

# **UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**

**Fakulta přírodovědecká**

**Katedra analytické chemie**

**Separace cisplatiny a transplatiny kapilární  
elektroforézou**

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

Autor práce:

Bc. Kateřina Holušová

Studijní obor:

Analytická chemie

Vedoucí práce:

doc. RNDr. Jan Petr, Ph.D.

**OLOMOUC 2019**

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou v seznamu použité literatury.

Souhlasím s tím, že práce je prezenčně zpřístupněna v knihovně Katedry analytické chemie, Přírodovědecké Fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne 30. 3. 2019

.....

Vlastnoruční podpis

## **Poděkování**

Na tomto místě bych ráda poděkovala panu doc. RNDr. Janu Petrovi, Ph.D. za odborné vedení mé diplomové práce, cenné rady, obětavost a čas, který mi během její celé tvorby a při dokončování práce věnoval.

Poděkování patří také mým rodičům za možnost studovat, jejich velkou podporu a pomoc v průběhu celého studia.

## Souhrn

Předkládaná diplomová práce má za cíl provést separaci cisplatinu a transplatinu kapilární elektroforézou, aby bylo možné další využití této metody ve forenzním zkoumání preparátu cisplatinu.

Teoretická část práce řeší teorii a aplikace kapilární elektroforézy a izomery cisplatinu a transplatinu. V první části je popsána kapilární elektroforéza, jako nástroj použitelný pro separaci protinádorových léčiv. Zabývá se instrumentací zařízení, ale také mechanismem samotné separace a možnostmi, jak látky detekovat a následně získané informace vyhodnotit. Řeší možnost spojení kapilární elektroforézy s hmotnostní spektrometrií. Druhá část je zaměřena na samotné látky cisplatinu a transplatinu. Cisplatina je nejrozšířenější a vůbec nejúčinnější cytostatikum, které může být použito k léčbě nejzávažnějších onkologických onemocnění.

Experimentální část se zabývá chováním cisplatinu a transplatinu v několika prostředích základních elektrolytů a hledá optimální podmínky, za kterých je možné látky rozseparovat. Je diskutován typ pracovního elektrolytu, jeho pH, koncentrace a přidávaná aditiva. V neposlední řadě je posuzována možnost provést experimenty v pokryté kapiláře.

## Summary

The aim of diploma thesis is to perform separation of cisplatin and transplatin by capillary electrophoresis for another next utilizing this method in forensic examination of cisplatin preparation.

The theoretical part deals with the theory and application of capillary electrophoresis and isomers of cisplatin and transplatin. The first part is devoted to the description of capillary electrophoresis as utility usable for separation of anticancer drugs. It is also describing interaction of cytostatics and their determination by capillary electrophoresis. The possibility of connection of capillary electrophoresis and mass spectrometry is also discussed.

The second part is focusing on cisplatin and transplatin as a substances. Cisplatin is a frequently used and very effective chemotherapeutic drug for treatment of cancer.

The experimental part describes the behaviour of cisplatin and transplatin in several electrolytes and finding the most optimal conditions for their separation. The background electrolytes, its pH, concentration and possible additives is also discussed. Last but not least it is studying the influence of the covered capillaries.

# Obsah

Obsah.....	6
1 ÚVOD .....	1
2 CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE.....	2
3 TEORETICKÁ ČÁST.....	3
3.1 Kapilární elektroforéza .....	3
3.1.1 Princip metody .....	4
3.1.1.1 Elektroforetická pohyblivost.....	4
3.1.1.2 EOF.....	5
3.1.2 Instrumentace CE .....	9
3.2 Pracovní podmínky.....	10
3.2.1.1 Separační napětí.....	10
3.2.1.2 Kapiláry.....	10
3.2.1.3 Dávkování .....	11
3.2.2 Separační módy .....	12
3.2.2.1 Kapilární zónová elektroforéza (CZE).....	12
3.2.2.2 Micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC).....	14
3.3 Detektory .....	16
3.3.1 Spektrofotometrické UV/Vis detektory .....	17
3.3.1.1 Dělení UV/VIS detektorů .....	17
3.3.1.2 Princip UV/VIS detektorů.....	17
3.3.1.3 Nepřímá absorpční detekce.....	19
3.3.1.4 Zlepšení citlivosti.....	19
3.3.2 Elektrochemické detektory.....	20
3.3.2.1 Amperometrické detektory .....	21
3.3.2.2 Vodivostní detektory.....	21
3.4 Spojení CZE – MS.....	21
3.4.1 CZE – MS s ionizací elektrosprejem.....	22
3.5 Cisplatina.....	25
3.5.1 Historie cisplatiny .....	27
3.5.2 Transplatina.....	27
3.5.3 Detekce a stanovení cisplatiny a transplatiny .....	27
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	29

4.1	Materiál.....	29
4.1.1	Chemikálie .....	29
4.1.2	Vzorky .....	29
4.2	Příprava elektrolytů .....	29
4.3	Instrumentace a experimentální podmínky.....	30
5	VÝSLEDKY A DISKUZE .....	31
5.1	Optimalizace základního elektrolytu .....	31
5.1.1	Vliv základního elektrolytu – fosfát.....	33
5.1.2	Vliv základního elektrolytu – HEPES.....	36
5.1.3	Vliv základního elektrolytu typu MES.....	38
5.1.4	Vliv borátového základního elektrolytu .....	39
5.1.5	ESI – QQQ – MS .....	41
5.1.6	Vliv DNA na separaci cisplatinu a transplatinu .....	43
5.2	Diskontinuální dávkování.....	45
6	ZÁVĚR.....	47
7	POUŽITÁ LITERATURA.....	48
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....	52

## BIBLIOGRAFICKÉ ÚDAJE

Jméno a příjmení	Kateřina Holušová
Název práce	Separace cisplatin a transplatin kapilární elektroforézou
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Katedra analytické chemie
Vedoucí práce	doc. RNDr. Jan Petr, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2019
Abstrakt	Diplomová práce se zabývá separací cisplatin a transplatin pomocí kapilární elektroforézy. Byl studován vliv základního elektrolytu, jeho pH, koncentrace a přidávaná aditiva. Cisplatina a transplatina jsou látky důležité pro onkologickou léčbu.
Klíčová slova	cisplatina, transplatina, DNA, kapilární elektroforéza, hmotnostní spektrometrie
Počet stran	62
Počet příloh	0
Jazyk	český



## **BIBLIOGRAPHICAL IDENTIFICATION**

First name and surname	Kateřina Holuřov
Title	Separation of cisplatin and transplatin by capillary electrophoresis
Type of thesis	Master
Department	Department of Analytical Chemistry
Supervisor	doc. RNDr. Jan Petr, Ph.D.
The year of presentation	2019
Abstract	This diploma thesis is concerning with the separation of cisplatin and transplatin by the capillary electrophoresis. The experimental part finding the most optimal conditions of separation. It's discussed the influence of the background electrolytes, concentration, pH and possible additives. Cisplatin and transplatin are important for cancer treatment.
Keywords	cisplatin, transplatin, DNA, capillary electrophoresis, mass spectrometry
Number of pages	62
Number of appendices	0
Language	czech

