

KARLOVA UNIVERZITA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE

Diplomová práce

**TESTOVÁNÍ POTENCIÁLNÍHO VYUŽITÍ
CHIRÁLNÍCH IONTOVÝCH KAPALIN S DLOUHÝM ŘETĚZCEM
PRO CHIRÁLNÍ SEPARACE V KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZE**

Školitel diplomové práce: PharmDr. Pavel Jáč, Ph.D.

HRADEC KRÁLOVÉ, 2016

Veronika Mrázová

Poděkování

Tímto bych chtěla vyjádřit velké poděkování PharmDr. Pavlu Jáčovi, Ph.D. za odborné vedení mé diplomové práce, za cenné rady, připomínky, vstřícnost a trpělivost. Děkuji také pracovníkům katedry analytické chemie za ochotu a vstřícnost při práci v laboratoři.

Dále děkuji PharmDr. Marcelu Špulákovi, Ph.D. za přípravu testovaných iontových kapalin použitých v této práci, bez kterých by má práce nemohla vzniknout. Poděkování patří také PharmDr. Barboře Vraníkové, Ph.D. za stanovení kritické micelární koncentrace u ILA-1 a ILA-2.

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové dne 13. 5. 2016

Veronika Mrázová

OBSAH

1. Úvod	8
2. Cíl a zadání práce.....	10
3. Teoretická část	11
3.1 Kapilární elektroforéza	11
3.2 Elektroforetická pohyblivost	12
3.3 Elektroosmotický tok.....	14
3.4 Instrumentace	16
3.5 Kapilární zónová elektroforéza	18
3.6 Micelární elektrokinetická chromatografie.....	19
3.7 Kapilární elektroforéza v nevodném prostředí	20
3.8 Chiralita	20
3.9 Chirální separace.....	20
3.9.1 Cyklodextriny.....	21
3.10 Iontové kapaliny.....	22
3.11 Chirální iontové kapaliny a jejich využití jako selektorů v CE.....	24
4. Experimentální část.....	26
4.1 Chemikálie.....	26
4.2 Přístrojové vybavení.....	29
4.3 Podmínky měření	29
4.3.1 Separace v achirálním prostředí.....	29
4.3.2 Chirální separace	30
4.3.3 Separace s testovanými CIL.....	31
4.4 Příprava roztoků základních elektrolytů	31
4.4.1 Separace v achirálním prostředí.....	31
4.4.2 Separace v chirálním prostředí	33
4.4.3 Separace v BGE obsahujícím nově připravené CIL	34
4.5 Příprava roztoků standardů modelových analytů.....	34
4.6 Výpočty.....	37

5.	Výsledky a diskuze	39
5.1	Popis a chování iontových kapalin	39
5.2	UV spektra testovaných CIL a volba vhodné vlnové délky	41
5.3	Modelové sloučeniny	41
5.4	Separace modelových sloučenin v BGE s konvenčním chirálním selektorem	45
5.5	Separace s nově připravenými CIL	51
5.5.1	ILA-1	51
5.5.2	ILA-2	55
5.5.3	ILA-3	57
5.5.4	ILB-1.....	60
5.6	Separace v achirálním prostředí.....	62
6.	Závěr	64
7.	Seznam obrázků	65
8.	Seznam tabulek	67
9.	Použité zkratky	68
10.	Citovaná literatura.....	69
11.	Přílohy.....	72

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Kandidát: Veronika Mrázová

Školitel: PharmDr. Pavel Jáč, Ph.D.

Název diplomové práce: Testování potenciálního využití chirálních iontových kapalin s dlouhým řetězcem pro chirální separace v kapilární elektroforéze I

Hlavním cílem diplomové práce bylo testování nově nasyntetizovaných chirálních iontových kapalin jako chirálních selektorů kapilární elektroforézou pro potenciální využití v chirálních separacích modelových sloučenin (většinou farmaceutického významu). Analýza probíhala prostřednictvím micelární elektrokinetické chromatografie, neboť chirální iontové kapaliny mají charakter kationických surfaktantů. Testované elektrolyty byly tvořeny různými pufrů o různé hodnotě pH a s různými koncentracemi přísad chirálních iontových kapalin. Separace probíhala v křemenné kapiláře (průměr 50 μm , celková délka 48,5 cm, efektivní délka 40 cm) s využitím UV detekce při různých vlnových délkách dle vlastností analyzovaných modelových sloučenin. Výsledkem byl vždy jeden pík, to znamená, že testované chirální iontové kapaliny nebyly schopny rozseparovat modelové analyty na jednotlivé enantiomery. Toto pozorování lze pravděpodobně vysvětlit tím, že dochází k tak silné elektrostatické interakci mezi záporně nabitým analytem a kladně nabitým chirálním selektorem, která zabraňuje rozdělení modelových analytů na jednotlivé enantiomery.

Pro porovnání byla dále uskutečněna chirální separace enantiomerů modelových sloučenin za konvenčních podmínek, které byly již dříve publikovány.

ABSTRACT

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Analytical Chemistry

Candidate: Veronika Mrázová

Supervisor: PharmDr. Pavel Jáč, Ph.D.

Title of diploma thesis: Testing of potential capability of chiral ionic liquids with long alkyl chain in capillary electrophoresis chiral separations I

The main aim of this diploma thesis was testing of novel chiral ionic liquids as chiral selectors in capillary electrophoresis for the potential application in chiral separations of model compounds (mainly of pharmaceutical importance). The analysis was realized by micellar electrokinetic chromatography since the tested chiral ionic liquids were cationic surfactants. The examined electrolytes were formed by different buffers of various pH values and with different concentration of chiral ionic liquids. The separation took place in fused silica capillary (50 μm diameter, 48.5 cm total length, 40 cm effective length). The UV detection was performed at different wavelengths according to the structural features of model compounds. The separation always resulted in one peak; it means that the tested chiral ionic liquids did not show any capability in enantioseparation of model analytes. This observation can probably be explained by electrostatic interaction (between negatively charged solute and positively charged chiral selector) that hindered the separation of model analytes into individual enantiomers.

The enantioseparation of model compounds under earlier published conventional conditions was realized as well.

1. Úvod

Chiralita a chirální separace mají ve farmacii zásadní význam. Chiralita ovlivňuje nejen účinek léčiva, ale i jeho farmakokinetiku. Zatímco jeden enantiomer může mít žádoucí terapeutický účinek, druhý se může projevovat nežádoucími až toxickými účinky [1], [2].

Iontové kapaliny jsou sloučeniny, které jsou složeny výhradně z iontů [3]. Pro svoji stálost a bezpečnost jsou mnohé z nich považovány za tzv. zelená rozpouštědla, nejsou tedy ve většině případů škodlivé pro své okolí, což je v dnešní době často diskutované téma, jak v oblasti chemie, tak i v jiných oborech zabývajících se životním prostředím. Iontové kapaliny nacházejí široké uplatnění i v analytické chemii včetně separačních metod, kde jsou používány k ovlivnění selektivity separace. Chirální iontové kapaliny lze využít jako chirální selektory [4], [5], [6].

Využití chirálních iontových kapalin jako chirálních selektorů v separačních metodách je intenzivněji studováno v posledním desetiletí, ale pouze z mála studií vyplývá přímá schopnost chirálních iontových kapalin působit jako chirální selektor. Relativně více publikací popisuje synergistický efekt s jiným chirálním selektorem [5], [6].

Inspirací pro tuto diplomovou práci jsou výsledky publikované v časopise *Analytical Chemistry* skupinou profesora Shamsiho [7]. Autoři této studie nasyntetizovali a otestovali iontové kapaliny odvozené od leucinolu a pyrrolidinolu. Nasyntetizované sloučeniny obsahovaly dlouhý alkylový řetězec s terminální dvojitou vazbou, karbamátovou a kvartérní amoniovou skupinu. Kromě toho byly připraveny také příslušné polymery. Připravené chirální selektory byly schopny separovat enantiomery modelových sloučenin (\pm) - α -bromofenyloctové a (\pm) -2-(2-chlorophenoxy)propanové kyseliny. Klíčovou rolí v separaci dle autorů představuje elektrostatická interakce mezi opačně nabitou chirální iontovou kapalinou a analyty. Svoji roli zde má také strukturní kompatibilita mezi chirální iontovou kapalinou a analytem [7].

Nově testované iontové kapaliny obsahují kvartérní amoniiovou skupinu a dlouhý alkylový řetězec. Jejich chirální centrum je tvořeno aminokyselinou, která je s dalšími částmi molekuly spojena peptidickou a esterovou vazbou. Tyto nové sloučeniny byly nasyntetizovány PharmDr. Marcelem Špulákem, Ph.D. na Katedře anorganické a organické chemie Farmaceutické fakulty v Hradci Králové. Struktury jednotlivých sloučenin a jejich základní vlastnosti jsou uvedeny v kapitole 4.1.4. Pro testování nově připravených chirálních selektorů byly zvoleny většinou farmaceuticky významné sloučeniny kyselého či amfoterního charakteru. Jednalo se o nesteroidní antiflogistika flurbiprofen a ketoprofen, kumarinové antikoagulans warfarin, chinolonové antibiotikum ofloxacin a 1,1'-binaftyl-2,2'-diylhydrogenfosforečnan sodný. Pro nezbytné porovnání výsledků byly modelové molekuly také separovány v achirálním prostředí a jiném, v literatuře popsaném, chirálním prostředí.

2. CÍL A ZADÁNÍ PRÁCE

Cílem práce je testování nově nasyntetizovaných chirálních iontových kapalin jako chirálních selektorů pro chirální separace modelových sloučenin (většinou farmaceutického významu) pomocí kapilární elektroforézy. Pro porovnání výsledků chirální separace a pořadí migrace enantiomerů byly modelové sloučeniny také separovány za konvenčních podmínek, které byly již dříve publikovány [8], [9]. Kromě toho byly také provedeny analýzy v achirálním prostředí.

3. TEORETICKÁ ČÁST

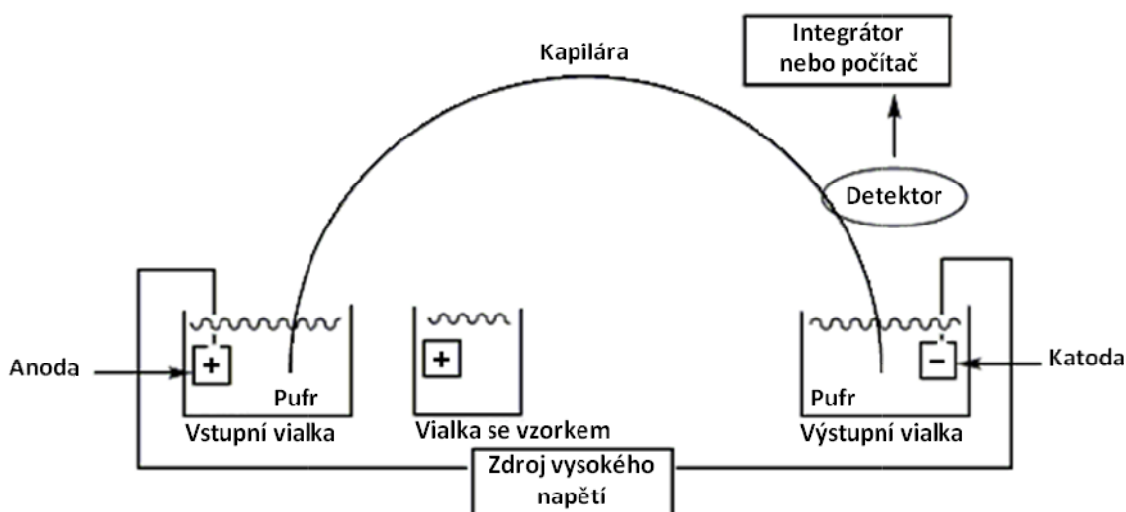
3.1 Kapilární elektroforéza

Kapilární elektroforéza (CE z anglického capillary electrophoresis) je separační metoda založená na migraci elektricky nabitých částic ve stejnosměrném elektrickém poli. Systém CE je tvořen kapilárou, elektrolytem, vzorkem, zdrojem vysokého napětí s elektrodami a detektorem. Elektroforetický analyzátor je propojen s počítačem, který slouží k ovládání přístroje a také k záznamu a vyhodnocování naměřených dat – viz obrázek 1 [10].

V porovnání s ostatními separačními metodami má jisté výhody. Patří mezi ně nízká spotřeba vzorků a činidel, které jsou potřebné pro separaci, nízké náklady na analýzy, rychlost analýz a vysoká účinnost. Naopak mezi nevýhody patří nižší citlivost, horší opakovatelnost, případně i nižší robustnost.

CE nachází využití v různých oborech včetně chemické, biochemické, mikrobiologické, potravinové, forenzní, environmentální a farmaceutické analýzy. Pomocí CE můžeme separovat nejen makromolekuly, ale také aminokyseliny, vitamíny, pesticidy, chirální léčiva, organické kyseliny, anorganické ionty, povrchově aktivní látky, barviva, bílkoviny, sacharidy a mezi zajímavé využití také určitě patří analýza virů a nanočástic [11].

Obrázek 1: Schéma kapilární elektroforézy



Převzato a upraveno ze zdroje [12].

3.2 Elektroforetická pohyblivost

Elektroforetická pohyblivost je základní veličina popisující migraci nabitých látek v elektrickém poli [13]. Rychlost migrace elektricky nabitých částic je přímo úměrná elektroforetické pohyblivosti a intenzitě elektrického pole – viz rovnice 1.

Rovnice 1

$$v = \mu \cdot E$$

v – rychlost iontu [m/s]

μ - elektroforetická pohyblivost [m^2/Vs]

E – intenzita elektrického pole [V/m]

Elektroforetická pohyblivost je specifickou charakteristikou konkrétního iontu. Výsledný pohyb iontů v roztoku charakterizuje působení dvou sil. Ion s nábojem je dán do pohybu silou elektrického pole. Pohyb je však brzděn frikční silou prostředí, kterou určuje Stokesův zákon [13]. Výsledný vztah popisuje rovnice 2. Z rovnice vyplývá, že malé vysoce nabité ionty dosahují velkých pohyblivostí, zatímco velké minimálně nabité ionty mají pohyblivosti malé [14].

Rovnice 2

$$\mu = \frac{q}{6\pi\eta r}$$

μ - elektroforetická pohyblivost [m^2/Vs]

q – náboj iontu [C]

η – viskozita roztoku [kg/ms]

r – poloměr iontu [m]

Tabelované hodnoty elektroforetické pohyblivosti jsou často odlišné od těch skutečně naměřených. Tabulky uvádí hodnoty pro plně ionizované molekuly v nekonečně zředěném roztoku. V reálném roztoku vyjadřujeme tzv. efektivní pohyblivost (μ_e), která je odrazem skutečnosti, že se částice vzájemně ovlivňují. Je závislá na stupni disociace analytu a je charakteristická vždy pro konkrétní podmínky (pH a složení pufru). Zdánlivá elektroforetická pohyblivost (μ_a) je stanovena na základě

migračního času – viz rovnice 3. Migrační čas je dán podílem vzdálenosti a rychlosti, charakterizuje dobu, za kterou doputuje rozpuštěná látka k místu detekce [14], [15].

Rovnice 3

$$\mu_a = \frac{l}{t_a E} = \frac{lL}{t_a V}$$

μ_a – zdánlivá pohyblivost [cm^2/Vs]

V – použité napětí [V]

l – efektivní délka kapiláry [cm]

L – celková délka kapiláry [cm]

t_a – migrační čas analyzovaného iontu [s]

E – intenzita elektrického pole [V/cm]

Pro výpočet efektivní pohyblivosti je dále využito rovnic 4 a 5.

Rovnice 4

$$\mu_a = \mu_e + \mu_{EOF}$$

μ_e – efektivní pohyblivost [cm^2/Vs]

μ_{EOF} – pohyblivost elektroosmotického toku [cm^2/Vs]

Rovnice 5

$$\mu_{EOF} = \frac{l}{t_{EOF} E} = \frac{lL}{t_{EOF} V}$$

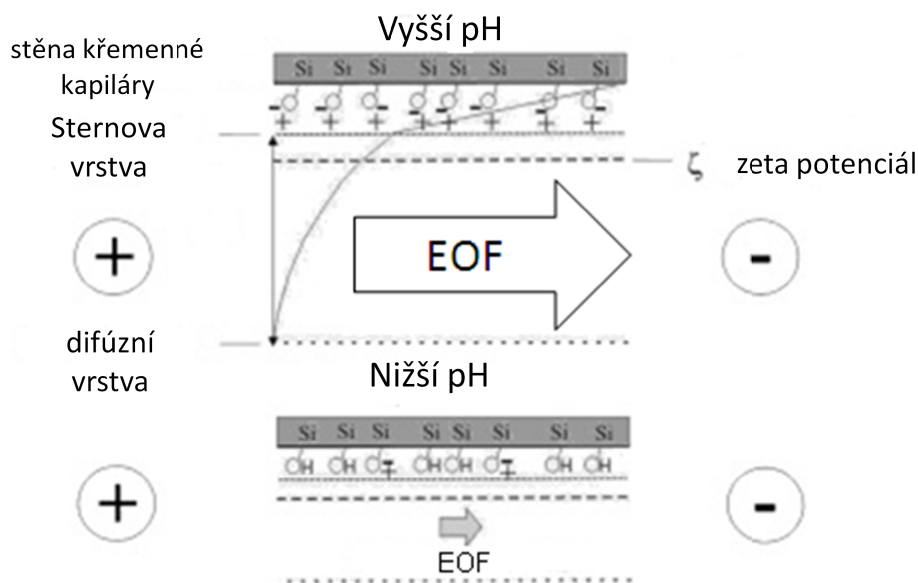
3.3 Elektroosmotický tok

Elektroosmotický tok (EOF z anglického electroosmotic flow) je hybnou silou umožňující separaci jak kationtů, tak i aniontů během jedné analýzy. EOF vzniká v křemenných kapilárách o malém vnitřním průměru (25-100 μm) působením stejnosměrného elektrického pole. Stěny těchto kapilár jsou tvořené silanolovými skupinami, které mohou disociovat při vyšším pH elektrolytu ($\text{pH} > 2,5$). Díky této disociaci vzniká na vnitřním povrchu kapiláry záporný náboj [13], [16]. Následně se u stěny vytváří dvojitá vrstva kationtů; vzdálenější od středu kapiláry je stabilní elektrická vrstva – tzv. Sternova vrstva. Ta je pevně spjata se silanolovými skupinami. Druhá vrstva vzniká blíže ke středu kapiláry, je pohyblivá a nazývá se difúzní vrstva. Na rozhraní obou vrstev vzniká elektrokinetický potenciál – tzv. zeta-potenciál.

Vložení napětí začnou kationty difúzní vrstvy putovat směrem ke katodě; tímto se uvede do pohybu i celý objem roztoku v kapiláře. Stejným směrem jsou prostřednictvím EOF unášeny také neutrální látky, které se pohybují stejnou rychlostí jako EOF. Anionty, které oproti EOF vykazují opačnou pohyblivost (směrem k anodě), která ale dosahuje nižších hodnot než pohyblivost EOF, jsou také unášeny ke katodě. Pohyblivost kationtů směřuje stejným směrem jako pohyblivost EOF a tak je výsledné pořadí migrace látek: kationty, neutrální látky a anionty [11], [13].

Vliv na rychlost EOF mají především pH, napětí a teplota. Čím jsou tyto hodnoty vyšší, tím vyšší je i hodnota zeta potenciálu a rychlost EOF stoupá. Je-li zvýšena koncentrace základního elektrolytu (BGE z anglického background electrolyte), tak zeta potenciál klesá a rychlost EOF je zpomalena [10], [17].

Obrázek 2: Schéma rozložení náboje na vnitřním povrchu kapiláry. Vznik elektrické dvojvrstvy a EOF v závislosti na pH

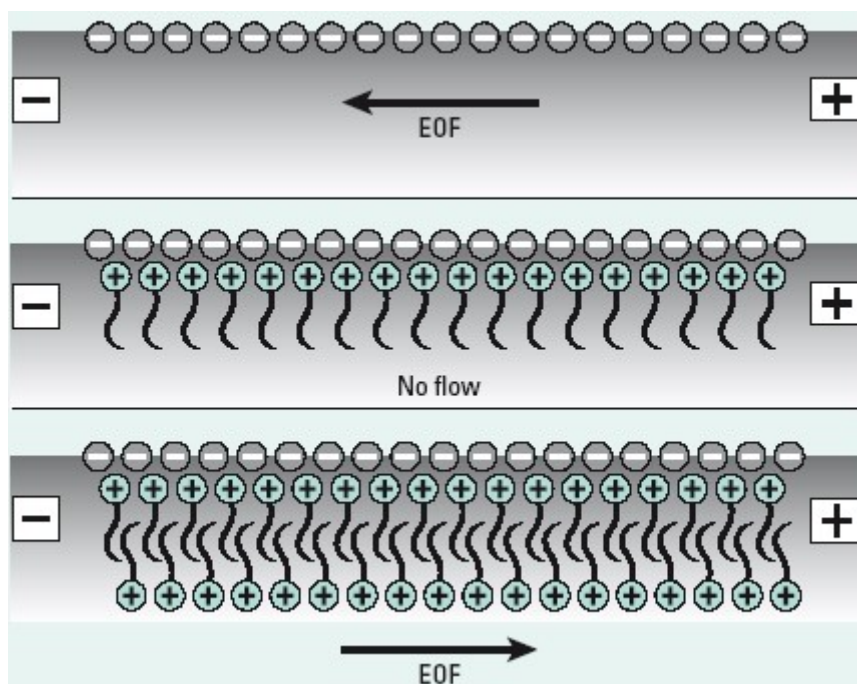


Převzato a upraveno ze zdroje [17].

