

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

Diplomová práce

**STUDIUM VHODNOSTI α -BRÓMFENYLOCTOVÉ
Kyseliny jako modelového
ANALYTU PRO CHIRÁLNÍ SEPARACE S VYUŽITÍM
KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZY**

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

HRADEC KRÁLOVÉ, 2018

Gabriela Kováčová

Pod'akovanie

Ďakujem svojmu školiteľovi PharmDr. Pavlovi Jáčovi, Ph.D., vedúcemu mojej diplomovej práce za odborné vedenie, cenné rady a pripomienky, ústretovosť a trpezlivosť.

Ďakujem ďalej i pracovníkom katedry analytickej chémie za ich ochotu a prívetivosť, vďaka ktorým som počas realizácie diplomovej práce mala vhodné pracovné podmienky.

Na záver ďakujem doc. RNDr. Marii Pospíšilovej, CSc., ktorej odborné rady nás posunuli vpred.

„Prehlasujem, že táto práca je mojím pôvodným autorským dielom. Literatúra a ďalšie zdroje, z ktorých som počas vypracovávania práce čerpala, sú uvedené v zozname použitej literatúry a v texte riadne citované. Práca nebola použitá k účelu získania iného alebo rovnakého titulu.“

V Hradci Králové 15.5.2018

Gabriela Kováčová

Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Kandidát: Gabriela Kováčová

Školitel: PharmDr. Pavel Jáč, Ph.D.

Názov diplomové práce: Studium vhodnosti α -brómfenyloctovej kyseliny jako modelového analytu pro chirální separace s využitím kapilární elektroforézy.

Práca sa zaoberá stabilitou α -brómfenyloctovej kyseliny, ktorá bola použitá ako modelový analyt pre chirálne separácie s využitím kapilárnej elektroforézy ako separačnej techniky (viz. Rizvi, S. A. A., Shamsi, A. S.. *Synthesis, Characterisation, and Application of Chiral Ionic Liquids and Their Polymers in Micellar Electrokinetic Chromatography*. Anal.Chem. 2006, Volume, 7061-7069). Stabilita α -brómfenyloctovej kyseliny v metanole a v 50% roztoku metanolu vo vode bola študovaná pomocou kapilárnej zónovej elektroforézy za použitia rôznych základných elektrolytov (50 mM fosfátový pufr o pH 7,5, 60 mM octanový pufr o pH 5,0 a 60 mM mravenčanový pufr o pH 3,0). Analýzy prebiehali v kremennej kapiláre s vnútorným priemerom 50 μm . UV detekcia prebiehala pri 200 nm. Jedine v 60 mM mravenčanovom puffri o pH 3,0 došlo k separácii všetkých teoreticky predpokladaných produktov nukleofilnej substitúcie - kyseliny mandľovej (nukleofilom je voda), kyseliny α -metoxyfenyloctovej (nukleofilom je metanol) i Br^- . Keď bola α -brómfenyloctová kyselina rozpustená v 50% roztoku metanolu vo vode, dochádzalo ku vzniku kyseliny mandľovej a kyseliny α -metoxyfenyloctovej. Počas separácií v 60 mM mravenčanovom puffri o pH 3,0, keď bola α -brómfenyloctová kyselina rozpustená v čistom metanole vznikala ako rozkladný produkt iba kyselina α -metoxyfenyloctová a reakcia mala pomalší priebeh. Práca poukazuje na nevhodnosť použitia α -brómfenyloctovej kyseliny ako modelového analytu z dôvodu jej nestability v metanolíckych roztokoch.

Abstract

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Analytical Chemistry

Candidate: Gabriela Kováčová

Supervisor: PharmDr. Pavel Jáč, Ph.D.

Title of diploma thesis: Study of α -bromphenylacetic acid suitability as a model analyte for chiral separations using capillary electrophoresis as a separation technique

This thesis deals with the stability of α -bromphenylacetic acid, that was used as the model analyte for chiral separations using capillary electrophoresis as a separation technique (see reference Rizvi, S. A. A., Shamsi, A. S.. *Synthesis, Characterisation, and Application of Chiral Ionic Liquids and Their Polymers in Micellar Electrokinetic Chromatography*. Anal.Chem. 2006, Volume, 7061-7069). Stability of α -bromphenylacetic acid in methanol and in 50% aqueous methanolic solution has been studied by means of capillary zone electrophoresis under the employment of different background electrolytes (50 mM phosphate buffer at pH 7.5, 60 mM acetate buffer at pH 5.0 and 60 mM formate buffer at pH 3.0). The separation was conducted in 50 μ m id fused-silica capillary. UV detection was at 200 nm. The successful separation of all theoretically possible products of nucleophilic substitution (mandelic acid, α -methoxyphenylacetic acid and bromide) has been reached only in the 60 mM formate buffer at pH 3.0. Mandelic acid and α -methoxyphenylacetic acid were present in the solution of α -bromphenylacetic acid that was dissolved in 50% aqueous methanol. When α -bromphenylacetic acid was dissolved in pure methanol, only α -methoxyphenylacetic acid was detected during the separation in 60 mM formate buffer at pH 3.0. In the latter solvent, the nucleophilic substitution showed lower rate. This thesis confirms the inappropriateness of α -bromphenylacetic acid as a model analyte due to its insufficient stability in methanolic solutions.

Obsah

1. Úvod.....	9
2. Cieľ a zadanie práce.....	10
3. Teoretická časť.....	11
3.1 Kapilárna elektroforéza.....	11
3.1.1 Elektroforetická pohyblivosť.....	12
3.1.2 Elektroosmotický tok.....	13
3.2 Inštrumentácia.....	14
3.2.1 Kapiláry.....	15
3.2.2 Termoregulácia.....	15
3.2.3 Zdroj vysokého napätia.....	15
3.2.4. Dávkovanie vzorku.....	16
3.2.5 Detektory.....	16
3.3 Rozdelenie elektromigračných metód podľa spôsobu separácie.....	16
3.3.1 Kapilárna zónová elektroforéza.....	16
3.3.2 Micelárna elektrokinetická chromatografia.....	17
3.3.3 Kapilárna izotachoforéza.....	18
3.3.4 Kapilárna gélová elektroforéza.....	19
3.3.5 Izoelektrická fokusácia.....	20
3.4 Nukleofilné substitúcie.....	20
3.4.1 Nukleofilné substitúcie monomolekulové (SN1).....	21
3.4.2 Nukleofilné substitúcie bimolekulárne (SN2).....	21
3.4.3 Faktory ovplyvňujúce nukleofilné substitúcie.....	22
4. Experimentálna časť.....	24
4.1 Chemikálie.....	24
4.1.1 Chemikálie použité k príprave základných elektrolytov.....	24
4.1.2 Štandardy zlúčenín a analyty.....	24
4.2 Prístrojové vybavenie.....	24
4.3 Podmienky merania.....	25
4.3.1 Kondicionácia a premytie kapilár.....	25
4.4 Základné roztoky elektrolytov a ich príprava.....	25

4.4.1	Príprava 50 mM fosfátového pufru, pH 7,5.....	25
4.4.2	Príprava 60 mM octanového pufru, pH 5,0	26
4.5	Príprava roztokov štandardov od modelových analytov	26
4.5.1	Príprava zásobných roztokov	26
4.5.2	Príprava pracovných roztokov	26
4.6	Výpočty	28
5.	Výsledky a diskusia	29
5.1	Fyzikálně-chemické vlastnosti analytů	29
5.1.1	α -brómfenyloctová kyselina	29
5.1.2	α -metoxyfenyloctová kyselina	30
5.1.3	α -hydroxyfenyloctová kyselina	30
5.2	Analýza α -brómfenyloctovej kyseliny a jej potenciálnych nečistôt pomocou kapilárnej zónovej elektroforézy	31
5.2.1	Analýza α -brómfenyloctovej kyseliny v 50 mM fosfátovom pufri o pH 7,5. 31	
5.2.2	Analýza α -brómfenyloctovej kyseliny v 60 mM octanovom pufri o pH 5,0. 38	
5.2.3	Analýza α -brómfenyloctovej kyseliny v 60 mM mravenčanovom pufri o pH 3,0	42
6.	Záver	50
7.	Zoznam obrázkov	51
8.	Zoznam tabuliek	53
9.	Citovaná literatúra.....	54
10.	Prílohy.....	56
10.1	Fortifikácia v BGE: 50mM fosfátový pufr, pH 7,5.....	56
10.2	Fortifikácia v BGE: 60mM mravenčanový pufr, pH 3,0 (1).....	58
10.3	Fortifikácia v BGE: 60mM mravenčanový pufr, pH 3,0 (2).....	60

Zoznam skratiek

BGE	základný elektrolyt
BrPhAcA	kyselina α -brómfenylactová
CE	kapilárna elektroforéza
CGE	kapilárna gelová elektroforéza
CIEF	kapilárna izoelektrická fokusácia
CITP	kapilárna izotachoforéza
CMC	kritická micelárna koncentrácia
CZE	kapilárna zónová elektroforéza
ČL	Český lékopis
DAD	detektor diódového pola
EOF	elektroosmotický tok
i.d.	vnútorný priemer
MA	kyselina mandľová
MEKC	micelárna elektrokinetická chromatografia
MetPhAcA	kyselina α -metoxyfenylactová
NACE	kapilárna elektroforéza v nevodnom prostredí
pI	izoelektrický bod
RSD	relatívna smerodatná odchýlka
SD	smerodatná odchýlka
SN	nukleofilná substitúcia
UV	ultrafialové žiarenie
VIS	viditeľné žiarenie

1. Úvod

Kyselina α -brómfenylacetová bola použitá ako modelový analyt pre testovanie chirálnych iónových kvapalín a ich polymérov ako potencionálnych chirálnych selektorov [1]. Tento modelový analyt, ktorý má štruktúrne predpoklady reagovať s nukleofilnými činidlami, môže reagovať so samotným 50% (v/v) roztokom metanolu vo vode, ktorý bol použitý ako rozpúšťadlo. Táto skutočnosť nebola autormi v článku diskutovaná [1], rovnako tak neboli nájdené ani iné štúdie na túto tému.

Táto diplomová práca sa teda venuje štúdiu stability α -brómfenylacetovej kyseliny ako modelového analytu v rozpúšťadlách ako je zmes metanol/voda (1:1, v/v) či čistý metanol. Pre štúdium stability tohto analytu bola použitá, rovnako ako v pôvodnej štúdií, metóda kapilárnej elektroforézy (CE). CE patrí v súčasnosti medzi veľmi atraktívne analytické metódy pre separáciu rôznych analytov od malých iónov až po biomolekuly. K charakteristickým rysom tejto separačnej metódy patrí vysoká separačná účinnosť, jednoduchosť, flexibilita a minimálne nároky na množstvo vzorky a rozpúšťadla [2].

2. Cieľ a zadanie práce

Cieľom práce bolo zistiť, či je kyselina α -brómfenyloctová vhodným modelovým analytom pre chirálne separácie s využitím CE.

Táto diplomová práca sa zaoberá týmito otázkami:

1. Prevedením analýzy α -brómfenyloctovej kyseliny za podmienok publikovaných v článku od autorov Rizviho a Shamsiho [1] ale bez použitia chirálneho selektoru
2. Nájdením vhodného elektrolytového systému pre separáciu prípadných rozkladných produktov
3. Overením identity rozkladných produktov (hlavne porovnaním so štandardmi)
4. Porovnaním stability α -brómfenyloctovej kyseliny v 50% roztoku metanolu vo vode a v čistom metanole

3. Teoretická časť

3.1 Kapilárna elektroforéza

Kapilárna elektroforéza (CE z angl. Capillary Electrophoresis) je analytická technika separujúca ióny na základe ich rozdielnej elektroforetickej pohyblivosti v elektrickom poli. Elektroforetická pohyblivosť μ je závislá od náboja molekuly, atómového polomeru a viskozity prostredia. Neutrálne častice v elektrickom poli nemigrujú. V prípade dvoch častíc rovnakej veľkosti, častica s väčším nábojom sa bude pohybovať v elektrickom poli rýchlejšie. V prípade, že dve častice majú rovnaký náboj, vyššiu μ bude vykazovať menšia častica. Toto správanie popisuje rovnica 1 [2].

$$\mu = \frac{q}{6\pi \eta r} \quad \text{Rovnica 1}$$

μ elektroforetická pohyblivosť [m^2/Vs]

q náboj častice [C]

η viskozita roztoku [kg/ms]

r polomer atómu [m]

Ako technika je kapilárna elektroforéza používaná najmä preto, že poskytuje rýchle výsledky a vykazuje vysokú separačnú účinnosť.

Začiatky (kapilárnej) elektroforézy sú spojené s menami ako Tiselius, Hjerten, Jorgenson a Lucasc. Elektromigračné metódy počas svojej viac ako osemdesiatročnej existencie prekonalí výrazný rozvoj. Do histórie sa svojou prácou zapísal v roku 1937 Tiselius, ktorý svetu predstavil tzv. „moving boundary electrophoresis”. Krátko na to bola v roku 1939 vyvinutá elektroforéza na papieri. 50.-te roky patrili elektroforéze na agarovom géli a jej širokému uplatneniu v biochémii a klinickej chémii. 60.-te roky sú späté s dvomi kľúčovými technikami analýzy proteínov a to s izoelektrickou fokusáciou a elektroforézou na polyakrylamidovom géli v prítomnosti dodecylsírnanu sodného (SDS - PAGE). V roku 1973 bol svetu predstavený prvý komerčne dostupný inštrumentálny set. Jednalo sa o automatický izotachoforetický analyzátor, ktorého usporiadanie bolo priamym predchodcom dnes známych elektroforetických analyzátorov. Roky 80.-te sú spojené s kapilármi vhodných rozmerov (i.d. 20-100 μm). V 90.-tych rokoch bol na trh uvedený prvý komerčný elektroforetický analyzátor [3].

Výhody tejto metódy ako je napríklad nízka spotreba vzorkov a činidiel, s tým súvisiace malé množstvo vzniknutého odpadu, rýchlosť a nízke náklady na analýzu,

viedli vedeckú spoločnosť k zvýšenému záujmu o jej rozvoj. Ich snahy viedli k podobe elektroforézy, akú poznáme dnes. Snaha o dosiahnutie čo najlepšej separácie viedla k vypracovaniu značného množstva rôznych techník a ich modifikácií, ktoré môžeme zhrnúť do 3 základných skupín [4]:

1. elektroforéza s pohyblivým rozhraním t.j. voľná elektroforéza
2. elektroforéza na nosičoch t.j. zónová elektroforéza
3. rovnovážna elektroforéza t.j. izoelektrická fokusácia a izotachoforéza

3.1.1 Elektroforetická pohyblivosť [2]

Elektroforetická pohyblivosť je vlastnosťou charakteristickou pre každý ión. Rýchlosť pohybu častíc, ako popisuje rovnica 2, je priamo úmerná elektroforetickej pohyblivosti a intenzite elektrického pola.

$$\vartheta = \mu \cdot E \quad \text{Rovnica 2}$$

μ elektroforetická pohyblivosť [m^2/Vs]

E intenzita elektrického pola [V/m]

ϑ rýchlosť nabitej častice [m/s]

Nabitá častica je silou elektrického pola F_e (rovnica 3) uvedená do pohybu, a tento pohyb je spomalený frikčnou silou prostredia F_f , ktorú definuje Stokesov zákon (rovnica 4).

$$F_e = q \cdot E \quad \text{Rovnica 3}$$

$$F_f = -6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r \cdot \vartheta \quad \text{Rovnica 4}$$

Efektívna elektroforetická pohyblivosť μ_e (v reálnom roztoku) vykazuje nižšie namerané hodnoty na rozdiel od vyššie uvedenej iónovej elektroforetickej pohyblivosti μ (tabelované hodnoty pre úplne ionizované molekuly v nekonečne nariedenom roztoku). Hodnota μ_e závisí na stupni disociácie, iónovej sile separačného média a tým pádom i na zložení použitého pufru. Vzhľadom na to, že väčšina delených molekúl je povahy slabých kyselín alebo zásad rozhodujúcu úlohu hrá hodnota pH základného elektrolytu. Hodnotu μ_e matematicky vyjadruje rovnica 5.

$$\mu_e = \mu_a - \mu_{EOF} \quad \text{Rovnica 5}$$

μ_e	efektívna elektroforetická pohyblivosť [cm ² /Vs]
μ_a	zdanlivá elektroforetická pohyblivosť [cm ² /Vs]
μ_{EOF}	elektroforetická pohyblivosť elektroosmotického toku [cm ² /Vs]

Zdanlivú elektroforetickú pohyblivosť je možné jednoducho vypočítať z experimentálnych údajov (viz. rovnica 6).

$$\mu_a = \frac{l}{t_a E} = \frac{lL}{t_a V} \quad \text{Rovnica 6}$$

V	použitá napätie [V]
l	efektívna dĺžka kapiláry [cm]
L	celková dĺžka kapiláry [cm]
t _a	migračný čas analyzovaného iónu [s]
E	intenzita elektrického poľa [V/cm]

Pre úspech separácie je dôležité, aby mali separované zložky v zmesi dostatočne odlišné efektívne elektroforetické pohyblivosti.

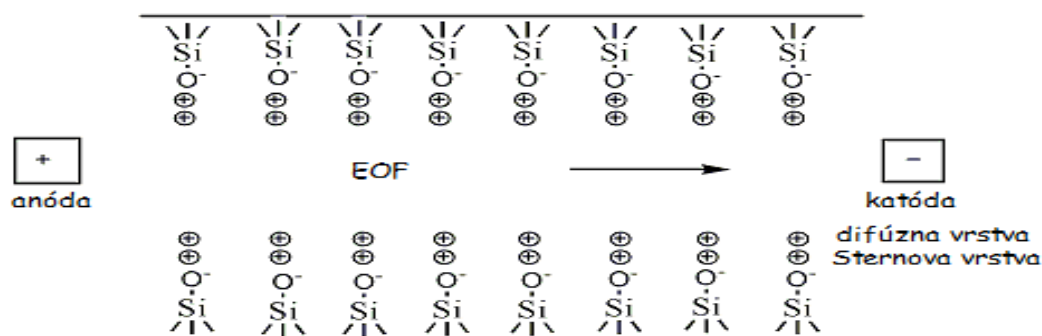
3.1.2 Elektroosmotický tok [5][6]

Elektroosmotický tok (EOF z angl. Electroosmotic Flow) je výsledkom pôsobenia aplikovaného vysokého napätia na kapiláru naplnenú elektrolytom. Je základným javom, vďaka ktorému sa v priebehu jednej analýzy separujú kationy aj anióny. Nastane, keď je pH elektrolytu pretekajúceho kapilárou vyššie ako 3, kedy dochádza k deprotonizácii silanolových skupín (SiOH). Stena kapiláry tak získa negatívny náboj, ktorý je podnetom pre vznik kationovej dvojvrstvy. Vnútorá, Sternova, vrstva je stacionárna, zatiaľ čo vonkajšia (bližšie k stredu kapiláry) je vrstvou difúznou a môže sa voľne pohybovať pozdĺž kapiláry. Na rozhraní týchto vrstiev vzniká elektrokinetický potenciál tzv. zeta-potenciál ζ . Vložením napätia sa kationy difúznej vrstvy začnú pohybovať smerom ku záporne nabitaj katóde, čo má za následok uvedenie do pohybu celého objemu roztoku v kapiláre. Rovnakým smerom t. j. ku katóde sú unášané aj neutrálne častice, ktoré sa pohybujú rovnakou rýchlosťou ako EOF. Záporne nabité ióny vykazujú opačnú pohyblivosť ako EOF, jej hodnota je však v porovnaní s EOF väčšinou nižšia a anióny sú tak rovnako unášané smerom ku katóde. Na základe toho, že kationy sa pohybujú rovnakým smerom ako EOF, je poradie migrácie nasledovné: kationy, neutrálne látky a anióny. Pohyblivosť EOF charakterizuje rovnica 7 [2].

$$\mu_{\text{EOF}} = \frac{\epsilon \cdot \zeta}{\eta}$$

Rovnica 7

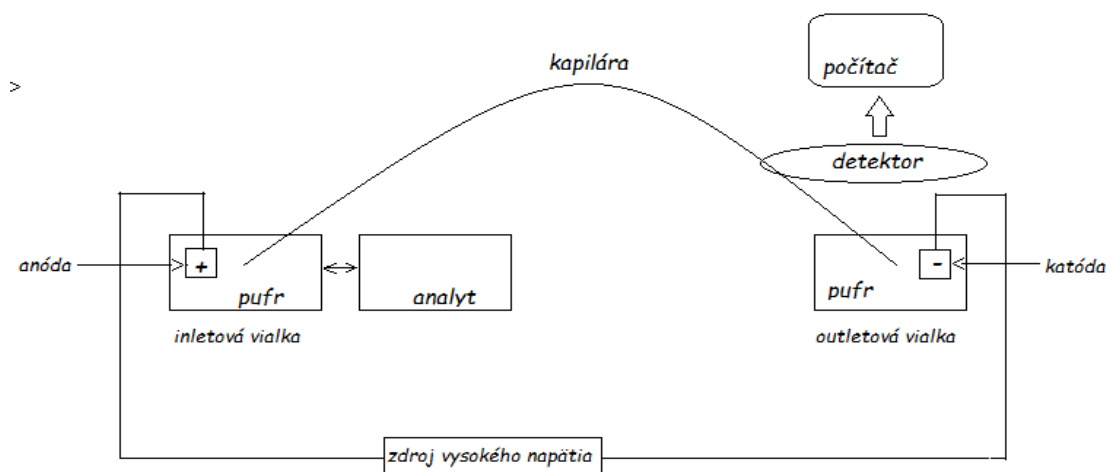
ζ zeta potenciál
 η viskozita
 ϵ dielektrická konštanta roztoku



Obrázok 1: Zobrazenie vnútra kapiláry taveného kremeňa v prítomnosti tlmivého roztoku (prevzaté a upravené podľa zdroja [7]).