# 1 ÚVOD

První objevy rakovinných buněk sahají 1,7 milionů na zpět do Jihoafrické republiky. U předchůdce člověka byl objeven osteosarkomální nádor. [1] Rakovina a vysoká úmrtnost s ní spojená zde byla vždy. [2]

Blahobyt a doba plná stresu má ve stále větší míře negativní dopad na lidské zdraví. Celosvětově rok od roku přibývá množství diagnostikovaných rakoviny. Velkou roli hraje genetika. Přímá souvislost mezi vznikem karcinomu a stylem života je více než značná. Výzkumy potvrzují, že rozvojové země jsou na rozdíl od vyspělých zemí zasaženy onkologickými onemocněními méně. Každoročně onemocní v České republice okolo 96 tisíc lidí zhoubným nádorem. O něco více jsou postiženi muži než ženy. Dle posledních dat z roku 2016, zemřelo na novotvary 27 261 lidí. [3]

Stále roste počet hlášených případů rakoviny tlustého střeva a konečníku. Česká republika naneštěstí patří k jednému ze států s nejvyšším výskytem tohoto onemocnění a poměrně velkou úmrtností. A na vině je právě způsob života, typ konzumovaných jídel a množství alkoholu. Kouření má až fatální dopad na vznik rakoviny plic. Nejvíce smutné a zarážející je, že rakovina se nevyhýbá ani malým dětem. [3]

Nicméně doba se žene kupředu mílovými kroky. Rapidně se zlepšuje diagnostika onemocnění, vyvíjí se stále nové léky a nové způsoby léčby, ať už chemické či alternativní přírodní. Doposud nejúčinnějším a nejrozšířenějším cytostatikem je cisplatina.

Analytická chemie je vědní obor, který jde ruku v ruce s farmaceutickým výzkumem i forenzní vědou. Instrumentální metody jsou nenahraditelné. K analýze cytostatik je využívána především hmotnostní spektrometrie. Do popředí se ale dostává stále více metoda kapilární elektroforézy, jakožto relativně levný nástroj vyznačující se minimální spotřebou vzorku elektrolytů.

## **2 CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE**

Cílem diplomové práce bylo vyvinout metodu pro separaci cisplatiny a transplatiny za pomoci kapilární elektroforézy. Bylo nutné nalézt optimální podmínky pro separaci, jako vhodný typ základního elektrolytu, jeho pH, koncentraci a případně přídavek různých aditiv.

## 3 TEORETICKÁ ČÁST

### 3.1 Kapilární elektroforéza

Vysokoučinná kapilární elektroforéza (High – Performance Capillary Electrophoresis, CE) je považována za jednu z nejcitlivějších (femtomol - zeptomol analytu v nano- až pikolitrových objemech) a neúčinnějších (stovky až miliony teoretických pater) separačních metod umožňující kvalitativní i kvantitativní analýzu. [4]

Podstatou elektromigračních metod je separace nabitých látek na základě rozdílné pohyblivosti iontů ve stejnosměrném elektrickém poli. [4]

Počátky CE sahají do roku 1937 a jsou spojeny se jménem Tiselius. Tiseliovy pokusy spočívaly v umístění směsi proteinů do zkumavky s pufrů a následně na ně bylo aplikováno elektrické pole. Díky svým nábojům se daly analyty do pohybu ve směru pole. Za svou práci získal Nobelovu cenu za chemii. Byly položeny základy separace ve volném roztoku a využívány polyakrylamidové a agarosové gely. V roce 1967 provedl Hjerten první pokusy v úzké trubici (první kapiláry o vnitřním průměru 1 mm). Průměr kapilár snížili Virtanen a Mikkers na 200  $\mu\text{m}$ . O třináct let později, Američané Jorgenson a Lukas poprvé použili křemenné kapiláry s vnitřním průměrem 75  $\mu\text{m}$ , potvrdili vysokou účinnost CE a položili základy CZE. Upřednostnění kapilár před gely (deskami) výrazně zlepšilo výkon metody a umožnilo separovat nejen makromolekuly, ale i malé kationty a anionty. O možnost separace neutrálních látek se zasloužil Japonec S. Terabe (1984), který položil základy MEKC. První komerční přístroje se objevily na trhu roku 1988. [4, 5]

Elektromigrační metody v kapilárním uspořádání zahrnují metody jako nejpoužívanější kapilární zónovou elektroforézu (CZE), izotachofózu (CITP) využívající dvou pufrů, izoelektrická fokusace (CIEF) pro separaci amfolytů dle izoelektrického bodu, kapilární gelová elektroforéza (CGE) pro separaci biomakromolekul na základě molekulové hmotnosti, micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC), jež využívá tvorbu nabitých micel a umožní tak separaci i neutrálních molekul. A v neposlední řadě kapilární elektrochromatografie (CEC) využívající spojení stacionární fáze jako u HPLC a CZE. [4, 5, 6, 7]

### 3.1.1 Princip metody

Kapilární elektromigrační separační metoda je založená na separaci nabitých látek ve stejnosměrném elektrickém poli na základě rozdílné elektroforetické pohyblivosti. Separace se provádí v úzkých kapilárách naplněných základním elektrolytem (pufrem, BGE). [4,5,7]

#### 3.1.1.1 Elektroforetická pohyblivost

Elektromigrační metody využívají dva základní mechanismy pohybu. Prvním z nich je elektroforetická pohyblivost neboli mobilita ( $\mu_e$ ). Vyjadřuje pohyb nabitých částic ve stejnosměrném elektrickém poli. Pole je charakterizováno jednotkovou intenzitou  $E$ . Rychlost, kterou se nabitě částice pohybují k elektrodě s opačným nábojem je označována jako elektroforetická rychlost  $v_{ep}$  [5]:

$$v_{ep} = \mu_e \cdot E \quad (m \cdot s^{-1}). \quad (1)$$

Elektrické pole vzniká po aplikaci elektrického napětí mezi konce kapilár. Intenzitu potom počítáme jako podíl vkládaného napětí  $U$  a délky kapiláry  $L$  [5]:

$$E = U / L \quad (2)$$

V základním elektrolytu působí na ionty dvě protichůdné síly. Částice o náboji  $q$  uvádí do pohybu síla elektrického pole  $F_{el}$  [4]:

$$F_{el} = q \cdot E \quad (3)$$

A naopak, částice s poloměrem  $r$  brzdí frikční síla  $F_{fr}$ , která je dána Stokesovým zákonem a podle něj je funkcí velikosti a tvaru molekul a viskozity daného prostředí  $\eta$  [8]:

$$F_{fr} = -6\pi\eta r v_{ep} \quad (4)$$

V okamžiku, kdy se síly vyrovnají a nastává ustálený stav [4]:

$$F_{el} = F_{fr} \quad (5)$$

můžeme elektroforetickou mobilitu definovat následujícím vztahem [4]:

$$\mu_e = q/6\pi\eta r \quad (6)$$

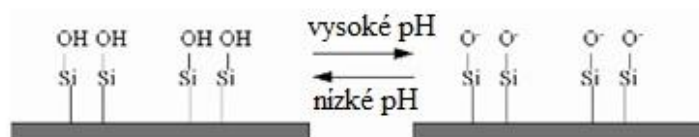
Následně můžeme z uvedených vztahů usoudit, že elektroforetická pohyblivost je přímo úměrná náboji iontu  $q$  a nepřímo úměrná jeho poloměru  $r$  a viskozitě prostředí  $\eta$ . [4] Malé a vysoce nabitě částice vykazují vysoké hodnoty pohyblivosti, naopak velké ionty s malým nábojem se pohybují nízkou pohyblivostí. [6]

