

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE

STUDIUM NOVÝCH MOŽNOSTÍ SEPARACE ENANTIOMERŮ
KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZOU

DISERTAČNÍ PRÁCE

Autor práce:

RNDr. Adam Příbylka

Studijní obor:

Analytická chemie

Vedoucí práce:

doc. RNDr. Vítězslav Maier, Ph.D.

Olomouc 2016

Prohlašuji, že jsem disertační práci vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem při psaní práce využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Souhlasím s tím, aby má práce byla prezenčně zpřístupněna v knihovně Katedry analytické chemie, Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne 21. 3. 2016

RNDr. Adam Příbylka

V první řadě bych moc rád poděkoval vedoucímu mé disertační práce doc. RNDr. Vítězslavu Maierovi, Ph.D. za nekonečnou trpělivost, neocenitelné odborné rady a podporu během celé doby studia. Dále bych chtěl poděkovat ostatním kolegům z laboratoře elektromigračních metod za jejich přátelský přístup a spolupráci na vědeckých publikacích, jmenovitě RNDr. Martinu Švidrnochovi, doc. RNDr. Janu Petrovi, Ph.D a prof. RNDr. Juraji Ševčíkovi, Ph.D.

Moje poděkování patří i kooperujícím pracovištím, konkrétně pracovní skupině prof. RNDr. Evy Tesařové, Ph.D z Katedry fyzikální a makromolekulární chemie, Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze a prof. Daniela W. Armstronga, Ph.D z Katedry chemie a biochemie, Texaské Univerzity v Arlingtonu, USA.

Nejvíce bych však chtěl poděkovat své rodině, přítelkyni a všem přátelům za neúnavnou psychickou, fyzickou i finanční podporu nejen po dobu mého studia, ale i mimo něj.

V neposlední řadě chci poděkovat za finanční podporu projektu mezinárodní spolupráce KONTAKT LH 11018 MŠMT ČR: Cyklofruktany a jejich deriváty jako nové chirální selektory pro kapalinovou chromatografii.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora:	RNDr. Adam Příbylka
Název práce:	Studium nových možností separace enantiomerů kapilární elektroforézou
Typ práce:	Disertační
Pracoviště:	Katedra analytické chemie, PřF UP v Olomouci
Vedoucí práce:	doc. RNDr. Vítězslav Maier, Ph.D.
Rok obhajoby práce:	2016

Abstrakt

Disertační práce je zaměřena na studium nových možností separace enantiomerů metodou kapilární elektroforézy. Práci lze rozdělit na dvě základní části. V první části je popsána aplikace dvojice sulfatovaných cyklodextrinů jako duálního systému selektorů pro separaci stereoisomerů 1,3- a 1,4-dimethylamylaminu. 1,3-dimethylamylamin je pro své fyziologické účinky podobný amfetaminu a jeho přírodní původ v potravinových doplňcích není zcela objasněn. Jednou z možností jak nepřímo prokázat přírodní původ 1,3-dimethylamylaminu je jeho enantioseparace a stanovení zastoupení jednotlivých stereoisomerů.

Ve druhé části práce byla studována enantiosektivita nové skupiny chirálních selektorů - cyklofruktanů. Studie byla provedena v kyselém i bazickém prostředí v přítomnosti vybraných separačních modifikátorů (methanolu, acetonitrilu a dodecylsíranu sodného) a získaná experimentální data byla porovnána s výsledky analýz za identických separačních podmínek, ve kterých byly jako chirální selektory použity nativní cyklodextriny.

Klíčová slova:	Cyklodextriny, Cyklofruktany, Duální systém selektorů, Enantioseparace, Chirální selektor, Kapilární elektroforéza, Nepřímá UV detekce
Počet stran:	97
Počet externích příloh:	0
Jazyk:	Čeština

Bibliographical identification

Author's first and surname:	RNDr. Adam Příbylka
Title:	The study of new possibilities for the separation of enantiomers by capillary electrophoresis
Type of thesis:	Dissertation
Department:	Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Palacky University in Olomouc
Supervisor:	Assoc. Prof. Vítězslav Maier, Ph.D.
The year of presentation:	2016

Abstract

The dissertation is focused on the study of new possibilities for the separation of enantiomers by capillary electrophoresis. The work can be divided into two parts. The first part describes the application of a pair of sulfated cyclodextrins as a dual selector system for the separation of 1,3- and 1,4-dimethylamylamine stereoisomers. 1,3-dimethylamylamine is similar to amphetamine for its physiological effects, and its natural origin in food additives is not fully elucidated. One of the ways how to indirectly prove the natural origin of 1,3-dimethylamylamine is based on the enantioseparation and the determination of representation of individual stereoisomers.

In the second part of the work, the enantioselectivity of a novel group of chiral selectors - cyclofructans - was studied. The study was performed in acidic and basic environment in the presence of selected separation modifiers (methanol, acetonitrile, and sodium dodecyl sulfate), and obtained experimental data were compared to results of analyses under identical separation conditions with the use of native cyclodextrins as chiral selectors.

Keywords:	Cyclodextrin, Cyclofructan, Dual selector system, Enantioseparation, Chiral selector, Capillary electrophoresis, Indirect UV detection
Number of pages:	97
Number of external appendices:	0
Language:	Czech

Seznam zkratek

AA	Octan amonný
ACN	Acetonitril
APCI	Chemická ionizace za atmosférického tlaku
APPI	Fotoionizace za atmosférického tlaku
BBP	3,3'-Bis[3,5-bis(trifluoromethyl)fenyl]-1,1'-binaftalen-1,1'-diyl hydrogenfosfát
BINOL	1,1'-Bi-2-naftol
BNP	1,1'-Binaftalen-2,2'-diyl hydrogenfosfát
BTEAC	Chlorid benzyl(triethyl)amonný
C4D	Kapacitně vázaný bezkontaktní vodivostní detektor
CD	Cyklodextrin
CE	Kapilární elektroforéza
CF	Cyklofruktan
CMC	Kritická micelární koncentrace
CM-β-CD	Karboxymethyl- β -cyklodextrin
CS	Chirální selektor
CSP	Chirální stacionární fáze
DABN	1,1'-Dinaftyl-2,2'-diamin
DAD	Detektor diodového pole
DMAA	Dimethylamylamin
DM-β-CD	2,6-Di- <i>O</i> -methyl- β -cyklodextrin
DMP-CF7	3,5-Dimethylfenylkarbamát cyklofruktan-7
DS	Stupeň substituce
EOF	Elektroosmotický tok
ESI	Ionizace elektrosprejem
EtOH	Ethanol
GC	Plynová chromatografie
HE-β-CD	2-Hydroxyethyl- β -cyklodextrin
HILIC	Hydrofilní interakční chromatografie
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HP-β-CD	2-Hydroxypropyl- β -cyklodextrin
IPA	Isopropanol
IP-CF6	Isopropylkarbamát cyklofruktan-6
IP-CF7	Isopropylkarbamát cyklofruktan-7
LFER	Lineární vztah pro změnu volné energie
LOD	Limit detekce
LOQ	Limit kvantifikace
MEKC	Micelární elektrokinetická chromatografie

MeOH	Methanol
MRM	Sledování vybraných reakcí
MS	Hmotnostní spektrometrie
NMR	Nukleární magnetická rezonance
NP	Normální fáze
POM	Polárně organický mód
Q	Kvadrupól
RN-CF6	<i>R</i> -naftylethylkarbamát cyklofruktan-6
RP	Reverzní fáze
RSD	Relativní směrodatná odchylka
S/N	Poměr signálu k šumu
SBE-β-CD	Sulfobutylether-β-cyklodextrin
S-CF6	Sulfatovaný cyklofruktan-6
S-CF7	Sulfatovaný cyklofruktan-7
SDS	Dodecylsírán sodný
SFC	Superkritická fluidní chromatografie
SL	Pomocná kapalina
SIM	Sledování vybraného iontu
SRM	Sledování vybrané reakce
Suk-β-CD	Sukcinylní-β-cyklodextrin
S-α-CD	Sulfatovaný α-cyklodextrin
S-β-CD	Sulfatovaný β-cyklodextrin
S-γ-CD	Sulfatovaný γ-cyklodextrin
TEA	Triethylamin
TFA	Trifluoroctová kyselina
TIC	Sken celkového iontového proudu
TLC	Tenkvrstevná kapalinová chromatografie
TM-β-CD	2,3,6-Tri- <i>O</i> -methyl-β-cyklodextrin
TOF	Analyzátor doby letu
TR	Vytěšňovací poměr
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UPLC	Ultraúčinná kapalinová chromatografie
VAPOL	2,2'-Difenyl-3,3'-bifenantryl-4,4'-diyl hydrogenfosfát

Obsah

1 Úvod	10 -
2 Cíle práce	12 -
3 Chiralita a její důsledky v kontextu chemické analýzy	13 -
3.1 Základní princip separace enantiomerů kapilární elektroforézou	15 -
3.1.1 Matematický model enantioseparace	16 -
3.2 Chirální selektory používané v kapilární elektroforéze.....	18 -
3.2.1 Cyklodextriny a jejich deriváty	19 -
3.2.2 Duální systém cyklodextrinů pro chirální separace	21 -
4 Separace stereoisomerů 1,3- a 1,4-dimethylamylaminu kapilární elektroforézou s využitím duálního systému cyklodextrinů	24 -
4.1 Struktura a vlastnosti 1,3- a 1,4-dimethylamylaminu	24 -
4.2 Nepřímá spektrofotometrická detekce v kapilární elektroforéze	27 -
4.3 Spojení kapilární elektroforézy s hmotnostní spektrometrií	29 -
4.4 Separace stereoisomerů 1,3- a 1,4-dimethylamylaminu metodou CE s nepřímou UV detekcí.....	36 -
4.4.1 Instrumentální vybavení	36 -
4.4.2 Použité chemikálie	36 -
4.4.3 Příprava vzorků doplňků stravy.....	37 -
4.4.4 Výsledky a diskuze.....	38 -
4.4.4.1 Volba vhodného pracovního elektrolytu	38 -
4.4.4.2 Enantioseparace 1,3-dimethylamylaminu	40 -
4.4.4.3 Enantioseparace 1,4-dimethylamylaminu	47 -
4.4.4.4 Simultánní enantioseparace studovaných aminů.....	48 -
4.4.4.5 Částečná validace metod	49 -
4.4.4.6 Analýza 1,3-dimethylamylaminu v doplňcích stravy	51 -
4.4.4.6.1 Stanovení koncentrace 1,3-dimethylamylaminu	51 -
4.4.4.6.2 Stanovení stereoisomerního složení 1,3-dimethylamylaminu.....	51 -
4.5 Separace stereoisomerů 1,3- dimethylamylaminu metodou CE s hmotnostní spektrometrií.....	52 -
4.6 Závěrečné shrnutí	55 -
5 Cyklofruktany a jejich deriváty	57 -
5.1 Cyklofruktany a jejich deriváty v GC	61 -
5.2 Cyklofruktany a jejich deriváty v SFC	62 -
5.3 Cyklofruktany a jejich deriváty v HPLC	63 -
5.4 Cyklofruktany a jejich deriváty v CE	68 -
5.4.1 Studium vlivu barnatých iontů na enantiosektivitu IP-CF6 v CE.....	68 -
5.4.1.1 Instrumentální vybavení a použité chemikálie	69 -
5.4.1.2 Výsledky a diskuze	70 -
5.4.2 Srovnání vlivu barnatých iontů na enantiosektivitu IP-CF6 v CE a HPLC ..	71 -
6 Empirické porovnání enantiosektivity cyklofruktanů a cyklodextrinů v kapilární elektroforéze	73 -

6.1	Instrumentální vybavení	- 73 -
6.2	Chemikálie.....	- 74 -
6.3	Výsledky a diskuze.....	- 75 -
6.3.1	Empirické porovnání enantioselektivity cyklofruktanů a cyklodextrinů v kyselém pracovním elektrolytu	- 75 -
6.3.1.1	Vliv organických rozpouštědel na separaci v kyselém pracovním elektrolytu.....	- 78 -
6.3.1.2	Vliv tenzidů na separaci v kyselém pracovním elektrolytu.....	- 80 -
6.3.2	Empirické porovnání enantioselektivity cyklofruktanů a cyklodextrinů v alkalickém pracovním elektrolytu.....	- 83 -
6.3.2.1	Vliv organických rozpouštědel na separaci v alkalickém pracovním elektrolytu.....	- 85 -
6.3.2.2	Vliv tenzidů na separaci v alkalickém pracovním elektrolytu	- 87 -
6.4	Závěrečné shrnutí	- 88 -
7	Závěr.....	- 90 -

1 Úvod

Mnoho biologicky aktivních látek účastnících se fyziologických procesů je chirálních. Chiralita molekuly může mít za následek rozdílný interakční mechanismus s okolním prostředím, což vede ke vzniku produktů s rozličnými biochemickými vlastnostmi. Pochopením interakce jednotlivých isomerů s živými systémy lze cíleně připravit biologicky aktivnější formy. K tomu je zapotřebí monitorovat zastoupení jednotlivých optických isomerů, případně je dokázat od sebe zcela odseparovat. Cílem této práce je prostudovat nové přístupy pro separaci vybraných chirálních látek kapilární elektroforézou (CE). V první části jsou popsány základní teoretické principy elektroforetické separace chirálních látek. Rovněž je zmíněn stručný přehled nejčastěji používaných neutrálních a nabitých derivátů cyklodextrinů (CD), včetně příkladů doposud publikovaných separací využívajících duálního systému dvou selektorů. Stěžejní část práce spočívá ze dvou samostatných studií věnovaných separacím chirálních látek s využitím CE.

První část je věnována vývoji nové metody separace stereoisomerů 1,3-dimethylamylaminu (1,3-DMAA) a 1,4-dimethylamylaminu (1,4-DMAA) s využitím duálního systému dvou sulfatovaných derivátů CD. Ačkoliv jsou interakční mechanismy CD s různými enantiomery již detailně popsány v řadě vědeckých prací, inovativní je použití duálního systému dvou aniontových derivátů CD. Význam této práce navíc podporuje fakt, že k detekci stereoisomerů 1,3- a 1,4-DMAA bylo použito nepřímé spektrofotometrické detekce, což je v případě chirální separace kladně nabitých látek méně obvyklé. Tato část je zároveň rozšířena o aplikaci CE ve spojení s hmotnostní spektrometrií (MS) pro enantioseparaci a detekci 1,3-DMAA. Nově vyvinutá metoda enantioseparace 1,3-DMAA byla částečně validována a úspěšně aplikována pro analýzu vzorků dvou doplňků stravy s obsahem přírodního geranievého extraktu. Geranievý extrakt by měl teoreticky obsahovat 1,3-DMAA s rozdílným zastoupením jednotlivých stereoisomerů. Cílem této separace bylo stanovit relativní zastoupení jednotlivých isomerů, které může poukázat na syntetický či přírodní původ látky v potravních doplňcích. Dosažené výsledky byly publikovány v impaktovaném zahraničním časopise *Electrophoresis*.

Druhá část disertační práce se rovněž věnuje novému přístupu pro chirální separaci technikou CE, avšak namísto aplikace již dobře popsaných selektorů byl

studován mechanismus interakce relativně nové skupiny chirálních selektorů – cyklofruktanů s vybranými chirálními látkami. Cyklofruktany (CF) a především jejich deriváty se již několik let úspěšně uplatňují jako chirální stacionární fáze (CSP) pro kapalinovou (HPLC) a superkritickou fluidní chromatografii (SFC). Praktické využití CF v CE je prozatím pouze okrajové. Důvodem je nejspíš nedostatečná znalost jejich interakčních mechanismů s chirálními i achirálními látkami. Tato práce přímo navazuje na studii publikovanou v časopise *Journal of Chromatography A* a zaměřenou na porovnání enantioseparačních vlastností isopropylkarbamát cyklofruktanu-6 (IP-CF6) v HPLC a CE při chirální separaci pěti strukturně podobných biaryl atropisomerů bez a v přítomnosti barnatých iontů v mobilní fázi či pracovním elektrolytu.

Dále byla studována enantioselektivita nativního cyklofruktanu-6 (CF6) a cyklofruktanu-7 (CF7) a jejich isopropylkarbamát derivátů na modelovém analytu *R,S*-1,1'-binaftalen-2,2'-diyl hydrogenfosfátu (*R,S*-BNP). Studovány byly vlivy běžných modifikátorů separačních podmínek, jako jsou methanol (MeOH), acetonitril (ACN) a dodecylsírán sodný (SDS) na rozlišení a průběh separace *R,S*-BNP. Výsledky byly empiricky porovnány s daty získanými při použití nativních α - a β -CD jako chirálních selektorů isomerních k studovaným selektorům na bázi CF za stejných experimentálních podmínek. V této práci byla poprvé popsána enantioselektivita nativních CF v CE. Výsledky byly publikovány v impaktovaném zahraničním časopise *Journal of Separation Science*.

2 Cíle práce

Cílem disertační práce bylo prostudovat nové možnosti separace enantiomerů metodou CE. Konkrétní cíle lze rozdělit do několika dílčích bodů:

- 1) Separace stereoisomerů 1,3- a 1,4-DMAA s nepřímou spektrofotometrickou detekcí.
 - a) Volba vizualizujícího iontu a vhodného složení pracovního elektrolytu.
 - b) Nalezení vhodného CS a jeho koncentrace pro rychlou a jednoduchou enantioseparaci 1,3- a 1,4-DMAA.
 - c) Částečná validace nově vyvinuté metody.
 - d) Ověření aplikovatelnosti metody separace stereoisomerů 1,3-DMAA na dvou vzorcích doplňcích stravy s obsahem geranievého extraktu.
- 2) Separace stereoisomerů 1,3-DMAA metodou CE s detekcí hmotnostním spektrometrem.
- 3) Studium enantioselektivity nativních CF a jejich derivátů v CE.
 - a) Studium vlivu koncentrace barnatých iontů v pracovním elektrolytu na rozlišení separace *R,S*-BNP.
 - b) Studium vlivu koncentrace CF na separaci *R,S*-BNP v kyselém i bazickém elektrolytu.
 - c) Empirické porovnání enantioselektivity CD a CF na modelovém analytu *R,S*-BNP s použitím běžných modifikátorů separačních podmínek (methanol, acetonitril, dodecylsírán sodný).

3 Chiralita a její důsledky v kontextu chemické analýzy

Chiralita označující nesouměrné (asymetrické) prostorové uspořádání objektů je fenomén, který do značné míry ovlivňuje mnoho aspektů v přírodních vědách, medicíně, potravinářství a dalších odvětvích. Chirální molekula nemá ve své struktuře centrum (střed nebo rovinu) symetrie, proto ji není možné ztotožnit s jejím zrcadlovým obrazem (prostřednictvím prosté rotace a/nebo translace objektu v prostoru jako celku, tedy bez rozštěpení vazeb nebo změny dihedrálních úhlů). Dvojici optických isomerů, které nelze žádnou operací symetrie navzájem ztotožnit nazýváme enantiomery. Aby bylo možné molekulu označit jako chirální, musí mít minimálně jedno centrum chiralit, což ve většině případů bývá atom (nejčastěji uhlík), na kterém jsou navázány čtyři různé substituenty. Tento typ chiralit je označován jako centrální chiralita. Jinými případy chiralit, kdy v molekule není přítomen asymetrický atom, jsou: (i) axiální chiralita (v molekule je přítomna chirální osa) a (ii) planární chiralita (v molekule je přítomna chirální rovina).

Enantiomery opticky aktivních molekul při interakci s dalším chirálním objektem (jiná chirální molekula nebo chirální fyzikální činitel) vykazují odlišné vlastnosti, zatímco v achirálním prostředí jsou tyto vlastnosti totožné. Odlišné chování enantiomerů v závislosti na typu prostředí se promítá do živých systémů, neboť mnoho fyziologicky aktivních látek je tvořeno chirálními molekulami. Interakce v živých organismech, které probíhají na úrovni molekul, jsou tedy z velké části založeny na vzájemných interakcích enantiomerů různých typů látek (např. aminokyselin, sacharidů, proteinů, nukleových kyselin apod.) ať už se strukturně podobnými nebo látkami zcela odlišnými. Nejčastější oblasti zájmu, které jsou spojovány s chiralitou, jsou beze sporu farmakologie, medicína a toxikologie. Pochopení interakcí enantiomerů s dalšími (chirálními či achirálními) molekulami vede například k vývoji účinnějších léků, objasnění celé řady fyziologických pochodů či vzniku patologických procesů (onemocnění).

Při interakci dvojice enantiomerů s organismem, který obsahuje opticky aktivní systémy (např. enzymy, aminokyseliny, proteiny, sacharidy apod.), vznikají produkty, které mohou mít zcela odlišné biochemické vlastnosti. V některých případech se může jednat pouze o biologickou neúčinnost jednoho z enantiomerů na organismus, jindy může vznikat produkt pro organismus nežádoucí či toxický. S narůstajícím poznáním

v oblasti studia mechanismů působení chirálních látek, jejich syntézy a jejich následným využitím v celé řadě odvětví roste i nutnost disponovat vysoce účinnými separačními metodami pro dělení enantiomerů v mikroměřítku. Vzájemná separace enantiomerů je také nutná pro jejich kvantifikaci v celé řadě matricí.

Vývoj nových analytických metod pro separaci enantiomerů komplikuje fakt, že většina fyzikálně-chemických vlastností dvojice enantiomerů v achirálním prostředí (např. rozpustnost, teplota varu, teplota tání aj.) je identická. K separaci enantiomerů je tedy nutné využít jejich interakce s jinou další chirální molekulou. Při vzájemné interakci separovaných enantiomerů s dalším optickým isomerem dochází ke vzniku diastereomerů – nové molekuly (komplexu), která bude mít alespoň jedno centrum chiralitity s opačnou, a alespoň jedno centrum chiralitity se shodnou konfigurací. Dvojice diastereomerů již má rozdílné fyzikálně-chemické vlastnosti, a proto může být pomocí analytických separačních metod navzájem rozdělena.

Enantioseparace v mikroměřítku (analytickém měřítku) jsou dnes uskutečňovány nejčastěji pomocí tzv. přímých metod. Přímá metoda enantioseparace je založena na interakci separovaných enantiomerů s dalším optickým isomerem tzv. chirálním selektorem (CS), přičemž k interakci a tvorbě diastereomerních komplexů postačí nekovalentní interakce. CS tak musí být součástí separačního systému. Tento způsob separace dnes zcela zastihuje nepřímou metodu, kdy se separované enantiomery derivatizují vhodným chirálním derivatizačním činidlem mimo separační systém za vzniku nových diastereomerních sloučenin (vznikají kovalentní vazby), a ty jsou pak separovány v achirálním prostředí. Díky integraci celé řady CS do separačního systému jsou přímé metody enantioseparací uskutečňovány napříč všemi moderními vysokoúčinnými analytickými separačními metodami, a to zejména plynovou chromatografií (GC), kapalinovou chromatografií, elektromigračními metodami a superkritickou fluidní chromatografií.

Elektromigrační metody představují atraktivní alternativu k, dnes v praxi hojně rozšířeným, chromatografickým metodám, především zásluhou vysoké účinnosti, selektivity, velmi nízké spotřeby vzorků a CS, a také díky možnosti využití různých mechanismů separace s použitím jediné instrumentace. Elektromigrační techniky většinou nevyžadují zakotvení CS na vhodný nosič, jak je tomu v případě chromatografie. CS je zde součástí separačního elektrolytu, což urychluje samotnou optimalizaci enantioseparace a navíc je možné získat fyzikálně-chemická data, která jsou nutná pro popis interakce mezi enantiomery a CS. Elektromigrační metody

umožňují nejen prostou separaci enantiomerů za účelem kvantifikace, ale i studium mechanismů enantioseparací se stávajícími či novými CS, a také studium mechanismů interakce enantiomerů s biologickým prostředím. Získané výsledky tak mají přímý dopad pro současný farmakologický a biomedicínský výzkum.

Určitou nevýhodou elektromigračních technik je většinou nízká koncentrační citlivost ve spojení s běžnými detekčními technikami (spektrofotometrická či vodivostní detekce) ve srovnání s chromatografickými metodami.

3.1 Základní princip separace enantiomerů kapilární elektroforézou

Separace s pomocí elektromigračních metod je založena na rozdílné rychlosti pohybu separovaných částic (iontů, iontových asociátů, nabitých komplexů, neutrálních látek v komplexu s nabitými látkami apod.) ve stejnosměrném elektrickém poli. K popisu principu chirální separace je nezbytné definovat jednu ze základních elektroforetických veličin – elektroforetickou mobilitu μ_e , která je přímo úměrná migrační rychlosti v a nepřímo úměrná intenzitě vkládaného elektrického pole E podle vztahu (1).

$$\mu_e = \frac{v}{E} \quad (1)$$

Směr a rychlost migrace iontu jsou závislé nejen na intenzitě elektrického pole, ale zároveň i na viskozitě separačního prostředí η , a především na parametrech analyzovaného iontu – velikosti náboje q a iontovém poloměru r , jak definuje rovnice (2).

$$\mu_e = \frac{q}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r} \quad (2)$$

Elektroforetická mobilita je teoretickou veličinou, která platí pouze pro plně disociované/protonizované analyty a kromě viskozity separačního prostředí zcela zanedbává ostatní pracovní parametry, jako jsou vkládané vnější napětí, koncentrace a složení elektrolytu, aj. Proto se zavádí jiná veličina, tzv. efektivní mobilita μ_{ef} , která

zohledňuje nejen výše zmíněné parametry, ale i stupeň disociace analyzované molekuly, případně další rovnováhy. Hodnotu efektivní mobility nelze z elektroferogramu přímo odečíst, neboť je ovlivněna příspěvkem tzv. elektroosmotického toku (EOF). EOF vzniká vlivem disociace silanolových skupin na vnitřní stěně křemenné kapiláry, kdy se na jejím povrchu tvoří záporný náboj, který je kationty přítomnými v pracovním elektrolytu kompenzován za vzniku elektrické dvojvrstvy. Ta způsobuje, že při aplikaci vnějšího napětí začnou kationty strhávat svým pohybem ke katodě okolní molekuly rozpouštědla a v kapiláře vznikne pozorovatelný (měřitelný) tok kapaliny. Mobilita charakterizující velikost a směr EOF, která je závislá na teplotě, a složení, koncentraci a pH pracovního elektrolytu, se nazývá elektroosmotická mobilita μ_{eof} . Součtem efektivní a elektroosmotické mobility dostaneme rovnici pro tzv. zdánlivou mobilitu μ_{av} (3),

$$\mu_{av} = \mu_{ef} + \mu_{eof} \quad (3)$$

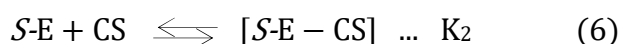
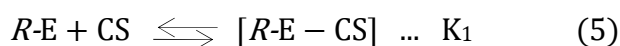
jejíž hodnotu je možné vypočítat přímo ze získaného elektroferogramu podle vztahu (4),

$$\mu_{av} = \frac{l \cdot L}{t_m \cdot U} \quad (4)$$

kde l je efektivní délka kapiláry (vzdálenost od nástřiku vzorku po detektor), L je celková délka kapiláry, t_m je migrační čas analytu, který lze odečíst ze záznamu analýzy a U je hodnota vkládaného vnějšího napětí.

3.1.1 Matematický model enantioseparace

Matematický model enantioseparace s využitím elektromigračních metod byl v minulosti popsán Wrenem a kol. (model vycházející z rozdílů mobilit) [1-3]. Interakci mezi separovanými enantiomery modelové racemické směsi R,S -E a chirálním selektorem CS můžeme popsat následujícími rovnováhami (5) a (6),



kde K_1 a K_2 jsou asociační konstanty tvorby příslušných diastereomerních komplexů. Wrenův model vychází z představy, že volné enantiomery (nevázané v komplexu s CS) mají stejnou elektroforetickou mobilitu $\mu_R = \mu_S = \mu_1$. Stejně tak shodnou elektroforetickou mobilitu mají i vzniklé diastereomerní komplexy separovaných enantiomerů s CS, tj. $\mu_{R-CS} = \mu_{S-CS} = \mu_2$.

Pokud separované enantiomery vykazují rozdílnou afinitu k CS, budou rozdílné i hodnoty asociačních konstant vzniku diastereomerních komplexů ($K_1 \neq K_2$). Rozdíl hodnot asociačních konstant implikuje rozdíl mezi mobilitou volného enantiomeru a enantiomeru asociovaného v komplexu s CS. Tento rozdíl mobilit mezi volným a vázaným enantiomerem v komplexu s CS vede k vzájemné separaci enantiomerů.

Rozdíl zdánlivých mobility enantiomerů $R-E$ a $S-E$ pak může být vypočítán na základě vztahu (7).

$$\Delta\mu = \frac{[C](\mu_1 - \mu_2)(K_2 - K_1)}{1 + [C](K_2 - K_1) + K_1K_2[C]^2} \quad (7)$$

Z uvedeného vztahu plyne, že pokud budou asociační konstanty K_1 a K_2 shodné nebo budou shodné mobility μ_1 a μ_2 , bude rozdíl mobilit $\Delta\mu = 0$ a k vzájemné separaci enantiomerů nedojde. K separaci enantiomerů rovněž nedojde, bude-li koncentrace selektoru $[C] = 0$. Z uvedeného vztahu lze odvodit optimální koncentraci selektoru, při které bude rozdíl mobilit maximální. Zároveň je možné odvodit, že v případě vysokých hodnot asociačních konstant bude k dosažení potřebného rozdílu mobilit nutná nižší koncentrace selektoru a naopak. Rozdíl mobilit mezi enantiomery pak bude nejvyšší v případě, kdy je směr migrace volného neasociovaného enantiomeru opačný k směru migrace komplexu enantiomer – selektor. Tento případ například nastává tehdy, pokud má selektor opačný náboj oproti náboji separovaného enantiomeru. Wrenův model zanedbává vliv pH a disociačních rovnovah, kterým podléhají jak enantiomery, tak případně i CS, pokud se jedná o slabé elektrolyty. Vliv dalších rovnováh pak popisuje matematický model odvozený Vighem a kol. [4-7].

Interakci enantiomerů s CS na molekulární úrovni lze zjednodušeně popsat pomocí tzv. modelu tříbodové interakce [8]. Enantiomer, který interaguje s CS prostřednictvím tří vazebných míst, vytváří stabilnější diastereomerní komplex (komplex s vyšší asociační konstantou) než enantiomer, který interaguje prostřednictvím méně vazeb a je tím pádem v komplexu vázán slaběji. Tato teorie však

nepočítá s charakterem a silou vazebné interakce, stejně tak nepočítá s prostorovou konformací obou interagujících molekul. Přestože byla navržena řada interakčních modelů, které tyto zřejmé nedostatky eliminují [9-11], je model třibodové interakce stále využíván pro ilustrativní popis tvorby diastereomerních komplexů.

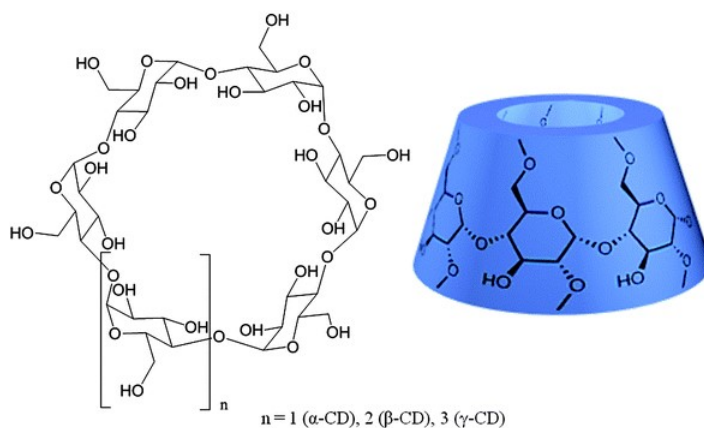
Na tvorbě přechodných diastereomerních komplexů se mohou podílet téměř všechny druhy nekovalentních interakcí, přičemž jejich síla a charakter závisí na vlastnostech a povaze analyzované molekuly a typu CS. Z nejběžnějších interakcí lze například zmínit interakce iontové povahy (coloumbické), interakce ion-dipól a dipól-dipól, π - π interakce, van der Waalsovy síly, vodíkové můstky nebo hydrofobní interakce. Některé zmíněné interakce, např. π - π interakce, svým charakterem popírají model třibodové interakce, neboť nepůsobí pouze na jednom místě (v jednom bodě), ale na více místech zároveň (vícebodová interakce). Kromě povahy interakce hraje velmi významnou roli i již zmíněné sterické uspořádání obou molekul, neboť může prostorově bránit k požadovanému přiblížení molekul a vytvoření potřebné interakce. Sterický faktor se uplatňuje například při použití CS, jejichž separační mechanismus je založen na tvorbě tzv. inkluzních komplexů, což je charakteristické zejména pro CD a jejich deriváty. V neposlední řadě jsou charakter a síla vazby do značné míry ovlivněny složením separačního prostředí, které může mít na interakci pozitivní (podpora iontových nebo hydrofobních interakcí), ale i negativní vliv (kompetice složek separačního média s analytem o interakční místa CS) [12].

3.2 Chirální selektory používané v kapilární elektroforéze

Přestože v současnosti existuje celá řada CS, jako jsou například makrocyclické antibiotika, chirální polymerní tenzidy, chirální crown ethery, chirální polymery, proteiny apod., které je možné úspěšně použít pro přímou chirální separaci metodou CE, bude v následujících kapitolách věnována pozornost pouze CD a jejich derivátům, mechanismu a praktické aplikaci duálního systému selektorů a, v elektromigračních metodách ojedinele používané, skupině makrocyclických oligosacharidů – cyklofruktanům.

3.2.1 Cyklodextriny a jejich deriváty

CD jsou cyklické oligosacharidy tvořené D-glukopyranosovými jednotkami, které jsou spojené prostřednictvím α -1,4-glykosidických vazeb a vytváří strukturu komolého kužele (Obr. 1). V praxi jsou nejčastěji používány α -, β - a γ -CD, jejichž makrocyklus je tvořen 6, 7 nebo 8 D-glukopyranosovými jednotkami. Připravit lze i CD tvořené 9 a více jednotkami, ale ty nejsou kvůli deformaci prostorové konformace aplikačně významné. Vnější povrch CD je vlivem přítomnosti hydroxylových funkčních skupin na uhlících 2, 3 a 6 hydrofilní, zatímco povrch vnitřní dutiny (kavity) tvořený uhlovodíkovou kostrou sacharidových jednotek je hydrofobní, což umožňuje tvorbu inkluzních komplexů s celou řadou molekul. Substitucí některých nebo všech volných hydroxylových skupin lze připravit deriváty CD, které mají nejen odlišné fyzikálně-chemické vlastnosti (např. rozpustnost), ale zároveň poskytují pro analyt další možná interakční místa. Právě díky detailně popsanému procesu vzniku inkluzních komplexů s achirálními i chirálními molekulami, široké škále synteticky připravených neutrálních i nabitých derivátů, dobré rozpustnosti ve vodě, nízké absorpci UV záření a netoxičtí, se CD staly často používanými CS v CE.