3.2 Inštrumentácia

Systém CE pozostáva z kapiláry, roztoku elektrolytu, roztoku vzorky, zdroja vysokého napätia, dvoch elektród a detektora. Elektroforetický analyzátor je prepojený s počítačom, ktorým je prístroj ovládaný [8]. Viz. obr. 2.



Obrázok 2: Schéma kapilárnej elektroforézy (prevzaté a upravené podľa zdroja [7]).

3.2.1 Kapiláry

Kapiláry sa vyrábajú z taveného kremeňa a na ich vonkajšom povrchu sa nachádza polyimidový povlak, ktorý ich chráni pred mechanickým namáhaním (kapilára je krehká). V detekčnom mieste je malá časť povlaku odstránená, pretože polyimid je nepriepustný pre UV-žiarenie a tým neumožňuje UV-detekciu. Najčastejšie sa používajú kapiláry celkovej dĺžky 25 – 100 cm a vnútorným priemerom 20 – 100 μm . Okrem celkovej dĺžky kapiláry rozlišujeme ešte dĺžku efektívnu, ktorá predstavuje vzdialenosť medzi miestom nástriku a detekcie [2]. Vo všeobecnosti platí, že čím menší priemer, tým lepšia je dosiahnutá separačná účinnosť na úkor detekčnej citlivosti. V kapilárach s menším priemerom je zároveň generovaný menší prúd a rovnako existuje i menšie riziko vzniku Joulovho tepla [9]. Vnútorný povrch kapilár môže byť rôzne upravený – a to buď kovalentnou modifikáciou vnútornej steny kapiláry (napr. polyvinylalkoholom) alebo dynamickým potiahnutím, kedy je zlúčenina modifikujúca vnútorný povrch kapiláry prítomná priamo v základnom elektrolyte (napr. cetyltrimetylamónium bromid). Povrchová úprava je používaná za účelom zníženia adsorpcie analytov, odtienenie silanolových skupín, či k zmeneniu náboja na stene kapiláry [8]. Okrem kremenných kapilár sa v minulosti používali dnes už obsolentné sklenené kapiláry, ďalej kapiláry z teflónu a iných fluorovaných polymérov [10].

3.2.2 Termoregulácia

Do elektroforetického analyzátoru je kapilára vložená v kazete (cartridge) prispôsobenej k UV – VIS detekcii. Regulácia teploty tohto prostredia je nutná pre správny priebeh separácie. Teplota je buď regulovaná vzduchom (analyzátory Agilent a PrinCE), alebo za pomoci chladiacej kvapaliny (AB Sciex).

3.2.3 Zdroj vysokého napätia

K tomu, aby boli ióny v kapiláre uvedené do pohybu je potrebný zdroj vysokého napätia. Bežne používané sú zdroje napätia, ktoré pracujú v rozsahu 0 – 30 kV. Pracovať s napätím vyšším ako 30 kV je bez praktického využitia, hrozí ionizácia vzduchu a nebezpečenstvo vzniku elektrických výbojov. Rovnako sa môže termicky znehodnotiť analyt [11].

Rozhodujúca je i možnosť zmeny polarít systému. Ak je EOF otočený, je nevyhnutné zmeniť polaritu – tzn. nástrik vzorky prebieha na záporne nabitom konci kapiláry – katóde [2].

3.2.4. Dávkovanie vzorku

Roztok vzorku je dávkovaný do systému väčšinou na konci kapiláry, ktorý je od detektoru vzdialenejší. Zóna nastrieknutého vzorku tvorí cca 1 – 2% celkovej dĺžky kapiláry, čo predstavuje množstvo 10 – 100 nL. Prevedenie dávkovania je možné niekoľkými spôsobmi. Nadávkať vzorku môžeme za použitia tlaku, rozdielom hladín, či elektrokineticky [8].

3.2.5 Detektory [4]

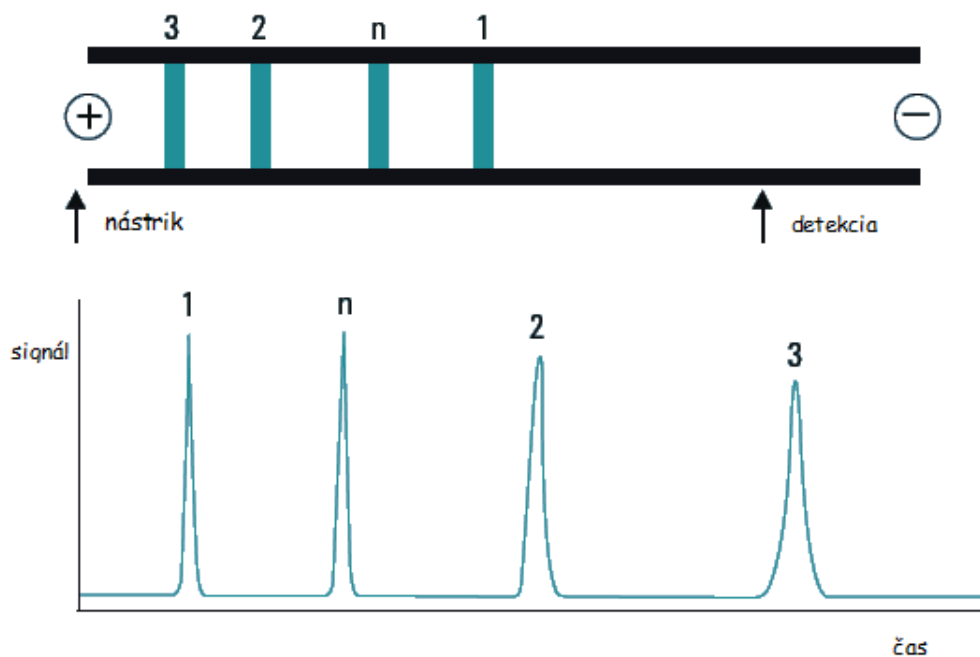
Vzhľadom k úzkemu priemeru kapiláry musia detektory vykazovať vysokú citlivosť. Najčastejšie je pohyb zón vzorku sledovaný za pomoci UV-VIS detektora. To znamená, že v určitom mieste kapiláry (detekčnom okne) je pri zvolenej vlnovej dĺžke meraná absorpcia žiarenia pohybujúceho sa základného elektrolytu a zón analytov. Zo získaného záznamu časového priebehu absorpcie, tzv. elektroferogramu, získame kvalitatívnu i kvantitatívnu informáciu. Migračný čas je kvalitatívnou charakteristikou analytu, určuje jeho identitu. Plocha pod píkom analytu je charakteristikou kvantitatívnou.

3.3 Rozdelenie elektromigračných metód podľa spôsobu separácie

3.3.1 Kapilárna zónová elektroforéza [2][6]

Najjednoduchšou formou CE je kapilárna zónová elektroforéza (CZE z angl. Capillary Zone Electrophoresis). Na kapiláru naplnenú elektrolytom sa po nadávkovaní vzorky vloží napätie. Separácia nastane na základe skutočnosti, že nabité látky za daných podmienok vykazujú rozdielne elektroforetické pohyblivosti. Vďaka tomu dôjde počas ich putovania kapilárou k oddeleniu do rôznych zón. Tie sú na detekčnom konci kapiláry určené vhodným detekčným zariadením.

Na obrázku 3 je zobrazená rozdielna migrácia 4 rozpustených látok pod vplyvom EOF. Tento princíp bol už diskutovaný v predchádzajúcich častiach textu (viz. kapitola 3.1.). Najväčšiu pohyblivosť v tomto príklade vykazuje kation (1), v zostupnom rade za ním nasledujú neutrálne látky (N), ktoré nie sú rozdelené, a dva anióny (2,3).

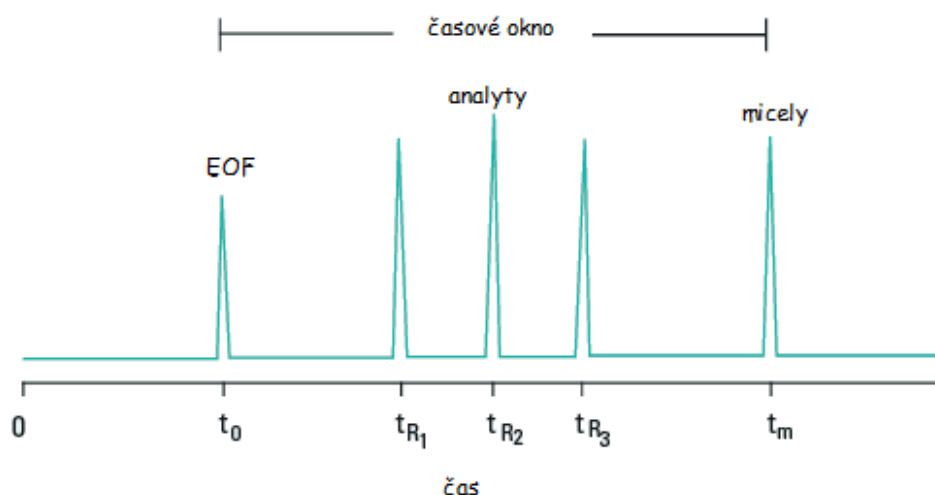


Obrázok 3: Zobrazenie separácie 4 zlučenín pomocou CZE a príslušný elektroferogram (prevzané a upravené zo zdroja [2]).

3.3.2 Micelárna elektrokinetická chromatografia [2]

Micelárna elektrokinetická chromatografia (MEKC z angl. Micellar Electrokinetic Chromatography) je hybridnou analytickou metódou, ktorá kombinuje princípy CE a chromatografie. Molekuly sa delia medzi lipofilné micely, predstavujúce pseudostacionárnu fázu a hydrofilný tlmivý roztok – fáza mobilná. Micely sú najčastejšie sférické útvary s hydrofóbnou časťou tzv. chvostíkom orientovaným dovnútra a hydrofilnou hlavičkou smerujúcou do vodného prostredia.

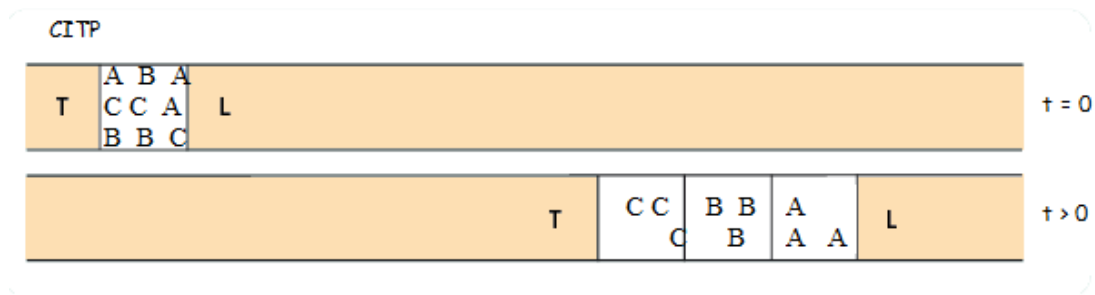
Najväčším pozitívom tejto separačnej techniky je možnosť separácie neutrálnych roztokov látok rovnako ako aj tých s nábojom. Pre separáciu je nutné do základného elektrolytu pridať surfaktant v koncentrácii prevyšujúcej kritickú micelárnu koncentráciu (CMC). K rozdeleniu neutrálnych látok dochádza vďaka pseudostacionárnej fáze v rozmezí migračných časov EOF (t_0) a micel (t_m) – viz. obrázok 4.



Obrázok 4: Elučné časové okno pre neutrálne analyty v priebehu MEKC separácie (prevzané a upravené zo zdroja [2]).

3.3.3 Kapilárna izotachoforéza [2][6]

Kapilárna izotachoforéza (CITP z angl. Capillary Isotachopheresis) je elektroforetická technika umožňujúca separáciu a detekciu skupín iónov (aniónov alebo katiónov). K separácii dochádza v kapiláre naplnenej nesúvislým systémom vedúceho (L) a terminálneho elektrolytu (T). Vedúci elektrolyt obsahuje ión s najvyššou pohyblivosťou a terminálny elektrolyt ión s pohyblivosťou najnižšou. Vzorka sa umiestni medzi L- a T- elektrolyt a po vložení konštantného elektrického prúdu dochádza k separácii. Po určitom čase sa ióny rozdelia do tesne prilahlých zón v poradí klesajúcej elektroforetickej pohyblivosti. Tieto zóny migrujú v ustálenom stave rovnakou rýchlosťou. Situáciu zobrazuje obrázok 5. Vodivostný detektor na kapiláre zaznamená prechod iónov. Výsledným záznamom je schodovitá krivka – izotachoforeogram.

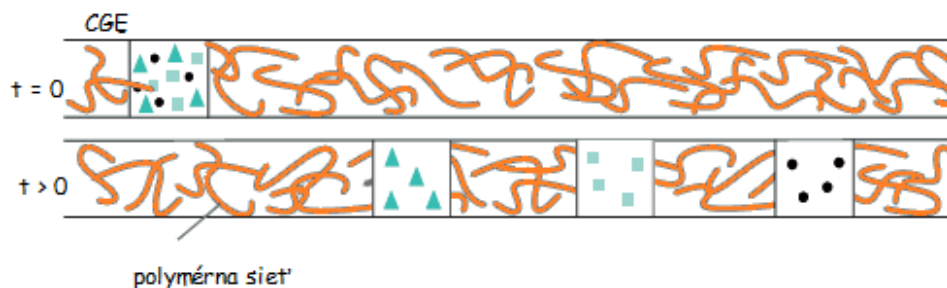


Obrázok 5: Ilustrácia CITEP, T – terminálny elektrolyt, L – vedúci elektrolyt, A, B, C – analyty, $\mu L > \mu A > \mu B > \mu C > \mu T$, (prevzané a upravené zo zdroja [2]).

3.3.4 Kapilárna gélová elektroforéza [2]

Kapilárna gélová elektroforéza (CGE z angl. Capillary Gel Electrophoresis) má široké uplatnenie v molekulárnej biológii. Využíva sa k separácii makromolekúl typu proteínov a nukleových kyselín podľa ich veľkosti. K deleniu molekúl podľa veľkosti dochádza prostredníctvom elektroforézy analytov cez vhodný polymér, ktorý slúži ako molekulárne sito. Pre upresnenie pojem gél v CGE je pomerne nejednoznačným, keď že gél je označením pevnej štruktúry, avšak väčšina „géllov“ používaných v CGE túto vlastnosť nevykazuje. Presnejším označením je teda polymérna sieť.

Nabité častice migrujúce polymérom sú ním brzdené. Väčšie častice sú spomaľované viac, z toho dôvodu je rýchlosť ich pohybu nižšia ako rýchlosť migrácie menších častíc (viz. Obrázok 6). Separačný mechanizmus je rovnaký ako u planárnej gelovej elektroforézy. S tým rozdielom, že kapilárne prevedenie je spojené s množstvom výhod ako je aplikácia 10 – 100 x vyššieho napätia bez nežiadúceho pôsobenia Joulovho tepla, možnosť automatizácie a on-line detekcia priamo v kapiláre.

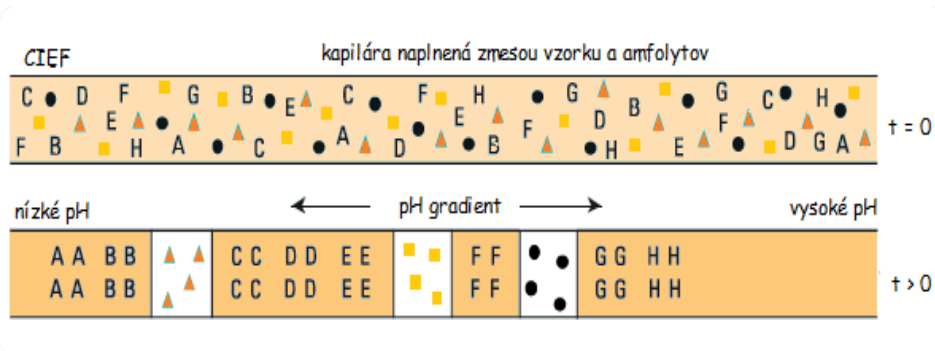


Obrázok 6: Schéma znázorňujúca separáciu v CGE, symboly ● ▲ ■ predstavujú molekuly proteínov $M_r \blacktriangle > M_r \blacksquare > M_r \bullet$, (prevzané a upravené zo zdroja [2]).

3.3.5 Izoelektrická fokusácia [2]

Kapilárna izoelektrická fokusácia (CIEF z angl. Capillary Isoelectric Focusing) je elektroforetickou technikou s vysokým rozlíšením, používanou pre separáciu proteínov a peptidov na základe ich rozdielneho izoelektrického bodu pI. pH gradient sa vytvorí vo vnútri kapiláry po naplnení roztokom amfolytov (zwitteriónové molekuly obsahujúce bázickú i kyslú časť) a analytom (v prípade CIEF je analytom roztok proteínov, peptidov). Na katodickom konci je roztok bázický (napr. roztok NaOH), na konci anodickom kyslý (napr. roztok H₃PO₄). Vloženie napätia dá do pohybu nabité proteíny a amfolyty, ktoré migrujú vyplnenou kapilárou až do miesta kde je pH rovnaké ako ich pI. V tomto mieste je kladný a záporný náboj amfotérneho analytu v rovnováhe a migrácia ustáva. Situáciu zobrazuje obrázok 7.

EOF by mohol spôsobiť vytlačenie amfolytov z kapiláry ešte pred fokusáciu a preto musí byť počas CIEF redukovaný či úplne eliminovaný [12].

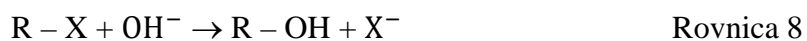


Obrázok 7: Schéma znázorňujúce separáciu v CIEF. A, B, C, D, E, F, G, H predstavujú molekuly amfolytov, Symboly ● ▲ ■ predstavujú analyty, napríklad peptidy, proteíny, pI ● > pI ■ > pI ▲ (prevzané a upravené zo zdroja [2]).

3.4 Nukleofilné substitúcie [13][14]

Podstatou nukleofilných substitučných reakcií (SN) je, že atakujúce činidlo (nukleofil) svojím voľným elektrónovým párom vytvára novú väzbu s reaktantom. Z pôvodnej väzby odstupuje odstupujúca skupina rovnako nukleofilnej povahy s dvojicou elektrónov pôvodnej väzby.