Rozlišujeme dva typy elektroforetických pohyblivostí: absolutní (limitní) a efektivní (aktuální). Na limitní pohyblivost se díváme jako na fyzikální konstantu určenou při úplné disociace analytu. Její hodnota je extrapolována na nekonečné zředění. Naopak efektivní pohyblivost je zjišťována experimentálně a závisí na složení základního elektrolytu, pH a disociační konstantě látky. V praxi to znamená, že máme-li dvě látky, které jsou podle tabelovaných hodnot nerozdělitelné, volbou vhodného pufru a jeho pH je lze rozseparovat. Zejména díky různým pak konstantám. [4,5,6]

### 3.1.1.2 EOF

Druhým jevem přispívajícím k pohybu částic v kapiláře je elektroosmotický tok, projevující se jako tok kapaliny uvnitř separační kapiláry a vznikající až po aplikaci stejnosměrného elektrického pole. Na rozhraní stěny kapiláry a roztoku se nachází elektrická dvojvrstva. Její vznik je podmíněn disociací ionizovatelných skupin nebo adsorpcí iontů (např. u neiontových materiálů jako je teflon) na povrchu kapiláry. [4,5,8]

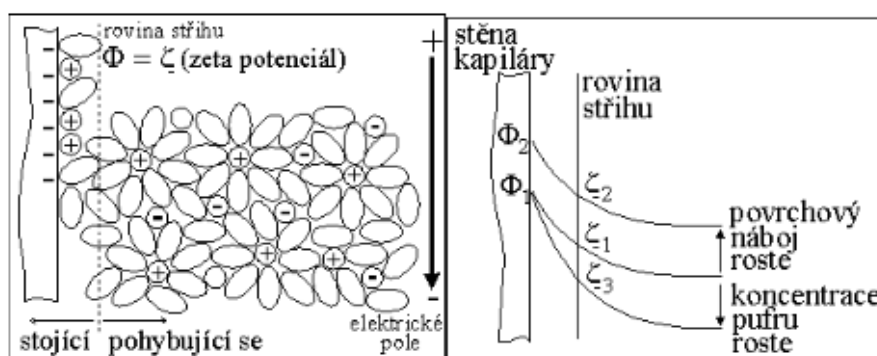
Pokud je používána křemenná kapilára a vodný pufr dochází nejdříve k disociaci silanolových skupin. Díky této disociaci jsou produkovány negativní křemičitanové skupiny, jak znázorňuje následující obrázek. Tato vrstva je označována jako vnitřní imobilizovaná vrstva a nese negativní náboj. [4,5,8]



Obr. 1 Disociace silanolových skupin na povrchu křemenných kapilár. Převzato a upraveno z [8]

Pozitivně nabité ionty (tzv. protiionty) tvoří druhou, difuzní část elektrické dvojvrstvy, směrem do roztoku. Tato vrstva kompenzuje negativní náboj stěny, aby byla dodržena podmínka elektroneutrálnosti. [8]

Rozložení vrstev je podmínkou pro vznik potenciálového rozdílu v blízkosti stěny kapiláry a elektrokinetického (zeta) potenciálu v roztoku. Po aplikaci napětí se difuzní vrstva, tvořená kationty spolu se svými solvatačními obaly vody dá do pohybu směrem k záporně nabitě katodě. Tento pohyb sebou strhává i zbývající rozpuštěné částice. Vytvořil se elektroosmotický tok. [5,6,8]



Obr.2 Rozložení vrstev v kapiláře a vznik zeta potenciálu. Převzato z [8]

Disociace silanolových skupin řídí zeta potenciál, a proto je EOF závislý na pH základního elektrolytu. Síla EOF je tedy závislá na konkrétních podmínkách prostředí. Významnější vliv má elektroosmotický tok až nad pH 4. Do této hodnoty je disociace malá a EOF má malou, až nulovou sílu. Nad hodnotami pH 9 jsou prakticky již všechny skupiny disociovány a EOF má velkou sílu. Mezi hodnotami pH 2 – 12 se však může lišit o více než jeden řád. [6,8]

Migrační rychlost analytů, účinnost separace i doba analýzy podléhají vlivu elektroosmotického toku. Pro výpočet toku platí následující vztah (7), který říká, že rychlost EOF  $v_{eof}$  je přímo úměrná intenzitě  $E$  a elektroosmotické mobilitě  $\mu_{eof}$ .

$$v_{eof} = \mu_{eof} \cdot E \quad (m \cdot s^{-1}) \quad (7)$$

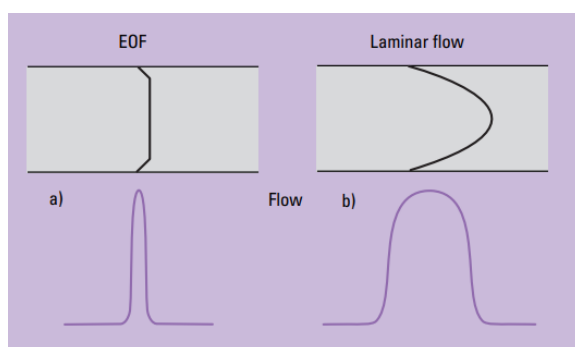
Elektroosmotický tok ( $\mu_{eof}$ ) je závislý jednak na povrchovém náboji kapiláry, na permitivitě roztoku  $\epsilon$  a také na poloměru kapiláry  $r$  a viskozitě prostředí  $\eta$ :

$$\mu(eo) = \epsilon \zeta / \eta r \quad (8)$$

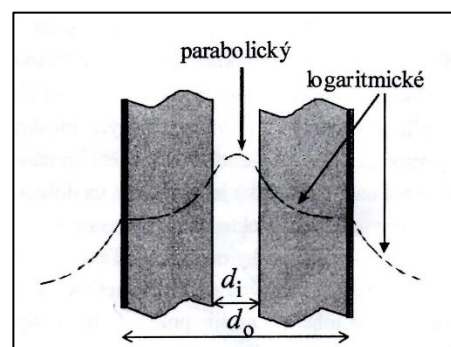
$\zeta$  – elektrokinetický potenciál [8]

Díky existenci EOF je možné v jediné analýze detekovat kationty a anionty za podmínek, že velikost EOF je vyšší než mobilita aniontů (např.  $\text{pH} > 7$ ). [8]

Předností EOF je plochý profil proudění kapaliny v celém průřezu kapilár (obr.3). Hnací síla proudu je v kapalině rovnoměrně rozložena po stěnách kapiláry, což způsobuje, že nedochází ke kolísání tlaku a disperzi zón rozpuštěných analytů, a to vede k úzkým píkům (např. ve srovnání s HPLC). V porovnávání separační účinnosti CE a HPLC má CE lepší výsledky. Elektrický výkon (procházející proud a vložené napětí) se mění na Joulovo teplo. Čím větší průměr kapiláry a vodivější elektrolyt použijeme, tím více tepla vzniká. Zvýšená teplota separačního elektrolytu pak deformuje profil píku. Jak vystihuje následující obrázek 4, v elektrolytu vzniká parabolický profil proudění. Teplo je následně odváděno stěnami kapiláry. [5,6]



Obr. 3 Znáznornění (a) plochého a (b) laminárního toku a zobrazení píků. [6]



Obr. 4 Znáznornění parabolického a logaritmického profilu proudění. [5]

Elektroosmotický tok je v analýzách ku prospěchu, ale musí být regulován a občas bývá problematické najít správné podmínky, za kterých bude mít právě pozitivní vliv.