Obrázek 1 Struktura (vlevo) a prostorové uspořádání (vpravo) makromolekuly CD připomínající komolý kužel - převzato a upraveno [13].

Z nativních (přírodních, nesubstituovaných) CD se pro chirální separace nejčastěji používá β -CD. Důvodem je pravděpodobně velikost kavity (6,0-6,4 Å), která svými parametry umožňuje tvorbu stabilnějších inkluzních komplexů s většinou běžně analyzovaných molekul. Tvorba inkluzních komplexů je u nativních CD nejdůležitější stereoselektivní interakcí, proto jsou aplikace γ -CD, jehož kavita je pro většinu analytů

příliš velká (7,5-8,3 Å) a vzájemné vazebné interakce s analytem velmi slabé, méně časté. Naopak průměr kavity α -CD je malý (4,7-5,2 Å), avšak v porovnání s velkou kavitou γ -CD umožňuje silnější interakce s celou řadou analytů, a proto je aplikačně zajímavější [14]. Důvodem je také skutečnost, že s kavitou α -CD může interagovat pouze část molekuly analytu, například postranní uhlovodíkový řetězec, což k vytvoření přechodného diastereomerního komplexu mnohdy stačí.

Jak již bylo zmíněno, derivatizace hydroxylových skupin nativních CD může značně změnit jejich fyzikálně-chemické vlastnosti, včetně enantioselektivity. Charakter interakčního mechanismu se významně mění s vlastnostmi funkční skupiny, která může být neutrální, nebo kationtové či aniontové povahy. Z neutrálních derivátů CD jsou aplikačně rozšířené především 2-hydroxypropyl- β -CD (HP- β -CD) a methylované β -CD, konkrétně methyl- β -CD, 2,6-di-*O*-methyl- β -CD (DM- β -CD) a 2,3,6-tri-*O*-methyl- β -CD (TM- β -CD). Přítomnost neutrální funkční skupiny v molekule CD může nejen podpořit vliv hydrofobních a vodíkových interakcí, ale zároveň může dojít k stabilizaci sterického uspořádání CD vedoucí k zpřístupnění kavity CD molekule analyzované látky. V neposlední řadě se derivatizací CD zvyšuje i jejich rozpustnost ve vodě a některých vybraných organických rozpouštědlech.

Derivatizace CD kladně nebo záporně nabitými funkčními skupinami zprostředkovává elektrostatické interakce s opačně nabitými molekulami, což vede ve většině případů nejen k nižší spotřebě nabitého CD oproti nenabitému CD (při totožném analytu majícím opačný náboj a za identických separačních podmínek), ale i k značnému nárůstu potenciálních aplikací. Hlavní předností nabitých derivátů CD je vlastní elektroforetická mobilita, jejíž směr a velikost jsou dány charakterem funkční skupiny. Vlastní mobilita nabitých CD umožňuje enantioseparaci neutrálních látek, která není v případě nativních nebo neutrálních derivátů CD možná. Jelikož většina analyzovaných látek je bazického charakteru, je i aplikace negativně nabitých derivátů CD oproti pozitivně nabitým derivátům obvyklejší. Zcela dominantní roli mezi negativními deriváty CD hrají sulfatované CD, přičemž nejpoužívanějším z nich je sulfatovaný β -CD (S- β -CD). Méně časté, ale pořád aplikačně zajímavé je použití karboxymethylovaných a fosfatovaných derivátů CD [15]. Použití kladně nabitých derivátů CD je značně limitováno sorpcí na záporně nabitou vnitřní stěnu křemenné kapiláry, což může v některých případech vést i k obrácení směru migrace EOF. Navíc oproti aniontovým CD je proces jejich syntézy značně komplikovanější [16].

Nejvýznamnějším zástupce této skupiny je β -CD derivatizovaný kvartérní amoniovou solí.

3.2.2 Duální systém cyklodextrinů pro chirální separace

Ve většině doposud publikovaných prací je duální systém CS tvořen dvojicí CD. Typické složení duálního systému obsahuje nabitý derivát CD a nativní nebo neutrální derivát CD [17-22]. Tento systém se uplatňuje především pro enantioseparaci neutrálních (nenabitých) analytů, přičemž každý CD plní v systému rozdílnou roli. Zatímco nabitý derivát CD svou interakcí s analytem obvykle zprostředkovává jeho elektroforetickou migraci k příslušné elektrodě na detekčním konci kapiláry, hlavní úlohou nenabitého derivátu CD bývá většinou tvorba diastereomeru vedoucí k enantioseparaci. Aplikace tohoto systému je však samozřejmě možná i pro látky iontové povahy, jak je demonstrováno na následujících příkladech.

Jako první publikovali aplikaci duálního systému CD pro separaci vybraných kationových drog Lurie a kol. [17]. Duální systém byl tvořen neutrálním DM- β -CD a záporně nabitým sulfobutylether β -CD (SBE- β -CD). Poměr koncentrace obou CD měl důležitý vliv na získané rozlišení a migrační časy. Fillet a kol. [20] použili kombinaci záporně nabitého SBE- β -CD a nenabitého derivátu CD (DM- β -CD nebo TM- β -CD, ale byly testovány i nativní β -CD, methyl- β -CD a HP- β -CD) pro chirální separaci pěti vybraných léčiv. Matthijs a kol. [22] testovali směsi obsahující vysoce sulfatovaný α -, β - nebo γ -CD a neutrální derivát CD, konkrétně DM- β -CD, TM- β -CD nebo HP- β -CD, pro chirální separaci 25 farmaceuticky aktivních látek s různými acidobazickými vlastnostmi. Pro 11 z 16 bazických látek bylo dosaženo lepší enantioseparace v případě použití duálního systému CD než v případě, kdy byl použit pouze samostatný sulfatovaný CD, přičemž lepší výsledky poskytoval TM- β -CD v porovnání s DM- β -CD a HP- β -CD.

V některých případech může být směs CS tvořena dvěma neutrálními deriváty CD [23-25]. Znaležiona a kol. [23] vyvinuli CE metodu pro chirální separaci čtyř stereoisomerů tapentadolu pomocí směsi 0,5 % (w/v) HP- β -CD a 5,0 % (w/v) HP- γ -CD. Zatímco HP- β -CD vykazoval větší enantioselektivitu pro separaci *S,R*- a *R,S*-tapentadolu, HP- γ -CD umožnil separaci *S,S*- a *R,R*- isomerů. Zcela vzácně se objevuje aplikace duálního systému dvou (především opačně) nabitých derivátů CD [26,27].

Abushoffa a kol. [26] publikovali enantioseparaci vybraných nesteroidních protizánětlivých léčiv metodou CE s použitím směsi kationtového permethyl-6-monoamino-6-monodeoxy- β -CD a polyaniontového heptakis-6-sulfato- β -CD. Oba CD měly nejen opačný vliv na elektroforetické mobility analytů, ale také různou stereoselektivní afinitu k enantiomerům jednotlivých analyzovaných látek.

Efektivní mobilita jednoho z dvojice separovaných enantiomerů μ_{Aeff} interagujícího se selektorem byla popsána Wrenem a Rowem [1] a je dána vztahem (8),

$$\mu_{Aeff} = \frac{\mu_{Af} + \mu_{AC} K_{AC} c_S}{1 + K_{AC} c_S} \quad (8)$$

který je obdobný vztahu (7) popisujícímu diferenci mobilit jednotlivých enantiomerů v závislosti na rovnovážné koncentraci selektoru $[C]$ a hodnotách asociačních konstant K_1 a K_2 . Rovnice (8) popisuje efektivní mobilitu pouze jednoho z enantiomerů, přičemž μ_{Af} je mobilita volného (v komplexu nevázaného) enantiomeru, μ_{AC} je mobilita komplexu enantiomer – selektor, c_S je analytická koncentrace použitého selektoru a K_{AC} je asociační konstanta charakterizující sílu interakce mezi enantiomerem a selektorem. Rovnice však platí pouze tehdy, pokud interakce mezi analytem a selektorem je dostatečně rychlá (rychlejší než elektroforetická migrace) a stechiometrie komplexace enantiomer – selektor je v poměru 1:1 [28].

Matematický model popisující elektroforetickou mobilitu analytu v duálním systému selektorů vychází z uvedené rovnice (8). Systém však musí splňovat další předpoklady: (i) selektory musí interagovat s analytem nezávisle a nesmí docházet k tvorbě směsných komplexů mezi analytem a oběma selektory. Zároveň (ii) spotřeba každého ze selektorů pro vytvoření komplexu musí být zanedbatelná. Rovnice pro μ_{Aeff} v duálním systému selektorů poté vypadá následovně (9):

$$\mu_{Aeff} = \frac{\mu_{Af} + \mu_{AC1} K_{AC1} c_{S1} + \mu_{AC2} K_{AC2} c_{S2}}{1 + K_{AC1} c_{S1} + K_{AC2} c_{S2}} \quad (9)$$

přičemž indexy 1 a 2 označují první a druhý selektor [29]. Dubský a kol. [30] modifikovali rovnici pro výpočet komplexace analytu s jedním selektorem rozšířením na rovnici pro libovolný počet selektorů (10),

$$\mu_{Aeff} = \frac{\mu_{Af} + \mu_{AC}^c K_{AC}^c c_S^c}{1 + K_{AC}^c c_S^c} \quad (10)$$

kde μ_{Aeff} a μ_{Af} mají stejný význam jako v předešlých rovnicích, c_S^c je součet molárních koncentrací všech selektorů přítomných v systému, K_{AC}^c je celková rovnovážná konstanta rovna (11)

$$K_{AC}^c = \sum_i \chi_i K_i \quad (11)$$

a μ_{AC}^c je celková mobilita komplexu analyt-selektor (12),

$$\mu_{AC}^c = \frac{\sum_i \chi_i \mu_i K_i}{K_{AC}^c} \quad (12)$$

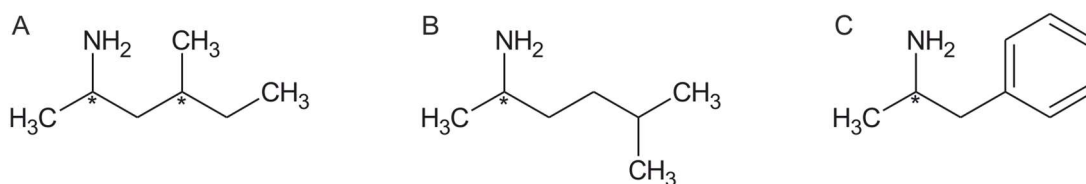
kde χ_i je molární frakce i -tého selektoru ve směsi (systému selektorů), μ_i je mobilita komplexu analyt – i -tý selektor a K_i je konstanta stability komplexu mezi analytem a i -tým selektorem. Platnost modelu experimentálně ověřila Müllerová a kol. [31] na separaci ibuprofenu a flurbiprofenu jakožto modelových analytů. Studovány byly dva duální systémy CS, konkrétně DM- β -CD s nativním β -CD a DM- β -CD s 6- O - α -maltosyl- β -CD v pufru o složení 50 mM Tris a 50 mM Tricin o pH 8,2.

Predikce vhodné kombinace a koncentračního poměru duálního systému CD pro chirální separace je stále velice obtížná, neboť závisí na mnoha faktorech, mezi které patří zejména povaha studovaného analytu nebo složení pracovního elektrolytu.

4 Separace stereoisomerů 1,3- a 1,4-dimethylamylaminu kapilární elektroforézou s využitím duálního systému cyklodextrinů

4.1 Struktura a vlastnosti 1,3- a 1,4-dimethylamylaminu

1,3-dimethylamylamin (1,3-DMAA) a 1,4-dimethylamylamin (1,4-DMAA) jsou jednoduché alifatické primární aminy. 1,3-DMAA je chirální látka se dvěma stereogenními centry tvořící směs čtyř stereoisomerů (dvou párů enantiomerů), zatímco 1,4-DMAA má pouze jedno stereogenní centrum a je tak tvořeno pouze jednou dvojicí enantiomerů. Struktura molekuly 1,3-DMAA je částečně podobná molekule amfetaminu (Obr. 2). Zdánlivě nepodstatná podobnost molekul 1,3-DMAA a amfetaminu může vést k falešně pozitivním imunochemickým výsledkům na přítomnost amfetaminů ve vzorcích obsahujících 1,3-DMAA [32].



Obrázek 2 Struktury (A) 1,3-DMAA, (B) 1,4-DMAA a (C) amfetaminu ilustrující jejich částečnou podobnost. Stereogenní centra jsou označena hvězdičkou.

1,3-DMAA je pravděpodobně, společně s 1,4-DMAA, obsažen v olejích a extraktech z rostlin rodu *Pelargonium* a *Geranium* (čeleď *Geraniaceae*), a pro své stimulační účinky bývaly oleje a extrakty přidávány jako aktivní složky do řady doplňků stravy a přípravků pro fitness [33,34]. Bezpečnost užívání 1,3-DMAA je v posledních letech předmětem četných debat, které navíc umocnily spekulace o přirozeném výskytu 1,3-DMAA v geraniových extraktech. Některé studie potvrzují, že synteticky připravený 1,3-DMAA, obzvláště v kombinaci s alkoholem nebo jinými látkami obvykle přítomnými v doplňcích stravy s obsahem geraniového extraktu jako je například kofein, může mít negativní účinky na lidský organismus. Negativní působení na organismus se nejčastěji projevuje jako nespavost, tachykardie (zvýšená tepová frekvence), krvácení do mozku nebo může dokonce dojít i k vzniku infarktu myokardu [35-38]. Světová antidopingová agentura zařadila 1,3-DMAA v roce 2010 na listinu

zakázaných látek [39] jako reakci na zvýšený počet případů užívání prostředků s obsahem 1,3-DMAA profesionálními sportovci.

Správná identifikace a stanovení přírodních substancí, jako jsou pravděpodobně i 1,3-DMAA a 1,4-DMAA, v botanickém materiálu je složitý proces závislý na mnoha faktorech: (i) na oblasti a přírodních podmínkách, ve kterých byly rostliny pěstovány a sbírány; (ii) způsobu úpravy a skladování vzorků; (iii) extrakčním postupu; (iv) složitosti matrice; (v) volbě selektivní a dostatečně citlivé analytické metody atd. [40,41]. Každý z těchto parametrů může být důvodem, proč doposud pouze tři studie potvrdily přirozený výskyt 1,3-DMAA v rostlinném materiálu [33,34,42]. Naopak mnoho publikovaných prací zabývajících se analýzou složení přírodních silic získaných extrakcí z rostlin čeledi *Geraniaceae* souhlasně tvrdí, že 1,3-DMAA se v těchto extraktech nevyskytuje [32,43-49]. Například ElSohly a kol. [43] vyvinuli GC-MS, LC-MS/MS a UPLC-QTOF-MS metody pro analýzu 1,3-DMAA v rostlinném materiálu a oleji druhu *Pelargonium graveolens*. Žádný z testovaných vzorků nevykazoval přítomnost detekovatelného množství 1,3-DMAA, přičemž LOD pro zmíněné metody byly < 0,1 ppm pro GC-MS, < 2,5 ppb pro LC-MS/MS a < 10 ppb pro UPLC-QTOF-MS. Di Lorenzo a kol. [44] vyvinuli HPLC-DAD metodu využívající derivatizaci 1,3-DMAA pomocí *o*-ftaldialdehydu s LOD = 0,3 µg/ml. Potvrdili tím tak nepřítomnost 1,3-DMAA v koncentraci vyšší než 0,3 µg/ml ve čtyřech odrůdách rodu *Pelargonium*, konkrétně *citriodorum*, *denticolatum*, *graveolens* a *tomentosum*.

Páry enantiomerů v synteticky připraveném 1,3-DMAA by měly být racemické a poměr diastereomerů dán charakterem procesu syntetické výroby. Naopak přírodní chirální látky získané z rostlinných materiálů jsou jako výsledek enzymatického (nesymetrického) procesu obvykle obohaceny ve prospěch jednoho z enantiomerů (stereoisomerů) [50]. Je však nezbytné zmínit, že v některých případech mohou i přírodní chirální látky tvořit racemické směsi [51,52].

Zhang a kol. [50] použili GC s plamenově ionizačním detektorem pro stanovení poměrného zastoupení 1,3-DMAA stereoisomerů u dvou syntetických standardů a třinácti různých komerčních doplňků stravy. K enantioseparaci byla použita kolona s CSP Astec ChiralDex G-DM (30 m x 0,25 mm x 0,20 µm). Vzorky byly před analýzou derivatizovány anhydridem kyseliny *N*-pentafluoropropionové. Stereoisomerní složení 1,3-DMAA v obou syntetických standardech a všech třinácti doplňcích stravy bylo tvořené racemickými páry enantiomerů. Z dosažených výsledků

autoři usuzovali, že je nepravděpodobné, aby 1,3-DMAA obsažený ve zkoumaných doplňcích stravy byl přírodního původu.

Naproti tomu Fleming a kol. [33] vyvinuli HPLC-MS/MS metodu používající Phenomenex Kinetex C18 (4,6 x 150 mm; 2,6 μ m) kolonu pro analýzu rostlinného materiálu ze tří oblastí Číny (regiony Changzhou, Guiyang a Kunming). Průměrná stanovená koncentrace 1,3-DMAA v rostlinách druhu *Pelargonium graveolens* z regionu Changzhou sbíraných v různých ročních obdobích se pohybovala v rozmezí 68 až 496 ng/g rostlinného materiálu, přičemž se podařilo stanovit i koncentraci 1,4-DMAA, která byla 13 až 162 ng/g rostlinného materiálu. Přítomnost 1,3- ani 1,4-DMAA v rostlinách z regionů Guiyang a Kunming však nebyla potvrzena. Jelikož je 1,3-DMAA tvořen dvěma diastereomery majícími různé fyzikální vlastnosti, došlo za daných separačních podmínek k jejich separaci. Poměry diastereomerů 1,3-DMAA v syntetickém standardu a v rostlinném materiálu z regionu Changzhou byly srovnatelné. Autoři dospěli k závěru, že tyto výsledky nasvědčují možnosti, že 1,3-DMAA může být, i přes shodné diastereomerní zastoupení v syntetickém standardu a získaném extraktu, přírodního původu a může být extrahován z rostlin rodu *Pelargonium* a *Geranium*.

Další práce zabývající se stanovením diastereomerního nebo stereoisomerního složení 1,3-DMAA nebyla doposud publikována. Navíc žádná vědecká práce prozatím nestudovala možnosti chirální separace 1,4-DMAA, který se, na základě předešle publikovaných výsledků [33,34], pravděpodobně vyskytuje v geraniových extraktech společně s 1,3-DMAA.

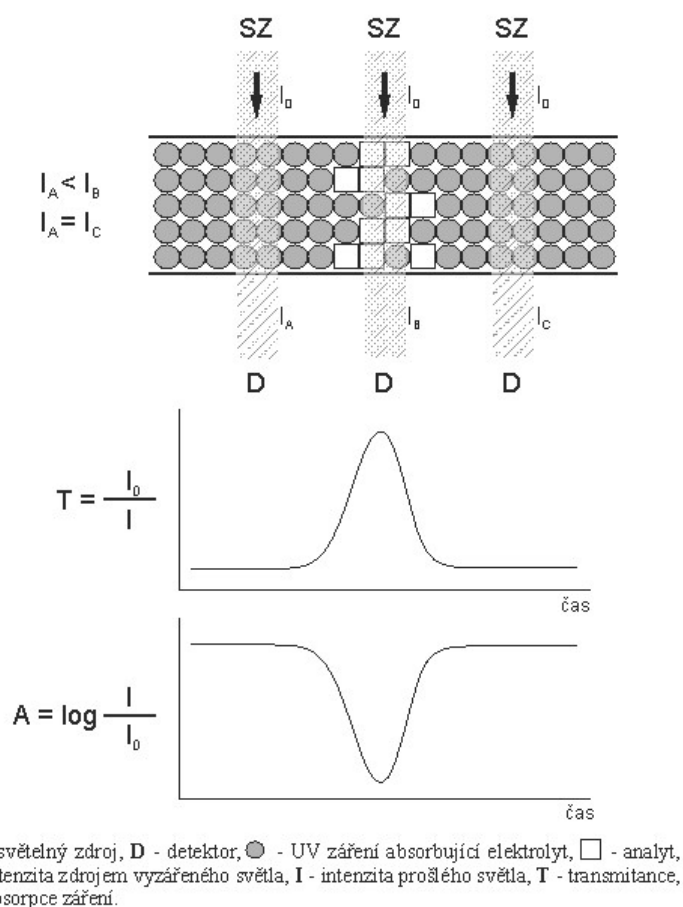
Vzhledem k tomu, že dosud nebyla publikovaná metoda rychlé a nenáročné separace všech stereoisomerů 1,3-DMAA a 1,4-DMAA, představuje využití CE pro tyto účely vhodnou alternativu k chromatografickým metodám.

Cílem této části práce bylo vyvinout časově nenáročnou metodu pro enantioseparaci standardů 1,3- a 1,4-DMAA pomocí CE s nepřímou spektrofotometrickou detekcí pro následnou analýzu poměru stereoisomerů uvedených látek ve vybraných doplňcích stravy. Během optimalizace metody byly studovány všechny parametry ovlivňující citlivost detekce (typ a koncentrace vizualizujícího iontu, složení a pH pracovního elektrolytu) a rozlišení (typ a koncentrace CS, složení duálního systému CS). Optimalizovaná metoda byla částečně validována a následně použita pro stanovení diastereomerního a stereoisomerního složení 1,3-DMAA v doplňcích stravy HydroxyStim[®] a Neurocore[®].

4.2 Nepřímá spektrofotometrická detekce v kapilární elektroforéze

Komerčně prodávané CE systémy jsou rutinně vybaveny detektorem diodového pole (DAD), který patří mezi nedestruktivní detektory vhodné pro detekci v oblasti vlnových délek od 200 až do 760 nm. Ve struktuře molekul 1,3- a 1,4-DMAA se nevyskytuje žádný chromofor (část molekuly, nejčastěji funkční skupina, která absorbuje elektromagnetické záření v UV-VIS oblasti), proto je nezbytné k detekci použít jiný postup.

Princip nepřímé detekce (Obr. 3) je založen na přidavku tzv. absorbujícího (vizualizujícího) iontu do pracovního elektrolytu, který musí splňovat základní podmínku iontové formy se stejným nábojem, jako má detekovaný analyt. Absorbující ion, na rozdíl od analytu, bude absorbovat elektromagnetické záření a analyt bude detekován prostřednictvím poklesu absorbance vzhledem k základní linii (negativní pík) [53].



Obrázek 3 Základní schéma nepřímé spektrofotometrické detekce v separačním mediu.

Pokud detekčním okénkem prochází pouze pracovní elektrolyt s přidavkem definovaného množství absorbujícího iontu je absorbance tohoto pracovního elektrolytu vysoká, protože jen malé množství z celkového množství světelného kvanta emitovaného ze zdroje záření prochází do detektoru. V momentě, kdy detekčním okénkem prochází zóna analytu, dojde k vytěsnění ekvimolárního množství absorbujícího iontu ionty separovaného analytu (neabsorbujícího záření) a dojde k odpovídajícímu poklesu absorbance (Obr. 3). Velikost poklesu absorbance je primárně závislá na rozdílech v elektroforetických mobilitách a koncentracích separovaného a absorbujícího iontu.

Proces vytěsnění absorbujícího iontu separovaným iontem je možné vyjádřit pomocí vytěšňovacího poměru (TR). TR vyjadřuje počet molů absorbujícího iontu vytlačeného jedním molem iontů analytu ze zóny analytu. TR lze matematicky vyjádřit rovnicí (13),

$$TR = \frac{z_A}{z_P} \cdot \frac{\mu_P}{\mu_A} \left(\frac{\mu_A + \mu_X}{\mu_P + \mu_X} \right) \quad (13)$$

kde z_A a z_P jsou náboje separovaného analytu A a vizualizujícího iontu P, μ_A , μ_X a μ_P jsou elektroforetické mobility odpovídající separovanému analytu A, protiiontu X pracovního elektrolytu a vizualizujícímu iontu P. Pro nepřímou UV-VIS detekci lze pak Lambert-Beerův zákon přepsat do podoby (14),

$$\Delta A = (\varepsilon_A - TR \cdot \varepsilon_P) b \cdot C_A \quad (14)$$

kde b je průměr separační kapiláry a C_A je koncentrace analytu. Pro nepřímou UV-VIS detekci tedy platí, že ε_A je blízké nule, a naopak ε_P by mělo být vysoké.

Pro dosažení co nejvyšší citlivosti nepřímé UV-VIS detekce by měla koncentrace absorbujícího iontu v pracovním elektrolytu být co nejvyšší. Prakticky je maximální koncentrace absorbujícího iontu omezena lineárním rozsahem UV-VIS detektoru. Citlivost detekce bude samozřejmě ovlivňovat tvar a účinnost negativního píku. V tomto případě je nutné přihlídnout při volbě absorbujícího iontu také k hodnotám elektroforetických mobilit absorbujícího iontu, separovaného iontu a protiiontu pracovního elektrolytu a v neposlední řadě také k pH pracovního elektrolytu a k případným dalším rovnováhám (např. komplexačním).

Práce zaměřené na nepřímou spektrofotometrickou detekci v CE se zejména věnují, v případě analýzy negativně nabitých látek, separaci anorganických aniontů, organických kyselin a sacharidů [54-57] nebo v případě analýzy kladně nabitých látek, separaci malých anorganických kationtů, především alkalických kovů, kovů alkalických zemin a lanthanoidů [58-60].

Doposud byly publikovány pouze dvě práce zabývající se enantioseparací pozitivně nabitých látek metodou CE s nepřímou UV-VIS detekcí. První z nich je zaměřena na separaci čtrnácti vybraných D,L-aminokyselin [61]. Jako pracovní elektrolyt byl použit pufr o složení 10 mM Tris a 100 mM kyseliny citronové s přídavkem 18-crown-6-tetrakarboxylové kyseliny, která sloužila jako CS. Byly studovány tři potenciální absorbující kationty: (i) 2-aminobenzimidazol, (ii) chinin a (iii) chrysoidin. Ačkoliv citlivost detekce byla pro každý z absorbujících iontů o fixní koncentraci 3 mM shodná, nejvyšší poměr signálu k šumu a zároveň minimální drift základní linie vykazoval chrysoidin. Takto zvolené separační podmínky byly úspěšně aplikovány pro chirální separaci devíti ze čtrnácti vybraných D,L-aminokyselin.

V druhé publikaci byl použit CE systém s kapacitně vázaným bezkontaktním vodivostním detektorem (C4D) k enantioseparaci aminů [62]. Získané výsledky byly následně porovnány s analýzami získanými metodou CE s nepřímou UV-VIS detekcí, pro kterou byly testovány tři pufrы o složení: (i) 10 mM kreatinin fosfát pH 2,20; (ii) 5 mM naftyl-1-amin fosfát pH 2,20 a (iii) 10 mM imidazol acetát pH 4,50. Jako neoptimálnější pufr (na základě získaných hodnot LOD) byl vybrán 10 mM kreatinin fosfát s přídavkem 15 mM TM- β -CD jako CS. Autoři však kladou důraz na skutečnost, že nepřímá UV-VIS detekce byla ve všech hodnocených parametrech (citlivost, opakovatelnost, přesnost, lineární rozsah i symetrie píků) v porovnání s C4D výrazně horší.

Další z možností je použití jiného detektoru než DAD. V tomto případě se nabízí spojení s vysoce univerzálním hmotnostním spektrometrem umožňujícím zároveň i identifikaci látek na základě hodnot poměrů hmotnosti m a náboje z .

4.3 Spojení kapilární elektroforézy s hmotnostní spektrometrií

Instrumentální spojení CE s detekcí hmotnostním spektrometrem (MS) není zcela rutinní záležitostí jako například spojení GC-MS nebo HPLC-MS, avšak díky pokroku

na poli vývoje ionizačních technik je již dnes dostupné. Nepopíratelnou výhodou spojení CE-MS je oproti standardní spektrofotometrické detekci řádově vyšší koncentrační citlivost detekce a také informace umožňující identifikaci separovaných látek (na základě poměru m/z , či z fragmentačních spekter) [63-65]. Nevýhodou je možný mírný pokles účinnosti píků vzhledem k systému se spektrofotometrickou detekcí a rovněž jistá omezení ve složení separačních podmínek v závislosti na použité ionizační technice. Ionizační techniky používané v CE jsou obdobné těm používaným při spojení HPLC-MS, přičemž nejvíce se využívají techniky ionizace za atmosférického tlaku, konkrétně ionizace elektrosprejem (ESI), chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI) a fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI). Všechny zmíněné ionizační techniky lze označit za měkké, což znamená, že během procesu ionizace fragmenty nevznikají, nebo vznikají pouze v malém rozsahu a ve spektru lze pozorovat dominantně tzv. molekulární ion [66].

APPI je vhodná zejména pro ionizaci silně nepolárních molekul. Princip je založený na převedení analytu do plynného stavu, kde reaguje s fotony o dané energii, které jsou emitovány argonovou nebo častěji kryptonovou výbojkou. Pokud energie fotonu přesáhne ionizační energii analyzované molekuly, dojde k fotoexcitaci a následné ionizaci molekuly. Při APPI nejsou kladeny speciální nároky na složení pracovního elektrolytu, stejně tak lze použít přídavek povrchově aktivní látky (tenzidu), což umožňuje spojení micelární elektrokinetické chromatografie (MEKC) s MS detekcí.

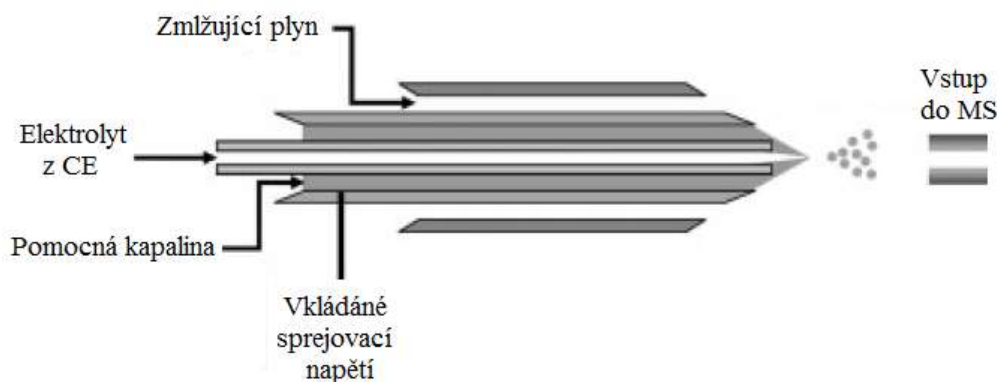
APCI je technika vhodná pro ionizaci nízkomolekulárních středně polárních až mírně nepolárních látek. Při APCI je analyt vystupující z kapiláry zplyněn a ionizován prostřednictvím přenosu náboje z pomocného činidla, které je předtím pomocí koronového výboje na jehle ionizováno. Přestože APCI, stejně jako APPI, dovoluje použití pufrů o standardním složení, včetně použití tenzidů, není pro spojení CE-MS zcela běžné.

Jednoznačně nejpoužívanější ionizační technikou pro spojení CE-MS je ESI. ESI je vhodné pro ionizaci jak nízkomolekulárních, tak i vysokomolekulárních látek polární až iontové povahy. Při ionizaci elektrosprejem vstupuje analyt do kovové kapiláry, na které je vloženo napětí (3-5 kV), umístěné na konci separační kapiláry. Vlivem elektrického pole dojde k vypuzení iontů z kovové kapiláry a vytvoření elektrospreje, který je na ústí kapiláry tvořen velkými kapičkami nesoucími značný povrchový náboj. V důsledku odpařování rozpouštědla se zvyšuje hustota povrchového náboje. Při dosažení kritické hodnoty povrchového náboje dojde k tzv. coulombickým explozím

vedoucím k vytvoření malých nabitých kapiček, v ideálním případě až iontů. Kovová kapilára slouží nejen k vytvoření vodivého spojení na obou koncích separační kapiláry, ale i k aplikaci sprejovacího napětí sloužícího k tvorbě elektrospreje. V současnosti se používají tři základní druhy uspořádání sprejovacího konce kapiláry: (i) bez pomocné kapaliny (sheathless), s pomocnou kapalinou (sheath flow) a (iii) kapalinový spoj (liquid-junction) [67,68].

Spojení sheathless není při klasickém spojení CE-ESI-MS moc často využíváno, neboť pracuje pouze při velmi nízkých průtocích elektrolytů, což může zapříčinit nestabilitu elektrospreje. Výhodou tohoto uspořádání je naopak vyšší citlivost a opakovatelnost, neboť nedochází k ředění vzorku pomocnou kapalinou, jako je tomu u ostatních dvou uspořádání. Spojení sheathless se proto daleko častěji používají při spojení čipové elektroforézy s MS (tzv. nanosprej) [69].

Uspořádání sheath-flow využívající k vytvoření elektrospreje pomocnou kapalinu a zmlžující plyn je oproti uspořádání sheathless při spojení CE-ESI-MS mnohem běžnější. Separační kapilára je umístěna v ocelové kapiláře, na kterou je vkládáno sprejovací napětí, a pomocí které je zároveň přiváděna pomocná kapalina (Obr. 4).



Obrázek 4 Schéma spojení CE-ESI-MS s použitím sheath-flow rozhraní – převzato a upraveno [70].

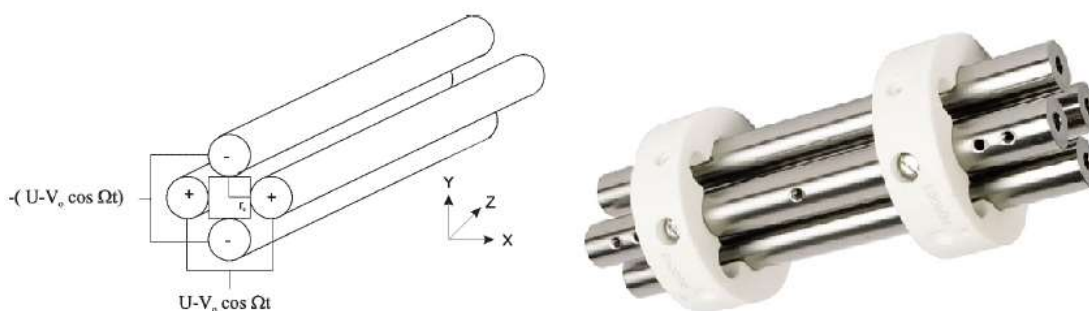
Pomocná kapalina zajišťuje nejen vytvoření a stabilitu elektrospreje, ale při vhodně zvoleném složení může zvýšit sprejovací účinnost a efektivitu ionizace. Použití pomocné kapaliny, která svým prouděním strhává elektrolyt ze separační kapiláry, umožňuje elektroforetickou separaci bez přítomnosti EOF, což při uspořádání sheathless není možné. Nevýhodou je ztráta citlivosti detekce způsobená naředěním analyzovaného vzorku pomocnou kapalinou a rovněž i ztráta účinnosti separace vytvořením parabolického profilu proudění elektrolytu uvnitř separační kapiláry.

