

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza

Studijní obor: Klinická a toxikologická analýza



Bc. Jan Bílek

CHIRÁLNÍ SEPARACE DIQUATŮ A STANOVENÍ KONSTANT
STABILITY JEJICH KOMPLEXŮ S CYKLODEXTRIN
KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZOU

Chiral separation of diquats and determination of stability
constants of their complexes with cyclodextrins by capillary
electrophoresis

Diplomová práce

Vedoucí práce: RNDr. Václav Kašička, CSc.
Konzultant práce: RNDr. Dušan Koval, Ph.D.

Praha, 2017

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci vypracoval samostatně, pod vedením RNDr. Václava Kašičky, CSc., a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědom toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze a Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i., je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity a ústavu.

V Praze dne 19. 5. 2017

.....
Podpis

Abstrakt

Kapilární zónová elektroforéza byla využita pro chirální separaci jedenácti derivátů diquatu (DQ). Tyto N-heteroaromatické dikationty obsahující strukturní motiv 2,2'-bipyridinu jsou v současné době studovány pro své zajímavé redoxní vlastnosti a axiální chiralitu. Kombinace těchto vlastností může v budoucnu přinést zajímavé využití. Pro chirální separace DQ byly jako chirální selektory (CS) použity komerčně dostupné náhodně sulfatované α -, β -, a γ -cyklodextriny o vysokém stupni substituce (HS- α -CD, HS- β -CD, HS- γ -CD). Při použití všech uvedených CS bylo dosaženo velmi dobrého chirálního dělení. Separace enantiomerů na základní linii bylo dosaženo pro 82 %, 91 %, respektive 100 % analyzovaných derivátů DQ v přítomnosti HS- α -CD, HS- β -CD, respektive HS- γ -CD. Nejvyšších separačních účinností a rozlišení enantiomerů DQ bylo dosaženo při elektroforetické separaci v základním elektrolytu (BGE) obsahujícím 22 mmol/L NaOH, 35 mmol/L H₃PO₄ (pH 2,5) a 6 mmol/L HS- β -CD. Pomocí tří dostupných neracemických DQ byla provedena identifikace migračního pořadí jednotlivých *M*- a *P*-enantiomerů příslušných DQ.

Metodou kapilární afinitní elektroforézy byly experimentálně zjištěny závislosti efektivní elektroforetické pohyblivosti enantiomerů DQ na koncentraci HS- α -CD, HS- β -CD, nebo HS- γ -CD v BGE. Efektivní pohyblivosti byly vypočteny po korekci migračních časů analytů pomocí Haarhoff-Van der Lindeho funkce. Nelineární regresní analýzou získaných dat byly stanoveny zdánlivé konstanty stability komplexů enantiomerů DQ s výše uvedenými anionickými CS cyklodextrinového typu. Pro komplexy všech DQ s HS- α -CD, HS- β -CD a HS- γ -CD byly zjištěny velmi vysoké hodnoty zdánlivých konstant stability. Jejich rozmezí bylo od $7,8 \cdot 10^3$ dm³/mol do $547,4 \cdot 10^3$ dm³/mol. Nejpevnější komplexy byly tvořeny interakcí enantiomerů derivátů DQ s HS- α -CD.

Klíčová slova: chirální separace, sulfatované cyklodextriny, kapilární elektroforéza, konstanta stability, diquaty

Abstract

Capillary zone electrophoresis was used for chiral separation of eleven diquat derivatives. These N-heteroaromatic dications containing structural motif of 2,2'-bipyridine have recently been studied for their interesting electrochemical properties as well as for the axial chirality of their molecules. The combination of these properties could potentially lead to interesting applications in the future. For enantioseparation of diquats (DQ) commercially available randomly sulfated α -, β -, and γ -cyclodextrins with high degree of substitution were used. A successful chiral separation was achieved using all of the three sulfated cyclodextrins as chiral selectors (CS). Baseline enantioseparation was achieved for 82 %, 91 % respectively 100 % of the analyzed DQ in the presence of HS- α -CD, HS- β -CD, HS- γ -CD respectively. The highest separation efficiency and resolution were obtained in the background electrolyte containing 22 mmol/L NaOH, 35 mmol/L H₃PO₄ (pH 2,5) and 6 mmol/L HS- β -CD. Using three available nonracemic DQ an identification of the particular *M*- and *P*-enantiomers was done for the three corresponding DQ structures.

Apparent stability constants of complexes of the DQ derivatives with above mentioned cyclodextrins as CS were determined by means of capillary affinity electrophoresis. The stability constant calculations were based on nonlinear regression analysis of experimentally obtained plot of the effective electrophoretic mobility of DQ against the concentration of given anionic CS added to the background electrolyte. Migration times of the enantiomer-CS complexes were corrected using Haarhoff-Van der Linde function. The DQ derivatives formed strong complexes with all three types of sulfated cyclodextrins as CS. The determined stability constants varied in the range of $7,8 \cdot 10^3$ and $547,4 \cdot 10^3$ dm³/mol.

Key words: chiral separation, sulfated cyclodextrins, capillary electrophoresis, stability constants, diquats

OBSAH

Seznam použitých zkratk a symbolů	8
1 Úvod.....	11
2 Výzkumné cíle	12
3 Teoretická část.....	13
3.1 Stereoizomerie a chiralita látek	13
3.2 Chirální analýza organických látek	14
3.3 Kapilární elektromigrační metody	17
3.3.1 Elektroforetická pohyblivost a elektroosmotický tok.....	17
3.3.2 Disperzní jevy.....	20
3.3.3 Separační parametry	21
3.3.4 Kapilární zónová elektroforéza	22
3.3.5 Kapilární afinitní elektroforéza	24
3.3.6 Ostatní kapilární elektromigrační metody pro chirální analýzu látek	25
3.4 Chirální selektory v kapilární elektroforéze	26
3.4.1 Cyklodextriny	27
3.5 Konstanta stability komplexu	32
3.5.1 Stanovení konstanty stability pomocí ACE.....	33
3.5.2 Další metody (A)CE pro stanovení konstant stability.....	35
3.6 Diquaty.....	36
4 Experimentální část – použité materiály, přístroje a pomůcky	39
4.1 Použité chemikálie	39
4.2 Analyzované látky	39
4.3 Přístrojové vybavení a experimentální podmínky separací.....	40
5 Výsledky a diskuze	43
5.1 Achirální analýza diquatů.....	44
5.2 Chirální separace diquatů.....	45
5.2.1 Elektroforetická separace enantiomerů derivátů diquatů při použití HS- α -CD jako chirálního selektoru.....	46
5.2.2 Elektroforetická separace enantiomerů derivátů diquatů při použití HS- β -CD jako chirálního selektoru.....	48
5.2.3 Elektroforetická separace enantiomerů derivátů diquatů při použití HS- γ -CD jako chirálního selektoru.....	50

5.2.4	Porovnání enantioseparací derivátů diquatů v přítomnosti HS- α -CD, HS- β -CD, HS- γ -CD jako chirálních selektorů – shrnutí analýz.....	52
5.2.5	Identifikace vybraných M- a P-enantiomerů diquatů při použití HS- α -CD, HS- β -CD, HS- γ -CD jako chirálních selektorů.....	59
5.3	Stanovení zdánlivých konstant stability komplexů diquatů s chirálními selektory HS-α-CD, HS-β-CD a HS-γ-CD	61
6	Závěr	75
7	Použité informační zdroje a literatura	77

Poděkování

Děkuji vedoucímu práce, RNDr. Václavu Kašíčkovi, CSc., za možnost vypracovat tuto diplomovou práci v Laboratoři elektromigračních metod Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i. Také mu děkuji za nabídnuté téma, rady a připomínky, odborné vedení a neobyčejně vstřícný přístup.

Mé poděkování patří též konzultantovi, RNDr. Dušanu Kovalovi, Ph.D., Mgr. Renátě Konášové a stejně tak i celému kolektivu Laboratoře elektromigračních metod ÚOCHB AV ČR, v.v.i., za poskytnutí příjemného pracovního prostředí, ale také za věcné a konstruktivní poznámky a připomínky k této práci.

Dále bych velice rád poděkoval své rodině a přátelům za trpělivost a podporu při studiu.

Seznam použitých zkratek a symbolů

Zkratka/symbol	Legenda
----------------	---------

ACE	afinitní kapilární elektroforéza
BGE	základní elektrolyt
CD	cyklodextrin
CE	kapilární elektroforéza
CEC	kapilární elektrochromatografie
CFACE	kontinuální frontální analýza spojená s kapilární elektroforézou
CIEF	kapilární izoelektrická fokusace
CITP	kapilární izotachoforéza
CS	chirální selektor
CSP	chirální stacionární fáze
CZE	kapilární zónová elektroforéza
DMSO	dimethylsulfoxid
DQ	diquat
CEKC	elektrokinetická kapilární chromatografie
EOF	elektroosmotický tok
FACE	frontální analýza spojená s kapilární elektroforézou
GC	plynová chromatografie
HD	Hummel-Dreyerova metoda pro stanovení konstant stability
HETP	výškový ekvivalent teoretického patra
HS- α -CD	vysoce sulfatovaný α -cyklodextrin
HS- β -CD	vysoce sulfatovaný β -cyklodextrin
HS- γ -CD	vysoce sulfatovaný γ -cyklodextrin
HPC	hydroxypropylcelulóza
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HVL	Haarhoff-Van der Linde (funkce)
i.d.	vnitřní průměr
MS	hmotnostní spektrometrie/hmotnostně-spektrometrický detektor
MS-ACE	kapilární afinitní elektroforéza založená na změně pohyblivosti
NMR	nukleární magnetická rezonance
o.d.	vnější průměr

PF-ACE	kapilární afinitní elektroforéza s částečným plněním kapiláry
SFC	superkritická fluidní chromatografie
SD	směrodatná odchylka
UV-VIS DAD	spektrofotometrický detektor s diodovým polem pro ultrafialovou a viditelnou oblast spektra elektromagnetického záření
VP	metoda vakantního píku pro stanovení konstant stability
A_{200}	absorbance při vlnové délce 200 nm
a_A	aktivita analytu
a_{AS}	aktivita komplexu analyt-selektor
a_S	aktivita chirálního selektoru
c	molární koncentrace
c_A^0	standardní molární koncentrace analytu
c_{AS}^0	standardní molární koncentrace komplexu analyt-selektor
c_S^0	standardní molární koncentrace chirálního selektoru
c_i	rovnovážná molární koncentrace i-té složky ionogenní látky v roztoku
d	průměr molekuly
E	intenzita elektrického pole
I	iontová síla
K_1	zdánlivá konstanta stability prvního migrujícího enantiomeru
K_2	Zdánlivá konstanta stability druhého migrujícího enantiomeru
k	rychlostní konstanta vzniku komplexu
k'	rychlostní konstanta zániku komplexu
K_{AS}	zdánlivá konstanta stability komplexu analyt-selektor
K_{AS}^{th}	termodynamická konstanta stability komplexu analyt-selektor
L_{eff}	efektivní délka separační kapiláry
L_t	celková délka separační kapiláry
m_A	elektroforetická pohyblivost analytu
m_{act}	aktuální elektroforetická pohyblivost
m_{app}	zdánlivá pohyblivost
m_{AS}	elektroforetická pohyblivost komplexu analyt-selektor
$m_{eff,(A)}$	efektivní elektroforetická pohyblivost (analytu A)
m_{EOF}	pohyblivost elektroosmotického toku
m_i	elektroforetická pohyblivost i-té složky ionogenní látky

m_{ion}	elektroforetická pohyblivost iontu
m_{lim}	limitní elektroforetická pohyblivost iontu
M_r	relativní molekulová hmotnost
m_s	elektroforetická pohyblivost selektoru
N	počet teoretických pater
q	elektrický náboj iontu
r	poloměr iontu
R_s	rozlišení
t_{inj}	doba dávkování markeru elektroosmotického toku
t_{mig}	migrační čas
t_{ramp}	doba lineárního růstu napětí z nuly na hodnotu separačního napětí
t_U	doba aplikace separačního napětí
U_{sep}	separační napětí
v	rychlost pohybu iontu
w	šířka píku při základně
w_h	šířka píku v polovině jeho výšky
x_i	molární zlomek i-té složky ionogenní látky
α	faktor selektivity separace
γ_A	aktivitní koeficient analytu
γ_{AS}	aktivitní koeficient komplexu analyt-selektor
γ_S	aktivitní koeficient selektoru
ε	permitivita
λ	vlnová délka
η	viskozita roztoku
σ	standardní odchylka Gaussovského píku
ζ	elektrokinetický potenciál

1 Úvod

Chiralita je významnou vlastností chemických látek související s asymetrií jejich molekul. Je schopna ovlivňovat jejich biologickou aktivitu a fyziologický účinek na živé organismy. Chování enantiomerů stejné molekuly se v chirálním prostředí lidského organismu může významně lišit. Z toho důvodu v posledních několika desítkách let došlo, především kvůli požadavkům farmaceutického a potravinářského průmyslu na chirální čistotu sloučenin, k rozvoji separačních technik a metod pro chirální analýzu látek [1, 2].

Využití kapilární elektroforézy (CE) pro chirální separace látek s sebou přináší několik výhod oproti jiným separačním metodám. Mezi tyto výhody patří zejména vysoká účinnost, rychlost a citlivost separace. Jednoduchá údržba instrumentu a nízké provozní náklady, dané velmi malým objemem dávkovaného vzorku i použitého elektrolytu, dělají z CE relativně levnou a ekologicky šetrnou separační metodu. Metody CE jsou aplikovatelné pro separace širokého spektra rozpustných ionizovatelných analytů, od malých iontů až po biopolymery či organely a celé buňky. Jsou spolehlivým separačním nástrojem pro kvalitativní i kvantitativní analýzu nebo mikropreparaci řady ionogenních látek. Zároveň umožňují stanovení různých fyzikálně-chemických parametrů a studium vysoce specifických interakcí mezi molekulami a/nebo ionty [3, 4].

Konstanta stability komplexu je významným termodynamickým parametrem, který charakterizuje pevnost komplexu látky se specifickou molekulou (či iontem) ligandu, a tedy sílu jejich vzájemné interakce [5, 6].

Diquaty (DQ) jsou chirální N-heteroaromatické dikationty se zajímavými oxidačně-redukčními vlastnostmi. V současné době je zkoumána jejich axiální chiralita způsobená přítomností biarylové osy ve 2,2'-bipyridinovém skeletu. Výzkum neracemických derivátů DQ, a tedy i rozvoj jejich praktických aplikací, je podmíněn dostupností rychlé, levné a spolehlivé separační metody poskytující vysokou separační účinnost a rozlišení jejich *M*- a *P*-enantiomerů [7, 8].

2 Výzkumné cíle

Hlavním cílem této diplomové práce bylo provést chirální separaci jedenácti derivátů diquatů, syntetizovaných na ÚOCHB AV ČR, v.v.i., pomocí kapilární zónové elektroforézy s využitím tří chirálních selektorů cyklodextrinového typu – náhodně sulfatovaných α -, β - a γ -cyklodextrinů s vysokým stupněm substituce. Cíle zahrnovaly provedení optimalizace některých separačních podmínek a provedení identifikace *M*- a *P*-enantiomerů vybraných diquatů pomocí příslušných dostupných neracemických diquatů.

Dalším cílem bylo proměření závislostí efektivních elektroforetických pohyblivostí enantiomerů diquatů na rostoucí koncentraci jednotlivých sulfatovaných cyklodextrinů v separačním systému pomocí kapilární afinitní elektroforézy a stanovení konstant stability nelineární regresní analýzou těchto experimentálně zjištěných dat.

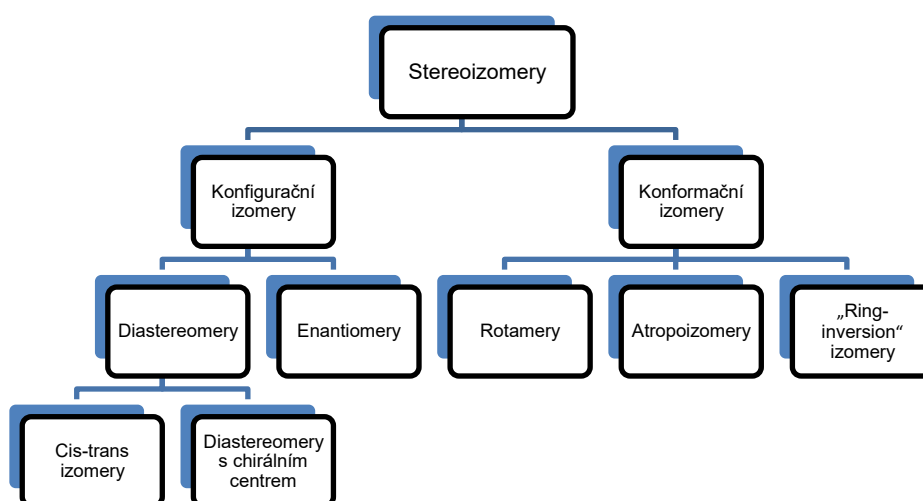
Cílem bylo zhodnotit a porovnat výsledky provedených enantioseparací a pokusit se najít vztah mezi experimentálně zjištěnými separačními parametry, strukturou diquatů, strukturou sulfatovaných cyklodextrinů a silou jejich specifických interakcí.

3 Teoretická část

3.1 Stereoizomerie a chiralita látek

Sloučeniny, které jsou tvořeny stejným počtem atomů stejného typu, ale liší se svým uspořádáním v prostoru, se nazývají stereoizomery. Stereoizomery je možno rozdělit na dvě podskupiny – konfigurační, u kterých během izomerizace dochází ke štěpení chemických vazeb, a konformační, kde je izomerizace uskutečněna pouze omezenou rotací kolem jednoduchých vazeb [1, 4, 9]. Konaformační stereoizomery lze dále rozdělit na rotamery, atropoizomery a „ring inversion“ izomery. Konfigurační stereoizomery je možné rozdělit na diastereomery a enantiomery. Diastereomery se dále dělí na (*E*, *Z*)-diastereomery a diastereomery s chirálním centrem. Druhy stereoizomerie jsou shrnuty na obrázku 1 [1].

Jednotlivé enantiomery jedné látky nejsou prostorově identické, neobsahují žádný prvek symetrie a jsou si navzájem svými zrcadlovými obrazy. Takto asymetrické látky jsou tzv. chirální. Existuje několik strukturních rysů molekuly, které způsobují její chiralitu. Nejběžnějším typem chiralitu je centrální neboli bodová chiralita [1, 4, 9]. Dalšími prvky asymetrie mohou být chirální osa u axiální chiralitu a chirální rovina u planární chiralitu. Chiralita, která je dána celkovou asymetrií molekuly, se nazývá helikální (tzv. helicity) [4, 9].



Obr. 1 Rozdělení stereoizomerů [1].

3.2 Chirální analýza organických látek

Separace enantiomerů bio(molekul) je důležitou oblastí separačních věd. Hraje důležitou roli především ve farmaceutickém průmyslu, potravinářství, environmentální analýze a zemědělství [4].

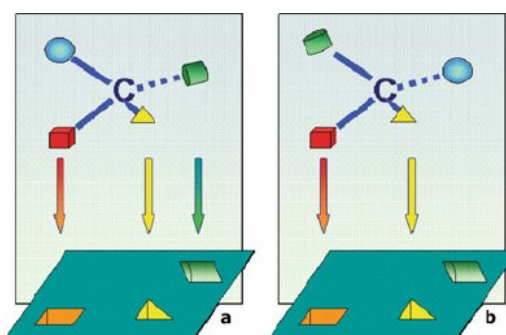
V analytické chemii se pro dělení enantiomerů využívá instrumentálních separačních metod založených na fyzikálně-chemických principech a jevech. Pomocí těchto analytických metod lze dosáhnout rychlých, vysokoúčinných a selektivních separací množství chirálních látek s vysokým rozlišením. Nejpoužívanější jsou metody chromatografické – plynová chromatografie (GC), vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC), superkritická fluidní chromatografie (SFC) a metody elektromigrační – kapilární elektroforéza (CE), kapilární elektrokinetická chromatografie (CEKC), kapilární elektrochromatografie (CEC) a kapilární afinitní elektroforéza (ACE). Mimo tyto separační metody se v chirální analýze a pro studium mechanismů chirálního chování látek používají i spektroskopické metody – nukleární magnetická rezonance (NMR), polarimetrie, cirkulární dichroismus, optická rotační disperze, rentgenová krystalografie a některé další [4, 10].

Enantiomery jedné látky mají v achirálním (symetrickém) prostředí stejné fyzikálně-chemické vlastnosti (s výjimkou specifické optické otáčivosti). V chirálním (asymetrickém) prostředí mohou být jejich vlastnosti i zásadně odlišné. Z této skutečnosti vychází principy chirálního dělení látek a plyne z ní také fakt, že separace enantiomerů nelze dosáhnout bez přítomnosti jiné chirálně čisté (neracemické) látky. Ta buď chemicky zreaguje se zkoumanou racemickou látkou (derivatizace), anebo svou přítomností vytvoří chirální prostředí. V tomto smyslu je chirálně čistá látka obecně chápána jako tzv. chirální selektor (CS), respektive diskriminátor. Prvnímu z uvedených přístupů k chirálnímu dělení látek se říká metoda nepřímá, druhý přístup je základem metody přímé [3, 4, 11, 12].

Podstatou nepřímé metody je chemická derivatizační reakce mezi vysoce chirálně čistým derivatizačním činidlem a racemickým analytem. Během této reakce vzniká stabilní diastereomerní pár. V každém z diastereomerů se nachází

nově vzniklá kovalentní vazba mezi chirálně čistým derivatizačním činidlem a jedním z enantiomerů původně racemického analytu. Vzniklé diastereomery mají odlišné fyzikálně-chemické vlastnosti a následně je možné je od sebe oddělit vhodnou separační metodou. Tato separace již probíhá v achirálním prostředí [3, 4, 11, 12].

Dělení enantiomerů za užití přímé metody se vyznačuje přítomností chirálně čisté látky přímo v separačním systému během vlastního separačního procesu. Mezi racemickým analytem a chirálně čistou látkou nedochází k chemické reakci, při které by vznikaly nové kovalentní vazby. Základním a poměrně dobře popsaným modelem, který popisuje mechanismus chirální diskriminace, je tzv. model třibodové interakce [12]. Schéma tohoto modelu je na obrázku 2. Plyne z něj, že aby došlo k chirálnímu rozpoznání molekuly, je třeba, aby existovala alespoň tři různá místa na molekule analytu a na molekule selektoru, mezi kterými dojde k mezimolekulovým interakcím. Uplatňují se všechny typy jak specifických, tak univerzálních nekovalentních sil, které jsou shrnuty v tabulce 1. Součet všech přítomných přitažlivých interakcí musí být větší než součet odpudivých interakcí.



Obr. 2 Schéma modelu třibodové interakce [10].

Pro separaci enantiomerů je nezbytné, aby minimálně jedna ze tří interakcí byla enantioselektivní. Prostřednictvím nekovalentních interakcí dochází k tvorbě přechodných diastereomerních komplexů mezi jednotlivými enantiomery a CS, se kterým reagují s různou afinitou. Vzniklé kineticky labilní komplexy se odlišují svými fyzikálně-chemickými vlastnostmi. To umožňuje jejich vzájemné oddělení. Chirální selektor se v separačním systému může nacházet volně, jako chirální aditivum, nebo chemicky navázán či adsorbován na danou matici,

např. stacionární fázi v chromatografii. Takovým způsobem vzniká tzv. chirální stacionární fáze (CSP) [3, 4, 10, 11].

Tab. 1: Typy a některé vlastnosti mezimolekulových nekovalentních interakcí [10].

Typ nekovalentní interakce	Síla interakce	Směr interakce	Dosah interakce
coulombické (elektrostatické)	velmi silné	odpudivé i přitažlivé	střední ($1/d^2$)
vodíkové můstky	velmi silné	přitažlivé	dlouhý
stérická repulze	slabé až velmi silné	odpudivé	krátký
π - π interakce	silná	přitažlivé	střední
ion-dipól interakce	silná	přitažlivé	krátký
dipól-dipól interakce	středně silná	přitažlivé i odpudivé	krátký ($1/d^3$)
dipól-indukovaný dipól interakce	slabá	přitažlivé	velmi krátký ($1/d^6$)
Londonovy disperzní síly	velmi slabá	přitažlivé	velmi krátký ($1/d^6$)
Van der Waalsovy síly (hydrofobní interakce)	velmi slabá	přitažlivé	velmi krátký ($1/d^6$)

3.3 Kapilární elektromigrační metody

Kapilární elektromigrační metody zahrnují několik elektromigračních vysokoúčinných separačních technik. Z technik založených na elektroforetickém migračním principu sem patří kapilární zónová elektroforéza (CZE), kapilární izotachoforéza (CITP) a kapilární izoelektrická fokusace (CIEF). Pro chirální analýzu látek lze využít CZE a CITP. Kapilární zónová elektroforéza pro chirální separace splňuje též definici kapilární afinitní elektroforézy (ACE), kdy specifický analyt reaguje se specifickým ligandem (v chirální CZE/ACE chirální selektor). Kromě těchto metod se v chirální analýze uplatňují rovněž hybridní techniky – kapilární elektrokinetická chromatografie (CEKC) a kapilární elektrochromatografie (CEC), kde se využívá kombinace principů CE a rozdělovací chromatografie [13, 14].