Jak je již výše zmíněno, elektroosmotický tok má přímý vztah s daným elektrickým polem, separačním elektrolytem, teplotou analýzy, použitými organickými modifikátory či povrchově aktivními látkami. První volbou přídatných látek jsou povrchově aktivní látky, především SDS. Vlastnosti těchto látek jsou dále rozebrány v kapitole MEKC. [6]

Podstatné pro správný EOF je i vhodně zvolený pufr. Měl by mít následující vlastnosti – nízkou absorpenci při použité vlnové délce detekce, dobrou pufrovací kapacitu ve

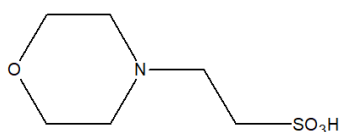


zvolené oblasti pH a nízkou mobilitu pro snížení generování elektrického proudu. Pufry by měly udržovat konstantní hodnotu pH. [6]

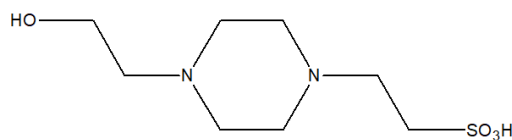
Tab.1 Příklady nejčastěji využívaných pufří. [6]

Pufř	Hodnota pK <sub>A</sub>
Fosfát	2,12 pK <sub>A1</sub> ; 7,21 pK <sub>A2</sub> ; 12,32 pK <sub>A3</sub>
Borát	9,24
Citrát	3,06 pK <sub>A1</sub> ; 4,74 pK <sub>A2</sub> ; 5,40 pK <sub>A2</sub>
Acetát	4,75
HEPES	7,55 pK <sub>A1</sub> ; 8,00 pK <sub>A2</sub>
MES	6,15

V tabulce uvedený MES neboli kyselina 2-(N-morfolino)-ethansulfonová (dle IUPAC) a HEPES ( 2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethansulfonová kyselina) jsou biologickými pufry.



Obr. 5 MES, 2-(morpholin-4-yl)ethanesulfonic acid



Obr. 6 HEPES, 2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethanesulfonic acid

Tab. 2 Přísady do pufrů CE pro ovlivnění mechanismu dělení [6]

Přísada	Příklad	Použití
Povrchově aktivní látky (kationtové, aniontové, neutrální)	SDS, CTAB, TWEEN	Aniontové PAL zvyšují EOF; kationtové PAL snižují nebo mění směr EOFu; vliv na selektivitu
Organické modifikátory	Methanol, TFA, acetonitril	Mění zeta potenciál, viskozitu a má vliv na selektivitu
Chirální selektory	Cyklodextriny, crown-ethery	Vznik komplexů a usnadnění separace

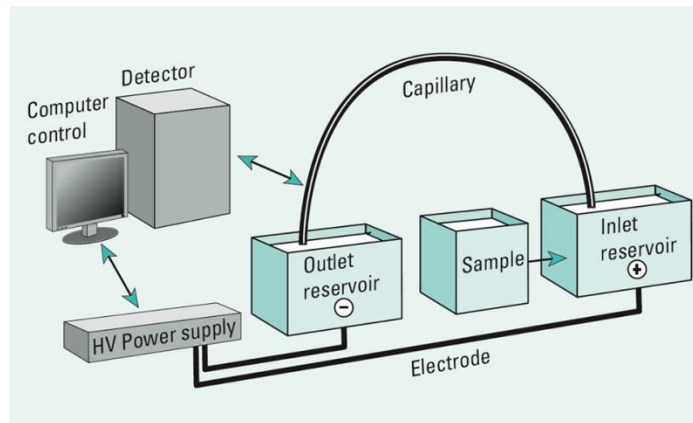
Povrchy kapilár se různě modifikují. Jejím pokrytím, ať už chemicky (přísadou do pufru) či kovalentně vázanými skupinami ovlivníme povrchový náboj na kapiláře, a ten má dopad na EOF. [6] Vnitřní povrch kapiláry je možno modifikovat dynamicky, např. chemickou vazbou povrchově aktivní látky (CTAB, TWEEN) ze základního elektrolytu. Nebo využít kovalentního pokrytí polymery (polyakrylamid, polyvinylalkohol, polyethylenglykol). [6, 8]

Vazba Si-O-Si-R, R= polyakrylamid umožňuje analýzy v rozmezí pH 4 – 7. Jsou – li tyto kapiláry připravovány s Grignardovou vazbou Si-C polyakrylamidu umožňuje použití kapilár v oblasti pH 2 – 10 a eliminuje případné další organické silylace. PVA umožňuje pracovat v oblasti pH 3 – 8. [6]

Pro MEKC je důležitá koncentrace kationtových tenzidů v elektrolytu. Je – li totiž jejich koncentrace vyšší než CMC, dojde k potlačení EOF. [6, 10, 11]

### 3.1.2 Instrumentace CE

Zařízení CE má poměrně jednoduchou konstrukci, schéma vystihuje následující obrázek. (Obr. 7) Mezi základní části patří zdroj vysokého napětí, vstupní a výstupní nádoby s základním elektrolytem a v nich ponořené 2 elektrody, na které je přiváděno napětí. Nádobka se vzorkem, separační kapilára, detektor a vyhodnocovací zařízení.



Obr. 7: Schéma kapilární elektroforézy. [6]

Záznam z detektoru je nazýván jako elektroforegram a jedná se o závislost signálu detektoru (nejčastěji absorbance) na čase. [12]

## 3.2 Pracovní podmínky

### 3.2.1.1 Separační napětí

Na elektrody v elektrolytu je přiváděno napětí, a to nejčastěji v rozmezí 5-30 kV. Volí se tak, aby produkovalo proud v rozsahu 10-100  $\mu\text{A}$ . Vyšší proudy generují velké množství Joulova tepla a následně způsobí rozmytí zón, ztrátu rozlišení a neopakovatelnost analýz. [8]

Další vlastností, kterou by měl napájecí zdroj mít, je schopnost přepínat polaritu elektrického pole. [6] Protože migrace molekul probíhá od anody ke katodě (jak běží EOF). Ale existují případy, kdy dochází k obrácení směru migrace. V takových případech dochází k obrácení polarity a dávkování nastane u záporné elektrody. [10, 12]

### 3.2.1.2 Kapiláry

V CE jsou používány kapiláry se sendvičovým uspořádáním vrstev taveného křemene a polyimidu k pokrytí. Délka se pohybuje okolo 30-100 cm, nejčastěji 48 cm [5] a vnitřním průměrem 50-75  $\mu\text{m}$ . [8] Miniaturizovaný vnitřní objem kapilár, a tedy prostor pro separaci zvyšuje citlivost metody. [4] Kapilára by neměla být příliš dlouhá. Ideálně tak dlouhá, aby

mohly být použity vysoká elektrická pole, a zároveň aby analýza běžela co nejkratší dobu. [6]

Ačkoli je používaný materiál pružný, je i poměrně křehký. Mechanickou odolnost kapilár zvyšuje právě vrstvička polymeru. Aby procházelo záření musí být v polyimidu vypálena nebo vyškrábána žiletkou (pro pokryté kapiláry) jeho část a tím vytvořeno tzv. detekční okénko, kudy proniká záření. K vypálení se využívá elektrického oblouku, žhaveného drátu. Je nezbytné, aby se materiál kapilár vyznačoval chemickou a elektrickou inertností, aby propouštěl záření v UV oblasti, byl robustní a zároveň finančně nepřilíš nákladný. [5, 6].