Zároveň není možné použít standardní pracovní elektrolyty a separační modifikátory, které mohou potlačovat ionizaci analytu, ale je nutné zvolit jako elektrolyty těkavé organické kyseliny (nejčastěji kyselinu mravenčí, octovou či pufr na bázi uhličitanu/hydrogenuhličitanu) nebo popřípadě jejich amonné soli [70]. I přes všechny tyto nedostatky je sheath-flow uspořádání, jak již bylo zmíněno výše, nejběžnější při spojení CE-ESI-MS.

Uspořádání liquid-junction, stejně jako sheath-flow, využívá pomocnou kapalinu, takže opět dochází k naředění vzorku a poklesu koncentrační citlivosti detekce. Na rozdíl od uspořádání sheath-flow není pomocná kapalina přiváděna kovovou sprejovací kapilárou, ale samostatnou kapilárou, která ústí do rezervoáru, kde zároveň ústí i konce separační a sprejovací kapiláry, které jsou namířeny proti sobě. Pomocná kapalina je do systému přiváděna pomocí externího tlaku a kromě stabilizace elektrospreje slouží i k uzavření elektrického obvodu mezi oběma konci separační kapiláry.

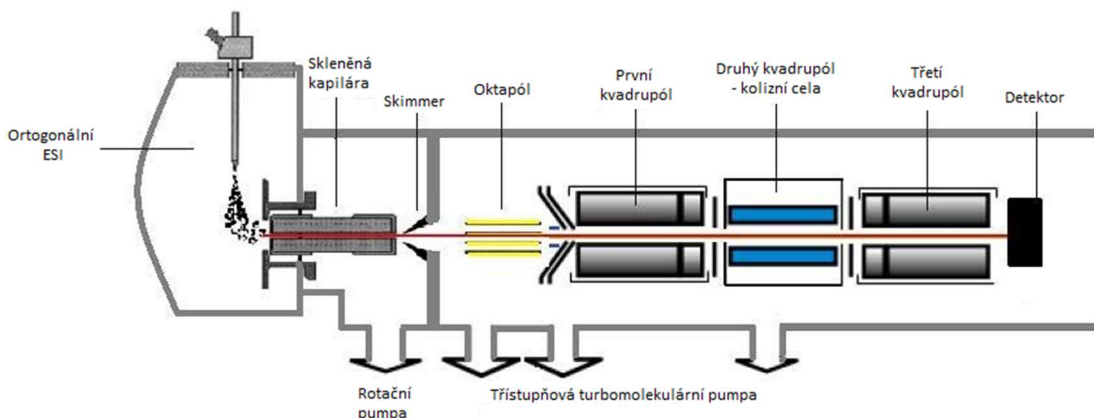
Další důležitou součástí MS je hmotnostní analyzátor, na který však již nejsou při spojení CE-MS kladeny speciální nároky jako tomu bylo u iontového zdroje. Hmotnostní analyzátor je v MS systému umístěn za iontovým zdrojem, kde dochází k převedení molekul analytu na ionty v plynném stavu, a před detektorem. Hmotnostní analyzátor slouží k rozdělení vzniklých iontů na základě jejich poměru m/z , přičemž tento děj vždy probíhá za vakua. Dále bude popsán pouze princip kvadrupólu (Q) a trojitého kvadrupólu (QqQ), který byl součástí CE-MS systému použitého při separaci 1,3-DMAA stereoisomerů.

Kvadrupólový analyzátor je tvořen čtyřmi stejnými kovovými tyčemi kruhového průřezu o délce 20 až 30 cm. Na dvě protilehlé tyče je vkládáno kladné stejnosměrné napětí, na zbylé dvě protilehlé tyče je vloženo záporné stejnosměrné napětí a zároveň na všechny čtyři tyče je kladeno střídavé vysokofrekvenční napětí (Obr. 5). Ion přivedený do středu osy kvadrupólu začne vlivem vytvořeného pole oscilovat. Volbou hodnot vkládaného stejnosměrného napětí U a amplitudy vysokofrekvenčního střídavého napětí V (jejich poměr zůstává konstantní) lze docílit stabilní oscilace pro ion s určitou hodnotou poměru m/z , který jako jediný dorazí až na detektor, zatímco se ostatní ionty s odlišným poměrem m/z vlivem nestabilní oscilace zachytí na jedné z tyčí. Plynulou změnou hodnot napětí U nebo amplitudy V lze postupně proměřit celé spektrum iontů, popřípadě pouze určitý rozsah hodnot m/z , takže kvadrupól může sloužit jako hmotnostní filtr [71].



Obrázek 5 Schéma (vlevo) a fotografie (vpravo) kvadrupólového hmotnostního analyzátoru [72,73].

Pro svou cenovou dostupnost, která pramení z instrumentální nenáročnosti, je kvadrupól velmi oblíbeným hmotnostním analyzátozem. Nevýhodou je nízký hmotnostní rozsah a pouhé jednotkové rozlišení, které se dá ovšem zvýšit hyperbolickým zakřivením tyčí. Kvadrupól se často používá v hybridních MS systémech jako hmotnostní filtr, popřípadě jako kolizní cela. Speciálním případem je uspořádání několika kvadrupólů za sebou. Teoreticky by bylo možné zapojit do série téměř neomezený počet kvadrupólů, prakticky se však používá systém tří kvadrupólů, tzv. trojitý kvadrupól označovaný QqQ (Obr. 6).

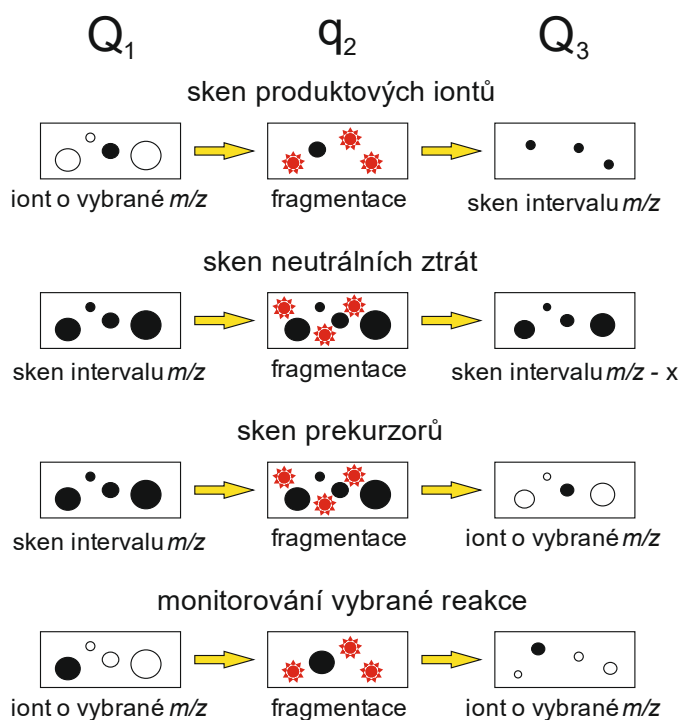


Obrázek 6 Schéma MS/MS systému s hmotnostním analyzátozem QqQ a ionizací ortogonálním ESI [74].

Prostřední kvadrupól je označován malým písmenem q, neboť na rozdíl od ostatních neslouží jako hmotnostní filtr, ale jako kolizní cela, ve které ionty vybrané prvním kvadrupólem interagují s kolizním plynem za vzniku fragmentů (tento proces se označuje jako kolizí indukovaná disociace), které jsou dále zavedeny do posledního kvadrupólového analyzátoru. Na prostřední kvadrupól q_2 je vloženo pouze vysokofrekvenční střídavé napětí, což umožňuje průchod všem iontům vybraným prvním

kvadrupólem Q_1 . Tímto systémem lze docílit tandemové MS analýzy, konkrétně MS^2 . K získání MS^3 by bylo nutné zapojit do série 5 kvadrupólů $Q_1Q_2Q_3Q_4Q_5$, což se v praxi nepoužívá.

Trojité kvadrupól je oblíbeným hmotnostním analyzátozem nejen díky relativně nízké pořizovací ceně a vysoké rozlišovací účinnosti, ale i pro možnost volby mezi několika skenovacími módy (Obr. 7). Kromě běžně používaného skenu celkového iontového proudu (TIC), kdy na detektor postupně dorazí všechny ionty v požadovaném rozsahu m/z , lze použít i další skenovací módy jako jsou sken produktových iontů, sken neutrálních ztrát, sken prekurzorů, monitorování vybraného iontu (SIM) a monitorování vybrané reakce (SRM).



Obrázek 7 Grafické znázornění principu a funkcí jednotlivých kvadrupólů ve vybraných skenovacích módech.

Při skenu produktových iontů slouží první kvadrupól Q_1 jako hmotnostní filtr k výběru iontu (prekurzoru) o konkrétní hodnotě m/z , který v druhém kvadrupólu Q_2 , sloužícím jako kolizní cela, fragmentuje a vzniklé produktové ionty jsou postupně skenovány v zadaném rozsahu m/z posledním kvadrupólem Q_3 . Na základě informací získaných z hodnot m/z fragmentačních iontů lze usuzovat o struktuře původního iontu prekurzoru. Rovněž je možné díky vzniku specifických fragmentů kvantifikovat

zastoupení jednotlivých isomerů, které jinak pomocí MS není možné rozlišit, neboť mají identický poměr m/z .

Při skenu neutrálních ztrát slouží oba kvadrupóly Q_1 a Q_3 ke skenování vybraného rozsahu m/z , avšak interval hodnot m/z skenovaných na kvadrupólu Q_3 je o určitou hodnotu menší. Tato hodnota je konstantní a je dána poměrem m/z sledované neutrální molekuly, kterou ionty vstupující z kvadrupólu Q_1 do kvadrupólu q_2 , který slouží opět jako kolizní cela, ztrácejí. Běžným využitím tohoto skenovacího módu je například sledování ztráty molekuly vody, kdy je skenovací interval nastavený na kvadrupólu Q_3 nižší o hodnotu $m/z = 18$.

Sken prekurzorů, dříve nazývaný jako sken rodičovských iontů, slouží k identifikaci iontu prekurzoru od vybraného produktového iontu. Aby toho mohlo být docíleno, musí kvadrupól Q_3 sloužit jako hmotnostní filtr a propustit na detektor pouze fragmentační ion o konkrétním nastaveném poměru m/z , První kvadrupól Q_1 slouží ke skenování iontů v daném intervalu hodnot m/z a druhý kvadrupól q_2 opět plní funkci kolizní cely.

SIM mód se od výše zmíněných módů poněkud liší, neboť ani jeden z kvadrupólů neslouží ke skenování vybraného rozsahu poměrů m/z , ale celý systém je nastaven, aby propustil na detektor pouze jeden (popřípadě i více) iontů o konkrétní hodnotě m/z . Po celou dobu se tedy monitoruje intenzita signálu vybraného iontu (iontů) na čase. SIM slouží především ke kvantitativním analýzám vybraných iontů ve směsi, neboť oproti ostatním skenovacím módům dosahuje řádově lepších limitů detekce a kvantifikace, a zároveň i vyšší citlivosti detekce.

SRM mód se od SIM módu liší v tom, že prvním kvadrupólem Q_1 je vybrán konkrétní ion prekurzoru, který je podroben v druhém kvadrupólu q_2 kolizi indukované disociaci, a ve třetím kvadrupólu Q_3 je monitorován pouze vzniklý charakteristický produktový ion. Kvadrupóly Q_1 a Q_3 tedy slouží jako hmotnostní filtry pro vybrané ionty, jejichž hodnota m/z se v obou kvadrupólech liší. Pomocí SRM lze zároveň monitorovat i více iontových reakcí, poté se označuje jako MRM. SRM, potažmo MRM, se hojně prakticky využívá například ve kvantitativní proteomice [75].

4.4 Separace stereoisomerů 1,3- a 1,4-dimethylamylaminu metodou CE s nepřímou UV detekcí

4.4.1 Instrumentální vybavení

Všechny experimenty byly provedeny na kapilární elektroforéze HP 3D (Agilent Technologies, Waldbronn, Německo) vybavené DAD. Použita byla nepokrytá křemenná kapilára (MicroSolv, Eatontown, NJ, USA) o vnitřním průměru 50 μm , vnějším průměru 365 μm , celkové délce 48,5 cm a efektivní délce 40 cm (vzdálenost od dávkovacího konce kapiláry po detekční okénko). Všechna měření byla provedena při teplotě 25 °C. Na začátku každého pracovního dne byla kapilára promyta po dobu 15 minut 1 M hydroxidem sodným, 15 minut deionizovanou vodou a nakonec 15 minut pracovním elektrolytem. Mezi jednotlivými analýzami byla kapilára promyta 2 minuty hydroxidem sodným, 2 minuty deionizovanou vodou a 2 minuty pracovním elektrolytem. Detekční vlnová délka byla nastavena na 214 nm. Vzorky byly dávkovány hydrodynamicky tlakem 50 mbar po dobu 5 sekund. Pro stanovení efektivních mobilit benzyl(triethyl)amonného kationtu bylo použito dávkování vzorku z kratšího konce kapiláry (efektivní délka byla 8,5 cm). Dimethylsulfoxid byl použit jako marker EOF. Hodnota vkládaného napětí byla 15 kV v módu normální polarity. Identifikace 1,3- a 1,4-DMAA ve vzorcích byla provedena přidáním 25 $\mu\text{g/ml}$ příslušného standardního roztoku. Všechny experimenty byly opakovány 3krát, pokud není v textu uvedeno jinak.

4.4.2 Použité chemikálie

Kyselina fosforečná (85%), kyselina octová, hydroxid sodný, hydroxid draselný, imidazol, dimethylsulfoxid, tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris), triethylamin (TEA), chlorid benzyl(triethyl)amonný (BTEAC), methylhexanamin hydrochlorid (1,3-DMAA), 2-amino-5-methylhexan (1,4-DMAA), dimethylaminoethanol, β -alanin, L-citrulin, kreatin hydrochlorid, kofein a L-karnosin byly zakoupeny u firmy Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Všechny použité chemikálie byly p. a. čistoty. Nativní CD (α -, β - a γ -), HP- β -CD s průměrným stupněm substituce (DS)~0,5-1,3; 2-hydroxypropyl- γ -CD (HP- γ -CD) - DS~0,6; 2-hydroxyethyl- β -CD (HE- β -CD) - DS~3; DM- β -CD - DS~14; TM- β -CD; karboxymethyl- β -CD (CM- β -CD) - DS~3; SBE- β -CD -

DS~4; sukcinyl- β -CD (Suk- β -CD) - DS~3,5; S- α -CD - DS~8,7; S- β -CD - DS~11; sulfatovaný γ -CD (S- γ -CD) - DS~11,5 a (-)-(18-crown-6)-tetrakarboxylová kyselina byly rovněž zakoupeny u Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Nativní CF6 a IP-CF6 (DS~5) byly pořízeny u firmy AZYP (Arlington, TX, USA). Pracovní elektrolyty byly připraveny rozpuštěním odpovídajícího množství kyseliny fosforečné nebo imidazolu v deionizované vodě ($18 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$, Millipore, Molsheim, Francie) a požadovaného pH bylo docíleno titrací Tris bází, respektive kyselinou octovou. BTEAC byl přidán jako vizualizující ion pouze do fosfátového pufru až po úpravě pH. CS o požadované koncentraci byly do pracovních elektrolytů přidány až nakonec. Zásobní roztoky standardů 1,3- a 1,4-DMAA o koncentraci 10,0 mg/ml byly připraveny rozpuštěním methylhexanamin hydrochloridu, popřípadě 2-amino-5-methylhexanu v deionizované vodě a následně byly skladovány při teplotě 4 °C. Nižší koncentrace vzorků byly připraveny postupným ředěním zásobních roztoků deionizovanou vodou.

4.4.3 Příprava vzorků doplňků stravy

Doplňěk stravy HydroxyStim[®] byl prodáván ve formě želatinových kapslí plněných béžovým práškem o následujícím složení (hmotnosti jsou uvedeny na obsah jedné kapsle): geraniový extrakt (177 mg), bezvodý kofein (100 mg), dimethylaminoethanol bitartrát (17 mg), huperzinový extrakt (13 μg) a další minoritní složky. Informace o koncentraci 1,3-DMAA nebyly z příbalového letáku dostupné. Obsah z deseti kapslí byl smíchán dohromady (průměrná hmotnost prášku z jedné kapsle byla 510 mg), homogenizován a z něj bylo odebráno a přesně naváženo 50 mg prášku, který byl následně rozpuštěn v odměrné baňce v 10 ml deionizované vody.

Složení doplňku stravy prodáváného pod jménem Neurocore[®] ve formě smaragdově zeleného prášku bylo následující (hmotnosti jsou uvedené na obsah jedné dávky = 4 g): geraniový extrakt (177 mg), bezvodý kofein (110 mg), extrakt z rozchodnice (33 mg), CarnoSyn[®] β -alanin (1067 mg), L-citrulin (1000 mg) a další minoritní přísady. 400 mg tohoto prášku bylo odebráno a rovněž rozpuštěno v 10 ml deionizované vody. Takto připravené roztoky obou vzorků byly při laboratorní teplotě sonifikovány v ultrazvukové lázni po dobu 15 minut, a následně přefiltrovány přes mikrofiltry o velikosti pórů 0,22 μm . Před nadávkováním byly oba roztoky vzorků

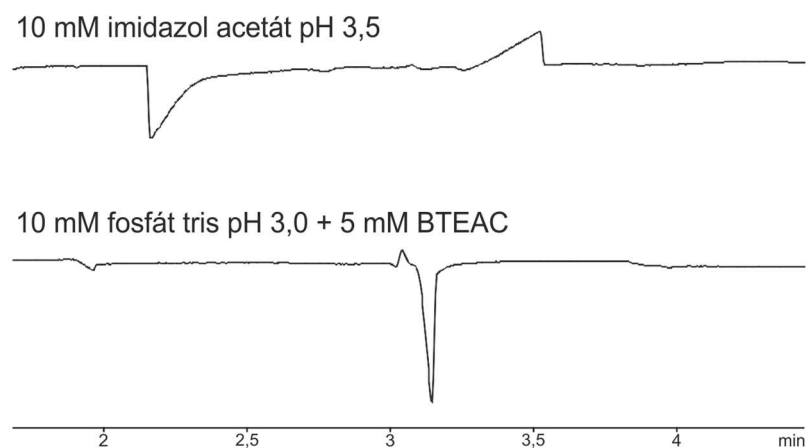
naředěny deionizovanou vodou na dále uvedenou koncentraci. Žádná další předúprava vzorků před samotnou analýzou nebyla nutná.

4.4.4 Výsledky a diskuze

4.4.4.1 Volba vhodného pracovního elektrolytu

1,3-DMAA i 1,4-DMAA jsou slabé báze, které v kyselém elektrolytu budou vlivem protonizace aminoskupiny migrovat jako kationty od anody ke katodě. Z tohoto důvodu byly jako pracovní elektrolyty dále studovány dva elektrolyty s hodnotou pufrací kapacity v kyselé oblasti (přesná hodnota pH elektrolytu byla nastavena podle hodnoty disociační konstanty pK_a použité kyseliny) obsahující rozdílné vizualizující kationty: (i) sekundární amin imidazol jako součást 10 mM imidazol acetátu o pH 3,5 a (ii) kvartérní amoniovou sůl BTEAC o koncentraci 5 mM jako absorbující aditivum v 10 mM fosfátu Tris o pH 3,0. Imidazol patří k často používaným vizualizujícím kationtům zejména pro analýzu alkalických kovů a kovů alkalických zemin metodou CE s nepřímou UV-VIS detekcí [58,76]. Naproti tomu nebyla pro nepřímou UV-VIS detekci doposud publikována žádná studie využívající BTEAC jako vizualizujícího iontu. Molekula obou vizualizujících kationtů obsahuje ve své struktuře aromatické jádro absorbující záření v blízké UV oblasti, proto byly pracovní detekční vlnové délky nastaveny na 200, 210 a 214 nm. Při volbě vhodného absorbujícího iontu byly vyhodnocovány následující parametry: (i) symetrie píku, (ii) účinnost a (iii) poměr signálu k šumu (S/N). Studováno bylo pět standardních roztoků 1,3- a 1,4-DMAA v koncentračním rozmezí 0,01 až 1,0 mg/ml v obou pracovních elektrolytech. Významný rozdíl mezi oběma puframi byl pozorován pro hodnoty symetrie píku, která byla počítána jako poměr b/a v 10 % výšky píku, přičemž a je vzdálenost mezi kolmicí na základní linii, která je vedena v maximu píku a přední (frontující) hranou píku v jeho 10% výšce a b je vzdálenost mezi zmíněnou kolmicí v maximu píku a zadní (chvostující) hranou píku, opět v jeho 10% výšce. V případě analýzy 1,3-DMAA v imidazolovém pufru byla průměrná hodnota symetrie 3,7 (počítáno pro pět různých koncentrací analytu), zatímco ve fosfátovém pufru s přidavkem BTEAC měla symetrie píku průměrnou hodnotu 0,4 (Obr. 8). Pro separace enantiomerů je klíčové dosáhnout dostatečného rozlišení ($R_s \geq 1,50$), které umožní správnou kvantifikaci jednotlivých

stereoisomerů. Asymetrický tvar píků separaci isomerů značně komplikuje, neboť vlivem frontování nebo chvostování může docházet k jejich částečnému vzájemnému překryvu. Průměrné hodnoty symetrie píků pro analýzy 1,3- i 1,4-DMAA ve fosfátovém pufru s BTEAC se více blížily ideální symetrii 1,0. Proto byl pufr o tomto složení vybrán jako pracovní elektrolyt pro další studii vhodných separačních podmínek. Z důvodu vyšších hodnot poměru S/N byla detekční vlnová délka nastavena na 214 nm.



Obrázek 8 Porovnání analýzy standardu 1,3-DMAA o koncentraci 0,5 mg/ml v 10 mM imidazol acetátu o pH 3,5 (horní záznam, migrační čas 2,1 min) a 10 mM fosfátu Tris o pH 3,0 s přidavkem 5 mM BTEAC (dolní záznam, migrační čas 3,1 min). Detekční vlnová délka byla 214 nm.

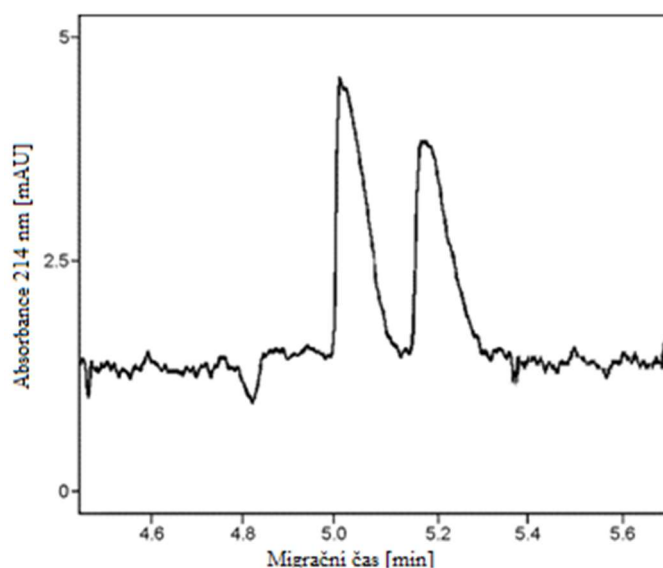
Následně bylo studováno vhodné složení pracovního elektrolytu, konkrétně koncentrace kyseliny fosforečné, pH pufru a koncentrace BTEAC. Kromě již výše zmíněných parametrů (symetrie píku, účinnosti a poměru S/N) byly sledovány i změny směrnice kalibrační přímky (citlivosti detekce). Optimalizace koncentrace kyseliny fosforečné byla provedena v rozsahu 5 až 20 mM ve fosfátu Tris s přidavkem 5 mM BTEAC při konstantním pH rovné 3,0. S klesající koncentrací kyseliny fosforečné byl pozorován při analýze standardů 1,3-DMAA a 1,4-DMAA (opět měřeno pro 5 různých koncentrací v rozsahu 0,01 až 1,0 mg/ml) mírný nárůst hodnot poměru S/N. Zatímco byl vliv pH pufru v rozmezí 2,5 - 3,5 na analýzu prakticky zanedbatelný, koncentrace BTEAC se podle očekávání ukázala být klíčová pro optimalizaci pracovního elektrolytu. Studované koncentrační rozpětí BTEAC bylo 5 až 20 mM v pufru upraveném na základě předchozích výsledků – 5 mM fosfát Tris o pH 3,0. Všechny důležité parametry jako jsou poměr S/N, symetrie píku a účinnost nejdříve s rostoucí koncentrací BTEAC výrazně rostly. Při koncentracích BTEAC převyšujících hodnotu 10 mM však docházelo k významnému poklesu hodnot poměru S/N a rovněž mírně klesala i účinnost. Experimentálně získané vhodné složení pracovního elektrolytu,

5 mM fosfát Tris o pH 3,0 s přidavkem 10 mM BTEAC jako vizualizujícího iontu, je v souladu s publikovanou literaturou, podle které se jako nejvhodnější elektrolyty pro nepřímou UV-VIS detekci v CE považují málo koncentrované pracovní elektrolyty obsahující, při dané detekční vlnové délce, silně absorbující ionty nesoucí stejný náboj jako analyt [77].

4.4.4.2 Enantioseparace 1,3-dimethylamylaminu

Aminoskupina přítomna ve struktuře 1,3-DMAA může interagovat s CS zejména pomocí vodíkových můstků, ale také, v případě, že aminoskupina nese kladný náboj a CS je za daných podmínek záporně nabitý, i pomocí coulombických interakcí. Současně však uhlovodíkový řetězec 1,3-DMAA umožňuje s CS hydrofobní interakce. Z tohoto důvodu byla pro enantioseparaci 1,3-DMAA studována řada neutrálních a záporně nabitých CS, konkrétně nativní, neutrální a nabité deriváty CD, nativní CF6, IP-CF6 a (-)-(18-crown-6)-tetrakarboxylová kyselina.

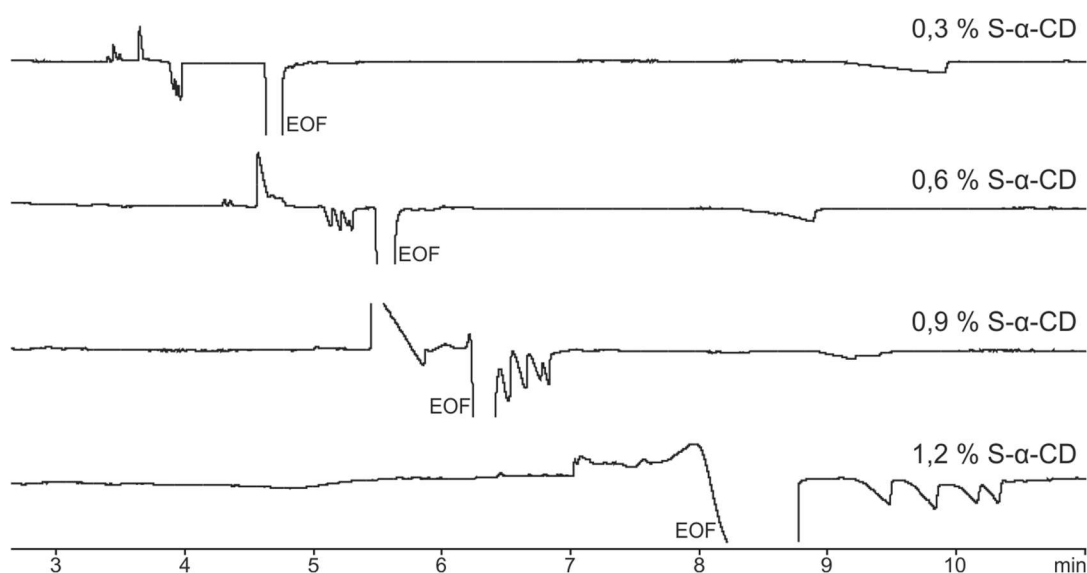
Pro prvotní experimenty byly vybrány neutrální CS. Částečná separace ($R_s = 0,4$) a separace na základní linii ($R_s = 1,6$) dvojice diastereomerů 1,3-DMAA byla pozorována při použití 3,0 % (w/v) DM- β -CD, případně 5,0 % (w/v) HE- β -CD (Obr. 9).



Obrázek 9 Separace dvojice diastereomerů 1,3-DMAA s použitím 5,0 % (w/v) HE- β -CD jako CS v 5 mM fosfátu Tris o pH 3,0 a s přidavkem 10 mM BTEAC. Koncentrace vzorku byla 50 μ g/ml. Záznam analýzy byl pomocí softwaru vertikálně otočen.

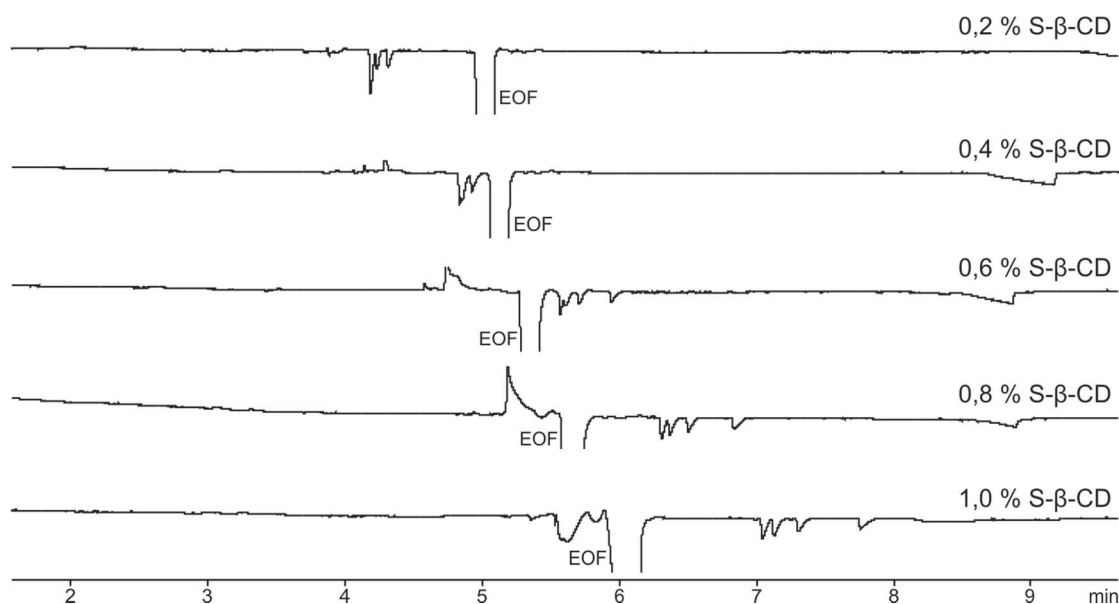
Další zvyšování koncentrace obou selektorů (v případě DM- β -CD až do 5,0 % (w/v) a u HE- β -CD do 8,0 % (w/v)) nevedlo k získání separace s vyšším rozlišením ani k separaci jednoho z dvojice párů enantiomerů. Pouze se výrazně prodlužovala doba analýzy a zhoršovala symetrie a účinnost píků. Pro další studované neutrální CS, nativní CD (α -, β - a γ -), HP- β -CD, TM- β -CD, nativní CF6 a IP-CF6 v rozsahu koncentrací 0,1 až 8,0 % (w/v), nebyla separace vůbec pozorována. Proto se v dalším kroku přistoupilo k testování aniontových CS, konkrétně (-)-(18-crown-6)-tetrakarboxylové kyseliny a negativně nabitých derivátů CD, které migrují v opačném směru oproti pozitivně nabitému 1,3-DMAA a katodickém EOF.

Přídavek S- α -CD o koncentraci 0,3 % (w/v) do pracovního elektrolytu vedl k separaci všech čtyř stereoisomerů, avšak s maximálním získaným rozlišením menším než 0,5 pro dvojici sousedních isomerů. Postupné zvyšování koncentrace S- α -CD v rozmezí 0,35 až 0,9 % (w/v) vedlo k nárůstu hodnot separačního rozlišení mezi všemi čtyřmi stereoisomery. Při koncentraci S- α -CD vyšší než 0,9 % (w/v) migrovaly všechny stereoisomery za EOF (pozitivní polarita napětí při analýze), což nasvědčuje tomu, že vzniklé diastereomerní komplexy S- α -CD a stereoisomerů 1,3-DMAA byly záporně nabitě. Nejlepších hodnot rozlišení, konkrétně 2,0 pro první pár stereoisomerů a 1,4 pro druhý pár stereoisomerů (podle migračního pořadí) bylo dosaženo přidáním S- α -CD o koncentraci 1,2 % (w/v) do pracovního elektrolytu (Obr. 10).



Obrázek 10 Elektroferogramy enantioseparace standardu 1,3-DMAA o koncentraci 50 $\mu\text{g/ml}$ v 5 mM fosfátu Tris o pH 3,0 s přídavkem 10 mM BTEAC a různých koncentrací S- α -CD.

