci tzv. Joulova tepla, které ohřívá základní elektrolyt. V důsledku toho vznikají v kapiláře teplotní gradienty a také lokální změny viskozity separačního elektrolytu, které následně deformují píkový profil EOFu a lokálně ovlivňují elektroforetické mobility analytů. Tvorbu Joulova tepla lze omezit pomocí snížení intenzity elektrického pole aplikovaného na kapiláru, zmenšením průměru kapiláry nebo snížením koncentrace složek základního elektrolytu a tím i jeho vodivosti.²³

Jedním z efektů přispívajících k zvýšení celkové disperze je adsorpce analytu na stěnu separační kapiláry. V případě ireverzibilní adsorpce dochází ke ztrátě analytu, v případě reverzibilní adsorpce dochází k deformaci zón analytů, případně k zvýšení migračních časů. Adsorpci na stěnu separační kapiláry lze eliminovat pomocí úpravy povrchu vnitřní stěny kapiláry.²⁴

Další z efektů, který přispívá k zvýšení celkové disperze je elektromigrační disperze, která způsobuje deformaci ideálních gaussovských píků na tzv. trojúhelníkovité píky. Tento efekt lze do značné míry potlačit volbou vhodného složení základního elektrolytu.²⁵ V případě deformace píků v důsledku elektromigrační disperze neodpovídá migrační čas vrcholu píku jako u ideálního gaussovského tvaru píku. Migrační čas trojúhelníkovitých píků lze zjistit proložením píku Haarhoff-Van der Lindeho (HVL) funkcí.²⁶

Poslední z disperzních jevů vyskytujících se v CZE je podélná difúze. Difúze je transport hmoty vyvolaný koncentračními gradienty, který následně deformuje pístový profil elektroosmotického toku. Podélnou difúzi nelze potlačit, ale způsobuje symetrické rozmývání píků.

2.2.3 Elektroosmotický tok

Elektroosmotický tok, jeho rychlost a směr, musí být brány do úvahy při každém elektroforetickém experimentu. Časté jsou snahy o jeho modifikaci (tak aby byl v analýze prospěšný) nebo naopak o jeho úplné potlačení²⁴. V této práci je zařazen mezi rušivé jevy CE z důvodu jeho časté nestability a citlivosti i na malé změny vlastností základního elektrolytu nebo vnitřní stěny kapiláry. Výrazná je jeho závislost na pH a iontové síle.²⁷ EOF je silně závislý na hodnotě pH separačního elektrolytu, kdy dochází k disociaci silanolových skupin, rychlost EOFu se v rozmezí pH 3-8 zvyšuje až čtyřnásobně, naopak v hodnotách nízkého pH je elektroosmotický tok nestabilní, jelikož silanolové skupiny jsou pouze částečně disociovány.² Závislost elektroosmotického toku na iontové síle byla také již dostatečně prostudována a bylo prokázáno, že s rostoucí iontovou silou separačního elektrolytu klesá rychlost elektroosmotického toku.²⁸

S řešením jak eliminovat vliv nestabilního EOFu přišli Vigh a kol.²⁹ pomocí tlakem modifikované kapilární elektroforézy (PremCE). Tato metoda spočívá v tom, že je analyt s elektroneutrálním markerem pomocí tlaku natlačen do termostatované části kapiláry, následně je na kapiláru aplikováno napětí, kdy dochází k rozdělení separované látky a elektroneutrálního markeru, poté je vypnuto napětí a je nadávkován na začátek kapiláry další elektroneutrální marker. Vše je následně pouze tlakem protlačeno skrz kapiláru k detektoru. Tato metoda řeší i některé další problémy klasické kapilární elektroforézy. Díky migraci pouze v termostatované části kapiláry je redukován vliv tvorby Joulova tepla. Umožňuje také výpočet elektroforetické mobility analytu i v systémech s velmi pomalým EOF (například nízké pH). Blíže je princip PremCE metody popsán v experimentální části této práce.

2.3 Afinitní kapilární elektroforéza

Afinitní kapilární elektroforéza je v současné době jedním z nejvyužívanějších módů CE, kdy se využívá cílené interakce látek za účelem zvýšení separační účinnosti.⁷ Afinitní kapilární elektroforéza (ACE) je využívána hlavně při chirálních separacích, kdy dochází ke komplexaci chirálního selektoru s jednotlivými enantiomery analytu. K separaci dochází, pokud jsou vzniklé komplexy různě stabilní, nebo mají-li odlišnou elektroforetickou mobilitu. Jako nejčastěji používaná komplexační činidla, případně chirální selektory lze zmínit cyklodextriny, korunové ethery, makrocyclická antibiotika nebo polysacharidy.³⁰

ACE lze také využít ke stanovení komplexačních konstant. Interakci (komplexaci) látek lze popsat následující rovnicí



kde analyt (A) a komplexující činidlo (C) přítomné v základním elektrolytu tvoří komplex AC. Rovnovážná konstanta K v rovnici (1) - komplexační konstanta - je dána jako podíl aktivit komplexu a jednotlivých složek A a C:

$$K = \frac{a_{AC}}{a_A * a_C} \quad (2)$$

Často se pracuje se zdánlivou komplexační konstantou K' , kde jsou uvažovány pouze rovnovážné koncentrace jednotlivých složek:

$$K' = \frac{[AC]}{[A][C]} \quad (3)$$

K' tedy závisí na iontové síle roztoku.

Nejčastějším uspořádáním při stanovení komplexační konstanty komplexu AC je měření závislosti efektivní mobility dávkovaného analytu na koncentraci komplexujícího činidla v BGE. Je-li analyt při daných podmínkách plně nabitý, lze

odvodit, že mobilita analytu pak závisí na rovnovážné koncentraci volného komplexujícího činidla podle následující rovnice:

$$\mu_{A,ef} = \frac{\mu_A + \mu_{AC}K'[C]}{1 + K'[C]} \quad (4)$$

Kde μ_A je mobilita analytu a μ_{AC} je mobilita komplexu. Mobilita samotného analytu při dané iontové síle je většinou známa nebo ji zjistíme z měření při nulové koncentraci komplexujícího činidla. Mobilita komplexu je dalším parametrem, který získáme regresní analýzou naměřených dat rovnicí (4).

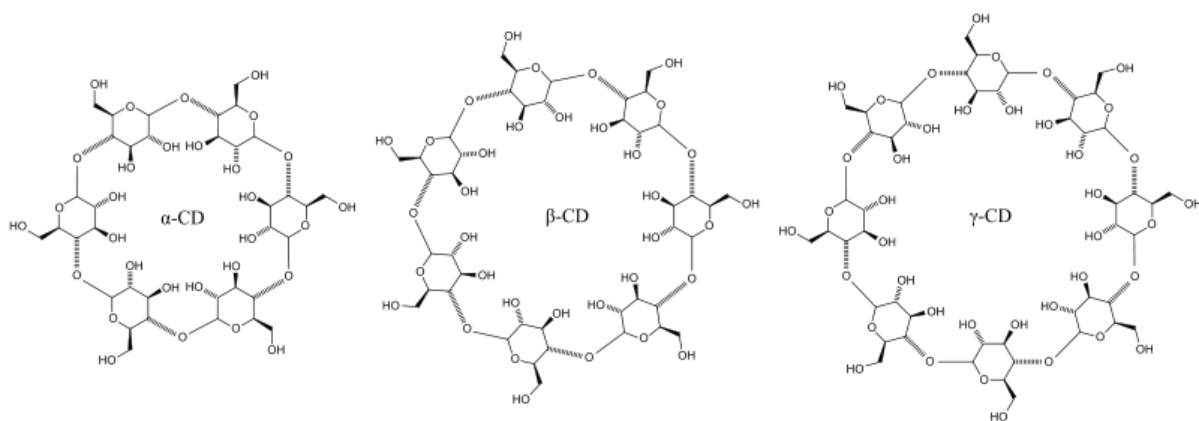
Stanovení konstant komplexace lze provést dvěma způsoby. Prvním z nich je měření za konstantní iontové síly. (Používáme-li nabitě komplexační činidlo, je při jeho zvyšující se koncentraci snižována koncentrace pufru.) Proložení dat rovnicí (4) pak získáme zdánlivou komplexační konstantu K' , platnou pro danou iontovou sílu. Termodynamická konstanta komplexace K se pak může získat následnou korekcí, pokud známe příslušné aktivitní koeficienty (viz kap. 2.5.1).