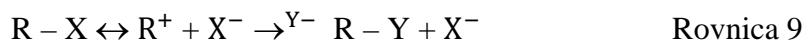
Činidlom môže byť neutrálna molekula alebo záporne nabitý ión. Činidlo musí mať voľný elektrónový pár tj. všetky nukleofily sú zároveň Lewisovými zásadami.



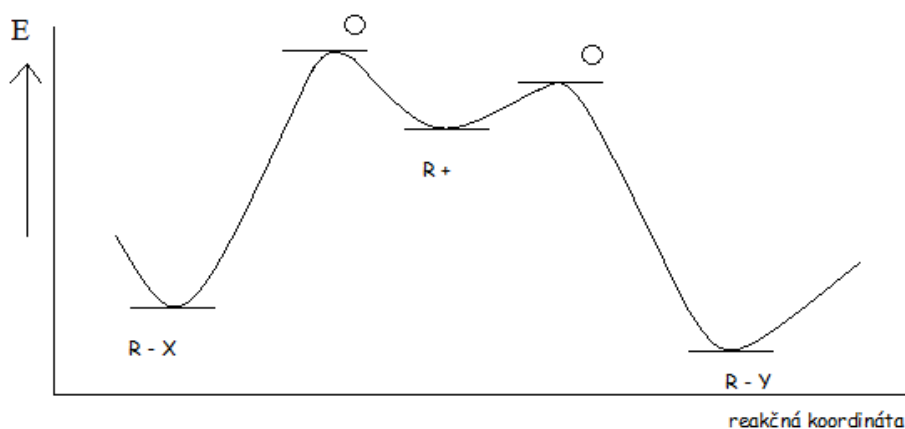
Podľa stupňa určujúceho rýchlosť priebehu reakcie a spôsobu štiepenia starej väzby uhlík – odstupujúca skupina, delíme nukleofilné substitúcie na monomolekulové a bimolekulové.

3.4.1 Nukleofilné substitúcie monomolekulové (SN1) [13]

Ich reakčný mechanizmus je dvojstupňovým procesom. K heterolýze väzby a k vzniku karbkatiónu dochádza v priebehu prvého stupňa. Karbkatión v rýchlom druhom stupni reaguje s nukleofilom. Rýchlosť spravidla určuje ten najpomalší reakčný stupeň, ktorý je energeticky náročnejší a obyčajne ním býva štiepenie väzby. Vzhľadom na to, že k štiepeniu väzby dochádza len na jednej molekule, reakcia je označená ako monomolekulová nukleofilná substitúcia (SN1).



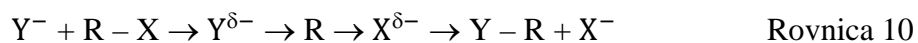
Energetický diagram má dve maximá, prvé maximum značí vznik solvatovaného iónového páru R...X. Druhé maximum značí vznik nového solvatovaného páru karbkatiónu a nukleofilu. Situáciu ilustruje obrázok 8.



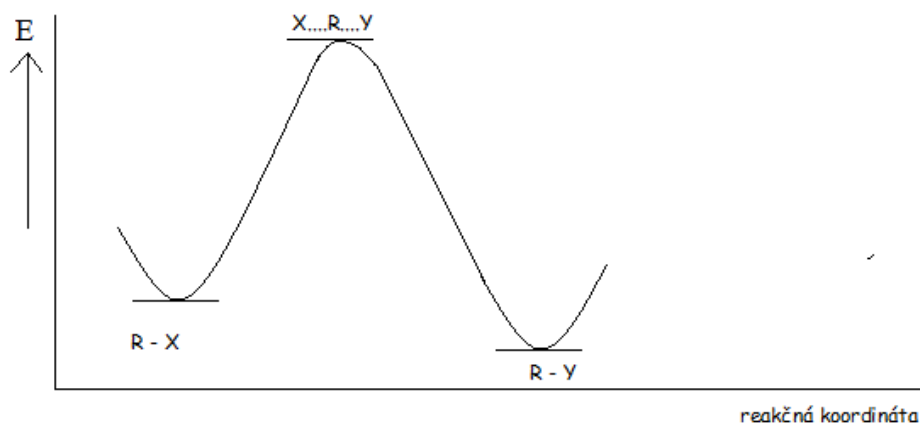
Obrázok 8: Energetický diagram priebehu monomolekulových reakcií (prevzané a upravené zo zdroja [13]).

3.4.2 Nukleofilné substitúcie bimolekulárne (SN2) [14]

Reakčný mechanizmus bimolekulárnych nukleofilných substitúcií (SN2) je jednostupňový proces, v priebehu ktorého dochádza súčasne k nukleofilnému ataku i k oslabeniu kovalentnej väzby odstupujúcej skupiny. Reakcia má jeden stupeň a ten určuje rýchlosť jej priebehu.



Energetický diagram má v prípade (SN2) jedno maximum. Situáciu ilustruje obrázok 9.



Obrázok 9: Energetický diagram priebehu bimolekulárnych reakcií (prevzané a upravené zo zdroja [13]).

3.4.3 Faktory ovplyvňujúce nukleofilné substitúcie [13][14]

Medzi hlavné faktory určujúce rýchlosť a priebeh SN reakcií patrí charakter substrátu, charakter/sila nukleofilného činidla, charakter odstupujúcej skupiny a rozpúšťadlo, v ktorom nukleofilná substitúcia prebieha.

1. Substrát

Pre SN1 reakciu je kľúčová stabilita vzniknutého karbkatiónu. Preto SN1 reakcie prebiehajú preferenčne u terciálnych alkyl, allyl či benzylhalogenidov. Naopak, SN2 mechanizmus je u týchto štruktúr zo sterických dôvodov menej pravdepodobný. Preto SN2 mechanizmus prebieha veľmi dobre u metylhalogenidov či primárnych a sekundárnych alkylhalogenidov.

2. Nukleofilné činidlo

Nukleofil sa v prípade SN1 mechanizmu nezúčastňuje kroku určujúceho rýchlosť priebehu reakcie, tým pádom nemá vplyv na rýchlosť takejto reakcie. Inak je tomu v prípade SN2 mechanizmu, počas ktorého sa nukleofilné činidlo priamo zúčastňuje kroku určujúceho rýchlosť reakcie. Preto čím väčšia je nukleofilita, tým rýchlejší bude priebeh SN2 reakcií a naopak. Bázické, záporne nabité nukleofily sú obecné reaktívnejšie ako neutrálne nukleofily.

V prípade nukleofilných činidiel s veľmi malou nukleofilnou silou môže dokonca dôjsť k zmene mechanizmu z bimolekulového na monomolekulový.

3. Charakter odstupujúcej skupiny

Dobre odstupujúce skupiny zvyšujú rýchlosti reakcie. Čím je odstupujúca skupina slabšou zásadou, tým je reakcia rýchlejšia. Reaktivita rastie napríklad v rade Cl^- , Br^- a I^- .

4. Rozpúšťadlo

Na rýchlosť a mechanizmus priebehu nukleofilných substitúcií má podstatný vplyv aj rozpúšťadlo a jeho solvatačná schopnosť. Solvatácia je interakcia medzi molekulami rozpúšťanej látky a rozpúšťadla. Je spôsobená príťažlivými elektrickými silami dipólov. V prípade, že je substrát polárny, molekuly polárneho rozpúšťadla sú k nemu príťahované. Čím polárnejšie je rozpúšťadlo, tým je samotné príťahovanie silnejšie a tým pádom systém vykoná viac elektrostatickej práce, viac energie sa uvoľní a systém je stabilnejší.

Na základe vyššie uvedeného, pre SN_1 reakcie sú výhodné rozpúšťadlá s vysokou polaritou, tým že stabilizujú prechodne vzniknutý karbkatión.

Pre väčšinu SN_2 reakcií je typické, že pôvodný náboj je rozptýlený v tranzitnom stave. Vzhľadom k tejto skutočnosti je vplyv polárneho rozpúšťadla nežiadúci, reakciu spomaľujúci. Naopak, priebeh SN_2 reakcií je rýchlejší v polárnych aprotických rozpúšťadlách ako je dimetylsulfoxid či acetonitril, v ktorých nie je nukleofilné činidlo solvatované.

4. Experimentálna časť

4.1 Chemikálie

4.1.1 Chemikálie použité k príprave základných elektrolytov

- Dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát, $\geq 99,0\%$; Sigma-Aldrich
- Hydroxid sodný, Merck
- Kyselina mravenčia, $\geq 98\%$; Sigma-Aldrich
- Kyselina octová, $\geq 99,7\%$; Sigma-Aldrich
- Metanol; Chromasolv pre HPLC, $\geq 99,9\%$, Sigma Aldrich
- Voda, ultra-čistá, pripravená systémom Milli-Q, Milipore, USA (odpor 18 $M\Omega \cdot cm^{-1}$

4.1.2 Štandardy zlúčenín a analyty

- α -brómfenyloctová kyselina, 98%, Sigma Aldrich; Šarža: #STBD6288V
- α -brómfenyloctová kyselina, 98%, Sigma Aldrich; Šarža: #STBF9755V
- α -metoxyfenyloctová kyselina, 99%, Sigma Aldrich; Šarža: #BCBT8707
- mandľová kyselina (α -hydroxyfenyloctová kyselina), 99%, Sigma Aldrich; Šarža: #BCBF9033V
- bromid draselný $\geq 99,0\%$, Sigma Aldrich; Šarža: MKBX2670V

4.2 Prístrojové vybavenie

- Kapilárna elektroforéza CE 7100, Agilent Technologies, Waldbronn, Nemecko
- pH meter Sentron SI 400 s pH elektrodou Sentron SI (rozsah 0-14); Sentron, Holandsko
- MicroSolv Window Maker, MicroSolv Technology Corporation, Leland, Spojené štáty americké
- ďalšie štandardné prístrojové vybavenie laboratória ako napríklad váhy, ultrazvuková lázeň, mikropipety, ...

4.3 Podmienky merania

K analýzam vo fosfátovom a octanovom pufri sa používala kremenná kapilára s vnútorným priemerom 50 μm a celkovou dĺžkou 48,5 cm. Efektívna dĺžka kapiláry bola 40 cm. Analýzy v mravenčanovom pufri sa uskutočňovali v kremennej kapiláre s celkovou dĺžkou 33 cm a efektívnou dĺžkou 24,5 cm o vnútornom priemere 50 μm . Merania sa uskutočňovali v miestnosti klimatizovanej na 25°C. Roztoky používané k analýzam boli uskladnené v chladničke. Analyzovaná vzorka bola dávkovaná pri tlaku 50 mBar počas 5 sekúnd. Teplota kapiláry bola 25°C. Pri separáciách vo fosfátovom pufri prebiehali analýzy pri +20 kV, v prípade octanového pufru pri +30 kV (detekcia na katodickom konci kapiláry). Separácie v mravenčanovom pufri prebiehali pri -30 kV (detekcia na anodickom konci kapiláry). Analyty boli detekované pri 200 nm. Pre väčšiu prehľadnosť sú konkrétne podmienky meraní vždy uvedené i v časti diskusia a výsledky. Základné elektrolyty a ich zloženie je uvedené v kapitole 4.4.

4.3.1 Kondicionácia a premytie kapilár

Pred prvým použitím bola kapilára premytá 1 M roztokom hydroxidu sodného po dobu 30 minút, 0,1 M hydroxidom sodným 30 minút a na záver vodou 10 minút. Každý deň, pred prvým a po poslednom meraní, bola kapilára prepláchnutá 10 minút 1 M NaOH a 10 minút vodou. Premytie 1 M NaOH 3 minúty, vodou 10 minút a vlastným elektrolytom po dobu 3 minút a za tlaku 1000 mBar prebehlo vždy pred každou analýzou vo fosfátovom a octanovom pufri. Premytie 10 minút vodou a vlastným elektrolytom po dobu 3 minút prebehlo vždy pred každou analýzou v mravenčanovom pufri.

4.4 Základné roztoky elektrolytov a ich príprava

Tlmivé roztoky boli pred umiestnením do vialiek prefiltrované pomocou nylonových filtrov s veľkosťou pórov 0,45 μm (Agilent Technologies, Waldbronn, Nemecko).

4.4.1 Príprava 50 mM fosfátového pufru, pH 7,5

Navážka 780 mg $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ bola rozpustená v kadičke v približne 30 ml vody. Roztokom 1 M NaOH bolo pH upravené na hodnotu 7,5. Vzniknutý roztok bol kvantitatívne prevedený do 100 ml odmernej banky a doplnený vodou po rysku.

4.4.2 Príprava 60 mM octanového pufru, pH 5,0

0,347 ml kyseliny octovej ($\geq 99,7\%$) bolo napipetované do kadičky s cca 30 ml vody; pH bolo upravené 1 M roztokom NaOH na hodnotu 5,0. Roztok bol kvantitatívne prevedený do 100 ml odmernej banky a doplnený vodou po rysku.

4.5 Príprava roztokov štandardov od modelových analytov

Všetky pripravené roztoky boli uchovávané v chladničke pri teplote 5 – 8 °C.

4.5.1 Príprava zásobných roztokov

Do 5 ml odmernej banky bolo navážených 5,0 mg príslušného štandardu (α -brómfenylactová kyselina, α -metoxyfenylactová kyselina, mandľová kyselina, bromid draselný). Navážky jednotlivých štandardov boli v odmernej banke rozpustené v čistom metanole a následne ním doplnené po rysku. Pre uľahčenie procesu rozpúšťania bola použitá ultrazvuková lázeň (po dobu 3 minút). Koncentrácia zásobných roztokov pripravených týmto postupom bola 1 mg/ml.

4.5.2 Príprava pracovných roztokov

Pracovné roztoky α -brómfenylactovej kyseliny, α -metoxyfenylactovej kyseliny, mandľovej kyseliny a bromidu draselného boli pripravené nariadením konkrétnych zásobných roztokov. Do mikroskúmavky typu Eppendorf bolo napipetované množstvo zásobného roztoku tak, aby koncentrácia pracovného roztoku odpovedala koncentrácii 100 $\mu\text{g/ml}$. Napipetovaný objem bol čistým metanolom doplnený a riadne premiešaný.

Pri príprave pracovných roztokov v 50% metanole sa postupovalo analogicky t.j. bol pripravený zásobný roztok v 50% MeOH, ktorý bol následne 50% MeOH nariadený.

Príklad: Presná navážka α -brómfenylactovej kyseliny činila 4,92 mg a bola rozpustená v 5 ml čistého metanolu. Vznikol zásobný roztok o koncentrácii 0,984 mg/ml. K príprave 1 ml pracovného roztoku o koncentrácii 100 $\mu\text{g/ml}$ bola použitá zmiešavacia rovnica (viz. rovnica 11).

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

Rovnica 11

$$984 \cdot V_1 + 0 \cdot V_2 = 100 \cdot 1000$$

$$984 \cdot V_1 = 100000$$

$$V_1 = 101,63 \mu\text{l}$$

$$V_2 = 1000 - V_1$$

$$V_2 = 898,37 \mu\text{l}$$

c	koncentrácia [$\mu\text{g}/\text{ml}$]
V	objem [μl]
1	zásobný roztok
2	100% (v/v) metanol
3	pracovný roztok

Výsledkom zmiešavacej rovnice je objem zásobného roztoku (V_1), ktorý činil 101,63 μl a bolo k nemu pridaných 898,37 μl 100% metanolu (V_2).

4.6 Výpočty

Elektroforetická pohyblivosť

Viz. rovnica 6 v kapitole 3.1.1.

Rozlíšenie (Rs) [15]

$$R_s = \frac{1,18 \cdot (t_{R2} - t_{R1})}{w_{h1} + w_{h2}} \quad \text{Rovnica 12}$$

$$t_{R2} > t_{R1}$$

t_{R1}, t_{R2} migračné časy [s]

w_{h1}, w_{h2} šírky píkov v polovici ich výšky [s]

Opakovateľnosť [15]

1. Priemer hodnôt

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} \quad \text{Rovnica 13}$$

2. Smerodatná odchylka (SD)

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad \text{Rovnica 14}$$

n – počet jednotlivých meraní

x_i – hodnota výsledku jednotlivého merania

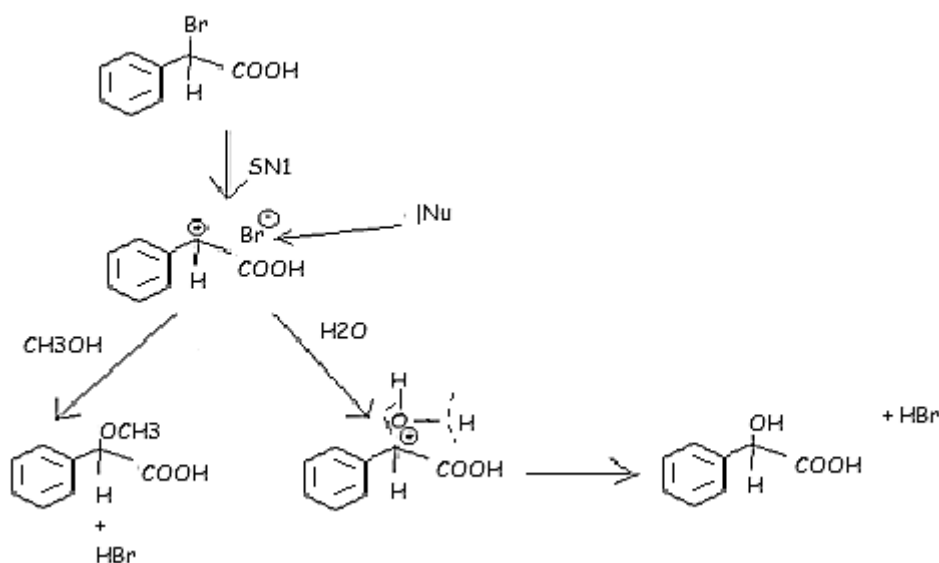
3. Relatívna smerodatná odchylka (RSD)

$$RSD = 100 \cdot \frac{SD}{\bar{x}} \quad \text{Rovnica 15}$$

5. Výsledky a diskusia

5.1 Fyzikálne-chemické vlastnosti analytů

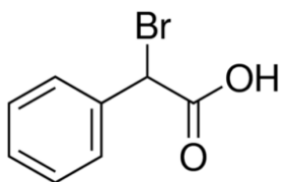
V nasledujúcom texte sú uvedené základné fyzikálne-chemické vlastnosti α -brómfenyloctovej kyseliny a potenciálnych produktov, ktoré môžu vzniknúť pri nukleofilnej substitúcii v prostredí 50% vodného metanolickeho roztoku. Na obrázku č. 10 je zobrazené reakčné schéma nukleofilnej substitúcie α -brómfenyloctovej kyseliny v 50% roztoku MeOH vo vode. Vzhľadom k tomu, že reakčným prostredím je protické polárne rozpúšťadlo, ktoré solvatáciou znižuje energiu prechodného stavu vedúceho ku vzniku karbkatiónu, je predpokladaným reakčným mechanizmom monomolekulárna nukleofilná substitúcia vedúca ku vzniku kyseliny mandľovej (nukleofilom je voda) a α -metoxyfenyloctovej kyseliny (nukleofilom je MeOH). V čisto metanolickeom prostredí bude SN1 reakciou vzniknúť iba α -metoxyfenyloctová kyselina. Keďže je metanol menej polárny ako voda, možno predpokladať, že SN1 reakcia bude v 50% MeOH prebiehať rýchlejšie ako v čistom MeOH [14].



Obrázok 10: Schéma nukleofilnej substitúcie α -brómfenyloctovej kyseliny v 50% roztoku MeOH vo vode.

5.1.1 α -brómfenyloctová kyselina

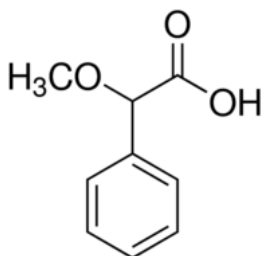
α -brómfenyloctová kyselina, chemicky 2-bróm-2-fenyloctová kyselina (skrátene BrPhAcA) je biela kryštalická látka, dobre rozpustná v polárnych organických rozpúšťadlách. Hodnota pK_a karboxylovej skupiny je $2,40 \pm 0,10$ [1][16].