Modifikací vnitřní stěny kapiláry můžeme EOF obrátit či potlačit. Obrácení EOF může způsobit malý přídavek kationického tenzidu (např. cetyltrimethylammonium bromid, CTAB), který je přidán k BGE v množství, které obvykle nepřesahuje kritickou micelární koncentraci. Migrace iontů pak probíhá v opačném pořadí: anionty, neutrální látky a kationty.

Na obrázku 3 můžeme pozorovat (od shora): EOF směřuje ke katodě – žádná modifikace vnitřní stěny kapiláry, uprostřed vidíme potlačení EOF a ve spodní části modifikaci, díky níž je EOF obrácen [14].

Obrázek 3: Modifikace elektroosmotického toku



Vysvětlivky: No flow – žádný tok. Převzato ze zdroje [14].

3.4 Instrumentace

3.4.1 Kapiláry

Nejvíce používanými jsou kapiláry z taveného křemene. Přednostmi tohoto materiálu jsou elektrická a chemická neutralita, propustnost UV záření, flexibilita a v neposlední řadě nízká cena. Křemenné kapiláry jsou charakteristické svojí křehkostí, proto jsou z vnější strany potaženy polyimidovou vrstvou, která umožňuje mechanickou manipulaci. V místě UV detekce bývá polyimidová ochranná vrstva odstraněna. Průměr těchto kapilár se pohybuje v rozmezí 25-100 μm a celková délka činí cca 25-100 cm [10], [13]. Kromě celkové délky rozlišujeme ještě efektivní délku kapiláry, která je vzdáleností mezi místem nástřiku a místem detekce. Dále se mohou používat kapiláry teflonové a pyrexové [14], [18].

3.4.2 Zdroj vysokého napětí

Zdroj vysokého napětí je hnací silou pohybu iontů v kapiláře. Zpravidla se používá zdroj stejnosměrného napětí do 30 kV. Konce křemenné kapiláry naplněné

BGE jsou ponořeny do vialek s elektrolytem, který vede proud. Vygenerovaný proud může dosahovat stovek μA . Limitní hranicí je $300 \mu\text{A}$, vyšší hodnoty nejsou žádoucí kvůli možné teplotní destrukci analytů.

Zcela zásadní je možnost přepínání polarity. Je-li EOF obrácen, je nutné změnit i polaritu - to znamená nástřik vzorku je realizován na katodickém konci kapiláry [14], [18].

3.4.3 Regulace teploty

Prostředí, kde se nachází kapilára, musí být temperováno pro správný průběh separace, zajišťují se tak stálé podmínky separace. Definované teploty také zlepšují opakovatelnost. Teplota může být regulována vzduchem nebo kapalinou [14].

3.4.4 Dávkování vzorku

Vzorek je většinou dávkován na konec kapiláry vzdálenější od detektoru. Průměr kapiláry limituje objem vzorku. Zpravidla jde o 1 – 2% celkového objemu kapiláry, což odpovídá 10-100 nl. Vzorek může být dávkován tlakem, působením elektrického pole nebo rozdílem hladin. V praxi se uplatňují dva způsoby dávkování: hydrodynamické (dávkování tlakem nebo aplikací vakua) a elektrokinetické využívající aplikaci napětí [10], [13].

3.4.5 Detektory

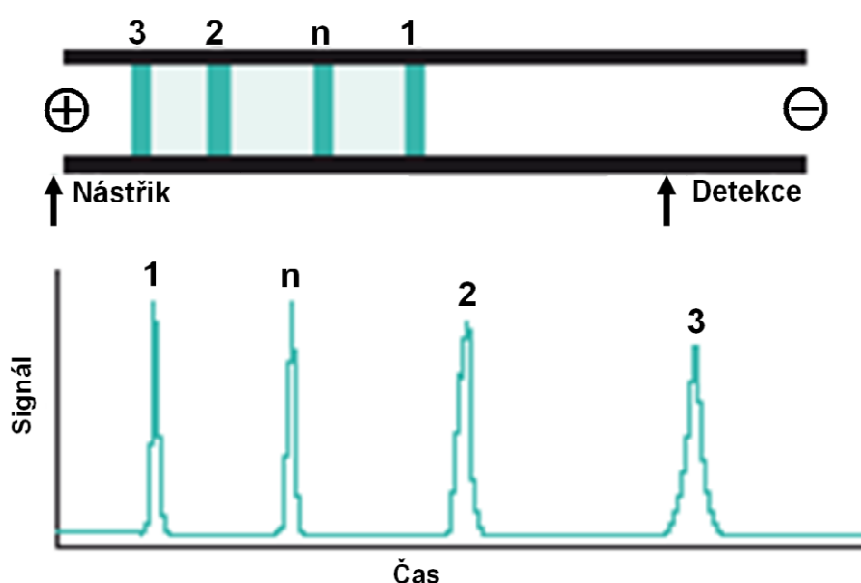
Mezi nepoužívanější detektory patří UV/VIS detektor (UV/VIS z anglického ultraviolet/visible) a to hlavně vzhledem k jeho univerzálnosti. Jeho prostřednictvím lze detekovat analyty při vlnových délkách od 200 nm až do 800 nm. Existují ale látky, které prostřednictvím UV/VIS detekovat nelze a proto je nutné využít alternativy. Mezi další typy detekce patří laserem indukovaná fluorescenční detekce, bezkontaktně vodivostní detekce, elektrochemická detekce a ke specifickým typům také patří detekce pomocí hmotnostní spektrometrie.

Základní předpokladem detektorů je citlivost, přesnost a spolehlivost, také je ale nutno zohlednit jejich vlastnosti z hlediska běžného používání a ceny [10], [14].

3.5 Kapilární zónová elektroforéza

Kapilární zónová elektroforéza (CZE z anglického capillary zone electrophoresis) je nejjednodušší formou CE. Kapilára je naplněna elektrolytem, nadávkuje se vzorek a vloží se napětí. K separaci dojde díky faktu, že nabité látky mají za separačních podmínek různé pohyblivosti a během migrace v kapiláře dojde k jejich rozdělení do různých zón, které jsou na druhém konci kapiláry detekovány vhodnou detekční technikou. Malé vícenásobně nabité ionty se pohybují rychle, zatímco větší ionty s malým nábojem se pohybují pomaleji. Rozpuštěné látky migrují k elektrodě s opačným nábojem, tzn. anionty putují k anodě, kationty ke katodě, mimoto je ale migrace ovlivněna prostřednictvím EOF (viz kapitola 3.3). Pokud není změněn povrch kapilár, EOF ve většině případů pohání látky směrem ke katodě. Díky své relativně vysoké rychlosti unášejí kationty i anionty směrem k detektoru, ty pak mohou být analyzovány v průběhu jednoho experimentu. Neutrální látky jsou nerozseparované unášeny EOF stejnou rychlostí. Za pomoci detektoru získáváme záznam, tzv. elektroferogram, který nám poskytuje informace o migračním čase a ploše píku jednotlivých složek separované směsi [13]. Na obrázku 4 můžeme pozorovat rozdílnou migraci rozpuštěných látek ovlivněnou EOF. Kationt (1) má nejvyšší pohyblivost, následuje ho neutrální analyt (N) a dva anionty (2, 3) [14].

Obrázek 4: Znárodnění separace CZE a příslušný záznam separace – elektroferogram



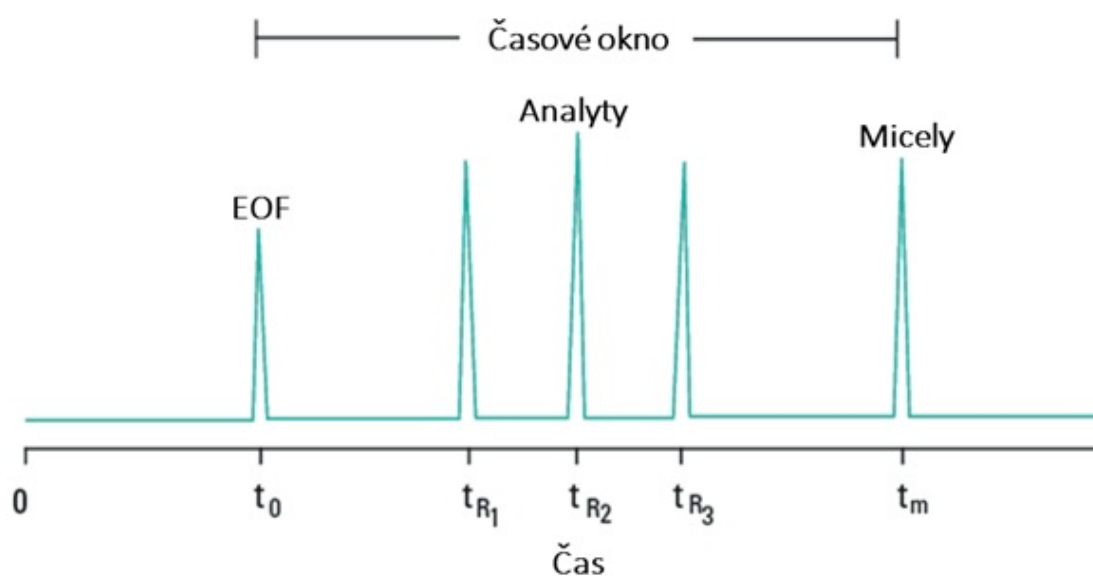
Převzato a upraveno ze zdroje [14].

3.6 Micelární elektrokinetická chromatografie

Micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC z anglického micellar electrokinetic chromatography) je obměnou CE s výhodou možnosti separovat neutrální látky. Využívá principy elektrokinetické (tj. elektroosmotické, elektroforetické) a zároveň chromatografické. Je charakterizována přidavkem povrchově aktivní látky k BGE a to ve vyšší koncentraci než je kritická micelární koncentrace. Často je používán dodecylsulfát sodný (SDS). Ve vodném BGE jsou pak přítomny micely s hydrofobním jádrem a záporně nabitým povrchem. V MEKC dochází nejen k elektromigraci, analyty se také rozdělují mezi micelu – tzv. pseudostacionární fázi a BGE [14].

Právě díky micelární pseudostacionární fázi dochází k separaci neutrálních látek v tzv. časovém oknu, tedy v migračním čase mezi t_0 (migrační čas EOF) a t_m (migrační čas micel). Situaci popisuje obrázek 5. Separace tak může být výrazně ovlivněna použitím různých povrchově aktivních látek, které vykazují různé vlastnosti a mohou tak způsobit změny fyzikálních vlastností micel, jako je velikost, náboj nebo rozměr [13].

Obrázek 5: Migrace neutrálních analytů v MEKC



Převzato a upraveno ze zdroje [14].

3.7 Kapilární elektroforéza v nevodném prostředí

Nevodné prostředí může hrát důležitou roli v separaci prostřednictvím elektroforézy. Kapilární elektroforéza v bezvodém prostředí (NACE z anglického non-aqueous capillary electrophoresis) je založena na elektrolytech, které jsou tvořeny organickými rozpouštědly. Toto složení nabízí velké množství znaků, které mohou zlepšit selektivitu jako je např. lepší rozpustnost hydrofobních sloučenin a snížení pohyblivosti EOF. Hlavní výhodou bezvodého prostředí je možnost rozpustit ve vodě nerozpustné organické sloučeniny, které je pak možno separovat za pomoci NACE. Další faktem jsou rozdílné fyzikální a chemické vlastnosti mezi vodou a organickými rozpouštědly. Organická rozpouštědla je možno využít pro separace látek, které mají příliš slabé nebo neměřitelné interakce ve vodném prostředí [19].

3.8 Chiralita

Chirální objekt není totožný se svým zrcadlovým obrazem, nemá tedy střed ani rovinu symetrie, může mít ale rotační osu symetrie. V chemii má chiralita velký význam především u organických sloučenin, které mají centrum chiralitu. Chirální organické sloučeniny nemusí obsahovat pouze stereogenní centrum, jako je např. čtyřvázný uhlík s různými substituenty, ale mohou vykazovat i tzv. axiální či helikální chiralitu. Vliv chiralitu na biologickou aktivitu dokazuje asi největší aféra ve farmaceutickém průmyslu, tj. thalidomidová aféra, kdy *R*-enantiomer thalidomidu má sedativní účinky, ale nikoli teratogenní účinek jako *S*-enantiomer [20].

3.9 Chirální separace

Chirální separace je separace enantiomerů opticky aktivních látek. Enantiomery jsou dvě konstitučně stejné molekuly, ale odlišují se ve vzájemném postavení atomů a vazeb v prostoru, jsou charakteristické stejnými fyzikálně-chemickými vlastnostmi, mohou se však odlišovat svými biologickými, farmakologickými a toxikologickými vlastnostmi. Jelikož je řada léčiv chirálního charakteru, je hodnocení kvality a bezpečnosti chirálních léčiv důležitou součástí farmaceutické praxe. V těchto procesech představují významnou roli chirální separace. U chirálně čistých léčiv je druhý (nežádoucí) enantiomer považován za nečistotu a jeho obsah ve finálním

produktu je limitován. V praxi je nezbytné zabývat se analýzou přítomnosti jednotlivých enantiomerů v různých maticích a sledovat interakce enantiomerů s cílovým objektem. K hodnocení se mimo jiné používá i CE. Pro úspěšné provedení separace je nutné vytvořit chirální prostředí [2].

Nepřímá chirální separace je charakteristická tvorbou diastereomerů mezi enantiomery a chirálně čistým derivatizačním činidlem před samotnou separací. Separace pak probíhá v achirálním prostředí [2].

Přímá chirální separace je charakterizována tvorbou diastereomerů během samotné separace, je zajištěna přidavkem chirálního selektoru (CS) k základnímu elektrolytu. CS vytváří s opticky aktivními analyty přechodné diastereomerní komplexy, které se musí lišit svojí stabilitou, aby došlo k chirální separaci. Při tvorbě těchto komplexů se uplatňují slabé intermolekulární interakce a sterické faktory. CS využívané pro chirální separaci v CE jsou cyklodextriny (CD), crown-ethery, chirální micely, selektory fungující na principu výměny ligandů, makrocyclické glykopeptidy, proteiny, polysacharidy a jejich deriváty, mezi experimentálně používanými pak patří chirální iontové kapaliny (CIL z anglického *chiral ionic liquids*) [2].

3.9.1 Cyklodextriny

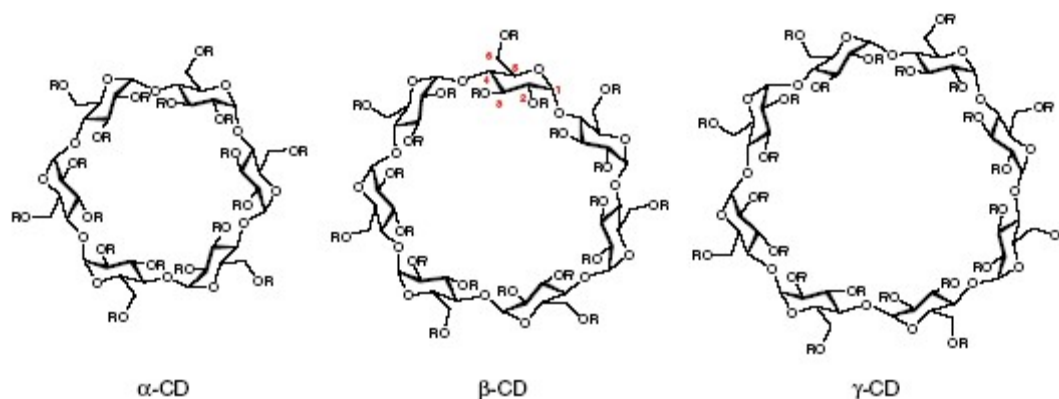
Mezi nejpoužívanější CS v kapilární elektroforéze patří CD. CD jsou cyklické oligosacharidy skládající se z molekul D-glukózy spojených α -(1 → 4) glykosidickou vazbou. Přírodní CD vznikají enzymatickým trávením škrobu prostřednictvím bakterií z kmene *Bacillus*. Nejdůležitějšími průmyslově produkovány CD jsou tzv. nativní cyklodextriny: α -CD, β -CD a γ -CD. Liší se mezi sebou počtem glukózových jednotek – viz obrázek 6 [8]. α -CD je tvořen šesti, β -CD sedmi a γ -CD osmi jednotkami glukózy. Cyklodextriny svým tvarem připomínají dutinu, jejíž vnitřní část má lipofilní charakter, zatímco vnější část je hydrofilní a charakteristická svými hydroxy skupinami. Právě tyto skupiny poskytují prostor pro vznik mnoha derivátů [8].

Nejdůležitější charakteristikou CD je jejich schopnost uzavřít analyzované molekuly do dutiny CD, čímž dochází k ustanovení dynamické rovnováhy. Na vzniku takového komplexu se podílí van der Waalsovy síly a vodíkové můstky mezi polárními

funkční skupinou analytu a hydroxylovou skupinou CD. Stabilita komplexu je ovlivněna různými faktory. Nejdůležitějšími z nich je prostorové uspořádání a polarita analyzované molekuly, vlastnosti pufru a teplota [8].

Hlavní výhoda CD spočívá v možnosti jejich využití jak ve vodném, tak nevodném prostředí CE [8].

Obrázek 6: Struktura α -CD, β -CD a γ -CD



Převzato ze zdroje [8].

3.10 Iontové kapaliny

Iontové kapaliny (IL z anglického ionic liquids) jsou organické soli vyznačující se krystalickou strukturou. Vykazují unikátní fyzikálně - chemické vlastnosti v závislosti na svém složení. Jsou stálé i při vyšších teplotách, neodpařují se. Jejich teplota tání se pohybuje pod 100°C , často může být ale i nižší než pokojová teplota. Mohou nahrazovat organická rozpouštědla. Tento fakt je základním rozdílem mezi IL a tavenými solemi. Samy mohou být rozpustné v polárních i nepolárních rozpouštědlech [21].

Chemicky bývají složeny z kationické části tvořené nejčastěji z dusíkatých sloučenin (pyridiniové, imidazoliové, thiazoliové, amoniové a pyrrolidiniové soli) či fosforu (fosfoniové soli) – viz obrázek 7. Kationická část je často substituována alkyly. Anionická část molekuly může být tvořena jak anorganickými, tak organickými anionty – viz obrázek 8. Známé struktury IL jsou založeny na kvartérních amoniových a fosfoniových solí, které deklarují elektrochemickou stálost, dobrou elektrickou

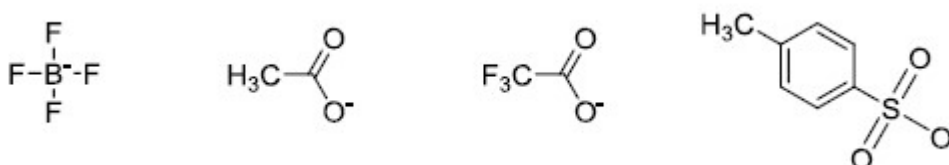
vodivost, velkou iontovou pohyblivost, zanedbatelné odpařování, vynikající chemickou a teplotní stabilitu. Kvartérní amoniové skupiny jsou také známy pro své emulgující schopnosti, dále se využívá jejich antimikrobiální aktivity, jsou složkami kosmetických produktů, mají antikorozi vlastnosti, slouží jako katalyzátory [7].

Obrázek 7: Příklad struktur používaných v IL - imidazoliové, pyridiniové, amoniové, fosfoniové soli



Důvod nízkého bodu tání iontových kapalin není zcela jasný, ale je pravděpodobné, že velký anorganický aniont v kombinaci s delokalizovaným nabitým kationtem zabraňují vzniku stabilní krystalické mřížky. Mezi kationtem a aniontem nesmí docházet k žádné koordinaci a právě tuto podmínku spolehlivě splňují velké ionty, které stericky brání okolní substituenty [21].

Obrázek 8: Příklad objemných aniontů – tetrafluoroborát, acetát, trifluoroacetát, tosylát

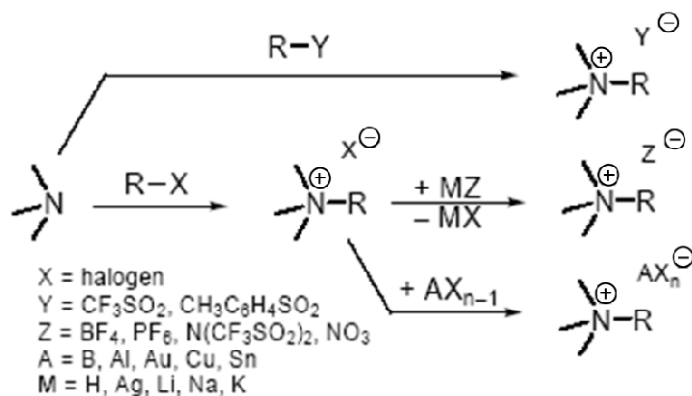


Chemické vlastnosti jsou závislé i na struktuře aniontové části, např. sloučenina se stejným kationtem, ale různými anionty může být mísitelná s vodou či organickým rozpouštědlem v závislosti na struktuře aniontu. Z tohoto důvodu jsou vhodné jako modifikátory EOF v NACE [19].