Pokud používáme nabitě komplexační činidlo je pak častější, že koncentrace pufru základního elektrolytu je zachována a zvyšuje se pouze koncentrace komplexačního činidla. Neměříme pak za konstantní iontové síly a korekce mobility komplexu μ_{AC} na iontovou sílu musí být obsažena již v regresní rovnici (4).^{16,31} Korekce na iontovou sílu bude podrobněji popsána v kapitole 2.5.

Získané komplexační konstanty a limitní mobility komplexačních činidel a jejich závislost efektivních mobilit na iontové síle jsou nezbytné pro přesné výsledky simulačních programů afinitní kapilární elektroforézy.³²

2.4 Cyklodextriny

Mezi nejčastěji používaná komplexační činidla patří cyklodextriny.³³ Cyklodextriny jsou cyklické oligosacharidy skládající se z šesti až osmi glukózových zbytků spojených do cyklických makromolekul.



Obr. 1 Struktury jednotlivých nativních α, β, γ cyklodextrinů

Jak je patrné z Obr. 1 liší se jednotlivé cyklodextriny velikostí molekuly a také velikostí vnitřní dutiny tzv. kavity, která je na rozdíl od povrchu cyklodextrinu hydrofóbní. Právě v této kavitě dochází nejčastěji k interakcím s jednotlivými analyty. Cyklodextriny jsou ve své nativní formě (Obr. 1) nenabitě (pK_a se pohybuje kolem 12,2).

Chemickou modifikací nativních cyklodextrinů jsou připravovány různé deriváty cyklodextrinů, jak neutrální, tak nabitě – anionické i kationické.³⁴ Substituované cyklodextriny jsou však ve většině případů substituovány náhodně, používají se tedy směsi izomerů, které mohou nést různý počet nábojů. V ACE se pak tedy chovají jako směs nedefinovaných chirálních selektorů. Přesně určené deriváty cyklodextrinů jsou velmi drahé, ale jejich elektroforetické chování lze lépe popsat.

2.5 Korekce na iontovou sílu

Kromě teplotních a viskozitních korekcí¹⁶ je korekce na iontovou sílu jednou z nejdůležitějších při stanovování rovnovážných konstant a elektroforetických mobilit.

2.5.1 Korekce komplexačních konstant na iontovou sílu

Při stanovení komplexačních konstant je nutné provést korekci na iontovou sílu přes výpočet aktivitních koeficientů. To nám umožní ze zdánlivé komplexační

konstanty získat pravou termodynamickou konstantu komplexace podle následujícího vztahu:

$$K = \frac{[AC]}{[A][C]} \frac{\gamma_{AC}}{\gamma_A \gamma_C} = K' \frac{\gamma_{AC}}{\gamma_A \gamma_C} \quad (5)$$

Kde $\gamma_{AC}, \gamma_A, \gamma_C$ jsou jednotlivé aktivní koeficienty.

Jak je patrné z rovnice (5), nejjednodušší je situace v případě neutrálního analytu a neutrálního komplexačního činidla, kdy jsou všechny aktivní koeficienty jednotkové a zdánlivá komplexační konstanta je rovna termodynamické. Případ neutrálního analytu a nabitého komplexačního činidla (cyklodextrinu) popisují ve své práci Beneš a kol.¹⁶. I když neznají hodnoty γ_{AC} a γ_C , považují je za shodné kvůli jejich stejnému náboji a také velmi podobné velikosti (analyt je vnořen uvnitř CD kavity). V takovém případě se tedy zdánlivá komplexační konstanta opět rovná termodynamické komplexační konstantě.

V systémech, kde je však komplexační činidlo i analyt ionogenní látkou, je nutné hodnoty aktivních koeficientů vyčíslit. Nejčastěji je využíván rozšířený Debye–Hückelův limitní zákon³⁵:

$$\log \gamma_{\pm} = -Az_i^2 \frac{\sqrt{I}}{1 + Ba\sqrt{I}} \quad (6)$$

Kde a popisuje velikost daného iontu, z_i je náboj i -té složky, I je iontová síla základního elektrolytu a A a B jsou konstanty pro danou teplotu a rozpouštědlo. Pro vypočtení aktivních koeficientů je tedy nutné znát jejich parametr a , který charakterizuje velikost daného iontu, tento parametr bývá teoreticky vypočítáván a následně je pomocí něho spočten aktivní koeficient dané látky v konkrétním elektrolytu. Po zjištění aktivních koeficientů je pomocí rovnice (5) provedena korekce na iontovou sílu pro zjištění termodynamické komplexační konstanty.

2.5.2 Korekce elektroforetických mobilit na iontovou sílu

Elektroforetická mobilita je také funkcí iontové síly základního elektrolytu.³⁶ Z tohoto důvodu je nutné při stanovení komplexačních konstant provést korekci elektroforetických mobilit na iontovou sílu základního elektrolytu. Tyto korekce je možné provést pomocí rozšířeného Onsangerova limitního zákona pro elektroforetickou mobilitu:

$$\mu_{-} = \mu_{0,-} - \left(\mu_{0,-} B_1 z_+ |z_{-}| \frac{q}{1 + \sqrt{q}} + |z_{-}| B_2 \right) \frac{\sqrt{I}}{1 + B\alpha\sqrt{I}} \quad (7)$$

Kde μ_{-} je mobilita aniontu, $\mu_{0,-}$ je limitní mobilita aniontu, konstanta α charakterizuje velikost iontu, konstanty q , B , B_1 a B_2 jsou konstanty pro danou teplotu a daná prostředí, z_{-} a z_{+} jsou nábojová čísla aniontu a kationtu a I je iontová síla. Pro kationty je vztah analogický.

Rozšířený Onsangerův limitní zákon byl odvozen pro bodový náboj, tedy dobře popisuje chování malých sférických molekul s vysokou povrchovou hustotou náboje. V případě velkých organických molekul, často nesymetrických, které mají malou povrchovou hustotu náboje nebo naopak velké organické molekuly nesoucí mnoho nábojů (jako jsou námi studované cyklodextriny) jsou pozorovány značné odchylky od Onsagerova zákona. V těchto případech je nutné tuto závislost experimentálně stanovit.

Pro zjištění závislosti elektroforetické mobility na iontové síle u molekul, které se neřídí podle rozšířeného Onsangerova zákona byly odvozeny empirické vztahy, které se tuto závislost pokoušejí popsat.

Jednou z prvních empirických rovnic, která popisuje závislost elektroforetické mobility na iontové síle byla odvozena Kenndlerem a spol.³⁶ a platí pro nábojová čísla iontů od 1 do 3 a iontových sil do 0,01 M:

$$\mu_{-} = \mu_{0,-} \exp(-0,5z^{1,78}\sqrt{I}) \quad (8)$$

Další z těchto empirických rovnic, vycházejících z práce Kenndlera je rovnice odvozena Friedlem a kol.³⁶:

$$\mu_{-} = \mu_{0,-} \exp(-az^b I^c) \quad (9)$$

Kde konstanty a, b a c jsou parametry empirické rovnice. V práci Friedla a kol. tato rovnice byla použita pro ionty se 2 - 6 náboji a iontové síle BGE do 0,1 M.

Následně byla odvozena obecná empirická rovnice v práci Lucy a kol¹⁵:

$$\mu_{-} = \mu_{0,-} - \frac{P_1 \sqrt{I}}{1 + P_2 \sqrt{I}} \quad (10)$$

Kde parametry P_1 a P_2 jsou parametry, obsahující jednotlivé konstanty z rozšířeného Onsangerova zákona. Tato rovnice byla v práci Beneše³⁷ vybrána jako vhodná pro proložení závislosti efektivní mobility nabitých cyklodextrinů na iontové síle a stanovení limitních mobilit.