Obrázok 11: Štruktúrny vzorec α -brómfenylactovej kyseliny.

5.1.2 α -metoxyfenylactová kyselina

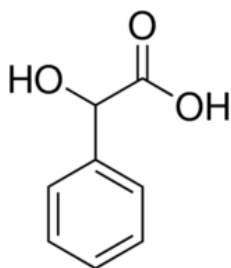
α -metoxyfenylactová kyselina, chemicky 2-metoxy-2-fenylactová kyselina (skrátene MetPhAcA) má kryštalickú štruktúru a biely až žltkavý vzhľad. Je dobre rozpustná v polárnych organických rozpúšťadlách. Hodnota pK_a karboxylovej skupiny je 4,14 [17].



Obrázok 12: Štruktúrny vzorec α -metoxyfenylactovej kyseliny

5.1.3 α -hydroxyfenylactová kyselina

α -hydroxyfenylactová kyselina, chemicky 2-hydroxy-2-fenylactová kyselina je známa aj pod názvom kyselina mandľová (skrátene MA). Je to biela, pevná, kryštalická látka, dobre rozpustná vo vode a v polárnych organických rozpúšťadlách. Hodnota pK_a karboxylovej skupiny je 3,41 [16].



Obrázok 13: Štruktúrny vzorec α -hydroxyfenylactovej kyseliny.

5.2 Analýza α -brómfenyloctovej kyseliny a jej potenciálnych nečistôt pomocou kapilárnej zónovej elektroforézy

Na základe vyššie uvedených pKa hodnôt jednotlivých analytov boli prevedené separácie v 50 mM fosfátovom pufri o pH 7,5, v ktorom sú všetky tri analyty plne ionizované. Zloženie tohto elektrolytu odpovedá zloženiu pufru, ktorý bol použitý v publikácii Rizviho a Shamsiho [1] len s tým rozdielom, že do BGE tohto zloženia nebol pridaný chirálny selektor. Pre separáciu α -brómfenyloctovej kyseliny a jej rozkladných produktov bol tiež použitý 60 mM octanový pufr o pH 5,0 v ktorom je α -brómfenyloctová kyselina plne ionizovaná a ďalšie dve kyseliny MetPhAcA a MA sú čiastočne ionizované. Ďalším testovaným elektrolytom bol 60 mM mravenčanový pufr o pH 3,0. I v tomto výrazne kyslom elektrolyte sú všetky tri analyty čiastočne záporne nabité a tak migrujú ako anióny. Keďže je EOF v takto silne kyslom BGE výrazne potlačený, bolo nutné separovať pri obrátenej polarite, kedy boli analyty detekované na anodickom konci kapiláry.

Pre kvantifikáciu bola použitá metóda normalizácie. Pre výpočet korigovaných plôch bola plocha každého píku vydelená príslušným migračným časom (A/t), aby bol kompenzovaný posun migračných časov medzi analýzami a rozdiel v odozvách zložiek vzorky s rôznymi migračnými časmi. Množstvo BrPhAcA a rozkladných produktov bolo vypočítané ako percentuálny podiel príslušnej korigovanej plochy (A/t , %) zo sumy korigovaných plôch všetkých píkov na príslušnom zázname [15].

5.2.1 Analýza α -brómfenyloctovej kyseliny v 50 mM fosfátovom pufri o pH 7,5

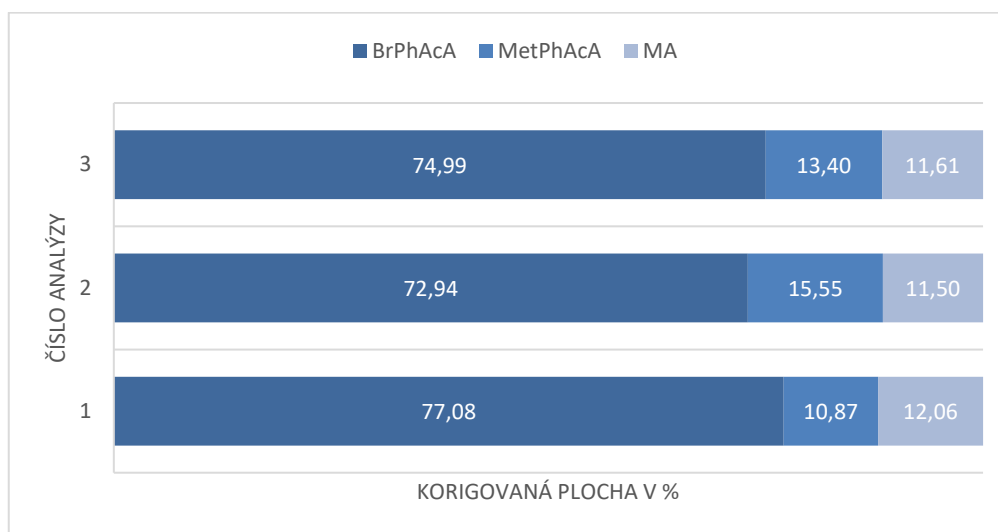
Všetky analýzy vo fosfátovom pufri prebiehali v FS kapiláre s celkovou dĺžkou 48,5 cm a efektívnou dĺžkou 40,0 cm. Vnútorý priemer kapiláry bol 50 μ m. Na kapiláru bolo vložené napätie +20 kV.

Kyselina α -brómfenyloctová bola k analýze pripravená v koncentrácii 2,5 mg/ml a rozpustená v 50% metanole (Tab. 1), čo odpovedá koncentrácii analytu, ktorá bola použitá v publikácii Rizviho a Shamsiho [1]. Za týchto podmienok sú na elektroferograme zrejme tri píky. Zároveň je intenzita signálu neúmerne vysoká (> 200 mAU) a tak bolo ďalej pracované s roztokmi s koncentráciou 100 μ g/ml v čisto metanolickej prostredí (Tab. 2, 3, 4).

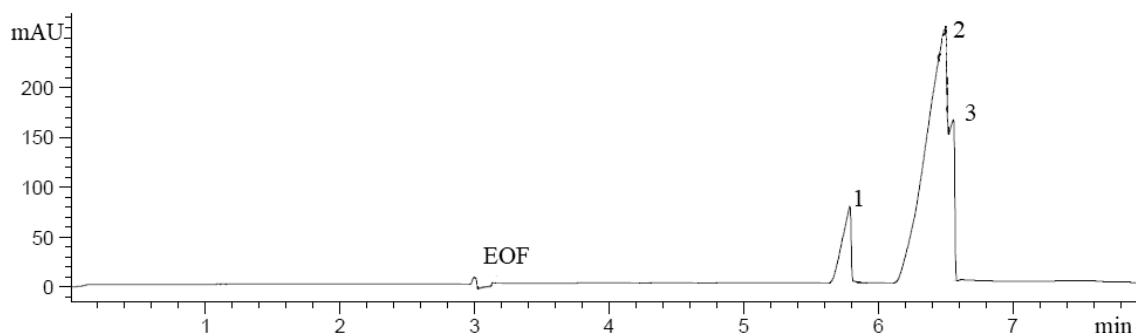
Ako vidieť na zázname (Obr. 15) okrem BrPhAcA (pík 2) je prítomná MetPhAcA (pík 1) a MA (pík 3). Zatiaľ, čo pík MetPhAcA je dostatočne rozseparovaný od píku BrPhAcA (rozlíšenie 3,23), tak pík MA v podstate nie je od píku BrPhAcA oddelený.

Tabuľka 1: Analýza α -brómfenylactovej kyseliny s koncentráciou 2,5 mg/ml, rozpustená v 50% metanole. BGE: 50 mM fosfátový pufr, pH 7,5. Analýza bez oplachu inletovej elektródy; $n = 3$.

	t (min)	μ_a (cm ² /Vs)	μ_e (cm ² /Vs)	μ_{EOF} (cm ² /Vs)	rozlíšenie
MetPhAcA	5,76	2,81.10 ⁻⁴	-2,36.10 ⁻⁴	5,17.10 ⁻⁴	-
SD	0,03	1,44.10 ⁻⁶	2,95.10 ⁻⁷	1,17.10 ⁻⁶	-
RSD	0,51	0,51	0,13	0,23	-
BrPhAcA	6,45	2,51.10 ⁻⁴	-2,66.10 ⁻⁴	5,17.10 ⁻⁴	3,23
SD	0,05	1,81.10 ⁻⁶	6,52.10 ⁻⁷	1,17.10 ⁻⁶	0,03
RSD	0,72	0,72	0,25	0,23	1,00
MA	6,51	2,48.10 ⁻⁴	-2,69.10 ⁻⁴	5,17.10 ⁻⁴	0,34
SD	0,05	1,76.10 ⁻⁶	6,00.10 ⁻⁷	1,17.10 ⁻⁶	0,03
RSD	0,71	0,71	0,22	0,23	7,33



Obrázok 14: Graf zobrazujúci zmenu korigovanej plochy analytu BrPhAcA v 50% MeOH. Tri po sebe nasledujúce analýzy za podmienok uvedených v Tabuľke 1. (analýza bez oplachu inletovej elektródy).

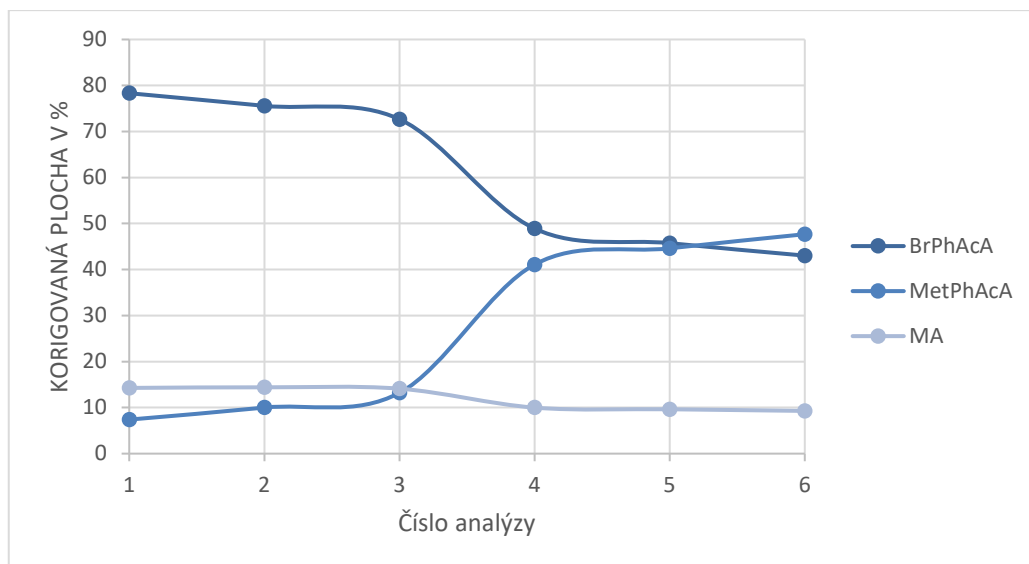


Obrázok 15: Elektroferogram 2. analýzy α -brómfenylactovej kyseliny s koncentráciou 2,5 mg/ml, rozpustenej v 50% metanole. BGE: 50 mM fosfátový pufr, pH 7,5 (1 – MetPhAcA, 2 – BrPhAcA, 3 – MA).

Analýzou roztoku BrPhAcA v čistom metanole bol predpokladaný vznik iba MetPhAcA a nie MA. Avšak výsledok analýzy tento predpoklad nepotvrdil. Ako je vidieť na obrázku 18, na elektroferograme bol okrem píku α -metoxyfenylactovej kyseliny (pík 1) prítomný i pík kyseliny mandľovej (pík 3). Z tohto pozorovania možno urobiť predbežný záver, že kyselina mandľová vzniká pravdepodobne len v priebehu separácie vo fosfátovom puffri, pretože jej percentuálne zastúpenie sa v čase mení len nepatrne (14,28 – 9,28%), zatiaľ čo množstvo kyseliny MetPhAcA sa v priebehu niekoľkých hodín zvýšilo z 7,40% na 47,68% (viz obrázok 16). Identifikácia jednotlivých analytov bola prevedená metódou štandardného prídavku k roztoku BrPhAcA i analýzou samostatných roztokov jednotlivých produktov reakcie (viz. Kap. 10.1).

Tabuľka 2: Analýza α -brómfenylactovej kyseliny (STBD6289V) s koncentráciou 100 μ g/ml, rozpustená v 100% metanole. BGE: 50 mM fosfátový pufr, pH 7,5. Analýza bez oplachu inletovej elektródy; $n = 6$.

	t (min)	μ_a (cm ² /Vs)	μ_e (cm ² /Vs)	μ_{EOF} (cm ² /Vs)	rozlíšenie
MetPhAcA	5,63	$2,87 \cdot 10^{-4}$	$-2,41 \cdot 10^{-4}$	$5,28 \cdot 10^{-4}$	-
SD	0,06	$2,83 \cdot 10^{-6}$	$7,15 \cdot 10^{-6}$	$9,40 \cdot 10^{-6}$	-
RSD	0,99	0,99	2,97	1,78	-
BrPhAcA	6,07	$2,66 \cdot 10^{-4}$	$-2,62 \cdot 10^{-4}$	$5,28 \cdot 10^{-4}$	7,43
SD	0,08	$3,68 \cdot 10^{-6}$	$6,63 \cdot 10^{-6}$	$9,40 \cdot 10^{-6}$	0,83
RSD	1,38	1,38	2,53	1,78	11,17
MA	6,14	$2,63 \cdot 10^{-4}$	$-2,65 \cdot 10^{-4}$	$5,28 \cdot 10^{-4}$	0,89
SD	0,08	$3,44 \cdot 10^{-6}$	$6,75 \cdot 10^{-6}$	$9,40 \cdot 10^{-6}$	0,06
RSD	1,31	1,31	2,55	1,78	6,90

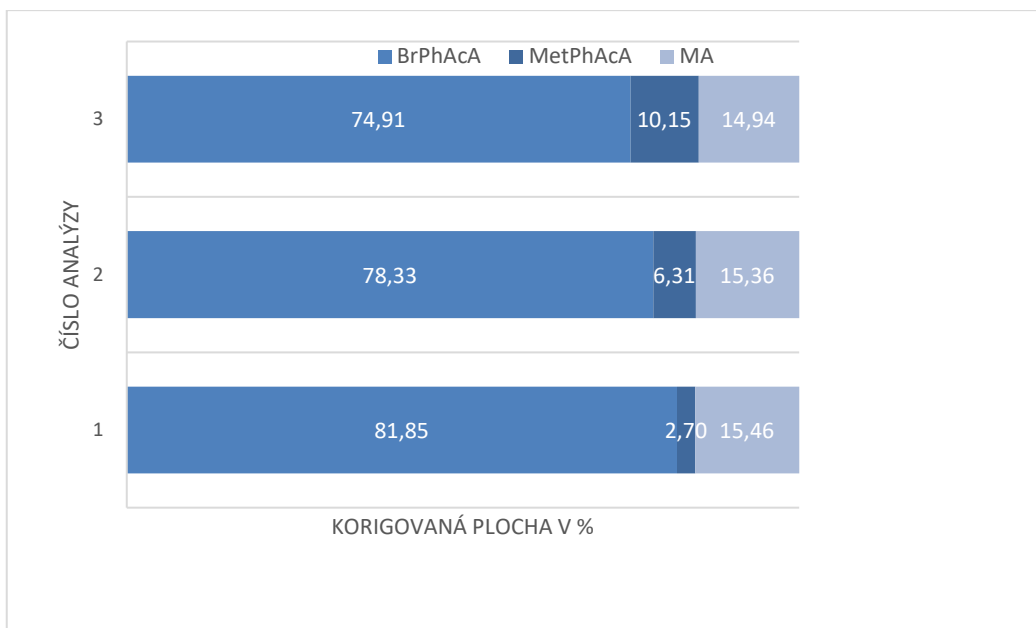


Obrázok 16: Graf zobrazujúci zmenu korigovanej plochy BrPhAcA (STBD6289V) v 100% MeOH za podmienok uvedených v Tab. 2. Analýzy 1-3 prebehli priamo za sebou, rovnako tak analýzy 4-6. Medzi 3. a 4. analýzou bol časový rozostup 5 hodín. Všetky nástriky boli vykonané z jednej vialky. Analyzovaný roztok bol pred prvou analýzou pripravený 24 hodín vopred. Analýza bez oplachu inletovej elektródy.

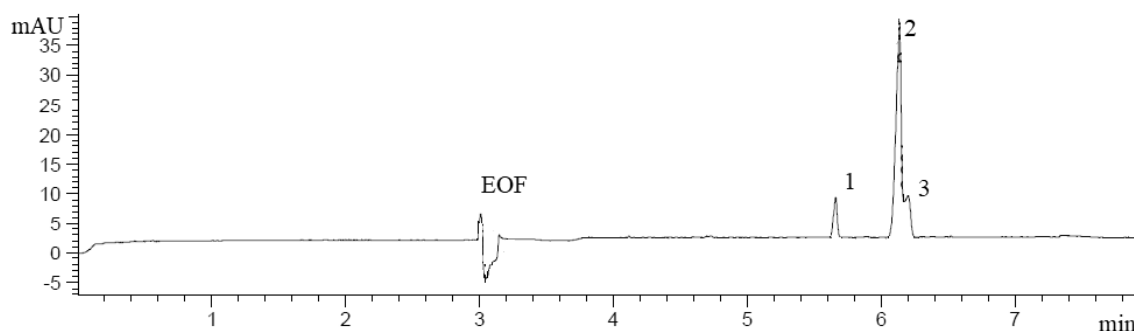
Pre overenie správnosti výsledkov bola rovnaká analýza prevedená i s inou šaržou BrPhAcA. Ako je vidieť z výsledkov uvedených v tabuľke 3 a obrázkoch 17 a 18, je správanie oboch testovaných šarží (STBD6289V a STBF9755V) BrPhAcA analogické. Percentuálne zastúpenie plochy MA je medzi analýzami 1-3 v podstate nemenné (14,94-15,46%), zatiaľ čo korigovaná plocha MetPhAcA rastie od prvej ku tretej analýze (z 2,70 na 10,15%).

Tabuľka 3: Analýza α -brómfenyloctovej kyseliny (STBF9755V) s koncentráciou 100 $\mu\text{g/ml}$, rozpustená v 100% metanole. BGE: 50mM fosfátový pufr, pH 7,5. Analýza bez oplachu inletovej elektródy; $n=3$.

	t (min)	μ_a (cm^2/Vs)	μ_e (cm^2/Vs)	μ_{EOF} (cm^2/Vs)	rozlíšenie
MetPhAcA	5,69	$2,84 \cdot 10^{-4}$	$-2,44 \cdot 10^{-4}$	$5,28 \cdot 10^{-4}$	-
SD	0,03	$1,57 \cdot 10^{-6}$	$1,06 \cdot 10^{-6}$	$2,61 \cdot 10^{-6}$	-
RSD	0,55	0,55	0,44	0,50	-
BrPhAcA	6,18	$2,62 \cdot 10^{-4}$	$-2,66 \cdot 10^{-4}$	$5,28 \cdot 10^{-4}$	7,61
SD	0,04	$1,78 \cdot 10^{-6}$	$8,69 \cdot 10^{-7}$	$2,61 \cdot 10^{-6}$	0,03
RSD	0,68	0,68	0,33	0,50	0,35
MA	6,24	$2,59 \cdot 10^{-4}$	$-2,69 \cdot 10^{-4}$	$5,28 \cdot 10^{-4}$	0,79
SD	0,04	$1,68 \cdot 10^{-6}$	$9,65 \cdot 10^{-7}$	$2,61 \cdot 10^{-6}$	0,03
RSD	0,65	0,65	0,36	0,50	3,20



Obrázok 17: Graf zobrazujúci zmenu korigovanej plochy analytu BrPhAcA (STBF9755V) v 100% MeOH za podmienok uvedených v Tab. 3. Analýza bez oplachu inletovej elektródy.