Syntéza IL se provádí v těchto dvou základních krocích: tvorba kationtu pomocí kvarternizace a výměna aniontu. Kvarternizace je uskutečňována pomocí alkylhalogenidu a výměna pak prostřednictvím halogenidového aniontu. Výměna je většinou závislá na nerozpustnosti jednoho z produktů v daném rozpouštědle (IL nebo vznikající anorganické soli) nebo na Lewisově neutralizaci [21]. Identita a čistota sloučeniny je posuzována pomocí NMR spektroskopie (NMR z anglického nuclear

magnetic resonance). Obsah vody v čisté a suché látce je stanoven pomocí titrace dle Karla Fischera. Příprava je relativně jednoduchá. Některé IL je možné skladovat bez významných požadavků delší dobu, avšak některé IL jsou hygroskopické [22].

Obrázek 9: Schéma syntézy IL



Převzato a upraveno ze zdroje [21].

Dle svého složení mohou být využity jako rozpouštědlo či jako katalyzátor pro široké spektrum organické syntézy, především pro elektrofilní, ale i nukleofilní substituce. Oproti běžným organickým rozpouštědlům jsou IL ceněny pro možnost recyklace, snadnější získávání produktu z reakční směsi a svoji netěkavost. Těmito vlastnostmi se jeví jako bezpečnější a proto jsou také spojovány s tzv. zelenou chemií, což je technologický směr zabývající se preventivními kroky proti znečištění životního prostředí a celkovým snížením spotřeby neobnovitelných zdrojů. IL se dále využívají jako rozpouštědla v atomové absorpční spektrometrii, jako médium v extrakci z kapaliny do kapaliny, ve fyzikální chemii, v lithiových bateriích a jako lubrikanty. V analytické chemii nachází využití jako součást mobilní fáze ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii, jako elektrolyty v CE, v hmotnostní spektrometrii, jako stacionární fáze v plynové chromatografii a pseudostacionární fáze v MEKC [21].

3.11 Chirální iontové kapaliny a jejich využití jako selektorů v CE

Chirální iontové kapaliny jsou IL, které obsahují ve své struktuře alespoň jedno chirální centrum. Využití jejich potenciálu jako CS bylo intenzivněji studováno v posledním desetiletí, avšak málo studií dokazuje jejich přímé využití jako CS.

Relativně více publikací popisuje synergistický účinek CIL s jinými tradičními CS (zmíněné v kapitole 3.9) v CE. Přehled literatury ukazuje zajímavé a slibné výsledky inspirující k podrobnějšímu testování včetně návrhu a syntézy nových CIL [5], [6].

Yuan s kolektivem publikovali jednu z prvních studií popisující využití CIL v CE. V této studii byl použit (*R*)-*N,N,N*-trimethyl-2-aminobutanol-2-hydroxybis(trifluoromethansulfon)imidát jako samostatný CS umožňující separovat modelové sloučeniny. Tato CIL byla také testována v enantioselektivních separacích pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie i pomocí plynové chromatografie [23]. Skupina profesora Shamsiho představila undecenoxykarbonyl-*L*-leucinol bromid (*L*-UCLB) a undecenoxykarbonyl-*L*-pyrrolidinol bromid (*L*-UCPB) a jejich polymery. Tyto CIL mají povahu kationických surfaktantů a byly použity v separacích prostřednictvím MEKC. Vnitřní stěna kapiláry byla potažena monomery a polymery zmíněných CIL, což způsobilo obrácení EOF a následnou separaci enantiomerů modelových sloučenin (\pm)- α -bromofenyloctové a (\pm)-2-(2-chlorophenoxy)propanové kyseliny [7]. CIL založené na struktuře *L*-alaninu byly dále úspěšně použity jako samostatné CS v separaci 1,1'-binaftyl-2,2'-diylhydrogenfosfátu [24]. Další příklady CIL, které fungují jako samostatný CS, zahrnují tetramethylammonium-laktobionát, který byl použit pro chirální separaci léčiv (např. atenolol, nefopam, duloxetin) [25] a také CIL obsahující efedrin, která byla použita pro separaci enantiomerů rabeprazolu [26]. Tyto jedinečné příklady CIL, které jsou použitelné jako chirální selektory v CE, ilustrují možný potenciál pro další výzkum a jejich následné širší využití v chirálních separacích.

CIL, které vykazují synergistický efekt a které byly použity jako surfaktanty spolu s nativním CD pro separaci aniontů a neutrálních analytů, testovala skupina profesora Shamsiho. Ve srovnání samostatného CD a kombinace CD s CIL jako BGE dosahovala kombinace lepších výsledků [27]. Podobných výsledků dosáhli i Stavrou s kolektivem, kteří testovali kombinaci cyklofruktanů s CIL. Výsledky ukazují zlepšení separačních vlastností s přidavkem laktátu *t*-butylesteru *D*-alaninu [28]. Další možnosti zlepšení separací představuje změna ve struktuře CIL [29].

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Chemikálie

4.1.1 Základní chemikálie a reagentie na přípravu pufrů a základních elektrolytů

- Dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát, $\geq 99,0\%$; Sigma-Aldrich
- Ethanol; Chromasolv (pro HPLC), $\geq 99,9\%$, Sigma-Aldrich
- Hydroxid sodný
- Kyselina boritá pro elektroforézu; Sigma-Aldrich
- Kyselina fosforečná, 85%; Merck
- Kyselina chlorovodíková
- Kyselina mravenčí, $\geq 98\%$, Sigma-Aldrich
- Kyselina octová, $\geq 99,7\%$; Sigma-Aldrich
- Methanol; Chromasolv (pro HPLC), $\geq 99,9\%$, Sigma-Aldrich
- Octan amonný, $\geq 98\%$, Sigma-Aldrich
- Trizma; Sigma-Aldrich
- Voda, ultračistá, produkována systémem Milli-Q, Milipore, USA; (odpor $18 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$)

4.1.2 Standardy chirálních sloučenin

- (*R*)-(-)-1,1'-binaftyl-2,2'-diylhydrogenfosfát, $\geq 98\%$; Sigma-Aldrich
- (*S*)-(+)-1,1'-binaftyl-2,2'-diylhydrogenfosfát, 97%; Sigma-Aldrich
- Flurbiprofen; Sigma-Aldrich
- Ibuprofen, $\geq 98\%$, Sigma-Aldrich
- (*S*)-Ibuprofen, ReagentPlus, 99%, Sigma-Aldrich

- Ketoprofen racemát; Sigma-Aldrich
- (S)-(+)-Ketoprofen, 99%; Sigma-Aldrich
- Levofloxacin; Sigma-Aldrich
- Ofloxacin; Sigma-Aldrich
- Warfarin, analytical standard, Sigma-Aldrich
- (R)-Warfarin, $\geq 97\%$, Sigma-Aldrich

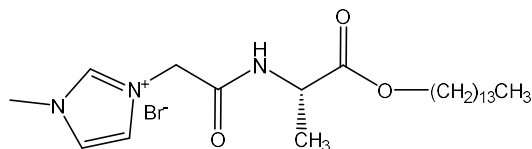
4.1.3 Cyklodextriny

- β -cyklodextrin; Fluka
- β -cyklodextrin, sulfatovaný, sodná sůl; Sigma-Aldrich
- Heptakis(2,3,6-tri-O-methyl)- β -cyklodextrin; $\geq 98\%$, Sigma-Aldrich

4.1.4 Testované iontové kapaliny

Testované CIL byly připraveny a charakterizovány PharmDr. Marcellem Špulákem, Ph.D. z Katedry anorganické a organické chemie Farmaceutické fakulty v Hradci Králové. Kritické micelární koncentrace (CMC z anglického critical micellar concentration) pro ILA-1 a ILA-2 byly stanoveny tensiometricky PharmDr. Barborou Vraníkovou, Ph.D. na Katedře farmaceutické technologie Farmaceutické fakulty v Hradci Králové.

ILA-1



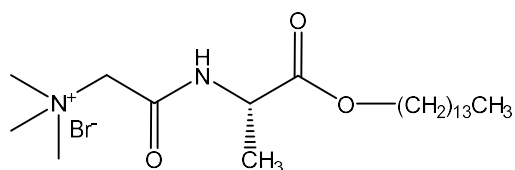
(S)-1-methyl-3-{2-oxo-2-[1-oxo-1-(tetradecyloxy)propan-2-ylamino]ethyl}-1H-imidazol-3-ium bromid

Mr: 488,51

$[\alpha]_D^{25} = -28.35^\circ$ ($c=0,04\text{g/l}$, MeOH)

CMC = 0,304 mM (v H₂O)

ILA-2



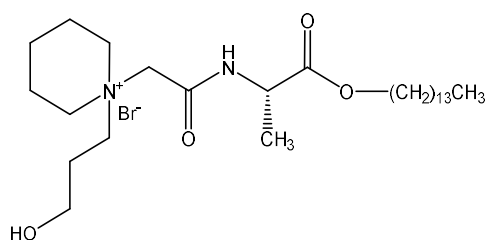
(S)-{2-oxo-2-[1-oxo-1-(tetradecyloxy)propan-2-ylamino]ethyl}(trimethyl)ammonium bromid

Mr: 465,52

$[\alpha]_D^{25} = -13.17^\circ$ (c=0,09g/l, MeOH)

CMC = 0,281 mM (v H₂O)

ILA-3

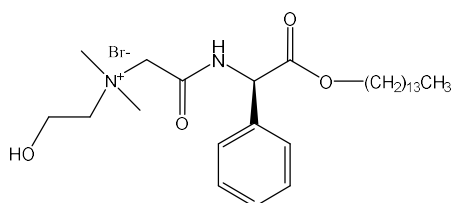


(S)-1-(3-hydroxypropyl)-1-{2-oxo-2-[1-oxo-1-(tetradecyloxy)propan-2-ylamino]ethyl}piperidin-1-ium bromid

Mr: 549,64

$[\alpha]_D^{25} = -13.04^\circ$ (c=0,07g/l, MeOH)

ILB-1



(R)-{2-(2-hydroxyethyl){2-oxo-2-[2-oxo-2-(tetradecyloxy)-1-fenylethan-1-ylamino]ethyl}(dimethyl)ammonium bromid

Mr: 557,61

$[\alpha]_D^{25} = +34.76^\circ$ (c=0,05g/l, CHCl₃)

4.2 Přístrojové vybavení

- Kapilární elektroforéza CE 7100, Agilent Technologies, Waldbronn, Německo
 - UV spektrofotometr HP 8453, Agilent Technologies, Waldbronn, Německo
 - pH metr Sentron SI 400 s pH elektrodou Sentron SI (rozsah pH 0-14); Sentron, Holandsko
- a ostatní standardní vybavení laboratoře (váhy, UV lázeň, pipety, ...)

4.3 Podmínky měření

Pro všechny analýzy byla použita křemenná kapilára o vnitřním průměru 50 μm , celkové délce 48,5 cm a efektivní délce 40 cm. Jedna sada základního elektrolytu byla tvořena 3 zásobníky elektrolytů (vialkami) – jeden vstupní, jeden výstupní a jeden na promytí kapiláry; taková sada roztoků byla použita max. na 9 analýz. Místnost, ve které byly analýzy prováděny, byla klimatizována na 25°C.

4.3.1 Separace v achirálním prostředí

Kapilára byla promyta před prvním použitím 30 minut 1 M hydroxidem sodným, dále 30 minut 0,1 M hydroxidem sodným a nakonec 10 minut vodou. Denně pak byla kapilára před prvním měřením a po posledním měření proplachována 10 minut 1 M NaOH a 10 minut vodou. Před každou analýzou byla kapilára promyta 3 minuty 1 M NaOH, 10 minut vodou a 3 minuty vlastním elektrolytem, všechny kroky při tlaku 1000 mBar. Dávkování analyzovaného vzorku probíhalo při tlaku 50 mBar po dobu 5 sekund. Kapilára byla temperována na 25°C. Vkládané napětí bylo 30 kV (katodický EOF). Detekce probíhala při vlnových délkách 200 nm, 254 nm a 300 nm. Složení základních elektrolytů je uvedeno v Kapitole 4.4.1.

4.3.2 Chirální separace

4.3.2.1 Chirální separace enantiomerů 1,1'-binaftyl-2,2'-diylhydrogenfosfátu a ofloxacinu

Kapilára byla kondicionována 10 minut 0,1 M kyselinou fosforečnou, 20 minut 1 M hydroxidem sodným, 20 minut 0,1 M hydroxidem sodným, 10 minut vodou a 10 minut BGE. Mezi jednotlivými analýzami byla kapilára promývána 2 minuty 0,1 M kyselinou fosforečnou, 2 minuty 0,1 M hydroxidem sodným, 2 minuty vodou a 4 minuty BGE. Po dokončení denního měření byla kapilára promývána 10 minut 0,1 M kyselinou fosforečnou, 10 minut 0,1 M hydroxidem sodným a 10 minut vodou [8].

4.3.2.1.1 Separace enantiomerů 1,1'-binaftyl-2,2'-diylhydrogenfosfátu

Dávkování analyzovaného vzorku probíhalo při tlaku 50 mBar po dobu 5 sekund. Kapilára byla temperována na 20°C. Vkládané napětí bylo -30 kV. Detekce probíhala při vlnové délce 210 nm. Příprava základního elektrolytu je uvedena v Kapitole 4.4.2.1 [8].

4.3.2.1.2 Separace enantiomerů ofloxacinu

Dávkování analyzovaného vzorku probíhalo při tlaku 50 mBar po dobu 5 sekund. Kapilára byla temperována na 20°C. Vkládané napětí bylo -20 kV. Detekce probíhala při vlnové délce 291 nm. Příprava základního elektrolytu je uvedena v Kapitole 4.4.2.2 [8].

4.3.2.2 Chirální separace ketoprofenu, flurbiprofenu a warfarinu

Kapilára byla promyta před prvním použitím 30 minut 1 M NaOH, dále 30 minut 0,1 M NaOH a nakonec 10 minut vodou. Denně pak byla kapilára před prvním měřením a po posledním měření proplachována 10 minut 1 M NaOH a 10 minut vodou. Před každou analýzou byla kapilára promyta 3 minuty 1 M NaOH, 10 minut vodou a 3 minuty vlastním elektrolytem, všechny kroky při tlaku 1000 mBar. Dávkování analyzovaného vzorku (platí pro ketoprofen, flurbiprofen, warfarin) probíhalo při tlaku 50 mBar po dobu 5 sekund. Kapilára byla temperována na 25°C. Vkládané napětí bylo

30 kV. Detekce probíhala při vlnové délce 254 nm. Příprava základního elektrolytu je uvedena v Kapitole 4.4.2.3. [9].

4.3.3 Separace s testovanými CIL

Kapilára byla kondicionována a promývána roztoky a elektrolyty v závislosti na postupně získaných zkušenostech s CIL. Vzhledem k neznámému chování látek se jednalo o metodu screeningu. V různých fázích experimentální činnosti v průběhu řešení mé diplomové práce byly analýzy uskutečňovány s různými koncentracemi IL a různými analyty. Přesné složení BGE, promytí kapiláry, vložené napětí a vhodná vlnová délka pro detekci chirálních analytů jsou uvedeny u jednotlivých příkladů v Kapitole 8. Dávkování analyzovaného vzorku probíhalo při tlaku 50 mBar po dobu 5 sekund. Kapilára byla temperována na 25°C. Příprava základního elektrolytu je uvedena v Kapitole 4.4.3.1.

4.3.3.1.1 Separace v nevodném prostředí (s ILB-1)

Kapilára byla promyta 15 minut metanolem, 15 minut 1 M kyselinou mravenčí v metanolu a nakonec 15 minut vlastním elektrolytem. Mezi analýzami byla promývána 5 minut 1 M kyselinou mravenčí, 5 minut metanolem a 3 minuty vlastním elektrolytem, všechny kroky při tlaku 1000 mBar. Dávkování analyzovaného vzorku probíhalo při tlaku 50mBar po dobu 5 sekund. Kapilára byla temperována na 25°C. Vkládané napětí bylo -30 kV. Detekce probíhala při vlnové délce 254 nm. Příprava základního elektrolytu je uvedena v Kapitole 4.4.3.2 [30].

4.4 Příprava roztoků základních elektrolytů

4.4.1 Separace v achirálním prostředí

Všechny elektrolyty byly před použitím filtrovány za pomoci nylonového filtru o velikosti pórů 0,45 μm a poté byly odplyněny v ultrazvukové lázni po dobu 5 minut.

4.4.1.1 Příprava 60 mM octanového pufru o pH 5,0

Do kádinky s cca 30 ml vody bylo napipetováno 0,347 ml kyseliny octové; pH bylo upraveno na hodnotu 5,0 1 M roztokem NaOH. Tento roztok byl kvantitativně převeden do 100 ml odměrné baňky a doplněn vodou po rysku.

4.4.1.2 Příprava 50 mM fosfátového pufru o pH 7,5

Do kádinky bylo naváženo 780 mg $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, toto množství bylo rozpuštěno v cca 30 ml vody. Hodnota pH byla upravena na hodnotu 7,5 roztokem 1 M HCl. Tento roztok byl kvantitativně převeden do 100 ml odměrné baňky a doplněn vodou po rysku.

4.4.1.3 Příprava 50 mM fosfátového pufru o pH 2,0

Do kádinky s cca 30 ml vody bylo napipetováno 0,340 ml kyseliny fosforečné; pH bylo upraveno na hodnotu 2,0 1 M roztokem NaOH. Tento roztok byl kvantitativně převeden do 100 ml odměrné baňky a doplněn vodou po rysku.

4.4.1.4 Příprava 20 mM trizmového pufru o pH 8,5

Do kádinky bylo naváženo 0,2430 g trizmy, toto množství bylo rozpuštěno v cca 30 ml vody. Hodnota pH byla upravena 1 M HCl na hodnotu 8,5. Tento roztok byl kvantitativně převeden do 100 ml odměrné baňky a doplněn vodou po rysku.

4.4.1.5 Příprava 20 mM borátového pufru o pH 9,0

Do kádinky bylo naváženo 0,1240 g kyseliny borité, toto množství bylo rozpuštěno v cca 30 ml vody. Hodnota pH byla upravena 1 M HCl na hodnotu 9,0. Tento roztok byl kvantitativně převeden do 100 ml odměrné baňky a doplněn vodou po rysku.

4.4.2 Separace v chirálním prostředí

Dle dříve sepsané literatury [8], [9] byly připraveny následující elektrolyty. Byly filtrovány za pomoci polytetrafluorethylenového filtru o velikosti pórů 0,45 μm a dále pak byly odplyněny v ultrazvukové lázni po dobu 5 minut.

4.4.2.1 50 mM fosfátový pufr o pH 3,0 a β -CD (2,5 mg/ml)

Do kádinky s cca 50 ml vody bylo napipetováno 0,340 ml kyseliny fosforečné; pH bylo upraveno na hodnotu 3,0 1 M roztokem NaOH. Tento roztok byl kvantitativně převeden do 100 ml odměrné baňky a doplněn vodou po rysku. Dále bylo naváženo 25 mg β -cyklodextrinu, který byl rozpuštěn v cca 5 ml pufru za pomoci ultrazvukové lázně. Výsledný roztok byl kvantitativně převeden do 10 ml odměrné baňky, která byla doplněna pufrům po rysku [8].

4.4.2.2 50 mM fosfátový pufr o pH 2,5 s 30 mg/ml sulfatovaného β -CD

Do kádinky s cca 50 ml vody bylo napipetováno 0,340 ml kyseliny fosforečné; pH bylo upraveno na hodnotu 2,5 1 M roztokem NaOH. Tento roztok byl kvantitativně převeden do 100 ml odměrné baňky a doplněn vodou po rysku. Dále bylo naváženo 300 mg sulfatovaného β -cyklodextrinu, který byl rozpuštěn v cca 5 ml pufru za pomoci ultrazvukové lázně. Výsledný roztok byl kvantitativně převeden do 10 ml odměrné baňky, která byla doplněna pufrům po rysku [8].

4.4.2.3 60 mM octanový pufr o pH 5,0 s 50 mM TM- β -CD

V případě literatury [9] byl připraven elektrolyt – 60 mM octanový pufr o pH 5,0 stejným způsobem jako při přípravě pro separace v achirálním prostředí – viz Kapitola 4.4.1.1. Dále bylo naváženo 0,715 g trimethyl- β -cyklodextrinu do kádinky a následně rozpuštěno v 10 ml 60 mM octanového pufru. Koncentrace této navážky odpovídá 50 mM trimethyl- β -cyklodextrinu.

4.4.3 Separace v BGE obsahujícím nově připravené CIL

4.4.3.1 Separace ve vodném prostředí

Elektrolyty byly připraveny rozpuštěním příslušného množství CIL v určitém pufru. Pufry byly připraveny dle postupů v kapitole Separace v achirálním prostředí – viz Kapitola 4.4.1. Navážky CIL podle požadovaných koncentrací byly vypočítány podle vzorce $m = c \cdot M \cdot V$, kde c odpovídá molární koncentraci [mol/l], M je molární hmotnost [g/mol] CIL a V je objem pufru [l]. Získané číslo je navážka CIL [g]. Roztok byl umístěn do ultrazvukové lázně po dobu nutnou k úplnému rozpuštění IL v pufru. Roztok byl zfiltrován pomocí nylonového filtru o velikosti pórů 0,45 μm a odplyněn v ultrazvukové lázni po dobu 5 minut. Roztoky byly uchovávány při pokojové teplotě.