Kapilární elektromigrační metody obvykle poskytují rychlou a vysokoúčinnou separaci množství různorodých ionogenních i elektroneutrálních sloučenin či částic. Své využití nacházejí především v kvalitativní a kvantitativní analýze, preparaci látek nebo při studiu fyzikálně-chemických dějů a specifických interakcí mezi molekulami a/nebo ionty [5, 11].

3.3.1 Elektroforetická pohyblivost a elektroosmotický tok

Kapilární elektroforéza je fyzikálně-chemická separační metoda, která umožňuje oddělovat od sebe rozpustné elektricky nabitě látky a částice. Elektroforetické dělení probíhá v separační kapiláře na základě rozdílných rychlostí pohybu ionogenních látek ve stejnosměrném elektrickém poli. Směr a rychlost jejich pohybu jsou určeny intenzitou vloženého elektrického pole a součtem dvou fyzikálních vektorových veličin – elektroforetické pohyblivosti (mobility) iontů a pohyblivosti elektroosmotického toku (EOF) kapalného média, jímž je naplněna separační kapilára [14, 15]. Rychlost pohybu iontů je dána rovnicí:

$$\vec{v} = \vec{E}(\vec{m}_{ion} + \vec{m}_{EOF}), \quad (1)$$

kde \vec{E} je intenzita elektrického pole, \vec{m}_{ion} je elektroforetická pohyblivost iontu a \vec{m}_{EOF} je pohyblivost EOF kapaliny v separační kapiláře [5, 11, 14-16].

Křemenná separační kapilára obsahuje na svém vnitřním povrchu silanolové skupiny Si-O-H, které při vyšším pH BGE disociují. Po naplnění separační kapiláry vodivým elektrolytem její záporně nabitá vnitřní stěna elektrostaticky interaguje s kationickými protioionty v BGE. Na vnitřním povrchu stěny kapiláry dochází ke vzniku elektrické dvojvrstvy. Ta může být kvantitativně popsána fyzikální veličinou – elektrokinetickým potenciálem zéta ζ . Elektrická dvojvrstva se skládá z nehybné Sternovy vrstvy a z pohyblivé difúzní vrstvy. Po vložení vysokého napětí dochází ve vzniklém stejnosměrném elektrickém poli k pohybu kationické difúzní vrstvy k záporně nabitě katodě. Solvatační obaly iontů, které formují dvojvrstvu, s sebou zároveň strhávají okolní ionty a celý objem kapaliny v kapiláře je uveden do pohybu – vzniká katodický EOF [5, 11, 14-16]. Rychlost EOF je možné popsat rovnicí:

$$\vec{v}_{EOF} = \vec{m}_{EOF} \cdot \vec{E} = \zeta \cdot \frac{\varepsilon}{4\pi\eta} \cdot \vec{E}, \quad (2)$$

kde ε je permitivita a η je viskozita roztoku [5, 11, 14-16].

Elektroforetická pohyblivost daného sférického iontu, m_{ion} , je definována jako rychlost pohybu tohoto iontu v kapalném prostředí vlivem stejnosměrného elektrického pole o jednotkové intenzitě. Lze pro ni odvodit následující vztah:

$$\vec{m}_{ion} = \frac{q}{6\pi\eta r}, \quad (3)$$

kde q je elektrický náboj iontu a r je jeho poloměr. Hodnoty elektroforetické pohyblivosti jsou tabelovány jako fyzikální konstanty a jsou stanoveny pro zcela disociované látky a v nekonečně zředěném roztoku. Taková elektroforetická pohyblivost se nazývá limitní iontová pohyblivost, m_{lim} . Aktuální iontová pohyblivost plně disociované látky, m_{act} , je elektroforetická pohyblivost daného iontu při dané teplotě a nenulové iontové síle. Zdánlivá pohyblivost, m_{app} , je dána součtem efektivní elektroforetické pohyblivosti, m_{eff} , a elektroosmotické pohyblivosti, m_{EOF} [5, 11, 14-16].

Zdánlivou elektroforetickou pohyblivost iontu, m_{app} , lze určit přímo z elektroforegramu podle rovnice:

$$m_{app} = \frac{L_t \cdot L_{eff}}{U_{sep} \cdot t_{mig}}, \quad (4)$$

kde L_t je celková délka separační kapiláry, L_{eff} je efektivní délka separační kapiláry, tedy délka od vstupního konce kapiláry k detekčnímu okénku, U_{sep} je separační napětí a t_{mig} je migrační čas analytu. Pro výpočet efektivní elektroforetické pohyblivosti iontu, m_{eff} , je nutné zohlednit pohyblivost EOF. Je-li ke vzorku přidán neutrální marker EOF, potom lze efektivní elektroforetickou pohyblivost vyjádřit jako:

$$m_{eff} = \left(\frac{1}{t_{mig}} - \frac{1}{t_{EOF}} \right) \cdot \left(\frac{L_t \cdot L_{eff}}{U_{sep}} \right) \quad (5)$$

kde t_{EOF} je migrační čas markeru EOF. V případě, že má neutrální marker za daných experimentálních podmínek příliš nízkou pohyblivost, je výhodnější pro stanovení pohyblivosti EOF použít metodu navrženou Williamsem a Vighem [17]. Tento způsob eliminuje vliv změn m_{EOF} během separace s přidáním markerem a m_{eff} analytu je pak zatížena menší chybou. Tato metoda zahrnuje tři postupná dávkování neutrálního markeru. První dvě dávkování následují po sobě a jsou aplikována stejným tlakem po stejnou dobu t_{inj} , poté je vloženo určité separační napětí, U_{sep} , po dobu t_U , a dvě vzniklé zóny markeru se elektroforetický dělí. Následně je marker nadávkován potřetí stejným tlakem a po stejnou dobu, jako při prvních dvou dávkováních. Výsledkem tohoto postupu jsou tři zóny neutrálního markeru a z migračních časů, t_{mig1} , t_{mig2} , t_{mig3} , odpovídajících píků v elektroforegramu je možné m_{EOF} vypočítat takto [17]:

$$m_{EOF} = \frac{(t_{mig3} - t_{mig2} + t_{mig1}) \cdot L_t \cdot L_{eff}}{U_{sep} \cdot (t_U - t_{ramp}) \cdot \left(t_{mig3} + \frac{1}{2} t_{inj} \right)}, \quad (6)$$

kde t_{ramp} je doba, po kterou napětí lineárně roste z nuly až na hodnotu U_{EOF} . Efektivní elektroforetickou pohyblivost analytu A pak lze vyjádřit jako rozdíl zdánlivé elektroforetické pohyblivosti a pohyblivosti EOF:

$$m_{eff,A} = m_{app} - m_{EOF} \quad (7)$$

3.3.2 Disperzní jevy

Během elektroforetické separace dochází při pohybu zón analytů základním elektrolytem (BGE) k jejich rozšiřování (rozmývání) vlivem několika disperzních jevů. Rozšiřování zón je dáno různou migrační rychlostí iontů v dané zóně. Důsledkem disperzních jevů je deformace tvaru píku, a tím dochází k ovlivnění separační účinnosti a citlivosti metody. V CE může být disperze způsobena několika faktory. Mezi nejvýznamnější patří elektromigrační disperze, všudypřítomná podélná molekulární difúze, Jouleovo teplo tvořené při průtoku elektrického proudu kapalným vodivým médiem, interakce analytu s vnitřní stěnou separační kapiláry, nejčastěji v podobě adsorpce a v menší míře také rozšíření zón v důsledku dávkování (délka dávkované zóny) a detekce (délka detekční cely) [5, 11, 15, 16].

Elektromigrační disperze

Elektrodisperze je způsobena lokálními rozdíly mezi elektroforetickou pohyblivostí složek BGE a vzorku v příslušných zónách. Jednotlivé ionty se tak v dané zóně pohybují v elektrickém poli o odlišných intenzitách s různou rychlostí, neboť napětí vkládané mezi elektrody není lineárně rozprostřeno podél separační kapiláry. Tyto rozdíly mohou být způsobeny změnami pH nebo vodivosti v dané zóně. V případě ACE ke změnám v pohyblivostech složek zón dochází také z důvodu přítomnosti komplexačních rovnováh [18], kdy dochází ke specifickým komplexačním interakcím mezi složkami BGE. K elektrodisperzi také dochází při nadávkování nadměrného množství vzorku. Všechny tyto faktory vedou k asymetrickým, frontujícím nebo chvostujícím píkům [5, 11, 15, 16]. Pro pík Gaussovského typu odpovídá migrační čas maximu píku a jeho šířka proporčně odpovídá celkovému rozptylu píku. Pro charakterizaci tvaru píku deformovaného především elektromigrační disperzí byla popsána tzv. Haarhoff-van der Lindeho funkce (HVL funkce). Ta může být do jisté míry použita pro korekci migračních časů těchto píků. Korekce migračních časů pomocí HVL funkce je používána zejména v CZE a ACE [19-23].

Adsorpce

Nejčastější interakce mezi látkami rozpuštěnými ve vzorku či BGE se stěnou separační kapiláry je adsorpce. Adsorpce látek je způsobena elektrostatickými, hydrofobními a hydrofilními interakcemi kationtů se záporně nabitou stěnou kapiláry. Významná adsorpce je popsána zejména u vysokomolekulárních sloučenin – proteinů a dalších (bio)polymerů. Ve prospěch adsorpce působí také relativně velký poměr povrchu k objemu kapiláry. Adsorpci látek na vnitřní stěnu kapiláry lze neúčinněji potlačit modifikací její vnitřní stěny kovalentním navázáním organického modifikátoru, např. polyakrylamidu nebo hydroxypropylcelulózy (HPC). Taková úprava kapiláry nejen snižuje adsorpci, ale může i změnit či zcela eliminovat náboj, neutralizovat povrch kapiláry, a tím ovlivnit EOF [5, 11, 15, 16].

3.3.3 Separační parametry

Separační účinnost

Účinnost separace lze v CE vyjádřit jako počet teoretických pater (N) daný druhou mocninou podílu efektivní délky separační kapiláry, L_{eff} , a standardní odchylky, σ , píku daného analytu:

$$N = \left(\frac{L_{eff}}{\sigma}\right)^2 \quad (8)$$

Přímo z elektroforegramu je možné vypočítat počet teoretických pater např. dle následující rovnice [5, 11, 15, 16]:

$$N = 16 \left(\frac{t_{mig}}{w}\right)^2 = 5,54 \left(\frac{t_{mig}}{w_h}\right)^2, \quad (9)$$

kde t_{mig} je migrační čas píku analytu, w je šířka píku při základní linii a w_h je šířka píku v polovině jeho výšky. Separační účinnost vyjádřenou pomocí výškového ekvivalentu teoretického patra (HETP) je možné popsat vztahem [5, 11, 15, 16]:

$$HETP = \frac{\sigma^2}{L_{eff}} \quad (10)$$

Rozlišení

Rozlišení (R_s) charakterizuje míru relativní separace dvou sousedních píků a lze ho vypočítat pomocí rovnice:

$$R_s = \frac{2(t_{mig2} - t_{mig1})}{w_1 + w_2} = \frac{t_{mig2} - t_{mig1}}{4\sigma} = \frac{1,18(t_{mig2} - t_{mig1})}{w_{h1} + w_{h2}}, \quad (11)$$

za podmínky, že $t_{mig2} > t_{mig1}$; t_{mig1} a t_{mig2} jsou migrační časy separovaných píků analytů, w_1 a w_2 jsou jejich šířky při základní linii, w_{h1} a w_{h2} jsou šířky píků v polovině jejich výšky a σ je standardní odchylka Gaussovského píku. Hodnota rozlišení vyšší než 1,5, respektive 2,0, odpovídá rozdělení píků na základní linii. Pro píky, které se vzájemně značně liší svými výškami, nemusí být výše uvedená rovnice vhodná [5, 11, 15, 16].

Faktor selektivity

Selektivita (α) je schopnost metody oddělovat látky na základě určitého parametru. V CE lze selektivitu určit jako podíl efektivních elektroforetických pohyblivostí, m_{eff2} a m_{eff1} , dvou analytů [5, 11, 15, 16]:

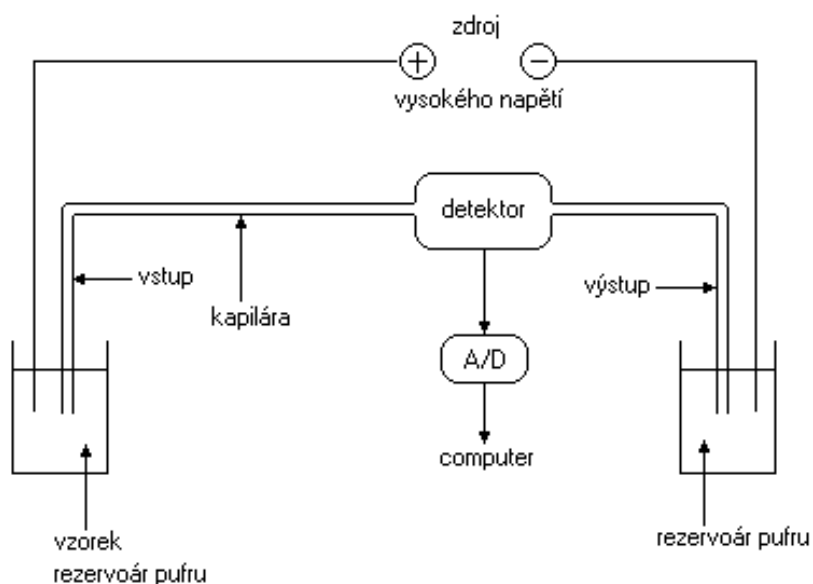
$$\alpha = \frac{m_{eff2}}{m_{eff1}}, \quad (12)$$

3.3.4 Kapilární zónová elektroforéza

Kapilární zónová elektroforéza (CZE) je nejjednodušší elektromigrační technikou. Separační kapilára je naplněna BGE, vzorek je hydrodynamicky nebo elektrokineticky dávkován a látky se pohybují ve stejnosměrném elektrickém poli. Elektroneutrální látky se pohybují s pohyblivostí odpovídající m_{EOF} . Látky iontové povahy se pohybují i vlastní elektroforetickou pohyblivostí, a pokud se jejich efektivní pohyblivosti dostatečně odlišují, dochází k jejich oddělení. Během separačního procesu se uvnitř separační kapiláry tvoří zóny jednotlivých analytů. Jsou-li separovány, doputují v různém čase do detektoru, kde jsou detegovány, signál odezvy detektoru je zaznamenán a počítačem převeden do podoby elektroforegramu.

Základní aparatura pro kapilární elektromigrační metody, viz schéma na obrázku 3, se skládá z říditelného zdroje vysokého napětí, ze dvou nádobek naplněných vodivým elektrolytem – pufrům, kvůli udržení stabilní hodnoty pH (tím i EOF). V nádobkách jsou ponořeny elektrody, které jsou připojeny ke zdroji vysokého napětí. V elektroforéze se používá vysoké napětí o hodnotách až 30 kV. Separační kapiláry jsou nejčastěji z taveného křemenného skla obaleného vrstvou polyimidu. Jsou dlouhé nejčastěji 20-100 cm, s vnitřním průměrem 25-100 μm a vnějším průměrem obvykle 375 μm . Před výstupním koncem kapiláry bývá umístěno detekční okénko pro nejčastější UV spektrofotometrickou detekci. Další používané typy detektorů jsou např. bezkontaktní vodivostní, fluorescenční, laserem indukovaný fluorescenční, amperometrický a hmotnostně-spektrometrický (MS) [14, 15].

V chirální CZE se nejčastěji používá přímé metody chirálního dělení, kdy se do BGE přidává jedno či více chirálních aditiv. Chirální selektor v BGE je specifickým ligandem, který prostřednictvím mezimolekulových nekovalentních sil interaguje se specifickým substrátem – chirálním analytem. Separace je založena na rozdílných efektivních elektroforetických pohyblivostech komplexů enantiomer-chirální selektor a/nebo na jejich rozdílné interakci s některou složkou separačního prostředí. Síla takové specifické interakce je charakterizována konstantou stability komplexu [5, 13, 24].



Obr. 3 Schéma aparatury pro kapilární elektroforézu [25].

V chirální CZE existují dva přístupy ke studiu interakcí mezi analytem a CS v závislosti na stabilitě vzniklého komplexu. První přístup je pro látky, které tvoří labilní komplexy. Druhý přístup je pro látky tvořící pevné komplexy, které během separace nedisociují a komplex je možné detegovat přímo. V takovém případě se analyzuje vzorek, který obsahuje rovnovážnou směs chirálního analytu a CS [3, 5, 26-30].

3.3.5 Kapilární afinitní elektroforéza

Kapilární afinitní elektroforéza je elektromigrační technika, která využívá vysoce specifických interakcí analytu se specifickými molekulami. Používá se především pro studium a charakterizaci specifických molekulárních interakcí analytu se specifickým ligandem. Pomocí ACE se studují různé fyzikálně-chemické vlastnosti látek a stanovují se některé fyzikálně-chemické, např. termodynamické parametry (konstanta stability komplexu). V ACE může být přítomno několik interagujících fází. Jednou fází je kapalné médium (BGE) a druhá fáze může být stacionární, kdy je CS upevněn (adsorbován či kovalentně vázán) na stacionární fázi, nebo obsažen v pseudostacionární fázi, tvořené přítomností např. chirální micely v separačním systému [5, 13, 24].

K dělení enantiomerů dochází v chirální ACE nejen na základě rozdílných efektivních elektroforetických pohyblivostí jednotlivých komplexů enantiomer-CS, ale také na základě jejich rozdílné afinity k některé složce separačního prostředí. Míra této afinity, respektive specifické interakce mezi enantiomerem a CS, je určena konstantou stability. Konstanta stability je termodynamický parametr, který charakterizuje sílu, a tedy stabilitu daného komplexu. Rovnováha vzájemných interakcí enantiomeru s CS je výsledkem součtu nescifických (hydrofobní interakce) a specifických (elektrostatické interakce, vodíkové můstky) nekovalentních mezimolekulových sil [3, 5, 26-30].

3.3.6 Ostatní kapilární elektromigrační metody pro chirální analýzu látek

Kapilární elektrokinetická chromatografie (CEKC)

Kapilární elektrokinetická chromatografie (CEKC) byla vyvinuta pro separaci elektroneutrálních látek, které nemohou být rozděleny pomocí CZE, neboť nejsou nabitě. Tato hybridní separační metoda je založena na elektromigraci analytu (elektroforetické i elektroosmotické) a chromatografickém rozdělovacím separačním principu. Ten v CEKC využívá chemické afinity analytů ve dvoufázovém systému – rozdílné distribuce analytů mezi mobilní fází (BGE) a tzv. pseudostacionární fází, která je také pohyblivá. Jako pseudostacionární fáze se do BGE nejčastěji přidávají povrchově aktivní látky (tenzidy), které po dosažení tzv. kritické micelární koncentrace samovolně agregují a tvoří shluky – micely. Elektromigrační technika se pak nazývá kapilární micelární elektrokinetická chromatografie. Tenzid může být nenabitý, kladně, nebo záporně nabitý, a pro enantioselektivní separace musí být chirální [3, 11, 14, 31].

Kapilární elektrochromatografie (CEC)

Kapilární elektrochromatografie (CEC) je stejně jako CEKC hybridní kapilární elektromigrační technikou na pomezí rozdělovací chromatografie a kapilární elektroforézy. Umožňuje separovat elektroneutrální i ionogenní látky. Princip CEC je analogický ke kapilární kapalinové chromatografii s tím rozdílem, že jako hnací sílu využívá EOF kapaliny a separace analytů probíhá v elektrickém poli. Na rozdíl od CEKC se v CEC používá pravá nepohyblivá stacionární fáze. Chirální separace pomocí CEC probíhá v náplňové nebo povrchově-modifikované kapilární koloně. Náplňová kolona je v podstatě separační kapilára naplněná inertní chromatografickou stacionární fází, na kterou je adsorbován či kovalentně navázán CS. V povrchově modifikované kapilární koloně je CS upevněn na vnitřní stěnu kapiláry. Jedná se tedy CSP [11, 14, 15, 32-34].

3.4 Chirální selektory v kapilární elektroforéze

V chirální CE se k separaci enantiomerů používá metoda přímá. Chirální selektor, respektive diskriminátor, je přidán jako aditivum do BGE a musí v něm být dobře rozpustný. Musí být chemicky i chirálně stabilní, a to jak v pevném stavu, tak i po rozpuštění v BGE. Nesmí dojít ke spontánní samovolné racemizaci CS. Ideální CS je univerzální a zároveň vysoce selektivní. Nemělo by docházet k jeho adsorpci na vnitřní stěnu separační kapiláry. Interakce CS s analytem by neměly výrazně snižovat účinnost ani rychlost separace. Důležitá je také kompatibilita CS s použitým detektorem. Důležitými faktory pro výběr vhodného chirálního aditiva jsou také jeho finanční dostupnost a netoxicity. Prostorová struktura analytu a CS a typ přítomných funkčních skupin má zásadní vliv na mechanismus chirálního rozpoznání, a tím i enantioselektivitu separace. U CS se uplatňují různé enantioseparační mechanismy chirálního rozpoznávání – např. ligandová výměna, inkluzní komplexace, afinitní interakce, iontově párové interakce. Z nekovalentních mezimolekulových interakcí se uplatňují vodíkové můstky, π - π interakce, hydrofobní interakce, elektrostatické interakce, stericke repulzní síly a další. Nejpoužívanější chirální aditiva v chirální CE, jejich typické mezimolekulové interakce a mechanismy chirálního rozpoznávání jsou uvedeny v tabulce 2 [3, 4, 10, 11].

Tab. 2 Nejdůležitější chirální selektory používané v CE [10, 35].

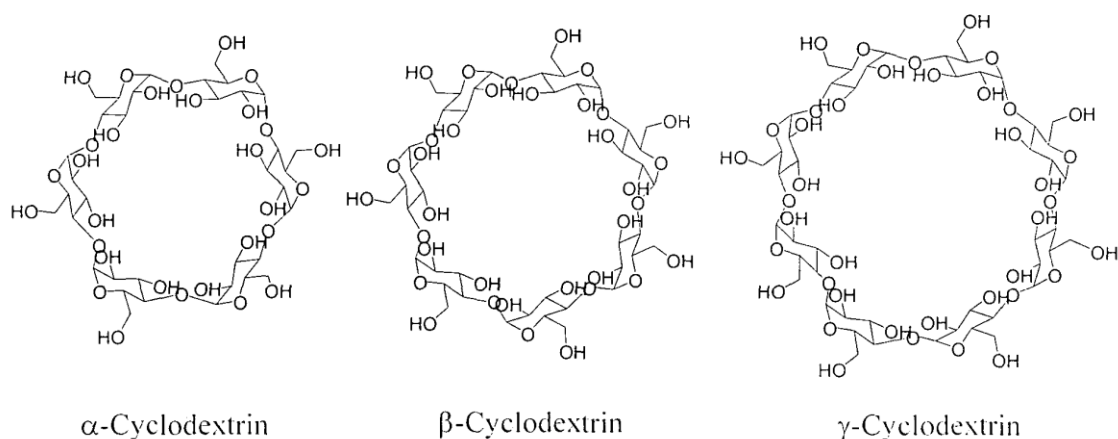
Chirální selektor	Interagující část analytu (blízko stereogenního centra)	Mechanismus	Převládající (primární) interakce	Typická koncentrace v BGE
Cyklodextriny	hydrofobní skupiny a vodíkové můstky	inkluzní komplexace	vodíkové můstky	1-5 %
Polysacharidy	hydrofobní skupiny a vodíkové můstky	inzerce do helikálních struktur	vodíkové můstky, dipolární, stérické	1-10 %
Crown ethery	primární aminoskupina	inkluzní komplexace	ion-dipól	5-10 mmol/L
Chirální komplexy kovů	dva heteroatomy	ligandová výměna	elektrostatické, ion-dipól	1-80 mmol/L
Proteiny	hydrofobní skupiny a vodíkové můstky	mnoho vazebných míst	různé	0,1-1 mmol/L
Makrocyclická antibiotika	hydrofobní skupiny a vodíkové můstky	mnoho vazebných míst	různé	2-20 mmol/L

3.4.1 Cyklodextriny

Cyklodextriny (CD) v současné době představují nejpoužívanější CS v elektromigračních separačních metodách. Z chemického hlediska jsou to cyklické oligosacharidy tvořené různým počtem D-glukopyranózových jednotek, které jsou navzájem propojeny α -(1,4)-glykosidickými vazbami. Podle počtu glukopyranózových jednotek se nativní CD rozdělují na α -, β -, respektive γ -CD, které obsahují 6, 7, respektive 8 jednotek

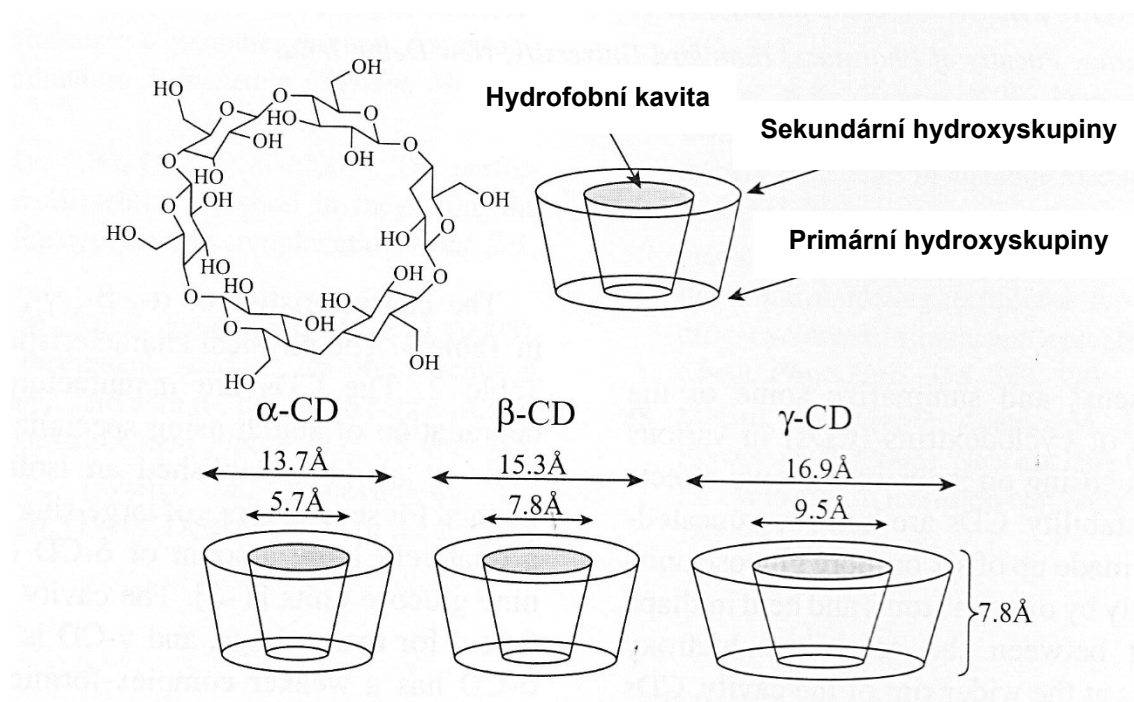
glukopyranózy. Nativní CD jsou elektroneutrální. Cyklodextriny se získávají částečným enzymovým štěpením škrobu [3, 4, 36-38].