3 Cíle práce

Cíle této bakalářské práce lze shrnout do několika bodů:

- Teoretické i praktické seznámení se základními pojmy a principy kapilární elektroforézy
- Proměření závislosti efektivních elektroforetických mobilit čtyř vybraných definovaných vícenásobně nabitých cyklodextrinů na iontové síle metodami PremCE a klasickou kapilární elektroforézou
- Vyhodnocení dat pomocí vybrané regresní funkce a stanovení limitních elektroforetických mobilit jednotlivých cyklodextrinů
- Porovnání výsledků získaných pro různé cyklodextriny PremCE a klasickou CE metodou

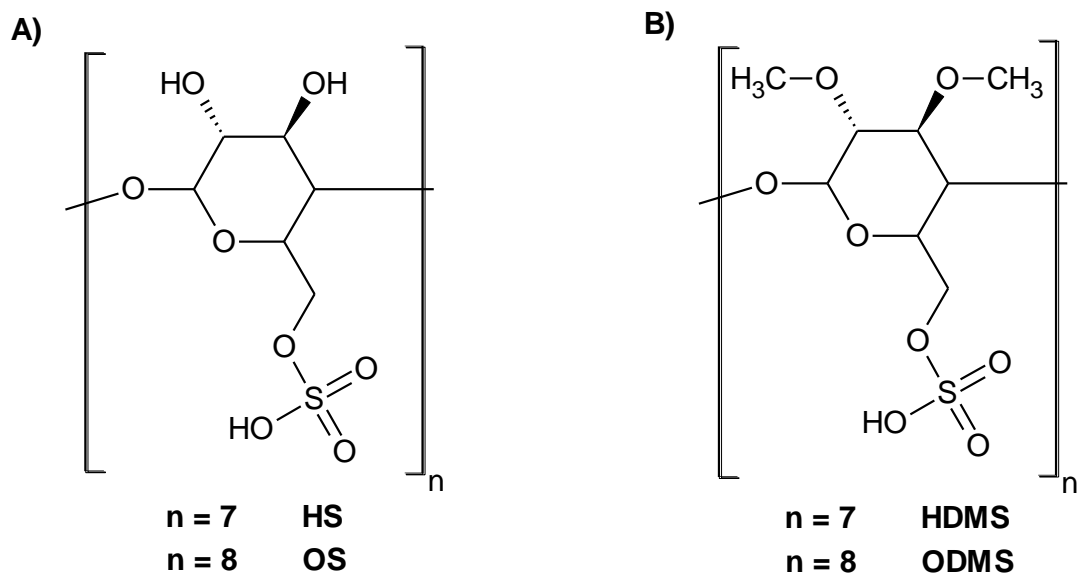
4 Experimentální část

4.1 Použité chemikálie a přístroje

Jako analyty byly použity modifikované cyklodextriny:

- sodná sůl oktakis(6-O-sulfo)- γ -cyclodextrinu (OS), osmimocný aniontový γ -cyclodextrin³⁸
- sodná sůl oktakis(2,3-di-O-methyl-6-O-sulfo)- γ -cyclodextrinu (ODMS), osmimocný aniontový 2,3-dimethylovaný γ -cyclodextrin³⁹
- sodná sůl heptakis(6-O-sulfo)- β -cyclodextrinu (HS), sedmimocný aniontový β -cyclodextrin⁴⁰
- sodná sůl heptakis(2,3-di-O-methyl-6-O-sulfo)- β -cyclodextrinu (HDMS), sedmimocný aniontový 2,3-dimethylovaný β -cyclodextrin⁴¹

Tyto definované cyklodextriny nám daroval prof. G.Vigh, Texas A&M University(USA). Struktura uvedených CD je znázorněna na Obr. 2.



Obr. 2 A) glukózová podjednotka (6-O-sulfatovaného)cyclodextrinu; B) glukózová podjednotka (2,3-di-O-methyl-6-O-sulfatovaného) cyclodextrinu; $n=7$, derivát β -cyclodextrin, $n=8$, deriváty γ -cyclodextrin

Jako základní elektrolyt byl použit mravenčanový pufr. K přípravě tohoto pufru byla použita kyselina mravenčí (Sigma-Aldrich, Německo, >95%) a monohydrát hydroxidu lithného (Sigma-Aldrich, Německo, >99%). Jako marker, sloužící k určení mobility EOF byl použit mezi mesityloxid (MO) (Sigma-Aldrich, Německo, >90%). K přípravě roztoků byla použita voda deionizovaná systémem ULTRAPUR (Watrex, Česká republika). K proplachování kapiláry byl používán 0,1 M roztok NaOH (Agilent Technologies, Německo).

Všechna měření probíhala na přístroji pro kapilární elektroforézu HP^{3D}CE (Agilent Technologies, Německo), se zabudovaným UV-Vis detektorem s diodovým polem (DAD), který měří v rozsahu vlnových délek 190 – 600 nm a vodivostním detektorem navrženým v naší laboratoři (CCD).⁴² Přístroj pro kapilární elektroforézu byl řízen počítačem pomocí programu ChemStation (verze B.01.03) (Agilent Technologies, Německo), který zároveň zaznamenával výsledné elektroferogramy. Získaná data byla následně exportována a vyhodnocována v programu Origin 8.1 (OriginLab, Velká Británie). Ve stejném softwaru probíhala také regresní analýza naměřených dat. K výpočtům sloužil také MS Excel 2003 (Microsoft, USA).

Experimenty byly prováděny v křemenné kapiláře potažené polyimidem (Labicom s.r.o, Česká republika), která měla vnitřní průměr 50 μm a vnější 375 μm . Celková délka kapiláry byla 50,1 cm, vzdálenost k DAD detektoru byla 41,6 cm a k CCD detektoru pak 35,1 cm.

4.2 Experimentální podmínky a postupy

Před prvním měřením byly očištěny elektrody přístroje v ultrazvukové lázni po dobu 10 minut v deionizované vodě a poté 10 minut v izopropanolu. Poté byla nově připravená kapilára propláchnuta 0,1 M roztokem NaOH, deionizovanou vodou a před každým měřením 5 minut aktuálně používaným základním elektrolytem.

Byly připraveny zásobní roztoky kyseliny mravenčí ($c = 1 \text{ M}$), hydroxidu lithného ($c = 0,5 \text{ M}$) mesityloxydu ($c = 50 \text{ mM}$) a zásobní roztoky jednotlivých cyklodextrinů o koncentraci $c = 50 \text{ mM}$.

Pro dostatečné proměření závislosti nabitých cyklodextrinů na iontové síle byla ze zásobních roztoků připravena série mravenčanových pufrů o iontových silách $I = 0,34 \text{ mM} - 100,28 \text{ mM}$ a o maximální pufrační kapacitě, tedy poměr kyseliny mravenčí a LiOH byl 2:1. Koncentrace obou složek v pufrch o dané iontové síle, pH a pufrační kapacita byly spočítány v programu PeakMaster¹⁹ a jsou uvedeny v Tab.1.

Tab. 1 Pufrační kapacity a hodnoty pH pro BGE o různých iontových silách vypočítaných v programu PeakMaster

BGE	I mM	c_{HCOOH} mM	c_{LiOH} mM	pH -	β mM
1	0,34	0,5	0,25	4,063	0,46
2	0,62	1	0,5	3,946	0,81
3	1,14	2	1	3,861	1,46
4	2,17	4	2	3,802	2,67
5	3,18	6	3	3,777	3,85
6	5,19	10	5	3,753	6,18
7	10,21	20	10	3,726	11,98
8	20,23	40	20	3,704	23,53
9	30,24	60	30	3,692	35,07
10	40,25	80	40	3,683	46,60
11	50,25	100	50	3,676	58,13
12	60,26	120	60	3,670	69,66
13	80,27	160	80	3,662	92,71
14	100,28	200	100	3,655	115,75

Jak je zřejmé z Tab. 1, pH jednotlivých BGE není konstantní, což by ale nemělo mít vliv na stupeň disociace studovaných cyklodextrinů, jelikož jsou modifikovány silně kyselými skupinami. Sulfátová skupina navázaná na glukózovou jednotku cyklodextrinu (viz Obr. 2A a 2B) má podle výpočtů v programu Sparc Online Calculator⁴³ $pK_A = 0,7$. Předpokládáme tedy, že i CD jako celek bude silným elektrolytem. Hodnota pH byla experimentálně změřena pouze u zásobních roztoků, tyto hodnoty se shodovaly s hodnotami spočítanými v programu PeakMaster¹⁹. Jak lze pozorovat z Tab. 1 disponují pufrы s nízkou iontovou silou také nízkou pufrací kapacitou, tento fakt však při obou metodách nijak neovlivňuje naměřené hodnoty.

Jelikož cyklodextriny neabsorbují v UV-Vis části spektra, byl k jejich detekci používán vodivostní detektor. Bylo tedy nutné v každém BGE vyvolat nadávkováním vzorku dostatečně velkou vodivostní poruchu. Z toho důvodu se koncentrace cyklodextrinu ve vzorku zvyšovala s rostoucí iontovou silou BGE, avšak koncentrace BGE ve vzorku byla stále konstantní. Složení vzorků pro jednotlivé BGE je uvedeno v Tab. 2.