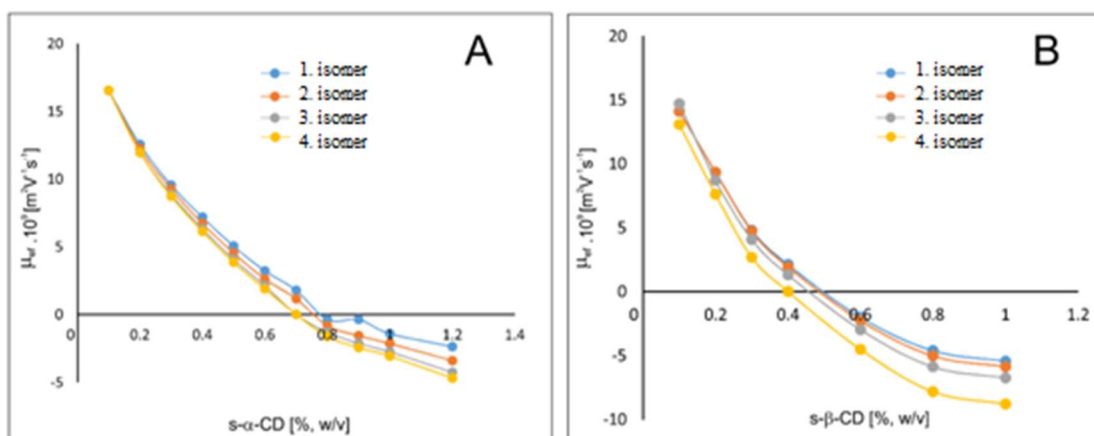
Kromě S- α -CD byly pro enantioseparaci 1,3-DMAA v 5 mM fosfátu Tris pH 3,0 s 10 mM BTEAC studovány i další sulfatované deriváty CD (S- β -CD a S- γ -CD). Po přidavku 0,2 % (w/v) S- β -CD do pracovního elektrolytu došlo k částečné separaci jednoho páru enantiomerů, druhý pár enantiomerů zůstal prozatím neseparovaný. Stejně jako v případě separace s použitím S- α -CD, tak i u S- β -CD rostlo se zvyšující se koncentrací selektoru i rozlišení mezi všemi stereoisomery (Obr. 11).



Obrázek 11 Elektroferogramy enantioseparace standardu 1,3-DMAA o koncentraci 50 µg/ml v 5 mM fosfátu Tris pH 3,0 s přidavkem 10 mM BTEAC a různých koncentrací S- β -CD.

K získání separace s $R_s \geq 1,5$ mezi jednotlivými stereoisomery bylo potřeba použít S- β -CD o koncentraci 1,0 % (w/v). Pro vyšší koncentrace S- β -CD byl pozorován pouze nárůst migračního času a chvostování stereoisomeru migrujícího jako poslední. Zároveň nedocházelo k dalšímu nárůstu hodnot rozlišení. Při použití S- β -CD o koncentraci 0,4 % (w/v) komigruje poslední stereoisomer s EOF, proto není na záznamu vidět. Pokud tyto výsledky porovnáme s výsledky získanými při separaci 1,3-DMAA s použitím S- α -CD, rozlišení pro jednotlivé páry enantiomerů mají přesně opačnou hodnotu. Pro první pár enantiomerů bylo rozlišení nižší ($R_s = 1,5$) a pro druhý pár enantiomerů naopak výrazně vyšší ($R_s = 4,2$).

Grafické závislosti efektivních mobilit jednotlivých stereoisomerů 1,3-DMAA na množství S- α -CD a S- β -CD v pracovním elektrolytu jsou vyneseny na obrázku 12. V obou případech je s rostoucí koncentrací CS patrný nárůst rozdílu efektivních mobilit jednotlivých stereoisomerů.



Obrázek 12 Závislosti hodnot efektivních mobilit jednotlivých stereoisomerů 1,3-DMAA na rostoucí koncentraci (A) S- α -CD a (B) S- β -CD v 5 mM fosfátu Tris pH 3,0 s přidavkem 10 mM BTEAC.

Na rozdíl od S- α -CD a S- β -CD, použití S- γ -CD v koncentračním rozmezí 0,1 až 5,0 % (w/v) neposkytovalo ani částečnou enantioseparaci 1,3-DMAA. Nedostatečnou enantioselektivitu vykazovaly i další studované aniontové CS, jmenovitě CM- β -CD, SBE- β -CD, Suk- β -CD a (-)-(18-crown-6)-tetrakarboxylová kyselina ve výše zmíněném koncentračním rozsahu.

Rozdíly mezi sulfatovanými deriváty CD ve schopnosti separovat stereoisomery 1,3-DMAA jsou patrně způsobeny různou povahou a silou stereoselektivních interakcí. Svou roli mohly sehrát i kompetitivní interakce BTEA⁺ kationtu se sulfatovanými CD. Pro porovnání těchto interakcí byly změřeny efektivní mobility BTEA⁺ v 5 mM fosfátu Tris o pH 3,0 s přidavky 0; 0,1; 0,5 a 1,0 % (w/v) každého ze sulfatovaných CD. Hodnoty efektivních mobilit BTEA⁺ klesaly v pořadí od S- α -CD k S- γ -CD, a zároveň klesaly i s rostoucí koncentrací studovaného CD (Tab. 1).

Tabulka 1 Souhrn průměrných elektroosmotických (μ_{eof}), zdánlivých (μ_{av}) a efektivních (μ_{ef}) mobilit BTEA⁺ kationtu v 5 mM fosfátu Tris o pH 3,0 s přidavky 0, 0,1, 0,5 a 1,0 % (w/v) sulfatovaného α -, β - a γ -CD. (n = 6). Hodnoty RSD [%] pro všechna měření byly $\leq 1,5$.

Koncentrace CS	μ_{eof} [$\text{cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$]	μ_{av} [$\text{cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$]	μ_{ef} [$\text{cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$]
bez CS	$38,34 \cdot 10^{-5}$	$50,63 \cdot 10^{-5}$	$12,68 \cdot 10^{-5}$
0,1 % S- α -CD	$14,49 \cdot 10^{-5}$	$24,14 \cdot 10^{-5}$	$9,65 \cdot 10^{-5}$
0,5 % S- α -CD	$12,50 \cdot 10^{-5}$	$12,77 \cdot 10^{-5}$	$0,27 \cdot 10^{-5}$
1,0 % S- α -CD	$13,46 \cdot 10^{-5}$	$11,19 \cdot 10^{-5}$	$-2,27 \cdot 10^{-5}$
0,1 % S- β -CD	$14,56 \cdot 10^{-5}$	$17,56 \cdot 10^{-5}$	$3,01 \cdot 10^{-5}$
0,5 % S- β -CD	$17,28 \cdot 10^{-5}$	$12,03 \cdot 10^{-5}$	$-5,26 \cdot 10^{-5}$
1,0 % S- β -CD	$16,48 \cdot 10^{-5}$	$9,92 \cdot 10^{-5}$	$-6,56 \cdot 10^{-5}$
0,1 % S- γ -CD	$14,04 \cdot 10^{-5}$	$16,31 \cdot 10^{-5}$	$2,27 \cdot 10^{-5}$
0,5 % S- γ -CD	$13,77 \cdot 10^{-5}$	$6,50 \cdot 10^{-5}$	$-7,26 \cdot 10^{-5}$
1,0 % S- γ -CD	$13,75 \cdot 10^{-5}$	$3,01 \cdot 10^{-5}$	$-10,74 \cdot 10^{-5}$

Lze předpokládat, že alkylový řetězec 1,3-DMAA hydrofobně interaguje s vnitřní kavitou CD, a také s aromatickým jádrem BTEA⁺ iontu. Současně jsou interakce mezi 1,3-DMAA a sulfatovaným CD podpořeny coulombickými interakcemi a vodíkovými vazbami. V případě S- α -CD a S- β -CD jsou interakce se stereoisomery 1,3-DMAA silnější než interakce s BTEA⁺, což umožňuje enantioseparaci 1,3-DMAA. Naproti tomu interakce mezi S- γ -CD a BTEA⁺ kationty jsou natolik silné, že pravděpodobně nedovolují jeho interakci se stereoisomery 1,3-DMAA, které se tím pádem neseparují.

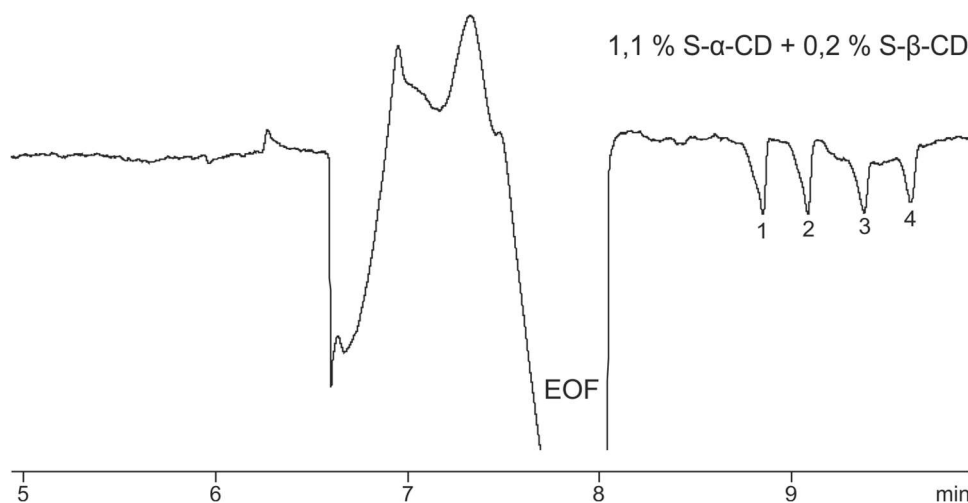
Samostatný S- α -CD i S- β -CD separuje 1,3-DMAA s rozlišením větším než 1,4 mezi jednotlivými stereoisomery, ale při použití koncentrací vyšších než 1,2 % (w/v) S- α -CD nebo 1,0 % (w/v) S- β -CD již v obou případech nedochází k většímu nárůstu hodnot rozlišení, pouze k značnému prodlužování doby analýzy, a rovněž ke ztrátě účinnosti a symetrie píků. Z tohoto důvodu byla studována možnost použití duálního systému selektorů tvořeného směsí S- α -CD a S- β -CD v různých koncentračních poměrech. Cílem bylo získat separaci všech čtyř stereoisomerů 1,3-DMAA s rozlišením větším než 1,5; aby bylo možné tuto metodu úspěšně aplikovat pro analýzu reálných vzorků, v tomto případě pro enantioseparaci 1,3-DMAA v doplňcích stravy s obsahem geraniového extraktu. Studium vhodného koncentračního poměru S- α -CD a S- β -CD bylo provedeno experimentálně (Tab. 2).

Tabulka 2 Hodnoty rozlišení mezi jednotlivými 1,3-DMAA stereoisomery při použití duálního systému CD o různém složení.

5 mM fosfát Tris o pH 3,0 s 10 mM BTEAC Koncentrace CD (w/v)	Rozlišení mezi 1,3-DMAA stereoisomery		
	1. a 2.	2. a 3.	3. a 4.
Konstantní koncentrace S-α-CD			
0,9 % S- α -CD + 0 % S- β -CD	1,4	1,3	0,9
0,9 % S- α -CD + 0,05 % S- β -CD	1,5	1,5	1,2
0,9 % S- α -CD + 0,10 % S- β -CD	1,5	1,7	1,4
0,9 % S- α -CD + 0,15 % S- β -CD	1,6	1,7	1,9
0,9 % S- α -CD + 0,20 % S- β -CD	1,7	2,1	2,1
0,9 % S- α -CD + 0,25 % S- β -CD	1,4	2,2	2,4
0,9 % S- α -CD + 0,30 % S- β -CD	1,3	2,5	2,9
Konstantní koncentrace S-β-CD			
0,8 % S- α -CD + 0,2 % S- β -CD	1,6	2,0	1,9
0,9 % S- α -CD + 0,2 % S- β -CD	1,7	2,1	2,1
1,0 % S- α -CD + 0,2 % S- β -CD	2,0	2,4	2,3
1,1 % S- α -CD + 0,2 % S- β -CD ^a	2,3	3,1	3,0
1,2 % S- α -CD + 0,2 % S- β -CD	2,4	3,1	2,8
1,3 % S- α -CD + 0,2 % S- β -CD	2,5	3,0	2,8

^a Nejvhodnější složení duálního systému aniontových CD

Vhodné koncentrační složení duálního systému sulfatovaných CD mělo následující podobu: 1,1 % (w/v) S- α -CD a 0,2 % (w/v) S- β -CD (Obr. 13).



Obrázek 13 Elektroferogram enantioseparace standardu 1,3-DMAA o koncentraci 50 $\mu\text{g/ml}$ v 5 mM fosfátu Tris o pH 3,0 s přidavkem 10 mM BTEAC a duálního systému CS o složení 1,1 % (w/v) S- α -CD a 0,2 % (w/v) S- β -CD. Stereoisomery jsou označeny čísly 1 až 4 podle svého migračního pořadí.

V porovnání s výsledky získanými při separacích samostatnými sulfatovanými CD, bylo duálním systémem dosaženo vyšších hodnot rozlišení mezi všemi čtyřmi stereoisomery ($R_s \geq 2,1$), a zároveň došlo k výraznému zlepšení symetrie píků u všech stereoisomerů.

Výslednou hodnotu rozlišení ovlivňuje kromě typu a koncentrace použitého CS i složení pracovního elektrolytu. Optimalizovány byly totožné parametry jako v případě studia vhodného složení elektrolytu pro achirální analýzu s nepřímou UV-VIS detekcí, konkrétně koncentrace kyseliny fosforečné, pH elektrolytu, koncentrace vizualizujícího iontu, a navíc byl studován i vliv protiiontu. Poměr koncentrací sulfatovaných CD zůstal při každém kroku optimalizace konstantní, tedy 1,1 % (w/v) S- α -CD a 0,2 % (w/v) S- β -CD. Kromě již použitého Tris^+ kationtu byly jako protiion studovány i K^+ , Na^+ a TEA^+ . Koncentrace kyseliny fosforečné byla 10 mM a pH elektrolytu bylo upravena na hodnotu 3,0. Druh protiiontu měl na získané rozlišení zanedbatelný vliv, proto jako druhé optimalizační kritérium byla vybrána opakovatelnost migračních časů. Nejmenší hodnotu relativní směrodatné odchylky (RSD) poskytoval Tris^+ protiion, který byl proto použit pro další kroky optimalizace. Studovaný koncentrační rozsah kyseliny fosforečné, koncentrace BTEAC a rozmezí hodnot pH fosfátového pufru byl stejný jako při předchozí volbě vhodných separačních podmínek (kap. 4.4.4.1). Nejvhodnější nalezené složení pracovního elektrolytu pro chirální separaci 1,3-DMAA stereoisomerů

mělo tedy identickou podobu jako pro achirální analýzu. Je třeba zmínit, že oba procesy optimalizace složení měly rozdílné klíčové parametry, podle kterých byly jednotlivé složky posuzovány. Při achirální analýze byl kladen největší důraz na symetrii a účinnost píku, a v případě chirální separace bylo stěžejním faktorem rozlišení, které však se symetrií a účinností píků úzce souvisí. V obou případech byl hodnocen i poměr S/N, který nabývá důležitosti zejména při analýze reálných vzorků majících složitější matici.

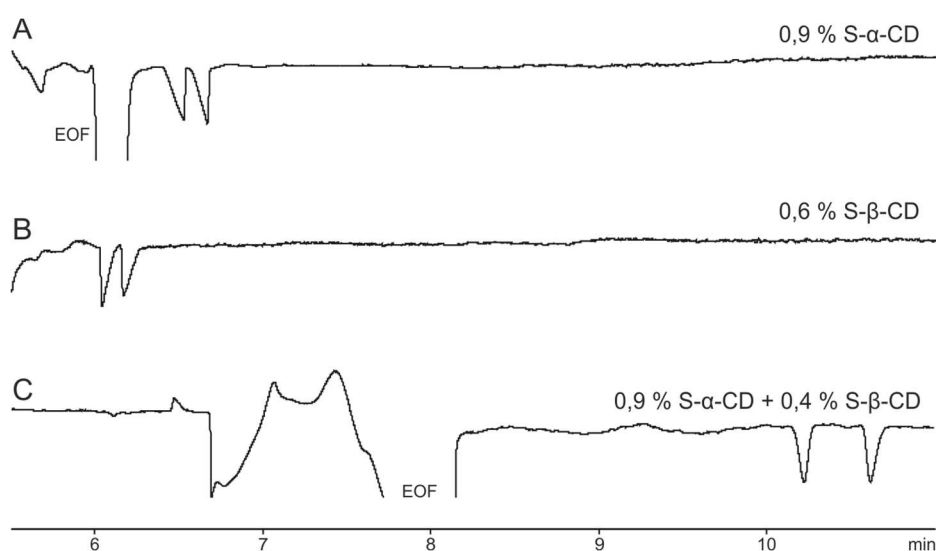
Doposud byla publikována pouze jediná práce reportující aplikaci systému dvou aniontových CS, nikoliv však dvou aniontových derivátů CD, pro separaci chirálních látek. Verleysen a kol. [78] studovali kombinace 18-crown-6-tetrakarboxylové kyseliny se S- β -CD a 18-crown-6-tetrakarboxylové kyseliny s CM- β -CD pro separaci tryptofan hydroxamátu a aspartyl dipeptidu α/β -AspPhe-OMe při různých separačních podmínkách (různé pH pracovního elektrolytu) a experimentálním uspořádání (metoda částečného plnění). Vytvořením duálního systému 18-crown-6-tetrakarboxylové kyseliny s derivátem CD došlo k dramatickému nárůstu rozlišení a zároveň zkrácení migračních časů oproti separaci s použitím samostatného aniontového CD. Podle autorů se tento jev nedá vysvětlit pouhým nárůstem celkové koncentrace CS v pracovním elektrolytu, ani distribucí analytu mezi dva selektory mající vlastní elektroforetickou mobilitu, ale naopak poukazují na přítomnost synergického efektu obou selektorů. Při enantioseparaci 1,3-DMAA nebyl pozorován žádný výrazný nárůst efektivních mobilit stereoisomerů ani nedošlo k významnému zvýšení hodnot rozlišení, proto pravděpodobně oba sulfatované CD spolu nevytvářely synergický efekt. Zlepšení separace je spíše přičítáno rozdílné afinitě jednotlivých sulfatovaných CD k jinému ze dvou párů enantiomerů, a také danému koncentračnímu poměru obou CD. V dostupných internetových databázích nebyla nalezena žádná publikace studující aplikaci duálního systému selektorů tvořeného dvojicí negativně nabitých derivátů CD.

Diastereomerní složení synteticky připraveného standardu 1,3-DMAA zakoupeného u firmy Sigma-Aldrich bylo stanoveno z hodnot ploch píků diastereomerů získaných integrací ze záznamu separace 1,3-DMAA s použitím 5,0 % (w/v) HE- β -CD jako CS (Obr. 9). Vypočtená hodnota poměru obou diastereomerů byla $1,28 \pm 0,09$; což je v souladu s výsledky publikovanými Zhangem a kol. [50] ($1,22 \pm 0,06$) nebo Flemingem a kol. [33] ($1,14 \pm 0,08$). Pro stanovení stereoisomerního zastoupení 1,3-DMAA byl použit optimalizovaný duální systém sulfatovaných CD - 1,1 % (w/v) S- α -CD a 0,2 % (w/v) S- β -CD. Na základě vypočítaných ploch píků stereoisomerů lze

vyvodit závěr, že stereoisomerní složení standardu 1,3-DMAA je tvořeno dvěma racemickými páry enantiomerů. Získané výsledky jsou shodné s doposud jedinými porovnatelnými výsledky získanými metodou GC [50]. Kromě toho je enantioseparace metodou CE časově nenáročná (oproti GC metodě trvající více než 180 minut), neboť migrační čas posledního stereoisomeru je menší než 10 minut. Z důvodu nedostupnosti standardů jednotlivých 1,3-DMAA stereoisomerů nebylo studováno migrační pořadí stereoisomerů v závislosti na změnách typu a koncentrace sulfatovaných CD.

4.4.4.3 Enantioseparace 1,4-dimethylamylaminu

Na základě strukturních podobností molekul 1,3- a 1,4-DMAA a předešlých získaných výsledků při enantioseparaci 1,3-DMAA, byly pro enantioseparaci 1,4-DMAA použity stejné separační podmínky: 5 mM fosfát Tris o pH 3,0 s přídavkem 10 mM BTEAC jakožto vizualizujícího iontu. Pro enantioseparaci 1,4-DMAA byly testovány stejné CS jako v případě chirální separace 1,3-DMAA. Enantioselektivitu k 1,4-DMAA vykazovaly oba sulfatované CD, S- α -CD i S- β -CD. K získání enantioseparace 1,4-DMAA na základní linii ($R_s = 1,5$) bylo potřeba použít 0,9 % (w/v) S- α -CD nebo 0,6 % (w/v) S- β -CD (Obr. 14).

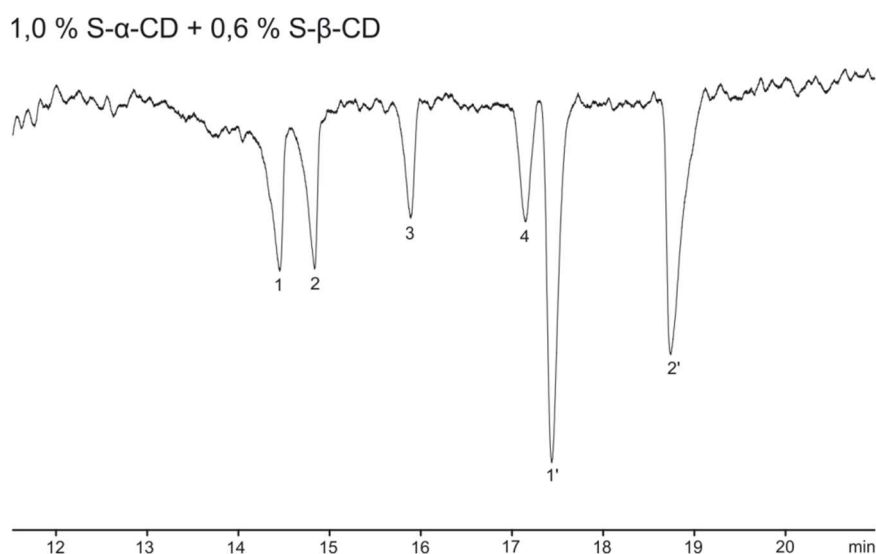


Obrázek 14 Elektroferogramy enantioseparace 1,4-DMAA v 5 mM fosfátu Tris o pH 3,0 s přídavkem 10 mM BTEAC a (A) 0,9 % (w/v) S- α -CD, (B) 0,6 % (w/v) S- β -CD nebo (C) směsí 0,9 % (w/v) S- α -CD a 0,4 % (w/v) S- β -CD.

Aplikace duálního systému selektorů byla studována i pro chirální separaci 1,4-DMAA. Vhodný koncentrační poměr byl odlišný oproti poměru použitého pro separaci 1,3-DMAA, konkrétně byl tvořen směsí 0.9 % (w/v) S- α -CD a 0.4 % (w/v) S- β -CD (Obr. 14C). Rozlišení mezi enantiomery narostlo na hodnotu 4,2 a i přes téměř dvojnásobný nárůst migračních časů došlo k značnému zlepšení symetrie obou píků.

4.4.4.4 Simultánní enantioseparace studovaných aminů

Vzhledem k tomu, že se 1,3- a 1,4-DMAA patrně vyskytují v geraniových extraktech společně [33,34], dá se předpokládat přítomnost obou látek v doplňcích stravy, které tento extrakt obsahují. Z tohoto důvodu je vhodné vyvinout metodu, která dokáže současně enantiomerně separovat 1,3- i 1,4-DMAA, neboť informace o stereoisomerním, popřípadě enantiomerním složení obou látek může významně pomoci k určení pravděpodobného původu geraniového extraktu. Experimentálně zjištěné koncentrační složení sulfatovaných CD pro enantioseparaci samostatného 1,3-DMAA, ani 1,4-DMAA nebylo vhodné pro simultánní separaci obou látek, proto bylo vyžadováno složení duálního systému selektorů experimentálně stanovit. Nalezené separační podmínky měly následující podobu: 5 mM fosfát Tris pH 3,0 s přidavkem 10 mM BTEAC a směsí 1,0 % (w/v) S- α -CD a 0,6 % (w/v) S- β -CD (Obr. 15).



Obrázek 15 Elektroferogram simultánní enantioseparace směsi 1,3- a 1,4-DMAA v 5 mM fosfátu Tris o pH 3,0 s 10 mM BTEAC a duálním systémem selektorů o složení 1,0 % (w/v) S- α -CD a 0,6 % (w/v) S- β -CD. Koncentrační poměr 1,3- a 1,4-DMAA byl 1:1 a výsledná koncentrace vzorku byla 50 μ g/ml. Stereoisomery 1,3-DMAA migrující jako první jsou označeny čísly 1-4 a píky enantiomerů 1,4-DMAA jsou označeny čísly 1' a 2'.

4.4.4.5 Částečná validace metod

Jelikož při analýze vybraných doplňků stravy obsahujících geraniový extrakt nebylo detekováno 1,4-DMAA, nebyla metoda pro simultánní separaci obou látek validována. Částečně validovány byly pouze metody pro samostatné stanovení 1,3-DMAA (metoda byla následně použita pro enantiomerní analýzu 1,3-DMAA ve zmíněných doplňcích stravy) a 1,4-DMAA (metoda může sloužit k analýzám, kde bude enantioseparace 1,4-DMAA vyžadována). Získaná data byla vyhodnocena statistickým softwarem QC Expert 2.5 (TriloByte, Pardubice, Česká Republika). Ze zásobních roztoků 1,3-DMAA a 1,4-DMAA o koncentraci 10,0 mg/ml bylo připraveno 7 kalibračních roztoků za účelem proměření kalibračních křivek s koncentračním rozsahem od 5 do 500 µg/ml. Pro měření kalibračních křivek stereoisomerů 1,3-DMAA bylo nutné koncentrační rozsah upravit, neboť roztoky 1,3-DMAA o koncentraci menší než 25 µg/ml byly pod limitem kvantifikace (LOQ) metody, a zároveň při separaci roztoků o koncentraci vyšší než 250 µg/ml docházelo k interferenci pík jednotlivých stereoisomerů, což znemožňovalo jejich správnou kvantifikaci. Výsledný koncentrační rozsah pro kalibrační křivky jednotlivých stereoisomerů 1,3-DMAA byl nastaven od 25 do 250 µg/ml (připraveno pouze 5 roztoků o různé koncentraci). Koncentrační rozsah pro kalibraci 1,4-DMAA enantiomerů byl nastaven v rozmezí 10 až 500 µg/ml (připraveno 6 roztoků o různé koncentraci). Rovnice kalibrace a korelační koeficient byly získány metodou lineární regrese. Hodnoty limitů detekce (LOD) a LOQ byly vypočítány podle doporučení ICH [79] jako poměr směrodatné odchylky posunutí a směrnice kalibrační přímky vynásobený faktorem 3,3 pro LOD nebo 10 pro LOQ.

Přesnost měření byla stanovena z kalibračních křivek v rozsahu 25 až 250 µg/ml (pět koncentračních bodů, každý měřen 10krát). Kalibrační křivky byly zhotovovány po dobu 3 dní a poté byly spočítány průměrné hodnoty relativních směrodatných odchylek. Mezidenní měření preciznosti bylo stanoveno z kalibračních křivek vyhotovených v průběhu pěti dní. Všechny získané výsledky částečné validace metod pro achirální stanovení a enantioseparaci 1,3- a 1,4-DMAA jsou shrnuty v tabulkách 3 a 4.

Tabulka 3 Výsledky částečné validace metody pro achirální stanovení a enantioseparaci 1,3-DMAA v 5 mM fosfátu Tris pH 3,0 + 10 mM BTEAC a směs 1,1 % (w/v) S- α -CD + 0,2 % (w/v) S- β -CD (směs sulfatovaných CD byla do pracovního elektrolytu přidána pouze při enantioseparaci). (n = 10)

	1,3-DMAA	1. isomer	2. isomer	3. isomer	4. isomer
Denní RSD migračních časů (%)	0,20	0,43	0,38	0,32	0,41
Mezidenní RSD migračních časů (%)	0,64	1,04	0,86	0,91	1,21
Denní RSD plochy píku (%)	1,35	1,02	2,13	1,58	1,33
Mezidenní RSD plochy píku (%)	1,65	1,42	2,85	2,11	1,79
Symetrie píku ^a	0,55	0,34	0,53	0,63	0,32
Účinnost píku	75 660	35 960	57 450	61 760	24 640
Směrnice přímky (mAU·s·ml· μ g ⁻¹)	0,9205	0,1962	0,1924	0,1931	0,1921
Posunutí přímky (mAU·s)	0,8324	1,5486	0,7512	0,5092	0,7466
Korelační koeficient	0,999	0,994	0,998	0,999	0,998
LOD ^b (μ g/ml)	0,88	6,30	6,83	7,29	7,72
LOQ ^c (μ g/ml)	2,66	19,1	20,7	22,1	23,4

Tabulka 4 Částečná validace metody pro achirální stanovení a enantioseparaci 1,4-DMAA v 5 mM fosfátu Tris pH 3,0 s 10 mM BTEAC a směsí 0,9 % (w/v) S- α -CD + 0,4 % (w/v) S- β -CD (směs sulfatovaných CD byla do pracovního elektrolytu přidána pouze při enantioseparaci). (n = 10)

	1,4-DMAA	1. enantiomer	2. enantiomer
Denní RSD migračních časů (%)	0,31	0,35	0,51
Mezidenní RSD migračních časů (%)	0,52	0,82	0,94
Denní RSD plochy píku (%)	0,66	0,91	1,12
Mezidenní RSD plochy píku (%)	1,25	1,32	1,59
Symetrie píku ^a	0,75	0,69	0,54
Účinnost píku	82 780	55 690	51 920
Směrnice přímky (mAU·s·ml· μ g ⁻¹)	0,8431	0,2709	0,3312
Posunutí přímky (mAU·s)	-0,0872	0,3011	0,4169
Korelační koeficient	0,999	0,997	0,995
LOD ^b (μ g/ml)	1,64	5,12	5,93
LOQ ^c (μ g/ml)	4,97	15,5	17,9

^a Symetrie píku byla počítána jako poměr b/a v 10% výšky píku, přičemž a je vzdálenost mezi kolmicí na základní linii, která je vedena v maximu píku a přední (frontující) hranou píku v jeho 10% výšce a b je vzdálenost mezi kolmicí vedené v maximu píku a zadní (chvostující) hranou píku v jeho 10% výšce.

^b LOD byl počítán jako poměr směrodatné odchylky posunutí a směrnice kalibrační přímky vynásobený faktorem 3,3.

^c LOQ byl počítán jako poměr směrodatné odchylky posunutí a směrnice kalibrační přímky vynásobený faktorem 10.

Součástí validace byla i studie selektivity pro achirální i chirální analýzy obou doplňků stravy. Známé majoritní komponenty vyskytující se v přípravcích HydroxyStim[®] a Neurocore[®] jsou spolu se svým koncentračním obsahem uvedeny v kapitole 4.4.3. Metoda pro stanovení 1,3-DMAA prokazovala dostatečnou selektivitu, neboť žádná z analyzovaných komponent (kofein, β -alanin, L-citrulin, dimethylaminoethanol, karnosin a kreatin) neinterferovala s 1,3-DMAA při achirální

analýze nebo s některým z jeho stereoisomerů při enantioseparaci. 1,4-DMAA nebylo v přípravcích detekováno, proto nebyla selektivita metody pro jeho stanovení studována.

4.4.4.6 Analýza 1,3-dimethylamylaminu v doplňcích stravy

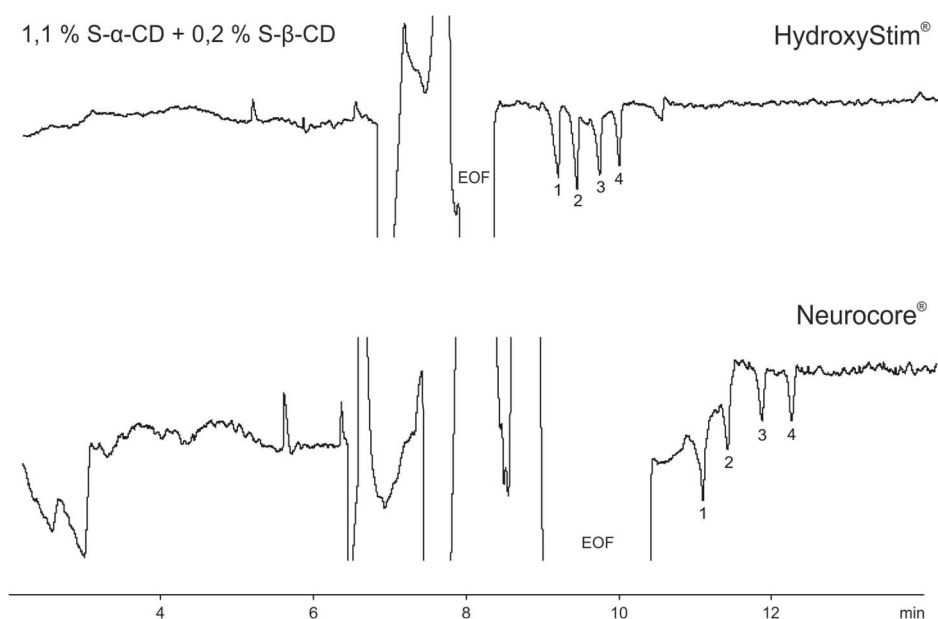
4.4.4.6.1 Stanovení koncentrace 1,3-dimethylamylaminu

Stanovení celkové koncentrace 1,3-DMAA v přípravcích HydroxyStim[®] a Neurocore[®] bylo provedeno v 5 mM fosfátu Tris o pH 3,0 s 10 mM BTEAC bez přídavku CS. Identifikace 1,3-DMAA byla provedena přidáním 25 µg/ml standardního roztoku. Stanovená koncentrace 1,3-DMAA v přípravku HydroxyStim[®] byla $8,21 \pm 1,17$ mg 1,3-DMAA v jedné kapsli (přibližně 510 mg). Získaný výsledek byl porovnán s hodnotou (10 ± 1 mg) publikovanou Zhangem a kol. [50], kteří rovněž stanovovali koncentraci 1,3-DMAA v doplňku stravy HydroxyStim[®]. Porovnáním obou hodnot lze konstatovat, že koncentrace stanovená metodou CE s nepřímou UV detekcí byla přibližně o 20 % nižší. Stanovená koncentrace 1,3-DMAA v přípravku Neurocore[®] byla $6,72 \pm 0,24$ mg v jedné dávce (4 g prášku). Analýzu tohoto doplňku stravy doposud nikdo nepublikoval a informace o množství 1,3-DMAA nebyly u přípravku uvedeny, takže není možné hodnotu porovnat s žádnými dalšími daty. Procentuální návratnost byla hodnocena ze vzorků připravených odebráním 500 mg prášku, ke kterému byl přidán standardní roztok o koncentraci 10 µg/ml. Po přípravě vzorku (postup je popsán v kapitole 4.4.3) bylo provedeno stanovení koncentrace 1,3-DMAA za výše popsaných experimentálních podmínek. Získaná hodnota návratnosti pro přípravek HydroxyStim[®] byla 110 % a pro Neurocore[®] 89 %. Přítomnost 1,4-DMAA nebyla ani v jednom z testovaných doplňků stravy touto metodou prokázána.