Cyklodextriny tvoří dutý komolý kužel s hydrofobní dutinou (kavitou) a hydrofilním vnějším povrchem, struktura molekul CD a schéma kavity jsou na obrázcích 4 a 5. Z širší části dutiny vyčnívají z poloh 2 a 3 na glukopyranózových zbytcích sekundární hydroxyskupiny, zatímco z užší části dutiny vyčnívají primární hydroxyskupiny z polohy 6. Kavita všech tří nativních CD má stejnou hloubku, ale různou šířku. Chirální rozpoznávání je založeno zejména na inkluzi hydrofobní části analytu do kavity CD (inkluzní komplexace). Velikost kavity je proto důležitá pro mechanismus chirálního rozpoznání enantiomerů, neboť stérický faktor (tvar a velikost molekuly) ovlivňuje tvorbu inkluzního komplexu. Další důležitou součástí chirálního rozpoznávání u CD je interakce polárních skupin analytu blízkých jeho chirálnímu centru s hydroxyskupinami na povrchu CD (interakce vodíkovými můstky). Podobně důležitá je interakce hydrofobní kavity s hydrofobními částmi analytu (uplatňují se interakce dipól-dipól, Londonovy disperzní a Van der Waalsovy síly). Cyklodextriny mají pro chirální separace řadu výhodných vlastností. Při detekci analytu nedochází k interferenci s CD, neboť CD neabsorbují v UV oblasti. Jsou dostatečně rozpustné v běžně užívaných vodných BGE (kromě nativního β -CD), cenově dostupné, netoxické a stabilní. Nativní β -CD je nejméně rozpustný ve vodě (18,5 g/L při 25 °C) [4, 10, 11, 36-38]. Vybrané vlastnosti nativních CD jsou uvedeny v tabulce 3.



Obr. 4 Struktura nativních α -, β -, γ -cyklodextrinů [39].

Chemickou modifikací (derivatizací) mohou CD získat výhodné vlastnosti. Vhodnou derivatizací lze například zvětšit hloubku kavity nebo zvýšit stabilitu a rozpustnost daného CD ve vodných BGE. Zavedením různých polárních či nepolárních skupin je možné posílit mezimolekulové interakce mezi chirálním analytem a CD. Příkladem neutrálního derivatizovaného CD je např. 2, 3-dimethyl- β -CD. Nativní neutrální CD nelze využít pro separaci nenabitých chirálních analytů. Z tohoto důvodu byly syntetizovány různě derivatizované nabitě CD, které jsou schopny dělit nabitě i nenabitě chirální molekuly. Mezi nabitým CD a opačně nabitým analytem dochází k silnějším interakcím (elektrostatickým). K derivatizaci jsou dostupné hydroxyskupiny v polohách 2, 3 a 6 na glukopyranózových zbytcích. Nejsnáze substitučním reakcím podléhá primární hydroxyskupina v poloze 6. Nabitě CD v ionizovaném stavu migrují během elektroforetické separace s vlastní elektroforetickou pohyblivostí. Nabitě CD lze rozdělit na kladně nabitě, záporně nabitě a amfoterní [3, 4, 36-38].



Obr. 5 Kavita nativních α -, β -, γ -cyklodextrinů [40].

Amfoterní CD mohou být v závislosti na pH prostředí neutrální, kladně nabitě, nebo záporně nabitě. Příkladem může být mono-(6-glutamylamino-6-

deoxy)- β -CD. Lze je využít pro enantioseparaci kyselých, bazických i neutrálních sloučenin [3, 4, 36-38].

Mezi kationické CD patří například různé amino- β -CD. Aminoskupiny na různě dlouhém alkylovém řetězci mohou být primární, sekundární i terciární. Ukázalo se, že substituent na dusíkovém atomu aminoskupiny má významný vliv na enantioselektivitu separace a délka alkylového řetězce hraje roli v mechanismech chirálního rozpoznávání [3]. Další informace o derivatizovaných nabitých CD v pro použití v kapilární elektroforéze lze nalézt v literatuře [41, 42].

Tab. 3 Vybrané vlastnosti nativních α -, β -, γ -cyklodextrinů [11, 36-38].

Parametr/vlastnost	α-cyklodextrin	β-cyklodextrin	γ-cyklodextrin
Relativní molekulová hmotnost	972	1135	1297
Vnitřní průměr kavity [nm]	0,47-0,57	0,60-0,78	0,75-0,95
Vnější průměr kavity [nm]	1,37-1,46	1,53-1,54	1,69-1,75
Hloubka kavity [nm]	0,79	0,79	0,79
Objem kavity [nm ³]	0,174-0,176	0,262-0,346	0,427-0,510
Počet molekul vody v kavitě	5	11	17
Bod tání [K]	551	572	540
Rozpustnost ve vodě při 25 °C [g/L]	145	18,5	232
pK _a rozpětí hydroxylových skupin	12,1-12,6	12,1-12,6	12,1-12,6
Specifická optická rotace	+150,5	+162,0	+177,4
Hustota [g/cm ³]	1,42-1,45	1,42-1,45	1,42-1,45
Počet glukopyranózových jednotek	6	7	8
Počet hydroxylových skupin	18	21	24
Počet primárních hydroxylových skupin	6	7	8
Počet sekundárních hydroxylových skupin	12	14	16

Nejpoužívanější anionické CD jsou některé karboxyalkyl- β -CD, sulfoalkyl- β -CD, sulfatované CD a v menší míře fosfátované CD. Hlavní nevýhodou řady derivatizovaných CD je fakt, že jsou obvykle dostupné jako komplexní směs obsahující různý počet izomerů, které se liší počtem a polohami daných substituentů. Tato skutečnost může vést k málo reprodukovatelným separacím, neboť i nepatrná změna ve struktuře CS může vést ke vzniku různě stabilních komplexů jednotlivých izomerů CS s molekulami chirálního analytu [43, 44]. Komerčně dostupné vysoce sulfatované CD, navzdory své náhodné substituci, vykazaly velkou efektivitu např. při enantioseparaci některých léčiv [45-48]. V jiné práci byla s dobrým výsledkem otestována reprodukovatelnost a robustnost chirálních separací při použití náhodně sulfatovaných CD o vysokém stupni substituce pro chirální analýzu několika léčiv [43]. Analýza komerčně dostupných náhodně sulfatovaných CD o vysokém stupni substituce pomocí MS s elektrosprejovou ionizací, CE a NMR ukázala, že stupeň jejich substituce ve směsi izomerů se příliš neliší [49].

3.5 Konstanta stability komplexu

Míra nekovalentních interakcí mezi molekulami analytu a specifickými molekulami ligandu je kvantifikována fyzikálně-chemickým termodynamickým parametrem – konstantou stability (také vazebná, asociační, komplexační, afinitní konstanta). V chirálních separacích je specifickým ligandem chirální selektor, který s jednotlivými enantiomery daného analytu tvoří přechodné diastereomerní komplexy, jejichž pevnost je dána konstantou stability. Čím je hodnota této konstanty vyšší, tím je komplex pevnější a tedy stabilnější, rychleji vzniká a pomaleji zaniká [5, 13, 24]. Příkladem specifických interakcí může být například interakce enzym-substrát, antigen-protilátka, léčivo-receptor, hormon-inhibitor, a konkrétně v této práci chirální analyt-chirální selektor, respektive enantiomer diquatu-sulfatovaný cyklodextrin [5, 14]. V minulosti byly studovány specifické interakce různých typů látek, např. enzym-inhibitor [50], protilátka-antigen [51], ion kovu-protein [52], protein-léčivo [53], antibiotikum-peptid [54], protilátka-protein [55], hormon-ion kovu [56], DNA-léčivo [57].

Pro studium konstant stability je možné využít různé analytické metody – MS, UV-VIS spektrofotometrii, NMR spektroskopii, kalorimetrii, potenciometrii, chromatografii (nejčastěji HPLC) a techniky CE [27]. Stanovení konstant stability pomocí technik CE se provádí sérií experimentů, ve kterých se koncentrace jedné složky mění a koncentrace druhé složky je konstantní. Konstanty pak lze určit z elektroforetických pohyblivostí či koncentračních poměrů volného a komplexovaného analytu. Podstatou stanovení konstant stability pomocí ACE je analýza rovnovážné směsi chirálního analytu a CS a sledování změny efektivní elektroforetické pohyblivosti chirálního analytu po jeho komplexaci daným CS rozpuštěným v BGE [3, 5, 26-30].

3.5.1 Stanovení konstanty stability pomocí ACE

Schématem lze vznik komplexu analyt-selektor v poměru 1:1 vyjádřit takto:



kde A je analyt, S je chirální selektor a AS je komplex analyt-selektor. Pro takovou komplexotvornou rovnováhu lze vyjádřit zdánlivou konstantu stability K_{AS} :

$$K_{AS} = \frac{[AS]}{[A] \cdot [S]}, \quad (14)$$

kde $[A]$ je rovnovážná molární koncentrace analytu, $[S]$ je rovnovážná molární koncentrace selektoru a $[AS]$ je rovnovážná molární koncentrace komplexu analyt-chirální selektor. Zdánlivá konstanta stability stanovená chirální CE je unikátní nejen pro dvojici analyt-selektor, ale také pro použitý BGE a teplotu separačního prostředí. Termodynamická konstanta stability, K_{AS}^{th} , která zahrnuje aktivity jednotlivých složek prostředí, může být vyjádřena jako:

$$K_{AS}^{th} = \frac{k}{k'} = \frac{a_{AS}}{a_A \cdot a_S} = \frac{[AS]}{[A] \cdot [S]} \cdot \frac{c_A^0 \cdot c_S^0}{c_{AS}^0} \cdot \frac{\gamma_{AS}}{\gamma_A \cdot \gamma_S}, \quad (15)$$

kde k a k' jsou rychlostní konstanty vzniku a zániku komplexu, a_{AS} , a_A a a_S jsou aktivity komplexu analyt-chirální selektor, volného analytu a volného selektoru, c_{AS}^0 , c_A^0 a c_S^0 jsou standardní molární koncentrace komplexu analyt-chirální selektor, volného analytu a volného selektoru (při 25°C, 1013 hPa) a γ_{AS} , γ_A a γ_S jsou aktivní koeficienty komplexu analyt-chirální selektor, volného analytu a volného selektoru. Termodynamickou konstantu stability je obtížné stanovit z důvodu neznámých aktivních koeficientů jednotlivých složek soustavy.

Látka, přítomná v roztoku ve více formách, které jsou navzájem v rychlé dynamické rovnováze, putuje při CE v elektrickém poli jako jediná zóna o určité efektivní elektroforetické pohyblivosti, která je dána součtem pohyblivostí volné a komplexované látky. Tato efektivní pohyblivost může být vyjádřena takto:

$$m_{eff} = \sum_i m_i \cdot \frac{c_i}{c} = \sum_i m_i \cdot x_i, \quad (16)$$

kde m_i je elektroforetická pohyblivost i -té složky přítomné v roztoku v rovnovážné koncentraci c_i , c je celková molární koncentrace dané ionogenní látky a x_i je molární zlomek i -té složky dané ionogenní látky přítomné v roztoku. Z rovnice (14) plyne:

$$c = [A] + [AS] \quad (17)$$

Pokud m_A je elektroforetická pohyblivost volného analytu a m_{AS} elektroforetická pohyblivost analytu (jednoho z enantiomerů) vázaného v komplexu s CS, lze efektivní elektroforetickou pohyblivost analytu A vyjádřit následujícím způsobem:

$$m_{eff,A} = \frac{[A]}{c} \cdot m_A + \frac{[AS]}{c} \cdot m_{AS} \quad (18)$$

Spojením rovnic (14) a (18) dostaneme vztah:

$$m_{eff,A} = \frac{1}{1+K_{AS} \cdot [S]} \cdot m_A + \frac{K_{AS} \cdot [S]}{1+K_{AS} \cdot [S]} \cdot m_{AS} \quad (19)$$

Rovnici lze přepsat do tvaru [5, 13, 24]:

$$m_{eff,A} = \frac{m_A + K_{AS} \cdot [S] \cdot m_{AS}}{1 + K_{AS} \cdot [S]}, \quad (20)$$

kde m_A je pohyblivost analytu bez přítomnosti CS, K_{AS} je zdánlivá konstanta stability komplexu enantiomer analytu-chirální selektor, $[S]$ je molární koncentrace CS, m_{AS} je pohyblivost komplexu enantiomer analytu-chirální selektor. Tento vztah platí pouze, pokud je koncentrace CS v BGE alespoň o jeden až dva řády vyšší než koncentrace chirálního analytu. Tato rovnice může být využita pro nelineární regresní analýzu experimentálně naměřené závislosti efektivních elektroforetických pohyblivostí komplexů analyt-chirální selektor na koncentraci daného CS v BGE [5, 26-30].

V případě chirálních separací je žádoucí, aby rozdíl efektivních pohyblivostí komplexů CS s jednotlivými enantiomery analytu byl co nejvyšší. Z konstant stability těchto komplexů lze vypočítat optimální koncentraci CS následujícím způsobem:

$$[S]_{opt} = \frac{1}{\sqrt{K_{AS1} \cdot K_{AS2}}}, \quad (21)$$

kde $[S]_{opt}$ je optimální molární koncentrace CS v BGE a K_{AS1} a K_{AS2} jsou konstanty stability jednotlivých enantiomerů chirálního analytu [5].

3.5.2 Další metody (A)CE pro stanovení konstant stability

Stanovení konstant stability metodami CE má několik výhod – vysoká separační účinnost, rozlišení i rychlost analýzy a z důvodu specifických interakcí i selektivita. Je možné kvantifikovat i velmi slabé interakce a pro stanovení stačí malé množství vzorku. V CE existuje několik metod pro stanovení konstant stability, patří mezi ně již zmíněná ACE, přesněji označeno MS-ACE – ACE založená na změně pohyblivosti („mobility shift“) buď analytu, nebo selektoru. Další metody jsou pak od ACE odvozeny – PF-ACE („partial-filling“ ACE), Hummel-Dreyerova metoda (HD), metoda vakantního píku (VP), frontální analýza spojená s CE (FACE), kontinuální frontální analýza spojená s CE (CFACE) a některé další. Vybrané metody CE používané pro stanovení konstant stability komplexů (nejen) enantiomerů s CS jsou stručně shrnuty v tabulce 4. Podrobnější informace o zmíněných a dalších metodách lze nalézt v literatuře [5, 24, 26, 27, 29, 53, 58, 59].

Tab. 4 Vybrané metody kapilární elektroforézy pro stanovení konstant stability [5, 26, 58, 60].

Metoda	Vzorek (analyty)	BGE	Parametr pro stanovení K_{AS}
MS-ACE	A + marker EOF S + marker EOF	separační pufr + A separační pufr + S	změna pohyblivosti A změna pohyblivosti S
PF-ACE	A + marker EOF	separační pufr + S	změna migračního času A
HD	separační pufr +A+S	separační pufr +A (nebo S)	plocha vakantního píku odpovídá [AS]
VP	separační pufr	separační pufr +A+S	plocha vakantního píku odpovídá [A]
FACE	separační pufr +A+S	separační pufr	výška píku odpovídá [A]
CFACE	separační pufr +A+S	separační pufr	výška píku odpovídá [A]

A-analyt, S-selektor

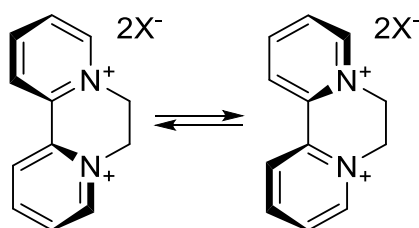
3.6 Diquaty

Základní molekula – diquat (DQ) – od které jsou odvozeny látky analyzované v této práci, je známa od roku 1958, kdy byla v podobě dibromidu představena jako silný a rychle účinkující herbicid. Diquat dibromid, neselektivní kontaktní herbicid, působí jako desikant a defoliant pouze na zelenou část rostliny, na kterou je ve formě postřiku aplikován [61]. Způsobuje degradaci buněčných biomembrán a snižuje fotosyntetickou aktivitu rostliny [62, 63]. Achirální identifikace a stanovení diquatu dibromidu jako herbicidu byly v minulosti provedeny např. pomocí HPLC-MS [64] nebo voltametriky [65]. Chirálně DQ a jeho deriváty zatím ještě nebyly dostatečně analyzovány [66].

Diquaty jsou N-heteroaromatické dikationty obsahující ve své struktuře skelet 2,2'-bipyridinu. Deriváty DQ jsou zajímavé především ze dvou hledisek. Přítomností dvou kvartérních atomů dusíku zabudovaných do aromatických jader je vytvořen elektronově deficitní systém s velkým elektron-akceptorovým potenciálem. Důsledkem jsou elektrochemické redoxní vlastnosti, které představují jeden z možných směrů využití DQ. Bipyridinový skelet může v závislosti na oxidačně-redukčních podmínkách okolního prostředí existovat v podobě dikationtu, kationradikálu, či v neutrální podobě [7, 8, 66-70]. Tato práce se zabývá druhým zajímavým aspektem derivátů DQ, a tím je jejich chiralita. Diquaty vykazují chiralitu méně obvyklou, a to axiální. Axiální chiralita je dána přítomností chirální asymetrické osy, viz obrázek 6. Diquaty neobsahují chirální asymetrický atom. U axiální chiralitě označujeme absolutní konfiguraci jednotlivých enantiomerů přiřazením stereodeskriptorů R_a a S_a , anebo M (minus, levotočivý) nebo P (plus, pravotočivý) [7, 8, 66-70]. Molekulární struktury analyzovaných derivátů DQ jsou uvedeny na obrázku 7 a jejich systematické chemické názvy v tabulce 5.

Výzkum neracemických derivátů DQ je podmíněn dostupností rychlé a spolehlivé separační metody poskytující vysokou separační účinnost a rozlišení enantiomerů. Vzhledem k přítomnosti kvarterních atomů dusíku a dvojnásobnému kladnému náboji jsou polární molekuly DQ nabitě v celém rozsahu pH, dobře rozpustné ve vodných roztocích, a tedy vhodné k analýze

pomocí CZE. Aromatická struktura DQ je odpovědná za absorpci elektromagnetického záření v UV oblasti spektra, což umožňuje přímou UV detekci při vlnové délce 200 nm.



Obr. 6 Znázornění axiální chiralitě bipyridinového skeletu diquatů (vyznačeny *M*- a *P*-enantiomery).

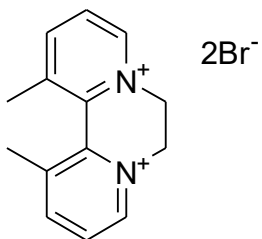
Vzhledem k uvedeným vlastnostem deriváty DQ nacházejí uplatnění například jako stavební jednotky v supramolekulární chemii, katalyzátory elektronového přenosu, barviva, herbicidy, redoxní indikátory, DNA interkalátory, molekulární zařízení a zařízení pro nelineární optiku [7, 8, 66-70].

Tab. 5 Systematické chemické názvy analyzovaných struktur racemických derivátů diquatů (s uvedeným protiiontem).

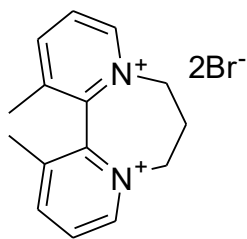
DQ	Systematický název struktury
1	1,12-dimethyl-6,7-dihydrodipyrido[1,2-a:2',1'-c]pyrazin-5,8-diium dibromid
2	1,13-dimethyl-7,8-dihydro-6H-dipyrido[1,2-a:2',1'-c][1,4]diazepin-5,9-diium dibromid
3	1,14-dimethyl-6,7,8,9-tetrahydrodipyrido[1,2-a:2',1'-c][1,4]diazocin-5,10-diium dibromid
4	1,16-dimethyl-6,11-dihydrobenzo[f]dipyrido[1,2-a:2',1'-c][1,4]diazocin-5,12-diium dibromid
5	6,11-dihydrobenzo[f]dipyrido[1,2-a:2',1'-c][1,4]diazocin-5,12-diium dibromid
6	2,15-dimethyl-6,11-dihydrobenzo[f]dipyrido[1,2-a:2',1'-c][1,4]diazocin-5,12-diium dibromid
7	1,16-dikarboxy-6,11-dihydrobenzo[f]dipyrido[1,2-a:2',1'-c][1,4]diazocin-5,12-diium dibromid
8	4,13-dimethyl-6,11-dihydrobenzo[f]dipyrido[1,2-a:2',1'-c][1,4]diazocin-5,12-diium dibromid
9	1,2,15,16-tetramethyl-6,11-dihydrobenzo[f]dipyrido[1,2-a:2',1'-c][1,4]diazocin-5,12-diium bis(trifluoromethansulfonát)
10	5,20-dihydrobenzo[6,7][1,4]diazocino[2,1-a:3,4-a']diizochinolin -6,19-diium dibromid
11	1,4,13,16-tetramethyl-6,11-dihydrobenzo[f]dipyrido[1,2-a:2',1'-c][1,4]diazocin-5,12-diium dibromid

Obr. 7 Molekulární struktury analyzovaných derivátů diquatu.