K odlišení systémových píků od píků analytu byl v několika měřeních nadávkován slepý vzorek neobsahující žádný cyklodextrin. Vzorek byl dávkován v obou metodách hydrodynamicky, tlakem 10 mbar po dobu 10 sec v PremCE metodě a tlakem 30 mbar po dobu 3 s klasickém uspořádání.

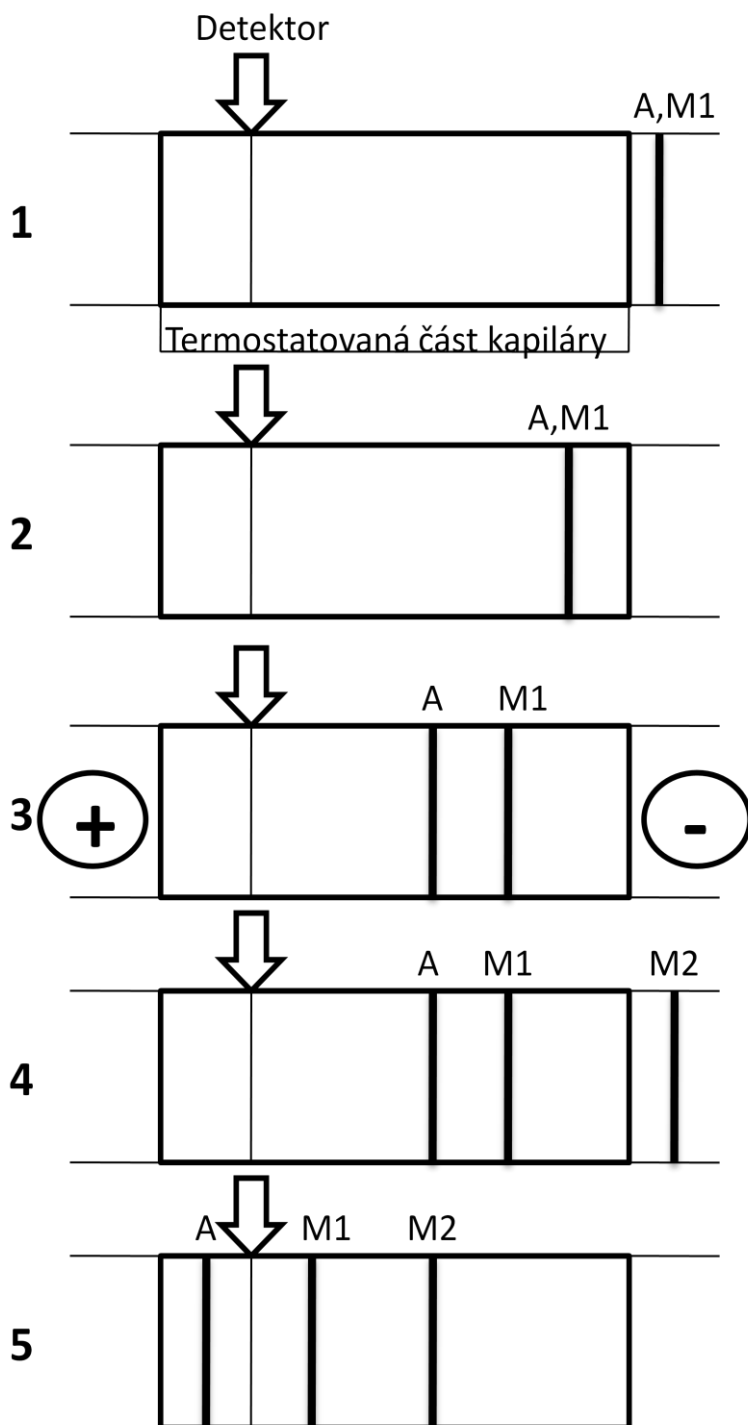
Tab.2 Koncentrace mesityloxydu a cyklodextrinů ve vzorcích pro jednotlivé BGE

BGE	<i>I</i> mM	c_{MO} mM	c_{CD} mM
1	0,34	5,0	0,25
2	0,62	5,0	0,4
3	1,14	5,0	0,7
4	2,17	5,0	0,9
5	3,18	5,0	1,1
6	5,19	5,0	1,3
7	10,21	5,0	1,5
8	20,23	5,0	1,7
9	30,24	5,0	1,9
10	40,25	5,0	2,5
11	50,25	5,0	3,5
12	60,26	5,0	4,5
13	80,27	5,0	5,5
14	100,28	5,0	6,5

K vyšetřování závislosti efektivní mobility studovaných cyklodextrinů na iontové síle byly vybrány dvě metody. První metodou je PremCE, jejíž výhody byly blíže zmíněny v teoretickém úvodu. Realizace PremCE metody je znázorněna na Obr. 3. Na počátku je nadávkován vzorek, který obsahuje analyt (A) a elektroneutrální marker (M1). Zóna vzorku je poté pomocí tlaku zatlačena do termostatované části kapiláry (bod 2). Následně je po dobu t_{migr} aplikováno napětí a dochází k elektromigraci daného analytu a jeho oddělení od markeru M1 (bod 3). V dalším kroku (bod 4) je napětí vypnuto a je opět nadávkován elektroneutrální marker (M2). V konečném kroku (bod 5) jsou analyt i oba markery protlačeny skrz kapiláru, kde pomocí markeru (M2) je určen čas, potřebný k protlačení markeru skrze kapiláru. Z tohoto času lze pak určit rychlost protlačování v posledním kroku. Známe-li rychlost protlačování a známe-li ze záznamu časový odstup píků A a M1, můžeme vypočítat jakou vzdálenost urazil analyt od markeru 1 během času t_{migr} . Efektivní mobilita analytu je proto dána vztahem:

$$\mu_{ef} = \frac{l_c l_{\text{DAD}} (t_{\text{M1}} - t_A)}{U t_{\text{migr}} (t_{\text{M2}} - t_p)} \quad (11)$$

kde l_c je délka kapiláry, l_{DAD} je délka kapiláry k DAD detektoru, U je aplikované napětí, t_{migr} je čas po který je aplikováno napětí, t_p je čas od kterého byl aplikován tlak a $t_{\text{M1}}, t_{\text{M2}}$ a t_A jsou jednotlivé migrační časy markerů a analytu.



Obr. 3 Schéma průběhu metody PremCE v bodech 1-5, kde A značí analyt a M1 a M2 značí EOF markery

V našem případě byly detekční čas analytu (cyklodextrinu) a M1 markeru odečítány z vodivostního signálu (cyklodextriny neabsorbují v UV-Vis oblasti). Detekční

čas M2 byl pak odečítán z UV absorpčního signálu při $\lambda = 254$ nm. Při vyšších iontových silách ($I > 40,25$ mM) byl občas vodivostní elektroferogram velmi nečitelný, tudíž byly detekční časy M1 i cyklodextrinů odečteny z UV absorpčního signálu při $\lambda = 195$ nm, kde při vyšších koncentracích BGE docházelo k nepřímé UV detekci⁴⁴.

V klasickém uspořádání kapilární elektroforézy je nutné k výpočtu efektivní mobility znát jak mobilitu analytu, tak i mobilitu EOF. V případě, že je EOF velmi pomalý, nebo směřuje od detektoru, chybí na záznamu pík EOF markeru a efektivní mobilita analytu nemůže být spočítána. Jelikož při našich měřeních byl z důvodu nízkého pH EOF velmi pomalý, byla klasická metoda modifikována a kromě napětí byl po dobu analýzy aplikován také tlak 50 mbar. Za předpokladu konstantního tlaku jsou pak analyt i marker urychleny stejně a efektivní mobilita se vypočítá, stejně jak v klasickém uspořádání, jako rozdíl pozorovaných mobilit analytu a EOF markeru. Takto modifikovaná klasická metoda byla použita jako srovnávací metoda k PremCE.

Migrační čas cyklodextrinu byl opět odečítán z vodivostního signálu a detekční čas EOF markeru (MO) z UV $\lambda = 254$ nm. Každé měření bylo opakováno třikrát. U obou metod byla zaznamenávána také hodnota aplikovaného tlaku a bylo tak potvrzeno, že je přístroj schopen udržovat konstantní tlak. Odchyly od zadaných hodnot byly minimální.