4.4.4.6.2 Stanovení stereoisomerního složení 1,3-dimethylamylaminu

Pro stanovení diastereomerního a stereoisomerního složení 1,3-DMAA v obou doplňcích stravy byly použity metody popsané v kapitole 4.4.4.2. U obou přípravků došlo k enantioseparaci 1,3-DMAA s hodnotou rozlišení $\geq 1,7$ mezi jednotlivými

stereoisomery (Obr. 16). Rozdíl v hodnotách migračních časů mezi stereoisomery standardu 1,3-DMAA a vzorků doplňků stravy se přisuzuje rozdílné mobilitě EOF mezi analýzami. Relativní poměrné zastoupení diastereomerů 1,3-DMAA v přípravku HydroxyStim[®] bylo $1,24 \pm 0,03$ a v přípravku Neurocore[®] $1,26 \pm 0,07$. Obě hodnoty jsou srovnatelné s hodnotou získanou při enantioseparaci syntetického standardu 1,3-DMAA (kapitola 4.4.4.2). Při porovnání zastoupení jednotlivých stereoisomerů lze konstatovat, že složení je naprosto identické jako v případě standardu, čili je rovněž tvořeno dvojicí racemických párů enantiomerů.



Obrázek 16 Elektroferogramy enantioseparace 1,3-DMAA v doplňcích stravy prodávaných pod názvem HydroxyStim[®] a Neurocore[®]. K analýze byl použit 5 mM fosfát Tris pH 3,0 s přidavkem 10 mM BTEAC a duálním systémem 1,1 % (w/v) S-α-CD a 0,2 % (w/v) S-β-CD. Koncentrace vzorků byla 5 mg/ml (HydroxyStim[®]) a 20 mg/ml (Neurocore[®]). Jednotlivé stereoisomery jsou u obou analýz označeny čísly od 1 do 4. Stereoisomerní složení 1,3-DMAA je v obou doplňcích stravy tvořeno racemickými páry enantiomerů.

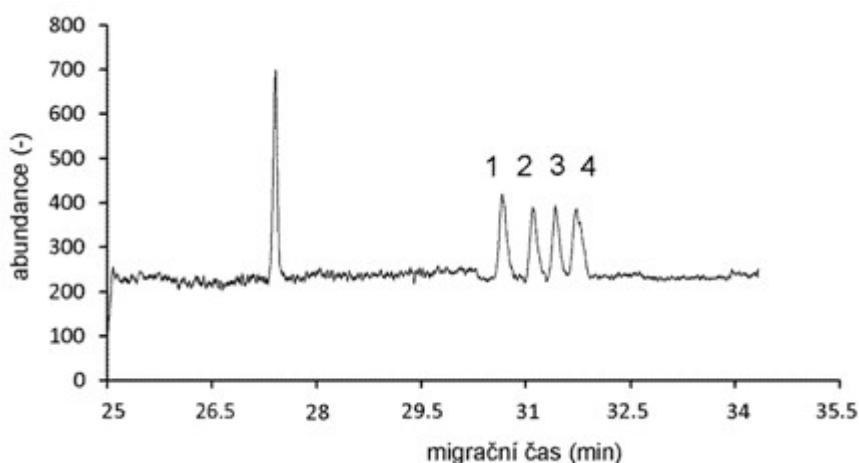
4.5 Separace stereoisomerů 1,3-dimethylamylaminu metodou CE s hmotnostní spektrometrií

CE-MS/MS je citlivější a spolehlivější metoda pro separaci a zároveň exaktní identifikaci jednotlivých separovaných analytů. Jak bylo demonstrováno v kapitole 4.4.4.6 je citlivost nově vyvinuté CE-DAD metody pro stanovení 1,3-DMAA v potravinových doplňcích dostatečná. Pro enantioseparaci a kvantifikaci stereoisomerů 1,3-DMAA v jiných vzorcích (rostlinné materiály, geraniolový olej) nemusí být

dosážená citlivost CE-DAD metody již vyhovující. Za tímto účelem byla vyvinuta CE-MS/MS metoda, jejímž cílem bylo dosáhnout lepší citlivosti detekce pro analýzu 1,3-DMAA v geraniovém oleji, eventuálně i pro analýzu rostlinných extraktů. Tandemová hmotnostní spektrometrie zároveň umožňuje, oproti výše popsané CE-DAD metodě, přesnou identifikaci jednotlivých isomerů 1,3-DMAA.

K experimentům byl použit systém kapilární elektroforézy Agilent 7100 (Agilent, Waldbronn, Německo) spojený on-line s hmotnostním detektorem Agilent 6460 s analyzátozem trojitého kvadrupólu. Pomocná kapalina byla do elektrospreje přiváděna pomocí isokratické chromatografické pumpy Agilent 1260. Všechny separace byly provedeny v polyakrylamidem pokryté [80] křemenné kapiláře o délce 70 cm, vnitřním průměru 50 μm a vnějším průměru 365 μm (MicroSolv, Eatontown, NJ, USA). Před aplikací separačního napětí byla kapilára naplněna pracovním elektrolytem obsahujícím CS o dané koncentraci metodou tzv. částečného plnění do 90 % celkové délky kapiláry.

S ohledem na nemožnost využití stejného pracovního elektrolytu jako v případě CE-DAD metody, bylo složení pracovního elektrolytu pro CE-MS/MS optimalizováno zvlášť. Nejvyšší odezvu (intenzitu signálu z MS detektoru) pro jednotlivé stereoisomery 1,3-DMAA poskytoval elektrolyt o složení 50 mM acetátu amonného o pH 3,5 s přídavkem 0,2 % (w/v) S- β -CD. Rekonstruovaný elektroferogram enantioseparace 1,3-DMAA je uveden na obrázku 17.



Obrázek 17 Rekonstruovaný elektroferogram separace stereoisomerů 1,3-DMAA. Separační podmínky: 50 mM acetát amonný pH 3,5 + 0,2 % (w/v) S- β -CD, U = +25 kV, dávkování 100 mbar/5s, koncentrace vzorku 500 $\mu\text{g/L}$ ve vodě. SIM $[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z = 116,2 \pm 0,5$; $U_{\text{ESI}} = +3,5$ kV, 10 L/min, 10 psi, T = 100 $^{\circ}\text{C}$, SL – 50:49,5:0,5 MeOH:voda:kyselina mravenčí, 4 $\mu\text{L/min}$.

Pro kvantifikaci stereoisomerů 1,3-DMAA byl využit přechod 116,2 → 98,9 a pro identifikaci byl využit přechod 116,2 → 57,1. Validační parametry pro achirální analýzu a enantioseparaci jsou uvedeny v následujících tabulkách 5 a 6.

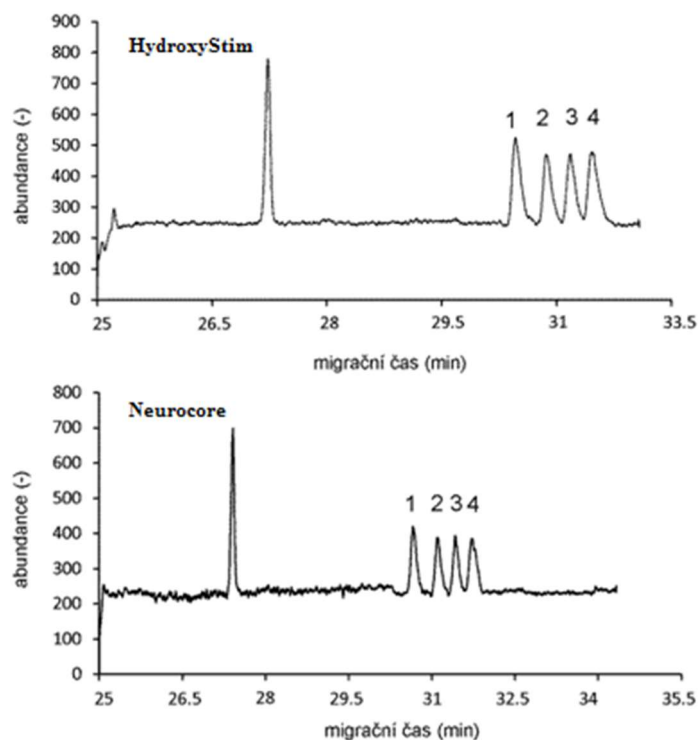
Tabulka 5 Validační parametry achirální analýzy 1,3-DMAA metodou CE-MS (n = 5)

Kalibrační křivka	$y = 4,94x + 151,34$
Linearita	3 – 2000 µg/ml
r^2	0,9999
LOD	1 µg/ml (= 8,7 nmol/l)
LOQ	3,3 µg/ml (= 29 nmol/l)
Výtěžnost	94,7 %
Opakovatelnost migračních časů (RSD)	1,56 %
Opakovatelnost plochy (RSD)	2,12 %

Tabulka 6 Validační parametry chirální separace 1,3-DMAA metodou CE-MS/MS (n = 5). Čísla v závorkách označují stereoisomery podle jejich migračního pořadí.

Kalibrační křivky	(1) $y = 260082x + 516,91$ ($r^2 = 0,9956$) (2) $y = 183583x + 440,50$ ($r^2 = 0,9956$) (3) $y = 162876x + 470,12$ ($r^2 = 0,9958$) (4) $y = 228521x + 450,68$ ($r^2 = 0,9919$)
Linearita	5 – 1000 µg/ml
LOD	(1) 4,9 µg/ml (2) 5,3 µg/ml (3) 5,4 µg/ml (4) 5,2 µg/ml
LOQ	(1) 16,3 µg/ml (2) 17,4 µg/ml (3) 18,0 µg/ml (4) 17,3 µg/ml
Výtěžnost	(1) 93,7 % (2) 92,3 % (3) 92,1 % (4) 92,9 %
Opakovatelnost migračních časů (RSD)	(1) 2,16 % (2) 2,13 % (3) 2,11 % (4) 2,00 %
Opakovatelnost plochy (RSD)	(1) 1,51 % (2) 5,24 % (3) 3,49 % (4) 1,54 %

Za stejných separačních podmínek byly analyzovány i studované vzorky potravinových doplňků HydroxyStim[®] a Neurocore[®]. Rekonstruované elektroferogramy separace stereoisomerů 1,3-DMAA v obou studovaných doplňcích stravy jsou uvedeny na obrázku 18.



Obrázek 18 Rekonstruovaný elektroferogram separace stereoisomerů 1,3-DMAA v přípravku HydroxyStim[®] (nahore) a Neurocore[®] (dole). Separací podmínky: 50 mM acetát amonný pH 3,5 + 0,2 % (w/v) S- β -CD, U = +25 kV, dávkování 100 mbar/5s; MRM 116,2 \rightarrow 57,1; U_{ESI} = +3,5 kV, 10 L/min, 10 psi, T = 100 °C, SL – 50:49,5:0,5 MeOH:voda:kyselina mravenčí, 4 μ L/min.

Z uvedených elektroferogramů (Obr. 18) je zřejmé, že poměr jednotlivých stereoisomerů je shodný jako v případě analýzy vzorku syntetického 1,3-DMAA (Obr. 17), což je ve shodě s výsledky dosaženými metodou CE-DAD.

4.6 Závěrečné shrnutí

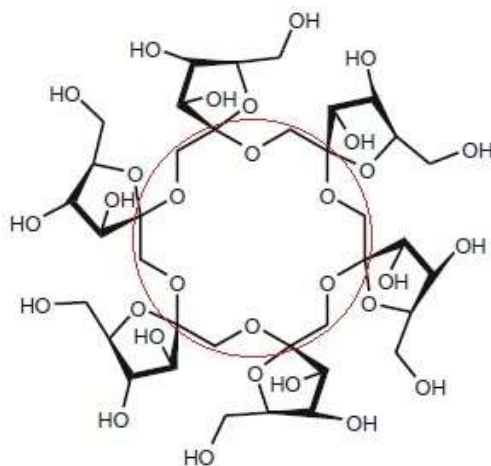
Byla vyvinuta nová, časově nenáročná metoda CE s nepřímou spektrofotometrickou detekcí vhodná k enantioseparaci 1,3-DMAA; 1,4-DMAA a jejich směsi. V této práci byl poprvé použit duální systém selektorů tvořený dvěma negativně nabitými deriváty CD. Metody pro chirální separaci 1,3- a 1,4-DMAA byly částečně validovány a metoda pro separaci 1,3-DMAA byla následně použita pro stanovení

diastereomerního a stereoisomerního složení 1,3-DMAA ve dvou vybraných doplňcích stravy. Na základě získaných výsledků lze dospět k závěru, že geraniový extrakt obsahující 1,3-DMAA pravděpodobně není přírodního původu, protože jeho diastereomerní i stereoisomerní složení je identické složení syntetického standardu. Díky své nenáročnosti na úpravu vzorku má tato metoda velký potenciál stát se rychlou a ekonomickou metodou pro stanovení a kvantifikaci stereoisomerního složení 1,3- i 1,4-DMAA nejen v doplňcích stravy, ale případně i v ostatních produktech s vyšším obsahem geraniového extraktu. Nevýhodou CE metody s nepřímou UV detekcí je oproti publikovaným chromatografickým metodám nižší citlivost a limity detekce, a mírně horší opakovatelnost migračních časů, což je však známou slabinou elektromigračních metod. Výsledky byly publikovány v zahraničním impaktovaném časopise *Electrophoresis* [81].

Kromě již zmíněné CE-DAD metody byla vyvinuta i CE-MS/MS metoda, která díky řádově větší citlivosti a nižším limitům detekce, může sloužit nejen k zjištění stereoisomerního zastoupení, ale i k přesnějšímu stanovení koncentrace 1,3-DMAA ve vzorcích s velmi nízkým obsahem geraniového extraktu.

5 Cyklofruktany a jejich deriváty

Cyklofruktany (CF) jsou cyklické oligosacharidy tvořené D-fruktofuranosovými jednotkami navzájem spojenými β -2,1 glykosidickými vazbami. Uspořádání D-fruktofuranosových jednotek do makrocyklu vytváří ve svém centru strukturu podobnou crown etherům (Obr. 19).



Obrázek 19 Struktura makrocyklu nativního CF6 tvořícího ve svém centru konfiguraci podobnou crown etherům (zvýrazněno červeně) - převzato a upraveno [82].

Podle počtu jednotek obsažených v makrocyklu se CF obvykle označují jako cyklofruktan-6 (CF6), cyklofruktan-7 (CF7) a cyklofruktan-8 (CF8), analogicky jako u CD. Vybrané fyzikálně-chemické vlastnosti přírodního (nativního) CF6 až CF8 jsou shrnuty v tabulce 7.

Tabulka 7 Vybrané fyzikální vlastnosti CF6 až CF8 - převzato a upraveno [83].

	molekulová hmotnost	bod tání (°C)	$[\alpha]_D^{20}$ (deg.) ve vodě	průměr kavity (Å) ^c	průměr cyklu (Å)	výška cyklu (Å)
CF6	972,84	210-219 ^a 231-233	-64,6 -63,5	2,3	14,6	8,7-9,4
CF7	1134,98	215-222 ^a	-59,1	4,1	15,9	8,5-8,9
CF8	1297,12	n/a	n/a	4,7	16,1	8,5-9,2

^a V tomto rozmezí teplot taje a rozkládá se.

Poprvé byly CF připraveny v roce 1989 Kawamurou a kol. [84] fermentací inulinu extracelulárním enzymem cykloinulo-oligosacharid fruktanotransferásou (CFTásou) produkovanou bakteriálním kmenem *Bacillus circulans* OKUMZ31B. Hlavním produktem fermentace byl CF tvořený šesti D-fruktofuranosovými jednotkami

(CF6), ale zároveň jako vedlejší produkty vznikaly v malém množství i CF se sedmi (CF7) a osmi (CF8) D-fruktofuranosovými jednotkami. Struktura CF6 byla potvrzena a charakterizována pomocí MS a ^{13}C NMR. Krystalografická struktura potvrzující uspořádání centrální části molekuly CF6, která je tvořena 12 atomy uhlíku a 6 atomy kyslíku, což je analogické k 18-crown-6 etheru, byla stanovena metodou enzymatické, spektroskopické a chromatografické analýzy o dva roky později [85]. Metoda přípravy CF byla v roce 1994 zdokonalena použitím bakteriálního kmene *Bacillus circulans* MCI-2554, který produkuje ve vyšší míře enzym CFTásu, který je klíčový pro přípravu CF [86]. Enzym CFTása přeměňující inulin na CF katalytickou intramolekulární transfruktosylací byl později izolován i z bakteriálního kmene *Bacillus macerans* CFC1 [87].

Ačkoliv jsou CF, stejně jako CD, tvořeny sacharidovými jednotkami spojenými glykosidickými vazbami, jejich struktury jsou značně odlišné. Fruktofuranosové jednotky v CF jsou střídavě orientované dovnitř a ven z makrocyclického centra molekuly, na rozdíl od CD, které mají glukosové jednotky nasměrovány pouze směrem do centra molekuly. Všechny hydroxylové skupiny na pozicích 3 a 4 ve struktuře fruktosových jednotek jsou orientovány na jednu stranu, čímž jí propůjčují značnou hydrofilitu. Druhá strana molekuly je vlivem přítomnosti ethylenových skupin v crown etherovém jádře hydrofobní [88]. Molekula CF sice netvoří klasickou kavitu, která je typická pro CD, přesto její struktura není planární (rovinná), ale mírně zkroucená vlivem působení vnitřních vodíkových vazeb [83].

CF lze prakticky využít v průmyslu jako aditiva do některých druhů potravin, tonerů pro inkoustové tiskárny, halogenidů stříbra sloužících pro účely vyvolávání fotografických snímků nebo farmaceutických přípravků [89]. CF jsou zde využívány jako komplexující nosiče složek výše uvedených produktů. Z chemicko-analytického hlediska jsou velmi důležité interakce CF a jejich derivátů s celou řadou molekul jako jsou kovové ionty, aminy, aminoalkoholy, nukleotidy, oligonukleotidy, peptidy, atropoisomery a v neposlední řadě také chirální molekuly.

První práci studující interakci CF s kationty alkalických kovů, kovů alkalických zemin a vybraných přechodných kovů publikovali Uchiyama a kol. [90] v roce 1993. Z komplexačních konstant změřených metodou tenkovrstevné chromatografie (TLC) vyplývá, že CF6 interaguje ve vodném prostředí s Ba^{2+} kationty řádově silněji než s ostatními kationty. Použitím 50% (v/v) vodného roztoku MeOH se interakce se všemi kationty zvýšila, nejvíce pak v případě Ba^{2+} , Pb^{2+} , Ag^+ , Rb^+ a K^+ kationtů oproti

ostatním studovaným kationtům (H^+ , Li^+ , Na^+ , Cs^+ , Cu^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Sr^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Al^{3+} , La^{3+} , Cr^{3+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Co^{2+} , Ni^{2+}). Konstanty stability K komplexů vyjmenovaných kationtů s CF6 ve vodě a 50% (v/v) vodném roztoku metanolu jsou uvedeny v tabulce 8.

Tabulka 8 Konstanty stability K komplexů vybraných kationtů s CF6 - upraveno [90].

Kation ve formě Cl soli ^a	K v H ₂ O	K v 50% (v/v) MeOH
H ⁺	0	0
Li ⁺	0,01	-
Na ⁺	-	0,11
K ⁺	0,02	1,18
Rb ⁺	0,04	1,40
Cs ⁺	0,02	0,26
Cu ²⁺	-	0,09
Ag ⁺	0,06	1,66
Mg ²⁺	-	0,02
Ca ²⁺	-	-
Sr ²⁺	0,02	0,03
Ba ²⁺	0,49	4,65
Zn ²⁺	0,02	0,01
Cd ²⁺	0,02	0,04
Al ³⁺	-	0,02
La ³⁺	0,02	0,10
Pb ²⁺	0,05	3,17
Cr ³⁺	0,03	0,12
Fe ²⁺	0,04	0,09
Fe ³⁺	0,01	0,09
Co ²⁺	-	0,10
Ni ²⁺	-	0,03

^a Ag⁺ bylo analyzováno ve formě dusičnanu stříbrného a Ba²⁺ ve formě octanu barnatého

Schopnost CF vytvářet komplexy s kovovými kationty pak klesala v pořadí od CF6 k CF8. Přímou konduktometrií byla stanovena stechiometrie 1:1 vzniklého komplexu mezi CF6 a Ba²⁺ ve formě octanu barnatého v 50% (v/v) vodném roztoku MeOH. Konstanty stability mezi CF6 a vybranými kationty (NH₄⁺, Na⁺, K⁺, Rb⁺, Cs⁺, Ag⁺, Ca²⁺, Sr²⁺, Ba²⁺, Pb²⁺) byly také studovány pomocí CE s nepřímou UV detekcí v pracovním elektrolytu o složení 10 mM 2-aminopyridinu vytitrovaném kyselinou octovou na pH 4,5 [91]. Síla interakce CF6 s kationty klesala v pořadí Ba²⁺>Ag⁺>Pb²⁺>K⁺>Rb⁺>Cs⁺>Ca²⁺>Sr²⁺>Na⁺>NH₄⁺. Výsledky jsou do značné míry shodné s dříve publikovanými výsledky [90]. Rovněž výsledná stechiometrie vznikajících komplexů mezi CF6 a studovanými kationty byla rovna 1:1.

Interakce mezi CF a jejich deriváty s kovovými kationty byly posléze studovány ještě několikrát. Metoda ESI-MS byla využita pro studium komplexů mezi CF6 a CF7 s alkalickými kovy v plynném stavu [92]. Z dosažených výsledků vyplývá, že prostorově větší CF7 je více ochoten vytvářet komplexy v poměru 1:2, než prostorově menší CF6. Selektivita obou studovaných CF v plynné fázi k alkalickým kovům klesala v pořadí $\text{Li}^+ > \text{Na}^+ > \text{K}^+ > \text{Rb}^+ > \text{Cs}^+$, které je shodné s rostoucím iontovým poloměrem. Stejná metoda byla použita pro studium komplexace mezi CF a kationty přechodných kovů (Fe^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+}) [93]. Stabilita komplexů v plynné fázi klesala v pořadí $\text{Ni}^{2+} > \text{Fe}^{2+} > \text{Co}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Cu}^{2+}$. V tomto případě ale hodnota konstanty stability přímo nesouvisí s velikostí iontového poloměru studovaných kationtů přechodných kovů. Crown ethery a CD a jejich deriváty rovněž vytváří komplexy s celou řadou kovových kationtů, přičemž jejich interakce se využívají v řadě chemických oblastí, jako jsou například vysoce selektivní separační metody, syntéza kationtových kopolymerů nebo specifická katalýza reakcí [94,95].

Vzhledem k tomu, že struktura CF je tvořena D-enantiomery sacharidů, jedná se, podobně jako u CD, o látky, které jsou intenzivně studovány jako CS, zejména v analytických separačních technikách. Nativní CF6, CF7 a CF8 jsou isomerní s nativními CD se stejným počtem sacharidových jednotek (α -CD, β -CD a γ -CD). Pro vzájemné porovnání CF a CD jsou v tabulce 9 uvedeny vybrané fyzikálně-chemické vlastnosti nativních CD.

Tabulka 9 Vybrané fyzikální vlastnosti nativního α - až γ -CD.

	molekulová hmotnost	bod tání (°C)	$[\alpha]_D^{20}$ (deg.) ve vodě ^a	průměr kavity (Å) ^b	průměr cyklu (Å) ^c	Výška cyklu (Å) ^b
α -CD	972,84	≥ 278	+150,5	4,7-5,2	13,7	6,7
β -CD	1134,98	290-300	+162,0	6,0-6,4	15,3	7,0
γ -CD	1297,12	257-265	+177,4	7,5-8,3	16,9	7,0

^a Hodnoty převzaty [96]

^b Hodnoty převzaty [97]

^c Hodnoty převzaty [98]

Pilotní práce studující stereoselektivní interakce CF s enantiomery byla publikována v roce 1998 Sawadou a kol. [99]. Stereoselektivní interakce vedoucí k diskriminaci enantiomerů vybraných esterů aminokyselin s pomocí permethylovaných derivátů CF6 a CF7 byly studovány metodou MS s ionizační technikou bombardování urychlenými atomy. Ačkoliv tato studie potvrdila enantiodiskriminační schopnosti zejména permethylovaného CF6, další výzkum v oblasti využití CF pro separace

chirálních látek započal až v roce 2009 skupinou profesora Daniela W. Armstronga. V posledních šesti letech našly CF a především jejich deriváty uplatnění jako CSP a CS pro separaci enantiomerů v CG, SFC, HPLC a CE.

5.1 Cyklofruktany a jejich deriváty v GC

Použití CF a jejich derivátů pro chirální separace v GC je pouze okrajové. Nativní CF nemohou být kvůli své vysoké teplotě tání a velmi omezené rozpustnosti v nevodných rozpouštědlech použity jako CSP v GC. Avšak derivatizací fruktofuranosových hydroxylových skupin vhodnými skupinami lze zvýšit rozpustnost CF v achirální matici, kterou lze poté použít jako CSP [100]. Doposud byly publikovány pouze dvě práce studující aplikaci derivátů CF v GC pro separaci enantiomerů. Zhang a kol. [100] studovali permethylovaný CF6, permethylovaný CF7 a 4,6-di-*O*-pentylovaný CF6 jako vhodný CS pro enantioseparaci vybraných analytů zahrnující β -laktamy, trifluoroacetyl deriváty aminokyselin, alkoholy a estery kyseliny vinné. Jako nejefektivnějším CS se ukázal být permethylovaný CF6, kterým se podařilo rozseparovat enantiomery α -(trifluoromethyl)benzyl alkoholu a řadu *N*-trifluoroacetylovaných aminokyselin. Žádná nebo jen částečná separace enantiomerů byla pozorována pro α -methylbenzyl alkohol a *N*-acetylované aminokyseliny, které jsou v porovnání s předchozími látkami slabšími donory vodíkových vazeb.

O rok později publikovali Zhang a Armstrong [101] studii nových CSP pro GC založených na 4,6-di-*O*-penty-3-*O*-trifluoroacetyl CF6 a 4,6-di-*O*-penty-3-*O*-propionyl CF6. Enantioselektivita uvedených CSP byla studována na 47 racemických látkách s různými chemickými vlastnostmi (deriváty aminokyselin, aminoalkoholy, aminy, alkoholy, vlny a laktony). Enantiomery analytů obsahující funkční skupiny podporující tvorbu vodíkových vazeb se na obou studovaných CSP separovaly výrazně lépe. Obě nově připravené CSP vykazovaly největší enantioselektivitu k aminokyselinám s alkylovým postraním řetězcem. Na základě experimentálně získaných hodnot změn enthalpie a entropie, které byly porovnány s hodnotami pro separaci identických analytů s použitím CD v již publikované literatuře, lze vyloučit interakci analytů s kavitou CF a tvorbu inkluzních komplexů.

5.2 Cyklofruktany a jejich deriváty v SFC

Kapaliny nebo plyny mohou překročením hodnot kritické teploty a tlaku dosáhnout tzv. superkritického stavu, pak o takových tekutinách hovoříme jako o superkritických fluidech, jejichž fyzikální vlastnosti se pohybují na hranici mezi kapalinami a plyny. Superkritická fluida mají nízkou viskozitu a vysoký difúzní koeficient jako plyny, ale zároveň jejich hustota a schopnost vystupovat jako rozpouštědlo je podobná kapalinám. Oboje tyto vlastnosti předurčují superkritická fluida jako vhodné součásti chromatografických mobilních fází [102]. Nejen pro snadno dosažitelné hodnoty kritického tlaku (7,39 kPa) a teploty (31 °C), ale i pro své další vlastnosti jako jsou nehořlavost, netoxičita a nízká pořizovací cena, se jako součást mobilní fáze ve SFC používá oxid uhličitý. Jelikož je samotný superkritický CO₂ nepolární, přidává se do mobilní fáze určitý podíl organického rozpouštědla, např. MeOH, ethanolu (EtOH), isopropanolu (IPA), ACN nebo chloroformu, popřípadě těkavé organické soli (acetát amonný, formiát amonný apod.) pro separace polárnějších analytů. Výhodou SFC bezesporu je, že může být použita pro separace v módu normální i reverzní fáze [103].

Stejně jako u GC, tak i u SFC je využití cyklofruktanových CSP pro chirální separace prozatím jen výjimečné. Sun a kol. [83] jako první demonstrovali použití *R*-naftylethylkarbamát CF6 (Larihc CF6-RN) navázaného na silikagelu pro separaci enantiomerů althiazidu. Složení organického podílu mobilní fáze bylo MeOH/EtOH/IPA 1:1:1 s 0,2% diethylaminem, a jeho množství se pohybovalo v rozmezí 5 až 60 % podle nastaveného průběhu gradientu. Detailní studii porovnávající vlastnosti 3,5-dimethylfenylkarbamát CF7 (Larihc CF7-DMP) stacionární fáze v HPLC a SFC publikoval Vozka a kol. [104]. K experimentům byl vybrán set látek s axiální (deriváty binaftylu) a centrální chiralitou a získané výsledky z HPLC a SFC byly porovnávány v rámci míry retence, selektivity a rozlišení. Dále byl použit model lineárního vztahu pro změnu volné energie (LFER) pro charakterizaci interakcí podílejících se na retenčním mechanismu u obou metod. Výsledky ukázaly, že nižší obsah alkoholu v mobilní fázi vedl k zvýšené adsorpci některých komponent mobilní fáze, což výrazně měnilo vlastnosti separace, především u kolony Larihc CF7-DMP. Wang a Zhang [105] studovali vliv zpětného tlaku na koloně na enantioseparaci 11 vybraných analytů metodou SFC používající 10 různých stacionárních fází, mezi nimiž byla i *R*-naftylethyl CF6 stacionární fáze. Hamman a kol. [106] evaluovali

25 CSP na reprezentativním vzorku 80 racemických látek pomocí enantioseparace metodou SFC. Mezi studovanými chirálními kolonami byly i Larihc CF6-RN a kolona s navázanou isopropylkarbamát CF6 stacionární fází (Larihc CF6-P). Jako vhodnou alternativu k chirální separaci 25 primárních aminů metodou HPLC v módu normální fáze (hexan/EtOH) a polárně organickém módu (ACN/MeOH) na koloně Larihc CF6-P, navrhli Armstrong a kol. [107] použití SFC na totožné koloně. Při optimalizaci separačních podmínek byly testovány MeOH, EtOH a IPA jako polární modifikátory mobilní fáze a kyselá a bazická aditiva, a jejich vzájemná kombinace pro upravení retence a symetrie píků. Zatímco přídavek hydroxidu amonného do mobilní fáze zcela potlačil enantioselektivitu separace, použití MeOH s přídavkem trifluoroctové kyseliny (TFA) a TEA vedlo k separaci enantiomerů na základní linii pro 18 z 25 analyzovaných látek.

5.3 Cyklofruktany a jejich deriváty v HPLC

Jednoznačně největší uplatnění našly CF a jejich deriváty jako selektory pro enantioseparace v HPLC. Poprvé byly cyklofruktanové CSP pro HPLC separace připraveny a popsány Suni a kol. [83] v roce 2009. Připraveny a charakterizovány byly stacionární fáze obsahující nativní CF6, methylkarbamátem částečně derivatizovaný CF6, *R*-naftylethylkarbamát a isopropylkarbamát CF6 navázan na silikagelu jako vhodném nosiči. Stacionární fáze byly studovány pro enantiomerní analýzu vybrané skupiny modelových látek s rozdílnými vlastnostmi v módu normální fáze (NP), reverzní fáze (RP) a polárně organickém módu (POM). Zatímco nativní CF6 CSP poskytovala značně omezenou enantioselektivitu, derivatizované CF vykazovaly unikátní enantiorozlišovací vlastnosti. Částečnou derivatizací hydroxylových skupin alifatickými skupinami totiž pravděpodobně došlo k narušení vnitřních vodíkových vazeb a zpřístupnění crown etherového jádra molekuly CF umožňujícího interagovat s primárními aminy. CF derivatizované aromatickou skupinou do vysokého stupně sice tuto vlastnost nevykazovaly, jejich použití však umožnilo enantiomerně separovat širokou škálu nejrůznějších chirálních látek, a to zejména díky sterickým a π - π interakcím. Výrazné zlepšení enantioselektivity CSP tvořené nativním CF6 pro separaci polárních analytů bylo pozorováno při použití hydrofilní interakční kapalinové chromatografie (HILIC) [108]. Další možnosti jak zvýšit enantioselektivitu nejen

nativního CF6, ale i derivatizovaných IP-CF6 a RN-CF6 CSP je přídavek málo koncentrované barnaté soli do mobilní fáze v POM [109]. Dolzan a kol. [110] studovali vliv velikosti částic, na které se navazovala nativní CF6 CSP v NP a HILIC módu. Použití povrchově porézních částic o průměru 2,7 μm vedlo k výrazně vyšší enantioseparační schopnosti v porovnání s použitím plně porézních částic o průměru 3 nebo 5 μm , přičemž rozdíly byly zřetelnější při NP módu. Přehled doposud publikovaných prací zabývajících se studiem cyklofruktanových CSP v HPLC je shrnut v tabulce 10.