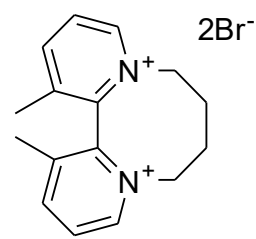
DQ 1 ($M_r=372,1$)



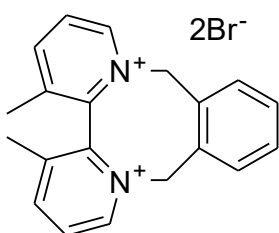
DQ 2 ($M_r=386,1$)



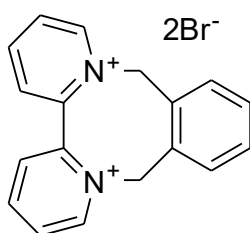
DQ 3 ($M_r=400,2$)



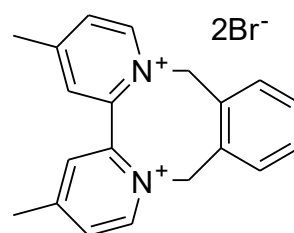
DQ 4 ($M_r=448,2$)



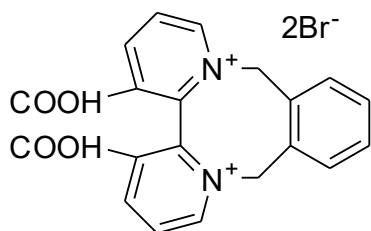
DQ 5 ($M_r=420,2$)



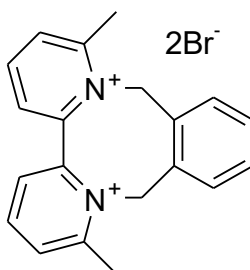
DQ 6 ($M_r=448,2$)



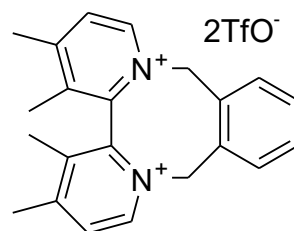
DQ 7 ($M_r=508,2$)



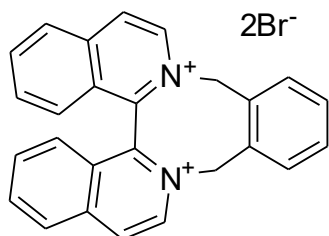
DQ 8 ($M_r=448,2$)



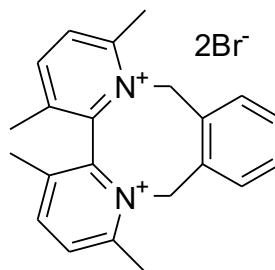
DQ 9 ($M_r=614,6$)



DQ 10 ($M_r=520,3$)



DQ 11 ($M_r=476,3$)



4 Experimentální část – použité materiály, přístroje a pomůcky

4.1 Použité chemikálie

Všechny použité chemikálie dosahovaly stupně čistoty p. a. a byly dodány/vyrobeny těmito společnostmi:

Deionizovaná voda, úprava pomocí zařízení Millipore Milli-Q® Synthesis A10® (Merck spol. s r.o., Praha, Česká republika) pro přípravu ultračisté vody filtrací a deionizací.

Dimethylsulfoxid, Lachema, a.s., Brno-Neratovice, Česká republika

Kyselina sírová, 96%, Penta, s.r.o, Praha, Česká republika

Kyselina fosforečná, 85%, Lachema, a.s., Brno-Neratovice, Česká republika

Hydroxid sodný, Agilent Technologies, Waldbronn, Německo

Hydroxypropylcelulóza, $M_r \approx 100\ 000$, Sigma-Aldrich®, Steinheim, Německo

HS- α -cyklodextrin hydrát sodné soli, Sigma-Aldrich®, Steinheim, Německo

HS- β -cyklodextrin sodná sůl, Sigma-Aldrich®, Steinheim, Německo

HS- γ -cyklodextrin, 20% (*m/v*), Beckman Coulter, Brea, Kalifornie, USA

4.2 Analyzované látky

Vzorky jedenácti racemických DQ (směsi *P*- a *M*- enantiomerů) byly syntetizovány na Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i. Jejich molekulární struktury jsou uvedeny na obrázku 7. V deseti případech z jedenácti se jednalo o dibromidy DQ, zbylý derivát (DQ **9**) obsahoval jako

protiion (bis)trifluoromethansulfonát (2TfO⁻). Byly analyzovány vodné roztoky DQ o koncentraci 0,2 mmol/L, které vznikly odvážením příslušných množství vzorků, jejich rozpuštěním v deionizované vodě a vhodným ředěním. Koncentrace 0,2 mmol/L byla zvolena po optimalizaci tak, aby odezvy detektoru pro separované enantiomery DQ byly přiměřené (do 50 mAU).

4.3 Přístrojové vybavení a experimentální podmínky separací

Všechna měření byla provedena na přístroji pro vysokoúčinnou kapilární elektroforézu – model Agilent Technologies 7100 Capillary Electrophoresis (Agilent Technologies, Waldbronn, Německo). Přístroj je vybaven UV-VIS spektrofotometrickým detektorem s diodovým polem (UV-VIS DAD). Přístroj je plně automatizován, jeho ovládání, sběr dat a jejich zpracování je prováděno pomocí osobního počítače a softwaru OpenLab CE G7100A (Agilent Technologies, Waldbronn, Německo). Data byla zpracována pomocí programů Origin 8.5 (OriginLab Corporation, Friedrichsdorf, Německo), CEval 0.6 [21] (pro korekci migračních časů analytů pomocí HVL funkce) a Microsoft Excel 365 Pro Plus. Vzorky byly naváženy na analytických vahách Scaltec SBC 22 (Scaltec Instruments GmbH, Heiligenstadt, Německo), centrifugovány pomocí centrifugy Z 160 M (Hermle, Wehingen, Německo) a promíchány pomocí vortexu V-1 plus (Biosan, Riga, Litva). pH separačního pufru bylo změřeno přístrojem CyberScan PC 5500 (Thermo Scientific Eutech, Loughborough, Anglie, Velká Británie).

Separace enantiomerů probíhala v křemenné separační kapiláře (Polymicro Technologies, Phoenix, Arizona, USA) s vnějším polyimidovým potahem a s vnitřním povrchem upraveným neutrální hydroxypropylcelulózou pro potlačení sorpce analytů a stabilizaci EOF [71]. Separací kapilára o celkové délce (L_t) 38,5 cm a efektivní délce (L_{eff}) 30 cm měla vnitřní průměr (i.d.) 50 μm , vnější průměr (o.d.) 375 μm a detekční okno bylo vyleptáno pomocí koncentrované H_2SO_4 zahřáté na 130 °C. Kapilára byla před sérií analýz

promývána pět minut vodou a pět minut BGE při tlaku 950 mbar. Mezi jednotlivými analýzami byla kapilára při stejném tlaku promývána BGE po dobu dvou minut. Kazeta s kapilárou byla chlazena vzduchem a karusel se vzorky byl chlazen proudící kapalinou pomocí oběhového termostatu F12-MV (Julabo, Seelbach, Německo), oboje na teplotu 22 °C.

Dávkování vzorků bylo hydrodynamické, tlakem 7 mbar po dobu 10 sekund. Každý z jedenácti racemických DQ byl analyzován třikrát po sobě. Po každém tripletu analýz daného DQ byla stanovena hodnota pohyblivosti EOF metodou podle Williamse a Vigha [17]. Pokud byl aritmetický průměr pohyblivostí EOF stanovených před a po tripletu analýz vyšší než $1 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$, byla pro další analýzu DQ použita nová kapilára čerstvě potažená HPC. Jako marker EOF byl použit roztok dimethylsulfoxidu (DMSO) ředěný BGE tak, aby jeho výsledná hmotnostní koncentrace byla 5 mg/mL.

Detekce analytů probíhala pomocí UV-VIS DAD. Signál detektoru byl zaznamenáván při vlnové délce 200 nm. Při této vlnové délce byly vyhodnoceny všechny provedené analýzy DQ. Vzorkovací frekvence byla nastavena na 20 Hz. Separační napětí bylo zvoleno -12 kV (s tzv. reverzní polaritou – katoda na vstupním konci, anoda na výstupním konci separační kapiláry). Toto napětí vytváří v dané separační kapiláře elektrické pole o intenzitě 312 V/cm. Za daných experimentálních separačních podmínek a při daném složení BGE nepřesahovaly protékající elektrické proudy při analýzách 45 μA , příkony se pohybovaly v hodnotách do 0,6 W.

Jako chirální selektory byly po prostudování literatury [72] použity náhodně sulfatované α -, β - a γ -CD (HS- α -CD, HS- β -CD, HS- γ -CD) s vysokým stupněm substituce. Komerční HS- α -CD a HS- β -CD byly k dispozici v pevné formě, zatímco HS- γ -CD byl dodán ve formě 20% (*m/v*) kapalného roztoku. V BGE byly HS-CD o přibližné molární koncentraci 6 mmol/L, která odpovídá hmotnostní koncentraci 12,2 mg/mL HS- α -CD, 12,5 mg/mL HS- β -CD a 1,5% (*m/v*) HS- γ -CD. Použité náhodně sulfatované CD jsou směsí izomerů, které se liší v počtu a pozicích sulfoskupin vázaných na jednotlivé glukopyranózové jednotky cyklodextrinového skeletu. V předešlých experimentech byla stanovena průměrná M_r těchto HS-CD na 2020, 2100, respektive 2510 a průměrný počet

sulfoskupin na 10,2; 9,5, respektive 11,8 pro molekuly HS- α -, HS- β -, respektive HS- γ -CD [72].

Jako separační pufr byl použit kyselý sodno-fosfátový pufr dle předchozích experimentů s helquaty [72]. Zásobní roztok tohoto pufru obsahoval 70 mmol/L H_3PO_4 a 44 mmol/L NaOH. Hodnota pH byla 2,4 a iontová síla 48,4 mmol/L. Při přípravě BGE s HS- α -CD a HS- β -CD byl tento zásobní roztok sodno-fosfátového pufru ředěn deionizovanou vodou v objemovém poměru 1:1. V takto připraveném sodno-fosfátovém pufru ($c_{NaOH}=22$ mmol/L, $c_{H_3PO_4}=35$ mmol/L, pH 2,5, $I=25,5$ mmol/L) byla následně rozpuštěna navážená množství HS- α -CD a HS- β -CD. Základní elektrolyt s HS- γ -CD byl připraven smícháním daných objemů zásobního roztoku sodno-fosfátového pufru, 20% (*m/v*) roztoku HS- γ -CD a deionizované vody tak, aby vznikl 1,5% (*m/v*) roztok HS- γ -CD v sodno-fosfátovém pufru o molární koncentraci 22 mmol/L NaOH a 35 mmol/L H_3PO_4 . Experimentální podmínky separací jsou shrnuty v tabulce 6.

Tab. 6 Experimentální podmínky separace enantiomerů racemických DQ 1-11.

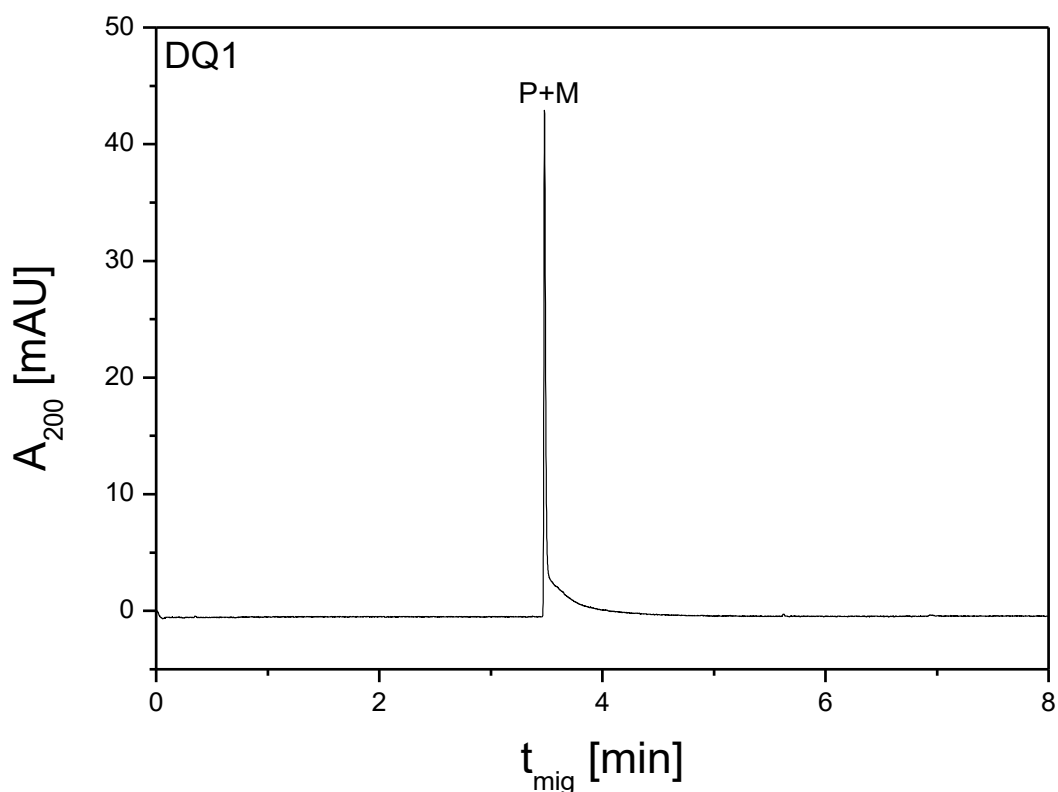
Separační kapilára	křemenná, $L_t=38,5$ cm, $L_{eff}=30$ cm, i.d.=50 μ m, o.d.=375 μ m, kovalentní modifikace povrchu vnitřní stěny – neutrální HPC úprava
Separační pufr	22 mmol/L NaOH, 35 mmol/L H_3PO_4 , pH=2,5, $I=25,5$ mmol/L
Chirální selektor	HS- α -CD, nebo HS- β -CD, nebo HS- γ -CD s vysokým stupněm substituce, přibližná $c=6$ mmol/L
Marker EOF	5 mg/mL roztok DMSO v sodno-fosfátovém pufru
Dávkování	hydrodynamické 7 mbar · 10 s
Detekce	UV-VIS DAD, záznam při $\lambda=200$ nm, vzorkovací frekvence 20 Hz
Teplota kazety s kapilárou a karuselu se vzorky	22 °C
Separační napětí	konstantní, -12 kV, katoda na vstupu
Vzorky	0,2 mmol/L vodné roztoky racemických diquatů (celkem 11 různě substituovaných derivátů)

5 Výsledky a diskuze

Pro chirální separaci helquatů (helically extended diquats) [72], jež jsou helikální molekuly nesoucí stejný strukturní motiv jako DQ (dvojnásobný kladný náboj na kvartérních atomech dusíků zabudovaných do aromatických jader), se jako CS osvědčily náhodně sulfatované α -, β - a γ -CD s vysokým stupněm substituce. U většiny testovaných dikationických helquatů bylo v přítomnosti záporně nabitých HS-CD jako CS dosaženo výborné enantioselektivní separace s vysokým rozlišením. V těchto předchozích experimentech byly pro enantioseparaci helquatů vyzkoušeny také nativní α -, β - a γ -CD a derivatizované elektroneutrální 2-hydroxypropyl- β -CD, 2-hydroxypropyl- γ -CD a 2,3-dimethyl- β -CD. V přítomnosti těchto CS k separaci helquatů nedošlo. Také byl testován anionický CS karboxymethyl- β -CD, který sice vykázal určitou enantioselektivitu, ale píky enantiomerů byly rozmyté a rozlišení nízká. Na základě strukturní podobnosti molekul derivátů DQ s helquaty byly v provedených experimentech použity uvedené komerčně dostupné HS- α -, HS- β - a HS- γ -CD. Nejprve byla otestována separační efektivita těchto selektorů a následně byla charakterizována síla jejich interakcí s DQ. Byly zhodnoceny a diskutovány rozlišení, faktory selektivity, počty teoretických pater, efektivní elektroforetické pohyblivosti, migrační časy a konstanty stability.

5.1 Achirální analýza diquatů

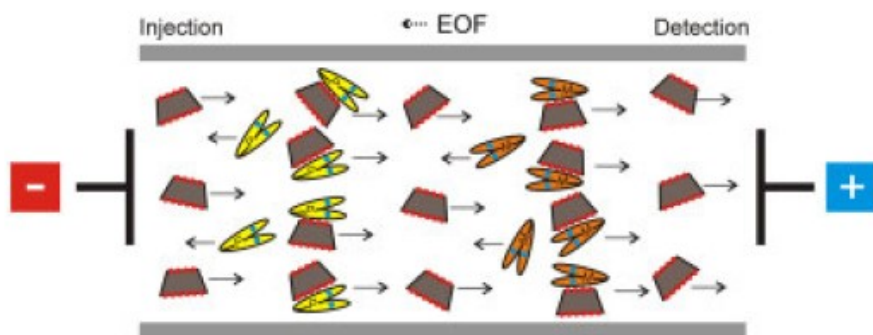
Nejprve byla pro dosažení přiměřené odezvy detektoru na analyty optimalizována koncentrace dávkovaných vzorků racemických DQ na 0,2 mmol/L. Následně byly DQ analyzovány v BGE bez přídavku CS obsahujícím 22 mmol/L NaOH a 35 mmol/L H₃PO₄, (pH=2,5, I=25,5 mmol/L) a při separačním napětí s polaritou +12 kV. Diquaty putovaly jako kationty s průměrným migračním časem 4,20 min a průměrnou efektivní elektroforetickou pohyblivostí $38,1 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ jako jediný pík a k oddělení enantiomerů nedošlo. Ukázka elektroforegramu analýzy racemického DQ **1** v sodno-fosfátovém pufru je na obrázku 8.



Obr. 8 Analýza racemického diquatů **1** v sodno-fosfátovém pufru bez přídavku chirálního selektoru.

5.2 Chirální separace diquatů

Na základě předchozích experimentů s helquaty byly použity HS- α -, HS- β -a HS- γ -CD o přibližné molární koncentraci 6 mmol/L. Racemické DQ jsou dvojnásobně kladně nabitě a v BGE bez přídavku HS-CD po vložení separačního napětí +12 kV migrují ke katodě. V přítomnosti HS- α -CD, HS- β -CD, nebo HS- γ -CD jako chirálního selektoru po vložení separačního napětí s reverzní polaritou -12 kV enantiomery dikationického DQ v důsledku elektrostatických interakcí s několikanásobně záporně nabitými HS-CD (obsahují průměrně 10-12 sulfoskupin) migrují proti slabému katodickému EOF směrem k anodě a detektoru jako komplexy o výsledném záporném náboji. Tento jev je vyobrazen schématem na obrázku 9.



Obr. 9 Schéma elektroforetické separace enantiomerů DQ v komplexech s HS-CD [72].

Významné elektrostatické interakce mezi kvarterními atomy dusíku DQ a sulfoskupinami HS-CD jsou jedním z interakčních mechanismů mezi těmito molekulami, ale pro chirální diskriminaci enantiomerů nejsou rozhodující. V mechanismu chirálního rozpoznávání hraje zásadní roli prostorová struktura. Pro chirální diskriminaci je v případě HS-CD jako CS důležitá tvorba inkluzního komplexu, tedy zanoření enantiomerů DQ do hydrofobní kavity HS-CD s různou afinitou. Vznik inkluzního komplexu závisí na sterickém uspořádání – velikosti a tvaru molekul DQ i HS-CD. Efektivní elektroforetické pohyblivosti analytů byly vypočteny použitím rovnic (4), (6) a (7). Faktory selektivity byly spočteny jako podíly efektivních elektroforetických pohyblivostí enantiomerů

daných DQ. Rozlišení a počet teoretických pater byly vypočteny softwarem OpenLab CE G7100A přímo z elektroforegramů.

5.2.1 Elektroforetická separace enantiomerů derivátů diquatu při použití HS- α -CD jako chirálního selektoru

Elektroforegramy chirální CE separace *M*- a *P*-enantiomerů jedenácti racemických derivátů DQ v přítomnosti HS- α -CD jako chirálního selektoru jsou zobrazeny v levé části obrázků 10 a 11 (str. 55-56). Vybrané separační parametry jsou uvedeny v tabulkách 7 a 10. Identifikace jednotlivých *M*- a *P*- enantiomerů byly provedeny pouze pro tři deriváty DQ (**4**, **7** a **9**) (viz diskuze na str. 59-60). Migrační časy enantiomerů se pohybovaly v rozmezí 3,88 až 5,96 min, s průměrnou hodnotou 4,12 min pro první migrující enantiomery a průměrnou hodnotou 4,36 min pro druhé migrující enantiomery. S nejnižším migračním časem migrovaly enantiomery DQ **4** a **5**. S nejvyšším migračním časem migrovaly enantiomery DQ **7** a **3**. Absolutní hodnoty efektivních pohyblivostí enantiomerů se pohybovaly v rozmezí $27,10 \cdot 10^{-9}$ až $41,55 \cdot 10^{-9}$ $\text{m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$, s průměrnou hodnotou $39,34 \cdot 10^{-9}$ $\text{m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ pro první migrující enantiomery a $37,50 \cdot 10^{-9}$ $\text{m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ a pro druhé migrující enantiomery. Nejvyšších efektivních pohyblivostí dosáhly enantiomery DQ **5** a **4**. Nejnižších efektivních pohyblivostí dosáhly enantiomery DQ **7** a **3**. Nejvyššího faktoru selektivity s hodnotou 1,38 bylo dosaženo pro enantiomery DQ **7**. Faktory selektivity pro zbylé separované enantiomery DQ si byly velmi podobné, s rozmezím 1,02 až 1,05. Rozlišení píků separovaných enantiomerů DQ se pohybovala v rozmezí 2,58 až 27,5, s průměrnou hodnotou 6,94 a střední hodnotou 4,21. Nejvyšší hodnoty rozlišení píků bylo dosaženo pro enantiomery DQ **7**. Nejnižších hodnot rozlišení separovaných píků bylo dosaženo pro enantiomery DQ **10** a **9**. U DQ **8** a **11** nebylo dosaženo chirální separace, faktory selektivity byly tedy 1,0 a rozlišení 0,0. Počet teoretických pater se pohyboval v rozmezí $120,3 \cdot 10^3$ až $405,7 \cdot 10^3$, s průměrnou hodnotou $220,5 \cdot 10^3$ pro první migrující enantiomery a $269,1 \cdot 10^3$ pro druhé migrující enantiomery.

Tab. 7 Migrační časy (t_{mig}), efektivní elektroforetické pohyblivosti (m_{eff}), počty teoretických pater (N), faktory selektivity (α) a rozlišení (R_s) CE separace diquatů při použití HS- α -CD jako chirálního selektoru.

DQ	$t_{mig1} \pm SD$ [min]	$t_{mig2} \pm SD$ [min]	$(m_{eff1} \pm SD) \cdot 10^9$ [m ² V ⁻¹ s ⁻¹]	$(m_{eff2} \pm SD) \cdot 10^9$ [m ² V ⁻¹ s ⁻¹]	$N_1 \cdot 10^{-3}$	$N_2 \cdot 10^{-3}$	α	R_s
1	4,13±0,00	4,34±0,00	-39,19±0,03	-37,27±0,03	318,2	405,7	1,05	7,65
2	4,35±0,01	4,55±0,01	-37,14±0,06	-35,51±0,05	396,5	312,0	1,05	6,30
3	4,52±0,01	4,69±0,01	-35,60±0,05	-34,27±0,05	360,3	339,0	1,04	5,75
4	3,89±0,01	4,00±0,01	-41,22±0,06	-40,05±0,06	128,1	271,9	1,03	3,02
5	3,88±0,01	3,99±0,01	-41,55±0,07	-40,36±0,06	299,1	358,9	1,03	4,21
6	3,96±0,01	4,05±0,01	-40,72±0,07	-39,79±0,07	167,0	296,4	1,02	2,78
7	4,32±0,00	5,96±0,00	-37,30±0,04	-27,10±0,02	148,5	120,3	1,38	27,50
8	4,09±0,01	4,09±0,01	-39,90±0,07	-39,90±0,07	193,5	193,5	1,00	0,00
9	3,96±0,01	4,05±0,01	-40,67±0,09	-39,73±0,08	141,7	263,8	1,02	2,67
10	3,96±0,01	4,05±0,01	-40,66±0,06	-39,72±0,06	135,8	262,5	1,02	2,58
11	4,21±0,02	4,21±0,02	-38,75±0,17	-38,75±0,17	136,3	136,3	1,00	0,00

5.2.2 Elektroforetická separace enantiomerů derivátů diquatů při použití HS- β -CD jako chirálního selektoru

Elektroforegramy chirální CE separace *M*- a *P*-enantiomerů jedenácti racemických derivátů DQ v přítomnosti HS- β -CD jako chirálního selektoru jsou zobrazeny v prostřední části obrázků 10 a 11 (str. 55-56). Vybrané separační parametry jsou uvedeny v tabulkách 7 a 10. Identifikace jednotlivých *M*- a *P*- enantiomerů DQ byla provedena pouze pro tři DQ (**4**, **7** a **9**) (str. 59-60). Diquat **7** nebude srovnáván s ostatními deseti DQ, neboť experimentální podmínky jeho separace se lišily (diskuze na str. 53-54). Migrační časy enantiomerů se pohybovaly v rozmezí 3,95 až 4,73 min s průměrnou hodnotou 4,15 min pro první migrující enantiomery a 4,43 min pro druhé migrující enantiomery. S nejnižším migračním časem putovaly enantiomery DQ **1** a **2**. S nejvyšším migračním časem putovaly enantiomery DQ **11** a **10**. Absolutní hodnoty efektivních pohyblivostí enantiomerů se pohybovaly v rozmezí $33,57 \cdot 10^{-9}$ až $40,76 \cdot 10^{-9}$ $\text{m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$, s průměrnou hodnotou $38,56 \cdot 10^{-9}$ $\text{m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ pro první migrující enantiomery a $36,16 \cdot 10^{-9}$ $\text{m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ pro druhé migrující enantiomery. Nejvyšších efektivních pohyblivostí dosáhly enantiomery DQ **1** a **2**. Nejnižších efektivních pohyblivostí dosáhly enantiomery DQ **11** a **10**. Nejvyššího faktoru selektivity s hodnotou 1,11 bylo dosaženo shodně pro enantiomery DQ **9** a **10**. Nejnižšího faktoru selektivity s hodnotou 1,01 bylo dosaženo pro enantiomery DQ **8**. Rozlišení píků separovaných enantiomerů DQ se pohybovala v rozmezí 1,29 až 15,17 s průměrnou hodnotou 9,23 a střední hodnotou 8,91. Nejvyšších hodnot rozlišení píků bylo dosaženo pro enantiomery DQ **9** a **10**. Nejnižší hodnoty rozlišení separovaných píků bylo dosaženo pro enantiomery DQ **8**, kdy došlo pouze k částečné separaci. Počty teoretických pater se pohybovaly v rozmezí $168,7 \cdot 10^3$ až $479,4 \cdot 10^3$ s průměrnou hodnotou $327,3 \cdot 10^3$ pro první migrující enantiomery a $361,5 \cdot 10^3$ pro druhé migrující enantiomery. Nejvyšší separační účinnosti bylo dosaženo pro druhý migrující enantiomer DQ **1** a druhý migrující enantiomer DQ **2**. Nejnižší separační účinnosti bylo dosaženo pro druhý migrující enantiomer DQ **11** a pro první migrující enantiomer DQ **1**.