5 Výsledky a diskuze

5.1 Závislost mobility cyklodextrinů na iontové síle BGE

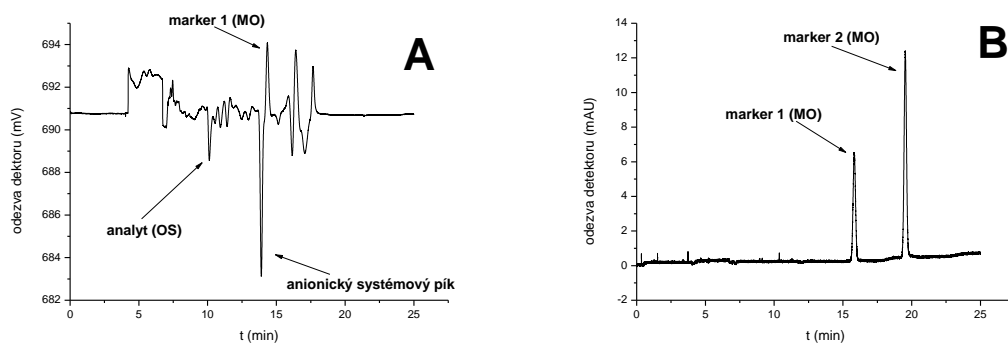
5.1.1 PremCE metoda

Při měření závislosti mobility cyklodextrinů na iontové síle elektrolytu metodou PremCE bylo nutné metodu vhodně optimalizovat. Z toho důvodu, aby rozdíl detekčních časů markeru a analytu byl co největší, ale zároveň, aby byl analyt vhodně detekován, a také nedocházelo k příliš velké generaci Joulova tepla. Hodnoty napětí (U) a délka jeho aplikace (t_{migr}) pro jednotlivé iontové síly jsou shrnuty v Tab. 3. Aplikovaný tlak měl vždy hodnotu 30 mbar.

Tab.3 Optimalizované hodnoty parametrů metody PremCE pro dané iontové síly

I	U	t_{migr}
mM	kV	min
0,34- 2,17	-10	1,5
3,18 - 30,24	-10	2,5
40,25 - 60,26	-5	5
80,27 - 100,28	-10	5

Na Obr. 4 je ukázka elektroferogramů získaných pro analyt OS při iontové síle $I = 30,24$ mM z vodivostního (Obr. 4A) a z DAD detektoru při $\lambda = 254$ nm (Obr. 4B). Na Obr. 4A je cyklodextrin OS reprezentován jako záporný pík. Marker 1 je reprezentován kladným píkem, před nímž je systémový pík se zápornou pohyblivostí. Při odečítání migračního času analytů nebylo možné jej odečítat jako prostý vrchol píku, jelikož píky podléhají elektromigrační disperzi. K získání správného migračního času byly proto píky fitovány HVL funkcí²⁶. U píků EOF markerů, které mají ideální gaussovský tvar, byl jako migrační čas brán vrchol píku.



Obr.4A) Vodivostní signál pro analyt OS při iontové síle BGE $I = 30,23$ mM, B) záznam pořízený DAD detektorem při $\lambda = 254$ nm pro stejné měření.

Migrační čas markeru 2 byl odečítán z elektroferogramu DAD při 254 nm Obr. 4B. Marker 1, ačkoliv je lépe pozorovatelný při UV detekci, byl vyhodnocován z vodivostní detekce Obr. 4A, jelikož z principu PremCE metody je patrné, že analyt a marker 1 musí být detekovány stejným detektorem. Efektivní mobilita analytu byla počítána podle rovnice (11).

V Tab. 4 jsou vypočtené hodnoty efektivních mobilit všech studovaných cyklodextrinů naměřených metodou PremCE.

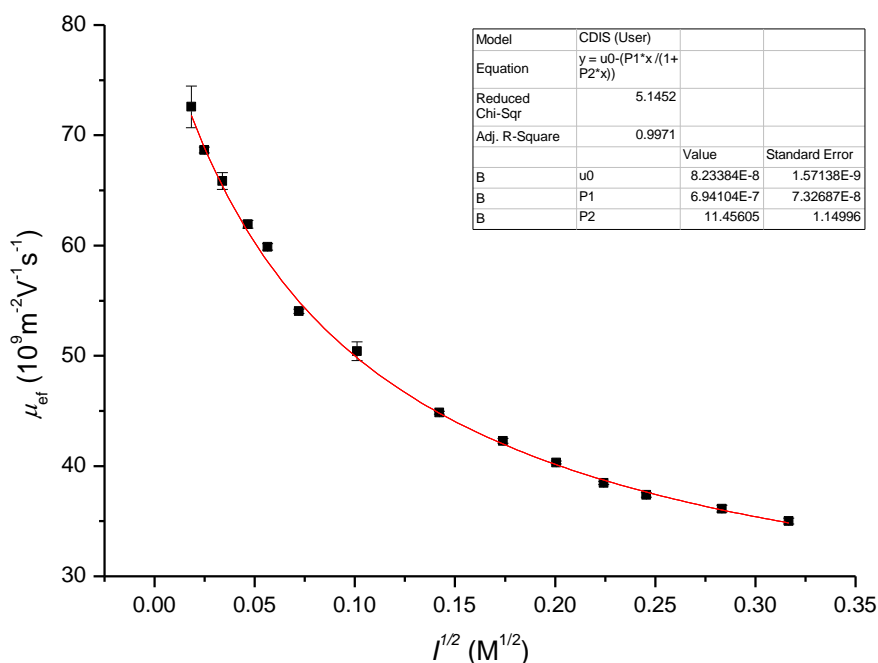
Tab.4 Vypočtené efektivní mobility (jejich absolutní hodnoty) a jejich směrodatné odchylky pro jednotlivé cyklodextriny metodou PremCE

<i>I</i> mM	$\mu_{ef} \pm s$ $10^9 \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$			
	OS	ODMS	HS	HDMS
0,34	72,6±1,8	61,3±0,5	70,9±0,5	63,0±0,5
0,62	68,7±0,3	59,7±0,8	67,1±0,6	59,7±0,5
1,14	65,8±0,8	56,8±0,2	65,6±0,6	58,4±0,3
2,17	61,9±0,4	53,8±0,1	62,1±0,6	57,1±0,5
3,18	59,9±0,3	52,7±1,2	59,1±0,3	55,1±0,7
5,19	54,0±0,2	51,3±0,3	56,0±0,1	50,9±0,6
10,21	50,4±0,9	45,8±0,1	51,5±0,2	46,4±0,8
20,23	44,8±0,1	40,5±0,8	45,3±0,9	41,4±0,3
30,24	42,3±0,2	38,7±0,3	42,2±0,5	40,2±0,5
40,25	40,3±0,1	35,9±0,5	38,8±0,3	36,2±0,2
50,25	38,5±0,1	34,9±0,2	37,4±0,3	35,4±0,4
60,26	37,4±0,2	33,5±0,3	36,4±0,4	34,3±0,2
80,27	36,1±0,3	32,2±0,6	35,7±0,5	33,0±0,2
100,28	35,0±0,2	31,7±0,5	34,5±0,2	32,3±0,3

V programu Origin 8.1 byly vyneseny hodnoty efektivních mobilit v závislosti na druhé odmocnině iontové síly a data byla proložena následující regresní funkcí:^{15,37}

$$\mu_{ef} = \mu_0 - \frac{P_1 \sqrt{I}}{1 + P_2 \sqrt{I}} \quad (10)$$

Parametr μ_0 představuje požadovanou hodnotu limitní mobility, P_1 a P_2 jsou empirické parametry, které nemají fyzikální význam. Na Obr. 5 je závislost efektivní mobility na odmocnině z iontové síly proložená rovnicí (10) pro cyklodextrin OS.



Obr.5 Závislost efektivní mobility cyklodextrinu OS na odmocnině iontové síly BGE, černé čtverce - experimentální data, chybové úsečky reprezentují směrodatnou odchylku, červená křivka proložení rovnicí (10)

Jak je patrné z Obr.5 zvolená regresní funkce (rovnice (10)) dobře odpovídala naměřeným hodnotám ($R^2 = 0,997$) a získané parametry byly získány s chybou v rozmezí 2 - 10 %. Výsledné hodnoty parametrů rovnice (10) pro OS i ostatní cyklodextriny jsou uvedeny v Tab. 5.