Tabulka 10 Přehled publikovaných prací zaměřených na studium cyklofruktanových CSP v HPLC

Typ CSP	Analyty	Složení mobilní fáze	Poznámky	Citace
CF6 Me-CF6 RN-CF6 IP-CF6	81 primárních aminů, thalidomid, Trögrova báze, althiazid, warfarin a další	(NP) heptan/EtOH nebo IPA/TFA (POM) ACN/MeOH + malé množství AA a TEA (RP) voda/ACN nebo ACN/20 mM AA pH 4,1	První publikace studující využití cyklofruktanových CSP pro separace v HPLC.	[83]
RN-CF6 IP-CF6	119 primárních aminů	(NP) heptan/EtOH/TFA (POM) ACN/MeOH + malé množství AA a TEA	Vyšší enantioselektivita pro analyty se stereogenním centrem v pozici α nebo β k aminoskupině. IP-CF6 poskytovalo lepší separaci většiny analytů než RN-CF6.	[111]
RN-CF6 DMP-CF7	Chirální kyseliny, aminy, komplexy kovů a vybrané neutrální látky	(NP) heptan/EtOH nebo IPA/TFA (POM) ACN/MeOH + 0,2% (w/v) NH_4NO_3	Obě CSP poskytovaly rozdílnou selektivitu, kombinací obou se podařilo separovat 43 % analytů. Aminy se lépe separovaly na RN-CF6, kyselé látky naopak na DMP-CF7.	[112]
IP-CF6	Analogy 1-(α -aminoalkyl)-2-naftolu a 2-(α -aminoarylalkyl)-1-naftolu a 2-(1-amino-2-methylpropyl)-1-naftolu	(NP) heptan/EtOH nebo IPA/TFA	Analogy 1-naftolu měly na IP-CF6 CSP větší retenční faktor, separační faktor a rozlišení.	[113]
IP-CF6 RN-CF6 DMP-CF7	44 testovacích roztoků s různými vlastnostmi	(NP) hexan/IPA (80:20, v/v)/TFA	Vlastnosti jednotlivých CSP byly charakterizovány metodou LFER	[114]

Tabulka 10 Přehled publikovaných prací zaměřených na studium cyklofruktanových CSP v HPLC - pokračování

Typ CSP	Analyty	Složení mobilní fáze	Poznámky	Citace
RN-CF6	46 látek s velmi rozdílnými vlastnostmi (deriváty binaftylu, chlorované fenoly, deriváty benzenu a další)	(NP) hexan/IPA/TFA	Výsledky byly porovnány se separacemi na <i>R</i> -naftylethyl β -cyklodextrinové CSP. LFER metoda ukázala, že kyselé vodíkové vazby a polarita (polarizovatelnost) měly značný vliv na retenci a enantiozlišovací schopnosti vybraných analytů.	[115]
CF6	Polární analyty (nukleové kyseliny, β blokátory, salicylová kyselina a její deriváty, maltooligosacharidy, xantiny a další)	(HILIC) ACN (60-95%)/ 20 mM AA pH 4,1	Separace vybraných analytů v HILIC módu na koloně s nativní CF6 CSP dosahovaly lepších výsledků než separace na komerčních kolonách. Jedná se o první publikaci studující cyklofruktanovou CSP v HILIC módu.	[108]
S-CF6	Polární a hydrofilní látky (xantiny, aminokyseliny, β blokátory, nukleosidy, maltooligosacharidy a další)	(HILIC) ACN/20 mM AA pH 4,1	S-CF6 byl připraven v nízkém (1-6) i vysokém (3-11) stupni substituce. Výsledky byly srovnatelné s komerčními kolonami.	[116]
IP-CF6 RN-CF6 DMP-CF7	Aminokyseliny, aminoalkoholy, diaminy	(NP) hexan/EtOH nebo IPA/TFA	Retence a rozlišení bylo závislé na složení mobilní fáze, především na druhu alkoholu a koncentraci TFA	[117]
RN-CF6 DMP-CF7	Deriváty binaftylu, alprenolol, nitrendipin, oxprenolol, amlodipin	(NP) hexan/IPA (60:40 nebo 80:20)/TFA	Porovnání s cyklodextrinovými CSP, konkrétně DMP β -CD a RN β -CD majících stejné nasubstituované skupiny a v případě DMP β -CD i stejný počet jednotek tvořících makrocycklus.	[118]

Tabulka 10 Přehled publikovaných prací zaměřených na studium cyklofruktanových CSP v HPLC - pokračování

Typ CSP	Analyty	Složení mobilní fáze	Poznámky	Citace
CF6 IP-CF6	4 pentapeptidy a 5 monopeptidů	(HILIC) ACN/20 mM AA pH 4,0	Studie porovnávací separace vybraných analytů na třech různých kolonách (kromě zmíněných dvou byla použita i silikagelová kolona) v HILIC módu. Obě cyklofruktanové kolony poskytovaly lepší výsledky.	[119]
IP-CF6 RN-CF6 DMP-CF7	17 tetrahydrobenzimidazolů	(RP) MeOH nebo ACN/ 20 mM AA pH 4,1 (POM) ACN/MeOH + malé množství AA a TEA	Největší enantioselektivitu měla IP-CF6 CSP	[120]
RN-CF6	Analogy spiroindolovaných fytoalexinů	(NP) hexan/IPA (95:5, v/v)	Lepší enantiorozlišovací schopnost vykazovaly analyty s elektron akceptujícím substituentem na fenylové skupině fytoalexinu.	[121]
DMP-CF7	Set látek s axiální a centrální chiralitou	(NP) hexan/IPA/TFA	Výsledky byly porovnány s daty získanými metodou SFC. Model LFER potvrdil různé druhy interakcí mezi analyty a CSP.	[104]
IP-CF6 RN-CF6 DMP-CF7	8 primárních aminů, 5 sekundárních aminů a 7 terciálních aminů	(POM) ACN/MeOH	Z 20 analytů se podařilo enantiomerně separovat 7 analytů na základní linii a dalších 7 analytů pouze částečně	[122]
CF6	4 cyklické nukleotidy, 6 nukleotid monofosfátů, 4 nukleotid difosfáty a 6 nukleotid trifosfátů	(HILIC) ACN/100 mM AA pH 6,6	Za daných separačních podmínek se podařilo separovat na základní linii 16 z 19 nukleotidů.	[123]
IP-CF6 RN-CF6 DMP-CF7	Funkcionalizované můstkové Trögroy baze	(NP) heptan/IPA	Separace na základní linii ($R_S \geq 1,5$) byla získána kombinací kolon s cyklofruktanovými a cyklodextrinovými (separace na RP EtOH/20 mM AA pH 4,1) CSP pro 13 z 14 analytů.	[124]

Tabulka 10 Přehled publikovaných prací zaměřených na studium cyklofruktanových CSP v HPLC - pokračování

IP-CF6 RN-CF6 DMP-CF7	30 biaryl atropisomerů	(NP) heptan/EtOH (1-50%) (POM) ACN/MeOH (0-10%)	Separováno bylo 24 z 30 biarylů, přičemž 17 na základní linii kombinací všech tří CSP. Nejlepší výsledky poskytovala kolona s IP-CF6.	[125]
CF6 IP-CF6 RN-CF6	16 chirálních fosforečnanových a sulfonových kyselin	(POM) MeOH nebo EtOH/vodný roztok barnaté soli + malé množství AA a TEA	Přidáním barnaté soli do mobilní fáze se výrazně zlepšila selektivita, která rostla s přítomností dalších akceptorů vodíkových vazeb v pořadí acetátový < trifluoracetátový < chloristanový anion.	[109]
IP-CF6	5 derivátů binaftalenových atropisomerů	(RP) MeOH/20 mM AA pH 4,5 + 5 mM acetát barnatý	Práce studovala vliv přídavku barnatých kationtů na enantioseparaci vybraných atropisomerů metodou HPLC a výsledky byly porovnány s výsledky získanými metodou CE.	[126]
IP-CF6	Amlodipin (Aml), 1-(1-naftyl)ethylamin (NEA), fipronil (Fip) a 2-amino-2'-hydroxy-1,1'-binaftyl (NOBIN)	(POM) ACN/MeOH (80/20 pro Aml a 60/40 pro NEA, v/v) + 0,3% AA a 0,2% TEA (NP) heptan/EtOH (95/5 pro Fip a NOBIN, v/v)	Porovnání povrchově porézních (průměr 2,7 μm) a plně porézních (průměr 3 a 5 μm) částic pro navázání cyklofruktanové CSP v HPLC.	[127]
CF6	Kyselina 5-fenylvalerová, kyselina ferulová, uracil, adenosin, cytosin, kyselina L-askorbová, pyridoxin, cyklické nukleotidy	(NP) heptan/EtOH nebo IPA (HILIC) ACN/25 nebo 100 mM AA	Studie porovnání povrchově a plně porézních částic pro navázání CF6 CSP. Výhody povrchově porézních částic byly zřetelnější při použití NP než v případě HILIC módu.	[110]
RN-CF6 DMP-CF7	21 polypyridyl ruthenatých komplexů	(POM) ACN/MeOH + malé množství AA a TEA	Kombinací kolon se podařilo separovat na základní linii 20 z 21 analytů. Na separaci se podílely π-π interakce, sterické interakce a vodíkové vazby. RN-CF6 CSP vykazovala větší separační efektivitu.	[128]

5.4 Cyklofruktany a jejich deriváty v CE

Stejně jako tomu bylo v případě GC a SFC, nebylo ani v případě CE prozatím věnováno moc pozornosti studiu využití CF jako možných CS. Hlavním důvodem může být nedostatek informací o povaze interakcí mezi studovanými analyty a CF, které se podstatně liší od CD nebo chirálních crown etherů. První práci zaměřenou na použití CF jako potenciálních CS v CE publikovali Jiang a kol. [129] v roce 2009. Autoři studovali nově připravený sulfatovaný CF6 (S-CF6) a CF7 (S-CF7) pro enantioseparaci více než 200 analytů. Oba sulfatované CF vykazovaly velkou enantioselektivitu ke všem látkám obsahujícím aminoskupinu, jmenovitě k primárním, sekundárním a terciárním aminům a aminokyselinám. Důležitou roli přitom hrály elektrostatické interakce mezi sulfáto skupinou CF a aminoskupinou analyzovaných látek. Neutrální analyty se S-CF6 ani S-CF7 vůbec neinteragovaly a migrovaly při normální polaritě společně s EOF.

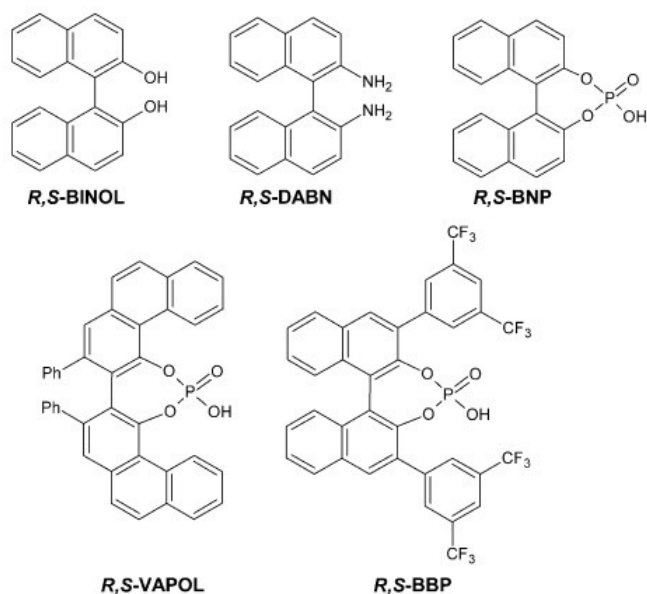
Dále byla věnována pozornost studiu enantiozlišovacích schopností S-CF6 a jeho porovnání se sulfatovanými CD (α , β i γ) pro enantioseparaci čtyř vybraných bazických látek, konkrétně tamsulosinu, tiropramidu, bupivakainu a norefedrinu metodou CE [130]. Všechny čtyři studované sulfatované CS vykazovaly dostatečnou enantioselektivitu k vybraným analyzovaným látkám, přičemž hodnoty získaných rozlišení byly závislé na druhu a koncentraci použitého sulfatovaného CS.

Perera a kol. [120] studovali enantioseparaci 17 tetrahydrobenzimidazolů na CSP s navázanými CD a CF v HPLC a s použitím nativního γ -CD, HP- β -CD, HP- γ -CD a IP-CF6 jako CS v CE. Ačkoliv HP- γ -CD vykazoval zcela nejlepší separační vlastnosti pro vybranou skupinu analytů, IP-CF6 o koncentraci 70 mM umožnil v 50 mM fosfátovém pufru o pH 2,5 částečně separovat ($R_s = 0,7$) jeden z vybraných analytů, ke kterému ostatní studované CD nevykazovaly vůbec žádnou enantioselektivitu.

5.4.1 Studium vlivu barnatých iontů na enantioselektivitu IP-CF6 v CE

Enantioselektivita IP-CF6 v CE a také v HPLC byla studována s pomocí 5 vybraných, strukturně podobných atropisomerů: 1,1'-bi-2-naftolu (*R,S*-BINOL), 1,1'-binaftyl-2,2'-diaminu (*R,S*-DABN), 1,1'-binaftalen-2,2'-diyl hydrogenfosfátu (*R,S*-BNP), 2,2'-difenyl-3,3'-bifenantryl-4,4'-diyl hydrogenfosfátu (*R,S*-VAPOL)

a 3,3'-bis[3,5-bis(trifluoromethyl)fenyl]-1,1'-binaftalen-1,1'-diyl hydrogenfosfátu (*R,S*-BBP) (Obr. 20).



Obrázek 20 Struktury pěti studovaných atropisomerů - převzato [126].

Ze studovaných pěti atropisomerů se metodou CE podařilo rozseparovat na základní linii pouze *R,S*-BNP a částečně ($R_S = 0,5$) *R,S*-VAPOL. Pravděpodobným důvodem mohlo být ukotvení IP-CF₆ na silikagelovém nosiči, čímž se IP-CF₆ stal více strukturně rigidním a zpřístupnil crown etherové centrum, které patrně hraje klíčovou roli při interakci s analytem.

5.4.1.1 Instrumentální vybavení a použité chemikálie

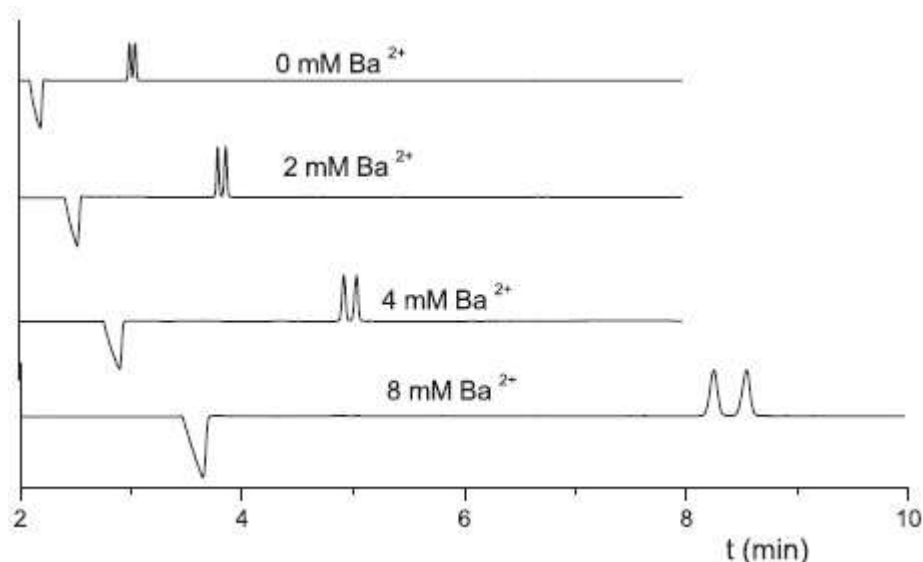
Všechny CE experimenty byly provedeny s použitím systému kapilární elektroforézy HP 3D (Agilent Technologies, Waldbronn, Německo) vybavené DAD. K analýzám byla použita nepokrytá křemenná kapilára (MicroSolv, Eatontown, NJ, USA) o vnitřním průměru 50 μm , vnějším průměru 365 μm , celkové délce 33 cm a efektivní délce 24,5 cm. Všechna měření byla provedena při teplotě 25 °C. Detekční vlnová délka byla nastavena na 214 nm. Způsob promývání kapiláry na začátku každého pracovního dne a mezi jednotlivými analýzami, a velikost vkládaného separačního napětí jsou shodné jako v kapitole 6.1. Vzorky byly dávkovány hydrodynamicky tlakem 50 mbar po dobu 5 sekund.

Kyselina boritá, kyselina fosforečná, hydroxid sodný, octan barnatý, methanol a *R*- a *S*-1,1'-binaftalen-2,2'-diyl hydrogenfosfát byly pořízeny u firmy Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Všechny zakoupené chemikálie byly p. a. čistoty. Selektor IP-CF6 byl opatřen u firmy AZYP (Arlington, TX, USA).

Fosfátový a borátový pufr byl studován v koncentračním rozmezí 10 až 100 mM. IP-CF6 o koncentracích 10 až 80 mM byl přidán do elektrolytu až po úpravě pH. Jako poslední komponent byl do pufru přidán octan barnatý o specifické koncentraci. Zásobní roztok analytu byl připraven rozpuštěním 5,0 mg standardu v 1,0 ml MeOH a postupným ředěním deionizovanou vodou byla koncentrace pracovního roztoku vzorku upravena na 1,0 mg/ml. Všechny analýzy byly opakovány 3krát.

5.4.1.2 Výsledky a diskuze

Složení pracovního elektrolytu pro separaci *R,S*-BNP atropisomerů bylo studováno pro kyselé i alkalické prostředí. Pro detailnější studium enantioselektivity IP-CF6 a vlivu barnatých kationtů na rozlišení byl vybrán alkalický pracovní elektrolyt o složení 100 mM borát sodný o pH 10,0, který poskytoval oproti kyselému 50 mM fosfátu sodnému o pH 2,5 vyšší hodnoty rozlišení, a vyšší účinnost a symetrii píků. S rostoucí koncentrací IP-CF6 v alkalickém pracovním elektrolytu rostly i hodnoty rozlišení, které bylo zároveň závislé i na koncentraci použitého borátového pufru, neboť s rostoucí koncentrací borátu a při konstantní koncentraci IP-CF6 rozlišení rovněž rostlo. Dále byl studován vliv přídavku barnatých iontů (v podobě octanu barnatého) na rozlišení enantioseparace *R,S*-BNP. Z elektroferogramů (Obr. 21) je patrné, že s rostoucí koncentrací Ba^{2+} iontů v alkalickém elektrolytu a při konstantním množství IP-CF6 (20 mM) rostly hodnoty rozlišení, zároveň byl však pozorován pokles elektroosmotické mobility způsobený interakcí kladně nabitých Ba^{2+} iontů se záporně nabitou vnitřní stěnou křemenné kapiláry. Získané výsledky lze vysvětlit částečnou inkorporací Ba^{2+} iontů do centra molekuly IP-CF6, čímž se struktura stane více rigidní a pro analyt přístupnější. Zároveň je vzniklý přechodný komplex Ba^{2+} iontů s IP-CF6 kladně nabitý, což podporuje elektrostatické interakce se záporně nabitou fosfátovou skupinou *R,S*-BNP atropisomerů.



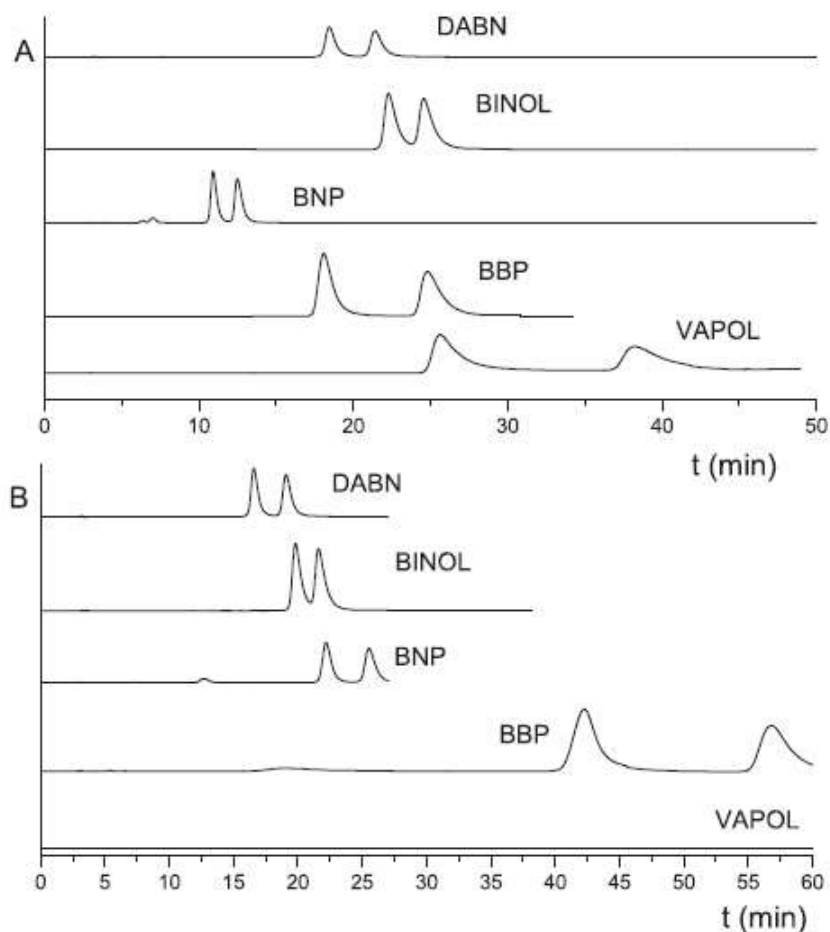
Obrázek 21 Elektroferogramy zobrazující efekt přidavku Ba^{2+} iontů ve formě octanu barnatého do pracovního elektrolytu na průběh enantioseparace *R,S*-BNP. Separací podmínky: 100 mM borát sodný o pH 10,0 s přidavkem 20 mM IP-CF6, separační napětí + 15 kV.

5.4.2 Srovnání vlivu barnatých iontů na enantiosektivitu IP-CF6 v CE a HPLC

K HPLC separaci byla použita chromatografická kolona (250 mm x 4,6 mm vnitřní průměr, velikost částic 5 μm) s navázanou IP-CF6 CSP (komerční název LARIHC-CF6-P) od firmy AZYP (Arlington, TX, USA). Složení mobilní fáze MeOH/20 mM AA pH 4,50 v poměrech od 20 do 60 % (v/v) MeOH (optimální složení mobilní fáze se pro jednotlivé analyty lišilo) poskytovalo nejlepší získané hodnoty rozlišení pro všech pět studovaných atropisomerů.

Následně byly do mobilní fáze přidány Ba^{2+} ionty ve formě 5 mM octanu barnatého a byl studován jejich vliv na retenci, enantiosektivitu a rozlišení studovaných analytů. Konstanta stability komplexu s CF má řádově vyšší hodnotu než ostatní kationty [92] Chromatogramy ilustrující porovnání enantioseparace vybraných atropisomerů s použitím mobilní fáze o optimalizovaném složení bez přidavku, a s přidavkem Ba^{2+} iontů jsou zobrazeny na obrázku 22. V případě enantioseparace *R,S*-BINOLu a *R,S*-DABNu vedla přítomnost Ba^{2+} iontů v mobilní fázi k mírnému poklesu retence obou atropisomerů a rovněž i hodnot rozlišení. Naproti tomu v případě atropisomerů obsahujících fosfátovou skupinu retence vzrostla, u *R,S*-VAPOLu dokonce značně (retenční čas delší než 60 minut). Vyšší retence, která je spojena s nárůstem hodnot rozlišení, je vysvětlena vytvořením komplexu mezi neutrálním

IP-CF6 a kladně nabitými Ba^{2+} ionty, který se tím stává rovněž kladně nabitým. Vlivem disociace záporně nabitě fosfátové skupiny *R,S*-BNPu, *R,S*-BBPu a *R,S*-VAPOLu mohou elektrostatickými silami interagovat s kladnými Ba^{2+} ionty vázanými v komplexu s IP-CF6, což vede k delší retenci zmíněných atropisomerů. *R,S*-BINOL a *R,S*-DABN jsou nenabitě, proto se výše popsané elektrostatické interakce neuplatňují.



Obrázek 22 Porovnání chromatografické separace vybraných atropisomerů s použitím mobilní fáze (A) bez přídavku a (B) s přídavkem Ba^{2+} iontů. Složení mobilní fáze pro jednotlivé analyty bylo následující: MeOH/pufř 30:70 (v/v) pro DABN a BNP; MeOH/pufř 20:80 (v/v) pro BINOL; MeOH/pufř 40:60 (v/v) pro BBP a VAPOL. Pufř: 20 mM AA o pH 4,50 - převzato [126].

6 Empirické porovnání enantioselektivity cyklofruktanů a cyklodextrinů v kapilární elektroforéze

Nativní CF vykazují velmi omezenou enantioseparační schopnost v CE. Důvodem je pravděpodobně částečná kroutivá deformace struktury CF vedoucí k zneprístupnění crown etherového jádra, které je hlavním interakčním centrem. Tento deformační efekt je navíc umocněn faktem, že nativní CF se v CE volně pohybují v elektrolytu (jeho elektroforetická mobilita je rovna elektroosmotické mobilitě) a jeho struktura není stabilizovaná, jako je tomu v případě chromatografických kolon, kde je CF kovalentně navázán na silikagelu.

Cílem této studie je empiricky porovnat enantioseparační schopnosti nativních CF a CD při separaci BNP atropisomerů za různých separačních podmínek (přídavek organického rozpouštědla nebo tenzidu). *R,S*-BNP patří do skupiny stereoisomerů (atropisomerů) jejichž optická isomerie je vyvolána znemožněním rotace dvou rovinných podjednotek okolo jednoduché vazby spojující obě podjednotky. Zároveň je ve studii poukázáno na zásadní význam derivatizace hydroxylových skupin D-fruktofuranosových jednotek isopropylkarbamátovou funkční skupinou na enantioselektivitu CF v CE.

6.1 Instrumentální vybavení

Experimenty byly realizovány na kapilární elektroforéze HP 3D (Agilent Technologies, Waldbronn, Německo) vybavené DAD. Použita byla nepokrytá křemenná kapilára (MicroSolv, Eatontown, NJ, USA) o vnitřním průměru 50 μm , vnějším průměru 365 μm , celkové délce 33 cm a efektivní délce 24,5 cm. Pracovní teplota pro všechny experimenty byla nastavena na 25 °C. Před prvním použitím a na začátku každého pracovního dne byla kapilára promyta po dobu 15 minut 1 M hydroxidem sodným, 15 minut deionizovanou vodou a nakonec 15 minut pracovním elektrolytem. Mezi jednotlivými analýzami se kapilára promývala 2 minuty 1 M hydroxidem sodným, 2 minuty deionizovanou vodou a 2 minuty borátovým pracovním elektrolytem v případě analýz prováděným při alkalickém pH nebo se promývala 2 minuty deionizovanou vodou, 2 minuty 1 M kyselinou chlorovodíkovou

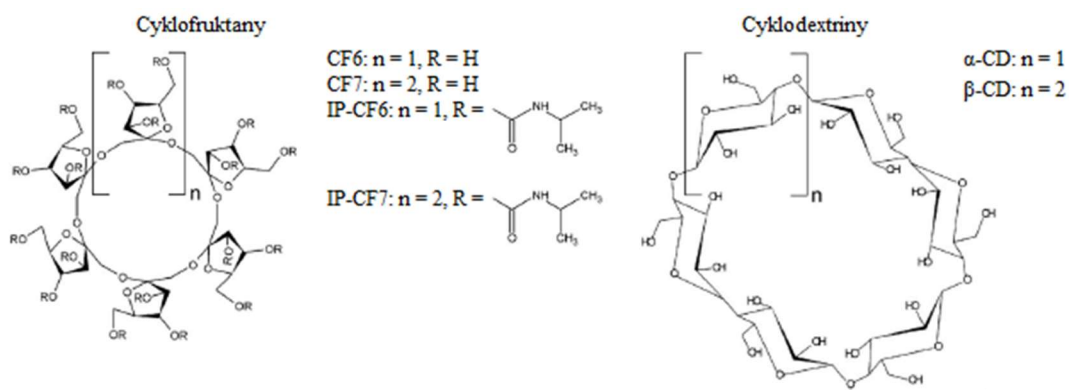
a poté 2 minuty fosfátovým pufrům pro analýzy v kyselém prostředí. Detekční vlnová délka byla nastavena na 214 nm. Separace v kyselém prostředí byly provedeny v módu opačné polarizace s hodnotou vkládaného napětí -15 kV. V případě alkalického prostředí bylo použito módu normální polarizace s hodnotou napětí +15 kV. Vzorek byl dávkován hydrodynamicky tlakem 50 mbar po dobu 5 sekund. Identifikace jednotlivých BNP atropisomerů byla provedena přidáním příslušného standardního roztoku daného atropisomeru o koncentraci 10 µg/ml. Všechny experimenty byly provedeny 3krát, pokud není v textu uvedeno jinak.

6.2 Chemikálie

Kyselina boritá, kyselina fosforečná (85%), hydroxid sodný, kyselina chlorovodíková (37%), dodecylsírán sodný (SDS), *R*- a *S*-1,1'-binaftalen-2,2'-diylhydrogenfosfát (*R*- a *S*-BNP), α -CD a β -CD byly p. a. čistoty a organická rozpouštědla methanol (MeOH) a acetonitril (ACN) byly o HPLC čistotě. Všechny zmíněné chemikálie byly zakoupeny u firmy Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Nativní CF6 a CF7 a IP-CF6 (DS~5) a IP-CF7 (DS~9) byly získány od firmy AZYP (Arlington, TX, USA). Pracovní elektrolyty byly připraveny rozpuštěním odpovídajícího množství kyseliny fosforečné nebo kyseliny borité v deionizované vodě ($18 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$, Millipore, Molsheim, France) a požadovaného pH bylo docíleno titrací 50% (w/v) roztokem hydroxidu sodného. Pracovní elektrolyty obsahující určitý podíl organické složky byly připraveny následujícím způsobem: příslušné množství kyseliny fosforečné nebo borité bylo rozpuštěno ve směsi deionizované vody a požadovaného procentuálního objemového množství MeOH nebo ACN a pH bylo upraveno titrací roztokem 50% (w/v) hydroxidu sodného. SDS o uvedené koncentraci byl přidán do pracovního elektrolytu až po úpravě pH. Studované CS byly do pracovních elektrolytů přidány až úplně nakonec. Zásobní roztoky jednotlivých BNP atropisomerů o koncentraci 2,0 mg/ml byly připraveny rozpuštěním příslušného standardu v MeOH. Racemická směs *R,S*-BNP byla připravena smícháním zásobních roztoků *R*- a *S*-atropisomeru a naředěna deionizovanou vodou na pracovní roztok o koncentraci 1,0 mg/ml. Připravené roztoky byly skladovány při teplotě 4 °C.

6.3 Výsledky a diskuze

S ohledem na předchozí publikované výsledky [126] byl jako modelový analyt pro studium možností ovlivnění enantioselektivity CF vybrán atropisomer *R,S*-BNP, který se již podařilo úspěšně enantiomerně separovat pomocí IP-CF6 v kyselém i alkalickém prostředí. Kromě nativních CF6 a CF7 byly pro porovnání použity i jejich neutrální deriváty IP-CF6 a IP-CF7 a nederivatizované α -CD a β -CD (Obr. 23), jejichž interakční mechanismy při separaci chirálních látek jsou velice dobře popsány [82,131].

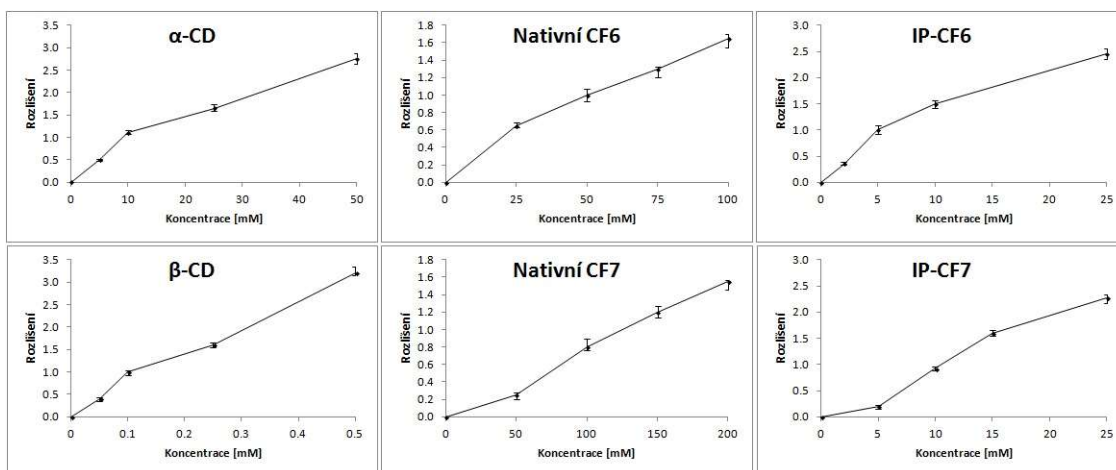


Obrázek 23 Struktury studovaných cyklofruktanů a cyklodextrinů.

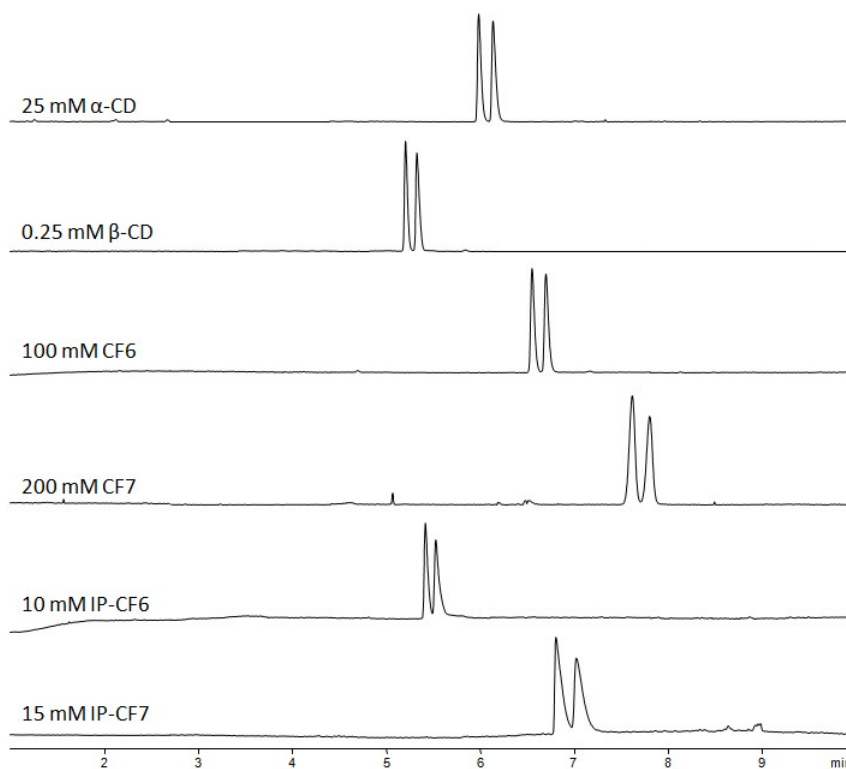
6.3.1 Empirické porovnání enantioselektivity cyklofruktanů a cyklodextrinů v kyselém pracovním elektrolytu

V kyselém prostředí (pH 2,5) je *R,S*-BNP vlivem disociace fosfátové skupiny záporně nabitý a migruje jako anion od katody k anodě. Naproti tomu jsou všechny studované CS při tomto pH neutrální a jejich elektroforetická mobilita je rovna elektroosmotické mobilitě, jejíž směr migrace je opačný ke směru migrace *R,S*-BNP. Aby bylo možné *R,S*-BNP detekovat, je nezbytné použít mód obrácené polarity s detekcí na anodickém konci kapiláry. V předchozí práci [126] bylo studováno vhodné složení kyselého i alkalického pracovního elektrolytu. Výsledné složení kyselého pracovního elektrolytu – 50 mM fosfát sodný pH 2,50 – bylo proto použito i pro následující studii.