Tab. 8 Migrační časy (t_{mig}), efektivní elektroforetické pohyblivosti (m_{eff}), počty teoretických pater (N), faktory selektivity (α) a rozlišení (R_s) CE separace diquatů při použití HS- β -CD jako chirálního selektoru.

DQ	$t_{mig1} \pm SD$ [min]	$t_{mig2} \pm SD$ [min]	$(m_{eff1} \pm SD) \cdot 10^9$ [m ² V ⁻¹ s ⁻¹]	$(m_{eff2} \pm SD) \cdot 10^9$ [m ² V ⁻¹ s ⁻¹]	$N_1 \cdot 10^{-3}$	$N_2 \cdot 10^{-3}$	α	R_s
1	3,95±0,01	4,17±0,01	-40,76±0,07	-38,69±0,07	212,2	479,4	1,05	7,59
2	4,04±0,01	4,32±0,01	-39,89±0,06	-37,29±0,06	267,8	478,3	1,07	10,21
3	4,28±0,01	4,49±0,01	-37,55±0,06	-35,84±0,06	404,7	400,7	1,05	7,51
4	4,06±0,01	4,40±0,01	-39,48±0,07	-36,42±0,07	233,3	335,3	1,08	11,04
5	4,10±0,00	4,31±0,01	-39,06±0,04	-37,15±0,05	404,6	412,1	1,05	7,70
6	4,12±0,01	4,39±0,01	-38,84±0,06	-36,44±0,05	384,4	371,4	1,07	10,11
7	9,13±0,02	17,24±0,06	-17,58±0,05	-9,30±0,03	56,6	45,4	1,89	34,49
8	4,36±0,00	4,39±0,00	-36,62±0,04	-36,32±0,04	372,4	338,4	1,01	1,29
9	4,08±0,00	4,52±0,00	-38,93±0,03	-35,14±0,03	391,4	328,1	1,11	15,17
10	4,12±0,01	4,56±0,01	-38,49±0,08	-34,73±0,07	353,5	302,1	1,11	14,30
11	4,41±0,00	4,73±0,00	-36,00±0,03	-33,57±0,02	248,5	168,7	1,07	7,40

5.2.3 Elektroforetická separace enantiomerů derivátů diquatů při použití HS- γ -CD jako chirálního selektoru

Elektroforegramy chirální CE separace *M*- a *P*-enantiomerů jedenácti racemických derivátů DQ v přítomnosti HS- γ -CD jako chirálního selektoru jsou zobrazeny v pravé části obrázků 10 a 11 (str. 55-56). Vybrané separační parametry jsou uvedeny v tabulkách 9 a 10. Identifikace jednotlivých *M*- a *P*-enantiomerů DQ byla provedena pouze pro tři DQ (**4**, **7** a **9**) (str. 59-60). Diquat **7** nebude srovnáván s ostatními deseti DQ, neboť experimentální podmínky jeho separace se lišily (diskuze na str. 53-54). Migrační časy enantiomerů se pohybovaly v rozmezí 4,30 až 5,40 min s průměrnou hodnotou 4,62 pro první migrující enantiomery a 4,94 min pro druhé migrující enantiomery. S nejnižším migračním časem putovaly enantiomery DQ **6** a **1**. S nejvyšším migračním časem putovaly enantiomery DQ **11** a **10**. Absolutní hodnoty efektivních pohyblivostí enantiomerů se pohybovaly v rozmezí $28,50 \cdot 10^{-9}$ až $36,57,76 \cdot 10^{-9}$ $\text{m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ s průměrnou hodnotou $34,00 \cdot 10^{-9}$ $\text{m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ pro první migrující enantiomery a $31,76 \cdot 10^{-9}$ $\text{m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ pro druhé migrující enantiomery. Nejvyšších efektivních pohyblivostí dosáhly enantiomery DQ **6** a **1**. Nejnižších efektivních pohyblivostí dosáhly enantiomery DQ **11** a **10**. Nejvyššího faktoru selektivity s hodnotou 1,13 bylo dosaženo pro enantiomery DQ **11**. Nejnižšího faktoru selektivity s hodnotou 1,03 bylo dosaženo shodně pro enantiomery DQ **2**, **5** a **8**. Rozlišení píků separovaných enantiomerů DQ se pohybovala v rozmezí 2,82 až 12,47 s průměrnou hodnotou 7,09 a střední hodnotou 5,78. Nejvyšších hodnot rozlišení píků bylo dosaženo pro enantiomery DQ **6** a **9**. Nejnižších hodnot rozlišení separovaných píků bylo dosaženo pro enantiomery DQ **5** a **8**. Počty teoretických pater se pohybovaly v rozmezí $68,0 \cdot 10^3$ až $248,6 \cdot 10^3$ s průměrnou hodnotou $220,8 \cdot 10^3$ pro první migrující enantiomery a $179,1 \cdot 10^3$ pro druhé migrující enantiomery. Nejvyššího počtu teoretických pater bylo dosaženo pro první migrující enantiomer DQ **3** a první migrující enantiomer DQ **4**. Nejnižšího počtu teoretických pater bylo dosaženo pro druhý migrující enantiomer DQ **11** a druhý migrující enantiomer DQ **4**.

Tab. 9 Migrační časy (t_{mig}), efektivní elektroforetické pohyblivosti (m_{eff}), počty teoretických pater (N), faktory selektivity (α) a rozlišení (R_s) CE separace diquatů při použití HS- γ -CD jako chirálního selektoru.

DQ	$t_{mig1} \pm SD$ [min]	$t_{mig2} \pm SD$ [min]	$(m_{eff1} \pm SD) \cdot 10^9$ [m ² V ⁻¹ s ⁻¹]	$(m_{eff2} \pm SD) \cdot 10^9$ [m ² V ⁻¹ s ⁻¹]	$N_1 \cdot 10^{-3}$	$N_2 \cdot 10^{-3}$	α	R_s
1	4,48±0,02	4,64±0,02	-35,20±0,14	-33,98±0,14	196,9	172,7	1,04	3,78
2	4,69±0,01	4,84±0,01	-33,64±0,09	-32,56±0,08	237,7	221,5	1,03	4,28
3	4,86±0,01	5,04±0,01	-32,48±0,08	-31,36±0,08	248,6	229,0	1,04	4,09
4	4,66±0,01	4,99±0,01	-33,85±0,06	-31,59±0,06	240,9	145,5	1,07	7,27
5	4,58±0,01	4,69±0,01	-34,39±0,06	-33,55±0,06	237,6	222,9	1,03	2,82
6	4,30±0,00	4,79±0,00	-36,57±0,03	-32,73±0,03	218,0	212,3	1,12	12,47
7	5,34±0,01	17,27±0,19	-30,06±0,08	-9,29±0,10	45,5	54,2	3,24	59,86
8	4,72±0,00	4,87±0,00	-33,11±0,02	-32,06±0,02	211,3	179,1	1,03	3,40
9	4,53±0,01	5,05±0,01	-34,44±0,05	-30,74±0,04	218,9	176,2	1,12	12,10
10	4,54±0,00	5,07±0,01	-34,21±0,04	-30,54±0,03	209,9	164,1	1,12	11,73
11	4,81±0,01	5,40±0,01	-32,19±0,04	-28,50±0,04	187,7	68,0	1,13	8,95

5.2.4 Porovnání enantioseparací derivátů diquatu v přítomnosti HS- α -CD, HS- β -CD, HS- γ -CD jako chirálních selektorů – shrnutí analýz

Z analýzy získaných dat o separačním chování DQ komplexovaných chirálními selektory HS- α -CD, HS- β -CD a HS- γ -CD lze konstatovat, že enantiomery DQ **1**, **2** a **3** migrovaly s nejvyššími efektivními elektroforetickými pohyblivostmi v přítomnosti HS- β -CD. Tyto DQ ve své struktuře neobsahují žádné další aromatické jádro, kromě dvou z 2,2'-bipyridinového skeletu, a obsahují methylové zbytky ve stejných polohách na tomto skeletu. Odlišují se pouze délkou alifatického řetězce mezi kvarterními atomy dusíku. Enantiomery DQ **4-6** a **8-11** migrovaly s nejvyšší efektivní elektroforetickou pohyblivostí v přítomnosti HS- α -CD. Tyto DQ obsahují ve své struktuře kromě dvou aromatických jader 2,2'-bipyridinového skeletu navíc další aromatické jádro, napojené na čtyřuhlíkatý alifatický zbytek, který propojuje kvarterní atomy dusíku. Nejpomaleji migrovaly všechny enantiomery DQ **1-11** v přítomnosti HS- γ -CD až na jedinou výjimku, kterou byl DQ **7**, kdy jeden jeho enantiomer putoval rychleji při použití HS- γ -CD než při použití HS- β -CD. Diquat **7** bude diskutován dále v textu samostatně (str. 53-54), neboť jeho struktura vynikala přítomností dvou karboxylových skupin, které byly příčinou odlišného elektroforetického separačního chování. Po zhodnocení dosažených separačních výsledků je možné konstatovat, že chirální dělení derivátů DQ v přítomnosti HS-CD až na malé výjimky probíhalo s velkým, až enormním rozlišením, které není pro chirální separace právě typické. Směrodatné odchylky migračních časů a efektivních elektroforetických pohyblivostí komplexů enantiomerů DQ byly velmi malé.

V BGE s přidavkem HS- α -CD jako CS došlo k separaci enantiomerů na základní linii u devíti z jedenácti racemických DQ, tzn. s 82% úspěšností, a ve 44 % těchto případů bylo rozlišení vyšší než 5. V přítomnosti tohoto HS-CD se nepodařilo oddělit pouze enantiomery DQ **8** a **11**. V BGE s přidavkem HS- β -CD jako CS došlo k separaci enantiomerů na základní linii u deseti z jedenácti DQ, tzn. s 91% úspěšností, a zároveň bylo ve všech těchto případech

rozlišení vyšší než 5. U DQ **8** došlo pouze k částečné separaci enantiomerů s rozlišením 1,29. V BGE s přidavkem HS- γ -CD jako CS došlo k úplné separaci enantiomerů u všech jedenácti analyzovaných DQ, tzn. se 100% úspěšností, a v 55 % případů bylo rozlišení vyšší než 5.

Až na jedinou výjimku (DQ **7**) probíhaly separace enantiomerů rychle a analýzy trvaly ve většině případů do pěti minut. Z podobnosti migračních časů jednotlivých enantiomerů všech analyzovaných DQ lze konstatovat, že během jediné analýzy by je současně oddělit nešlo.

Z výsledků separace je patrné, že CS s nejmenším rozměrem kavity, tedy HS- α -CD, nebyl schopen dělit enantiomery DQ **8** a **11**, které obsahují v polohách 4 a 13 na 2,2'-bipyridinovém skeletu methylové zbytky. Je pravděpodobné, že v těchto dvou případech nedošlo kvůli prostorovému uspořádání molekul DQ a HS- α -CD ke vzniku inkluzního komplexu, a nemohl tak být plně uplatněn rozhodující chirálně-diskriminační mechanismus.

Z průměrných hodnot zjištěných separačních parametrů lze obecně konstatovat, že nejrychleji migrovaly DQ v přítomnosti HS- α -CD a nejpomaleji v přítomnosti HS- γ -CD. Nejvyšších hodnot rozlišení pro enantiomery DQ bylo dosaženo v přítomnosti HS- β -CD a nejnižších v přítomnosti HS- α -CD. Faktory selektivity byly podobné, ale nejvyšších bylo dosaženo v přítomnosti HS- β -CD a nejnižších v přítomnosti HS- α -CD. Nejvyšších počtů teoretických pater se dosáhlo v přítomnosti HS- β -CD a nejnižších v přítomnosti HS- γ -CD.

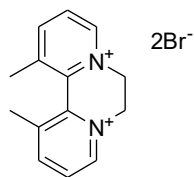
Srovnání separací enantiomerů DQ 7

Separace enantiomerů DQ **7** probíhala v BGE obsahujícím 22 mmol/L NaOH, 35 mmol/L H₃PO₄, (pH=2,5, *I*=25,5 mmol/L) a 6 mmol/L HS- α -CD podobně jako zbytek analyzovaných struktur. Migrační čas prvního migrujícího enantiomeru byl 4,32 min a druhého 5,96 min. Efektivní pohyblivost prvního enantiomeru byla $-37,30 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$ a druhého $-27,10 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$. Odlišná situace nastala při použití tohoto pufru (22 mmol/L NaOH, 35 mmol/L H₃PO₄, pH=2,5, *I*=25,5 mmol/L) s přidavkem HS- β -CD a HS- γ -CD o *c*=6 mmol/L jako CS v BGE. Při těchto analýzách nedošlo k separaci enantiomerů

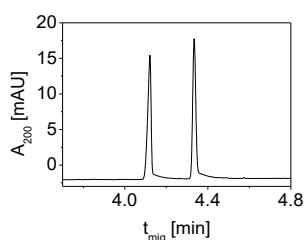
DQ 7 v obdobném časovém rozmezí jako u ostatních struktur. Enantiomery putovaly za těchto experimentálních podmínek (složení BGE) příliš pomalu, a proto bylo třeba analýzu urychlit. Příčinou pomalé migrace byla přítomnost dvou karboxylových skupin vázaných v polohách 1 a 16 na N-heteroaromatických jádrech 2,2'-bipyridinového skeletu DQ 7. Tyto skupiny svou disociací způsobovaly prodloužení migračních časů jednotlivých enantiomerů, neboť snižovaly celkový kladný povrchový náboj tohoto DQ. V důsledku toho se zeslabily elektrostatické síly mezi kvarterními dusíky molekul enantiomerů DQ 7 a sulfoskupinami HS- β -CD a HS- γ -CD. To vedlo k oslabení komplexačních interakcí, snížení efektivních elektroforetických pohyblivosti a migračních časů komplexů enantiomer DQ-HS-CD. Bylo tedy třeba potlačit disociaci karboxylových skupin snížením pH BGE, a tedy změnou složení separačního pufru. Složení pufru bylo upraveno z původních 22 mmol/L na 16 mmol/L NaOH a z původních 35 mmol/L na 50 mmol/L H₃PO₄. Hodnota pH pufru tím klesla z 2,5 na 2,1 a hodnota iontové síly z 25,5 mmol/L na 25,1 mmol/L. Kladněji nabitá molekula DQ 7 pak více elektrostaticky interagovala se záporně nabitými HS-CD a došlo ke zkrácení doby analýzy, která však stále byla ve srovnání s ostatními DQ dlouhá, efektivní pohyblivosti nižší, ale rozlišení velká. Při použití BGE s optimalizovaným složením – nižším pH – došlo v přítomnosti 6 mmol/L HS- β -CD k separaci enantiomerů DQ 7 s rozlišením 34,49, ale s nízkým počtem teoretických pater ($56,6 \cdot 10^3$ a $45,4 \cdot 10^3$). Migrační časy oddělených enantiomerů DQ 7 byly 9,13 min a 17,24 min a efektivní pohyblivosti $-17,58 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ a $-9,30 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$. Při použití stejného pufru, ale přidávkem HS- γ -CD bylo dosaženo ještě vyššího rozlišení, a to 59,86. Migrační časy enantiomerů DQ 7 byly 5,34 min a 17,27 min a efektivní pohyblivosti $-30,06 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ a $-9,29 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$. Porovnání separačních parametrů dosažených při chirální separaci DQ 7 v přítomnosti HS- α -CD, HS- β -CD a HS- γ -CD se nachází v tabulce 10. Elektroforegramy těchto separací jsou v horní části obrázku 11.

Struktura

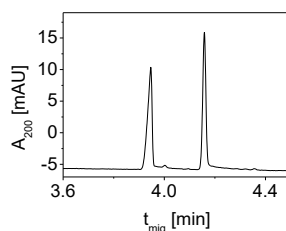
DQ1



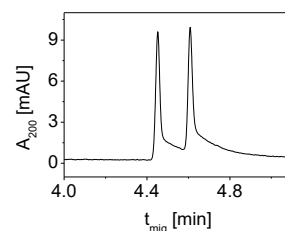
HS- α -CD



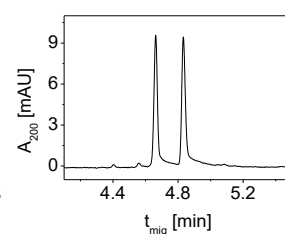
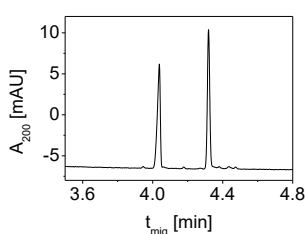
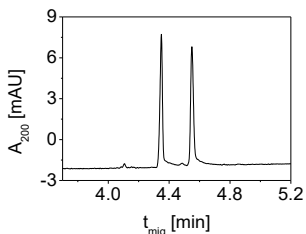
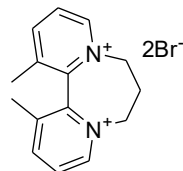
HS- β -CD



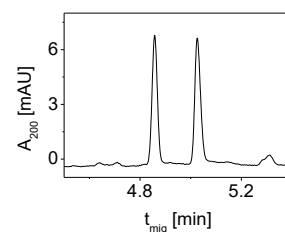
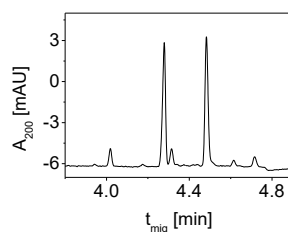
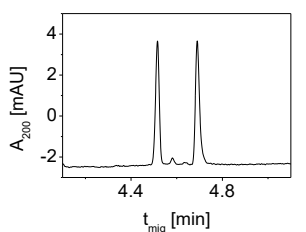
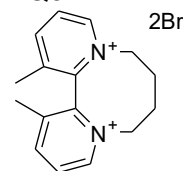
HS- γ -CD



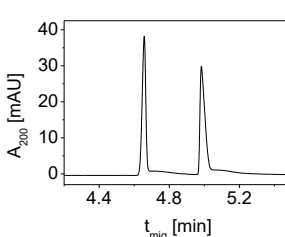
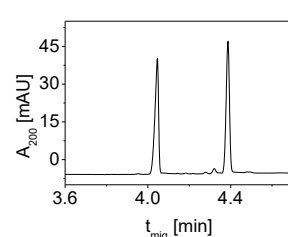
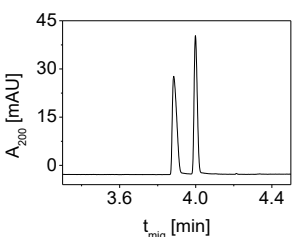
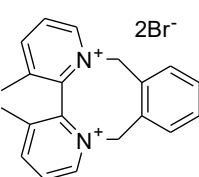
DQ2



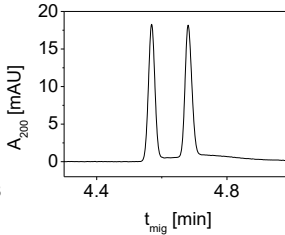
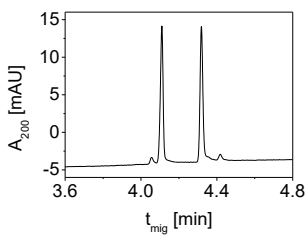
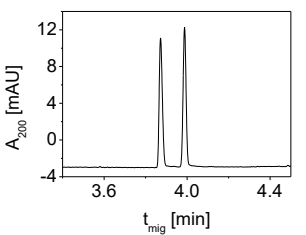
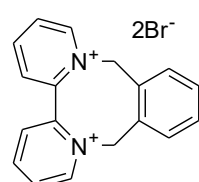
DQ3



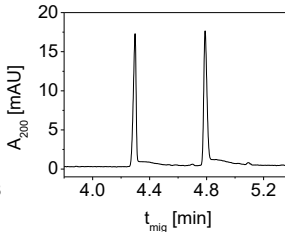
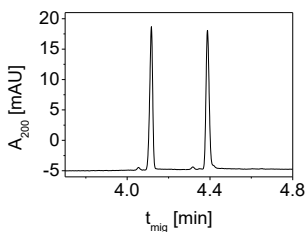
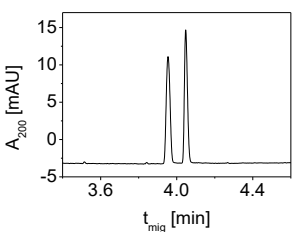
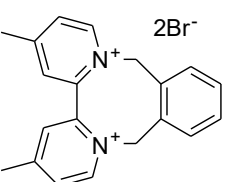
DQ4



DQ5

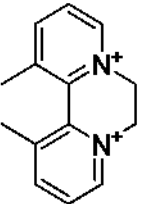
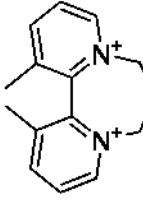
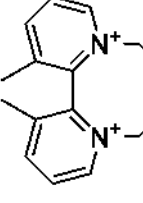
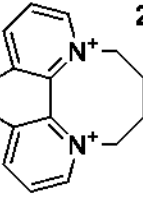
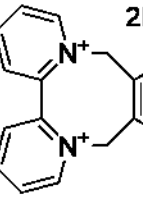


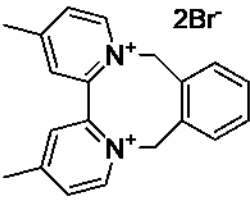
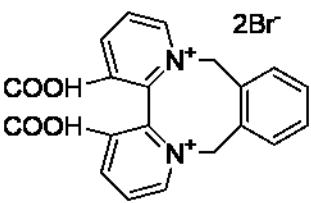
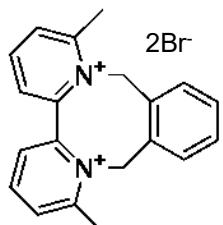
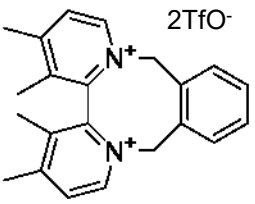
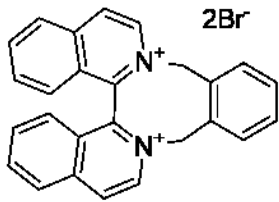
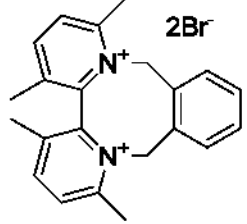
DQ6



Obr. 10 Porovnání separace enantiomerů diquatů 1-6 v při použití HS- α -CD, HS- β -CD a HS- γ -CD jako chirálních selektorů.