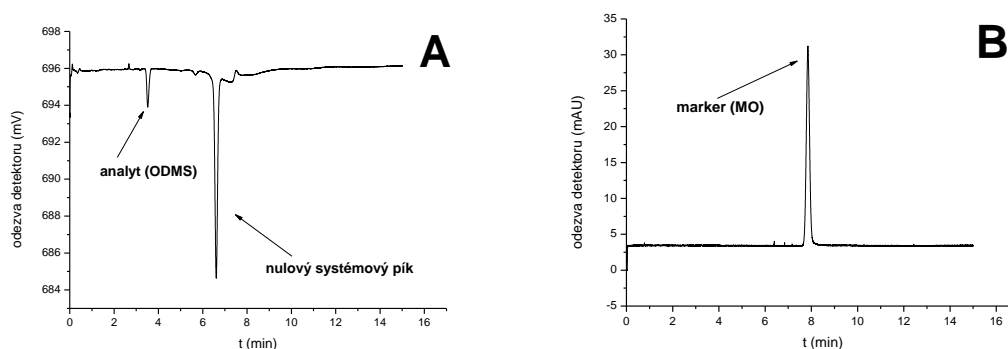
Tab. 5 Hodnoty limitních mobilit studovaných cyklodextrinů a parametry P_1 a P_2 rovnice (10) s příslušnými chybami získané metodou PremCE

	$\mu_0 \pm s$	$P_1 \pm s$	$P_2 \pm s$
analyt	$10^9 \text{ m}^{-2}\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$	-	-
OS	$82,3 \pm 1,6$	$6,94 \pm 0,73$	$11,5 \pm 1,1$
ODMS	$65,5 \pm 0,7$	$3,16 \pm 0,25$	$5,93 \pm 0,6$
HS	$78,8 \pm 1,6$	$4,98 \pm 0,58$	$7,91 \pm 0,9$
HDMS	$70,3 \pm 1,5$	$4,49 \pm 0,68$	$8,43 \pm 1,4$

5.1.2 Klasická metoda

Vedle metody PremCE byla jako srovnávací metoda použita klasická metoda. Z důvodu velmi pomalého elektroosmotického toku byl ihned po nadávkování vzorku aplikován přidavný konstantní tlak 50 mbar.

Na Obr. 6 je ukázka elektroferogramů získaných pro analyt ODMS při iontové síle $I = 30,24 \text{ mM}$ z vodivostního (Obr. 6A) a z DAD detektoru při 254 nm (Obr. 6B)



Obr.6A) Vodivostní signál pro analyt ODMS při iontové síle BGE $I = 30,23 \text{ mM}$. B) záznam pořízený DAD detektorem při $\lambda = 254 \text{ nm}$ pro stejné měření.

Na záznamu vodivostního detektoru byl pík analytu reprezentován záporným píkem. Pík analytu byl z důvodu působení elektromigrační disperze fitován opět HVL funkcí. Jak je patrné při porovnání elektroferogramů z klasické metody s elektroferogramy z metody PremCE (Obr. 4A a 4B), byly záznamy z klasické metody přehlednější a pík analytu se snáze detekoval.

Efektivní mobilita tedy byla spočtena jako rozdíl mobility analytu a mobility EOF:

$$\mu_{\text{ef}} = \mu_{\text{Analyt}} - \mu_{\text{EOF}} \quad (12)$$

Jednotlivé mobility spočteme podle rovnice:

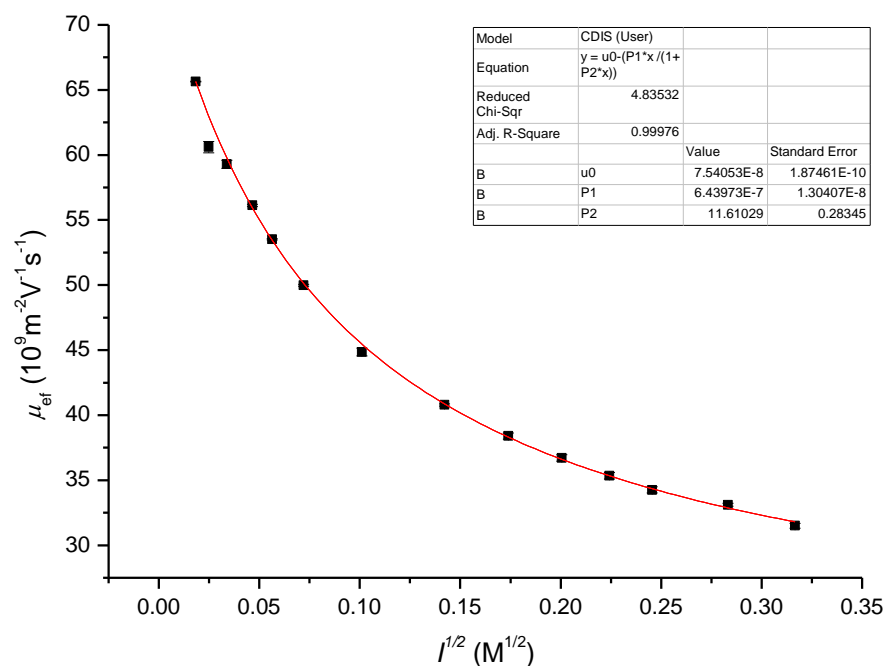
$$\mu_i = \frac{l_{\text{DET}} * l_c}{U * t_i} \quad (13)$$

Kde l_{DET} je délka kapiláry k detektoru (v případě cyklodextrinu CCD detektor, v případě EOF markeru DAD detektor), l_c je celková délka kapiláry, U je vkládané napětí a t_i je migrační čas i -té složky. Tímto způsobem byly spočteny všechny efektivní mobility všech cyklodextrinů pro jednotlivé iontové síly. Výsledky jsou uvedeny v Tab. 6.

Tab. 6 Vypočtené efektivní mobility (jejich absolutní hodnoty) a jejich směrodatné odchylky pro jednotlivé cyklodextriny klasickou metodou

<i>I</i> mM	$\mu_{\text{ef}} \pm s$ $10^9 \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$			
	OS	ODMS	HS	HDMS
0,34	76,6±0,4	65,6±0,0	69,9±0,1	66,1±1,6
0,62	75,4±1,6	60,6±0,4	66,0±0,3	64,2±0,3
1,14	69,2±0,7	59,3±0,3	62,9±0,1	61,1±0,5
2,17	63,3±0,4	56,1±0,1	59,9±0,3	56,9±0,4
3,18	61,3±0,2	53,5±0,0	58,6±0,5	54,0±0,2
5,19	56,0±0,6	50,0±0,1	54,3±0,1	50,0±0,3
10,21	50,4±0,7	44,9±0,3	49,6±0,2	45,4±0,2
20,23	43,3±0,2	40,8±0,1	44,4±0,2	40,9±0,1
30,24	40,9±0,3	38,4±0,2	41,4±0,2	38,4±0,1
40,25	38,6±0,3	36,7±0,2	39,7±0,2	36,6±0,1
50,25	36,6±0,6	35,3±0,2	38,6±0,7	35,6±0,1
60,26	36,0±0,0	34,3±0,2	37,4±0,2	34,9±0,2
80,27	35,0±0,4	33,1±0,1	35,9±0,4	33,3±0,1
100,28	33,9±0,3	31,5±0,2	34,1±0,3	31,9±0,1

Poté byly vyneseny závislosti efektivních mobilit cyklodextrinů na druhé odmocnině iontové síly BGE a proloženy funkcí v rovnici (10). Příklad takové závislosti a regresní analýzy pro ODMS je uveden na Obr. 7



Obr.7 Závislost efektivní mobility cyklodextrinu ODMS na odmocnině iontové síly BGE, černé čtverce - experimentální data, chybové úsečky reprezentují směrodatnou odchylku, červená křivka proložení rovnicí (10)

Podobně jako u výsledků metody PremCE, získaná data výborně odpovídají zvolené regresní funkci $R^2 = 0,999$ a získané parametry měly chybu maximálně 9%. Výsledné hodnoty parametrů i s jejich chybami jsou uvedeny v Tab. 7.