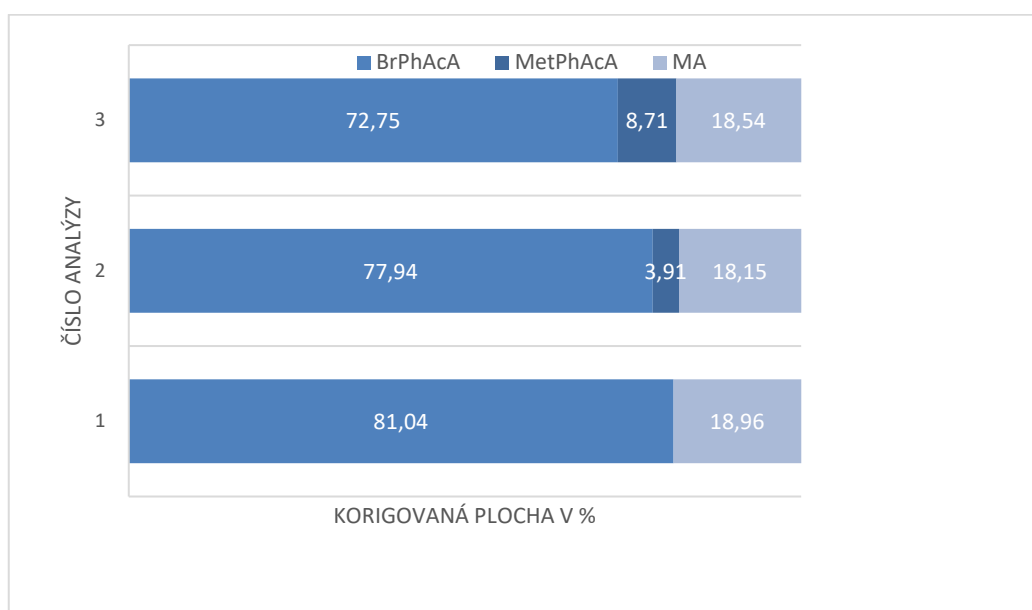


Obrázok 18: Elektroferogram 1.analýzy α -brómfenylactovej kyseliny (STBF9755V) s koncentráciou 100 $\mu\text{g/ml}$, rozpustenej v 100% metanole. BGE: 50 mM fosfátový pufr, pH 7,5. (1 – MetPhAcA, 2 – BrPhAcA, 3 – MA). Analýza bez oplachu inletovej elektródy.

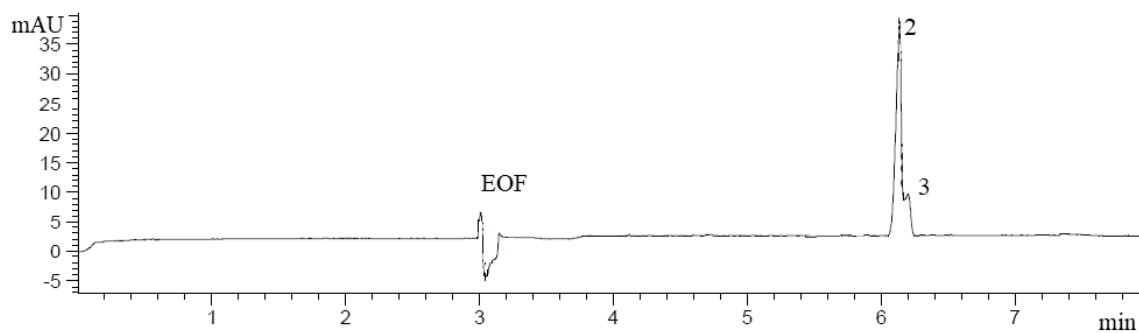
Keďže bola vzorka umiestnená vo vialke o objeme 250 μl , tak bol tiež sledovaný vplyv nárastu plochy MetPhAcA s ohľadom na oplach inletovej elektródy metanolom. Oplach inletovej elektródy roztokom metanolu bol automaticky prevedený medzi premytím kapiláry príslušným BGE a vlastným hydrodynamickým nadávkovaním vzorky. Ako je vidieť na obrázku 19, tak je nárast plochy MetPhAcA pomalší ako keď oplach inletovej elektródy nebol použitý. Toto možno vysvetliť i tým, že stopy neutrálneho fosfátového pufru môžu nukleofilnú substitúciu urýchliť, napríklad stabilizáciou vzniknutého karbkatiónu v prípade predpokladaného SN1 mechanizmu.

Tabuľka 4: Analýza α -brómfenyloctovej kyseliny (STBF9755V) s koncentráciou 100 $\mu\text{g/ml}$, rozpustená v 100% metanole. BGE: 50 mM fosfátový pufr, pH 7,5. Analýza s oplachom inletovej elektródy; $n = 3$. *vľadom k skutočnosti, že MetPhAcA nevznikla počas prvej analýzy rozlíšenie BrPhAcA je spriemerované z dvoch analýz, a tým pádom SD a RSD nie je uvedené.

	t (min)	μ_a (cm^2/Vs)	μ_e (cm^2/Vs)	μ_{EOF} (cm^2/Vs)	rozlíšenie
MetPhAcA	6,11	$2,65 \cdot 10^{-4}$	$-2,50 \cdot 10^{-4}$	$5,15 \cdot 10^{-4}$	-
SD	0,03	$1,38 \cdot 10^{-6}$	$1,05 \cdot 10^{-6}$	$2,43 \cdot 10^{-6}$	-
RSD	0,52	0,52	0,42	0,47	-
BrPhAcA	6,66	$2,43 \cdot 10^{-4}$	$-2,72 \cdot 10^{-4}$	$5,15 \cdot 10^{-4}$	8,11*
SD	0,05	$1,83 \cdot 10^{-6}$	$1,92 \cdot 10^{-6}$	$1,75 \cdot 10^{-6}$	-
RSD	0,76	0,75	0,71	0,34	-
MA	6,74	$2,40 \cdot 10^{-4}$	$-2,75 \cdot 10^{-4}$	$5,15 \cdot 10^{-4}$	0,83
SD	0,05	$1,89 \cdot 10^{-6}$	$2,06 \cdot 10^{-6}$	$1,75 \cdot 10^{-6}$	0,04
RSD	0,79	0,79	0,75	0,34	4,85



Obrázok 19: Graf zobrazujúci zmenu korigovanej plochy analytu BrPhAcA (STBF9755V) v 100% MeOH za podmienok uvedených v Tab. 4. Analýza s oplachom inletovej elektródy.



Obrázok 20: Elektroferogram 1. analýzy α -brómfenylactovej kyseliny (STBF9755V) s koncentráciou 100 $\mu\text{g/ml}$, rozpustenej v 100% metanole. BGE: 50 mM fosfátový pufr, pH 7,5. (1 – MetPhAcA, 2 – BrPhAcA, 3 – MA). Analýza s oplachom inletovej elektródy

5.2.2 Analýza α -brómfenyloctovej kyseliny v 60 mM octanovom pufrí o pH 5,0

Kyselina α -brómfenyloctová bola k analýze pripravená v koncentrácii 100 $\mu\text{g/ml}$ a rozpustená v 100% metanole. Analýza prebiehala v FS kapiláre s celkovou dĺžkou 48,5 cm a efektívnou dĺžkou 40,0 cm. Vnútorý priemer kapiláry bol 50 μm . Na kapiláru bolo vložené napätie +30 kV.

Analýzy prebiehajúce v prostredí 60 mM octanového pufru s pH 5,0 poskytovali podobné výsledky (jednotlivé analyty migrovali v rovnakom poradí) ako tomu bolo v 50 mM fosfátovom pufrí o pH 7,5 (viz. kapitola 5.2.1) a preto v tomto prostredí nebola overená totožnosť pík pomocou metódy štandardného prídavku. Na elektroferograme kyseliny α -brómfenyloctovej (viz. Obr. 22) opakovane figurovali neoddelené píky BrPhAcA a MA (píky 2 a 3), ktorým predchádzal pík MetPhAcA (pík 1).

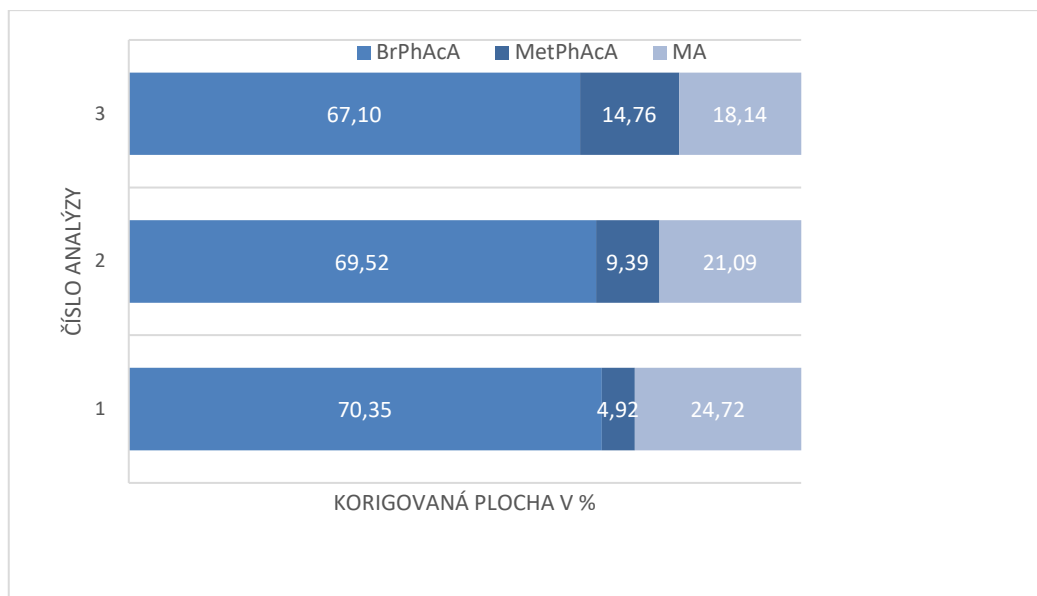
Vzhľadom k čisto metanolickému roztoku BrPhAcA nebol vznik MA očakávaný. Reakcia, počas ktorej MA vznikala prebiehala s veľkou pravdepodobnosťou priamo vo vnútri kapiláry.

S oplachom inletovej elektródy sa percentuálne zastúpenie MetPhAcA (v % celkovej korigovanej plochy) zmenšilo z 14,76% na 3,69% u tretej analýzy. Situácia je graficky znázornená na obrázkoch č. 21 a 23.

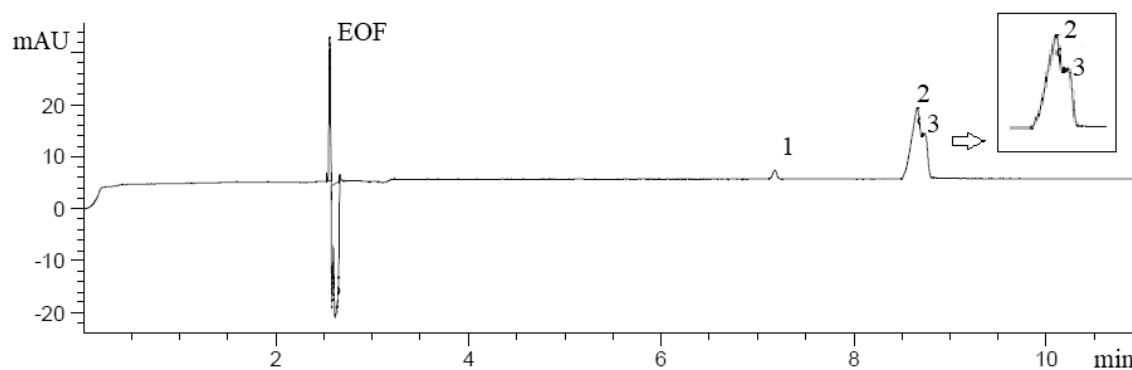
V oboch prípadoch sa korigovaná plocha píku MetPhAcA zvyšovala na úkor plôch BrPhAcA a počas analýzy vznikajúcej MA.

Tabuľka 5: Analýza α -brómfenyloctovej kyseliny s koncentráciou 100 $\mu\text{g/ml}$, rozpustená v 100% metanole. BGE: 60 mM octanový pufr, pH = 5,0. Analýza bez oplachu inletovej elektródy; $n = 3$.

	t (min)	μ_a (cm^2/Vs)	μ_{e_e} (cm^2/Vs)	μ_{EOF} (cm^2/Vs)	rozlíšenie
MetPhAcA	7,27	$1,48 \cdot 10^{-4}$	$-2,72 \cdot 10^{-4}$	$4,20 \cdot 10^{-4}$	-
SD	0,09	$1,83 \cdot 10^{-6}$	$8,63 \cdot 10^{-7}$	$9,86 \cdot 10^{-7}$	-
RSD	1,23	1,23	0,32	0,23	-
BrPhAcA	8,79	$1,23 \cdot 10^{-4}$	$-2,97 \cdot 10^{-4}$	$4,20 \cdot 10^{-4}$	10,75
SD	0,13	$1,77 \cdot 10^{-6}$	$8,23 \cdot 10^{-7}$	$9,86 \cdot 10^{-7}$	0,07
RSD	1,44	1,45	0,28	0,24	0,62
MA	8,86	$1,22 \cdot 10^{-4}$	$-2,98 \cdot 10^{-4}$	$4,20 \cdot 10^{-4}$	0,46
SD	0,12	$1,59 \cdot 10^{-6}$	$6,55 \cdot 10^{-7}$	$9,86 \cdot 10^{-7}$	0,07
RSD	1,30	1,30	0,22	0,24	15,68



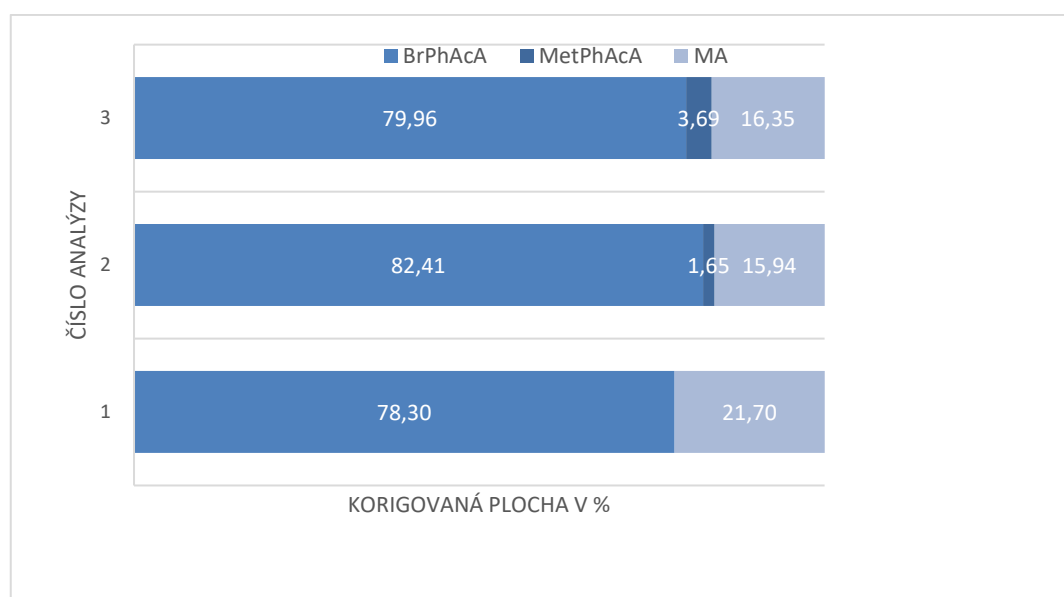
Obrázok 21: Graf zobrazujúci zmenu korigovanej plochy analytu BrPhAcA v 100% MeOH za podmienok uvedených v Tab. 5. Analýza bez oplachu inletovej elektródy.



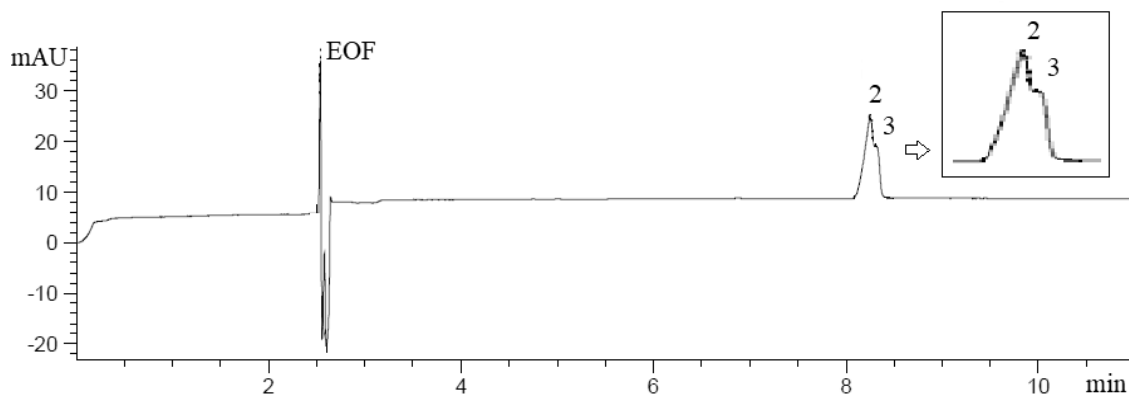
Obrázok 22: Elektroferogram 1. analýzy α -brómfenylactovej kyseliny s koncentráciou 100 $\mu\text{g/ml}$, rozpustenej v 100% metanole. BGE: 60 mM octanový pufr, pH 5,0 (1 – MetPhAcA, 2 – BrPhAcA, 3 – MA). Analýza bez oplachu inletovej elektródy.

Tabuľka 6: Analýza α -brómfenylactovej kyseliny s koncentráciou 100 $\mu\text{g/ml}$, rozpustená v 100% metanole. BGE: 60 mM octanový pufr, pH 5,0. Analýza s oplachom inletovej elektródy; $n = 3$. *vzhľadom k skutočnosti, že MetPhAcA nevznikla počas prvej analýzy rozlíšenie BrPhAcA je spriemerované z dvoch analýz a tým pádom SD a RSD nie je uvedené.

	t (min)	μ_a (cm^2/Vs)	μ_{ef} (cm^2/Vs)	μ_{EOF} (cm^2/Vs)	rozlíšenie
MetPhAcA	6,75	$1,60 \cdot 10^{-4}$	$-2,70 \cdot 10^{-4}$	$4,29 \cdot 10^{-4}$	-
SD	0,01	$1,34 \cdot 10^{-7}$	$2,29 \cdot 10^{-7}$	$3,63 \cdot 10^{-7}$	-
RSD	0,08	0,08	0,08	0,08	-
BrPhAcA	8,13	$1,33 \cdot 10^{-4}$	$-2,95 \cdot 10^{-4}$	$4,28 \cdot 10^{-4}$	10,82 *
SD	0,10	$1,68 \cdot 10^{-6}$	$9,26 \cdot 10^{-7}$	$2,60 \cdot 10^{-6}$	-
RSD	1,28	1,27	0,31	0,61	-
MA	8,19	$1,32 \cdot 10^{-4}$	$-2,96 \cdot 10^{-4}$	$4,28 \cdot 10^{-4}$	0,43
SD	0,11	$1,78 \cdot 10^{-6}$	$8,29 \cdot 10^{-7}$	$2,60 \cdot 10^{-6}$	0,06
RSD	1,36	1,35	0,28	0,61	12,91



Obrázok 23: Graf zobrazujúci zmenu korigovanej plochy analytu BrPhAcA v 100% MeOH za podmienok uvedených v Tab. 6. Analýza s oplachom inletovej elektródy.



Obrázok 24: Elektroferogram 1. analýzy α -brómfenylactoovej kyseliny s koncentráciou 100 $\mu\text{g/ml}$, rozpustenej v 100% metanole. BGE: 60 mM octanový pufr, pH 5,0. Analyza s oplachom inletovej elektródy. (2 – BrPhAcA, 3 - MA).