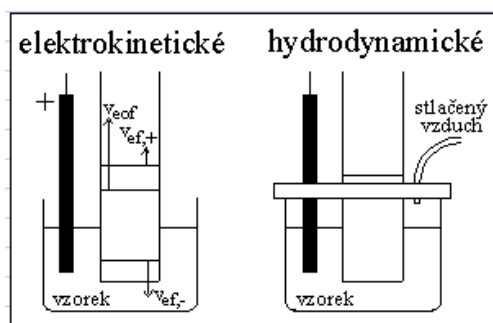
Je dobré si uvědomit, že křemen neobsahuje kationty, které absorbují světlo v UV oblasti. Tavením ztrácí křemen nepravidelnost krystalové struktury a stává se propustný pro UV záření. [8].

Podstatnou součástí, jako u všech přístrojů, je termostat. Zařízení dostupná na trhu využívají nucenou ventilaci chlazeného bloku. Zajímavý je přístroj vyráběný společností SCIEX, který využívá chladící kapaliny pro regulaci teploty celé kazety. [8]

### **3.2.1.3 Dávkování**

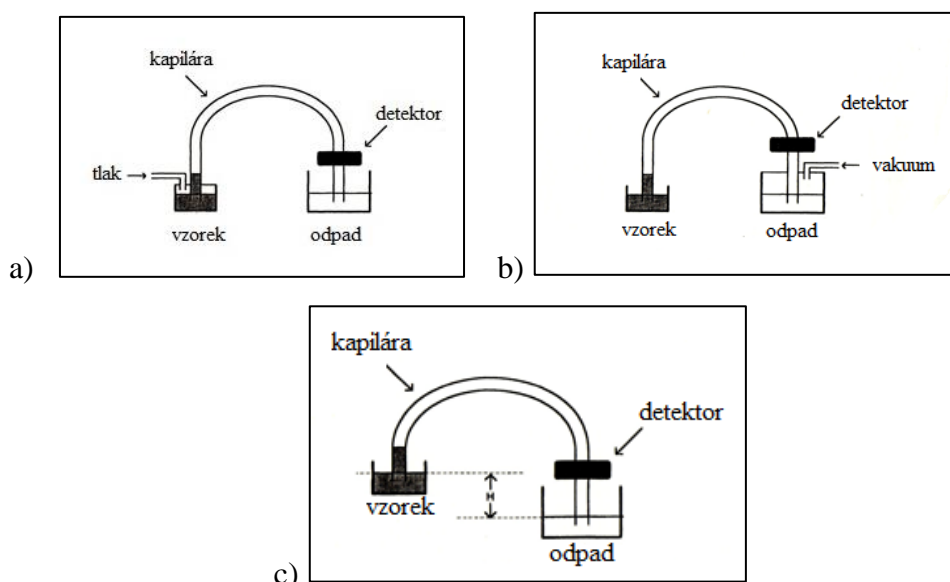
Vzorek je obvykle připravován do vialek o objemu 150  $\mu$ l a separační elektrolyt do vialek s objemem 600  $\mu$ l. I z tohoto již minimálního množství je do kapiláry dávkováno pouze několik nanolitů (10-100 nl). [8]. Využití pouze minimálního množství reálných vzorků dostává do popředí elektroforézu zejména v oblasti zdravotnictví a forezních věd.

Vzorky jsou obvykle dávkovány dvěma způsoby – hydrodynamicky a elektrokineticky. (obr. 8) Druhé zmiňované dávkování využívá jev elektroosmózy a vlastní migrace iontů, vlivem které migrují rozpuštěné částice vzorku do kapiláry. Nesmí být opomenut fakt, že kationty se pohybují vyšší elektroforetickou rychlostí než anionty a do kapiláry putují ve větším množství a mění se tak složení vzorku. Toto negativum vede k omezení používání elektrokinetického dávkování a upřednostňuje se hydrodynamické. Nicméně, například v gelové elektroforéze je dávkování vlivem elektroosmózy nenahraditelné. [5]



Obr. 8 Znáznornění dvou možných typů dávkování vzorků – elektrokineticky a hydrodynamicky. [13]

Podstata hydrodynamického dávkování spočívá v přenesení vzorku do kapiláry působením tlaku, za pomoci vakua nebo gravitace – tzv. sifonování. Všechny tři metody znázorňují následující obrázky. Objem vstříkovaného vzorku závisí na síle tlaku, vakua či gravitaci, viskozitě vzorku a rozměrech kapiláry. [12]



Obr. 9 Schématické znázornění možností hydrodynamického dávkování – a) pod tlakem; b) za pomoci vakua; c) sifonování [12]

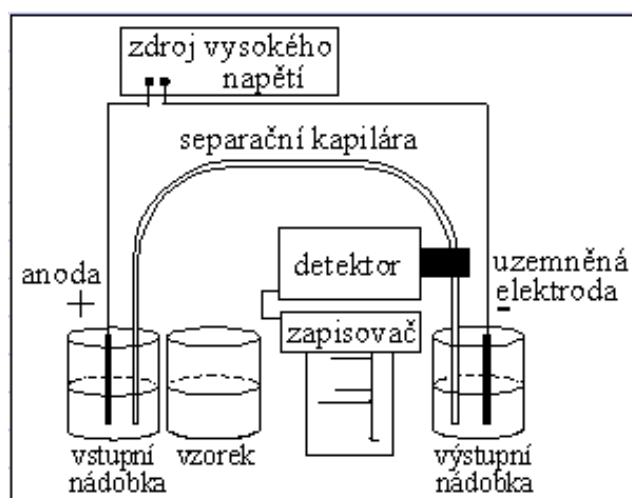
### 3.2.2 Separační módy

#### 3.2.2.1 Kapilární zónová elektroforéza (CZE)

CZE je nejjednodušší technika kapilárních elektromigračních metod, díky jednoduchosti v provozu, univerzálnosti a nízkým finančním nákladům. [6] Separuje a stanoví látky dle jejich molekulové hmotnosti, náboje nebo tvaru. Využití nachází v analýze nabitých

organických i anorganických látek, enantiomerů, aminokyselin, peptidů mnoha dalších látek iontové povahy. V praxi se uplatňuje ve farmacii k analýze léčiv, v potravinářství, v oblastech životního prostředí, pro různé kontrolní analýzy. [5, 6].