4.4.3.2 Separace v nevodném prostředí

Elektrolyty byly připraveny rozpuštěním CIL v pufru. 60 mM octan amonný byl připraven následujícím způsobem. Do kádinky bylo naváženo 462 mg octanu amonného, toto množství bylo rozpuštěno v cca 30 ml metanolu. Roztok byl kvantitativně převeden do 100 ml odměrné baňky a doplněn metanolem po rysku. Dále byla navážena CIL dle požadované koncentrace a rozpuštěna v pufru. Roztok byl zfiltrován za pomoci polytetrafluorethylenového filtru o velikosti pórů 0,45 μm a odplyněn v ultrazvukové lázni po dobu 5 minut. Roztoky byly uchovávány při pokojové teplotě.

4.5 Příprava roztoků standardů modelových analytů

Všechny roztoky byly uchovávány v lednici při 5 - 8 °C.

4.5.1 Příprava zásobních roztoků

4.5.1.1 Příprava racemických roztoků

Do mikrozkušavky typu Eppendorf bylo naváženo příslušné množství ketoprofenu, ibuprofenu, flurbiprofenu či warfarinu. Každý ze standardů byl rozpuštěn v 1 ml 25% metanolu. Koncentrace ketoprofenu byla 5 mg/ml, ibuprofenu 1mg/ml,

flurbiprofenu 1 mg/ml a warfarinu 2 mg/ml. Pro rozpuštění byla použita míchačka Vortex a ultrazvuková lázeň (po dobu 4 minut).

Pro elektroforézu v nevodném prostředí byly roztoky připravovány stejným způsobem za použití 100% metanolu.

4.5.1.2 Příprava roztoků jednotlivých enantiomerů

Do mikrokumavky typu Eppendorf byl navážen (*S*)-ketoprofen, (*S*)-ibuprofen, či (*R*)-warfarin. Každá navážka byla rozpuštěna v 1 ml 25% (v/v) metanolu. Koncentrace (*S*)-ketoprofenu byla 5 mg/ml, (*S*)-ibuprofenu 1 mg/ml a (*R*)-warfarinu 1 mg/ml. Pro rozpuštění byla použita míchačka Vortex a ultrazvuková lázeň (po dobu 4 minut).

Do mikrokumavky typu Eppendorf byl navážen přibližně přesně 1 mg (*R*)-(-)-1,1'-binaftyl-2,2'-diylhydrogenfosfátu či 1 mg (*S*)-(+)-1,1'-binaftyl-2,2'-diylhydrogenfosfátu. Každý byl rozpuštěn v 1 ml metanolu. Pro rozpuštění byla použita míchačka Vortex a ultrazvuková lázeň.

Do mikrokumavky typu Eppendorf byl navážen přibližně přesně 1 mg levofloxacinu a 1 mg racemického ofloxacinu. Každý byl rozpuštěn v 1 ml metanolu. Pro rozpuštění byla použita míchačka Vortex a ultrazvuková lázeň.

4.5.1.3 Příprava pracovních roztoků standardů

Pracovní roztoky ketoprofenu, flurbiprofenu a warfarinu byly připraveny zředěním zásobních roztoků, příp. smícháním konkrétních zásobních roztoků pro přípravu fortifikovaných pracovních roztoků. Do mikrokumavky typu Eppendorf bylo napipetováno množství zásobního roztoku tak, aby koncentrace pracovního roztoku odpovídala 100 µg/ml. Napipetovaný objem byl doplněn 25% (v/v) metanolem a roztok byl řádně promíchán.

Příklad.: Přesná navážka warfarinu 2,23 mg byla rozpuštěna v 1 ml 25% (v/v) metanolu. Vznikl zásobní roztok o koncentraci 2,23 mg/ml. Pro přípravu 1 ml pracovního roztoku o koncentraci 100 µg/ml byla použita směšovací rovnice:

Rovnice 6

$$V_1 \cdot c_1 + V_2 \cdot c_2 = V_3 \cdot c_3$$

$$2230 \cdot V_1 + 0 \cdot V_2 = 100 \cdot 1000$$

$$2230 \cdot V_1 = 100000$$

$$V_1 = 44,84 \mu l$$

$$V_2 = V_3 - V_1$$

$$V_2 = 1000 - 44,84$$

$$V_2 = 955,16 \mu l$$

V – objem [µl]

c – koncentrace [µg/ml]

1 – zásobní roztok

2 – 25% (v/v) metanol

3 – pracovní roztok

Výsledkem směšovací rovnice je pipetovaný objem zásobního roztoku (V_1), v našem případě tedy 44,84 µl, ke kterému bylo přidáno 955,16 µl 25% MeOH.

Pro separaci dle dříve sepsané literatury [8] byl použit pracovní roztok v tomto složení: 20 µl zásobního roztoku (S)-(+)-1,1'-binaftyl-2,2'-diylhydrogenfosfátu a 10 µl zásobního roztoku (R)-(-)-1,1'-binaftyl-2,2'-diylhydrogenfosfátu doplněný 10% metanolem na celkový objem 1 ml. Výsledný roztok tedy obsahoval 20 µg/ml (S)-izomeru a 10 µg/ml (R)-izomeru.

Pro separaci dle dříve sepsané literatury [8] byl použit pracovní roztok v tomto složení: 40 µl zásobního roztoku racemického ofloxacinu a 20 µl zásobního roztoku levofloxacinu doplněný vodou na celkový objem 1 ml. Koncentrace levofloxacinu byla tedy 40 µg/ml a koncentrace (R)-izomeru byla 20 µg/ml.

4.6 Výpočty

4.6.1 Elektroforetická pohyblivost

Viz rovnice 3 v kapitole 3.2.

4.6.2 Zdánlivý počet teoretických pater [31]

Rovnice 7

$$N = 5,54 \cdot \left(\frac{t_R}{w_h} \right)^2$$

t_R – migrační čas nebo vzdálenost podél základní linie mezi bodem nástřiku a kolmicí spuštěnou z vrcholu sledovaného píku [s]

w_h – šířka píku v polovině jeho výšky [s]

4.6.3 Rozlišení [31]

Rovnice 8

$$R_s = \frac{1,18 \cdot (t_{R2} - t_{R1})}{w_{h1} + w_{h2}}$$

$t_{R2} > t_{R1}$

t_{R1} a t_{R2} – migrační časy nebo vzdálenosti podél základní linie mezi bodem nástřiku a kolmicemi spuštěnými z vrcholů dvou sousedních píků [s]

w_{h1} a w_{h2} – šířky píků v polovině jejich výšky [s]

4.6.4 Faktor symetrie píku [31]

Rovnice 9

$$A_s = \frac{w_{0,05}}{2d}$$

$w_{0,05}$ – šířka píku v jedné dvacetině jeho výšky [s]

d – vzdálenost mezi kolmicí spuštěnou z vrcholu píku a vzestupnou částí píku v jedné dvacetině jeho výšky [s]

4.6.5 Opakovatelnost

4.6.5.1 Průměr hodnot [32]

Rovnice 10

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

4.6.5.2 Směrodatná odchylka [32]

Rovnice 11

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

n – počet jednotlivých měření

x_i – hodnota výsledku jednotlivého měření

4.6.5.3 Relativní směrodatná odchylka [31]

Rovnice 12

$$RSD = 100 \cdot \frac{SD}{\bar{x}}$$

5. VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 *Popis a chování iontových kapalin*

5.1.1 ILA-1

Jako čistá sloučenina je bílá, sypká, s tendencí tvořit šupiny, bez zápachu. Je hygrokopická, proto byla skladována v exsikátoru. Její rozpustnost je závislá na koncentraci připravovaného roztoku, teplotě a pH rozpouštědla. Po delším stání, tj. minimálně po 72 hodinách, dochází k tvorbě amorfni sraženiny. Následnou sonifikací a mícháním se ale opět rozpustí.

V kyselějším pH se rozpouští snadněji, se zvyšujícím se pH se rozpouští obtížně či se nerozpouští vůbec. Ve fosfátovém pufru o pH 2,0 se bez problému rozpustí i 30 mM přídavek ILA-1, avšak separace s tímto elektrolytem poskytují pouze chvostující a nereprodukovatelné píky. V octanovém pufru o pH 5,0 se rozpouští ILA-1 obtížněji a to do koncentrace 20 mM, při koncentraci 25 mM a vyšší je již v tomto pufru částečně nerozpustná. Ve fosfátovém pufru o pH 7,5 byly pozorovány problémy s rozpustností i při nižších koncentracích. Po 72 hodinovém stání bylo pozorováno vysrážení ILA-1 bez ohledu na koncentraci. V trizmovém pufru o pH 8,5 se rozpouští ILA-1 pomalu, po 15 minutách sonifikace dochází k rozpuštění. V borátovém pufru o pH 9,0 je ILA-1 nerozpustná.

ILA-1 reaguje s hydroxidem sodným. Je pravděpodobné, že zde dochází k hydrolyze v alkalickém prostředí za vzniku sraženiny. K alkalické hydrolyze může být náchylná jak esterová vazba, tak i amidická vazba. Z těchto důvodů se nesmí kapilára promývat mezi analýzami hydroxidem sodným. K promývání kapiláry byla později zvolena kyselina chlorovodíková, neboť s ILA-1 nebyly pozorovány žádné makroskopické změny roztoku.

Tato sloučenina byla nasyntetizována jako první a proto byla zkoumána nejdůkladněji. S dalšími nově nasyntetizovanými jevila velice podobné chování.

5.1.2 ILA-2

Jako čistá sloučenina je bílá, sypká, lehce zapáchá po aminech. Je hygroskopická, proto byla skladována v exsikátoru. Svým chováním velice připomíná ILA-1. Její rozpustnost je téměř identická s ILA-1 – viz tabulka 1, ale obtížněji se rozpouští i ve fosfátovém pufru o pH 2,0. Při koncentraci 20 mM a vyšší je ILA-2 v tomto pufru nerozpustná.

5.1.3 ILA-3

Jako čistá sloučenina je bílá, sypká, bez zápachu. Je hygroskopická, proto byla skladována v exsikátoru. Svými vlastnostmi v podstatě kopíruje předchozí ILA.

5.1.4 ILB-1

Jako čistá sloučenina je bílá, sypká a bez zápachu. Je hygroskopická, proto byla skladována v exsikátoru. Je nerozpustná ve vodě. Nerozpustnost ve vodě pravděpodobně způsobuje substituce fenylem. Touto substitucí se také ILB-1 zásadně odlišuje od ILA1-3; pro syntézu ILB-1 byla použita aminokyselina fenylglycin, zatímco pro syntézu ILA1-3 byl použit alanin. Je rozpustná v metanolu. V bezvodém octanovém pufru se rozpouštěla dobře i ve vyšších koncentracích.

Tabulka 1: Rozpustnost IL v jednotlivých pufrech

	VODA	OCTANOVÝ PUFR pH 5,0	FOSFÁTOVÝ PUFR pH 7,5	FOSFÁTOVÝ PUFR pH 2,0	TRIZMOVÝ PUFR pH 8,5	BORÁTOVÝ PUFR pH 9,0
ILA-1	R	R (20)	R (20)	R	R (10)	N
ILA-2	R	R (20)	R (20)	R (20)	R (10)	N
ILA-3	R	R (20)	R (20)	R (20)	-	-
ILB-1	N*	-	-	-	-	-

R – rozpustný

R (číslo) – rozpustný do určité koncentrace, hodnoty odpovídají mM

N* – nerozpustný, zpracováno za pomoci nevodného prostředí

-- nezkoušeno

Na základě těchto údajů byly ILA1-3 testovány jako chirální selektory v BGE založených na octanovém pufru o pH 5,0 a fosfátovém pufru o pH 7,5. ILB-1 byla testována v nevodném prostředí.

5.2 UV spektra testovaných CIL a volba vhodné vlnové délky

Vzhledem k používané UV detekci bylo zapotřebí stanovit vhodnou vlnovou délku tak, aby se vlnová délka detekce nepřekrývala s absorbancí testovaných CIL, které jsou součástí BGE. Naměřená UV spektra jsou uvedena v příloze 1. Na základě těchto výsledků pak byly určeny použité vlnové délky (254 nm, 300 nm) a zároveň vyloučeny některé sloučeniny, např. ibuprofen či histidin, se kterými bylo původně v plánu CIL testovat. UV „cut off“ testovaných ILA1-3 a ILB-1 je v rozmezí cca 230-240 nm.

5.3 Modelové sloučeniny

Základním prvkem výběru sloučenin pro tuto práci je jednoznačně jejich optická aktivita. Jak již bylo zmíněno v předchozím textu, tato diplomová práce je inspirována publikací Rizviho a Shamsiho [7]. Jelikož námi testované CIL jsou inspirované strukturou *L*-UCLB a *L*-UCPB, byly modelové analyty vybrané takovým způsobem, aby měly podobné vlastnosti jako modelové analyty (\pm)- α -bromofenylactová kyselina a (\pm)-2-(2-chlorophenoxy)propanová kyselina, jejichž enantiomery byly v práci Rizviho a Shamsiho úspěšně rozseparovány. Jako první volbu představují sloučeniny ze skupiny nesteroidních antiflogistik (ketoprofen, flurbiprofen a ibuprofen), které strukturně odpovídají arylpropionovým kyselinám. Pro rozšíření portfolia modelových analytů byl do studie zahrnut také warfarin (slabší kyselina než nesteroidní antiflogistika), 1,1'-binaftyl-2,2'-diylhydrogenfosfát, který nemá chirální centrum, ale vykazuje axiální chiralitu a amfoterní antibiotikum ofloxacin.

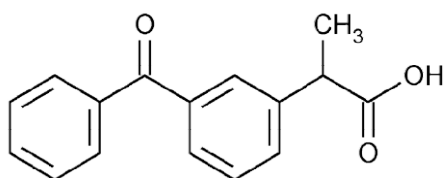
5.3.1 Nesteroidní antiflogistika

Nesteroidní protizánětlivá léčiva se používají k potlačení zánětu a bolesti. Kyselý charakter sloučeniny je podmínkou jejich účinku, neboť při inhibici cyklooxygenázy kompetují s kyselinou arachidonovou. Prostorové uspořádání molekuly umožňuje optimální interakci s místem účinku [33].

5.3.1.1 Ketoprofen

Ketoprofen, chemicky 2-(3-benzoylfenyl)propanová kyselina, konkrétně nekoplanární uspořádání se dvěma aromatickými jádry, které jsou spojené karbonylovou skupinou. Nejprve byl do klinické praxe zaveden racemát, ale vzhledem k pozdějším farmakologickým poznatkům jednotlivých enantiomerů byl schválen také dexketoprofen [9]. Hodnota pKa karboxylové skupiny je 3,88. Z toho vyplývá, že při pH 7,5, a též i při pH 5,0 je plně ionizován (deprotonován), to znamená, že má záporný náboj. Výběr této sloučeniny byl vhodný i vzhledem k jeho UV spektru a možnosti detekce v přítomnosti CIL. Vlnová délka UV detekce byla 254 nm.

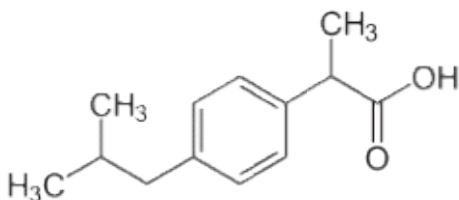
Obrázek 10: Strukturní vzorec ketoprofenu



5.3.1.2 Ibuprofen

Ibuprofen, chemicky 2-(4-(2-methylpropyl)fenyl)propanová kyselina. V klinické praxi je používán jak racemát, tak dexibuprofen. Hodnota pKa činí 4,85. Z toho vyplývá, že při pH 7,5 je plně ionizován, ale při pH 5,0 je jen částečně deprotonován. Výběr této sloučeniny byl nevhodný vzhledem k jeho UV spektru a možnosti detekce v přítomnosti CIL, a proto s ním nebylo v separacích s CIL pracováno.

Obrázek 11: Strukturní vzorec ibuprofenu

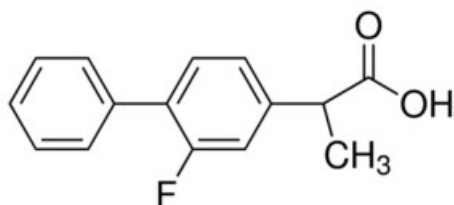


5.3.2 Flurbiprofen

Flurbiprofen, chemicky (2*RS*)-2-(2-fluorbifenyl-4-yl)propanová kyselina, obsahuje dvě přímo spojená aromatická jádra. V klinické praxi je používán racemát. Hodnota pKa činí 4,42. Z toho vyplývá, že při pH 7,5 je plně ionizován, ale při pH 5,0 je

jen částečně deprotonován. Výběr této sloučeniny byl vhodný i vzhledem k jeho UV spektru a možnosti detekce v přítomnosti CIL. Vlnová délka UV detekce byla 254 nm.

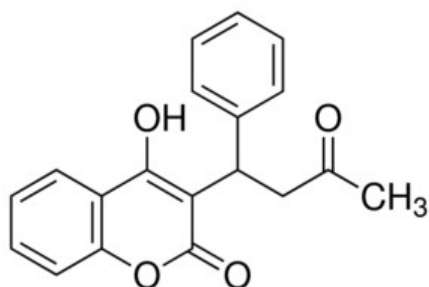
Obrázek 12: Strukturní vzorec flurbiprofenu



5.3.3 Warfarin

Warfarin, chemicky (*RS*)-3-(α -acetonylbenzyl)-4-hydroxykumarin, je perorální antikoagulans, antagonist vitamínu K. Je používán při poruchách srážlivosti krve ve formě sodné soli. V klinické praxi je používán racemát, ačkoli je dokázáno, že *S*-izomer je účinnější než *R*-izomer. Jednotlivé izomery mají také rozdílné lékové interakce, ať už s jinými léčivými, tak i s potravou [34]. Hodnota pK_a činí 5,08. Z toho vyplývá, že při pH 7,5 je plně ionizován, ale při pH 5,0 je jen málo deprotonován. Výběr této sloučeniny byl vhodný i vzhledem k jeho UV spektru a možnosti detekce v přítomnosti CIL. Vlnová délka UV detekce byla 300 nm.

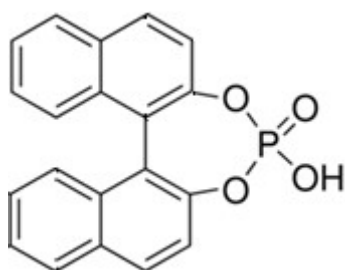
Obrázek 13: Strukturní vzorec warfarinu



5.3.4 1,1'-binaftyl-2,2'-diylhydrogenfosfát

1,1'-binaftyl-2,2'-diylhydrogenfosfát je axiálně chirální sloučeninou. V klinické praxi se nepoužívá. Pro experimenty byla použita sodná sůl. Vlnová délka UV detekce byla 254 nm.

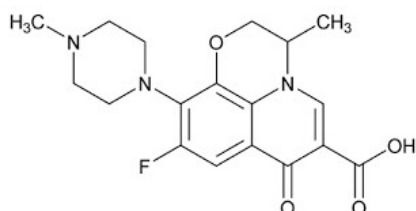
Obrázek 14: Strukturní vzorec 1,1'-binaftyl-2,2'-diylhydrogenfosfátu



5.3.5 Ofloxacin

Ofloxacin, chemicky 9-fluor-3-methyl-10-(4-methylpiperazin-1-yl)-7-oxo-2,3-dihydro-7H-pyrido[1,2,3-*de*][1,4]benzoxazin-6-karboxylová kyselina, je chinolinové chemoterapeutikum. Mechanismus účinku spočívá v inhibici prokaryontní DNA gyrasy. Má baktericidní účinek. Používá se na základě mikrobiologického vyšetření a stanovení citlivosti mikroorganismů, např. na infekce močových cest. V klinické praxi se užívá buďto v racemické podobě anebo ve formě *S*-izomeru, pro který se používá název levofloxacin. *R*-izomer je spjat s projevy neurotoxicity [35]. Ze strukturního vzorce vyplývá, že se jedná o amfoterní sloučeninu. pK_a karboxylové skupiny je 5,45, to znamená, že při pH 7,5 je tato sloučenina převážně záporně nabitá. pK_a dusíkového heteroatomu v poloze 4 piperazinového kruhu činí 6,20. Z toho vyplývá, že při pH 5,0 bude molekula ofloxacinu významně protonovaná a bude se tak chovat jako kationt. pI hodnota je 5,97; to znamená, že při tomto pH je kladný a záporný náboj v rovnováze a molekula ofloxacinu se nebude pohybovat v elektrickém poli. Vlnová délka UV detekce byla 254 nm.