Tab. 7 Hodnoty limitních mobilit studovaných cyklodextrinů a parametry P_1 a P_2 rovnice (10) s příslušnými chybami získané klasickou metodou

	$\mu_0 \pm s$	$P_1 \pm s$	$P_2 \pm s$
analyt	$10^9 \text{ m}^{-2} \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$	-	-
OS	$91,5 \pm 1,7$	$9,65 \pm 0,9$	$13,3 \pm 1,1$
ODMS	$75,4 \pm 0,2$	$6,44 \pm 0,13$	$11,6 \pm 0,3$
HS	$83,6 \pm 1,5$	$8,75 \pm 0,1$	$14,9 \pm 1,1$
HDMS	$79,2 \pm 0,8$	$7,92 \pm 0,4$	$13,7 \pm 0,6$

5.2 Porovnání a diskuze výsledků získaných metodami PremCE a klasickou CE

Po proměření závislostí efektivních mobilit na iontové síle a následném stanovení limitních mobilit pomocí klasické metody a metody PremCE byly následně tyto hodnoty porovnávány. V Tab. 8 jsou získané limitní mobility naměřené pomocí obou metod.

Tab. 8 Srovnání hodnot stanovených limitních mobilit a jejich směrodatných odchylek CD metodou PremCE a klasickou CE.

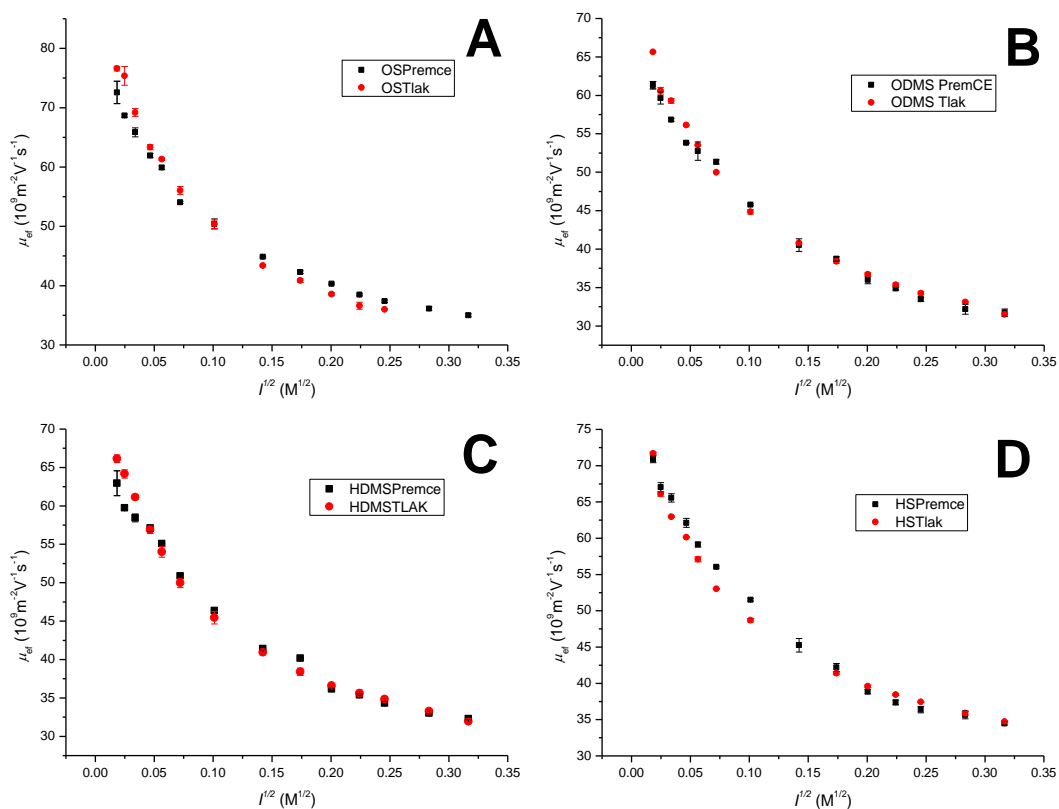
	PremCE	Klas. CE
analyt	$\mu_0 \pm s$	$\mu_0 \pm s$
	$10^9 \text{ m}^{-2}\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$	$10^9 \text{ m}^{-2}\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$
OS	82,3±1,6	91,5±1,7
ODMS	65,5±0,7	75,4±0,2
HS	78,8±1,6	83,6±1,5
HDMS	70,3±1,5	79,2±0,8

Jak je patrné z Tab. 8, limitní mobility cyklodextrinů se liší mezi sebou a zároveň se mobilita daného CD liší pro obě použité metody. Limitní mobility pro různé typy cyklodextrinů splňují naše předpoklady. Cyklodextriny, které mají navíc methylové skupiny (ODMS, HDMS) a jsou tak větší při stejném náboji (viz Obr. 2) jsou vždy pomalejší než jejich analoga bez těchto skupin bez ohledu na použitou metodu. U osmimocných CD (OS a ODMS) byl oběma metodami získán přibližně stejný rozdíl mobilit (přibližně $16,5 \times 10^9 \text{ m}^{-2}\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$). U sedmimocných CD (HS a HDMS) byl metodou PremCE pozorován rozdíl poloviční ($8,5 \times 10^9 \text{ m}^{-2}\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$). Klasickou metodou byl v tomto případě zaznamenán rozdíl pouze $4,4 \times 10^9 \text{ m}^{-2}\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$. ODMS je tak methylovými skupinami více zpomalen a jeho limitní mobilita je nižší než u HDMS. Z

nemethylovaných CD je rychlejší osmimocný OS, což naznačuje, že jeden náboj navíc oproti HS převáží nárůst velikosti o jednu glukózovou jednotku.

Zajímavý je rozdíl v hodnotách získaných pro daný CD různými metodami. Při porovnání limitních mobilit je zřejmé, že limitní mobility naměřené pomocí klasické metody dosahují vyšších hodnot. Kromě cyklodextrinu HS, kde je hodnota limitní mobility získaná klasickou metodou vyšší pouze o $4,8 \times 10^9 \text{ m}^{-2} \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ je u ostatních CD hodnota z klasické metody vyšší o přibližně stejnou hodnotu ($9 \times 10^9 \text{ m}^{-2} \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$). Tuto odchylku lze označit tedy jako systematickou.

Pro zjištění důvodu, proč se limitní mobility cyklodextrinů liší v rámci stejných cyklodextrinů změřených jinou metodou, byly porovnávány jejich závislosti mobilit na iontové síle (Obr. 8).



Obr. 8 Porovnání závislostí efektivních mobilit na iontové síle pro obě metody pro cyklodextriny OS (A), ODMS (B), HDMS (C), HS (D), kde červeně je klasická CE a černě metoda PremCE, černé čtverce - metoda PremCE, červené body - klasická metoda, chybové úsečky reprezentují směrodatnou odchylku

Z Obr.8 je patrné, že v hodnotách vysokých a středních iontových sil se efektivní elektroforetické mobility v podstatě shodují a obě závislosti jsou téměř identické. Při nízkých iontových silách ($I < 5,19$ mM) se tyto závislosti začínají lišit. Mobility naměřené klasickou metodou s aplikací tlaku dosahují vyšších hodnot než mobility změřené metodou PremCE. Jev je patrný u cyklodextrinů OS, ODMS a HDMS. U HS je vyšší hodnota mobility pouze pro nejnižší iontovou sílu. Odchylku hodnot při nízkých iontových silách se zatím nepodařilo uspokojivě vysvětlit.

I když se limitní mobility cyklodextrinů liší pro obě použité metody, pro pozdější stanovení konstant komplexace to nebude mít žádný negativní vliv. Při stanovení konstant komplexace se zpravidla pohybujeme v iontových silách přesahujících $I = 5$ mM, tudíž při korekci na iontovou sílu se již budeme pohybovat v oblasti, kde se závislosti mobilit na iontové síle získané oběma metodami shodují.

6 Závěr

V teoretické části této práce je zde popsán princip kapilární zónové elektroforézy a rušivé jevy doprovázející kapilární elektroforézu. Dále je v teoretické části popsán systém afinitní kapilární elektroforézy a jednotlivé korekce, které se při něm uplatňují, zejména korekce na iontovou sílu.

V experimentální části této práce byly proměřeny závislosti elektroforetických mobilit na iontové síle pro 4 vybrané definované, vícenásobně nabitě cyklodextriny. K získání efektivních mobilit těchto cyklodextrinů v BGE o různých iontových silách byly použity a srovnány dvě metody – kapilární elektroforéza v klasickém uspořádání s přidanou aplikací tlaku po dobu analýzy a metoda PremCE. Získané hodnoty limitních mobilit cyklodextrinů byly porovnány pro jednotlivé cyklodextriny i jednotlivé metody. Hodnoty pro jednotlivé CD splnily naše předpoklady. Dále byla zjištěna systematická odchylka hodnot limitních mobilit získaných oběma metodami. V rámci této bakalářské práce byly splněny všechny předem určené cíle.