CZE je metoda instrumentálně méně náročná. Schématický popis CZE znázorňuje obr. 10. Separace běží v kapiláře zhotovené z taveného křemene naplněné separačním pufrům, tvořící kapalně prostředí pro analýzu. Nejdříve je začátek kapiláry naplněn rozpuštěným vzorkem a poté elektrolytem a připojen ke zdroji vysokého napětí. Důsledkem rozlišných mobilit iontů se vytvoří zóny, kterými putuje rozpuštěný analyt k detektoru a zaznamenává se jejich průchod detektorem v závislosti na čase. [4]



Obr. 10 Schématické znázornění zařízení kapilární zónové elektroforézy. [13]

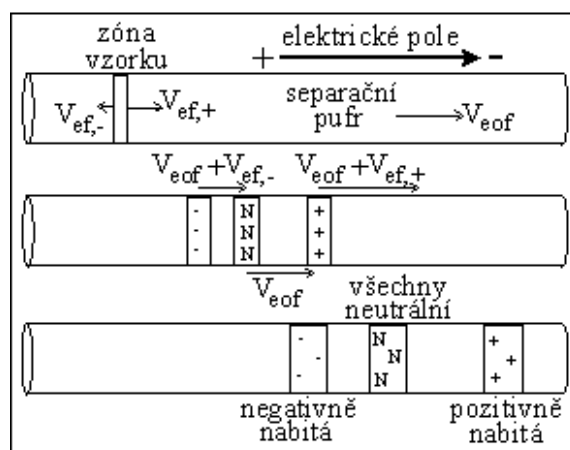
Opět je využíváno více možností nadávkování vzorku. Jednou z nich je dávkování na základě rozdílu hladin mezi roztokem nosného elektrolytu a roztokem vzorku, nad kterým vzniká přetlak. Rozdílné elektroforetické rychlosti  $v_{ep}$  zajistí separaci.

Jsou – li použity křemenné kapiláry s nemodifikovaným povrchem, je tok orientován směrem ke katodě. Rychlost solutu bývá vyšší než elektroforetická rychlost a z toho vyplývá, že pohyb kladně i záporně nabitých iontů má stejný směr. [4]

Separací mechanismus znázorňuje obrázek č. 11. Rychlost zóny dle rovnice [8]:

$$v_{poz, i} = v_{eof} + v_{ef, i} \quad (9)$$

$$v_{eof} > 0; v_{ef+} > 0; v_{ef-} < 0$$



Obr. 11 *Separální mechanismus CZE.* [8]

Molekulární difuze způsobuje rozšiřování zón a zhoršuje rozlišení. Jev je možné eliminovat zkrácením doby, po kterou se vzorek bude nacházet v kapiláře. [6, 14] Souvislost nacházíme mezi rozlišením a selektivitou. Selektivita je definována jako poměr mobilit separovaných analytů dle následujícího vztahu (10):

$$\alpha = \mu_{ep,1} / \mu_{ep,2}, \alpha \geq 1 \quad (10)$$

Oproti běžným chromatografickým metodám popisujícím proces separace pomocí distribučních konstant  $K_D$ , pracujeme v CE s poměrem elektroforetických mobilit. [15] Možnost mít pod kontrolou selektivitu přispívá k lepšímu rozlišení. Zejména pH a vhodně zvolený pufr zajišťují dobré hodnoty selektivity. [6]

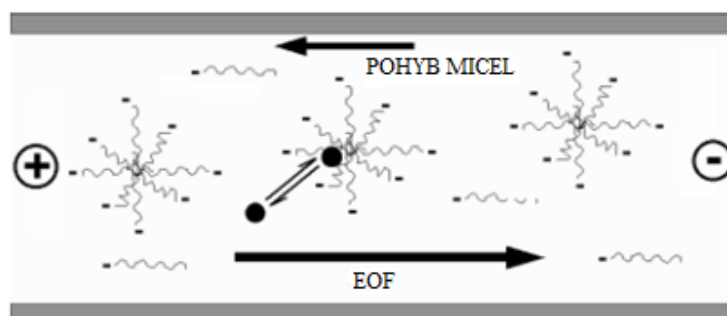
Jediná analýza dovoluje sledovat jak kationty, tak anionty zároveň a CZE není vhodné pro detekci neutrálních látek. První volbou z možných detektorů je detektor diodového pole (DAD). Poté se přikláníme k „on-column“ UV-VIS absorpční detektoru, fluorimetrickému, vodivostnímu a amperometrickému. [8, 13]

### 3.2.2.2 Micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC)

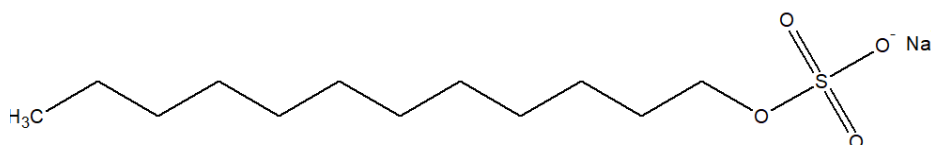
Micelární elektrokinetická chromatografie může být popsána jako elektricky řízená chromatografie, vyvinutá přednostně pro neutrální molekuly hydrofilní i hydrofobní povahy. [14] Počátky metody sahají do roku 1984 a její objev je spojen se jménem Terabe. [4]

Základem MEKC jsou povrchově aktivní látky přidávané do základního elektrolytu. V okamžiku, kdy jejich koncentrace překročí kritickou micelární koncentraci

(CMC) dojde k vytvoření micel. Micelární fáze je označována jako „pseudostacionární fáze“ a její funkce je srovnatelná s úlohou stacionární fáze v běžných chromatografických metodách. Nenabitě analyty jsou v micelách solvatovány. Nejčastějším surfaktantem je SDS (sodium dodecylsulfate, obr. 13), který vytváří kulovité částice s hydrofobním uhlíkatým řetězcem a na konci s hydrofilní sulfátovou skupinou. [5, 14]



Obr. 12 Struktura micel a ovlivnění elektroosmotického toku. Převzato a upraveno z [8]



Obr. 13 Dodecylsírán sodný

Micely rozlišujeme podle charakteru dutiny na dva typy. Ty s hydrofobní dutinou vznikající v hydrofilním prostředí a opačně, micely s hydrofilní dutinou tvořící se v hydrofobním prostředí. Dochází-li k tvorbě micel v hydrofilním prostředí BGE, micela má polární povrch a nepolární dutinu. Hydrofobní dutiny pojmu nepolární molekuly analytu a tím dochází k jejich solvataci či rozpuštění. [5]