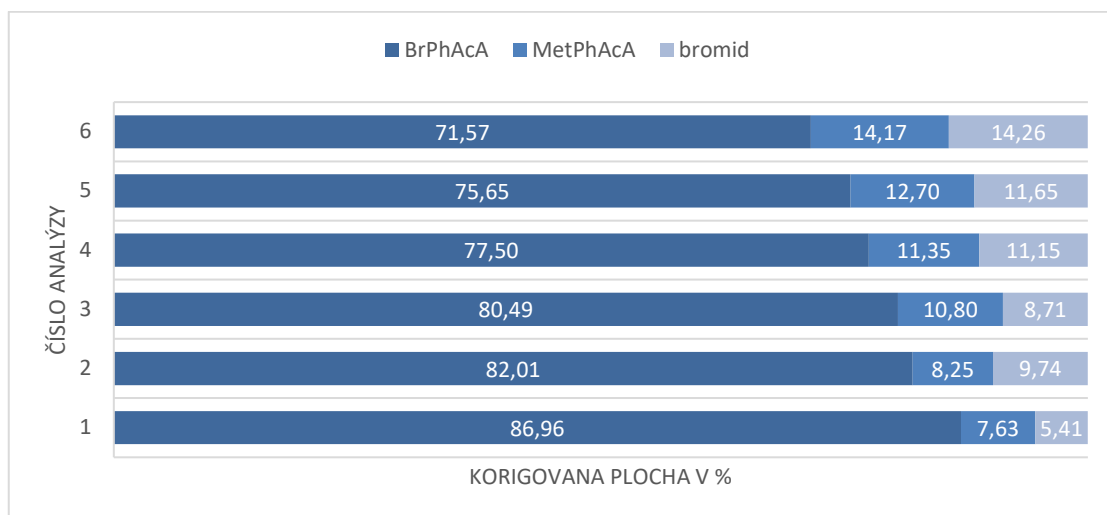
5.2.3 Analýza α -brómfenyloctovej kyseliny v 60 mM mravenčanovom pufri o pH 3,0

Keďže analýza α -brómfenyloctovej kyseliny a jej rozkladných produktov vo fosfátovom a octanovom pufri neumožnila separáciu všetkých analytov na základnú líniu, tak bol otestovaný i kyslý BGE tvorený 60 mM mravenčanovým pufrom o pH 3,0. V tomto elektrolyte sú všetky analyty len čiastočne nabité a vzhľadom k rozdielu v ich ionizácii (vzhľadom k rozdielnym hodnotám pKa) možno očakávať i zmenu selektivity a tým pádom i rozlíšenia. Analýzy prebiehali v FS kapiláre s celkovou dĺžkou 33 cm a efektívnou dĺžkou 24,5 cm, aby bolo dosiahnutých krátkych migračných časov. Vnútorý priemer kapiláry bol 50 μ m. Na kapiláru bolo vložené napätie -30 kV, aby detekcia prebiehala na anodickom konci kapiláry. Všetky analýzy v tomto prostredí prebiehali bez oplachu inletovej elektródy.

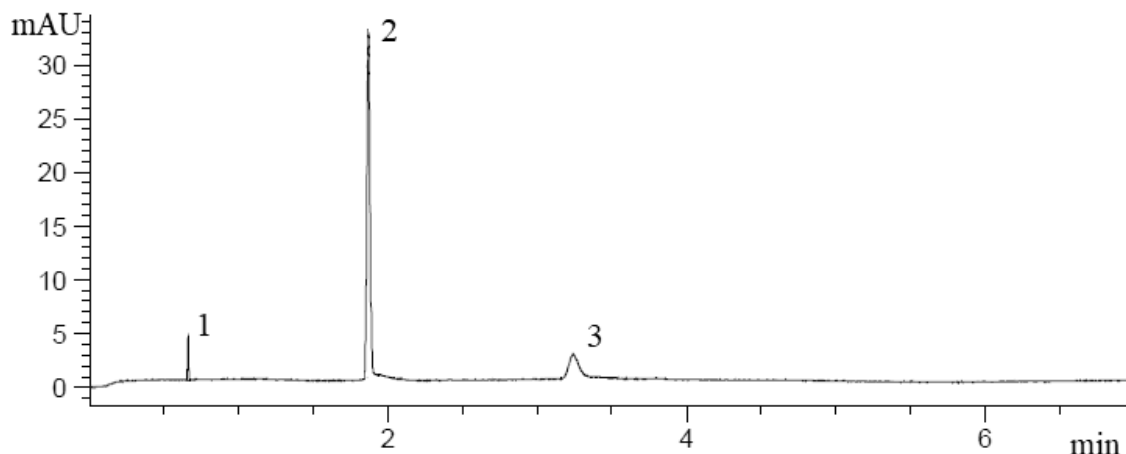
Najskôr analýzy prebiehali s kyselinou α -brómfenyloctovou o koncentrácii 100 μ g/ml v 100% metanole. Ako vidieť v tabuľke č. 7 a na obrázkoch č. 25 a č. 26 α -brómfenyloctová kyselina (pík 2) sa rozkladá jedine za vzniku kyseliny α -metoxyfenyloctovej (pík 3). Ku vzniku mandľovej kyseliny nedochádza z dôvodu absencie vody ako nukleofilu v roztoku vzorky. V tomto prípade je priebeh SN1 reakcie v súlade s teoretickým predpokladom, na rozdiel od separácií vo fosfátovom i octanovom pufri, kedy dochádzalo i k neočakávanému vzniku kyseliny mandľovej pravdepodobne v priebehu separácie priamo v kapiláre. V priebehu nukleofilnej substitúcie dochádza i k vzniku HBr, jej prítomnosť je zrejmá vďaka píku Br⁻, ktorý v mravenčanovom pufri migruje ako prvý v poradí. Identifikácia jednotlivých analytov bola prevedená metódou štandardného prídavku k roztoku BrPhAcA i analýzou samotných roztokov jednotlivých produktov reakcie (viz. Kap. 10.2).

Tabuľka 7: Analýza α -brómfenylactovej kyseliny s koncentráciou 100 $\mu\text{g/ml}$, rozpustená v 100% metanole. BGE: 60 mM mravenčanový pufr, pH = 3,0. n = 6.

	t (min)	μ_a (cm^2/Vs)	Rozlíšenie
Br⁻	0,66	$-6,83 \cdot 10^{-4}$	-
SD	0,02	$2,06 \cdot 10^{-5}$	-
RSD	2,89	3,02	-
BrPhAcA	1,86	$-2,41 \cdot 10^{-4}$	44,98
SD	0,01	$1,31 \cdot 10^{-6}$	0,91
RSD	0,54	0,54	2,02
MetPhAcA	3,19	$-1,41 \cdot 10^{-4}$	16,2
SD	0,04	$1,57 \cdot 10^{-6}$	1,43
RSD	1,12	1,12	8,82



Obrázok 25: Graf zobrazujúci zmenu korigovanej plochy analytu BrPhAcA v 100% MeOH za podmienok uvedených v Tab. 7. (6 analýz prebehlo v tesnej náväznosti priamo za sebou, všetkých 6 analýz sa uskutočnilo z jednej vialky).



Obrázok 26: Elektroferogram 2. analýzy α -brómfenylactovej kyseliny s koncentráciou 100 $\mu\text{g/ml}$, rozpustenej v 100% metanole. BGE: 60 mM mravenčanový pufr, $\text{pH} = 3,0$. (1 – Br^- , 2 – BrPhAcA , 3 - MetPhAcA)

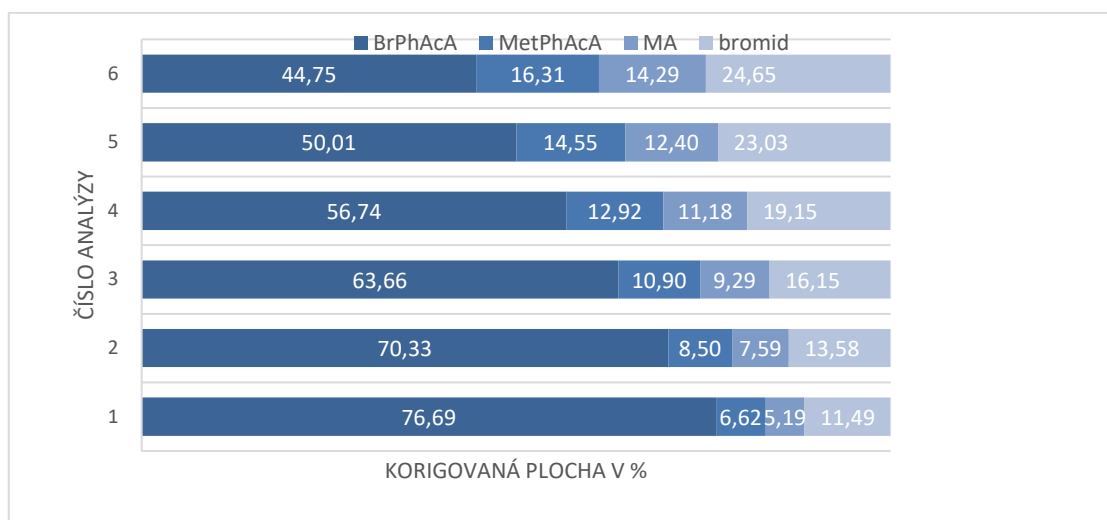
Ďalej bol v rovnakom elektrolyte testovaný i roztok α -brómfenylactovej kyseliny o koncentrácii 100 $\mu\text{g/ml}$ rozpustenej v zmesi MeOH : voda (1:1).

Ako vidieť v tabuľke č. 8 a na obrázkoch č. 27 a č. 28 α -brómfenylactová kyselina sa v zmesi vody a metanolu v pomere 1:1 rozkladá za vzniku kyseliny mandľovej (pík 4) a α -methoxyfenylactovej kyseliny (pík 3). Plochy ich píkov sa s narastajúcim časom analýzy zvyšujú na úkor plochy píku α -brómfenylactovej kyseliny (pík 2). Nestabilita a pomerne rýchla degradácia α -brómfenylactovej kyseliny bola zapríčinená prítomnosťou vody a metanolu, ktoré vystupovali ako nukleofilné činidlá. Ako v predchádzajúcom prípade bol identifikovaný i pík Br^- (pík 1). Identifikácia jednotlivých analytov bola prevedená metódou štandardného prídavku k roztoku BrPhAcA i analýzou samotných roztokov jednotlivých produktov reakcie (viz. Kap. 10.3.)

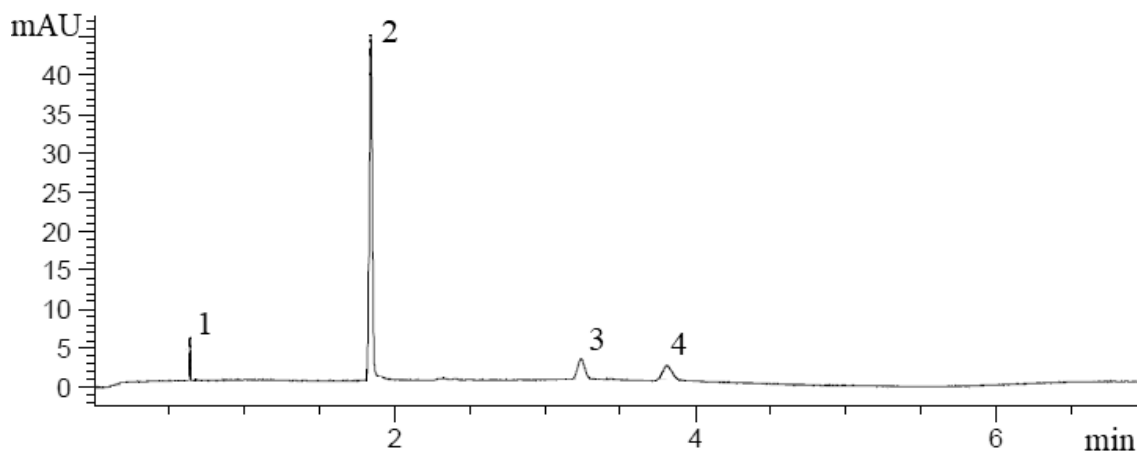
Priebeh reakcie bol v tomto prípade podstatne rýchlejší (~45% celkovej korigovanej plochy BrPhAcA po šiestich analýzach) ako v prípade, keď bola α -brómfenylactová kyselina rozpustená v čistom metanole (~72% celkovej korigovanej plochy BrPhAcA po šiestich analýzach).

Tabuľka 8: Analýza α -brómfenylactoovej kyseliny s koncentráciou 100 $\mu\text{g/ml}$, rozpustená v 50 % metanole. BGE: 60 mM mravenčanový pufr, $\text{pH} = 3,0$. $n = 6$.

	t (min)	μ_a (cm^2/Vs)	Rozlíšenie
Br⁻	0,64	$-7,04 \cdot 10^{-4}$	-
SD	0,01	$1,50 \cdot 10^{-6}$	-
RSD	0,21	0,21	-
BrPhAcA	1,84	$-2,45 \cdot 10^{-4}$	42,29
SD	0,01	$9,36 \cdot 10^{-7}$	5,29
RSD	0,38	0,38	12,51
MetPhAcA	3,25	$-1,38 \cdot 10^{-4}$	20,22
SD	0,01	$3,18 \cdot 10^{-7}$	4,61
RSD	0,23	0,23	22,82
MA	3,83	$-1,17 \cdot 10^{-4}$	5,51
SD	0,01	$3,83 \cdot 10^{-7}$	0,05
RSD	0,33	0,33	0,85



Obrázok 27: Graf zobrazujúci zmenu korigovanej plochy analytu BrPhAcA v 50% MeOH za podmienok uvedených v Tab. 8. (6 analýz prebehlo v tesnej náväznosti priamo za sebou, všetkých 6 analýz sa uskutočnilo z jednej vialky)

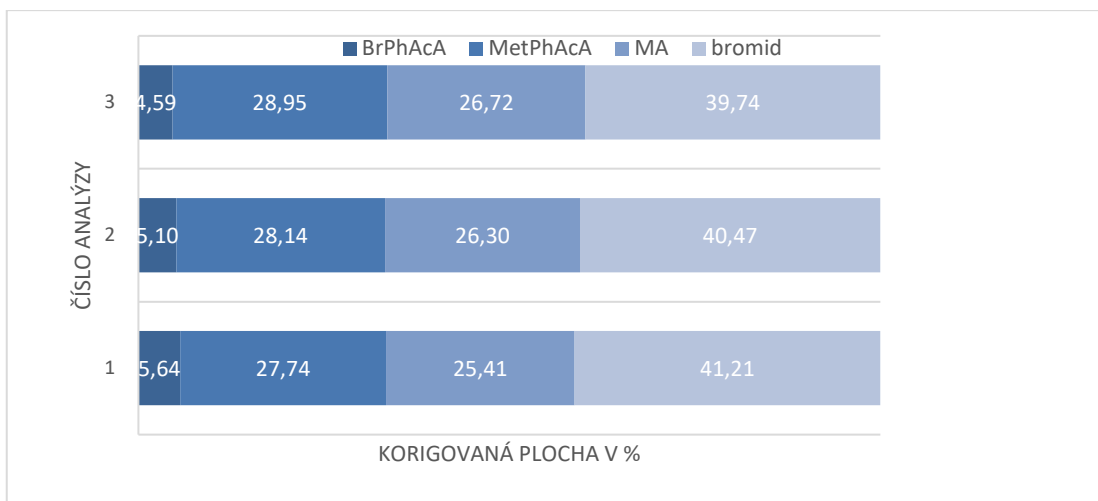


Obrázok 28: Elektroferogram 2. analýzy α -brómfenylactovej kyseliny s koncentráciou $100 \mu\text{g/ml}$, rozpustenej v 50% metanole. BGE: 60 mM mravenčanový pufr, $\text{pH} = 3,0$. (1 – Br^- , 2 – BrPhAcA , 3 – MetPhAcA , 4 – MA)

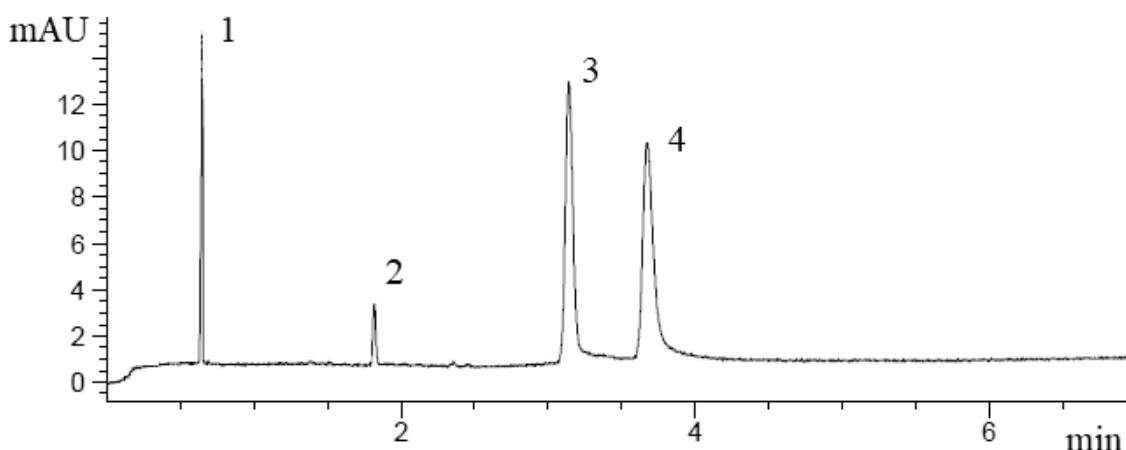
Skutočnosť, že sa α -brómfenylactová kyselina v 50% MeOH rozkladá veľmi rýchlo dokazuje aj to, že jej korigovaná plocha sa po 8 hodinách od začiatku analýz zmenšila takmer 15-násobne zatiaľ, čo plochy píkov rozkladných produktov sa zväčšili takmer 4-násobne (MetPhAcA), 5-násobne (MA). Celých 8 hodín bola vzorka vo vialke umiestnená v autosampleri pri 25°C . Situáciu popisuje tabuľka č. 9 a obrázok 29.

Tabuľka 9: Analýza α -brómfenylactovej kyseliny s koncentráciou $100 \mu\text{g/ml}$, rozpustená v 50% metanole. BGE: 60 mM mravenčanový pufr, $\text{pH} = 3,0$. Výsledky analýzy po 8 hodinách od prvého nástriku $n = 3$.

	t (min)	$\mu_a \text{ (cm}^2/\text{Vs)}$	Rozlíšenie
Br^-	0,65	$-6,94 \cdot 10^{-4}$	-
SD	$1,73 \cdot 10^{-3}$	$1,86 \cdot 10^{-6}$	-
RSD	0,27	0,27	-
BrPhAcA	1,82	$-2,47 \cdot 10^{-4}$	37,03
SD	$3,46 \cdot 10^{-3}$	$4,73 \cdot 10^{-7}$	0,18
RSD	0,19	0,19	0,48
MetPhAcA	3,14	$-1,43 \cdot 10^{-4}$	20,16
SD	0,01	$5,29 \cdot 10^{-7}$	0,25
RSD	0,37	0,37	1,25
MA	3,67	$-1,22 \cdot 10^{-4}$	4,82
SD	0,01	$4,66 \cdot 10^{-7}$	0,05
RSD	0,38	0,38	1,10



Obrázok 29: Graf zobrazujúci zmenu korigovanej plochy analytu BrPhAcA v 50% MeOH za podmienok uvedených v Tab. 9. (3 analýzy prebehli v tesnej návaznosti priamo za sebou, celých 8 hodín bola vzorka vo vialke umiestnená v autosampleri pri 25°C).