7 Literatura

- (1) Štulík, K. *Analytické separační metody*; Karolinum: Praha, **2005**.
- (2) Kasicka, V. Teoretické základy a separační principy kapilárních elektromigračních metod. *Chem. Listy* **1997**, 329, 320–329.
- (3) Pacáková, V.; Coufal, P.; Štulík, K.; Gas, B. The importance of capillary electrophoresis, capillary electrochromatography, and ion chromatography in separations of inorganic ions. *Electrophoresis* **2003**, 24, 1883–91.
- (4) Boyce, M. C. Determination of additives and organic contaminants in food by CE and CEC. *Electrophoresis* **2007**, 28, 4046–62.
- (5) Kašička, V. Capillary electrophoresis of peptides. *Electrophoresis* **1999**, 20, 3084–3105.
- (6) Bruin, G.; Paulus, A. Biopolymer separations with capillary electrophoresis. *Analytical methods and instrumentation* **1995**, 2, 3–26.
- (7) Heegaard, N. H.; Nilsson, S.; Guzman, N. a Affinity capillary electrophoresis: important application areas and some recent developments. *Journal of chromatography. B, Biomedical sciences and applications* **1998**, 715, 29–54.
- (8) Nishi, H.; Terabe, S. Micellar electrokinetic chromatography perspectives in drug analysis. *Journal of Chromatography A* **1996**, 735, 3–27.
- (9) Altria, K. D. Background theory and applications of microemulsion electrokinetic chromatography. *Journal of chromatography. A* **2000**, 892, 171–86.
- (10) Honda, S. Separation of neutral carbohydrates by capillary electrophoresis. *Journal of chromatography. A* **1996**, 720, 337–51.
- (11) Kuhn, R.; Hoffstetter-Kuhn, S. Chiral separation by capillary electrophoresis. *Chromatographia* **1992**, 34, 505–512.
- (12) Caldwell, J. Importance of stereospecific bioanalytical monitoring in drug development. *Journal of chromatography. A* **1996**, 719, 3–13.
- (13) FDA Policy statement for the development of new stereoisomeric drugs. *Chirality* **1992**, 4, 338–340.
- (14) Vceláková, K.; Zusková, I.; Kenndler, E.; Gas, B. Determination of cationic mobilities and pKa values of 22 amino acids by capillary zone electrophoresis. *Electrophoresis* **2004**, 25, 309–17.

- (15) Li, D.; Fu, S.; Lucy, C. A. Prediction of electrophoretic mobilities. 3. Effect of Ionic Strength in Capillary Zone Electrophoresis. *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 687–699.
- (16) Beneš, M.; Zusková, I.; Svobodová, J.; Gaš, B. Determination of stability constants of complexes of neutral analytes with charged cyclodextrins by affinity capillary electrophoresis. *Electrophoresis* **2012**, *33*, 1032–9.
- (17) Lin, C.-E. Determination of critical micelle concentration of surfactants by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A* **2004**, *1037*, 467–478.
- (18) Svobodová, J.; Beneš, M.; Hruška, V.; Ušelová, K.; Gaš, B. Simulation of the effects of complex-formation equilibria in electrophoresis: II. experimental verification. *Electrophoresis* **2012**, *33*, 948–57.
- (19) Jaros, M.; Gas, B.; Zusková, I.; Jaroš, M. Optimization of background electrolytes for capillary electrophoresis : II . Computer simulation. *Electrophoresis* **2002**, 2667–2677.
- (20) Gas, B.; Kenndler, E. System zones in capillary zone electrophoresis. *Electrophoresis* **2004**, *25*, 3901–12.
- (21) Gas, B.; Hruska, V.; Dittmann, M.; Bek, F.; Witt, K. Prediction and understanding system peaks in capillary zone electrophoresis. *Journal of separation science* **2007**, *30*, 1435–45.
- (22) Hruška, V.; Riesová, M.; Gaš, B. A nonlinear electrophoretic model for PeakMaster: I. mathematical model. *Electrophoresis* **2012**, *33*, 923–30.
- (23) Grushka, E.; McCormick, R. .; Kirkland, J. . Effect of temperature gradients on the efficiency of capillary zone electrophoresis separations. *Anal. Chem.* **1989**, *61*, 241–246.
- (24) Horvath, J.; Dolník, V. Polymer wall coatings for capillary electrophoresis. *Electrophoresis* **2001**, *22*, 644–55.
- (25) Gas, B.; Kenndler, E. Dispersive phenomena in electromigration separation methods. *Electrophoresis* **2000**, *21*, 3888–97.
- (26) Goodall, D. M.; Erny, G. L.; Bergstrom, E. T. Electromigration dispersion in capillary zone electrophoresis. Experimental validation of use of the Haarhoff-Van der Linde function. *Journal of chromatography A* **2002**, *959*, 229–239.
- (27) Spreacacener, D. C. L. Dependence of the Electroosmotic Flow in Bare Fused-Silica Capillaries from pH , Ionic Strength and Composition of Electrolyte Solutions Tailored for Protein Capillary Zone Electrophoresis. *Chromatographia* **2003**, 587–596.

- (28) Thormann, W.; Zhang, C. X.; Caslavská, J.; Gebauer, P.; Mosher, R. a Modeling of the impact of ionic strength on the electroosmotic flow in capillary electrophoresis with uniform and discontinuous buffer systems. *Analytical chemistry* **1998**, *70*, 549–62.
- (29) Cai, H.; Vigh, G. Method for the elimination of chromatographic bias from measured capillary electrophoretic effective mobility values. *Analytical chemistry* **1998**, *70*, 4640–3.
- (30) Kalíková, K.; Riesová, M.; Tesařová, E. Recent chiral selectors for separation in HPLC and CE. *Central European Journal of Chemistry* **2011**, *10*, 450–471.
- (31) Østergaard, J.; Jensen, H.; Holm, R. Affinity capillary electrophoresis method for investigation of bile salts complexation with sulfobutyl ether- β -cyclodextrin. *Journal of separation science* **2012**, *35*, 2764–72.
- (32) Hruška, V.; Beneš, M.; Svobodová, J.; Zusková, I.; Gaš, B. Simulation of the effects of complex-formation equilibria in electrophoresis: I. mathematical model. *Electrophoresis* **2012**, *33*, 938–47.
- (33) Szejtli, J. Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry. *Chemical reviews* **1998**, *98*, 1743–1753.
- (34) Scriba, G. K. E. V Cyclodextrins in capillary electrophoresis enantioseparations--recent developments and applications. *Journal of separation science* **2008**, *31*, 1991–2011.
- (35) Bahga, S. S.; Bercovici, M.; Santiago, J. G. Ionic strength effects on electrophoretic focusing and separations. *Electrophoresis* **2010**, *31*, 910–9.
- (36) Friedl, W.; Reijenga, J. C.; Kenndler, E. Ionic strength and charge number correction for mobilities of multivalent organic anions in capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A* **1995**, *709*, 163–170.
- (37) Beneš, M. Závilost pohyblivosti nabitých cyklodextrinů na iontové síle **2008**.
- (38) Zhu, W.; Vigh, G. A family of single-isomer α -sulfated α -cyclodextrin chiral resolving agents for capillary electrophoresis: Octa (6-O-sulfo)- α -cyclodextrin. *Electrophoresis* **2003**, 130–138.
- (39) Brent Busby, M.; Lim, P.; Vigh, G. Synthesis, analytical characterization and use of a novel, single-isomer, chiral resolving agent in low-pH background electrolytes. *Electrophoresis* **2003**, 351–362.
- (40) Vincent, J. B.; Kirby, D. M.; Nguyen, T. V.; Vigh, G. A Family of Single-Isomer Chiral Resolving Agents for Capillary Electrophoresis. 2. *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 4419–4428.

- (41) Cai, H.; Vigh, G. Capillary electrophoretic separation of enantiomers using the single resolving agent in methanol – water background electrolytes. *Journal of chromatography A* **1998**, *827*, 121–132.
- (42) Gas, B.; Zuska, J.; Coufal, P.; Van de Goor, T. Optimization of the high-frequency contactless conductivity detector for capillary electrophoresis. *Electrophoresis* **2002**, *23*, 3520–7.
- (43) sparc.chem.uga.edu/sparc.
- (44) Doble, P.; Haddad, P. R. Indirect photometric detection of anions in capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A* **1999**, *834*, 189–212.