V prvním kroku byl studován vliv rostoucí koncentrace každého z vybraných CS na rozlišení BNP atropisomerů. Ze závislostí zobrazených na obrázku 24 lze ve všech případech pozorovat trend nárůstu rozlišení na zvyšující se koncentraci použitého CS.



Obrázek 24 Závislosti rozlišení separace BNP atropisomerů na rostoucí koncentraci jednotlivých studovaných CS v 50 mM fosfátu sodném o pH 2,5.



Obrázek 25 Elektroferogramy vybraných analýz enantioseparace *R,S*-BNP v 50 mM fosfátu sodném pH 2,5 s přidavkem jednotlivých CS o koncentraci potřebné k získání rozlišení o hodnotě $\geq 1,5$. Separační napětí -15 kV.

Pro další studii byly vybrány koncentrace jednotlivých CS, při nichž dosažená hodnota rozlišení byla větší nebo rovna 1,5. V použitém 50 mM fosfátovém pufru o pH 2,5 byly potřebné koncentrace jednotlivých CS následující: 25 mM α-CD; 0,25 mM β-CD; 100 mM CF6; 200 mM CF7; 10 mM IP-CF6 a 15 mM IP-CF7. Elektroferogramy separace *R,S*-BNP pro uvedené CS jsou uvedeny na obrázku 25.

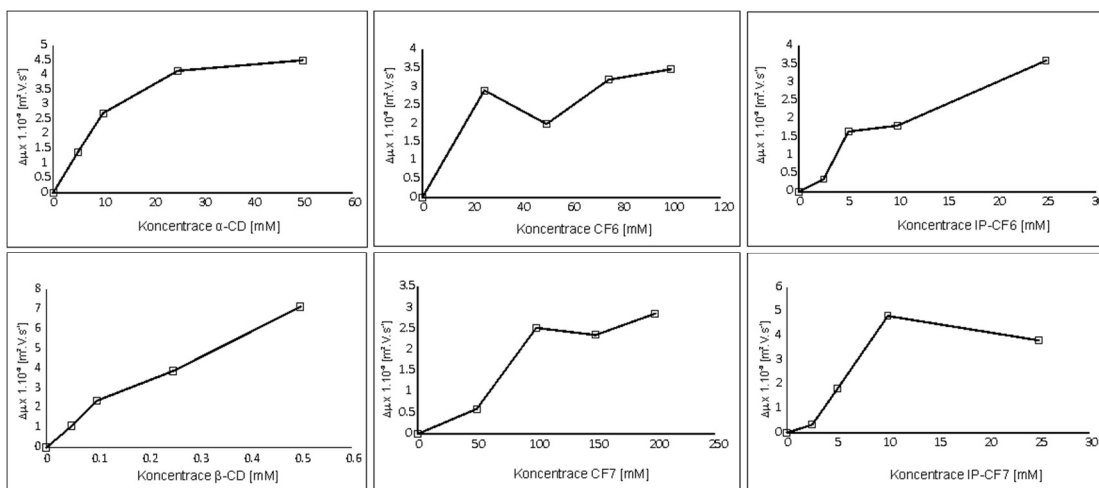
Z dosažených výsledků je zřejmé, že oba derivatizované CF vykazují větší enantioseparační schopnost než jejich nederivatizované analogy, neboť koncentrace IP-CF6 a IP-CF7 potřebné k enantioseparaci *R,S*-BNP na základní linii jsou několikanásobně menší než u obou nativních CF. Důvodem je patrně vznik silnějších interakcí mezi CF a *R,S*-BNP prostřednictvím vodíkových vazeb a změna symetrie molekuly CF, která je způsobena zánikem vodíkových vazeb mezi OH skupinami na uhlíku 3. Minimální koncentrace nativního CF7, jehož makrocycklus je tvořen sedmi D-fruktofuranosovými jednotkami, nezbytná k dosažení separace s rozlišením $\geq 1,50$ byla vyšší než v případě nativního CF6, který je tvořen pouze šesti jednotkami. Naprosto opačný jev byl pozorován u nederivatizovaných CD. Koncentrace α -CD, který je tvořen šesti jednotkami D-glukopyranosy, byla řádově (stokrát) vyšší než v případě β -CD, který obsahuje jednotek sedm. Rozdíl v enantioselektivitě α -CD a β -CD při separaci BNP atropisomerů lze vysvětlit rozdílným průměrem vnitřních kavit obou CD (vnitřní kavita β -CD má větší průměr). Binaftylová část molekuly BNP může totiž interagovat s prostorově větší vnitřní kavitou β -CD silněji, což umožňuje separaci BNP atropisomerů i při velmi nízkých koncentracích β -CD.

Na základě těchto výsledků lze konstatovat, že hlavním mechanismem tvorby diastereomerních komplexů mezi CD a *R,S*-BNP je inkluze, stabilizovaná hydrofobními interakcemi, binaftylové části molekuly BNP do kavity CD. V případě CF není jejich separační mechanismus tak jednoznačný, jelikož CF netvoří kavitu vhodnou pro tvorbu inkluzních komplexů. Lze však usuzovat, že „hydrofobnější“ strana CF může interagovat s binaftylovou částí, zatímco „hydrofilnější“ strana CF interaguje s fosfátovou skupinou molekuly BNP. Silnější interakci s *R,S*-BNP vykazoval CF6 ve srovnání s CF7, což potvrzuje rozdílný separační mechanismus oproti α -CD a β -CD. Je velice důležité zmínit fakt, že CF6 a α -CD, stejně jako CF7 a β -CD, jsou isomery se stejnou molekulovou hmotností, ale rozdílnou prostorovou konfigurací.

Z elektroferogramů (Obr. 25) je dále patrné, že při použití 10 mM IP-CF6, a především 15 mM IP-CF7 dochází k chvostování píků obou atropisomerů, které je pravděpodobně způsobeno adsorpcí vznikajících diastereomerních komplexů na převážně nenabitou vnitřní stěnu křemenné kapiláry. Migrační pořadí atropisomerů v prostředí fosfátového pufru bylo při použití každého ze studovaných CS stejné - jako první migroval *R*-BNP atropisomer.

Z vynesení závislosti změny elektroforetických mobilit atropisomerů na koncentraci studovaných CS byl ověřován Wrenův matematický model separace

enantiomerů (Obr. 26). Model byl částečně platný pouze v případě enantioseparací s použitím α -CD, CF7 a IP-CF7. V ostatních případech nebyl totiž pozorován charakteristický parabolický průběh křivek s jedním nebo více maximy. Wrenův model byl ověřován pouze ve studovaném koncentračním rozsahu a na daných koncentračních úrovních, proto lze tyto výsledky brát pouze orientačně.



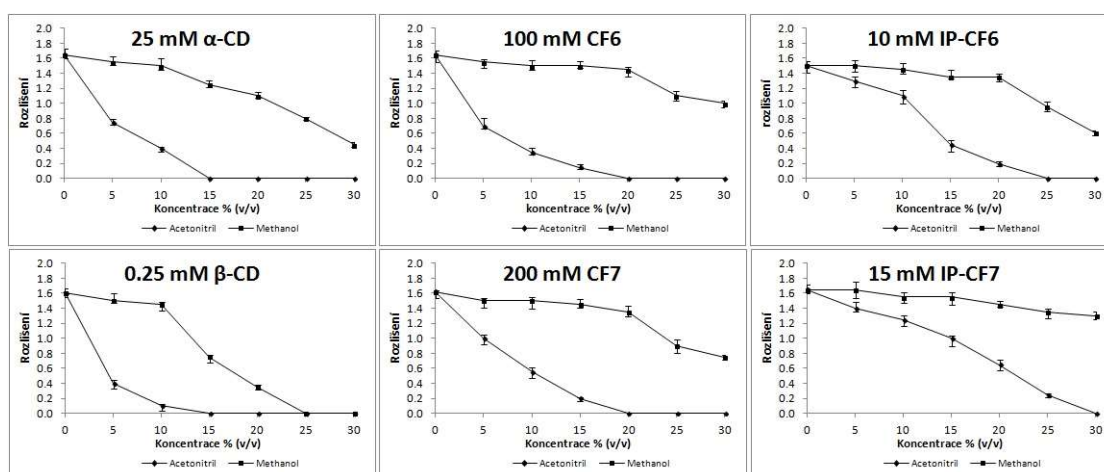
Obrázky 26 Grafy závislosti změn elektroforetických mobilit BNP atropisomerů na koncentraci CS sloužící k ověření platnosti Wrenova matematického modelu ve fosfátovém pufru.

6.3.1.1 Vliv organických rozpouštědel na separaci v kyselém pracovním elektrolytu

Přídavek malého množství organického rozpouštědla do pracovního elektrolytu může zásadně ovlivnit průběh separace. Důvodem jsou především změny viskozity a dielektrické konstanty elektrolytu, což má za následek změnu elektroosmotické mobility, která je, především v neutrálním a alkalickém prostředí, velice významným parametrem pro výslednou separaci. V silně kyselém pracovním elektrolytu jakým je fosfát sodný o pH 2,5 je mobilita EOF velmi malá a přidávkem organického rozpouštědla (v případě MeOH nebo ACN) dochází k dalšímu snížení elektroosmotické mobility. Kromě manipulace s elektroosmotickou mobilitou ovlivňuje přidavek organického rozpouštědla i solvataci molekul analytu, což má za následek možnou změnu jejich elektroforetických mobilit, a tudíž i rozdílný průběh separace. V neposlední řadě mohou organické rozpouštědla ovlivnit druh a sílu interakcí mezi analytem a použitým CS, čímž mohou vznikat diastereomerní komplexy o různých

hodnotách konstant stability a jednotlivé enantiomery se separovat s vyšší, ale i nižší hodnotou rozlišení [132,133].

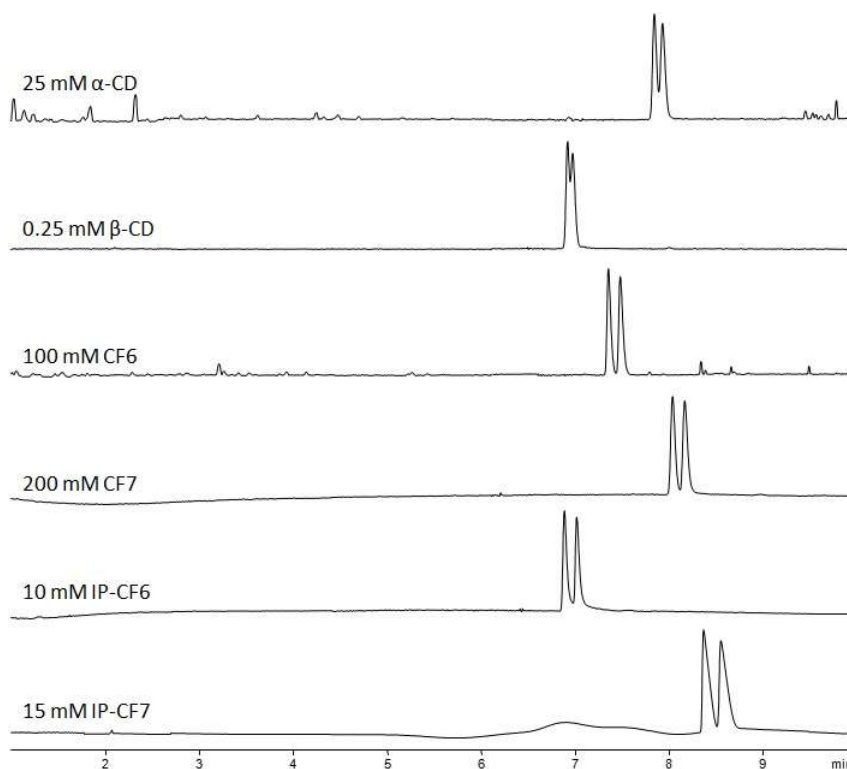
Na základě uvedených poznatků byl studován vliv přídavku MeOH a ACN v rozsahu koncentrací od 5 do 30 % (v/v), s přírůstků po 5 % (v/v), na průběh separace BNP atropisomerů při použití každého z CS o koncentraci potřebné k získání separace na základní linii. Vliv MeOH a ACN na separaci byl rozdílný. Zatímco přídavek ACN vedl k minimálnímu ovlivnění elektroforetických mobilit atropisomerů a poklesu rozlišení, které v případě separace s použitím CD bylo daleko výraznější (Obr. 27), vliv přídavku MeOH do pracovního elektrolytu měl odlišný průběh. Předpokládá se, že ACN jako slabý akceptor (příjemce) protonů může interagovat s protony vznikajícími disociací fosfátové skupiny *R,S*-BNP, čímž dochází k potlačení interakcí mezi analytem a selektorem prostřednictvím vodíkových vazeb.



Obrázek 27 Závislosti hodnot rozlišení enantioseparace *R,S*-BNP na rostoucím obsahu MeOH a ACN (% (v/v)) v 50 mM fosfátu sodném pH 2,5 s CS o výše uvedené koncentraci.

Při studiu vlivu MeOH a s použitím obou CD jako CS byl rovněž pozorován pokles hodnot rozlišení s rostoucí koncentrací MeOH, ale oproti přídavku ACN byl tento trend poklesu rozlišení pozvolnější. Důvodem je patrně interakce MeOH s vnitřní kavitou CD, což může vést ke změně hydrofobních vlastností kavity a snížení asociační konstanty inkluzního komplexu CD s molekulou *R,S*-BNP. Naproti tomu při použití CF byl zaznamenán s rostoucí koncentrací MeOH pouze mírný pokles hodnot rozlišení, především v případě isopropylovaných derivátů zůstalo rozlišení téměř nezměněné (Obr. 27). Výsledky naznačují, že hydrofobní interakce nemusí hrát při tvorbě komplexu mezi *R,S*-BNP a CF tak podstatnou roli, jako tomu bylo u CD, neboť struktura CF je planární a nevytváří klasickou kavitu jako CD, se kterou by mohl MeOH

interagovat, a tím pádem zásadně ovlivňovat vznikající diastereomerní komplexy. Pozvolný nárůst migračních časů obou BNP atropisomerů byl pozorován pro CD i CF s rostoucí koncentrací MeOH. Tento efekt je pravděpodobně spojený se změnou viskozity pufru a poklesem elektroosmotické mobility, který však v použitém kyselém elektrolytu nebyl nikterak zásadní. Elektroferogramy enantioseparace *R,S*-BNP v 50 mM fosfátu sodném o pH 2,5 s obsahem 20 % (v/v) MeOH jsou na obrázku 28.



Obrázek 28 Elektroferogramy enantioseparace *R,S*-BNP v 50 mM fosfátu sodném pH 2,5 s obsahem 20 % (v/v) MeOH a CS o uvedené koncentraci. Separáční napětí -15 kV.

6.3.1.2 Vliv tenzidů na separaci v kyselém pracovním elektrolytu

Tenzidy jsou povrchově aktivní látky schopné vytvářet tzv. micely a to za předpokladu, že je jejich koncentrace v roztoku větší nebo rovna jejich tzv. kritické micelární koncentraci (CMC). Tvorba micel je dynamický proces a do značné míry závisí na složení a vlastnostech daného pracovního elektrolytu. Micela se skládá z hydrofilní a hydrofobní části a může být neutrální nebo nabitá nebo a migrovat v elektroforetickém systému buď s EOF nebo mít vlastní elektroforetickou mobilitou. Vnější část makromolekul obou studovaných CD je hydrofilní, takže s micelární fází

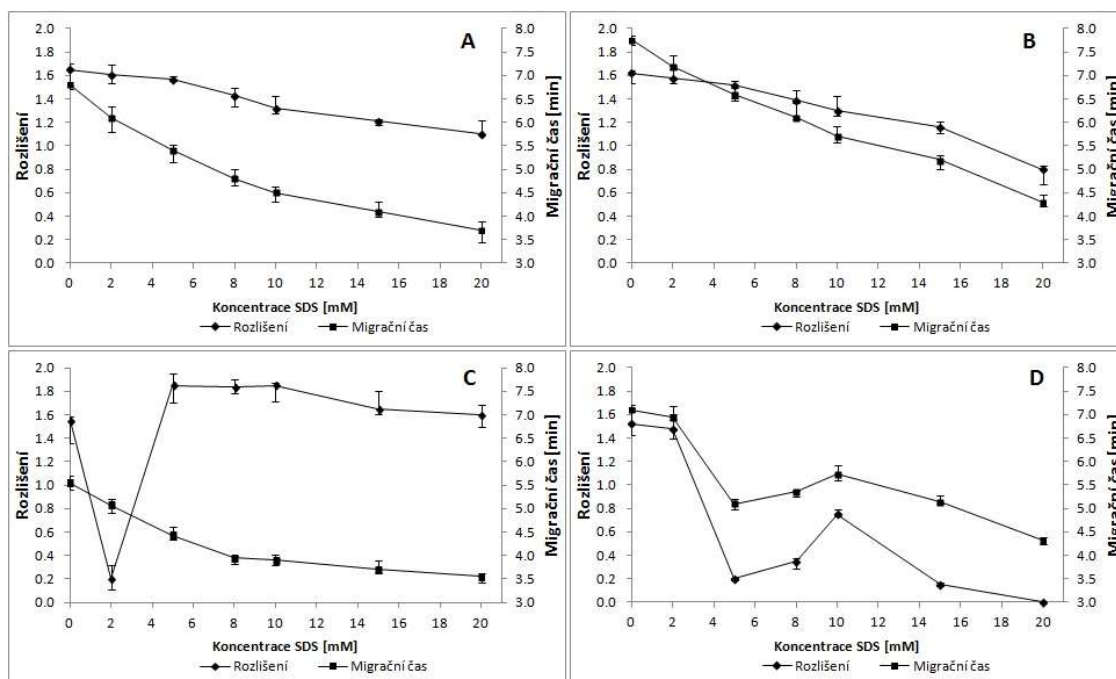
neinteraguje. Na druhou stranu, vnitřní kavita CD je silně hydrofobní, což umožňuje inkluzi molekuly tenzidu do středu kavity [134,135].

Molekula analytu může střídavě přecházet z oblasti vně micelární fáze do prostoru micelární fáze, která s ní může interagovat. V případě neutrálních (nenabitých) CD, jejichž elektroforetická mobilita je rovna elektroosmotické mobilitě, a iontových (nabitých) tenzidů, které mají elektroforetickou mobilitu rozdílnou od neutrálních CD, může na základě různě silné interakce analytu s micelární fází a kavitou CD docházet k ovlivnění elektroforetické mobility analytu, a pokud se jedná o chirální látku, tak i k separaci enantiomerů. Pokud by nejen CD, ale i micelární fáze byly nenabité, k separaci enantiomerů by mohlo dojít pouze za předpokladu, že studovaný analyt by byl v pracovním elektrolytu nabitý, což v tomto případě *R,S*-BNP splňuje (vlivem disociace má záporný náboj).

Doposud nebyla publikována žádná studie, která by se detailněji věnovala interakci iontových nebo neutrálních tenzidů s CF, dá se však usuzovat, že planární struktura CF nebude kvůli absenci hydrofobní kavity vytvářet inkluzní komplexy s molekulami tenzidu, ale mohou se uplatnit jiné vazebné interakce, např. vodíkové vazby, van der Waalsovy, disperzní interakce, aj. Aby bylo možné tuto teorii potvrdit, byl vybrán běžně používaný aniontový tenzid (SDS) pro studium ovlivnění enantioseparace pomocí CF a jejich isopropylovaných (neutrálních) derivátů. Výsledky byly porovnány s údaji získanými pro enantioseparaci s použitím α - a β -CD.

Hodnota CMC pro SDS v deionizované vodě je 8,3 mM [136]. V kyselém prostředí jsou micely SDS, stejně jako molekula *R,S*-BNP, záporně nabitě a migrují jako anionty. *R,S*-BNP je rozdělováno mezi vodnou fází bez SDS micel a vytvořenou SDS micelární fází, se kterou může aromatická část molekuly *R,S*-BNP hydrofobně interagovat. Přídavek CS do pufru, který obsahuje micelární fází, vytvoří další možnou fází, se kterou může *R,S*-BNP interagovat a utváří se tak složitá rovnováha mezi CS, micelární fází, vodnou fází a *R,S*-BNP.

Efekt přídavku SDS, studovaný v koncentračním rozmezí 2 až 20 mM, na enantiosektivitu nativních CF byl odlišný, než pro jejich isopropylované deriváty. Rozdílnou enantiosektivitu bylo navíc možné pozorovat i v případě obou derivátů. Při separaci BNP atropisomerů pomocí 100 mM CF6 a 200 mM CF7 docházelo s rostoucí koncentrací SDS v pracovním elektrolytu k pozvolnému poklesu rozlišení (Obr. 29A a 29B).



Obrázek 29 Vliv rostoucí koncentrace SDS v 50 mM fosfátu sodném o pH 2,5 s přidavkem (A) 100 mM CF6, (B) 200 mM CF7, (C) 10 mM IP-CF6 a (D) 15 mM IP-CF7 na rozlišení a migračním čase *S*-BNP atropisomeru, který migruje jako druhý v pořadí.

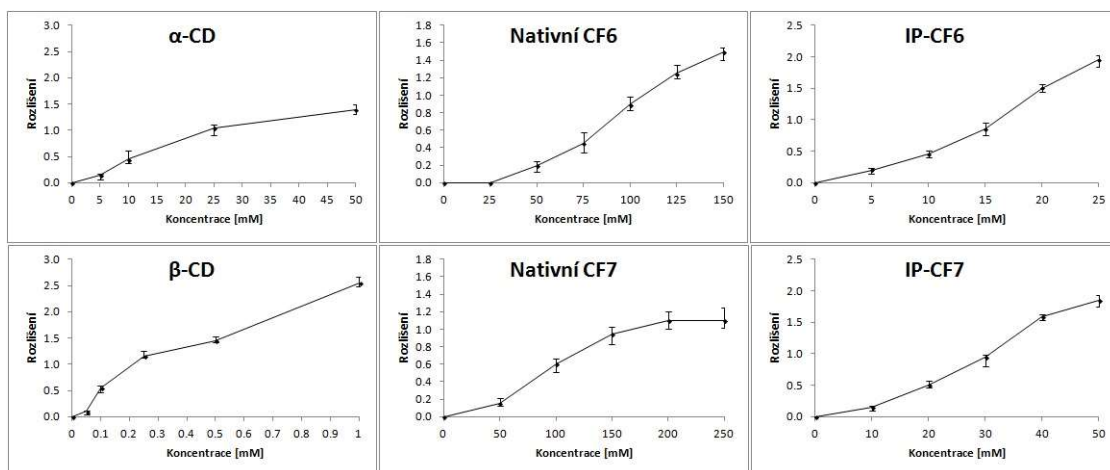
První přidavek SDS o koncentraci 2 mM při enantioseparaci *R,S*-BNP s použitím 10 mM IP-CF6 vedlo ke strmému poklesu rozlišení, přičemž doba analýzy se jen nepatrně zkrátila. Zvýšením koncentrace SDS na 5 mM došlo k nárůstu rozlišení na hodnotu vyšší než v případě separace samotným 10 mM IP-CF6 bez přidavku SDS. S dalším nárůstem koncentrace SDS až na hodnotu 10 mM se rozlišení prakticky neměnilo. Pro koncentraci SDS vyšší než 10 mM byl zaznamenán mírný pokles hodnot rozlišení, které však bylo pořád větší než při separaci bez SDS (Obr. 29C). Migrační časy obou BNP atropisomerů s rostoucí koncentrací SDS pozvolna klesaly, což nasvědčuje pravděpodobné vzájemné interakci.

Podobný průběh vlivu přidavku SDS na separaci BNP atropisomerů byl pozorován i pro 15 mM IP-CF7, avšak v tomto případě přidavek v koncentračním rozsahu 2 až 20 mM nevedl k získání separace s rozlišením větším než se samotným IP-CF7 bez přidavku SDS. S prvními přírůstky koncentrace SDS v pufru rozlišení prudce klesalo, přičemž při koncentraci SDS rovné 5 mM dosáhlo rozlišení hodnoty pouze 0,2. Zároveň se výrazně zkrátila i doba analýzy. V koncentračním rozsahu od 5 do 10 mM rozlišení narostlo až na hodnotu 0,8; avšak další přidavek vedl opět k postupné ztrátě rozlišení (Obr. 29D).

Enantioseparace *R,S*-BNP s využitím 25 mM α -CD a 0,25 mM β -CD poskytovaly naprosto rozdílné výsledky, neboť přidavek SDS v celém koncentračním rozsahu (2 až 20 mM) znamenal naprostou ztrátu enantioselektivity pro oba CD. Důvodem jsou pravděpodobně silné hydrofobní interakce molekuly SDS (především její hydrofobní části) s vnitřní kavitou CD, což mohlo znemožnit separaci BNP atropisomerů.

6.3.2 Empirické porovnání enantioselektivity cyklofruktanů a cyklodextrinů v alkalickém pracovním elektrolytu

Jak již bylo uvedené výše, *R,S*-BNP je kyselina, která vlivem disociace migruje jako anion v širokém rozsahu pH. V alkalickém prostředí je elektroosmotická mobilita velice významná a hraje důležitou roli pro celkový průběh analýzy. Jelikož směr migrace EOF je od anody ke katodě, což je obráceně oproti směru migrace *R,S*-BNP. Elektroosmotická mobilita je větší než elektroforetická mobilita *R,S*-BNP, a proto je nutné použít mód pozitivní polarity s detekcí na anodickém konci kapiláry. Složení alkalického pracovního elektrolytu, 100 mM borátu sodného o pH 10,0; bylo rovněž převzato z předchozí publikované práce [126]. Experimentální postup měl stejnou souslednost jako v případě studie v kyselém prostředí. Nejdříve byl sledován vliv rostoucí koncentrace každého ze studovaných CS na rozlišení (Obr. 30).

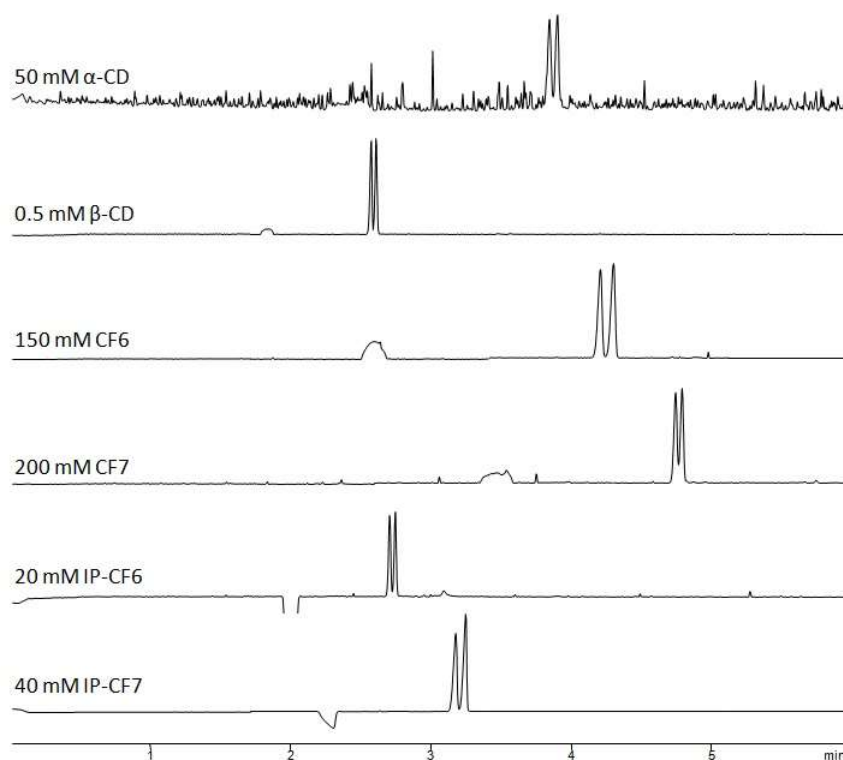


Obrázek 30 Závislosti změn hodnot rozlišení enantioseparace *R,S*-BNP na rostoucí koncentraci studovaných CS ve 100 mM borátu sodném o pH 10,0.

Nalezený trend nárůstu rozlišení v závislosti na rostoucí koncentraci CS byl stejný pro všechny selektory, výjimku tvořil pouze nativní CF7, se kterým se podařilo

separovat BNP atropisomery s maximální hodnotou rozlišení 1,1; neboť přídavek nativního CF7 o koncentraci vyšší než 200 mM již nevedlo k nárůstu hodnot rozlišení.

Ze závislostí je patrné, že koncentrace každého ze studovaných CS potřebná k získání separace s rozlišením o hodnotě $\geq 1,50$ je v alkalickém prostředí větší než tomu bylo v kyselém pufru. Pravděpodobným důvodem je zkrácení doby analýzy způsobené silným EOF, který značně ovlivňuje výslednou migraci *R,S*-BNP, a zároveň i dobu, po kterou může interagovat s CS. Elektroferogramy analýz s použitím 50 mM α -CD, 0,5 mM β -CD, 20 mM IP-CF6, 40 mM IP-CF7, 150 mM nativního CF6 a 200 mM nativního CF7, což jsou koncentrace nezbytné k získání separace BNP atropisomerů s $R_S \geq 1,50$ (v případě nativního CF7 s největším možným dosažitelným rozlišením) jsou uvedeny na obrázku 31. V případě 50 mM α -CD byl pozorován značný šum základní linie způsobený zhoršenou rozpustností α -CD v použitém pracovním elektrolytu.

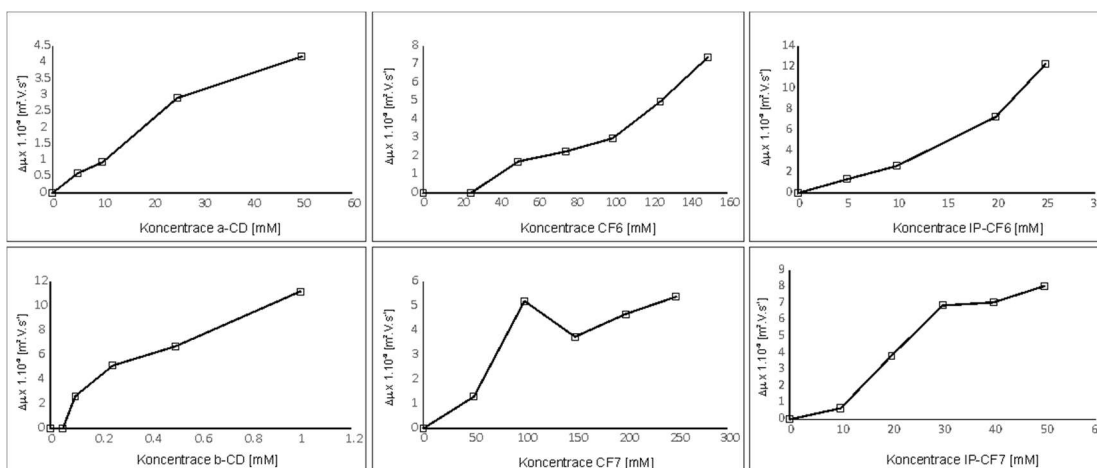


Obrázek 31 Elektroferogramy analýz enantioseparace *R,S*-BNP ve 100 mM borátu sodném o pH 10,0 s použitím 50 mM α -CD, 0,5 mM β -CD, 20 mM IP-CF6, 40 mM IP-CF7, 150 mM nativního CF6 a 200 mM nativního CF7. Separační napětí +15 kV.

V alkalickém pufru došlo ke změně migračního pořadí BNP atropisomerů a jako první migroval *S*- atropisomer. Důvodem je vložení vnějšího napětí s normální polaritou

a detekci na katodickém konci kapiláry, což je rozdíl oproti separace ve fosfátovém pufru, ve kterém byly BNP atropisomery detekovány na anodickém konci kapiláry.

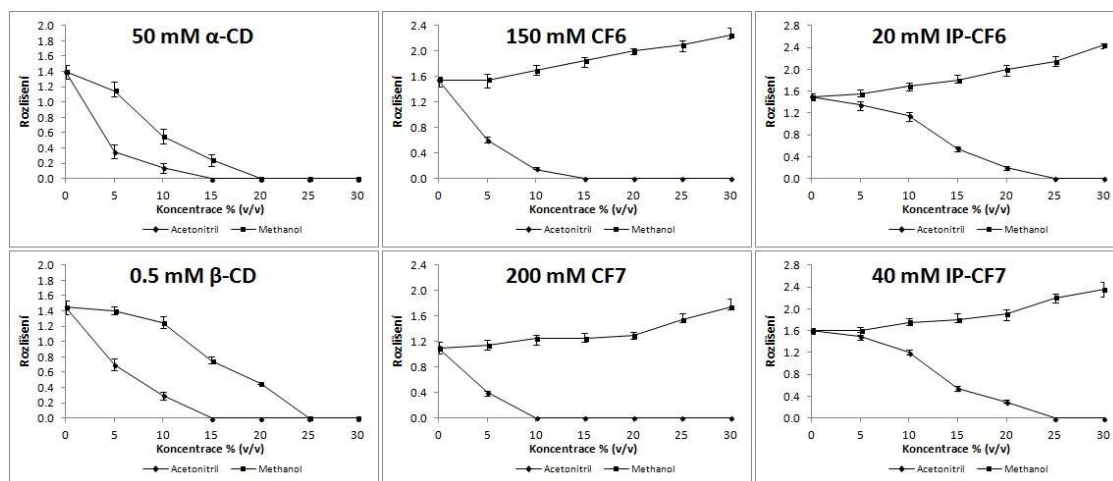
Stejně jako u fosfátového pufru, tak i v případě borátového pufru byla studována závislost změny elektroforetických mobilit BNP atropisomerů na koncentraci použitých CS (Obr. 32) sloužící k ověření platnosti Wrenova matematického modelu enantioseparace. V tomto případě bylo možné částečně aplikovat Wrenův model pouze pro nativní CF7 a jeho isopropylovaný derivát.



Obrázky 32 Grafy závislosti změn elektroforetických mobilit BNP atropisomerů na koncentraci CS sloužící k ověření platnosti Wrenova matematického modelu v borátovém pufru.