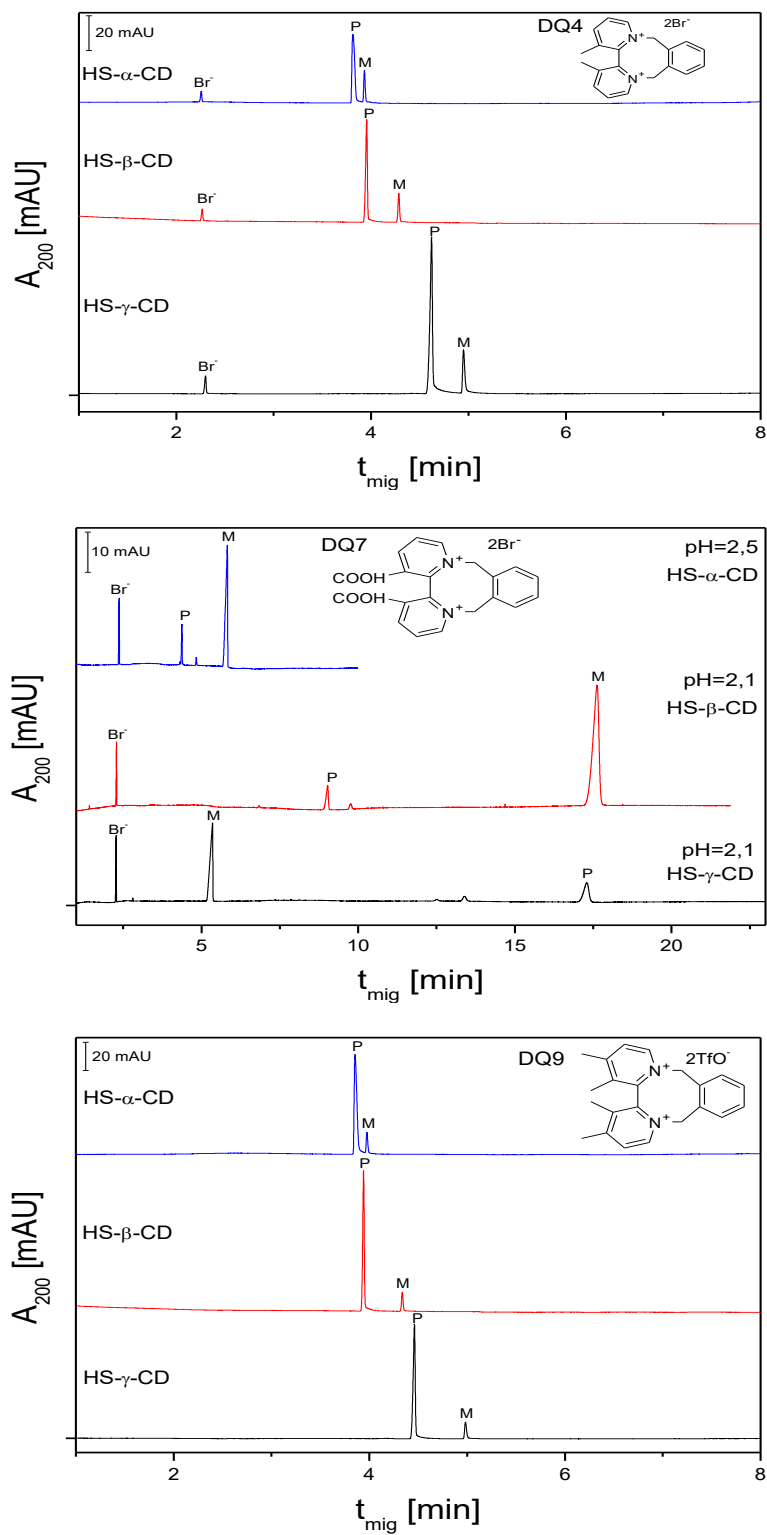
Tab. 10 Srovnání mediánů migračních časů (t_{mig1}), efektivních elektroforetických pohyblivostí (m_{eff1}) a počtů teoretických pater (N_1) prvních migrujících enantiomerů, rozlišení (R_s) a faktorů selektivity (α) elektroforetických separací analyzovaných racemických diquatů **1-11** při použití HS- α -CD, HS- β -CD a HS- γ -CD jako chirálních selektorů.

DQ	Struktura	Separační parametr	Chirální selektor		
			HS- α -CD	HS- β -CD	HS- γ -CD
1		t_{mig1} [min]	4,13	3,95	4,48
		$m_{eff1} \cdot 10^9$ [m ² V ⁻¹ s ⁻¹]	-39,19	-40,76	-35,20
		$N_1 \cdot 10^{-3}$	318,2	212,2	196,9
		R_s [-]	7,65	7,59	3,78
		α [-]	1,05	1,05	1,04
2		t_{mig1} [min]	4,35	4,04	4,69
		$m_{eff1} \cdot 10^9$ [m ² V ⁻¹ s ⁻¹]	-37,14	-39,89	-33,64
		$N_1 \cdot 10^{-3}$	396,5	267,8	237,7
		R_s [-]	6,30	10,21	4,28
		α [-]	1,05	1,07	1,03
3		t_{mig1} [min]	4,52	4,28	4,86
		$m_{eff1} \cdot 10^9$ [m ² V ⁻¹ s ⁻¹]	-35,60	-37,55	-32,48
		$N_1 \cdot 10^{-3}$	360,3	404,7	248,6
		R_s [-]	5,75	7,51	4,09
		α [-]	1,04	1,05	1,04
4		t_{mig1} [min]	3,89	4,06	4,66
		$m_{eff1} \cdot 10^9$ [m ² V ⁻¹ s ⁻¹]	-41,22	-39,48	-33,85
		$N_1 \cdot 10^{-3}$	128,1	233,3	240,9
		R_s [-]	3,02	11,04	7,27
		α [-]	1,03	1,08	1,07
5		t_{mig1} [min]	3,88	4,10	4,58
		$m_{eff1} \cdot 10^9$ [m ² V ⁻¹ s ⁻¹]	-41,55	-39,06	-34,39
		$N_1 \cdot 10^{-3}$	299,1	404,6	237,6
		R_s [-]	4,21	7,70	2,82
		α [-]	1,03	1,05	1,03

DQ	Struktura	Separační parametr	Chirální selektor		
			HS- α -CD	HS- β -CD	HS- γ -CD
6		t_{mig1} [min]	3,96	4,12	4,30
		$m_{eff1} \cdot 10^9$ [m ² V ⁻¹ s ⁻¹]	-40,72	-38,84	-36,57
		$N_1 \cdot 10^{-3}$	167,0	384,4	218,0
		R_s [-]	2,78	10,11	12,47
		α [-]	1,02	1,07	1,12
7		t_{mig1} [min]	4,32	9,13	5,34
		$m_{eff1} \cdot 10^9$ [m ² V ⁻¹ s ⁻¹]	-37,30	-17,58	-30,06
		$N_1 \cdot 10^{-3}$	148,5	56,6	45,5
		R_s [-]	27,50	34,49	59,86
		α [-]	1,38	1,89	3,24
8		t_{mig1} [min]	4,00	4,36	4,72
		$m_{eff1} \cdot 10^9$ [m ² V ⁻¹ s ⁻¹]	-39,90	-36,62	-33,11
		$N_1 \cdot 10^{-3}$	193,5	372,4	211,3
		R_s [-]	0	1,29	3,40
		α [-]	1	1,01	1,03
9		t_{mig1} [min]	3,96	4,08	4,53
		$m_{eff1} \cdot 10^9$ [m ² V ⁻¹ s ⁻¹]	-40,67	-38,93	-34,44
		$N_1 \cdot 10^{-3}$	141,7	391,4	218,9
		R_s [-]	2,67	15,17	12,10
		α [-]	1,02	1,11	1,12
10		t_{mig1} [min]	3,96	4,12	4,54
		$m_{eff1} \cdot 10^9$ [m ² V ⁻¹ s ⁻¹]	-40,66	-38,49	-34,21
		$N_1 \cdot 10^{-3}$	135,8	353,5	209,9
		R_s [-]	2,58	14,30	11,73
		α [-]	1,02	1,11	1,12
11		t_{mig1} [min]	4,05	4,41	4,81
		$m_{eff1} \cdot 10^9$ [m ² V ⁻¹ s ⁻¹]	-38,75	-36,00	-32,19
		$N_1 \cdot 10^{-3}$	136,3	248,5	187,7
		R_s [-]	0	7,40	8,95
		α [-]	1	1,07	1,13

5.2.5 Identifikace vybraných *M*- a *P*-enantiomerů diquatů při použití HS- α -CD, HS- β -CD, HS- γ -CD jako chirálních selektorů

K dispozici byly čtyři neracemické DQ (struktury **4**, **7**, **9**, **11**). Pouze pro DQ **4**, **7** a **9** byla určena absolutní konfigurace daného vykrytalizovaného enantiomeru. Neracemické DQ **4** a **9** byly *P*-enantiomery a neracemický DQ **7** byl *M*-enantiomer. U neracemického DQ **11** nebylo zjištěno, zda se jedná o *M*-, či *P*-enantiomer a pro identifikaci tak nemohl být použit. Byla provedena identifikace *M*- a *P*-enantiomerů DQ **4**, **7** a **9**. Byla analyzována směs 0,2 mmol/L racemátu a 1 mmol/L čistého enantiomeru v objemovém poměru 1:1. Pík s větší intenzitou signálu náležel čistému enantiomeru, neboť byl ve směsi v přebytku. Jak je zřejmé z elektroforegramů na obrázku 12, *P*-enantiomery DQ **4** a DQ **9** migrovaly v přítomnosti všech HS-CD jako první. Oproti tomu *M*-enantiomer DQ **7** migroval při použití HS- α -CD a HS- β -CD jako druhý, ale v HS- γ -CD došlo k záměně migračního pořadí a *M*-enantiomer putoval jako první. Je tedy zřejmé, že migrační pořadí není jednotné a je závislé na struktuře DQ i CS. Při identifikaci *M*- a *P*-enantiomeru DQ **7** byl pro rozpuštění HS- β -CD, respektive ředění HS- γ -CD použit odlišný pufr (pH 2,1, diskutováno na straně 53-54) než pro rozpuštění HS- α -CD (pH 2,5). Porovnání elektroforegramů, které byly využity pro identifikace jednotlivých enantiomerů DQ **4**, **7** a **9** v přítomnosti HS- α -CD, HS- β -CD a HS- γ -CD jako chirálních selektorů, je na obrázku 12.



Obr. 12 Elektroforegramy pro identifikaci *M*- a *P*-enantiomerů diquatů **4**, **7** a **9** v přítomnosti HS-α-CD, HS-β-CD a HS-γ-CD.

5.3 Stanovení zdánlivých konstant stability komplexů diquatů s chirálními selektory HS- α -CD, HS- β -CD a HS- γ -CD

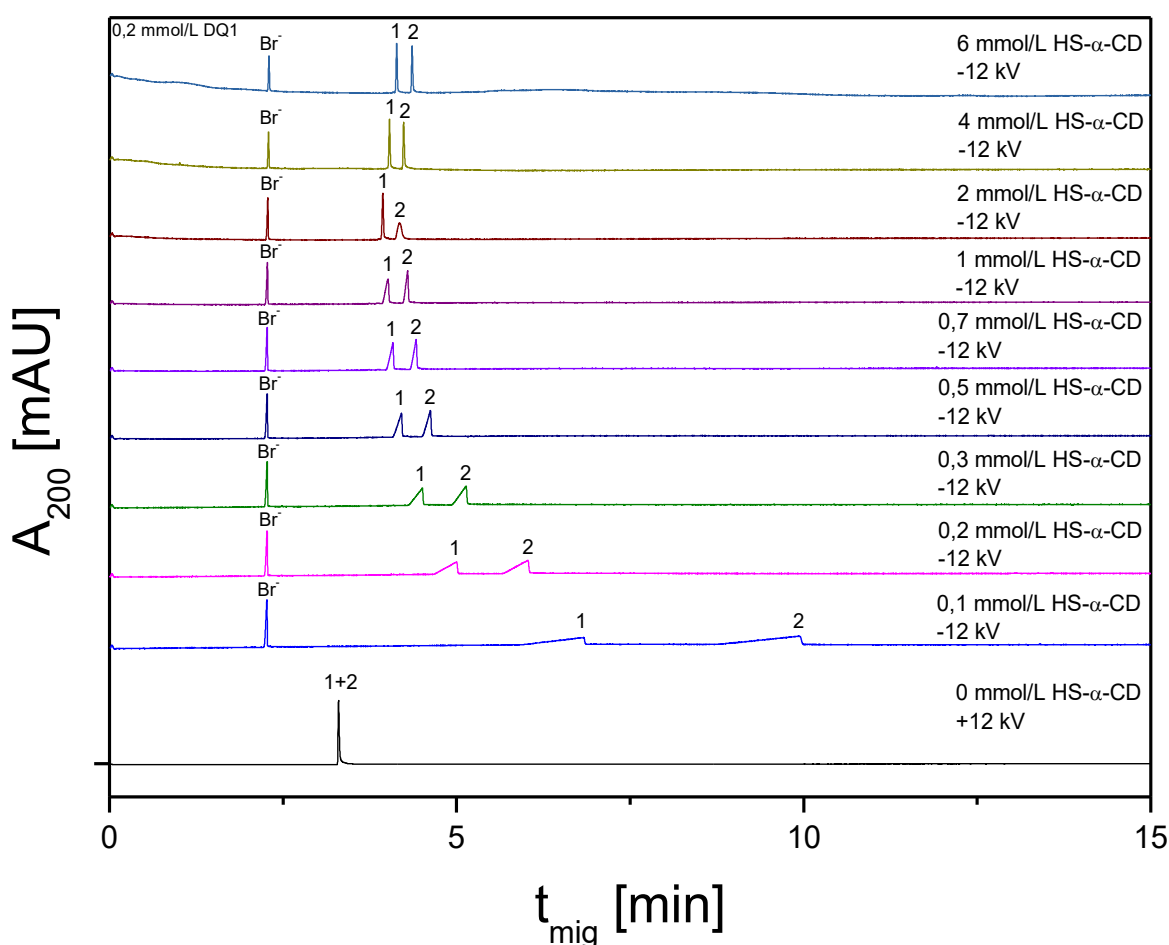
Konstanty stability charakterizují pevnost komplexu vytvořeného mezi chirálním analytem a CS. V chirální CZE, respektive ACE, je možné zdánlivou konstantu stability komplexu enantiomer-chirální selektor určit analyzováním jejich rovnovážné směsi při elektroforetické separaci. Experimentálně zjištěná závislost efektivní elektroforetické pohyblivosti enantiomeru na molární koncentraci CS v BGE se využije pro stanovení zdánlivé konstanty stability metodou nelineární regresní analýzy.

Pro výpočet zdánlivé konstanty stability komplexu analyt-chirální selektor se používá rovnice (20), kterou lze využít jako regresní funkci pro metodu nelineární regresní analýzy [26]:

$$m_{eff,A} = \frac{m_A + K_{AS} \cdot [S] \cdot m_{AS}}{1 + K_{AS} \cdot [S]}, \quad (20)$$

kde $m_{eff,A}$ je experimentálně zjištěná efektivní elektroforetická pohyblivost analytu (enantiomeru), m_A je elektroforetická pohyblivost volného analytu bez přítomnosti CS, K_{AS} je zdánlivá konstanta stability komplexu enantiomer analytu-chirální selektor, $[S]$ je molární koncentrace CS, m_{AS} je pohyblivost komplexu enantiomer analytu-chirální selektor. Elektroforetická pohyblivost volného analytu je dosažitelná experimentálně při nulové koncentraci CS v BGE. Hodnota pohyblivosti m_{AS} se získá nelineární regresní analýzou podle rovnice (20), ve které m_{AS} vystupuje vedle konstanty stability jako druhý stanovovaný parametr. Výše uvedená rovnice platí pouze, pokud je CS v rovnovážné směsi v nadbytku a jeho molární koncentrace v BGE je alespoň o jeden až dva řády vyšší než molární koncentrace analytu. Pohyblivost analytu se při vysoké koncentraci CS rovná pohyblivosti komplexu analyt-selektor, neboť ve velkém přebytku CS je téměř všechen analyt vázán do komplexu s CS [5].

Byly proměřeny závislosti efektivní pohyblivosti DQ na rostoucí koncentraci HS- α -CD, HS- β -CD a HS- γ -CD v BGE. Pro experimentální zjištění těchto závislostí byly zvoleny následující koncentrace CS: 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,5; 0,7; 1; 2; 4 a 6 mmol/L. Ukázka elektroforegramů separací 0,2 mmol/L směsi enantiomerů DQ **1** při jednotlivých koncentracích HS- α -CD jako CS v BGE je na obrázku 13. Kromě porovnání těchto provedených chirálních separací mezi sebou je na tomto obrázku také ukázáno jejich srovnání s achirální analýzou (bez přidavku CS do BGE) daného DQ.



Obr. 13 Ukázka elektroforegramů enantiomerů DQ **1** při různých koncentracích chirálního selektoru HS- α -CD v základním elektrolytu.

Z obrázku 13 je zřejmé, že enantiomery DQ **1** tvořily s HS-CD záporně nabitě komplexy už i při nízkých koncentracích HS- α -CD v BGE (již při 0,05 mmol/L). Z obrázku je dále patrné, že píky komplexů enantiomerů DQ **1** s HS- α -CD byly při nízkých koncentracích tohoto selektoru v BGE velmi

rozmyté (při koncentracích 0,05-0,7 mmol/L) a také putovaly při elektroforetické separaci s nižší efektivní pohyblivostí (při koncentracích 0,05 a 0,1 mmol/L). Separační účinnost roste (disperze píků enantiomerů DQ **1** klesá) s rostoucí koncentrací HS- α -CD v BGE. K rozšiřování zón a deformaci tvaru píků v tomto případě významně přispívá především elektromigrační disperze způsobená komplexotvornými rovnováhami mezi DQ a HS-CD [18, 21]. Z tohoto důvodu byla provedena korekce migračních časů píků komplexů enantiomerů DQ-HS-CD pomocí HVL funkce v programu CEval [21]. Efektivní elektroforetické pohyblivosti byly spočteny z korigovaných migračních časů enantiomerů pomocí MS Excel. Naměřené hodnoty efektivních elektroforetických pohyblivostí byly vyneseny v závislosti na zvyšující se koncentraci chirálních selektorů HS- α -CD, HS- β -CD a HS- γ -CD v BGE. Nelineární regresní analýza získaných dat byla poté provedena pomocí programu Origin 8.5.

Křivky sestojené vynesemím závislosti efektivních pohyblivostí komplexů enantiomerů DQ **1-11** na rostoucích koncentracích HS- α -CD, HS- β -CD a HS- γ -CD v BGE jsou vyobrazeny na obrázcích 14-19 (str. 67-72). Stanovené zdánlivé konstanty stability, pohyblivosti komplexu enantiomer DQ-HS-CD a jejich standardní odchylky, vypočítané programem Origin 8.5 dle rovnice (20), jsou uvedeny v tabulkách 11 a 12 (str. 73-74).

Z křivek na obrázcích 14-19 je patrné, že efektivní elektroforetické pohyblivosti *M*- a *P*-enantiomerů daného DQ jsou v BGE bez přídavku CS kladné a stejné. Dále lze z křivek pozorovat, že v přítomnosti i nízkých koncentrací HS-CD (0,05 mmol/L) se enantiomery DQ **1-11** při elektroforetickém dělení pohybovaly ve formě záporně nabitých komplexů s HS-CD a absolutní hodnota jejich pohyblivosti rostla se zvyšující se koncentrací HS-CD v BGE. Toto však platilo pouze při koncentracích přibližně do 1 mmol/L HS-CD v BGE. Při dalším zvyšování koncentrace HS-CD v BGE docházelo k poklesu absolutních hodnot efektivních pohyblivostí komplexů enantiomerů DQ-HS-CD. U většiny změřených závislostí byly pro stanovení konstant stability pomocí nelineární regresní analýzy zanedbány tyto klesající body odpovídající koncentracím 2, 4 a 6 mmol/L HS- α -CD, HS- β -CD a HS- γ -CD v BGE. Tento krok byl učiněn z toho důvodu, že se stoupající koncentrací několikanásobně záporně nabitých molekul

HS- α -CD, HS- β -CD a HS- γ -CD (přibližně 10-12 náhodně rozmístěných sulfoskupin na glukopyranózových zbytcích derivatizovaného CD skeletu) docházelo k nárůstu iontové síly BGE. Elektrické proudy protékající BGE vzrostly z hodnot kolem 17 μ A u elektrolytů s nulovou koncentrací HS-CD až na hodnoty kolem 40 μ A u BGE s koncentrací 6 mmol/L HS-CD. Příkony vzrostly z hodnot kolem 0,2 W při nulové koncentraci HS-CD v BGE až na hodnoty mezi 0,4-0,5 W při koncentraci 6 mmol/L HS-CD v BGE. Vliv změn teploty, viskozity a iontové síly separačního prostředí byl zanedbán vyloučením uvedených stoupajících bodů křivky. Stanovené zdánlivé konstanty stability pro studované komplexy derivátů DQ s HS- α -CD, HS- β -CD, HS- γ -CD byly obecně velmi vysoké, pohybovaly se v rozmezí $7,8 \cdot 10^3$ dm^3/mol až $547,4 \cdot 10^3$ dm^3/mol . Průměrné hodnoty konstant stability komplexů DQ byly v přítomnosti HS- α -CD jako CS $237,0 \cdot 10^3$ dm^3/mol pro první, respektive $74,1 \cdot 10^3$ dm^3/mol pro druhý migrující enantiomer. V přítomnosti HS- β -CD jako CS to bylo $73,7 \cdot 10^3$ dm^3/mol pro první, respektive $30,5 \cdot 10^3$ dm^3/mol pro druhý migrující enantiomer. Při použití HS- γ -CD jako CS byly průměrné konstanty stability $35,3 \cdot 10^3$ dm^3/mol pro první, respektive $22,0 \cdot 10^3$ dm^3/mol pro druhý migrující enantiomer.

Hodnoty všech stanovených konstant stability včetně standardních odchylek jsou uvedeny v tabulce 11. Vysoké hodnoty konstant stability ukazují na silnou interakci mezi DQ a HS-CD. Standardní odchylky byly ve většině případů malé. Nelineární regresní analýzou byly vypočteny také elektroforetické pohyblivosti komplexů m_{AS} . Hodnoty těchto pohyblivostí včetně standardních odchylek jsou uvedeny v tabulce 12.

U DQ, které vykázaly separaci enantiomerů při použití HS- α -CD jako CS byl nejmenší relativní rozdíl v konstantách stability komplexů jednotlivých enantiomerů nalezen mezi komplexy enantiomerů DQ **3** (pro jeden enantiomer $17,1 \cdot 10^3$ dm^3/mol a pro druhý $13,7 \cdot 10^3$ dm^3/mol), relativní rozdíl v konstantách stability mezi těmito enantiomery je téměř 19,9 %. Druhý nejmenší rozdíl v konstantách stability komplexů byl nalezen u DQ **2** (26,6 %). Největší rozdíl mezi konstantami stability komplexů enantiomerů s HS- α -CD byl nalezen mezi komplexy enantiomerů DQ **9** (pro jeden enantiomer $527,9 \cdot 10^3$ dm^3/mol a pro druhý $95,9 \cdot 10^3$ dm^3/mol), relativní rozdíl v konstantách stability mezi těmito

enantiomery je téměř 82 %. Podobně tomu bylo u DQ **10** (81,5 %) a vysoký rozdíl v konstantách stability komplexů byl nalezen rovněž u enantiomerů DQ **4** (77,1 %) a DQ **6** (74,5 %).

Při použití HS- β -CD jako CS byl nejmenší rozdíl v konstantách stability komplexů enantiomerů nalezen mezi komplexy enantiomerů DQ **8** (pro jeden enantiomer $39,9 \cdot 10^3 \text{ dm}^3/\text{mol}$ a pro druhý $34,3 \cdot 10^3 \text{ dm}^3/\text{mol}$), což koreluje s faktem, že u tohoto DQ nedošlo k separaci na základní linii, ale pouze částečnému dělení, s rozlišením 1,29. Relativní rozdíl v konstantách stability mezi těmito enantiomery je 14 %. Druhý nejnižší rozdíl mezi konstantami stability komplexů byl nalezen u DQ **3** (32,8 %). Největší rozdíl mezi konstantami stability komplexů enantiomerů s HS- α -CD byl nalezen mezi komplexy enantiomerů DQ **10** (pro jeden enantiomer $113,4 \cdot 10^3 \text{ dm}^3/\text{mol}$ a pro druhý $26,1 \cdot 10^3 \text{ dm}^3/\text{mol}$), relativní rozdíl v konstantách stability mezi těmito enantiomery je 77 %. Prakticky stejný relativní rozdíl mezi konstantami stability byl nalezen u DQ **9** (76,9 %) a vysoký rozdíl v konstantách stability komplexů byl nalezen rovněž u enantiomerů DQ **4** (68,7 %) a DQ **6** (59,5 %).

Při použití HS- γ -CD jako CS byl nejmenší rozdíl v konstantách stability komplexů enantiomerů nalezen mezi komplexy enantiomerů DQ **3** (pro jeden enantiomer $20,8 \cdot 10^3 \text{ dm}^3/\text{mol}$ a pro druhý $17,2 \cdot 10^3 \text{ dm}^3/\text{mol}$), tedy u stejného DQ jako tomu bylo u HS- α -CD. Relativní rozdíl v konstantách stability mezi těmito enantiomery je 17,3 %. Menší rozdíly v konstantách stability komplexů byly nalezeny také u DQ **8** a DQ **5** se shodným relativním rozdílem 20,5 % a u DQ **2** (20,8 %). Největší rozdíl mezi konstantami stability komplexů enantiomerů s HS- γ -CD byl nalezen mezi komplexy enantiomerů DQ **6** (pro jeden enantiomer $60,3 \cdot 10^3 \text{ dm}^3/\text{mol}$ a pro druhý $24,1 \cdot 10^3 \text{ dm}^3/\text{mol}$), relativní rozdíl v konstantách stability mezi těmito enantiomery je téměř 60 %. Vysoké rozdíly v konstantách stability komplexů byly nalezeny rovněž u enantiomerů DQ **10** (54,3 %) a DQ **9** (52,9 %).