Obrázek 15: Strukturní vzorec ofloxacinu



5.4 Separace modelových sloučenin v BGE s konvenčním chirálním selektorem

Separace enantiomerů ketoprofenu byla uskutečněna dle dříve popsané literatury [9] prostřednictvím trimethylovaného- β -cyklodextrinu jako CS v 60 mM octanovém pufru o pH 5,0. Touto metodou byly rovněž separovány enantiomery dalších chirálních analytů: ibuprofen, flurbiprofen a warfarin. Byly voleny vzhledem ke svým vlastnostem a podobnosti s ketoprofenem, jehož chirální separace je ve zdroji [9] popsána. Jako první migrují *R*-enantiomery (viz obrázek 16-19), které tvoří s CS pevnější komplex. Analyty migrují směrem k anodě (vzhledem k pKa hodnotám a pH elektrolytu migrují jako anionty), neutrální CS je vlivem EOF unášen ke katodě. Vliv EOF je silnější, proto jsou analyty následně unášeny ke katodě. Zprůměrované výsledky ze třech různých měření ukazuje tabulka 2, která zároveň obsahuje údaje o způsobilosti systému, tedy faktor symetrie, separační účinnost charakterizovanou počtem teoretických pater a opakovatelnost migračních časů charakterizovanou RSD. Rozlišení mezi jednotlivými enantiomery jsou shrnuty v tabulce 3.

Tabulka 2: Výsledky separací v BGE: 60 mM octanový pufr pH 5,0; 50 mM trimethyl- β -cyklodextrin

Analyt	t_m (analytu)	t_m (EOF)	μ_a	μ_e	μ_{EOF}	A_s	N	SD	RSD
(R)-ketoprofen	3,23	2,68	$3,34 \cdot 10^{-4}$	$-6,89 \cdot 10^{-5}$	$4,03 \cdot 10^{-4}$	0,85	625638	0,66	0,34
(S)-ketoprofen	3,32	2,68	$3,24 \cdot 10^{-4}$	$-7,84 \cdot 10^{-5}$	$4,03 \cdot 10^{-4}$	0,78	398167	0,71	0,36
(R)-ibuprofen	2,81	2,64	$3,84 \cdot 10^{-4}$	$-2,36 \cdot 10^{-4}$	$4,08 \cdot 10^{-4}$	0,96	500345	0,10	0,06
(S)-ibuprofen	2,84	2,64	$3,79 \cdot 10^{-4}$	$-2,88 \cdot 10^{-4}$	$4,08 \cdot 10^{-4}$	0,84	421978	0,11	0,07
(R)-warfarin	2,99	2,62	$3,60 \cdot 10^{-4}$	$-5,07 \cdot 10^{-4}$	$4,11 \cdot 10^{-4}$	0,86	527192	0,90	0,50
(S)-warfarin	3,07	2,62	$3,51 \cdot 10^{-4}$	$-6,02 \cdot 10^{-4}$	$4,11 \cdot 10^{-4}$	0,95	622738	1,00	0,54
flurbiprofen - izomer 1	2,90	2,63	$3,71 \cdot 10^{-4}$	$-3,81 \cdot 10^{-4}$	$4,09 \cdot 10^{-4}$	0,86	446814	0,10	0,06
flurbiprofen - izomer 2	2,95	2,63	$3,65 \cdot 10^{-4}$	$-4,40 \cdot 10^{-4}$	$4,09 \cdot 10^{-4}$	0,83	470439	0,11	0,06

t_m (analytu) – migrační čas analytu [min]

t_m (EOF) – migrační čas EOF [min]

μ_a – zdánlivá pohyblivost [cm^2/Vs]

μ_e – efektivní pohyblivost [cm^2/Vs]

μ_{EOF} – pohyblivost EOF [cm^2/Vs]

A_s – faktor symetrie

N – počet teoretických pater

SD – směrodatná odchylka

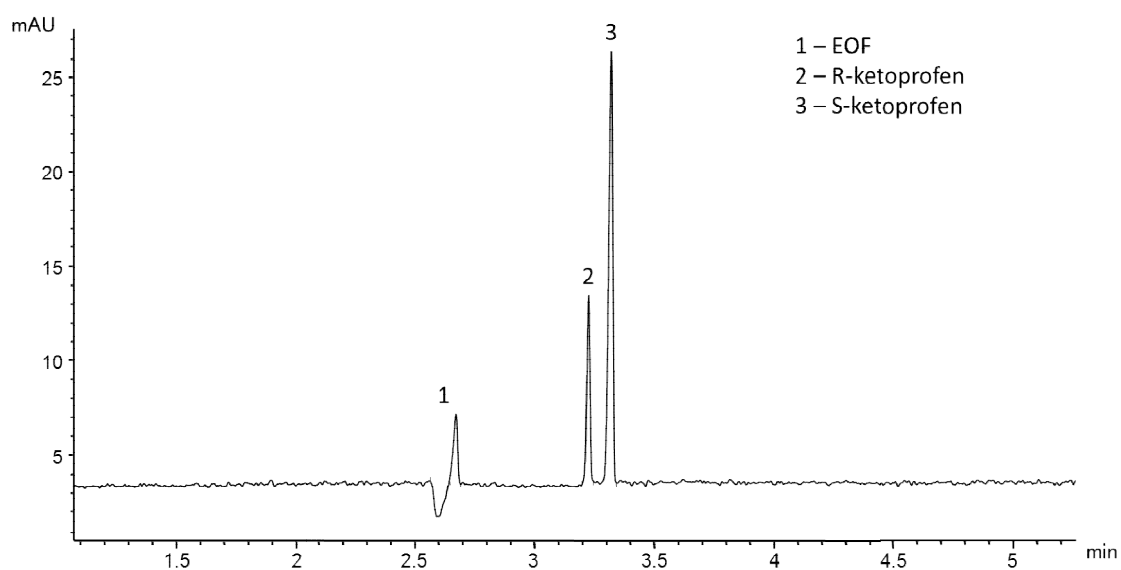
RSD – relativní směrodatná odchylka [%]

Tabulka 3: Rozlišení píků enantiomerů ketoprofenu, ibuprofenu, warfarinu a flurbiprofenu

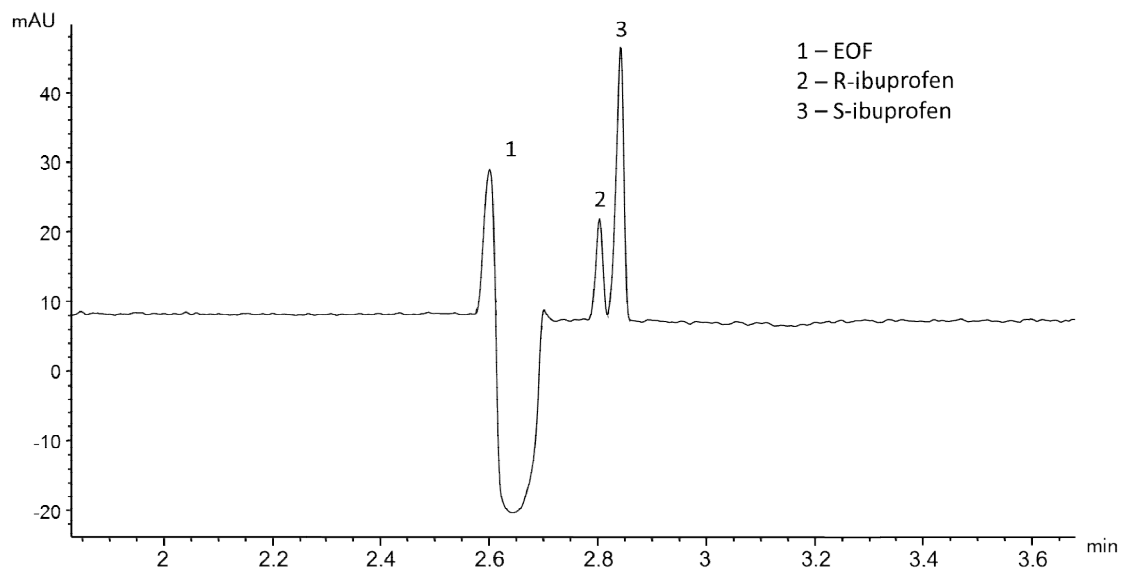
Rozlišení píků analytů	R_s
R -ketoprofen - S -ketoprofen	2,91
R -ibuprofen - S -ibuprofen	1,47
R -warfarin - S -warfarin	3,57
R -flurbiprofen - S -flurbiprofen	1,71

Z tabelovaných údajů vyplývá, že v tomto BGE s konvenčním CS lze docílit separace jednotlivých enantiomerů ketoprofenu, warfarinu a flurbiprofenu až na základní linii ($R_s > 1,5$). Separace enantiomerů ibuprofenu byla téměř na základní linii ($R_s = 1,47$).

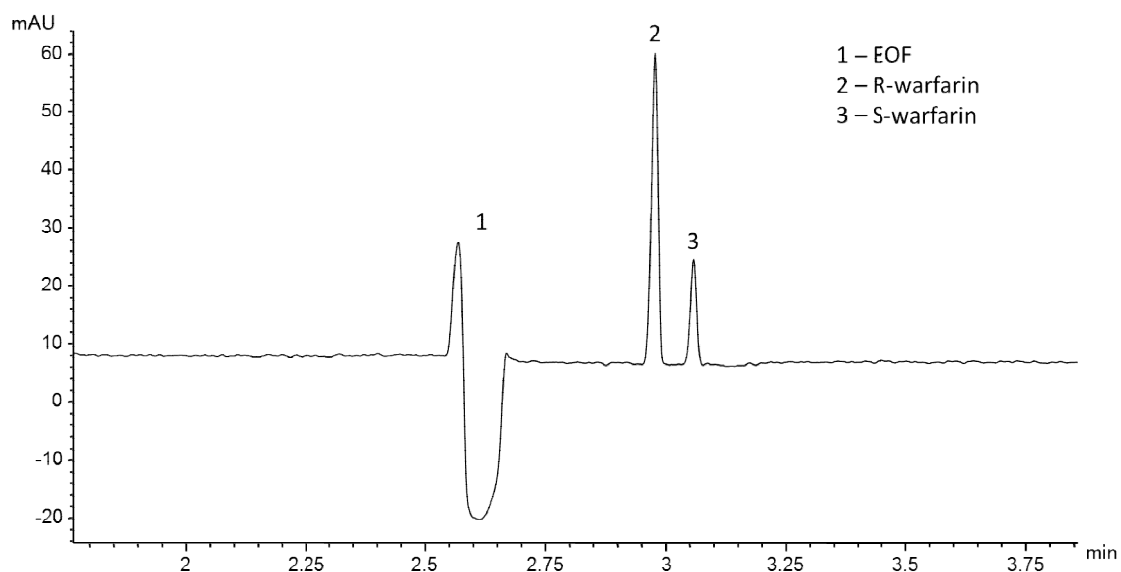
Obrázek 16: Elektroferogram separace enantiomerů ketoprofenu (koncentrace (R)-ketoprofenu byla 25 $\mu\text{g/ml}$ a (S)-ketoprofenu byla 75 $\mu\text{g/ml}$). BGE: 60 mM octanový pufr pH 5,0; 50 mM trimethyl- β -cyklodextrin



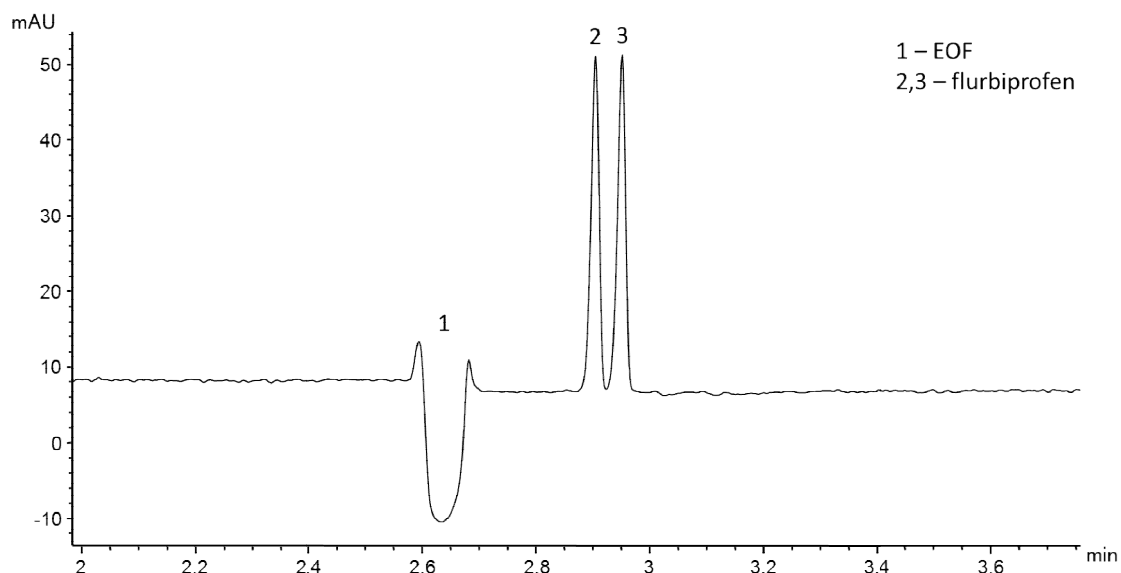
Obrázek 17: Elektroferogram separace enantiomerů ibuprofenu (koncentrace (R)-ibuprofenu byla 25 $\mu\text{g/ml}$ a (S)-ibuprofenu byla 75 $\mu\text{g/ml}$). BGE: 60 mM octanový pufr pH 5,0; 50 mM trimethyl- β -cyklodextrin



Obrázek 18: Elektroferogram separace enantiomerů warfarinu (koncentrace (R)-warfarinu byla 75 $\mu\text{g/ml}$ a (S)-warfarinu byla 25 $\mu\text{g/ml}$). BGE: 60 mM octanový pufr pH 5,0; 50 mM trimethyl- β -cyklodextrin



Obrázek 19: Elektroferogram separace enantiomerů flurbiprofenu (koncentrace racemátu byla 100 $\mu\text{g/ml}$), BGE: 60 mM octanový pufr pH 5,0; 50 mM trimethyl- β -cyklodextrin



Separace dle dříve sepsané literatury [8] byla uskutečněna přesně podle protokolu. Pro separaci enantiomerů 1,1'-binaftyl-2,2'-diylhydrogenfosfátu byl použit nativní β -CD, zatímco pro separaci enantiomerů ofloxacinu byl použit záporně nabitý

sulfatovaný β -CD. Průběh separací ukazují obrázky 20 a 21. Zprůměrované výsledky ze třech různých měření jsou shrnuty v tabulkách 4 a 5, které zároveň obsahují údaje o způsobilosti systému, tedy faktor symetrie, účinnost charakterizovanou počtem teoretických pater a opakovatelnost migračních časů charakterizovanou RSD. Hodnoty rozlišení uvádí tabulka 6.

Tabulka 4: Výsledky separací v BGE: 50 mM fosfátový pufr pH 3,0; 2,5 mg/ml β -cyklodextrin

Analyt	t_m (analytu)	t_m (EOF)	μ_a	μ_e	μ_{EOF}	A_s	N	SD	RSD
(R)-(-)-1,1'-binaftyl-2,2'-diyhydrogenfosfát	7,20	-	$1,50 \cdot 10^{-4}$	-	-	1,18	254093	13,49	3,12
(S)-(+)-1,1'-binaftyl-2,2'-diyhydrogenfosfát	8,03	-	$1,34 \cdot 10^{-4}$	-	-	1,33	210612	15,59	3,24

Tabulka 5: Výsledky separací v BGE: 50 mM fosfátový pufr pH 2,5; 30 mg/ml sulfatovaný- β -cyklodextrin

Analyt	t_m (analytu)	t_m (EOF)	μ_a	μ_e	μ_{EOF}	A_s	N	SD	RSD
levofloxacin	10,69	-	$1,01 \cdot 10^{-4}$	-	-	2,62	148682	30,52	4,76
R-ofloxacin	12,03	-	$0,90 \cdot 10^{-4}$	-	-	2,07	195282	38,53	5,34

t_m (analytu) – migrační čas analytu [min]

t_m (EOF) – migrační čas EOF [min]

μ_a – zdánlivá pohyblivost [cm^2/Vs]

μ_e – efektivní pohyblivost [cm^2/Vs]

μ_{EOF} – pohyblivost EOF [cm^2/Vs]

A_s – faktor symetrie

N – počet teoretických pater

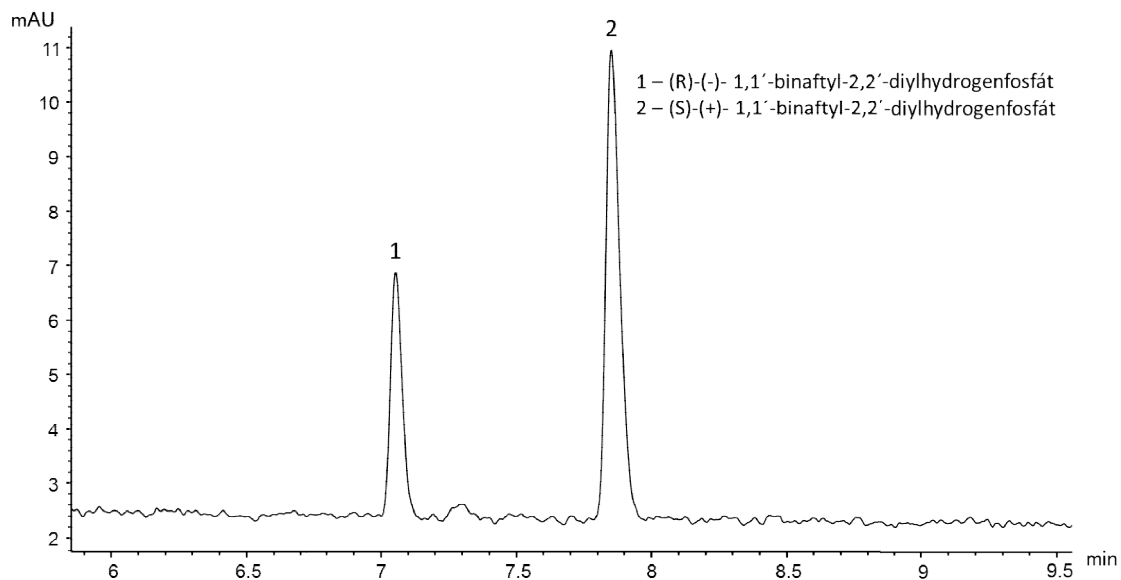
SD – směrodatná odchylka

RSD – relativní směrodatná odchylka [%]

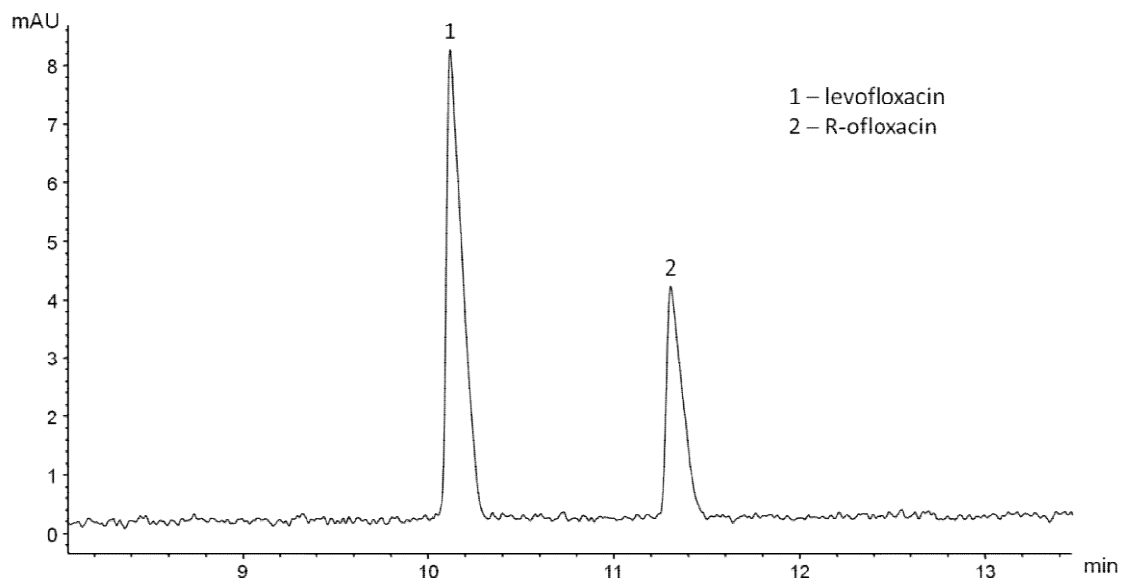
Tabulka 6: Rozlišení píků enantiomerů 1,1'-binaftyl-2,2'-diyhydrogenfosfátu a ofloxacinu

Rozlišení píků analytů	R_s
R-binaftyl - S-binaftyl	9,18
levofloxacin - R-ofloxacin	7,70

Obrázek 20: Elektroferogram separace enantiomerů 1,1'-binaftyl-2,2'-dihydrogenfosfátu (koncentrace (R)-enantiomeru byla 10 µg/ml a koncentrace (S)-enantiomeru byla 20 µg/ml). BGE: 50 mM fosfátový pufr pH 3,0; 2,5 mg/ml β-cyklodextrinu



Obrázek 21: Elektroferogram separace enantiomerů ofloxacinu (koncentrace levofloxacinu byla 40 µg/ml a koncentrace (R)-ofloxacinu byla 20 µg/ml. BGE: 50 mM fosfátový pufr pH 2,5; 30 mg/ml sulfatovaného β-cyklodextrinu



5.5 Separace s nově připravenými CIL

Separace s CIL byly inspirovány dříve popsanou literaturou [7], kde použité CIL jeví jistou podobnost s námi testovanými, nově nasyntetizovanými sloučeninami. Stejně jako ve zmíněné literatuře byly proměřeny různé typy BGE o různých koncentracích, různých pH a různých koncentračních přídavicích CIL. Jelikož připravené CIL mají charakter kationických surfaktantů, docházelo kromě obrácení EOF i k tvorbě micel, to znamená, že se dle mechanismu separace jednalo o MEKC. Rozpuštěné analyty se dělily mezi pufr a pseudostacionární fázi tvořenou micelami. Pohyblivost EOF má záporné znaménko – EOF, jak již bylo zmíněno, směřuje k anodě. Zdánlivá pohyblivost se rovněž vyznačuje záporným znaménkem, neboť analyty migrují vlivem EOF také k anodě. Efektivní pohyblivost je ale kladná, protože analyty interagují s kladně nabitými micelami, jejichž vlastní pohyblivost směřuje ke katodě. V absolutní hodnotě je efektivní pohyblivost menší než pohyblivost EOF a tím pádem byly modelové analyty detekovány na anodickém konci kapiláry.