Analyty jsou tedy separovány, jako v klasické chromatografii, mezi dvě fáze – vodnou fází a micelární fází, na základě polarit. Pohyb micel nastává ve směru, nebo proti směru EOF. SDS, jako aniontové tenzidy, migrují k anodě proti směru EOF, elektroforetickou rychlostí  $v_{mc}$  a dávají elektroforetickou pohyblivost  $\mu_{mc}$ . [5]:

$$v_{mc} = \mu_{mc} \cdot E \quad (11)$$

Rychlost pohybu micel k detektoru ovlivňuje stupeň solvatace. EOF má vyšší rychlost  $v_{eof}$  než je elektroforetická rychlost micel a celý systém unáší směrem ke katodě,



k detektoru. Poměr látkového množství analytu v micelární ( $n_{mc}$ ) a vodné fázi ( $n_{aq}$ ) vyjadřuje retenční faktor  $k_i$  [5]:

$$k_i = n_{mc} / n_{aq} \quad (12)$$

Počet molekul PAL, které tvoří jedinou micelu je dán agregačním číslem  $n$ . Nejčastěji používané tenzidy v MEKC jsou popsány v následující tabulce. [5]

Tab. 3 Přehled tenzidů využívaných v micelární elektrokinetické chromatografii s údaji o jejich kritické micelární koncentraci (CMC) a agregačním čísle. [5]

PAL	CMC (mmol.l <sup>-1</sup> )	Agregační číslo
<b>Aniontové</b>		
SDS	8,3	62
Kyselina cholová	14,0	3
<b>Kationtové</b>		
DTAB	14,6	61
TTAB	4,4	64

### 3.3 Detektory

Důležitou součástí všech analytických přístrojů je detektor. Na trhu je nabízena široká škála různých detektorů, které jsou voleny dle vlastnosti separovaných analytů a tak, aby dosahovaly vysoké citlivosti. První příčku nejpoužívanějších detektorů bezesporu drží spektrofotometrický detektor (UV/vis a DAD). Velký rozvoj zažilo spojení CE s hmotnostními detektory. Další běžně využívané detektory popisuje následující tabulka (Tab.4). [15]

Tab.4 Přehled používaných detektorů v elektomigračních metodách. [6]

Typ detektoru	UV/Vis	Fluorescenční	Amperometrický	Hmotnostní	vodivostní
<b>LOQ (mol.l<sup>-1</sup>)</b>	10 <sup>-6</sup> -10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-7</sup> – 10 <sup>-9</sup>	10 <sup>-10</sup> – 10 <sup>-11</sup>	10 <sup>-8</sup> – 10 <sup>-9</sup>	10 <sup>-7</sup> – 10 <sup>-8</sup>
<b>Výhody/nevýhody detektoru</b>	univerzální	vysoce citlivý, nutnost derivatizovat vzorek	citlivý, selektivní, pro elektroaktivní látky	citlivý, získáváme informace o struktuře	univerzální

### 3.3.1 Spektrofotometrické UV/Vis detektory

Detektory založené na principu absorpce záření v ultrafialové a viditelné oblasti jsou vzhledem ke své univerzálnosti nejvíce používanými detektory elektromigračních metod. [6] Tyto zařízení jsou schopny rychle snímat celá spektra v průběhu analýzy. [8]

#### 3.3.1.1 Dělení UV/VIS detektorů

Podle konstrukce můžeme rozlišovat 4 základní typy spektrofotometrických detektorů:

1. DAD – detektor diodového pole.
2. Detektor s fixní vlnovou délkou – Zdrojem záření je nízkotlaká Hg výbojka.
3. Detektor s měnitelnou vlnovou délkou – mají možnost měnit vlnovou délku, ale musíme být nastaveny před začátkem měření.
4. Detektor s programovatelnou vlnovou délkou – možnost přepínat vlnové délky i v průběhu experimentu. [16]

#### 3.3.1.2 Princip UV/VIS detektorů

Detekce probíhá po absorpci záření v oblasti vlnových délek 190-800 nm. [16] Princip UV/VIS detektorů je založen na Lambert – Beerově zákonu a absorbanci popisuje následující vztah (13) a z něj vyplývá, že je závislá na koncentraci  $c$  absorbující látky a tloušťce absorbující vrstvy  $d$ .

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot d = \log I/T, \quad (13)$$

$\varepsilon [l \cdot mol^{-1} \cdot c^{-1}]$  je molární absorpční koeficient.

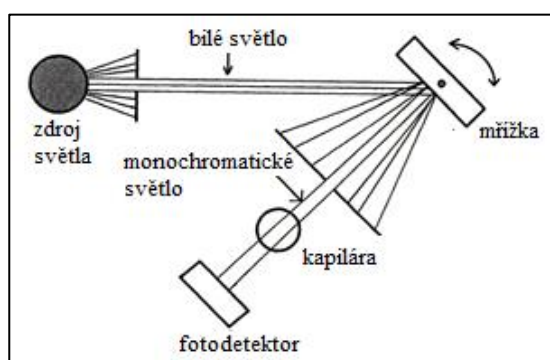
Jsou – li přítomny dvě a více absorbující složky, celkovou absorbanci definuje aditivní vztah (14) [16]:

$$A = l \cdot \sum \varepsilon_i \cdot c_i \quad (14)$$

Typ chromoforu analyzované látky, vlnová délka použité světla i pH roztoku ovlivňují sílu absorbance či transmitance  $T$  (viz. Tab.5). Minimální detekovatelné množství se pohybuje v oblasti  $10^{-5} - 10^{-7}$  mol/l. [12]

Tab. 5 Nejčastěji se vyskytující chromofory a jejich vlnové délky, při kterých pohlcují záření. [12]

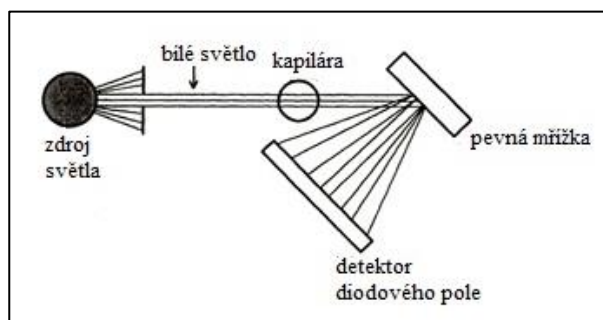
Typ chromoforu	Vlnová délka absorpce
Phenyl	202, 255 nm
Amino skupina	195 nm
Esterová skupina	205 nm
Aldehydová skupina	210 nm
Karboxylová skupina	200 nm



Obr. 14 Schématické znázornění detektoru UV/Vis – zdroj monochromatického světla, otočná mřížka, detekční okénko v kapiláře, fotodetektor. Převzato a upraveno z [12]

Zdroj světla zastupuje deuteriová lampa. Světelné paprsky dopadají na otočnou mřížku, která se pohybuje pomocí krokového („stepping“) motoru (ve směru šipky na obrázku 14). Mřížka vybere vhodnou vlnovou délku, se kterou bude monochromatické záření procházet přes detekční okénko a následně dopadat na fotodetektor a systémem fotodiód bude změřeno. Hodnota se vyjádří v absorpčních jednotkách. [12]

### Detektor diodového pole



Obr. 15 Detektor diodového pole. Převzato a upraveno z [12]

Dalším typem absorpčních detektorů je detektor diodového pole (DAD). (Obr. 15) Hlavním rozdílným znakem s výše rozebíraným UV/Vis detektorem je postup průchodu záření. U DAD prochází paprsek nejdříve kapilárou a až poté dopadá na mřížku, která je navíc nepohyblivá a dochází na ní k difrakci záření. Zářivý tok dopadá poté na systém 200-500 fotodiod. [12]