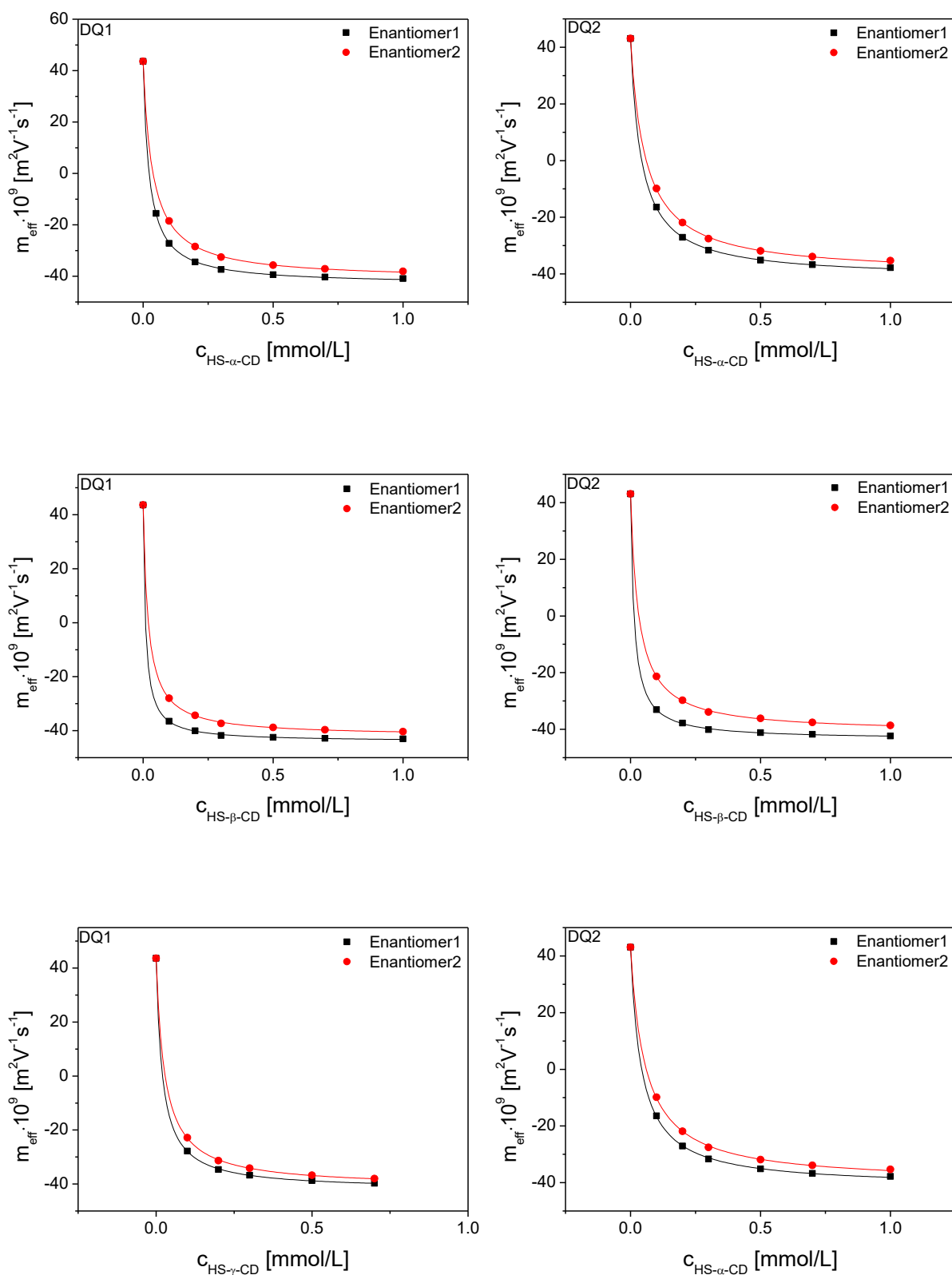
Pro první migrující komplexy enantiomerů DQ **1**, **2** a **3** s HS- α -CD, HS- β -CD i HS- γ -CD platilo, že měly vyšší hodnoty konstanty stability než druhé migrující komplexy enantiomerů těchto DQ. Nejpevnější komplexy enantiomerů DQ **1**, **2** a **3** byly utvořeny komplexací s HS- β -CD. Nejslabší komplexy

enantiomerů těchto DQ byly utvořeny komplexací s HS- α -CD. Enantiomery DQ **1**, **2** a **3** měly v přítomnosti HS- β -CD nejvyšší efektivní pohyblivosti a obecně vyšší hodnoty rozlišení, což koreluje s faktem, že jejich komplexy byly pevnější, měly nejvyšší hodnoty konstant stability a i nejvyšší relativní rozdíl mezi nimi.

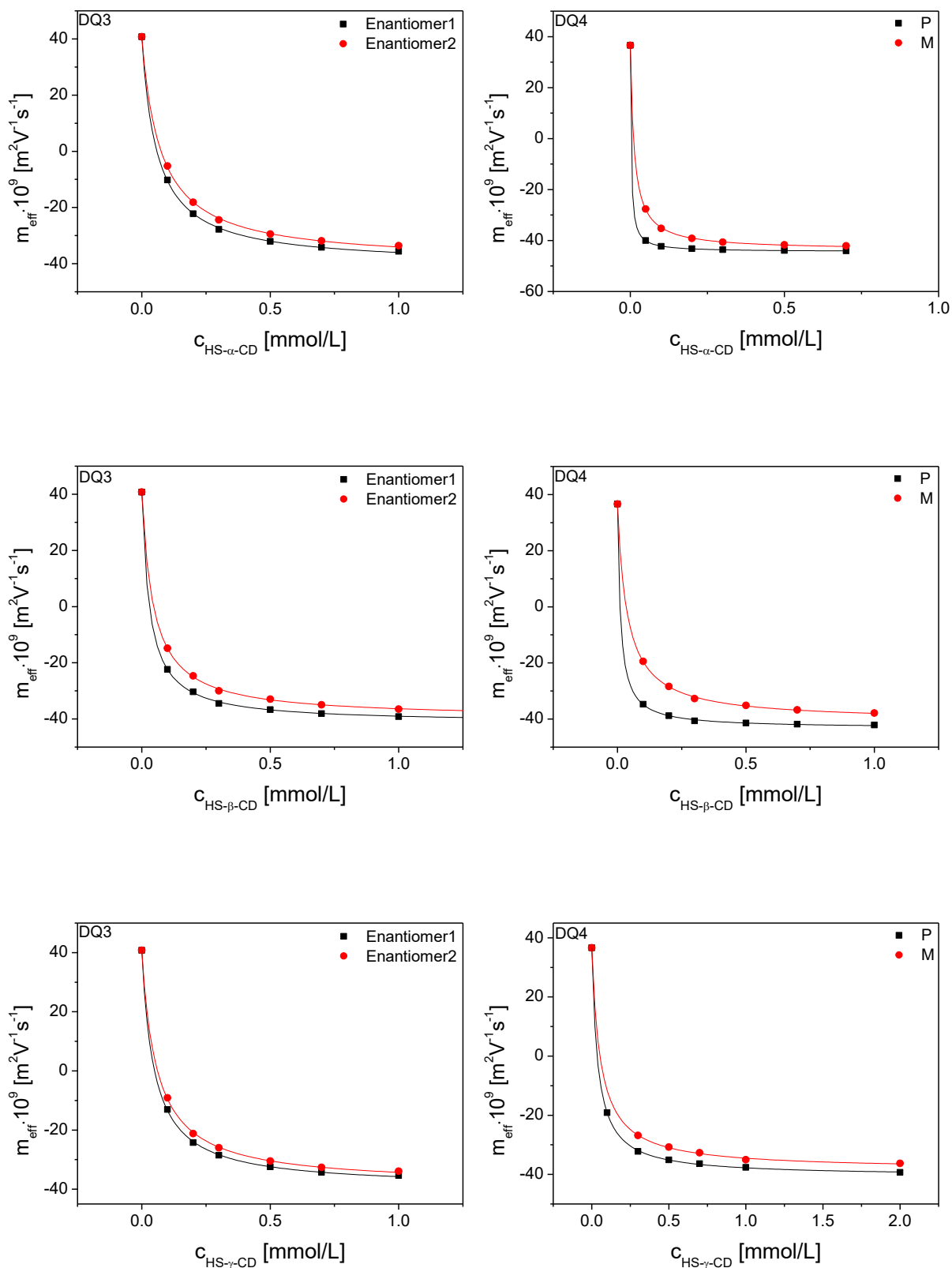
Pro komplexy enantiomerů DQ **4-6**, **9** a **10** s HS- α -CD, HS- β -CD i HS- γ -CD platilo, že první migrující enantiomery měly vyšší hodnoty zdánlivé konstanty stability než druhé migrující enantiomery. Nejpevnější komplexy enantiomerů DQ **4-6**, **9** a **10** byly utvořeny komplexací s HS- α -CD. Nejslabší komplexy enantiomerů těchto DQ byly utvořeny komplexací s HS- γ -CD. V těchto případech konstanty korelovaly s efektivními pohyblivostmi, které byly nejvyšší u nejpevnějších komplexů. Hodnoty zdánlivých konstant stability komplexů jednotlivých enantiomerů ale nekorelovaly s rozlišením enantiomerů, ta byla naopak nejnižší, přestože relativní rozdíl mezi těmito konstantami byl nejvyšší.

Pro komplexy enantiomerů DQ **8** a **11** byly zdánlivé konstanty stability s HS- α -CD totožné pro oba jejich enantiomery. To koreluje s faktem, že u těchto dvou DQ nedošlo při použití HS- α -CD jako CS k separaci enantiomerů. U těchto dvou DQ korelovaly hodnoty rozlišení enantiomerů s relativním rozdílem v konstantách stability. Pro první migrující komplexy enantiomerů DQ **8** a **11** s HS- β -CD i HS- γ -CD byly nalezeny vyšší hodnoty konstanty stability než pro druhé migrující komplexy enantiomerů těchto DQ. Nejpevnější komplex tvořily neseparované enantiomery DQ **8** a **11** s HS- α -CD. Nejslabší komplexy enantiomerů těchto DQ byly utvořeny komplexací s HS- γ -CD.

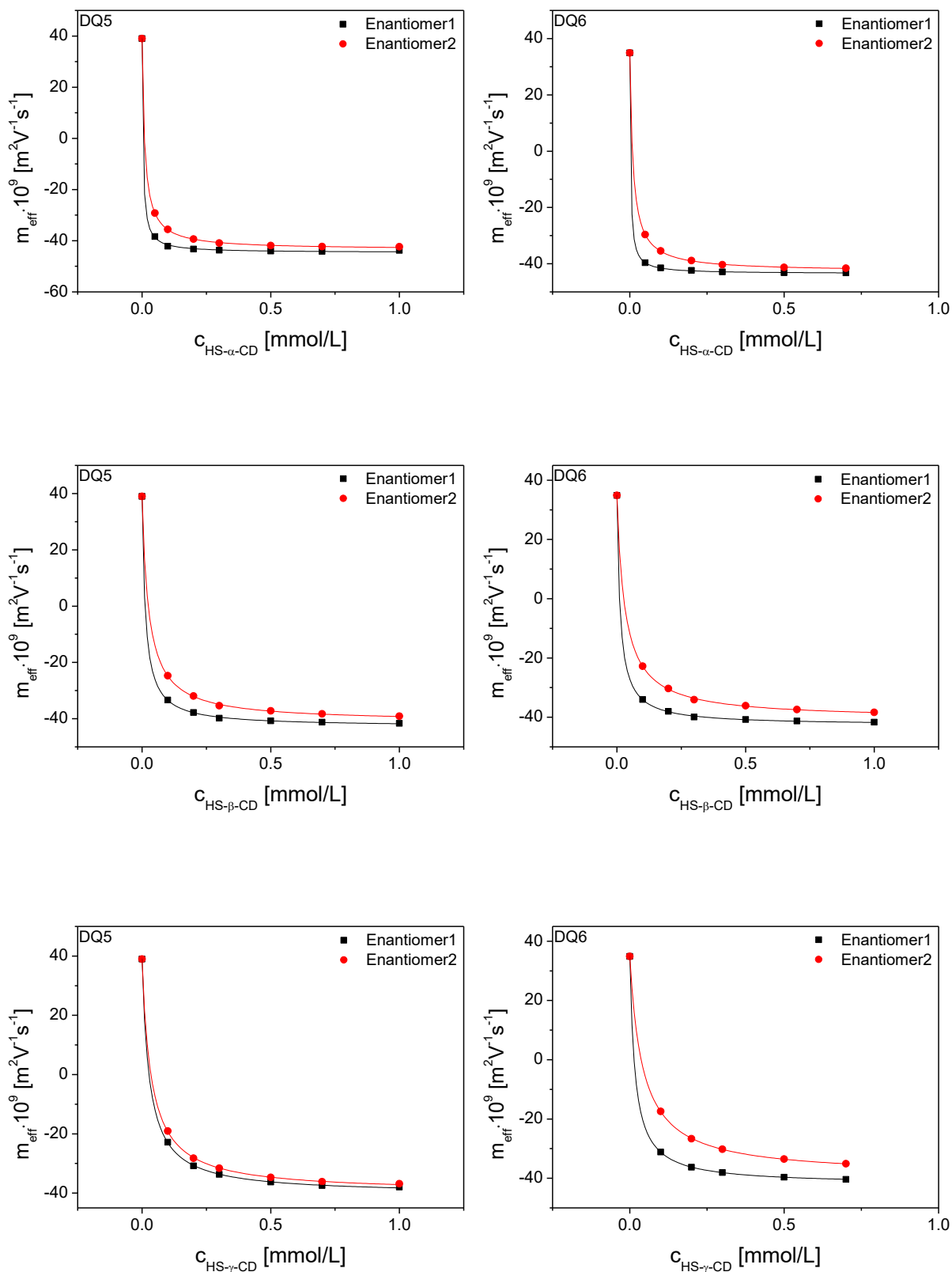
Pro jednotlivé komplexy enantiomerů DQ **7** s HS-CD nebyly hodnoty konstant porovnány, neboť měření byla provedena za použití rozdílných separačních pufrů v případě s HS- α -CD jako CS než v případech HS- β -CD a HS- γ -CD jako CS. Také směrodatné odchylky těchto stanovených konstant byly větší než u ostatních DQ.



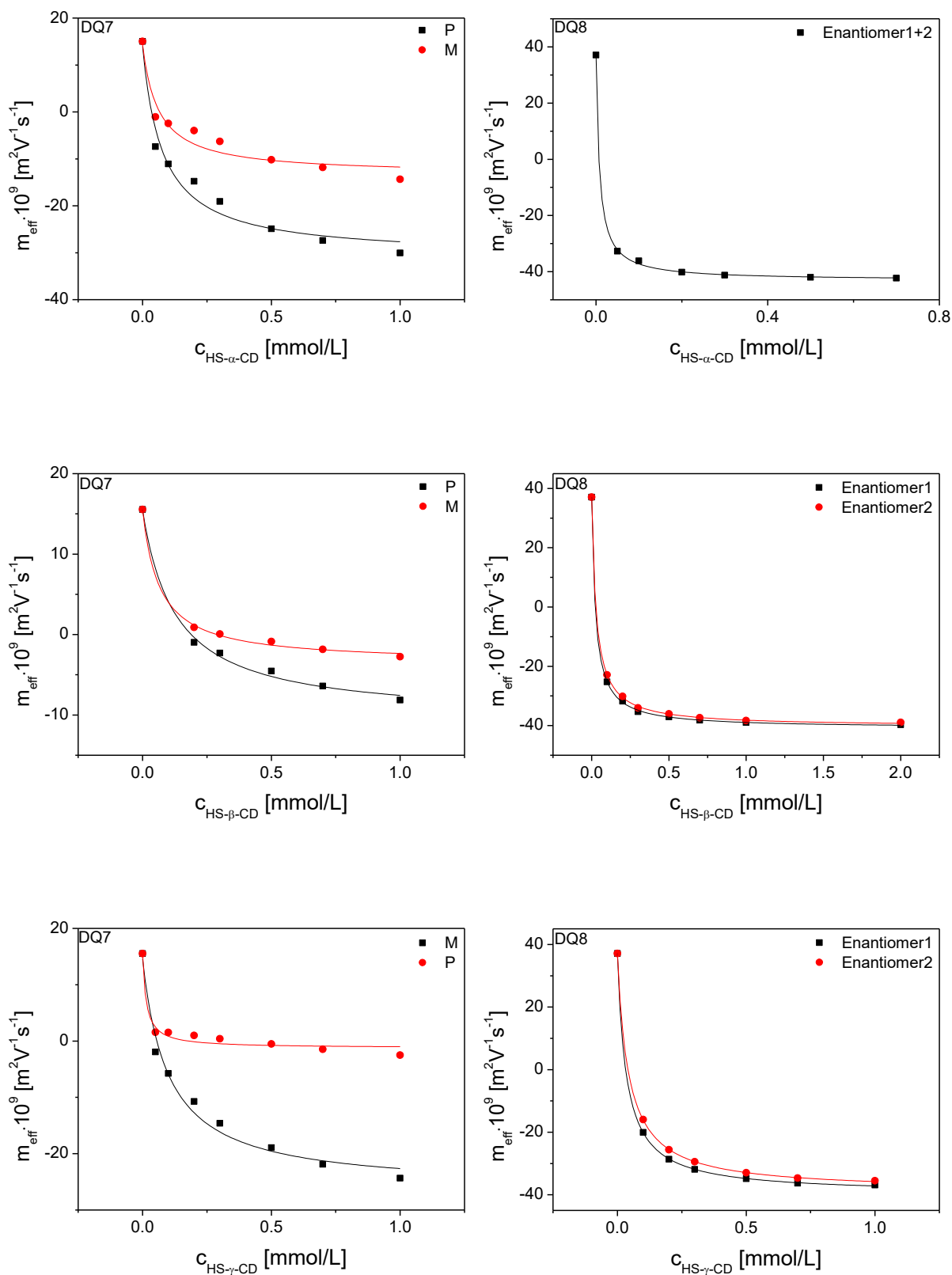
Obr. 14 Závislosti efektivních elektroforetických pohyblivostí enantiomerů diquatu 1 a 2 na molární koncentraci HS- α -CD, HS- β -CD, nebo HS- γ -CD jako chirálního selektoru přidávaného do BGE.



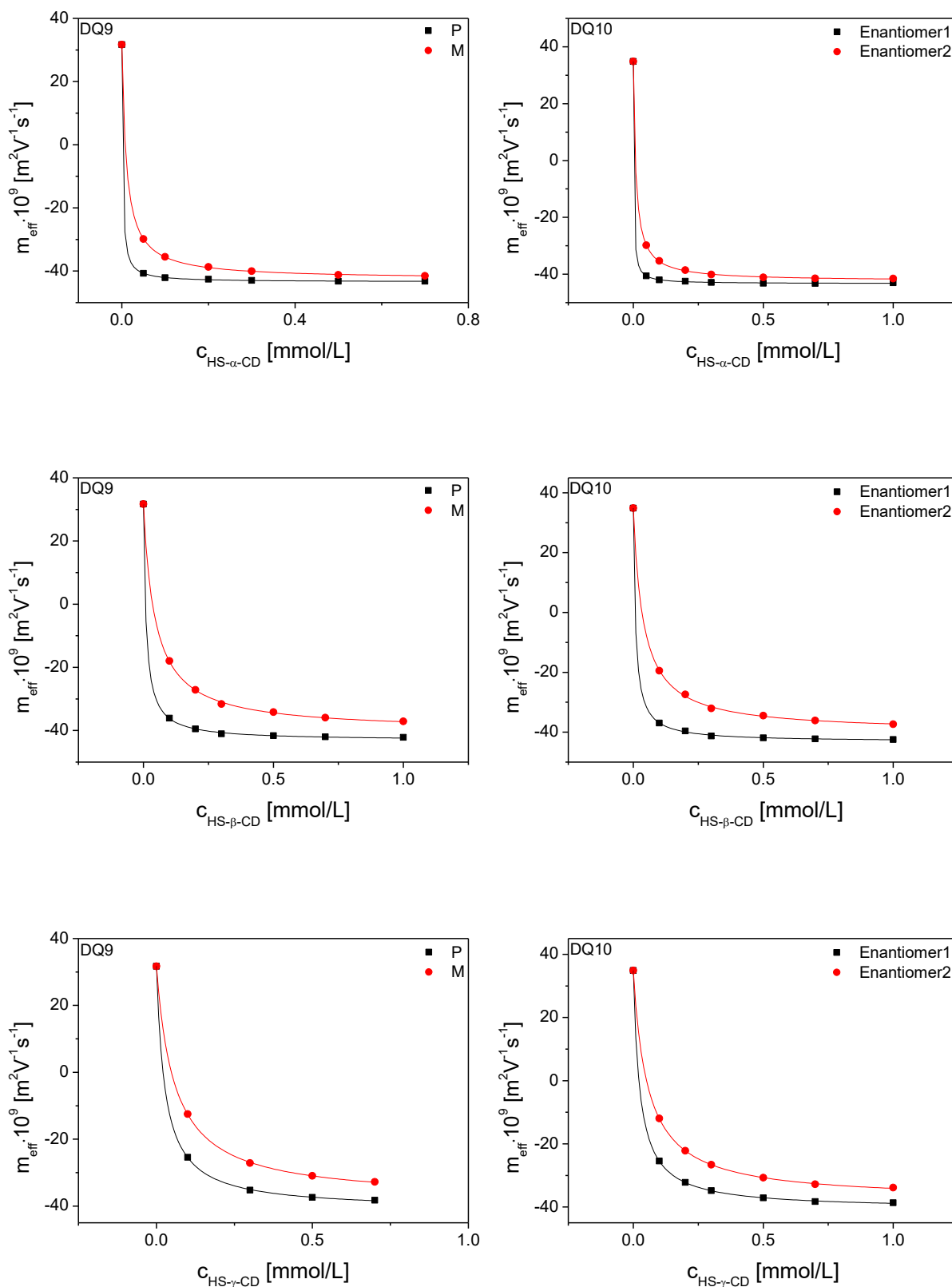
Obr. 15 Závislosti efektivních elektroforetických pohyblivostí enantiomerů diquatu **3** a **4** na molární koncentraci HS- α -CD, HS- β -CD, nebo HS- γ -CD jako chirálního selektoru přidaného do BGE.



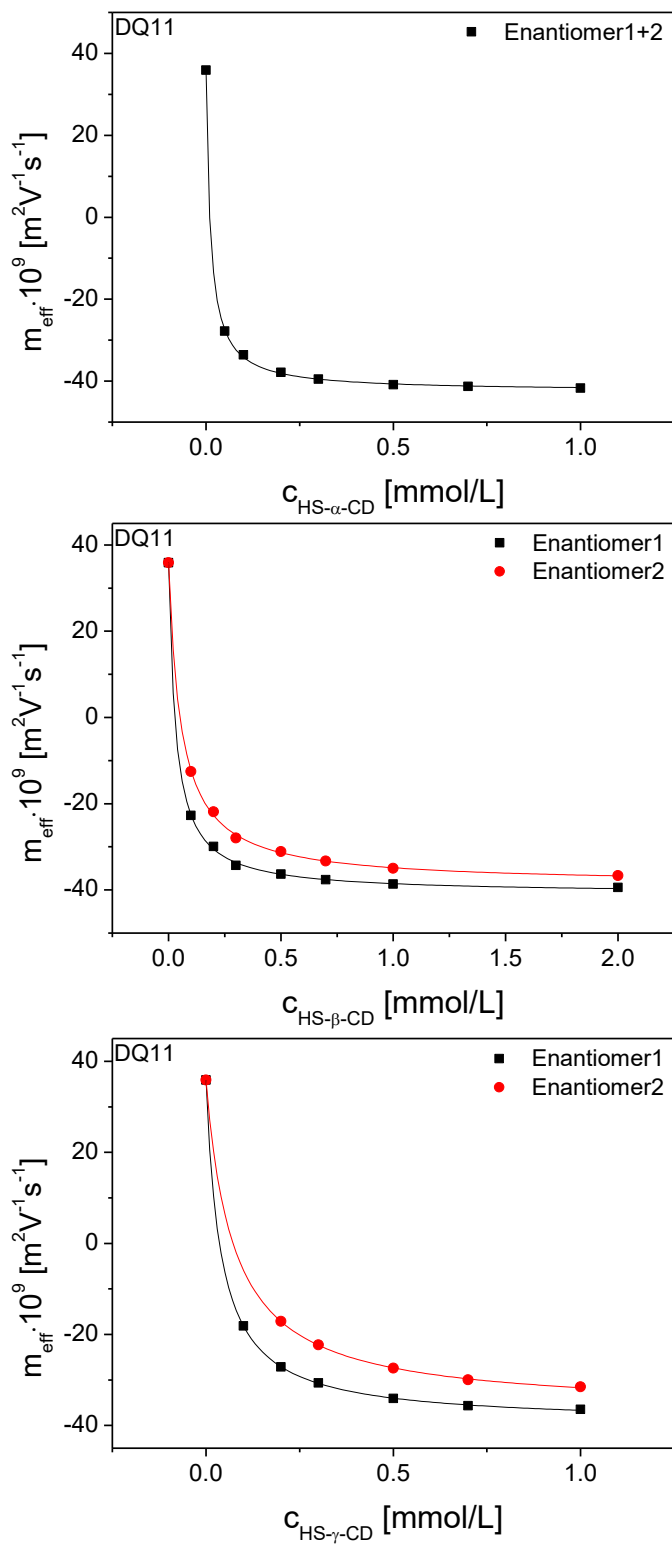
Obr. 16 Závislosti efektivních elektroforetických pohyblivostí enantiomerů diquatu **5** a **6** na molární koncentraci HS- α -CD, HS- β -CD, nebo HS- γ -CD jako chirálního selektoru přidaného do BGE.