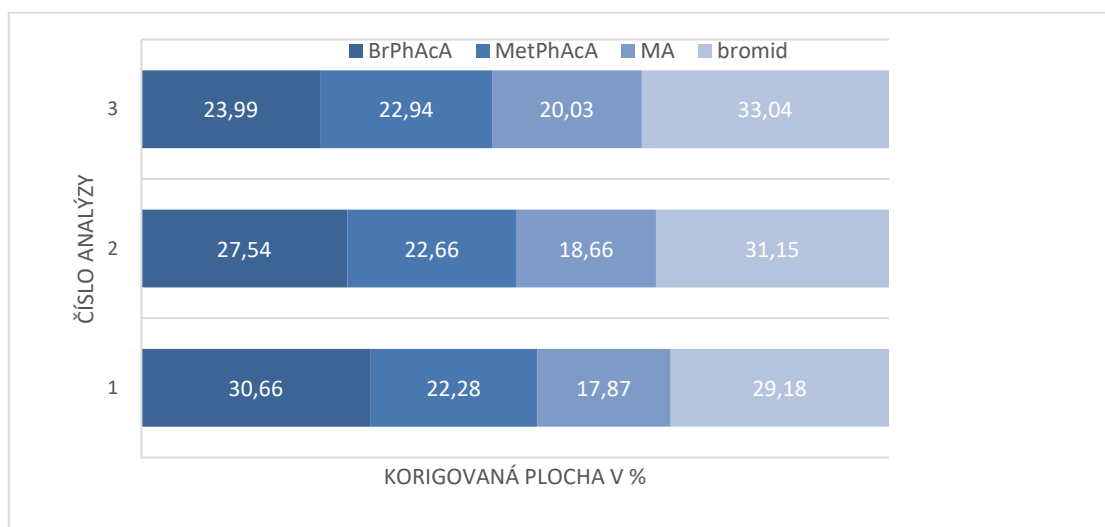
Obrázok 30: Elektroferogram 2. analýzy α -brómfenyloctovej kyseliny s koncentráciou 100 $\mu\text{g/ml}$, rozpustenej v 50% metanole. BGE: 60 mM mravenčanový pufr, pH = 3,0, po 8 hodinách od prvého nástriku. (1 – Br, 2 – BrPhAcA, 3 – MetPhAcA, 4 – MA)

V tabuľke 10 a na obrázku 31 sú uvedené údaje analýzy vzorky α -brómfenyloctovej kyseliny, ktorá bola nadávkovaná do separačného systému 24 hodín od prípravy jej roztoku v 50% MeOH, ktorý bol cez noc uchovaný v chladničke (8°C). V tomto prípade pozorujeme pomalší priebeh nukleofilnej substitúcie v porovnaní so situáciou, kedy bol roztok uchovaný pri laboratórnej teplote (25°C). Korigovaná plocha píku α -brómfenyloctovej kyseliny sa znížila takmer 2,5-násobne a korigované plochy píkov kyseliny α -metoxyfenyloctovej a kyseliny mandľovej vzrástli približne 3,4-násobne

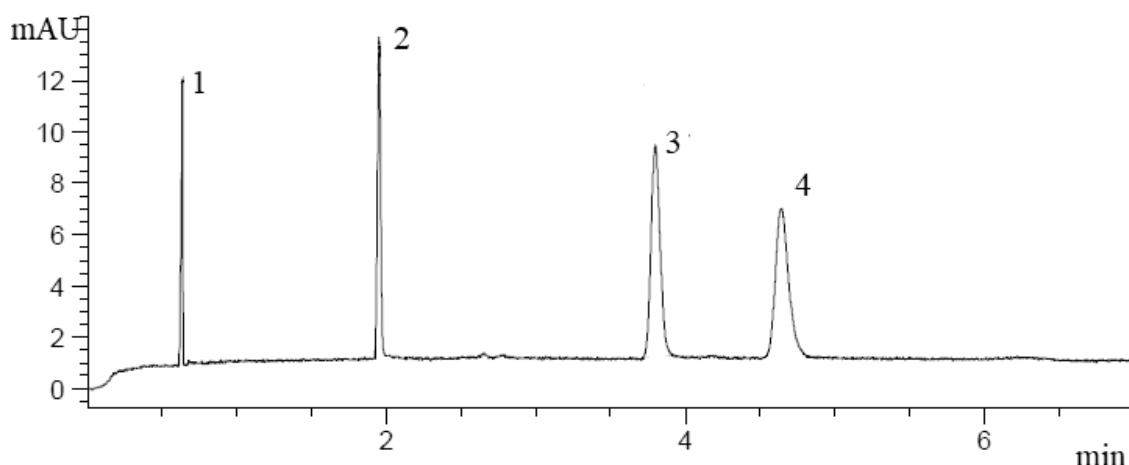
v porovnaní s analýzou BrPhAcA nadávkovanou čo najskôr po príprave jej roztoku (50% MeOH), viz. tab. 8.

Tabuľka 10: Analýza α -brómfenylactovej kyseliny s koncentráciou 100 $\mu\text{g/ml}$, rozpustená v 50 % metanole v 60 mM mravenčanovom pufri, pH = 3,0, po 24 hodinách od prípravy

	t (min)	μ_a (cm^2/Vs)	rozlíšenie
Br⁻	0,64	$-7,02 \cdot 10^{-4}$	-
SD	0,01	$6,09 \cdot 10^{-6}$	-
RSD	0,87	0,87	-
BrPhAcA	2,01	$-2,24 \cdot 10^{-4}$	44,63
SD	0,07	$7,87 \cdot 10^{-6}$	1,14
RSD	3,57	3,52	2,56
MetPhAcA	4,10	$-1,10 \cdot 10^{-4}$	24,72
SD	0,42	$1,06 \cdot 10^{-5}$	0,37
RSD	10,14	9,65	1,50
MA	5,09	$-8,95 \cdot 10^{-5}$	6,52
SD	0,79	$1,30 \cdot 10^{-5}$	0,46
RSD	15,43	14,55	6,99



Obrázok 31: Graf zobrazujúci zmenu korigovanej plochy analytu BrPhAcA v 50% MeOH za podmienok uvedených v Tab. 10. (3 analýzy prebehli v tesnej náväznosti priamo za sebou, vzorka bola do systému nadávkovaná 24 hodín od prípravy jej metanolickeho roztoku, ktorý bol uchovaný v chlade).



Obrázok 32: Elektroferogram 2. analýzy α -brómfenylactovej kyseliny s koncentráciou 100 $\mu\text{g/ml}$, rozpustenej v 50% metanole. BGE: 60 mM mravenčanový pufr, $\text{pH} = 3,0$, vzorka nadávkovaná do systému po 24 hodinách od prípravy jej metanolickeho roztoku. (1 – Br⁻, 2 – BrPhAcA, 3 – MetPhAcA, 4 – MA)

V mravenčanovom puffri bola v niektorých prípadoch pozorovaná väčšia variabilita migračných časov (viz. napr. Tab. 10) a to hlavne kvôli pomalšie migrujúcim MetPhAcA a MA. Táto nereprodukovateľnosť ale nemala vplyv na selektivitu metódy. Táto nereprodukovateľnosť môže byť spôsobená buď nepatrným EOF, ktorý je pri $\text{pH} 3,0$ prítomný a asi nie je stály. Preto by s týmto BGE bolo vhodnejšie prevádzkať separácie v kapilárach bez EOF, t.j. s upravenou vnútornou stenou (napr. polyvinylalkoholom). Ďalším kľúčovým faktorom môže byť i stálosť pH základného elektrolytu pri opakovaných analýzach. Keďže MetPhAcA a MA nesú menší náboj ako BrPhAcA či Br⁻ (jeho náboj nie je závislý na pH elektrolytu), tak sa malé zmeny pH základného elektrolytu môžu výraznejšie prejaviť neopakovateľnosťou migračných časov týchto dvoch analytov.

6. Záver

Výsledkom tejto diplomovej práce je záver že BrPhAcA nie je vhodným modelovým analytom pre chirálne separácie pretože reaguje s nukleofilnými činidlami ako je napríklad 50% (v/v) roztok metanolu vo vode, ktorý bol už raz použitý ako rozpúšťadlo tohoto modelového analytu. Táto skutočnosť nebola autormi v článku diskutovaná [1].

Testovaný analyt počas analýz prebiehajúcich za podmienok uvedených v publikácii Rizviho a Shamziho [1], ale bez prídavku chirálneho selektora k základnému elektrolytu vykazoval na elektroferograme 3 píky. Ostáva teda otázkou, či bola autormi publikácie skutočne prevedená chirálna separácia?

Analyt bol testovaný v prostredí 50 mM fosfátového pufru o pH 7,5 a 60 mM octanového pufru o pH 5,0, kde s dostatočným rozlíšením bola úspešne odseparovaná len MetPhAcA. Zároveň v týchto elektrolytoch pravdepodobne vznikala MA *in situ* v priebehu separácie aj napriek tomu, že bol analyzovaný čisto metanolický roztok BrPhAcA.

V kyslom prostredí 60 mM mravenčanového pufru o pH 3,0 sa od seba viditeľne oddelili všetky tri kyseliny (BrPhAcA, MetPhAcA, MA). Okrem toho bol v tomto BGE identifikovaný bromidový anión, ktorý pochádzal zo vznikajúcej HBr. Keď bol ako rozpúšťadlo použitý 50% roztok MeOH vo vode vznikala zmes MetPhAcA a MA. Zatiaľ, čo v prípade BrPhAcA rozpustenej v čistom MeOH vznikala len MetPhAcA.

Stabilita BrPhAcA v prostredí 50% MeOH je oveľa nižšia ako v čistom MeOH. Prítomnosť vody, ktorá je silnejším nukleofilom, urýchľuje rozklad BrPhAcA.

Identita rozkladných produktov bola overená prostredníctvom analýz ich štandardov a metódou štandardného prídavku k roztoku BrPhAcA.

Pre presnú kvantifikáciu MetPhAcA, MA a Br⁻ je treba nájsť vhodný vnútorný štandard. Ďalej by bolo výrazne lepšie prevádzať separácie v kapiláre s neutrálnym vnútorným povrchom, aby nedochádzalo k variabilite migračných časov (najmä u pomalšie migrujúcich MetPhAcA a MA) v najoptimálnejšom mravenčanovom pufri. Pre confirmáciu identity vzniknutých produktov by bolo potrebné previesť CE-MS analýzu v BGE kompatibilnom s hmotnostne spektrometrickou detekciou (napr. v mravenčanovom pufri o pH 3,0 upravenom roztokom NH₃).

7. Zoznam obrázkov

Obrázok 1: Zobrazenie vnútra kapiláry taveného kremeňa v prítomnosti tlmivého roztoku	14
Obrázok 2: Schéma kapilárnej elektroforézy	14
Obrázok 3: Zobrazenie separácie 4 zlúčenín pomocou CZE	17
Obrázok 4: Elučné časové okno pre neutrálne analyty v priebehu MEKC separácie... ..	18
Obrázok 5: Ilustrácia CITP.	19
Obrázok 6: Schéma znázorňujúca separáciu v CGE.....	19
Obrázok 7: Schéma znázorňujúce separáciu v CIEF	20
Obrázok 8: Energetický diagram priebehu monomolekulových reakcií.....	21
Obrázok 9: Energetický diagram priebehu bimolekulárnych reakcií.....	22
Obrázok 10: Schéma nukleofilnej substitúcie α -brómfenyloctovej kyseliny v 50% roztoku MeOH vo vode.	29
Obrázok 11: Štruktúrny vzorec α -brómfenyloctovej kyseliny.....	30
Obrázok 12: Štruktúrny vzorec α -metoxyfenyloctovej kyseliny	30
Obrázok 13: Štruktúrny vzorec α -hydroxyfenyloctovej kyseliny.....	30
Obrázok 14: Graf zobrazujúci zmenu korigovanej plochy analytu BrPhAcA v 50% MeOH.. ..	32
Obrázok 15: Elektroferogram 2. analýzy α -brómfenyloctovej kyseliny s koncentráciou 2,5 mg/ml, rozpustenej v 50% metanole. BGE: 50 mM fosfátový pufr, pH 7,5	33
Obrázok 16: Graf zobrazujúci zmenu korigovanej plochy BrPhAcA (STBD6289V)..	34
Obrázok 17: Graf zobrazujúci zmenu korigovanej plochy analytu BrPhAcA (STBF9755V)	35
Obrázok 18: Elektroferogram 1. analýzy α -brómfenyloctovej kyseliny (STBF9755V)	35
Obrázok 19: Graf zobrazujúci zmenu korigovanej plochy analytu BrPhAcA (STBF9755V).	36
Obrázok 20: Elektroferogram 1. analýzy α -brómfenyloctovej kyseliny (STBF9755V)	37
Obrázok 21: Graf zobrazujúci zmenu korigovanej plochy analytu BrPhAcA.....	39
Obrázok 22: Elektroferogram 1. analýzy α -brómfenyloctovej kyseliny.....	39
Obrázok 23: Graf zobrazujúci zmenu korigovanej plochy analytu BrPhAcA.....	40
Obrázok 24: Elektroferogram 1. analýzy α -brómfenyloctovej kyseliny.....	41
Obrázok 25: Graf zobrazujúci zmenu korigovanej plochy analytu BrPhAcA.....	43
Obrázok 26: Elektroferogram 2. analýzy α -brómfenyloctovej kyseliny.....	44

Obrázok 27: Graf zobrazujúci zmenu korigovanej plochy analytu BrPhAcA.....	45
Obrázok 28: Elektroferogram 2. analýzy α -brómfenyloctovej kyseliny.....	46
Obrázok 29: Graf zobrazujúci zmenu korigovanej plochy analytu BrPhAcA.....	47
Obrázok 30: Elektroferogram 2. analýzy α -brómfenyloctovej kyseliny.....	47
Obrázok 31: Graf zobrazujúci zmenu korigovanej plochy analytu BrPhAcA.....	48
Obrázok 32: Elektroferogram 2. analýzy α -brómfenyloctovej kyseliny.....	49

8. Zoznam tabuliek

Tabuľka 1: Analýza α -brómfenyloctovej kyseliny 2,5 mg/ml, v 50% metanole. BGE: 50 mM fosfátový pufr, pH 7,5. bez oplachu inletovej elektródy.....	32
Tabuľka 2: Analýza α -brómfenyloctovej kyseliny (STBD6289V) 100 μ g/ml, v 100% metanole. BGE: 50 mM fosfátový pufr, pH 7,5. bez oplachu inletovej elektródy	33
Tabuľka 3: Analýza α -brómfenyloctovej kyseliny (STBF9755V) 100 μ g/ml, v 100% metanole. BGE: 50 mM fosfátový pufr, pH 7,5. bez oplachu inletovej elektródy	34
Tabuľka 4: Analýza α -brómfenyloctovej kyseliny (STBF9755V) 100 μ g/ml, v 100% metanole. BGE: 50 mM fosfátový pufr, pH 7,5. s oplachom inletovej elektródy.....	36
Tabuľka 5: Analýza α -brómfenyloctovej kyseliny 100 μ g/ml, rozpustená v 100% metanole. BGE: 60 mM octanový pufr, pH = 5,0. bez oplachu inletovej elektródy.	38
Tabuľka 6: Analýza α -brómfenyloctovej kyseliny 100 μ g/ml, v 100% metanole. BGE: 60 mM octanový pufr, pH 5,0. s oplachom inletovej elektródy	40
Tabuľka 7: Analýza α -brómfenyloctovej kyseliny 100 μ g/ml, v 100% metanole. BGE: 60 mM mravenčanový pufr, pH = 3,0	43
Tabuľka 8: Analýza α -brómfenyloctovej kyseliny 100 μ g/ml, v 50 % metanole. BGE: 60 mM mravenčanový pufr, pH = 3,0.	45
Tabuľka 9: Analýza α -brómfenyloctovej kyseliny 100 μ g/ml, v 50% metanole. BGE: 60 mM mravenčanový pufr, pH = 3,0. po 8 hodinách.....	46
Tabuľka 10: Analýza α -brómfenyloctovej kyseliny 100 μ g/ml, v 50 % metanole v 60 mM mravenčanovom puffri, pH = 3,0, po 24 hodinách.....	48

9. Citovaná literatura

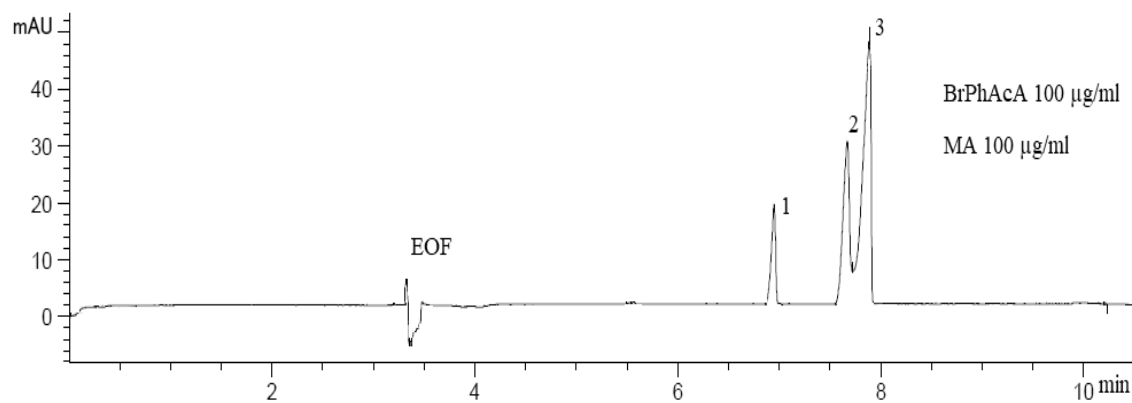
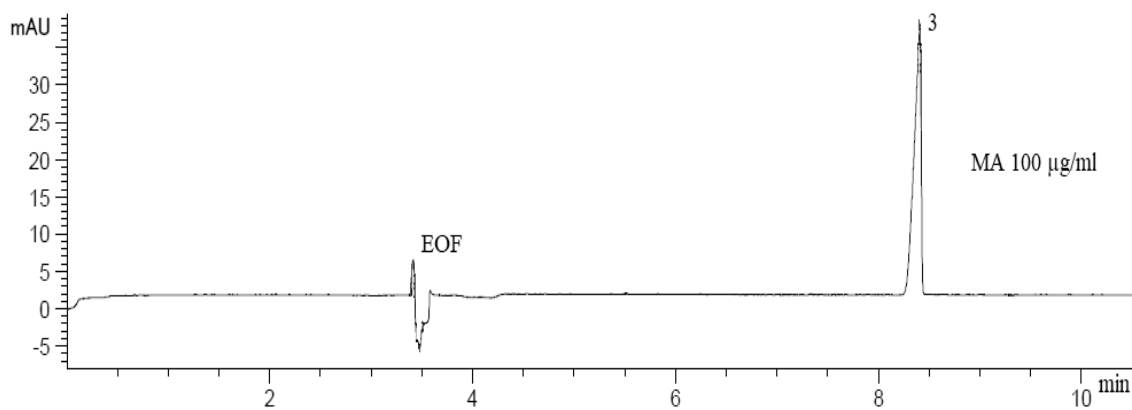
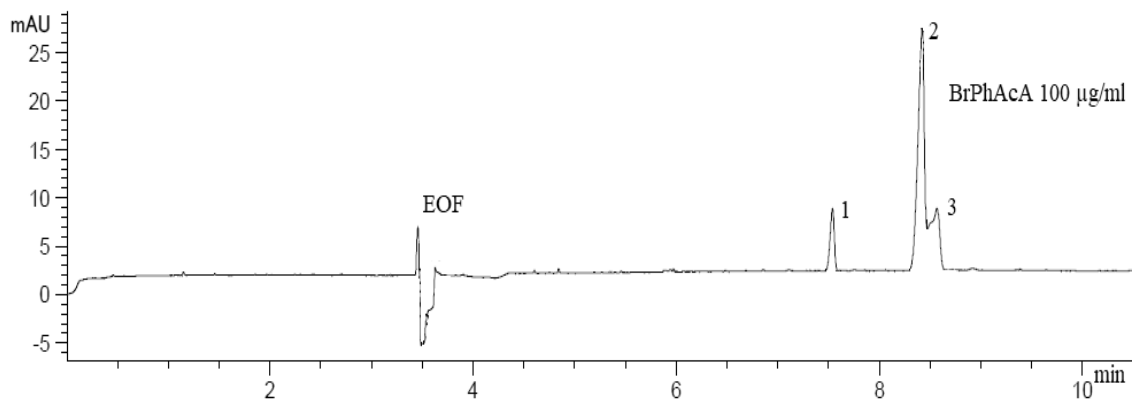
- [1] **RIZVI, Syed Asad Ali, SHAMSI, A. Shahab.** *Synthesis, Characterisation, and Application of Chiral Ionic Liquids and Their Polymers in Micellar Electrokinetic Chromatography.* Anal.Chem. 2006. 78, 7061-7069
- [2] **LAUER, Jenk H., ROZING, Gerard P.** *High Performance Capillary Electrophoresis,* Agilent Technologies. Germany. 2014. P/N 5990-3777EN. 174 s.
- [3] **RIGHETTI, P. G.,** *Electrophoresis: The march of pennies, the march of dimes.* J. Chromatogr. A 2005, 1079, 24-40.
- [4] **KÁŠ, J., KODÍČEK, M., VALENTOVÁ, O.** *Laboratorní techniky biochemie.* 1. Vyd. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Praha 2006. ISBN: 80-7080-586-2, str. 33.
- [5] **ŠTULÍK, Karel a kol.** *Analytické separační metody.* Praha : Karolinum, 2004. 264 s.
- [6] **KAŠIČKA, Václav.** *Teoretické základy a separační principy kapilárních elektromigračních metod.* Chemické listy. 91, 1997. 320-329.
- [7] **Wikipedia.** https://en.wikipedia.org/wiki/Capillary_electrophoresis. [Online] [Citace: 3.4.2018].
- [8] **KLOUDA, Pavel.** *Moderní analytické metody.* Druhé a upravené vydání. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. 132 s. ISBN 80-863-6907-2.
- [9] **MIKUŠ, Peter, PIEŠŤANSKÝ, Juraj.** *Kapilárna elektroforéza, hmotnostná spektrometria a ich kombinácie vo farmaceutickej a biomedicínskej analýze: učebnica pre farmaceutické fakulty a fakulty prírodovedného a technického smeru so zameraním na analytickú chémiu a farmaceutickú chémiu.* Bratislava: Veda, 2014. ISBN 9788022413770.
- [10] **MARINA M. L., RIOS A., VALCÁRCEL M.,** *Comprehensive Analytical Chemistry,* Vol.: 65 – Analysis and detection by capillary electrophoresis, Elsevier B. V., Amsterdam, 2005.
- [11] **DOLNÍK, Vladimír,** *Úvod do kapilární elektroforézy,* Brno, 1994.
- [12] **KRISTL, Theresa, STUTZ, Hanno, WENZ, Christian, ROZING, Gerard.** *Principles and applications of capillary isoelectric focusing.* Agilent Technologies. USA. 2014. P/N 5991-1660EN.