Jako výsledek v těchto analýzách bylo vždy možné pozorovat pouze jeden pík a je tedy evidentní, že nedochází k očekávané chirální separaci. Opakovatelnost byla stanovena v různé dny. Vzorky byly připravovány vždy čerstvě před analýzou ze zásobních roztoků. Z naměřených migračních časů byla vypočtena RSD. Pro přiblížení průběhu analýz je u každé IL uveden skutečný elektroferogram analýz ketoprofenu v octanovém pufru o pH 5,0 či ve fosfátovém pufru o pH 7,5 s konkrétním přídávkem CIL.

5.5.1 ILA-1

Z výsledků je patrné, že migrační časy jednotlivých vzorků jsou opakovatelné. Mezi jednotlivými analýzami můžeme pozorovat podobné migrační časy pro jednotlivé modelové sloučeniny, které byly v octanovém pufru při pH 5,0 záporně nabitě (z tabulek 7, 8 a 11 vyplývá, že se migrační časy pohybují v rozmezí 3,20 - 3,34 minut a efektivní pohyblivosti jsou téměř identické; $4,03 \cdot 10^{-4}$ – $4,07 \cdot 10^{-4}$ cm²/Vs). Podobně migroval i warfarin, který byl ale analyzován v BGE s koncentrací ILA-1 15 mM. Nejspíše zde dochází k silné elektrostatické interakci, která zabraňuje nejen rozdělení

enantiomerů, ale i separaci jednotlivých standardů. Jediný ofloxacin (viz tabulka 10), který byl při pH 5,0 kladně nabitý, migroval odlišně od ostatních modelových analytů ($\mu_e = 1,81 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{Vs}$). I ve fosfátovém pufru při pH 7,5 můžeme pozorovat velmi podobné chování modelových sloučenin. Migrační časy jsou blízké pro analyty, které byly analyzovány se stejným koncentračním přídatkem ILA-1 (dvojice ketoprofen – warfarin a flurbiprofen a 1,1'-binaftyl-2,2'dihydrogenfosfát), avšak efektivní pohyblivosti si jsou blízké ($2,02 \cdot 10^{-4} - 2,16 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{Vs}$) i přes rozdílnou koncentraci ILA-1 (10 vs 20 mM). Efektivní pohyblivost ofloxacinu se opět výrazně odlišuje ($\mu_e = 2,02 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{Vs}$).

Tabulka 7: Analýza ketoprofenu s ILA-1

Analyt	BGE	t_m (analytu)	t_m (EOF)	U	μ_a	μ_e	μ_{EOF}	A_s	N	SD	RSD
ketoprofen racemát	60mM acetát pH 5.0, 10mM ILA-1	3,20	1,45	-30	$-3,37 \cdot 10^{-4}$	$4,07 \cdot 10^{-4}$	$-7,44 \cdot 10^{-4}$	1,70	87796	2,09	1,09
ketoprofen racemát	50mM fosfát pH 7.5, 20mM ILA-1	11,87	4,78	-20	$-1,36 \cdot 10^{-4}$	$2,02 \cdot 10^{-4}$	$-3,38 \cdot 10^{-4}$	3,28	131353	0,82	0,11

Tabulka 8: Analýza flurbiprofenu s ILA-1

Analyt	BGE	t_m (analytu)	t_m (EOF)	U	μ_a	μ_e	μ_{EOF}	A_s	N	SD	RSD
flurbiprofen racemát	60mM acetát, pH 5.0, 10mM ILA-1	3,34	1,48	-30	$-3,23 \cdot 10^{-4}$	$4,03 \cdot 10^{-4}$	$-7,27 \cdot 10^{-4}$	1,81	54672	4,50	2,25
flurbiprofen racemát	50mM fosfát pH 7.5, 10mM ILA-1	15,66	5,15	-20	$-1,03 \cdot 10^{-4}$	$2,10 \cdot 10^{-4}$	$-3,14 \cdot 10^{-4}$	1,19	39584	6,15	0,65

Tabulka 9: Analýza warfarinu s ILA-1

Analyt	BGE	t_m (analytu)	t_m (EOF)	U	μ_a	μ_e	μ_{EOF}	A_s	N	SD	RSD
warfarin racemát	60mM acetát, pH 5.0, 15mM ILA-1	3,11	1,44	-30	$-3,46 \cdot 10^{-4}$	$4,04 \cdot 10^{-4}$	$-7,50 \cdot 10^{-4}$	1,63	153439	0,29	0,15
warfarin racemát	50mM fosfát pH 7.5, 20mM ILA-1	12,34	4,66	-20	$-1,31 \cdot 10^{-4}$	$2,16 \cdot 10^{-4}$	$-3,47 \cdot 10^{-4}$	0,73	47113	3,81	0,51

Tabulka 10: Analýza ofloxacinu s ILA-1

Analyt	BGE	t_m (analytu)	t_m (EOF)	U	μ_a	μ_e	μ_{EOF}	A_s	N	SD	RSD
ofloxacin racemát	60mM acetát, pH 5.0, 10mM ILA-1	1,96	1,48	-30	$-5,50 \cdot 10^{-4}$	$1,81 \cdot 10^{-4}$	$-7,31 \cdot 10^{-4}$	1,36	55693	2,09	1,78
ofloxacin racemát	50mM fosfát pH 7.5, 10mM ILA-1	5,49	5,14	-20	$-2,94 \cdot 10^{-4}$	$2,02 \cdot 10^{-5}$	$-3,15 \cdot 10^{-4}$	1,98	107901	0,61	0,18

Tabulka 11: Analýza 1,1'-binaftyl-2,2'-diylhydrogenfosfátu s ILA-1

Analyt	BGE	t_m (analytu)	t_m (EOF)	U	μ_a	μ_e	μ_{EOF}	A_s	N	SD	RSD
binaftyl racemát	60mM acetát, pH 5.0, 10mM ILA-1	3,33	1,48	-30	$-3,24 \cdot 10^{-4}$	$4,06 \cdot 10^{-4}$	$-7,30 \cdot 10^{-4}$	1,48	17757	3,94	1,97
binaftyl racemát	50mM fosfát pH 7.5, 10mM ILA-1	16,39	5,17	-20	$-9,86 \cdot 10^{-5}$	$2,14 \cdot 10^{-4}$	$-3,13 \cdot 10^{-4}$	0,87	58012	2,23	0,23

t_m (analytu) – migrační čas analytu [min]

t_m (EOF) – migrační čas EOF [min]

U – vkládané napětí [kV]

μ_a – zdánlivá pohyblivost [cm^2/Vs]

μ_e – efektivní pohyblivost [cm^2/Vs]

μ_{EOF} – pohyblivost EOF [cm^2/Vs]

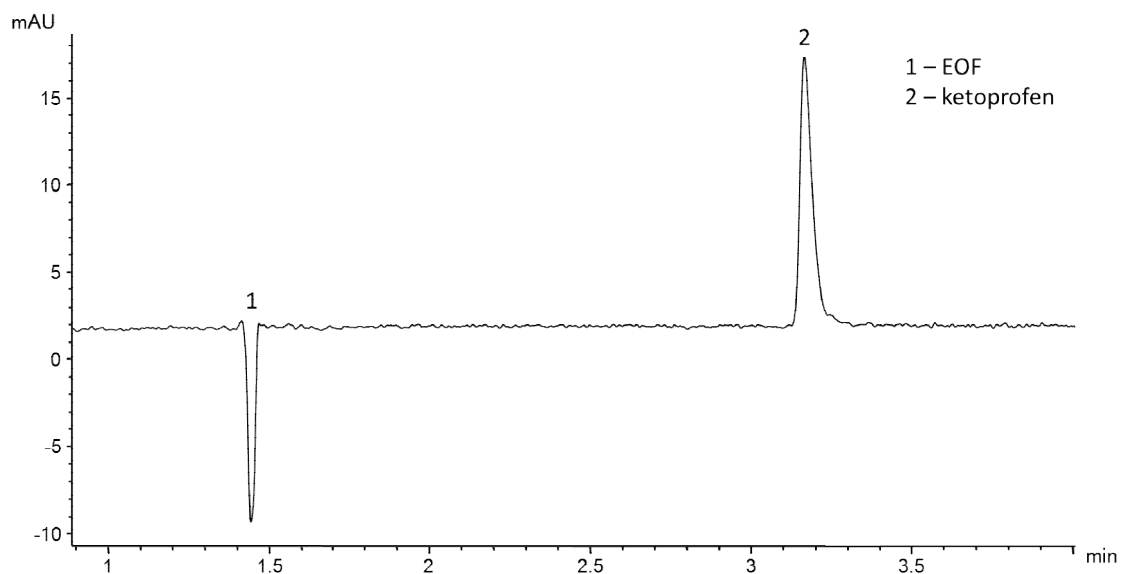
A_s – faktor symetrie

N – počet teoretických pater

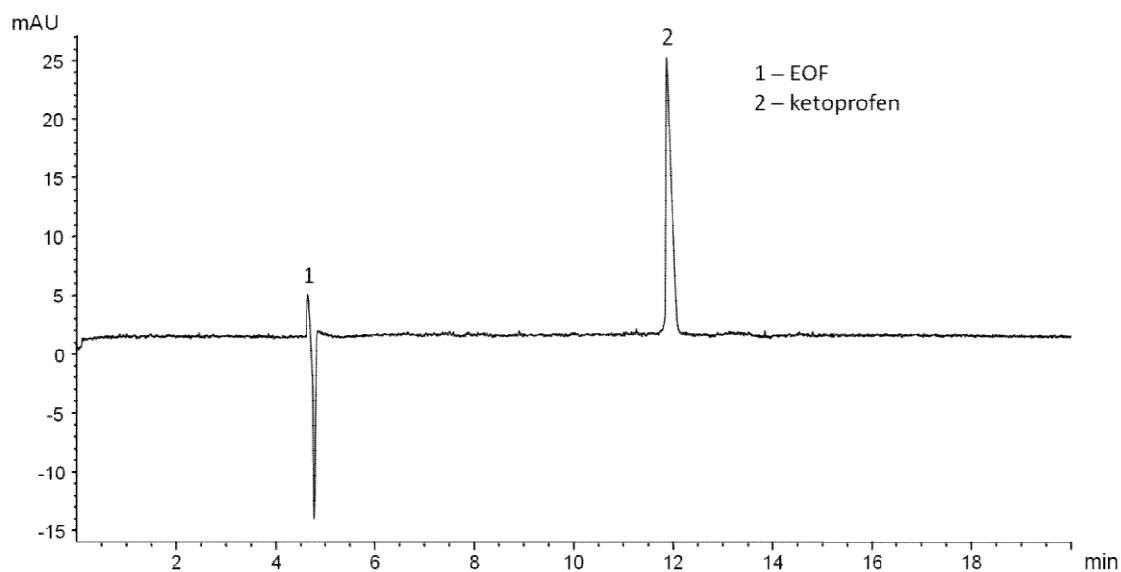
SD – směrodatná odchylka

RSD – relativní směrodatná odchylka [%]

Obrázek 22: Analýza ketoprofenu v BGE: 60mM octanový pufr pH 5,0; 10mM ILA-1, -30kV



Obrázek 23: Analýza ketoprofenu v BGE: 50mM fosfátový pufr pH 7,5; 20mM ILA-1, -20kV



5.5.2 ILA-2

Tabulka 12 uvádí zprůměrované migrační časy analytů, napětí použité při těchto analýzách, vypočtené elektroforetické pohyblivosti, faktor symetrie píků, počet teoretických pater, dále směrodatnou a relativní směrodatnou odchylku. Můžeme zde pozorovat analogii s chováním ILA-1, neboť migrační časy nesteroidních protizánětlivých látek si jsou v octanovém pufru o pH 5,0 v podstatě velmi podobné (5,17 a 5,30 minut). Migrace warfarinu v octanovém pufru s ILA-2 byla opět podobná jako u arylpropionových kyselin. Vzhledem k velké podobnosti s ILA-1 a horším chováním ILA-2 z hlediska rozpustnosti byl testován ve fosfátovém pufru o pH 7,5 pouze ketoprofen. Výsledky této analýzy uvádí taktéž tabulka 12. Od dalších analýz s ILA-2 bylo upuštěno.

Tabulka 12: Analýzy s ILA-2

Analyt	BGE	t_m (analytu)	t_m (EOF)	U	μ_a	μ_e	μ_{EOF}	A_s	N	SD	RSD
ketoprofen racemát	60mM acetát, pH 5,0, 10mM ILA-2	5,30	2,38	-20	$-3,05 \cdot 10^{-4}$	$3,75 \cdot 10^{-4}$	$-6,80 \cdot 10^{-4}$	1,32	141757	13,20	4,15
ketoprofen racemát	50mM fosfát pH 7,5, 10mM ILA-2	11,97	5,14	-20	$-1,35 \cdot 10^{-4}$	$1,79 \cdot 10^{-4}$	$-3,14 \cdot 10^{-4}$	6,73	46683	10,85	1,51
flurbiprofen racemát	60mM acetát, pH 5,0, 10mM ILA-2	5,17	2,32	-20	$-3,13 \cdot 10^{-4}$	$3,83 \cdot 10^{-4}$	$-6,95 \cdot 10^{-4}$	1,74	46051	0,28	0,09
warfarin racemát	60mM acetát, pH 5,0, 10mM ILA-2	5,03	2,33	-20	$-3,21 \cdot 10^{-4}$	$3,72 \cdot 10^{-4}$	$-6,93 \cdot 10^{-4}$	1,19	620601	0,51	0,17

t_m (analytu) – migrační čas analytu [min]

t_m (EOF) – migrační čas EOF [min]

U – vkládané napětí [kV]

μ_a – zdánlivá pohyblivost [cm^2/Vs]

μ_e – efektivní pohyblivost [cm^2/Vs]

μ_{EOF} – pohyblivost EOF [cm^2/Vs]

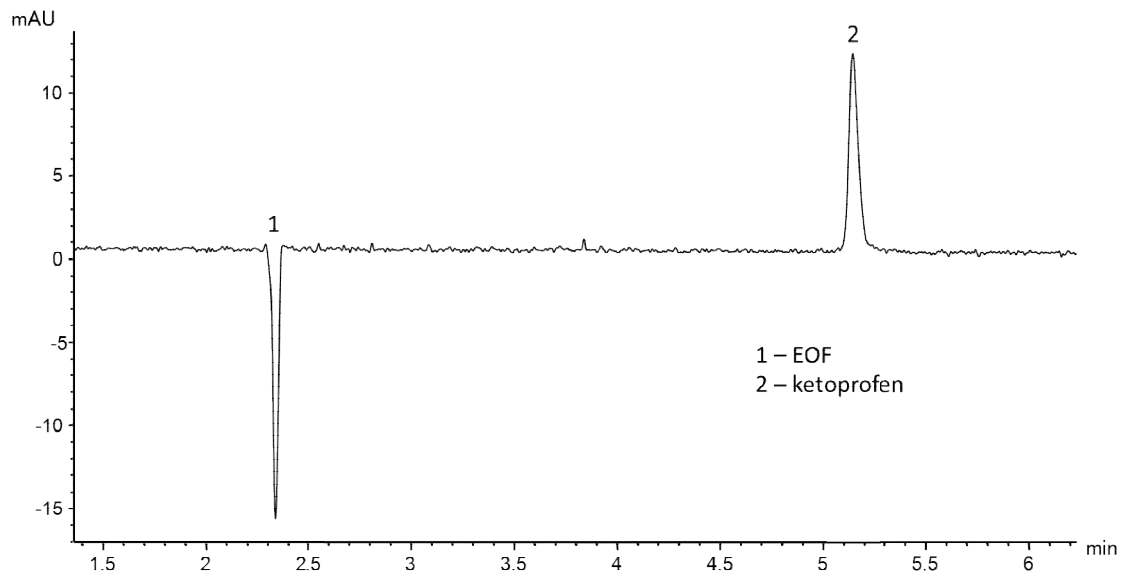
A_s – faktor symetrie

N – počet teoretických pater

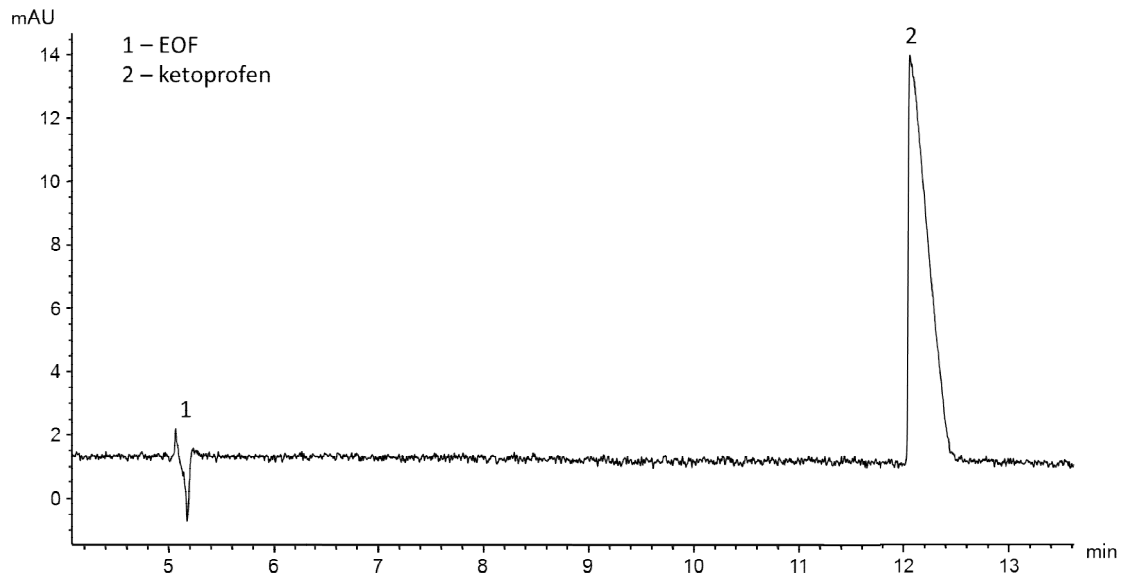
SD – směrodatná odchylka

RSD – relativní směrodatná odchylka [%]

Obrázek 24: Analýza ketoprofenu v BGE: 60 mM octanový pufr pH 5,0; 10 mM ILA-2, -20kV



Obrázek 25: Analýza ketoprofenu v BGE: 50 mM fosfátový pufr pH 7,5; 10 mM ILA-2, -20kV



5.5.3 ILA-3

Z výsledků je evidentní, že migrační časy jednotlivých vzorků jsou opakovatelné. Mezi jednotlivými analýzami můžeme opět pozorovat podobné migrační časy pro jednotlivé modelové sloučeniny, které byly v octanovém pufru při pH 5,0 záporně nabitě (z tabulek 13-16 vyplývá, že se migrační časy pohybují v rozmezí 3,27 - 3,56 minut a efektivní pohyblivosti jsou poměrně blízké; $3,75 \cdot 10^{-4} - 3,92 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{Vs}$). Srovnáme-li zde konkrétní výsledky s ILA-1 i s ILA-2, můžeme pozorovat podobné hodnoty efektivních pohyblivostí pro všechny tři ILA v octanovém pufru o pH 5,0. Nejspíše i zde dochází k silné elektrostatické interakci, která zabraňuje nejen rozdělení enantiomerů, ale i separaci jednotlivých standardů. Jediný ofloxacin, který byl při pH 5,0 kladně nabitý, migroval odlišně od ostatních modelových analytů, avšak i tady můžeme pozorovat téměř totožný výsledek jako u analýzy ofloxacinu s ILA-1 ($\mu_e = 1,83 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{Vs}$). Fosfátový pufr zde byl používán o koncentraci 20 mM, neboť s vyšší koncentrací trvaly analýzy déle. Ve fosfátovém pufru při pH 7,5 můžeme pozorovat velmi podobné chování modelových sloučenin. Migrační časy se od sebe odlišují, avšak efektivní pohyblivosti jsou opět velmi blízké či identické pro dvojice ketoprofen – warfarin ($1,58 \cdot 10^{-4}$ a $1,52 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{Vs}$) a flurbiprofen – 1,1'-binaftyl-2,2'-diylhydrogenfosfát (oba $1,77 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{Vs}$). Ofloxacin se díky svým odlišným vlastnostem opět řádově odlišuje ($\mu_e = 1,35 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{Vs}$).