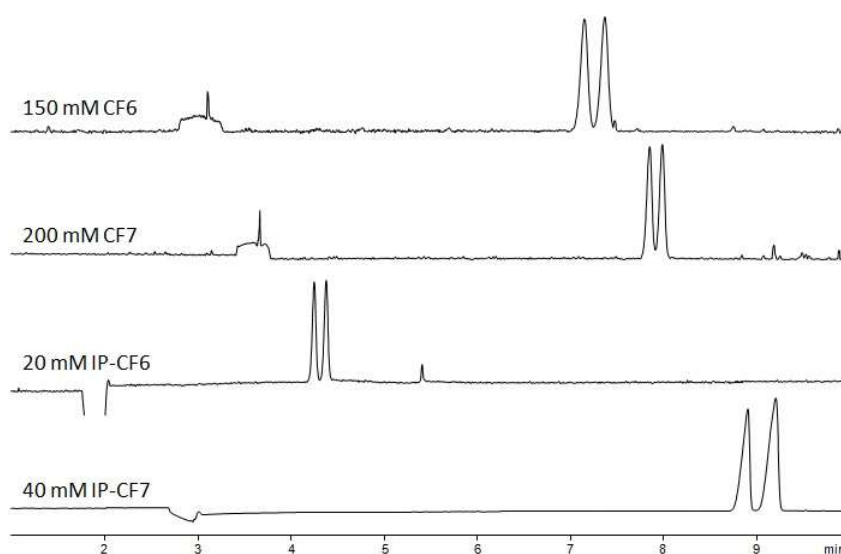
6.3.2.1 Vliv organických rozpouštědel na separaci v alkalickém pracovním elektrolytu

Jak již bylo zmíněno, přidavek organického rozpouštědla do pracovního elektrolytu může změnit některé jeho vlastnosti (např. viskozitu nebo iontovou sílu), které poté mohou mít vliv na směr a mobilitu EOF. V případě použití alkalického elektrolytu je elektroosmotická mobilita významná a do značné míry ovlivňuje průběh celé analýzy. Přidavek organického rozpouštědla může mít daleko větší vliv na separaci, než tomu bylo u kyselého elektrolytu. Studovány byly opět dvě rozpouštědla, konkrétně MeOH a ACN v koncentračním rozsahu 5 až 30 % (v/v), s 5% (v/v) přídavky. Stejně jako v kyselém prostředí, tak i v tomto případě měl ACN negativní vliv na separaci BNP atropisomerů, zejména při použití obou CD a nativních CF. U isopropylovaných derivátů CF byl rovněž, s rostoucím obsahem ACN v borátovém pufru, pozorován pokles hodnot rozlišení, který byl však výrazně pozvolnější (Obr. 33).



Obrázek 33 Závislosti rozlišení enantioseparace *R,S*-BNP na rostoucím obsahu MeOH a ACN (% (v/v)) ve 100 mM borátu sodném o pH 10,0 s použitím 50 mM α -CD, 0,5 mM β -CD, 20 mM IP-CF6, 40 mM IP-CF7, 150 mM nativního CF6 a 200 mM nativního CF7.

Naproti tomu MeOH měl na separaci s použitím CF a jejich derivátů naprosto opačný efekt. S rostoucím obsahem MeOH v pracovním elektrolytu totiž zároveň rostly i hodnoty získaného rozlišení. Je důležité zmínit fakt, že s rostoucím obsahem MeOH byl pozorován pokles elektroosmotické mobility, čímž došlo k prodloužení interakční doby mezi CF a molekulami *R,S*-BNP. Elektroferogramy ilustrující vliv 20% (v/v) přídavku MeOH na separaci BNP atropisomerů jsou zobrazeny na obrázku 34. Při koncentracích MeOH nad 20 % (v/v) byl pozorován stálý nárůst rozlišení. Nevýhodou však bylo výrazné prodloužení doby analýzy, čímž došlo ke ztrátě symetrie píků obou BNP atropisomerů.



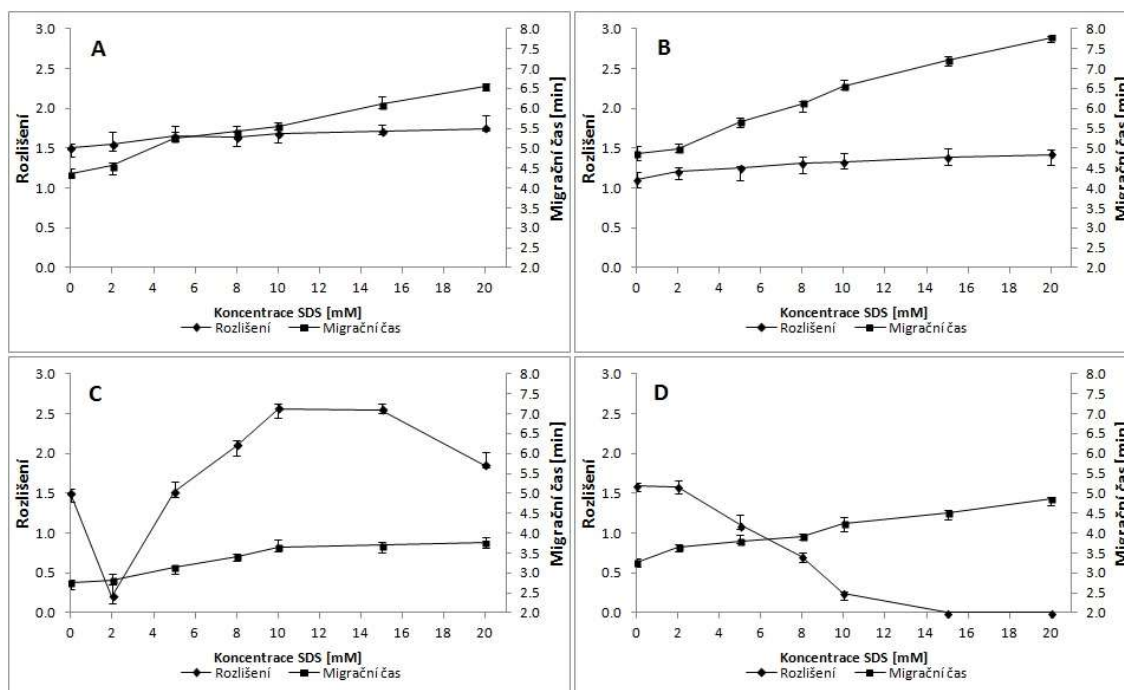
Obrázek 34 Elektroferogramy separace BNP atropisomerů ve 100 mM borátu sodném o pH 10,0 s obsahem 20 % (v/v) MeOH a CF o uvedené koncentraci. Separační napětí +15 kV.

Pro enantioseparaci *R,S*-BNP s použitím CD měl, stejně jako ACN, i MeOH negativní vliv, což se projevilo na poklesu hodnot rozlišení, který byl patrnější pro prostorově menší α -CD (Obr. 33). Výsledky opět potvrzují rozdílný interakční mechanismus CD a CF, který není v případě CF založený na tvorbě inkluzních komplexů. Ačkoliv zcela nelze potvrdit pozitivní efekt MeOH na sílu interakce mezi *R,S*-BNP a CF, přidavkem 20 % (v/v) MeOH do alkalického elektrolytu došlo k výraznému ovlivnění elektroosmotické mobility, což vedlo především k prodloužení interakční doby a získání lepšího rozlišení.

6.3.2.2 Vliv tenzidů na separaci v alkalickém pracovním elektrolytu

V alkalickém pracovním elektrolytu je vliv EOF na separaci významnější než tomu bylo v případě kyselého elektrolytu. Tenzidy, především ty iontové, mohou kromě interakce s analytem nebo CS, měnit směs a sílu EOF. Proto se dá očekávat větší vliv přidavku SDS na průběh enantioseparace *R,S*-BNP než ve fosfátovém pufru.

Studovaný koncentrační rozsah SDS zůstal stejný jako v případě kyselého prostředí, tedy 2 až 20 mM.



Obrázek 35 Vliv získaného rozlišení a migračního času *R*-BNP atropisomeru, který migruje jako druhý v pořadí, na rostoucí koncentraci SDS ve 100 mM borátu sodném o pH 10,0 s přidavkem (A) 150 mM CF6, (B) 200 mM CF7, (C) 20 mM IP-CF6 a (D) 40 mM IP-CF7.

Na obrázku 35 jsou zobrazeny grafy závislostí rozlišení BNP atropisomerů a migračního času *R*-BNP (atropisomeru migrujícího jako druhého v pořadí) na přidavku SDS do 100 mM borátu sodného o pH 10,0 s obsahem (A) 150 mM CF6, (B) 200 mM CF7, (C) 20 mM IP-CF6 a (D) 40 mM IP-CF7.

U nativních CF lze pozorovat podobný průběh nárůstu rozlišení i migračního času *R*-BNP atropisomeru v závislosti na rostoucí koncentraci SDS. Tento efekt se dá přičíst především změně elektroosmotické mobility a je nepravděpodobné, že by mírný nárůst rozlišení byl způsoben zvýšením enantioselektivity obou CF prostřednictvím interakce s SDS. Isopropylované deriváty CF poskytovaly naprosto odlišné výsledky. Při použití 20 mM IP-CF6 lze po poklesu hodnoty rozlišení z 1,5 na 0,2 (při přidavku 2 mM SDS, což je koncentrace nižší než CMC) pozorovat, s rostoucí koncentrací SDS, pozvolný nárůst rozlišení. V rozmezí 10 až 15 mM SDS bylo zaznamenáno koncentrační optimum, kdy rozlišení dosahovalo svého maxima. Další přidavek SDS již vedl k poklesu rozlišení a zhoršení separace. Migrační čas *R*-BNP atropisomeru mírně rostl, ale trend nebyl nikterak významný. Pro 40 mM IP-CF7 byl pozorován pouze pokles hodnot rozlišení v celém koncentračním rozsahu SDS, přičemž trend nárůstu migračního času zůstal stejný jako v případě separace s IP-CF6. Získané výsledky poukazují na význam sterického uspořádání CF - velikost makrocyklu, která je dána počtem fruktofuranosových jednotek, a stabilizace struktury vedoucí k zpřístupnění crown etherového jádra CF pomocí derivatizace hydroxylových skupin - pro interakci s molekulami SDS, která v případě IP-CF6 vedla k zvýšení enantioselektivity, která není pravděpodobně způsobena pouze ovlivněním vlastností separačního prostředí.

Stejně jako ve fosfátovém pufru, tak i v borátovém pufru došlo vlivem interakce s hydrofobní částí molekuly SDS ke ztrátě enantioselektivity obou CD. V celém koncentračním rozmezí SDS byl pozorován pouze jeden pík tvořený nerozseparovanou směsí obou BNP atropisomerů.

6.4 Závěrečné shrnutí

Nativní CF a především jejich isopropylované deriváty vykazují v CE velice dobrou enantioselektivitu k modelovému analytu *R,S*-BNP. Tato práce vůbec poprvé popisuje enantiorozlišovací schopnost nativních CF v CE. Koncentrace jednotlivých studovaných CF, která byla nezbytná použít k získání separace BNP atropisomerů

s hodnotou rozlišení $\geq 1,5$ závisela na počtu fruktofuranosových jednotek tvořících makrocyclus a derivatizaci volných hydroxylových skupin. Enantioselektivita CF byla studována ve dvou pracovních elektrolytech, 50 mM fosfátu sodném pH 2,5 a 100 mM borátu sodném pH 10,0; s přísady běžně používaných modifikátorů separačních podmínek, konkrétně organických rozpouštědel MeOH a ACN a povrchově aktivní látky SDS. Zatímco ACN měl v obou případech negativní efekt na enantioseparaci *R,S*-BNP, přídavek MeOH v některých případech vedl k nárůstu hodnot rozlišení, který je možné připsat především změně elektroosmotické mobility, proto byl tento efekt více pozorován v alkalickém pufru. Použití SDS, které interagovalo s oběma isopropylovanými deriváty CF prostřednictvím hydrofobních interakcí, mělo při separaci BNP atropisomerů pomocí IP-CF6 pozitivní vliv. Tyto výsledky poukázaly na klíčový význam sterických a hydrofobních interakcí, stejně tak i na pozitivní vliv tvorby vodíkových vazeb, pro enantioselektivitu CF v CE. Závoreň je možné vyloučit tvorbu inkluzních komplexů CF s molekulou analytu jako je tomu v případě CD.

Získané výsledky byly publikovány v zahraničním impaktovaném časopise *Journal of Separation Science* [137].

7 Závěr

Disertační práce poukazuje na dva odlišné přístupy k studiu nových možností separace enantiomerů metodou kapilární elektroforézy. První z nich popisuje aplikaci sulfatovaných derivátů CD pro enantioseparaci 1,3- a 1,4-DMAA. Ačkoliv je interakční mechanismus sulfatovaných CD již detailně popsán v řadě publikací, použití aniontových S- α -CD a S- β -CD jako duálního systému selektorů pro separaci enantiomerů nebylo doposud publikováno. Dalším zcela novým přínosem práce je popis využití chloridu benzyl(triethyl)amonného pro nepřímou spektrofotometrickou detekci při enantiomerní separaci obou studovaných látek, které v UV-VIS oblasti záření neabsorbují, neboť ve své struktuře nemají vhodnou funkční skupinu, která by plnila roli chromoforu. Nově vyvinutá elektroforetická metoda byla úspěšně aplikována pro separaci 1,3-DMAA stereoisomerů ve dvou komerčních doplňcích stravy, které garantují přítomnost přírodního 1,3-DMAA ve formě geraniového extraktu. Avšak stanovené zastoupení jednotlivých stereoisomerů 1,3-DMAA v obou přípravcích a synteticky připraveném standardu zakoupeného u firmy Sigma-Aldrich bylo naprosto identické, což poukazuje na pravděpodobný stejný způsob přípravy.

Druhý přístup k studiu separací enantiomerů se namísto vývoje nových elektroforetických metod věnuje základnímu výzkumu mechanismu interakcí a enantio-rozlišovacích vlastností aplikačně nové skupině selektorů – cyklofruktanů. Zcela poprvé byla prokázána enantiosektivita nativního CF6 a CF7 v CE. Zároveň byly studovány i jejich isopropylkarbamát deriváty a získaná data byla porovnána s výsledky získanými při analýzách s nativním α -CD a β -CD za stejných separačních podmínek. V práci je popsán vliv běžně používaných modifikátorů separačního prostředí (MeOH, ACN a SDS) na rozlišení a migračních časech BNP atropisomerů ve fosfátovém a borátovém pracovním elektrolytu. MeOH měl pozitivní vliv, který se přičítá především prodloužení doby analýzy spojené s delším interakčním obdobím, na rozlišení zejména v borátovém pufru, kde je hodnota elektroosmotické mobility téměř řádově větší než ve fosfátovém pufru. Podobný efekt byl pozorován i pro SDS, avšak pouze v určitém koncentračním rozsahu. Na základě získaných výsledků lze konstatovat, že interakční mechanismus studovaných CF je založen na hydrofobních a vodíkových interakcích, a zároveň je zcela odlišný oproti CD, které tvoří charakteristické inkluzní komplexy.

Přehled použité literatury

- [1] Wren, S. A. C., Rowe, R. C., *J. Chromatogr. A* 1992, 603, 235-241.
- [2] Wren, S. A. C., Rowe, R. C., *J. Chromatogr. A* 1992, 609, 363-367.
- [3] Wren, S. A. C., Rowe, R. C., Payne, R. S., *Electrophoresis* 1994, 15, 774-778.
- [4] Rawjee, Y. Y., Staerk, D. U., Vigh, G., *J. Chromatogr. A* 1993, 652, 291-306.
- [5] Rawjee, Y. Y., Williams, R. L., Vigh, G., *J. Chromatogr. A* 1993, 652, 233-345.
- [6] Rawjee, Y. Y., Williams, R. L., Vigh, G., *J. Chromatogr. A* 1994, 680, 599-607.
- [7] Rawjee, Y. Y., Vigh, G., *J. Chromatogr. A* 1994, 688, 273-282.
- [8] Dalgliesh, C. E., *J. Chem. Soc.* 1952, 3940, 137-141.
- [9] Bentley, R., *Trans. N. Y. Acad. Sci.* 1983, 41, 5-24.
- [10] Topiol, S., *Chirality* 1989, 1, 69-79.
- [11] Davankov, V. A., *Chirality* 1997, 9, 99-102.
- [12] Lämmerhofer, M., *J. Chromatogr. A* 2010, 1217, 814-856.
- [13] Zhou, J., Ritter, H., *Polym. Chem.* 2010, 1, 1552-1550.
- [14] Escuder-Gilabert, L., Martín-Biosca, Y., Medina-Hernández, M. J., Sagrado, S., *J. Chromatogr. A* 2014, 1357, 2-23.
- [15] Lehnert, P., Příbylka, A., Maier, V., Znaleziiona, J., Ševčík, J., Douša, M., *J. Sep. Sci.* 2013, 36, 1561-1567.
- [16] Tsioupi, D. A., Stefan-Vanstaden, R. I., Kapnissi-Christodoulou, C. P., *Electrophoresis* 2013, 34, 178-204.
- [17] Lurie, I. S., Klein, R. F. X., Dal Cason, T. A., LeBelle, M. J., Brenneisen, R., Weinberger, R. E., *Anal. Chem.* 1994, 66, 4019-4026.
- [18] Lelièvre, F., Gareil, P., Bahaddi, Y., Galons, H., *Anal. Chem.* 1997, 69, 393-401.
- [19] Meyring, M., Mühlenbrock, C., Blaschke, G., *Electrophoresis* 2000, 21, 3270-3279.
- [20] Fillet, M., Bechet, I., Schomburg, G., Hubert, P., Crommen, J., *J. High Resol. Chromatogr.* 1996, 19, 669-673.
- [21] Beaufour, M., Morin, P., Ribet, J.-P., *J. Sep. Sci.* 2005, 28, 529-533.
- [22] Matthijs, N., Hemelryck, S. V., Maftouh, M., Massart, D. L., Vander Heyden, Y., *Anal. Chim. Acta* 2004, 525, 247-263.
- [23] Znaleziiona, J., Fejős, I., Ševčík, J., Douša, M., Béni, S., Maier, V., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2015, 105, 10-16.

- [24] Wei, S., Guo, H., Lin, J.-M., *J. Chromatogr. B* 2006, 832, 90-96.
- [25] Nhujak, T., Sastravaha, C., Palanuvej, C., Petsom, A., *Electrophoresis* 2005, 26, 3814-3823.
- [26] Abushoffa, A. M., Fillet, M., Servais, A.-C., Hubert, P., Crommen, J., *Electrophoresis* 2003, 24, 343-350.
- [27] Jakubetz, H., Juza, M., Schurig, V., *Electrophoresis* 1998, 19, 738-744.
- [28] Včeláková, K., Zusková, I., Gaš, B., *Electrophoresis* 2007, 28, 2145-2152.
- [29] Müllerová, L., Dubský, P., Gaš, B., *Electrophoresis* 2014, 35, 2688-2700.
- [30] Dubský, P., Svobodová, J., Gaš, B., *J. Chromatogr. B* 2008, 875, 30-34.
- [31] Müllerová, L., Dubský, P., Gaš, B., *J. Chromatogr. A* 2014, 1330, 82-88.
- [32] Vorce, S. P., Holler, J. M., Cawrse, B. M., Magluilo, J., *J. Anal. Toxicol.* 2011, 35, 183-187.
- [33] Fleming, H. L., Ranaivo, P. L., Simone, P. S., *Anal. Chem. Ins.* 2012, 7, 59-78.
- [34] Li, S. J., Chen, M., Li, C. Z., *Anal. Chem. Ins.* 2012, 7, 47-58.
- [35] Gee, P., Jackson, S., Easton, J., *N. Z. Med. J.* 2010, 123, 124-127.
- [36] Brown, J. A., Buckley, N. A., *Med. J. Aust.* 2013, 198, 414-415.
- [37] Forrester, M. B., *Hum. Exp. Toxicol.* 2013, 32, 18-23.
- [38] Smith, T. B., Staub, B. A., Natarajan, G. M., Lasorda, D. M., Poornima, I. G., *Tex. Heart I. J.* 2014, 41, 70-72.
- [39] https://wada-main-prod.s3.amazonaws.com/resources/files/WADA_Prohibited_List_2010_EN.pdf. [staženo v listopadu 2015]
- [40] Pawar, R. S., Tamta, H., Ma, J., Krynitsky, A. J., Grundel, E., Wamer, W. G., Rader, J. I., *Anal. Bioanal. Chem.* 2013, 405, 4373-4384.
- [41] Gauthier, T. D., *Anal. Chem. Ins.* 2013, 8, 29-40.
- [42] Ping, Z., Jun, Q., Qing, J., *J. Guizhou Inst. Techn.* 1996, 25, 82-85.
- [43] ElSohly, M. A., Gul, W., ElSohly, K. M., Murphy, T. P., Weerasooriya, A., Ghittiboyina, A. G., Avula, B., Khan, I., Eichner, A., Bowers, L. D., *J. Anal. Toxicol.* 2012, 36, 457-471.
- [44] Di Lorenzo, C., Moro, E., Dos Santos, E., Uberti, F., Restani, P., *Drug. Test Anal.* 2013, 5, 116-121.
- [45] Lisi, A., Hasick, N., Kazlauskas, R., Goebel, C., *Drug Test. Anal.* 2011, 3, 873-876.
- [46] Shellie, R. A., Marriott, P. J., *Analyst.* 2003, 128, 879-883.

- [47] Jalali-Heravi, M., Zekavat, B., Sereshti, H., *J. Chromatogr. A* 2006, *1114*, 154-163.
- [48] Austin, K. G., Travis, J., Pace, G., Lieberman, H. R., *Drug Test. Anal.* 2014, *6*, 797-804.
- [49] Lopez-Avila, V., Zorio, M., *For. Sci. Int.* 2013, *231*, 113-119.
- [50] Zhang, Y., Woods, R. M., Breitbach, Z. S., Armstrong, D. W., *Drug Test. Anal.* 2012, *4*, 986-990.
- [51] Wust, M., Reindl, J., Fuchs, S., Beck, T., Mosandl, A., *J. Agric. Food Chem.* 1999, *47*, 3145-3150.
- [52] Batista, J. M., Lopez, S. N., Mota, J. S., Vanzolini, K. L., Cass, Q. B., Rinaldo, D., Vilegas, W., Bolzani, V. S., Kato, M. J., Furlan, M., *Chirality* 2009, *21*, 799-801.
- [53] Foret, F., Fanali, S., Ossicini, L., Boček, P., *J. Chromatogr. A* 1989, *470*, 299-308.
- [54] Ma, Y. F., Zhang, R. L., *J. Chromatogr. A* 1992, *625*, 341-348.
- [55] Dabek-Zlotorzynska, E., Dlouhy, J. F., *J. Chromatogr. A* 1994, *671*, 389-395.
- [56] Shamsi, S. A., Danielson, N. D., *Anal. Chem.* 1994, *66*, 3757-3764.
- [57] Soga, T., Imaizumi, M., *Electrophoresis* 2001, *22*, 3418-3425.
- [58] Beck, W., Engelhardt, H., *Chromatographia* 1992, *33*, 313-316.
- [59] Xu, X., Kok, W. T., Kraak, J. C., Poppe, H., *J. Chromatogr. B* 1994, *661*, 35-45.
- [60] Johns, C., Macka, M., Haddad, P. R., *J. Chromatogr. A* 2003, *997*, 87-94.
- [61] Kuwahara, Y., Nagata, H., Nishi, H., Tanaka, Y., Kakehi K., *Chromatographia* 2005, *62*, 505-510.
- [62] Lecoœur-Lorin, M., Delépée, R., Morin, P., *Electrophoresis* 2009, *30*, 487-498.
- [63] Fenn, J. B., Mann, M., Meng, C. K., Wong, S. F., Whitehouse, C. M., *Science* 1989, *246*, 64-71.
- [64] Palzs, B., Suhal, S., *Mass Spectrom. Rev.* 2005, *24*, 508-548.
- [65] Dettmer, K., Aronov, P. A., Hammock, B. D., *Mass Spectrom. Rev.* 2007, *26*, 51-78.
- [66] Schmitt-Kopplin, P., Frommberger, M., *Electrophoresis* 2003, *24*, 3837-3867.
- [67] Křenková, J., Foret, F., *Proteomics* 2012, *12*, 2978-2990.
- [68] Von Brocke, A., Nicholson, G., Bayer, E., *Electrophoresis* 2001, *22*, 1251-1266.
- [69] Creamer, J. S., Oborny, N. J., Lunte, S. M., *Anal. Methods* 2014, *6*, 5427-5449.

- [70] Hommerson, P., Khan, A. M., de Jong, G. J., Somsen G. W., *Mass Spectrom. Rev.* 2011, 30, 1096-1120.
- [71] Chernushevich, I. V., Loboda, A. V., Thomson, B. A., *J. Mass Spect.* 2001, 36, 849-865.
- [72] March, R. E., *Mass Spect. Rev.* 2009, 28, 961-989.
- [73] <http://www.reliance.co.uk/en/news/66/quadrupole+mass+filters>.
[staženo v listopadu 2015]
- [74] <https://masonaco/Home/mass-spectrometry/mass-analyzers>.
[staženo v listopadu 2015]
- [75] Lange, V., Picotti, P., Domon, B., Aebersold, R., *Mol. Syst. Biol.* 2008, 4, 222-235.
- [76] Shi, M., Gao, Q., Feng, J., Lu, Y., *J. Chromatogr. Sci.* 2012, 50, 547-552.
- [77] Foret, F., *Electrophoresis* 2009, 30, 34-39.
- [78] Verleysen, K., Sandra, P., *J. High Resol. Chromatogr.* 1999, 22, 33-38.
- [79] ICH Harmonized Tripartite Guideline: Validation of Analytical Procedures, Q2(R1), Step 4 version, November 2005.
- [80] Maier, V., Petr, J., Knob, R., Horáková, J., Ševčík, J., *Electrophoresis* 2007, 28, 1815-1822.
- [81] Příbylka, A., Švidrnoch, M., Ševčík, J., Maier, V., *Electrophoresis* 2015, 36, 2866-2873.
- [82] Scriba, G. K. E., *Chromatographia* 2012, 75, 815-838.
- [83] Sun, P., Wang, Ch., Breitbach, Z. S., Zhang, Y., Armstrong, D. W., *Anal. Chem.* 2009, 81, 10215-10226.
- [84] Kawamura, M., Uchiyama, T., Kuramoto, T., Tamura, Y., Mizutani, K., *Carbohydr. Res.* 1989, 192, 83-90.
- [85] Sawada, M., Tanaka, T., Takai, Y., Hanafusa, T., *Carbohydr. Res.* 1991, 217, 7-17.
- [86] Kushibe, S., Sashida, R., Morimoto, Y., *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 1994, 58, 1136-1138.
- [87] Kim, H.-Y., Choi, Y.-J., *Appl. Environ. Microbiol.* 2001, 67, 995-1000.
- [88] Immel, S., Schmitt, G. E., Lichtenthaler, F. W., *Carbohydr. Res.* 1998, 313, 91-105.
- [89] Wang, C., Sun, P., Armstrong, D. W., *Chiral Recognition in Separation Methods*, 2010, 77-96.

- [90] Uchiyama, T., Kawamura, M., Uragami, T., Okuno, H., *Carbohydr. Res.* 1993, 241, 245-248.
- [91] Reijenga, J. C., Verheggen, T. P. E. M., Chiari, M., *J. Chromatogr. A* 1999, 838, 111-119.
- [92] Wang, Ch., Yang, S. H., Wang, J., Kroll, P., Schug, K. A., Armstrong, D. W., *Int. J. Mass Spec.* 2010, 291, 118-124.
- [93] Wang, L., Chai, Y., Sun, C., Armstrong, D. W., *Int. J. Mass Spec.* 2012, 323, 21-27.
- [94] Cacciapaglia, R., Mandolins, L., *Chem. Soc. Rev.* 1993, 22, 221-231.
- [95] Hapiot, F., Tilloy, S., Monflier, E., *Chem. Rev.* 2006, 106, 767-781.
- [96] Tang, W., Ng, S.-Ch., Sun, D., *Modified Cyclodextrins for Chiral Separation* 2013, Springer.
- [97] Ogoshi, T., Harada, A., *Sensors* 2008, 8, 4961-4982.
- [98] Szejtli, J., *Chem. Rev.* 1998, 98, 1743-1754.
- [99] Sawada, M., Takai, Y., Shizuma, M., Takeda, T., Adachi, H., Uchiyama, T., *Chem. Commun.* 1998, 14, 1453-1454.
- [100] Zhang, Y., Breitbach, Z. S., Wang, C., Armstrong, D. W., *Analyst* 2010, 135, 1076-1083.
- [101] Zhang, Y., Armstrong, D. W., *Analyst* 2011, 136, 2931-2940.
- [102] Li, F., Hsieh, Y., *J. Sep. Sci.* 2008, 31, 1231-1237.
- [103] Lesellier, E., *J. Chromatogr. A* 2009, 1216, 1881-1890.
- [104] Vozka, J., Kalíková, K., Roussel, Ch., Armstrong, D. W., Tesařová, E., *J. Sep. Sci.* 2013, 36, 1711-1719.
- [105] Wang, Ch., Zhang, Y., *J. Chromatogr. A* 2013, 1281, 127-134.
- [106] Hamman, Ch., Wong, M., Aliagas, I., Ortwine, D. F., Pease, J., Schmidt, D. E., Victorino, J., *J. Chromatogr. A* 2013, 1305, 310-319.
- [107] Armstrong, D. W., Woods, R. M., Breitbach, Z. S., *LC-GC Europe* 2015, 28.
- [108] Qui, H., Loukotková, L., Sun, P., Tesařová, E., Bosáková, Z., Armstrong, D. W., *J. Chromatogr. A* 2011, 1218, 270-279.
- [109] Smuts, J. P., Hao, X.-Q., Han, Z., Parpia, C., Krische, M. J., Armstrong, D. W., *Anal. Chem.* 2014, 86, 1282-1290.
- [110] Dolzan, M. D., Spudeit, D. A., Breitbach, Z. S., Barber, W. E., Micke G. A., Armstrong, D. W., *J. Chromatogr. A* 2014, 1365, 124-130.
- [111] Sun, P., Armstrong, D. W., *J. Chromatogr. A* 2010, 1217, 4904-4918.

- [112] Sun, P., Wang, Ch., Padivitage, N. L. T., Nanayakkara, Y. S., Perera, S., Qiu, H., Zhang, Y., Armstrong, D. W., *Analyst* 2011, *136*, 787-800.
- [113] Aranyi, A., Ilisz, I., Pataj, Z., Szatmári, I., Fülöp, F., Armstrong, D. W., Antal, P., *Chirality* 2011, *23*, 549-556.
- [114] Janečková, L., Kalíková, K., Vozka, J., Armstrong, D. W., Bosáková, Z., Tesařová, E., *J. Sep. Sci.* 2011, *34*, 2639-2644.
- [115] Kalíková, K., Janečková, L., Armstrong, D. W., Tesařová, E., *J. Chromatogr. A* 2011, *1218*, 1393-1398.
- [116] Padivitage, N. L. T., Armstrong, D. W., *J. Sep. Sci.* 2011, *34*, 1636-1647.
- [117] Aranyi, A., Bagi, Á., Ilisz, I., Pataj, Z., Fülöp, F., Armstrong, D. W., Antal, P., *J. Sep. Sci.* 2012, *35*, 617-624.
- [118] Vozka, J., Kalíková, K., Janečková, L., Armstrong, D. W., Tesařová, E., *Analyt. Lett.* 2012, *45*, 2344-2358.
- [119] Kozlík, P., Šimová, V., Kalíková, K., Bosáková, Z., Armstrong, D. W., Tesařová, E., *J. Chromatogr. A* 2012, *1257*, 58-65.
- [120] Perera, S., Na, Y.-Ch., Doundoulakis, T., Ngo, V. J., Feng, Q., Breitbach, Z. S., Lovely, C. J., Armstrong, D. W., *Chirality* 2013, *25*, 133-140.
- [121] Gondová, T., Petrovaj, J., Kutschy, P., Armstrong, D. W., *J. Chromatogr. A* 2013, *1272*, 100-105.
- [122] Padivitage, N. L. T., Dodbiba, E., Breitbach, Z. S., Armstrong, D. W., *Drug Test. Anal.* 2014, *6*, 542-551.
- [123] Padivitage, N. L. T., Dissanayake, M. K., Armstrong, D. W., *Anal. Bioanal. Chem.* 2013, *405*, 8837-8848.
- [124] Weatherly, C. A., Na, Y.-Ch., Nanayakkara, Y. S., Woods, R. M., Sharma, A., Lacour, J., Armstrong, D. W., *J. Chromatogr. A* 2014, *955*, 72-80.
- [125] Woods, R. M., Patel, D. C., Lim, Y., Breitbach, Z. S., Gao, H., Keene, C., Li, G., Kürti, L., Armstrong, D. W., *J. Chromatogr. A* 2014, *1357*, 172-181.
- [126] Maier, V., Kalíková, K., Příbylka, A., Vozka, J., Smuts, J. P., Švidrnoch, M., Ševčík, J., Armstrong, D. W., Tesařová, E., *J. Chromatogr. A* 2014, *1338*, 197-200.
- [127] Spudeit, D. A., Dolzan, M. D., Breitbach, Z. S., Barber, W. E., Micke, G. A., Armstrong, D. W., *J. Chromatogr. A* 2014, *1363*, 89-95.
- [128] Shu, Y., Breitbach, Z. S., Dissanayake, M. K., Perera, S., Aslan, J. M., Alatrash, N., McDonnell, F. M., Armstrong, D. W., *Chirality* 2015, *27*, 64-70.

- [129] Jiang, Ch., Tong, M.-Y., Breitbach, Z. S., Armstrong, D. W., *Electrophoresis* 2009, 30, 3897-3909.
- [130] Zhang, Y. J., Huang, M. X., Zhang, Y. P., Armstrong, D. W., Breitbach, Z. S., Ryoo, J. J., *Chirality* 2013, 25, 735-742.
- [131] Fakayode, S. O., Lowry, M., Fletcher, K. A., Huang, X. D., Powe, A. M., Warner, I. M., *Curr. Anal. Chem.* 2007, 3, 171-181.
- [132] Fanali, S., *J. Chromatogr. A* 1997, 792, 227-267.
- [133] Porras, S. P., Sarmini, K., Fanali, S., Kenndler, E., *Anal. Chem.* 2003, 75, 1645-1651.
- [134] Fusanaki, N., Yado, H., Hada, S., Neya, S., *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 1992, 65, 1323-1330.
- [135] Valente, A. J. M., Söderman, O., *Adv. Colloid Interface Sci.* 2014, 205, 156-176.
- [136] Mukerjee, P., Mysels, K. J., *Critical Micelle Concentration of Aqueous Surfactant Systems*, NSRDS 36, US. Government Printing Office, Washington, D.C.
- [137] Příbylka, A., Švidrnoch, M., Tesařová, E., Armstrong, D. W., Maier, V., *J. Sep. Sci.* 2016, 39, 973-979.