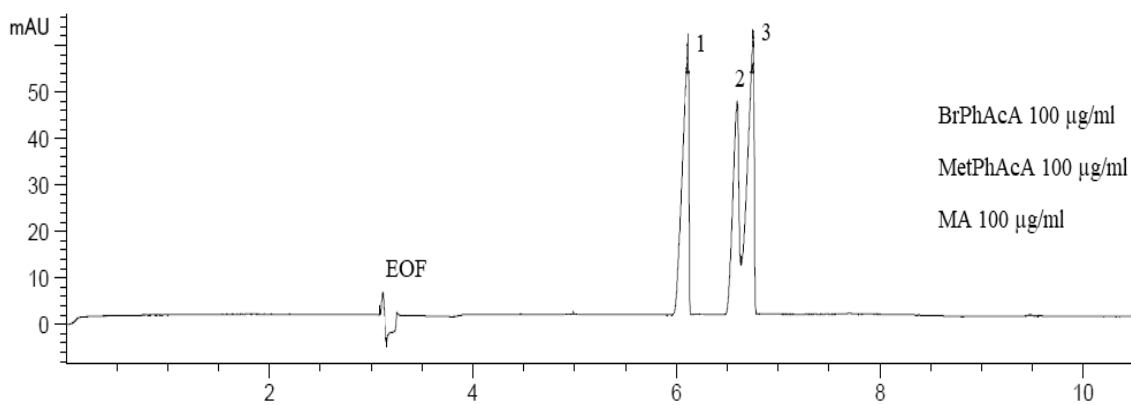
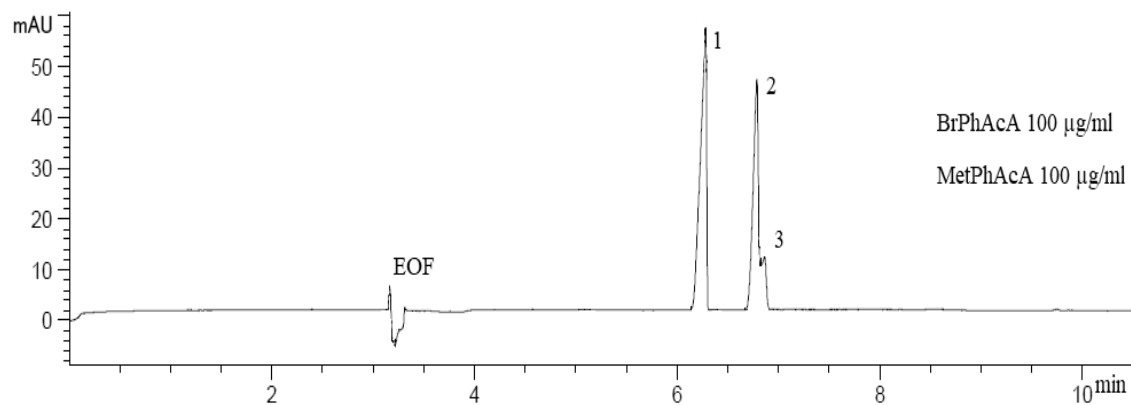
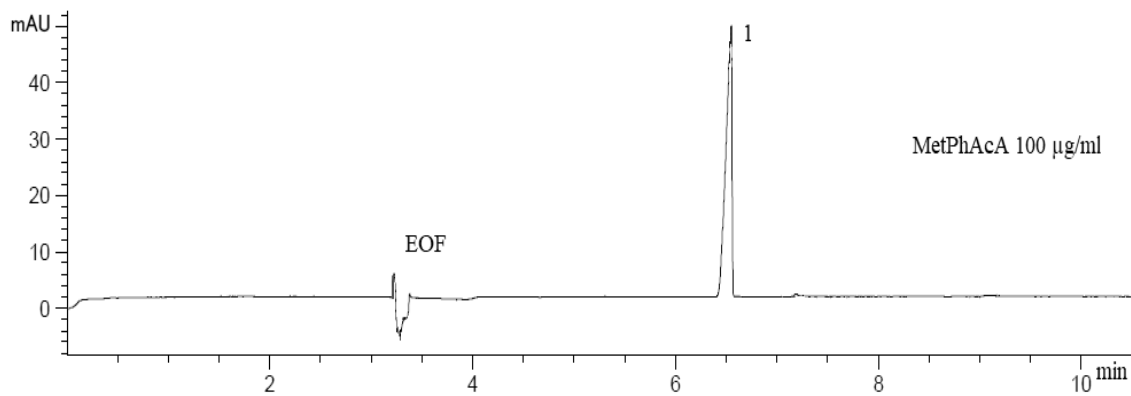
- [13] **DEVÍNSKY, Ferdinand a kol.** *Organická chémie pre farmaceutov*. Vyd Osveta, Martin 2001. ISBN 80-8063-056-9.
- [14] **MCMURRY, John.** *Organická chemie*. Přeložili: Jan BUDKA, Radek CIBULKA, Dalimil DVOŘÁK, Jaroslav KVÍČALA, Pavel LHOTÁK, Jiří SVOBODA. Brno: Vysoké učení technické v Brně, nakladatelství VUTIUM, 2015. ISBN 978-80-214-4769-1.
- [15] **MINISTERSTVO ZDRAVOTNICTVÍ ČR.** *Český lékopis 2009, ČL 2009 - Doplněk 2010, ČL 2009 - Doplněk 2011, ČL 2009 - Doplněk 2012, ČL 2009 - Doplněk 2013, ČL 2009 - Doplněk 2014, ČL 2009 - Doplněk 2015*. [CD] Praha: Grada Publishing, 2015. 4529 s.
- [16] **BJERRUM, J., et al.** *Stability Constants*, Chemical Society, London, 1958.
- [17] **ChemSpider.** <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.6867.html>
[Online] [Citace: 3.5.2018].

10. Prílohy

10.1 Fortifikácia v BGE: 50mM fosfátový pufr, pH 7,5

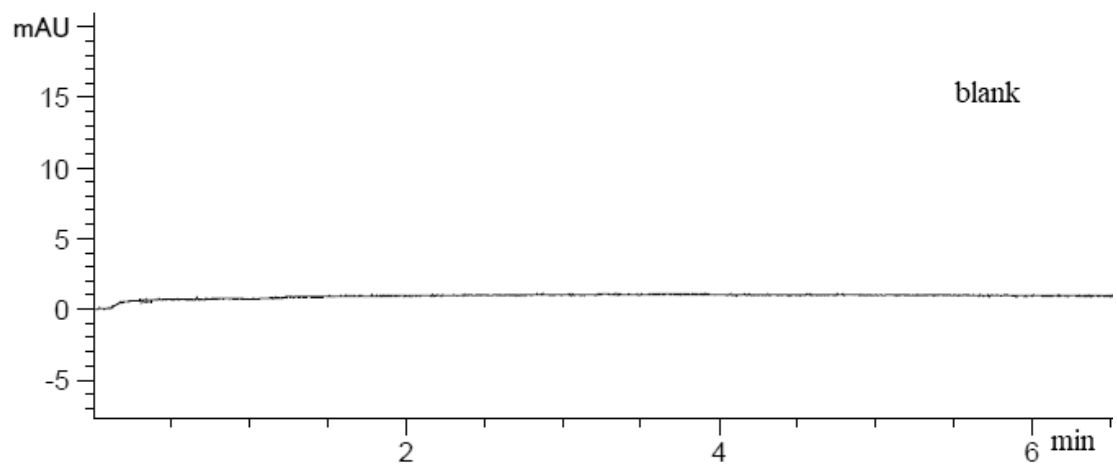
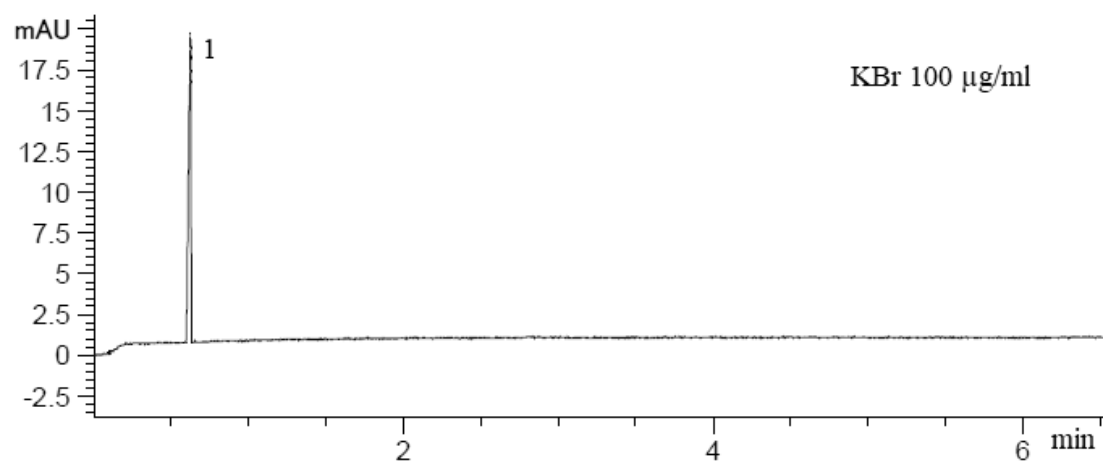
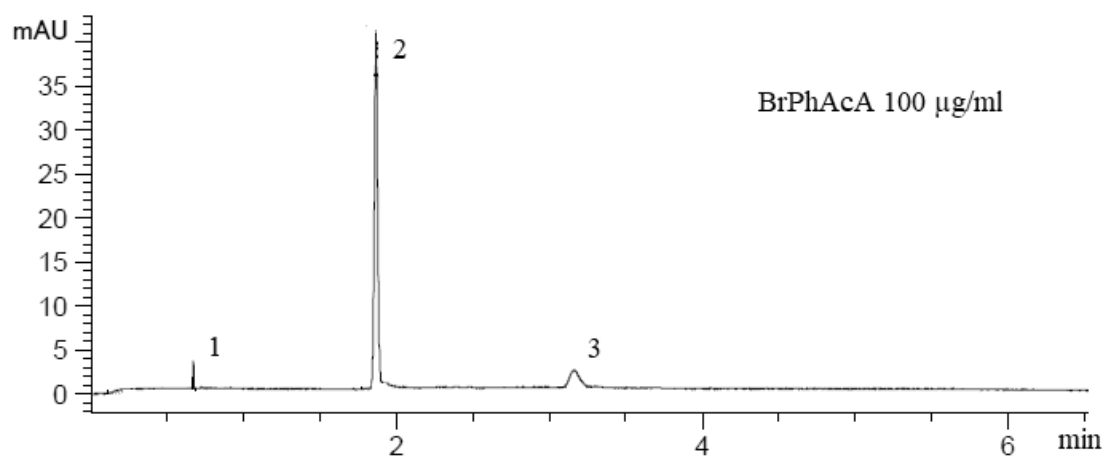
Všetky analyzované roztoky boli pripravené rozpustením v 100% metanole
(1 – MetPhAcA, 2 – BrPhAcA, 3 – MA)

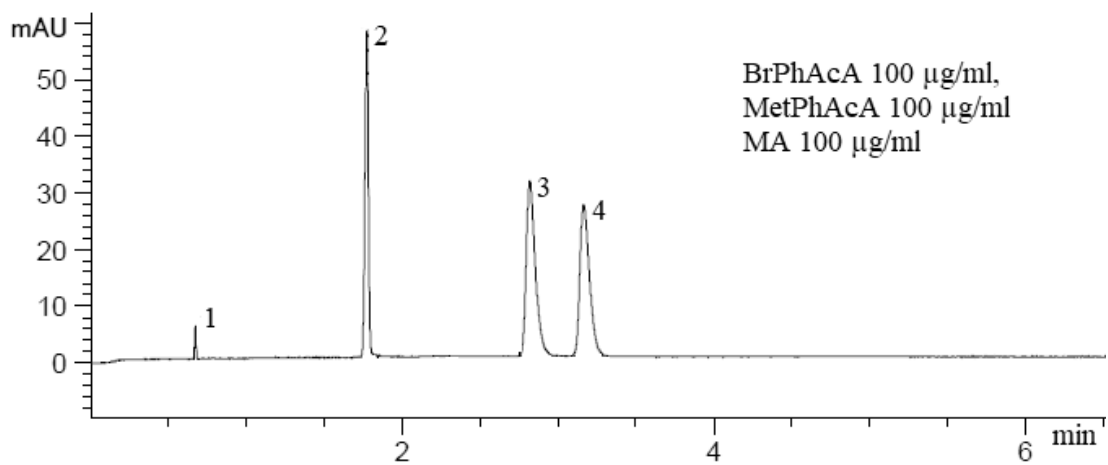
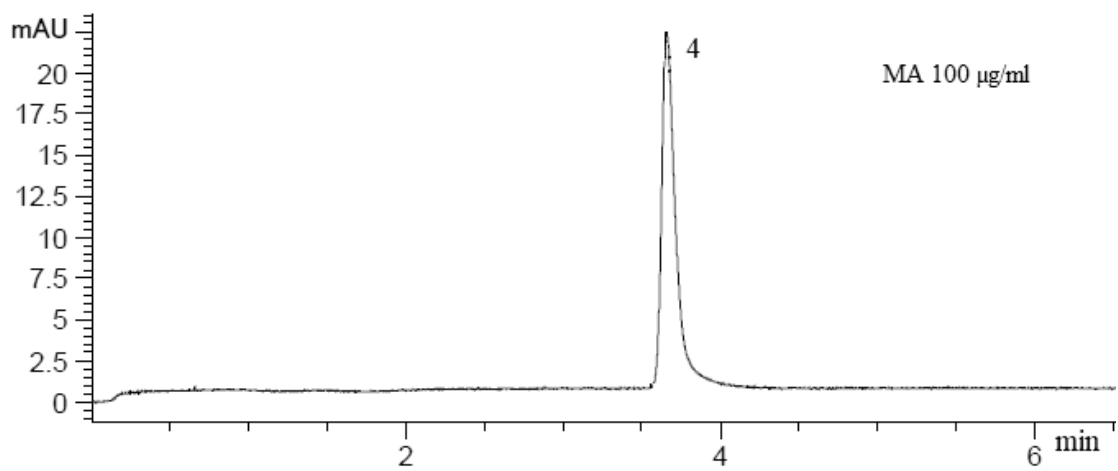
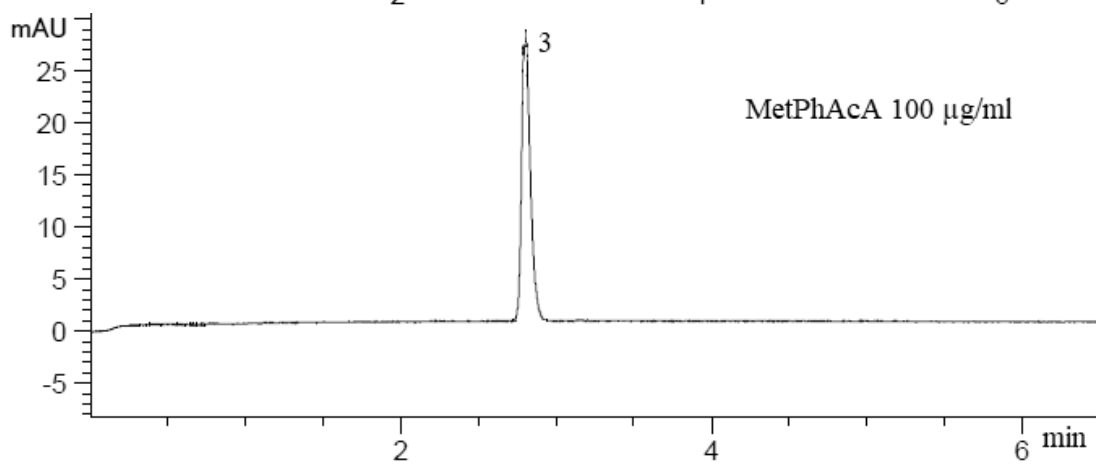
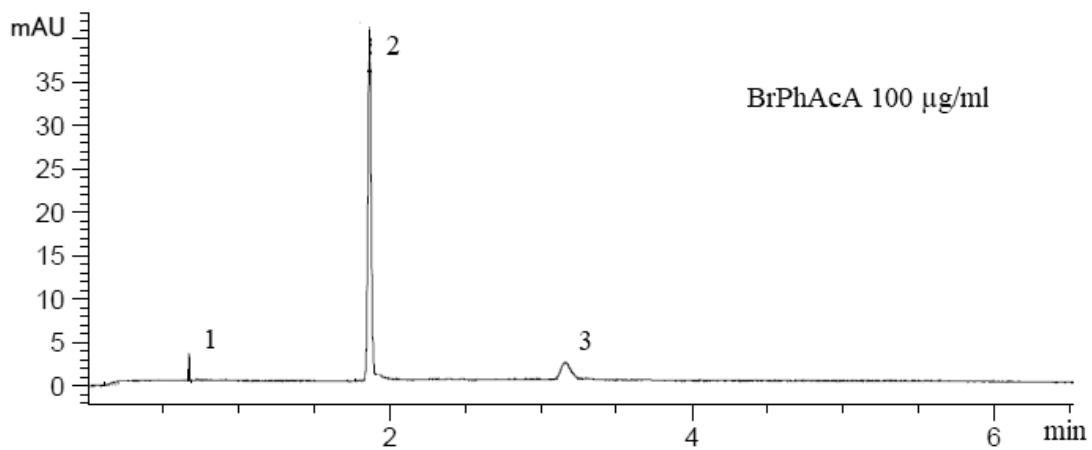




10.2 Fortifikácia v BGE: 60mM mravenčanový pufr, pH 3,0 (1)

Všetky analyzované roztoky boli pripravené rozpustením v 100% metanole
(1 – Br⁻, 2 – BrPhAcA, 3 – MetPhAcA)





10.3 Fortifikácia v BGE: 60mM mravenčanový pufr, pH 3,0 (2)

Všetky analyzované roztoky boli pripravené rozpustením v 50% metanole
(1 – Br⁻, 2 – BrPhAcA, 3 – MetPhAcA)