Obr. 17 Závislosti efektivních elektroforetických pohyblivostí enantiomerů diquatu **7** a **8** na molární koncentraci HS- α -CD, HS- β -CD, nebo HS- γ -CD jako chirálního selektoru přidaného do BGE.



Obr. 18 Závislosti efektivních elektroforetických pohyblivostí enantiomerů diquatů **9** a **10** na molární koncentraci HS- α -CD, HS- β -CD, nebo HS- γ -CD jako chirálního selektoru přidaného do BGE.



Obr. 19 Závislosti efektivních elektroforetických pohyblivostí enantiomerů diquatů **11** na molární koncentraci HS- α -CD, HS- β -CD, nebo HS- γ -CD jako chirálního selektoru přidaného do BGE.

Tab. 11 Přehled stanovených zdánlivých konstant stability komplexů enantiomerů diquatů **1-11** s HS- α -CD, HS- β -CD, HS- γ -CD jako chirálními selektory metodou nelineární regresní analýzy, SD=standardní odchylka.

DQ	Chirální selektor								
	HS- α -CD			HS- β -CD			HS- γ -CD		
	$(K_1 \pm SD) \cdot 10^{-3}$ [dm ³ /mol]	$(K_2 \pm SD) \cdot 10^{-3}$ [dm ³ /mol]	$\left(\frac{K_1 - K_2}{K_1}\right) \cdot 100$ [%]	$(K_1 \pm SD) \cdot 10^{-3}$ [dm ³ /mol]	$(K_2 \pm SD) \cdot 10^{-3}$ [dm ³ /mol]	$\left(\frac{K_1 - K_2}{K_1}\right) \cdot 100$ [%]	$(K_1 \pm SD) \cdot 10^{-3}$ [dm ³ /mol]	$(K_2 \pm SD) \cdot 10^{-3}$ [dm ³ /mol]	$\left(\frac{K_1 - K_2}{K_1}\right) \cdot 100$ [%]
1	43,4±0,8	27,5±0,6	36,6	106,9±4,9	51,2±1,4	52,1	50,4±1,0	36,5±0,8	27,6
2	24,1±0,6	17,7±0,4	26,6	72,5±2,0	32,5±0,9	55,2	29,3±0,6	23,2±0,5	20,8
3	17,1±0,4	13,7±0,4	19,9	33,2±0,9	22,3±0,6	32,8	20,8±0,5	17,2±0,4	17,3
4	354,1±7,7	81,2±1,9	77,1	84,7±3,4	26,5±0,7	68,7	26,1±0,5	18,0±1,0	31,0
5	262,9±22,3	95,4±1,6	63,7	77,3±2,6	38,9±1,0	49,7	35,6±0,7	28,3±0,6	20,5
6	381,8±10,3	97,5±1,3	74,5	79,8±2,6	32,3±0,9	59,5	60,3±0,4	24,1±0,2	60,0
7	12,8±3,6	16,2±6,3	-26,6	7,8±1,3	15,3±2,7	-96,2	10,0±2,2	70,3±30,3	-603
8	126,7±10,3	126,7±10,3	0,0	39,9±1,1	34,3±1,0	14,0	29,3±0,5	23,3±0,3	20,5
9	527,9±22,0	95,9±1,4	81,8	97,3±4,5	22,5±0,7	76,9	36,5±0,8	17,2±0,3	52,9
10	547,4±35,0	101,4±2,1	81,5	113,4±6,0	26,1±0,9	77,0	39,6±0,6	18,1±0,2	54,3
11	84,2±2,8	84,2±2,8	0,0	32,1±1,1	18,3±0,6	43,0	25,3±0,3	13,6±0,3	46,2

Tab. 12 Přehled stanovených elektroforetických pohyblivostí komplexů m_{AS1} a m_{AS2} enantiomerů diquatů **1-11** s HS- α -CD, HS- β -CD, HS- γ -CD jako chirálními selektory metodou nelineární regresní analýzy, SD=standardní odchylka.

DQ	Chirální selektor					
	HS- α -CD		HS- β -CD		HS- γ -CD	
	$(m_{AS1} \pm SD) \cdot 10^9$ [m ² V ⁻¹ s ⁻¹]	$(m_{AS2} \pm SD) \cdot 10^9$ [m ² V ⁻¹ s ⁻¹]	$(m_{AS1} \pm SD) \cdot 10^9$ [m ² V ⁻¹ s ⁻¹]	$(m_{AS2} \pm SD) \cdot 10^9$ [m ² V ⁻¹ s ⁻¹]	$(m_{AS1} \pm SD) \cdot 10^9$ [m ² V ⁻¹ s ⁻¹]	$(m_{AS2} \pm SD) \cdot 10^9$ [m ² V ⁻¹ s ⁻¹]
1	-43,21±0,19	-41,36±0,23	-44,07±0,16	-42,08±1,81	-42,12±1,55	-41,26±1,95
2	-41,52±2,68	-40,18±3,24	-43,57±1,37	-41,20±2,37	-40,50±2,09	-39,62±2,49
3	-40,50±3,21	-39,51±4,21	-41,41±2,09	-39,80±2,50	-39,43±2,68	-38,67±3,20
4	-44,39±0,04	-43,72±1,63	-43,25±1,61	-40,78±2,67	-40,64±1,62	-38,47±3,85
5	-44,65±2,14	-43,49±0,10	-42,82±1,47	-41,22±2,02	-40,43±1,51	-39,84±1,83
6	-43,53±0,05	-42,77±0,08	-42,71±1,31	-40,66±2,22	-42,13±0,04	-39,26±1,10
7	-30,90±2,50	-13,35±1,96	-10,52±0,97	-3,52±0,47	-26,37±1,91	-1,24±0,63
8	-43,10±3,97	-43,10±3,97	-40,84±1,82	-40,36±2,07	-39,72±1,39	-38,90±1,51
9	-43,45±0,05	-42,58±0,08	-43,15±1,52	-40,28±2,93	-41,14±1,62	-38,25±2,18
10	-43,34±0,08	-42,44±1,06	-43,21±1,59	-40,01±3,34	-40,71±1,05	-37,94±1,46
11	-42,50±2,00	-42,50±2,00	-40,86±2,63	-38,72±3,54	-39,54±1,24	-36,68±2,25

6 Závěr

V rámci této diplomové práce byla metodou vysokoúčinné kapilární zónové elektroforézy provedena chirální separace jedenácti racemických derivátů diquatu (DQ) s využitím anioinických chirálních selektorů (CS) náhodně sulfatovaných α -CD, β -CD a γ -CD o vysokém stupni substituce (HS- α -CD, HS- β -CD, HS- γ -CD). Komplexy enantiomerů DQ s těmito CD se pohybovaly s efektivními elektroforetickými pohyblivostmi $-38,42 \cdot 10^9 \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$, $-37,36 \cdot 10^9 \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$, respektive $-32,88 \cdot 10^9 \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ v přítomnosti 6 mmol/L HS- α -CD, HS- β -CD, respektive HS- γ -CD. Při použití všech uvedených chirálních selektorů bylo dosaženo dobrého chirálního dělení. Separace enantiomerů na základní linii bylo dosaženo pro 82 %, 91 %, respektive 100 % analyzovaných derivátů DQ v 22 mmol/L NaOH, 35 mmol/L H_3PO_4 sodno-fosfátovém pufru (pH 2,5) v přítomnosti 6 mmol/L HS- α -CD, HS- β -CD, respektive HS- γ -CD. Separace DQ probíhaly ve většině případů s velmi vysokým rozlišením. Pro 44 %, 91 % respektive 55 % oddělených enantiomerů bylo dosaženo hodnot rozlišení vyšších než 5 při použití HS- α -CD, HS- β -CD, respektive HS- γ -CD jako chirálních selektorů. Při použití HS- α -CD nedošlo k enantioseparaci pouze u DQ **8** a **11**, při použití HS- β -CD bylo u DQ **8** dosaženo pouze částečné separace s rozlišením 1,29. Nejvyšších separačních účinností pro dělené enantiomery DQ bylo obecně dosaženo při použití HS- β -CD, počty teoretických pater se pohybovaly v řádu statisíců (průměrná hodnota $344,4 \cdot 10^3$). Pomocí tří dostupných neracemických DQ byla provedena identifikace migračního pořadí jednotlivých *M*- a *P*-enantiomerů pro DQ **4**, **7** a **9**. Pro dosažení enantioseparace DQ **7**, jež obsahoval ve své struktuře karboxylové skupiny a migroval v daném BGE s HS- β -CD a HS- γ -CD s nízkou efektivní pohyblivostí, bylo optimalizováno složení separačního pufru snížením pH z hodnoty 2,5 na 2,1. K dělení enantiomerů pak došlo s enormním rozlišením (34,5 a 59,9).

Metodou kapilární afinitní elektroforézy byla proměřena závislost efektivních elektroforetických pohyblivostí jednotlivých enantiomerů DQ na koncentraci HS- α -CD, HS- β -CD a HS- γ -CD. Efektivní elektroforetické

pohyblivosti enantiomerů analytů při nízkých koncentracích chirálních selektorů v BGE byly z důvodu značné elektromigrační disperze způsobené komplexačními rovnováhami vypočteny z migračních časů korigovaných pomocí Haarhoff-Van der Lindeho funkce. Pomocí nelineární regresní analýzy byly následně stanoveny zdánlivé konstanty stability komplexů jednotlivých enantiomerů DQ s použitými CS. Pro komplexy všech diquatů s HS- α -CD, HS- β -CD a HS- γ -CD byly zjištěny velmi vysoké hodnoty konstant stability, v rozmezí mezi $7,8 \cdot 10^3$ a $547,4 \cdot 10^3$ dm³/mol. Zdánlivé konstanty stability dosahovaly průměrných hodnot 155, $54 \cdot 10^3$ dm³/mol, $52,10 \cdot 10^3$ dm³/mol, respektive $28,64 \cdot 10^3$ dm³/mol pro HS- α -CD, HS- β -CD, respektive HS- γ -CD. Nejpevnější komplexy enantiomerů DQ byly tvořeny s HS- α -CD a nejslabší s HS- γ -CD jako CS.

7 Použité informační zdroje a literatura

1. Smith, S.W., *Chiral Toxicology: It's the Same Thing...Only Different*. Toxicological Sciences, 2009. **110**(1): p. 4-30.
2. Gubitz, G. and M.G. Schmid, *Chiral separation by capillary electromigration techniques*. Journal of Chromatography A, 2008. **1204**(2): p. 140-156.
3. Cazes, J., ed. *Chiral separations by capillary electrophoresis*. Chromatographic science series, ed. Y.M. Ann Van Eeckhaut. Vol. 100. 2010, CRC Press: Florida, USA.
4. Ahuja, S., ed. *Chiral separation methods for pharmaceutical and biotechnological products*. ed. S. Ahuja. 2011, Pub John Wiley & sons, Inc: Hoboken, New Jersey, USA.
5. Neubert, R.H.H. and H.-H. Rüttinger, *Affinity capillary electrophoresis in pharmaceuticals and biopharmaceuticals*. Drugs and the pharmaceutical sciences, ed. J. Swarbrick. 2003, New York, USA: Marcel Dekker, Inc.
6. Benes, M., et al., *Determination of stability constants of complexes of neutral analytes with charged cyclodextrins by affinity capillary electrophoresis*. Electrophoresis, 2012. **33**(6): p. 1032-1039.
7. Cizkova, M., et al., *Linquats: Synthesis, Characterization, and Properties of Linear Extended Diquats*. Chemistry-a European Journal, 2016. **22**(34): p. 12154-12159.
8. Adriaenssens, L., et al., *Helquats: A Facile, Modular, Scalable Route to Novel Helical Dications*. Chemistry-a European Journal, 2009. **15**(5): p. 1072-1076.
9. Testa, B., *Organic Stereochemistry Part 3 Other Stereogenic Elements: Axes of Chirality, Planes of Chirality, Helicity, and (E,Z)-Diastereoisomerism*. Helvetica Chimica Acta, 2013. **96**(3): p. 351-374.
10. Berthold, A., ed. *Chiral recognition in separation methods: Mechanisms and applications*. 2010, Springer: Berlín, Německo.
11. Chankvetadze, B., *Capillary electrophoresis in chiral analysis*. 1997, Chichester, Anglie, Velká Británie: Pub John Wiley & sons, Inc.
12. Gubitz, G. and M.G. Schmid, *Chiral separation by chromatographic and electromigration techniques. A review*. Biopharmaceutics & Drug Disposition, 2001. **22**(7-8): p. 291-336.
13. Scriba, G.K.E., *Selected fundamental aspects of chiral electromigration techniques and their application to pharmaceutical and biomedical*

- analysis*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2002. **27**(3-4): p. 373-399.
14. Kasicka, V., *Theoretical bases and separation principles of capillary electromigration methods*. Chemicke Listy, 1997. **91**(5): p. 320-329.
 15. Henk H. Lauer, G.P.R., *High performance capillary electrophoresis*. 2010, Německo: Agilent Technologies.
 16. Paul D. Grossman, J.C.C., *Capillary electrophoresis: Theory and practice*. 1992, San Diego, Kalifornie, USA: Academic Press, Inc.
 17. Williams, B.A. and C. Vigh, *Fast, accurate mobility determination method for capillary electrophoresis*. Analytical Chemistry, 1996. **68**(7): p. 1174-1180.
 18. Benes, M., et al., *A nonlinear electrophoretic model for PeakMaster: Part IV. Electromigration dispersion in systems that contain a neutral complex-forming agent and a fully charged analyte. Experimental verification*. Journal of Chromatography A, 2012. **1267**: p. 109-115.
 19. Erny, G.L., E.T. Bergstrom, and D.M. Goodall, *Predicting peak shape in capillary zone electrophoresis: a generic approach to parametrizing peaks using the Haarhoff-Van der Linde (HVL) function*. Analytical Chemistry, 2001. **73**(20): p. 4862-4872.
 20. Le Saux, T., A. Varenne, and P. Gareil, *Peak shape modeling by Haarhoff-Van der Linde function for the determination of correct migration times: A new insight into affinity capillary electrophoresis*. Electrophoresis, 2005. **26**(16): p. 3094-3104.
 21. Dubsy, P., et al., *CEval: All-in-one software for data processing and statistical evaluations in affinity capillary electrophoresis*. Journal of Chromatography A, 2016. **1445**: p. 158-165.
 22. Dubsy, P., et al., *Determination of the correct migration time and other parameters of the Haarhoff-van der Linde function from the peak geometry characteristics*. Electrophoresis, 2015. **36**(5): p. 655-661.
 23. Erny, G.L., E.T. Bergstrom, and D.M. Goodall, *Electromigration dispersion in capillary zone electrophoresis - Experimental validation of use of the Haarhoff-Van der Linde function*. Journal of Chromatography A, 2002. **959**(1-2): p. 229-239.
 24. Busch, M.H.A., J.C. Kraak, and H. Poppe, *Principles and limitations of methods available for the determination of binding constants with affinity capillary electrophoresis*. Journal of Chromatography A, 1997. **777**(2): p. 329-353.
 25. <http://biochemie.sweb.cz/x/metody/elektroforeza.htm>.

26. Stepanova, S. and V. Kasicka, *Capillary electrophoretic methods applied to the investigation of peptide complexes*. Journal of Separation Science, 2015. **38**(15): p. 2708-2721.
27. Uselova-Vcelakova, K., I. Zuskova, and B. Gas, *Stability constants of amino acids, peptides, proteins, and other biomolecules determined by CE and related methods: Recapitulation of published data*. Electrophoresis, 2007. **28**(13): p. 2145-2152.
28. Vespalec, R. and P. Bocek, *Calculation of stability constants for the chiral selector-enantiomer interactions from electrophoretic mobilities*. Journal of Chromatography A, 2000. **875**(1-2): p. 431-445.
29. Busch, M.H.A., et al., *Comparison of five methods for the study of drug-protein binding in affinity capillary electrophoresis*. Journal of Chromatography A, 1997. **777**(2): p. 311-328.
30. Gomez, F.A., et al., *DETERMINATION OF BINDING CONSTANTS OF LIGANDS TO PROTEINS BY AFFINITY CAPILLARY ELECTROPHORESIS - COMPENSATION FOR ELECTROOSMOTIC FLOW*. Analytical Chemistry, 1994. **66**(11): p. 1785-1791.
31. Pyell, U., *Micellar electrokinetic chromatography - From theoretical concepts to real samples (Review)*. Fresenius Journal of Analytical Chemistry, 2001. **371**(6): p. 691-703.
32. Robson, M.M., et al., *Capillary electrochromatography: A review*. Journal of Microcolumn Separations, 1997. **9**(5): p. 357-372.
33. Simal-Gandara, J., *The place of capillary electrochromatography among separation techniques - A review*. Critical Reviews in Analytical Chemistry, 2004. **34**(2): p. 85-94.
34. Altria, K.D., N.W. Smith, and C.H. Turnbull, *A review of the current status of capillary electrochromatography technology and applications*. Chromatographia, 1997. **46**(11-12): p. 664-674.
35. Busch, K.W.B.a.M.A., ed. *Chiral analysis*. 2006, Elsevier: Amsterdam, Holandsko.
36. Luong, J.H.T. and A.L. Nguyen, *Achiral selectivity in cyclodextrin-modified capillary electrophoresis*. Journal of Chromatography A, 1997. **792**(1-2): p. 431-444.
37. Fanali, S., *Enantioselective determination by capillary electrophoresis with cyclodextrins as chiral selectors*. Journal of Chromatography A, 2000. **875**(1-2): p. 89-122.
38. Del Valle, E.M.M., *Cyclodextrins and their uses: a review*. Process Biochemistry, 2004. **39**(9): p. 1033-1046.

39. Gnaim, J.M. and M. Athamna, *Targeting conjugates comprising active agents encapsulated in cyclodextrin-containing polymers*. 2008, Google Patents.
40. D., D., *Cyclodextrins in Pharmaceuticals, Cosmetics, and Biomedicine: Current and Future Industrial Applications*. Cyclodextrins and their Inclusion Complexes. 2011: Pub John Wiley & sons, Inc.
41. de Boer, T., et al., *Recent innovations in the use of charged cyclodextrins in capillary electrophoresis for chiral separations in pharmaceutical analysis*. *Electrophoresis*, 2000. **21**(15): p. 3220-3239.
42. Chankvetadze, B., *Separation selectivity in chiral capillary electrophoresis with charged selectors*. *Journal of Chromatography A*, 1997. **792**(1-2): p. 269-295.
43. Perrin, C., et al., *Robustness testing of chiral separations by capillary electrophoresis using highly-sulfated cyclodextrins*. *Journal of Chromatography A*, 2003. **1007**(1-2): p. 165-177.
44. Cucinotta, V., et al., *Application of charged single isomer derivatives of cyclodextrins in capillary electrophoresis for chiral analysis*. *Journal of Chromatography A*, 2010. **1217**(7): p. 953-967.
45. Matthijs, N. and Y. Vander Heyden, *Enantiomeric impurity determination in capillary electrophoresis using a highly-sulfated cyclodextrins-based method*. *Biomedical Chromatography*, 2006. **20**(8): p. 696-709.
46. Saavedra, L., et al., *Enantioseparation of pharmaceutical compounds by multiplexed capillary electrophoresis using highly sulphated alpha-, beta- and gamma-cyclodextrins*. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 2008. **875**(1): p. 248-253.
47. Gagy, L., A. Gyeresi, and F. Kilar, *Role of chemical structure in stereoselective recognition of beta-blockers by cyclodextrins in capillary zone electrophoresis*. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 2008. **70**(6): p. 1268-1275.
48. Vaccher, M.P., et al., *Chiral capillary electrophoretic resolution of baclofen, gabaergic ligand, using highly sulfated cyclodextrins*. *Electrophoresis*, 2004. **25**(7-8): p. 1111-1119.
49. Chen, F.T.A., G. Shen, and R.A. Evangelista, *Characterization of highly sulfated cyclodextrins*. *Journal of Chromatography A*, 2001. **924**(1-2): p. 523-532.
50. Tang, Z.M. and J.W. Kang, *Enzyme inhibitor screening by capillary electrophoresis with an on-column immobilized enzyme microreactor*

- created by an ionic binding technique. *Analytical Chemistry*, 2006. **78**(8): p. 2514-2520.
51. Tseng, W.L., et al., *Immunoaffinity capillary electrophoresis: Determination of binding constant and stoichiometry for antibody-antigen interaction*. *Electrophoresis*, 2002. **23**(6): p. 836-846.
 52. Guo, M., et al., *Binding Interaction Between Zinc Ion and Human Serum Albumin Using Affinity Capillary Electrophoresis*. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2012. **40**(2): p. 268-272.
 53. El-Hady, D., et al., *Precision in affinity capillary electrophoresis for drug-protein binding studies*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2010. **52**(2): p. 232-241.
 54. Zavaleta, J., et al., *Multiple-injection affinity capillary electrophoresis to examine binding constants between glycopeptide antibiotics and peptides*. *Journal of Chromatography A*, 2006. **1105**(1-2): p. 59-65.
 55. Li, G.D., et al., *Capillary isoelectric focusing and affinity capillary electrophoresis approaches for the determination of binding constants for antibodies to the prion protein*. *Journal of Chromatography A*, 2004. **1053**(1-2): p. 253-262.
 56. Anisimova, M.V., et al., *The study of the metal-binding region in human growth hormone using immobilized metal ion affinity gel-electrophoresis*. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2001. **27**(1): p. 23-26.
 57. Shi, N. and V.M. Ugaz, *Using Microchip Gel Electrophoresis to Probe DNA-Drug Binding Interactions*, in *Functional Analysis of DNA and Chromatin*, J.C. Stockert, J. Espada, and A. BlazquezCastro, Editors. 2014, Humana Press Inc: Totowa. p. 13-24.
 58. Guijt-van Duijn, R.M., et al., *Recent advances in affinity capillary electrophoresis*. *Electrophoresis*, 2000. **21**(18): p. 3905-3918.
 59. Liu, X.J., et al., *Recent Advances in Affinity Capillary Electrophoresis (2007)*. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2009. **98**(2): p. 394-410.
 60. Albishri, H.M., et al., *Recent advances in affinity capillary electrophoresis for binding studies*. *Bioanalysis*, 2014. **6**(24): p. 3369-3392.
 61. Hayes, W.J.a.E.R.L., ed. *Classes of Pesticides*. *Handbook of Pesticide Toxicology*. Vol. 3. 1990, Academic Press, Inc.: New York, USA.
 62. Ritter, A.M., et al., *Characterizing aquatic ecological risks from pesticides using a diquat dibromide case study. I. Probabilistic exposure estimates*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2000. **19**(3): p. 749-759.

63. Mees, G.C., *EXPERIMENTS ON THE HERBICIDAL ACTION OF 1,1'-ETHYLENE-2,2'-DIPYRIDYLIUM DIBROMIDE*. *Annals of Applied Biology*, 1960. **48**(3): p. 601-612.
64. Pizzutti, I.R., et al., *Determination of paraquat and diquat: LC-MS method optimization and validation*. *Food Chemistry*, 2016. **209**: p. 248-255.
65. Walcarius, A. and L. Lamberts, *Square wave voltammetric determination of paraquat and diquat in aqueous solution*. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 1996. **406**(1-2): p. 59-68.
66. Vachon, J., G. Bernardinelli, and J. Lacour, *Resolution of the First Nonracemic Diquats*. *Chemistry-a European Journal*, 2010. **16**(9): p. 2797-2805.
67. Severa, L., et al., *Resolution of a configurationally stable 5 helquat: enantiocomposition analysis of a helicene congener by capillary electrophoresis*. *New Journal of Chemistry*, 2010. **34**(6): p. 1063-1067.
68. Teply, F., *Helquats: Helicene-Viologen Hybrids as a Novel Object of Chemical Research*. *Chemicke Listy*, 2011. **105**(7): p. 506-513.
69. Pospisil, L., et al., *Helquats, helical extended diquats, as fast electron transfer systems*. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2010. **12**(7): p. 1550-1556.
70. Pasquini, C., et al., *Chiral anion-mediated asymmetric induction onto chiral diquats*. *Tetrahedron Letters*, 2002. **43**(3): p. 423-426.
71. Koval, D., V. Kasicka, and H. Cottet, *Analysis of glycated hemoglobin A1c by capillary electrophoresis and capillary isoelectric focusing*. *Analytical Biochemistry*, 2011. **413**(1): p. 8-15.
72. Koval, D., et al., *Chiral analysis of helquats by capillary electrophoresis: Resolution of helical N-heteroaromatic dicationic species using randomly sulfated cyclodextrins*. *Electrophoresis*, 2011. **32**(19): p. 2683-2692.