Tabulka 13: Analýza ketoprofenu s ILA-3

Analyt	BGE	t_m (analytu)	t_m (EOF)	U	μ_a	μ_e	μ_{EOF}	A_s	N	SD	RSD
ketoprofen racemát	60mM acetát, pH 5,0, 10mM ILA-3	3,56	1,58	-30	$-3,03 \cdot 10^{-4}$	$3,78 \cdot 10^{-4}$	$-6,81 \cdot 10^{-4}$	1,58	58799	28,18	13,20
ketoprofen racemát	20mM fosfát pH 7,5, 10mM ILA-3	12,22	5,56	-20	$-1,32 \cdot 10^{-4}$	$1,58 \cdot 10^{-4}$	$-2,91 \cdot 10^{-4}$	6,18	40892	14,69	2,00

Tabulka 14: Analýza flurbiprofenu s ILA-3

Analyt	BGE	t_m (analytu)	t_m (EOF)	U	μ_a	μ_e	μ_{EOF}	A_s	N	SD	RSD
flurbiprofen racemát	60mM acetát, pH 5,0, 10mM ILA-3	3,39	1,52	-30	$-3,18 \cdot 10^{-4}$	$3,89 \cdot 10^{-4}$	$-7,07 \cdot 10^{-4}$	1,87	28094	3,81	1,87
flurbiprofen racemát	20mM fosfát pH 7,5, 10mM ILA-3	13,40	5,44	-20	$-1,21 \cdot 10^{-4}$	$1,77 \cdot 10^{-4}$	$-2,97 \cdot 10^{-4}$	4,87	32809	20,34	2,53

Tabulka 15: Analýza warfarinu s ILA-3

Analyt	BGE	t _m (analytu)	t _m (EOF)	U	μ _a	μ _e	μ _{EOF}	A _s	N	SD	RSD
warfarin racemát	60mM acetát, pH 5.0, 10mM ILA-3	3,27	1,53	-30	-3,30*10 ⁻⁴	3,75*10 ⁻⁴	-7,05*10 ⁻⁴	1,66	52942	0,44	0,22
warfarin racemát	20mM fosfát pH 7.5, 10mM ILA-3	12,15	5,68	-20	-1,33*10 ⁻⁴	1,52*10 ⁻⁴	-2,87*10 ⁻⁴	6,39	25214	6,63	0,91

Tabulka 16: Analýza 1,1'-binaftyl-2,2'-diylhydrogenfosfát s ILA-3

Analyt	BGE	t _m (analytu)	t _m (EOF)	U	μ _a	μ _e	μ _{EOF}	A _s	N	SD	RSD
binaftyl racemát	60mM acetát, pH 5.0, 10mM ILA-3	3,44	1,53	-30	-3,14*10 ⁻⁴	3,92*10 ⁻⁴	-7,06*10 ⁻⁴	1,60	12825	1,56	0,75
binaftyl racemát	20mM fosfát pH 7.5, 10mM ILA-3	13,78	5,50	-20	-1,17*10 ⁻⁴	1,77*10 ⁻⁴	-2,94*10 ⁻⁴	3,78	25447	3,64	0,44

Tabulka 17: Analýza ofloxacinu s ILA-3

Analyt	BGE	t _m (analytu)	t _m (EOF)	U	μ _a	μ _e	μ _{EOF}	A _s	N	SD	RSD
ofloxacin racemát	60mM acetát, pH 5.0, 10mM ILA-3	2,14	1,57	-30	-5,04*10 ⁻⁴	1,83*10 ⁻⁴	-6,87*10 ⁻⁴	2,99	57754	9,21	7,18
ofloxacin racemát	20mM fosfát pH 7.5, 10mM ILA-3	5,73	5,47	-20	-2,82*10 ⁻⁴	1,35*10 ⁻⁵	-2,96*10 ⁻⁴	0,82	43624	0,40	0,12

t_m (analytu) – migrační čas analytu [min]

t_m (EOF) – migrační čas EOF [min]

U – vkládané napětí [kV]

μ_a – zdánlivá pohyblivost [cm²/Vs]

μ_e – efektivní pohyblivost [cm²/Vs]

μ_{EOF} – pohyblivost EOF [cm²/Vs]

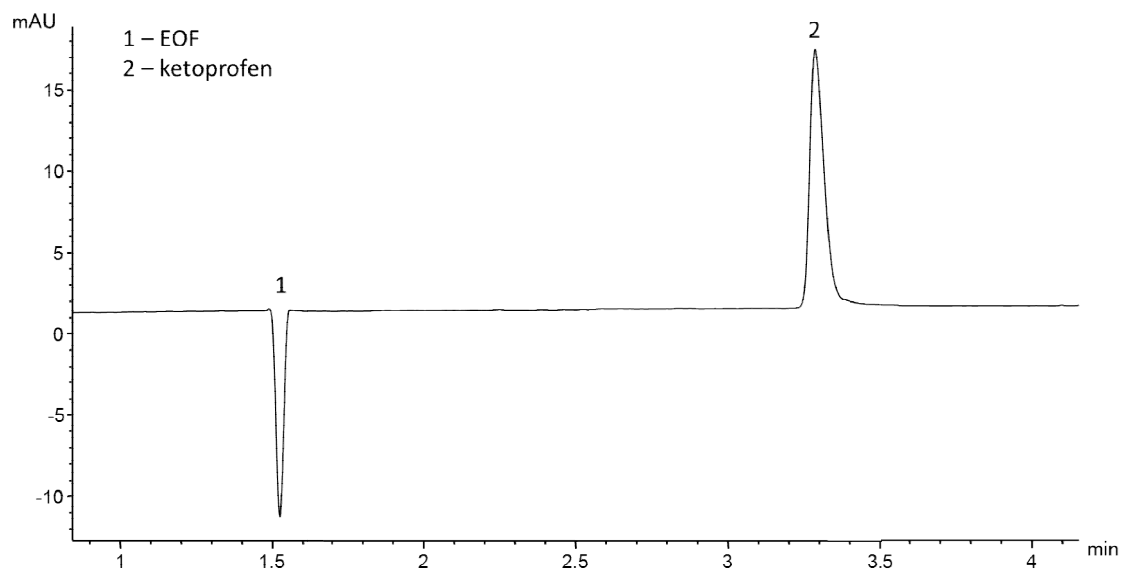
A_s – faktor symetrie

N – počet teoretických pater

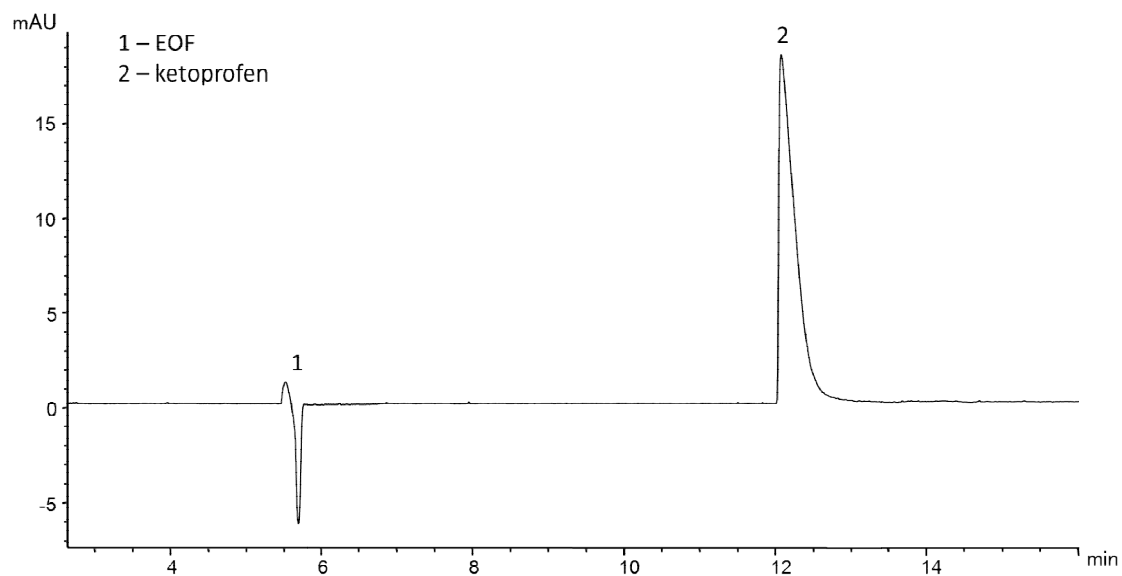
SD – směrodatná odchylka

RSD – relativní směrodatná odchylka [%]

Obrázek 26: Analýza ketoprofenu v BGE: 60 mM octanový pufr pH 5,0; 10 mM ILA-3, -30kV



Obrázek 27: Analýza ketoprofenu v BGE: 20 mM fosfátový pufr pH 7,5; 10 mM ILA-3, -20kV



5.5.4 ILB-1

I zde nejspíše dochází k silné elektrostatické interakci, která zabraňuje separaci analytů. Z tabulky 18 vyplývá opět jistá podobnost migračních časů (6,37 – 7,21 minut). Ačkoli se tedy ILB-1 částečně strukturně liší od ILA 1-3, neschopností fungovat jako chirální selektor je s nimi naprosto srovnatelná.

Tabulka 18: Analýzy s ILB-1

Analyt	BGE	tm (analytu)	tm (EOF)	U	μ_a	μ_e	μ_{EOF}	A_s	N	SD	RSD
ketoprofen racemát	60mM octan amonný v MeOH, 10mM ILB-1	7,14	-	-30	$-1,51 \cdot 10^{-4}$	-	-	3,42	128008	5,53	1,09
flurbiprofen racemát	60mM octan amonný v MeOH, 10mM ILB-1	7,08	-	-30	$-1,52 \cdot 10^{-4}$	-	-	3,11	181945	3,73	0,11
warfarin racemát	60mM octan amonný v MeOH, 10mM ILB-1	6,37	-	-30	$-1,69 \cdot 10^{-4}$	-	-	4,21	250431	2,70	2,25
binaftyl racemát	60mM octan amonný v MeOH, 10mM ILB-1	7,31	-	-30	$-1,48 \cdot 10^{-4}$	-	-	1,11	368085	2,80	0,65

tm (analytu) – migrační čas analytu [min]

tm (EOF) – migrační čas EOF [min]

U – vkládané napětí [kV]

μ_a – zdánlivá pohyblivost [cm^2/Vs]

μ_e – efektivní pohyblivost [cm^2/Vs]

μ_{EOF} – pohyblivost EOF [cm^2/Vs]

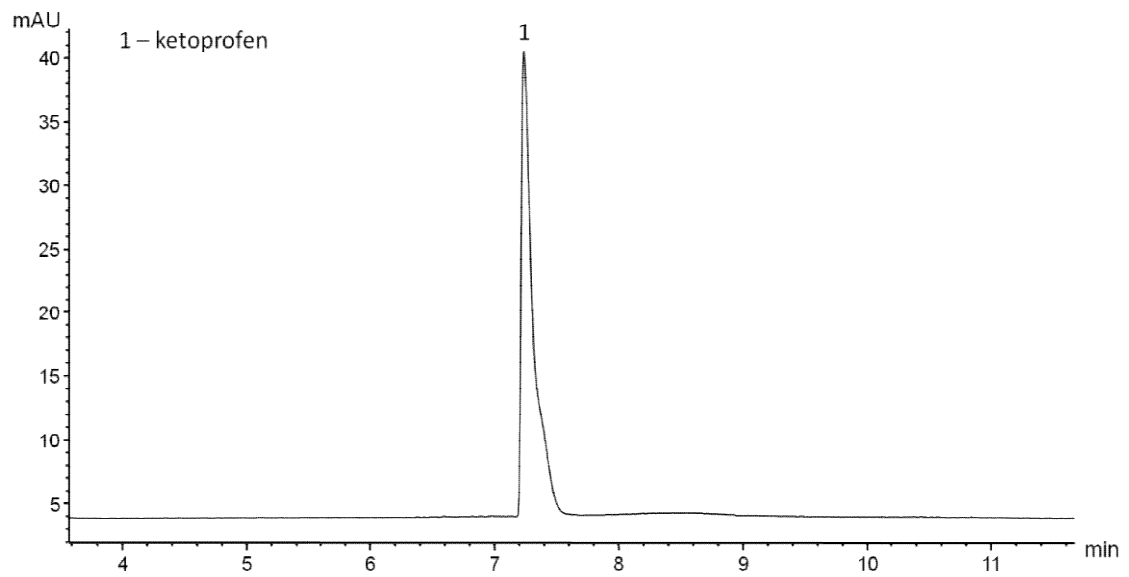
A_s – faktor symetrie

N – počet teoretických pater

SD – směrodatná odchylka

RSD – relativní směrodatná odchylka [%]

**Obrázek 28: Analýza ketoprofenu v BGE: 60 mM octanový pufr v metanolu;
10 mM ILB-1, -30kV**



5.6 Separace v achirálním prostředí

V achirálním prostředí bylo zaznamenáno očekávané chování. Pro příklad a porovnání jsou uvedeny jen analýzy ketoprofenu, který v octanovém pufru při pH 5,0 migroval v čase 5,49 minut a ve fosfátovém pufru při pH 7,5 migroval v čase 2,63 minut – viz tabulka 19.

Tabulka 19: Analýza ketoprofenu v achirálním prostředí

Analyt	BGE	tm (analytu)	tm (EOF)	U	μ_a	μ_e	μ_{EOF}	A_s	N	SD	RSD
ketoprofen racemát	60mM acetát, pH 5,0,	5,49	2,68	30	$1,96 \cdot 10^{-4}$	$-2,05 \cdot 10^{-4}$	$4,01 \cdot 10^{-4}$	0,62	200008	7,45	1,09
ketoprofen racemát	50mM fosfát, pH 7,5	2,63	1,64	30	$4,10 \cdot 10^{-4}$	$-2,46 \cdot 10^{-4}$	$6,57 \cdot 10^{-4}$	0,73	216593	3,19	0,11

tm (analytu) – migrační čas analytu [min]

tm (EOF) – migrační čas EOF [min]

U – vkládané napětí [kV]

μ_a – zdánlivá pohyblivost [cm^2/Vs]

μ_e – efektivní pohyblivost [cm^2/Vs]

μ_{EOF} – pohyblivost EOF [cm^2/Vs]

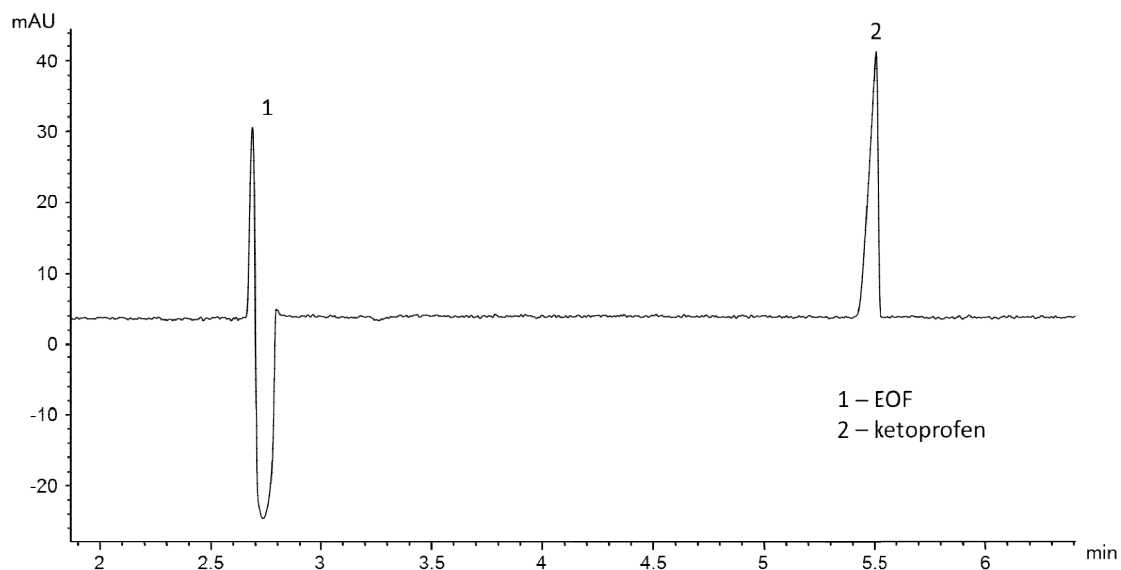
A_s – faktor symetrie

N – počet teoretických pater

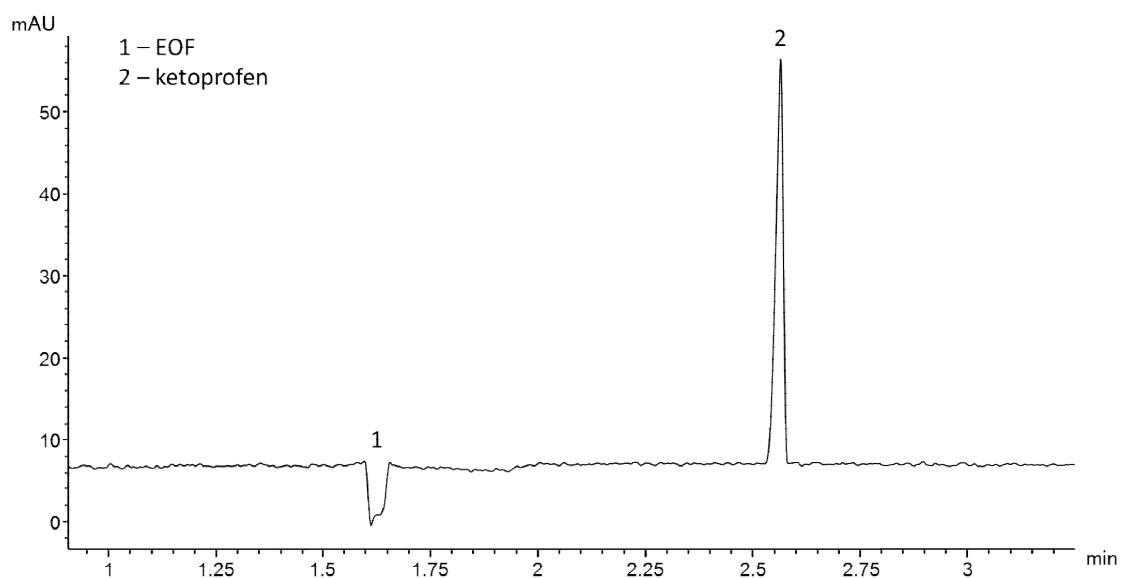
SD – směrodatná odchylka

RSD – relativní směrodatná odchylka [%]

Obrázek 29: Elektroferogram separace ketoprofenu (koncentrace racemátu byla 100 µg/ml), BGE: 60 mM octanový pufr pH 5,0



Obrázek 30: Elektroferogram separace ketoprofenu (koncentrace racemátu byla 100 µg/ml), BGE: 50 mM fosfátový pufr pH 7,5



6. ZÁVĚR

Testované nově nasyntetizované struktury CIL bohužel nevykazují chování chirálního selektoru při separaci námi zvolených chirálních modelových analytů. Modelové sloučeniny se všemi testovanými IL migrují v téměř podobném čase (v závislosti na povaze modelové sloučeniny), což poukazuje na velkou elektrostatickou interakci mezi negativně nabitým analytem a kladně nabitou CIL. Výjimku z tohoto chování představuje ofloxacin, který má odlišné acidobazické vlastnosti od ostatních modelových sloučenin charakteru kyselin. Ale ani v případě ofloxacinu jako modelového analytu nebylo dosaženo chirální separace. V porovnání se studií profesora Shamsiho [7] zde zřejmě sehrává negativní roli vzdálenost mezi permanentně nabitou hlavou CIL a jejím chirálním centrem. S výhledem do budoucnosti tedy zůstává potenciál strukturám podobným testovaným v této práci, avšak za předpokladu zkrácení vzdálenosti mezi kvartérní amoniovou skupinou a chirálním centrem selektoru. Nefunkčnost separace také může být způsobena i přítomností jiných funkčních skupin (ester, amid) v porovnání s dříve popsanou karbamátovou skupinou [7].

Separace modelových sloučenin s konvenčními CS i v achirálním prostředí proběhly dle očekávání.

7. SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Schéma kapilární elektroforézy	11
Obrázek 2: Schéma rozložení náboje na vnitřním povrchu kapiláry. Vznik elektrické dvojvrstvy a EOF v závislosti na pH.....	15
Obrázek 3: Modifikace elektroosmotického toku.....	16
Obrázek 4: Znárodnění separace CZE a příslušný záznam separace – elektroferogram.....	18
Obrázek 5: Migrace neutrálních analytů v MEKC.....	19
Obrázek 6: Struktura α -CD, β -CD a γ -CD	22
Obrázek 7: Příklad struktur používaných v IL - imidazoliové, pyridiniové, amoniové, fosfoniové soli	23
Obrázek 8: Příklad objemných aniontů – tetrafluoroborát, acetát, trifluoroacetát, tosylát	23
Obrázek 9: Schéma syntézy IL.....	24
Obrázek 10: Strukturní vzorec ketoprofenu	42
Obrázek 11: Strukturní vzorec ibuprofenu.....	42
Obrázek 12: Strukturní vzorec flurbiprofenu	43
Obrázek 13: Strukturní vzorec warfarinu	43
Obrázek 14: Strukturní vzorec 1,1'-binaftyl-2,2'-diyhydrogenfosfátu.....	44
Obrázek 15: Strukturní vzorec ofloxacinu	44
Obrázek 16: Elektroferogram separace enantiomerů ketoprofenu (koncentrace (R)-ketoprofenu byla 25 μ g/ml a (S)-ketoprofenu byla 75 μ g/ml). BGE: 60 mM octanový pufr pH 5,0; 50 mM trimethyl- β -cyklodextrin.....	47
Obrázek 17: Elektroferogram separace enantiomerů ibuprofenu (koncentrace (R)- ibuprofenu byla 25 μ g/ml a (S)-ibuprofenu byla 75 μ g/ml). BGE: 60 mM octanový pufr pH 5,0; 50 mM trimethyl- β -cyklodextrin	47
Obrázek 18: Elektroferogram separace enantiomerů warfarinu (koncentrace (R)- warfarinu byla 75 μ g/ml a (S)-warfarinu byla 25 μ g/ml).BGE: 60 mM octanový pufr pH 5,0; 50 mM trimethyl- β -cyklodextrin	48
Obrázek 19: Elektroferogram separace enantiomerů flurbiprofenu (koncentrace racemátu byla 100 μ g/ml), BGE: 60 mM octanový pufr pH 5,0; 50 mM trimethyl- β -cyklodextrin	48
Obrázek 20: Elektroferogram separace enantiomerů 1,1'-binaftyl-2,2'-diyhydrogenfosfátu (koncentrace (R)-enantiomeru byla 10 μ g/ml a koncentrace (S)-enantiomeru byla 20 μ g/ml). BGE: 50 mM fosfátový pufr pH 3,0; 2,5 mg/ml β -cyklodextrinu.....	50
Obrázek 21: Elektroferogram separace enantiomerů ofloxacinu (koncentrace levofloxacinu byla 40 μ g/ml a koncentrace (R)-ofloxacinu byla 20 μ g/ml. BGE: 50 mM fosfátový pufr pH 2,5; 30 mg/ml sulfatovaného β -cyklodextrinu.....	50

Obrázek 22: Analýza ketoprofenu v BGE: 60mM octanový pufr pH 5,0; 10mM ILA-1, -30kV	54
Obrázek 23: Analýza ketoprofenu v BGE: 50mM fosfátový pufr pH 7,5; 20mM ILA-1, -20kV....	54
Obrázek 24: Analýza ketoprofenu v BGE: 60 mM octanový pufr pH 5,0; 10 mM ILA-2, -20kV ..	56
Obrázek 25: Analýza ketoprofenu v BGE: 50 mM fosfátový pufr pH 7,5; 10 mM ILA-2, -20kV ..	56
Obrázek 26: Analýza ketoprofenu v BGE: 60 mM octanový pufr pH 5,0; 10 mM ILA-3, -30kV ..	59
Obrázek 27: Analýza ketoprofenu v BGE: 20 mM fosfátový pufr pH 7,5; 10 mM ILA-3, -20kV .	59
Obrázek 28: Analýza ketoprofenu v BGE: 60 mM octanový pufr v metanolu; 10 mM ILB-1, -30kV	61
Obrázek 29: Elektroferogram separace ketoprofenu (koncentrace racemátu byla 100 µg/ml), BGE: 60 mM octanový pufr pH 5,0.....	63
Obrázek 30: Elektroferogram separace ketoprofenu (koncentrace racemátu byla 100 µg/ml), BGE: 50 mM fosfátový pufr pH 7,5	63

8. SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Rozpustnost IL v jednotlivých pufrch.....	40
Tabulka 2: Výsledky separací v BGE: 60 mM octanový pufr pH 5,0; 50 mM trimethyl- β -cyklodextrin.....	46
Tabulka 3: Rozlišení píků enantiomerů ketoprofenu, ibuprofenu, warfarinu a flurbiprofenu ...	46
Tabulka 4: Výsledky separací v BGE: 50 mM fosfátový pufr pH 3,0; 2,5 mg/ml β -cyklodextrin .	49
Tabulka 5: Výsledky separací v BGE: 50 mM fosfátový pufr pH 2,5; 30 mg/ml sulfatovaný- β -cyklodextrin.....	49
Tabulka 6: Rozlišení píků enantiomerů 1,1'-binaftyl-2,2'-diylhydrogenfosfátu a ofloxacinu.....	49
Tabulka 7: Analýzy ketoprofenu s ILA-1.....	52
Tabulka 8: Analýza flurbiprofenu s ILA-1	52
Tabulka 9: Analýza warfarinu s ILA-1	52
Tabulka 10: Analýza ofloxacinu s ILA-1	52
Tabulka 11: Analýza 1,1'-binaftyl-2,2'-diylhydrogenfosfátu s ILA-1	53
Tabulka 12: Analýzy s ILA-2.....	55
Tabulka 13: Analýza ketoprofenu s ILA-3.....	57
Tabulka 14: Analýza flurbiprofenu s ILA-3	57
Tabulka 15: Analýza warfarinu s ILA-3	58
Tabulka 16: Analýza 1,1'-binaftyl-2,2'-diylhydrogenfosfát s ILA-3	58
Tabulka 17: Analýza ofloxacinu s ILA-3	58
Tabulka 18: Analýzy s ILB-1	60
Tabulka 19: Analýza ketoprofenu v achirálním prostředí	62

9. POUŽITÉ ZKRATKY

BGE	základní elektrolyt
CD	cyklodextrin
CE	kapilární elektroforéza
CIL	chirální iontové kapaliny
CMC	kritická micelární koncentrace
CS	chirální selektor
CZE	kapilární zónová elektroforéza
ČL	Český lékopis
EOF	elektroosmotický tok
IL	iontová kapalina
<i>L</i> -UCLB	undecenoxykarbonyl- <i>L</i> -leucinol bromid
<i>L</i> -UCPB	undecenoxykarbonyl- <i>L</i> -pyrrolidinol bromid
MEKC	micelární elektrokinetická chromatografie
NACE	kapilární elektroforéza v nevodném prostředí
NMR	nukleární magnetická resonance
RSD	relativní směrodatná odchylka
UV	ultrafialové záření
VIS	viditelné záření

10. CITOVANÁ LITERATURA

1. **ANZENBACHER, Pavel, JEZDINSKÝ, Jaroslav.** Léčiva a chiralita. *Klinická farmakologie*. 17, 2003. 148-150.
2. **SCRIBA, Gerhard K. E.** Chiral Recognition Mechanisms in Analytical Separation Sciences. *Chromatographia*. 75, 2012. 815-838.
3. **DUPONT, Jairton, DE SOUZA, Roberto F., SUAREZ, Paulo A.Z.** Ionic Liquids Phase Organometallic Catalysis. *Chemical Reviews*. 2002. 3667-3692.
4. **TRAN, Chieu D., MEJAC, Irena.** Chiral ionic liquids for enantioseparation of pharmaceutical products by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*. 1204, 2008. 204-209.
5. **PAYAGALA, Tharanga, ARMSTRONG, Daniel W.** Chiral ionic liquids: A compendium of syntheses and applications (2005-2012). *Chirality*. 24, 2012. 17-53.
6. **KAPNISSI-CHRISTODOULOU, Constantina P., STAVROU, Ioannis J., MAVROUDI, Maria C.** Chiral ionic liquids in chromatographic and electrophoretic separations. *Journal of Chromatography A*. 1363, 2014. 2-10.
7. **RIZVI, Syed Asad Ali, SHAMSI, Shabab A.** Synthesis, Characterization, and Application of Chiral Ionic Liquids and Their Polymers in Micellar Electrokinetic Chromatography. *Analytical Chemistry*. 78, 2006. 7061-7069.
8. **SCRIBA, Gerhard K.E., JÁČ, Pavel.** *Enantioseparations by Capillary Electrophoresis Using Cyclodextrins as Chiral Selectors. Chiral Separations Methods and Protocols. 2nd ed.* New York : Humana Press, 2013. p. 271.
9. **SAMAKASHVILI, Shorena, SALGADO, Antonio, SCRIBA, Gerhard K.E., CHANKVETADZE, Bezhan.** Comparative Enantioseparation of Ketoprofen with Trimethylated Cyclodextrins in Capillary Electrophoresis and Study of Related Selector-Selectand Interactions Using Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Chirality*. 25, 2013. 79-88.
10. **KLOUDA, Pavel.** *Moderní analytické metody. Druhé a upravené vydání.* Ostrava : Pavel Klouda, 2003. 132 s.
11. **ŠTULÍK, Karel a kol.** *Analytické separační metody.* Praha : Karolinum, 2004. 264 s.
12. Wikipedia. https://en.wikipedia.org/wiki/Capillary_electrophoresis. [Online] [Citace: 3. 5 2016]
13. **KAŠIČKA, Václav.** Teoretické základy a separační principy kapilárních elektromigračních metod. *Chemické listy*. 91, 1997. 320-329.
14. **LAUER, Jenk H., ROZING, Gerard P.** *High Performance Capillary Electrophoresis.* Německo : Agilent Technologies, 2014. 174 s.

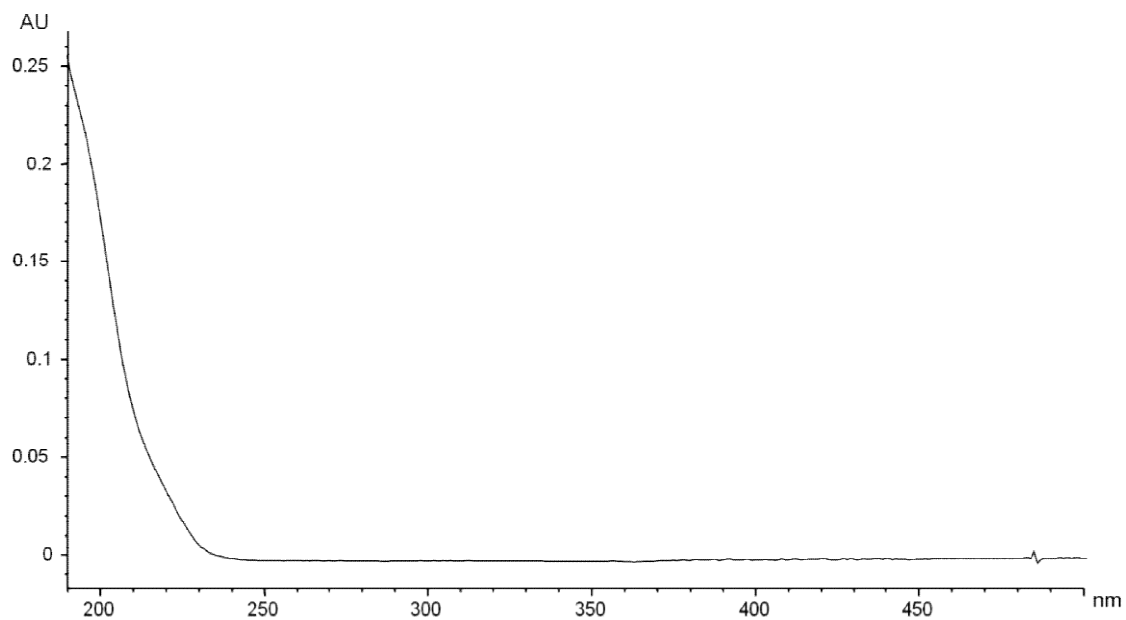
15. **WEINBERGER, Robert.** *Practical Capillary Electrophoresis.* San Diego : Academic Press, 2000. 462 s.
16. **PAZOUREK, Jiří.** *Moderní elektroforetické analytické metody: Přednášky pro magisterské studium.* Brno : autor neznámý, 2.6.2003. 88 s.
17. **SCHMITT-KOPPLIN, Philippe, FROMMBERGER, Moritz.** Capillary electrophoresis – mass spectrometry: 15 years of developments and applications. *Electrophoresis.* 24, 2003. 3837–3867.
18. **SØRENSEN, H. a kol.** *Chromatography and Capillary Electrophoresis in Food Analysis.* Cambridge : The Royal Society of Chemistry, 1999. 470 s.
19. **VAHER, Merike, KOEL, Mihkel, KALJURAND, Mihkel.** A pplication of 1-alkyl-3-methylimidazolium-based ionic liquids in. *Journal of Chromatography A.* 979, 2002. 27-32.
20. **JÁČ, Pavel, SCRIBA, Gerhard K.E.** Recent advances in electrodriven. *Journal of Separation Science.* 36, 2013. 52–74.
21. **HANUSEK, Jiří.** Iontové kapaliny - nový směr v "zelené" chemii. *Chem.listy.* 99, 2005. 263-294.
22. **KHUPSE, Nageshewar D., KUMAR, Anil.** Ionic Liquids: New materials with wide applications. *Indian Journal of Chemistry.* Vol.49A, 2010. 635-648.
23. **YUAN, L. M., HAN, Y., ZHOU, Y., MENG, X., LI, Z. Y., ZI, M. a CHANG, Y. X.** (R)-N,N,N-Trimethyl-2-Aminobutanol-Bis(Trifluoromethane-Sulfon)Imidate Chiral Ionic Liquid Used as Chiral Selector in HPCE, HPLC, and CGC. *Analytical Letters.* 39, 2006. 1439-1449.
24. **STAVROU, Ioannis J., KAPNISSI-CHRISTODOULOU, Constantina P.** Use of chiral amino acid ester-based ionic liquids as chiral selectors in CE. *Electrophoresis.* 34, 2013. 524-530.
25. **ZHANG, Qi, DU, Yingxiang, DU, Shuaijing, ZHANG, Jinjing, FENG, Zijie, ZHANG, Yanjie, LI, Xiaoqi.** Tetramethylammonium-lactobionate: A novel ionic liquid chiral selector based on saccharides in capillary electrophoresis. *Electrophoresis.* 36, 2015.
26. **MA, Zheng, ZHANG, Lijuan, LIN, Lina, JI, Ping, GUO, Xingjie.** Enantioseparation of rabeprazole and omeprazole by nonaqueous capillary electrophoresis with an ephedrine-based ionic liquid as the chiral selector. *Biomedical Chromatography.* 24, 2010. 1216-1223.
27. **WANG, Bin, HE, Jun, BIANCHI, Victoria, SHAMSI, Shabab A.** Combined use of chiral ionic liquid and cyclodextrin for MEKC: Part I. Simultaneous enantioseparation of anionic profens. *Electrophoresis.* 30, 2009. 2812-2819.
28. **STAVROU, Ioannis J., BREITBACH, Zachary S., KAPNISSI-CHRISTODOULOU, Constantina P.** Combined use of cyclofructans and an amino acid ester-based ionic liquid for the enantioseparation of huperzine A and coumarin derivatives in CE. *Electrophoresis.* 36, 2015. 3061-3068.

29. **YU, Jia, ZUO, Lihua, ZHANG, Lijuan, GUO, Xingjie.** Synthesis and application of a chiral ionic liquid functionalized β -cyclodextrin as a chiral selector in capillary electrophoresis. *Biomedical Chromatography*. 27, 2013. 1027-1033.
30. **SERVAIS, Anne-Catherine, FILLET, Marianne.** *Enantioseparations in Nonaqueous Capillary Electrophoresis using Charged Cyclodextrins. Chiral Separations Methods and Protocols. 2nd ed.* New York : Humana Press, 2013. p. 297.
31. **MINISTERSTVO ZDRAVOTNICTVÍ ČR.** *Český lékopis 2009, ČL 2009 - Doplněk 2010, ČL 2009 - Doplněk 2011, ČL 2009 - Doplněk 2012, ČL 2009 - Doplněk 2013, ČL 2009 - Doplněk 2014, ČL 2009 - Doplněk 2015.* [CD] Praha : Grada Publishing, 2015. 4529 s.
32. **HENDL, Jan.** *Přehled statistických metod zpracování dat: analýza a metaanalýza dat. 3.přepřacované vydání.* Praha : Portál, 2006. 696 s.
33. **DOLEŽAL, Martin a kol.** *Farmaceutická chemie léčiv působících na centrální nervový systém.* Praha : Karolinum, 2013. 190 s.
34. **HARTL, Jiří a kol.** *Farmaceutická chemie III.* Praha : Karolinum, 2008. 118 s.
35. **HARTL, Jiří a kol.** *Farmaceutická chemie IV.* Praha : Karolinum, 2008. 168 s.

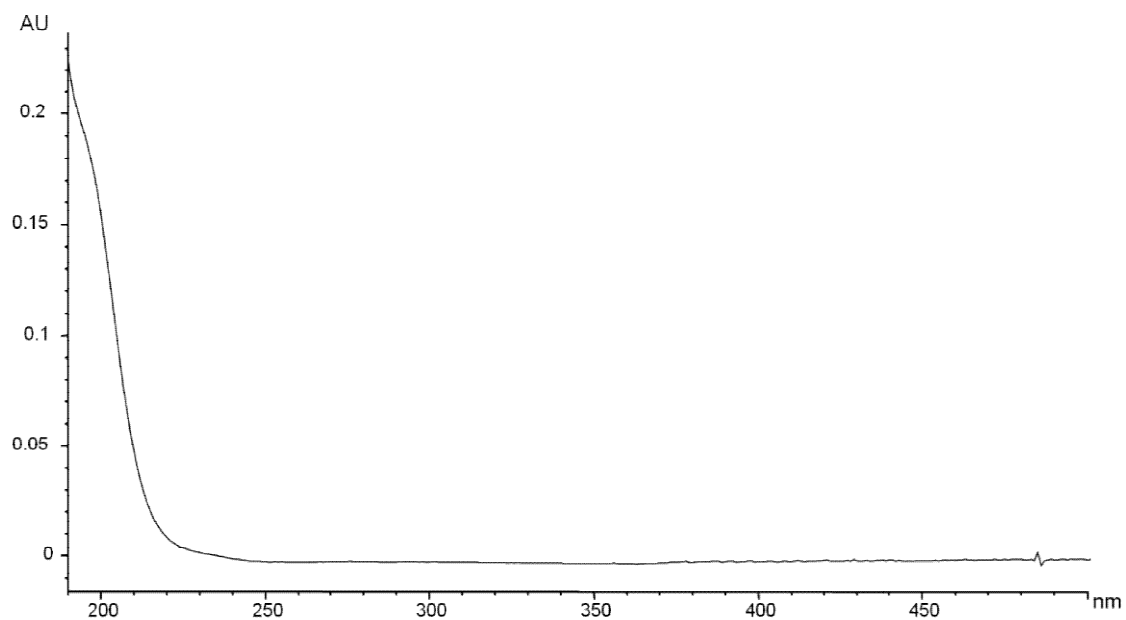
11. PŘÍLOHY

Příloha č. 1: UV spektra testovaných CIL

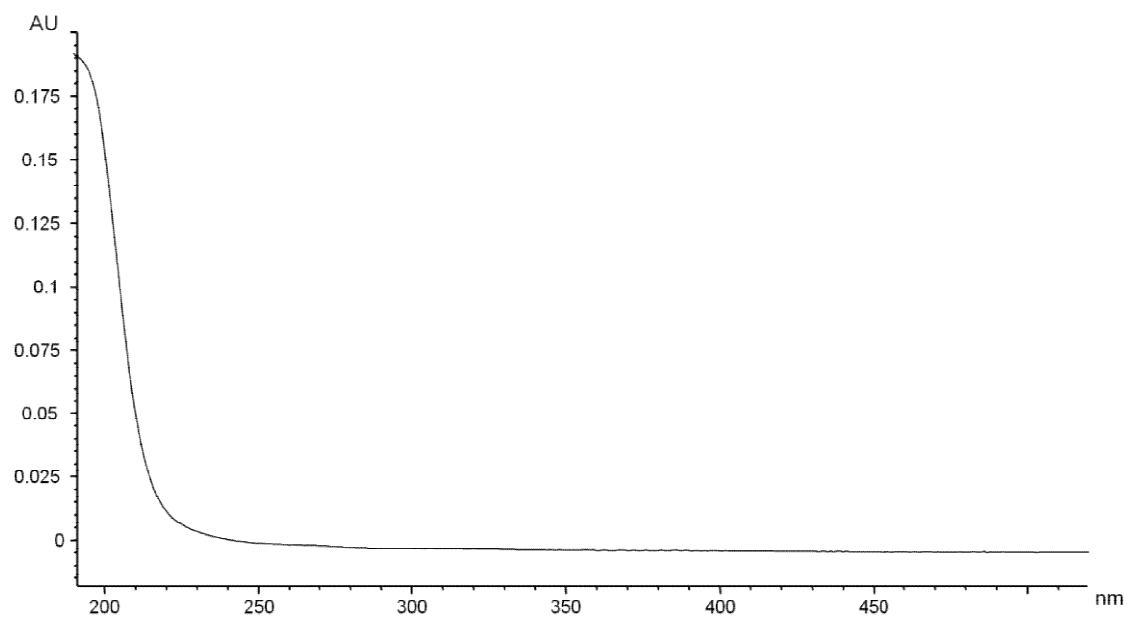
0,01mM ILA-1, H₂O



0,01mM ILA-2, H₂O



0,01mM ILA-3, H₂O



0,01mM ILB-1, MeOH