Tyto detektory jsou vhodné pro získání spektrálních dat, identifikaci látky a určení čistoty. Čistotu (neboli přítomnost jiné látky) určujeme podle spektra. Spektra získaná proměřením neznámé látky jsou normalizována a překrytím porovnávána se standardy. Druhou možností identifikace látky v CE je porovnávání migračních časů při alespoň dvou rozdílných vlnových délkách. Jedná-li se o totožné látky, nesmí se vrcholky píků po překrytí lišit. Musíme však mít na paměti, že UV/Vis spektra mají širokou distribuci a hodnoty maxim některých píků se jeví velmi podobně, ačkoli se jedná o dvě rozdílné látky. Identifikace nemusí být 100% a vždy je výhodné porovnávat více faktorů. [12]

### **3.3.1.3 Nepřímá absorpční detekce**

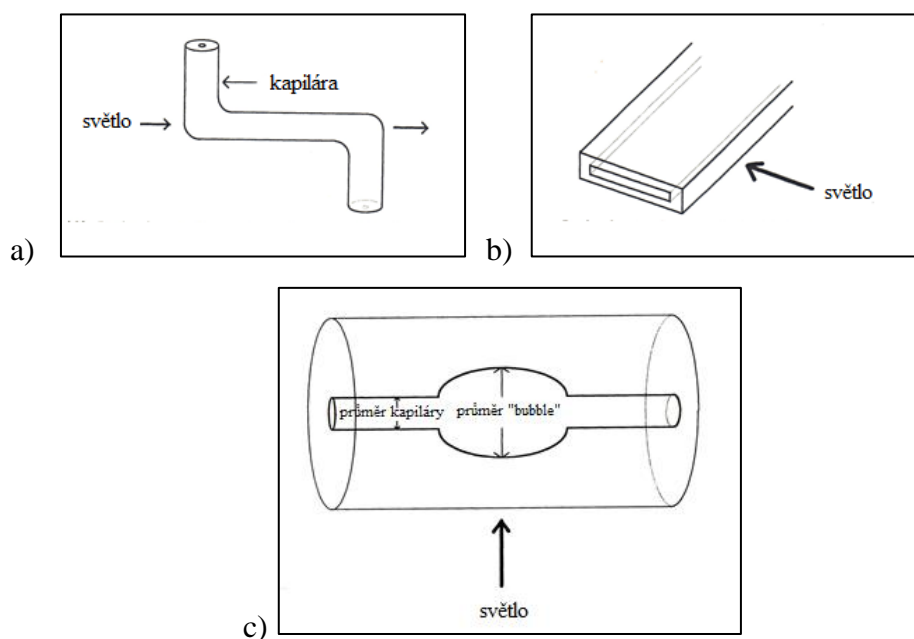
Látky, které obsahují organické nebo anorganické kationty bez chromoforu, nemají možnost pohlcovat záření v UV/Vis oblasti. Řešením je pro ně metoda nepřímé UV/Vis absorpční detekce. Její podstatou je použití elektrolytu, který sám o sobě vytváří absorpční pozadí. O zvolení typu elektrolytu rozhoduje hodnota elektroforetické pohyblivosti. [8] V okamžiku průchodu analyzované látky detektorem je zaznamenán pokles absorbance, a to má za následek snížení základní linie a tvorbu negativního píku. [12]

Obecně se jako chromoforní ionty vhodné pro detekci aniontů používají chromany a ftaláty, pro detekci kationtů chinin či malachitová zeleň a mnoho dalších uváděných v literatuře. Výběr vhodných iontů samozřejmě podléhá určitým kritériím. Základem je podobná mobilita chromoforů a iontů analytu a velká molární absorpce chromoforu při vybrané vlnové délce, protože v momentě průchodu neabsorbující analyzované látky dochází k prudkému poklesu absorbance. [12]

### **3.3.1.4 Zlepšení citlivosti**

V porovnání s HPLC mají elektromigrační metody 10–100krát vyšší LOD, díky krátkému detekčnímu okénku v kapiláře. Délka kapiláry a její vnitřní průměr jsou základem pro absorbanci, dle Lambert – Beerova zákona, jak je uvedeno výše. Další výhodou CE je

použití pufrů, které nepohlcují záření tak silně, jako organická rozpouštědla v HPLC. Jednou z možností, jak zlepšit LOD je proto zvětšit průměr kapiláry. To ale souvisí s následným vznikem nežádoucího Joulova tepla. Efektivnějším řešením je proto použití kapilár ohnutých do tvaru „Z“ (obr. 16 a) čím vzroste délka optické dráhy. Druhou možností jsou obdélníkové kapiláry (obr.16 b). Jejich výhodou jsou ploché stěny kapiláry, které zamezí zkreslení a rozptýlení záření. Třetí možností jsou tzv. „Bubble cell“ (obr.16 c), zde zvětšujeme průměr kapiláry, ale pouze ten vnitřní. Zmíněné možnosti vystihují následující obrázky. [12]



Obr. 16 Zobrazení možností úpravy cely pro zvýšení citlivosti detektoru UV/Vis.  
 a) „Z“ cely; b) obdélníkové kapiláry; c) „bubble cell“. Převzato a upraveno z [12]

### 3.3.2 Elektrochemické detektory

Dalšími na seznamu používaných detektorů jsou elektrochemické detektory (ECD), pro látky podléhající elektrochemické reakci (klasická oxidačně-redukční reakce). Jedná se především o léčiva a přírodní produkty. Podstatou ECD detektorů je měření určité elektrické veličiny (potenciál, proud, kapacity). Naměřený signál je úměrný koncentraci analyzované látky. Do této skupiny řadíme i amperometrické a vodivostní detektory. [15, 17]

### 3.3.2.1 Amperometrické detektory

Amperometrické detektory jsou založené na měření proudu vyvolaného průchodem elektroaktivní látky celou s detektorem. [17]. Vyznačují se vysokou citlivostí, širokým lineárním dynamickým rozsahem a dobrou selektivitou. Výhodou oproti klasickým spektrofotometrickým metodám je možnost miniaturizace. [12] Materiál elektrod je volen na bázi C (uhlíková vlákna, pasty, inkousty, soubory uhlíkových elektrod na disku), Pt a Au. [18]

Nezbytnost izolovat ECD detektor od zdroje vysokého napětí představuje jednu z komplikací spojení metod CE-EC. Dvěma možnými řešeními, jsou decoupling a postkolonová detekce. Při decoupling dochází k mechanickému zlomení kapiláry, což v praxi znamená vyvedení elektrického pole z kapiláry ještě před detekční celou. Obecně je výhodnější používat kapiláry o menším vnitřním průměru, protože čím menší průměr, tím nižší intenzita elektrického pole. [18]

### 3.3.2.2 Vodivostní detektory

Další z řady univerzálních detektorů je vodivostní detektor, který měří vodivost eluátu mezi dvěma elektrodami v cele, na něž je vkládáno střídavé napětí, aby nedocházelo k polarizaci elektrod. [19] Běžně komerčně dostupné jsou detektory v bezkontaktním provedení (CCD), vhodná pro detekci malých iontů, které nejsou schopny absorbovat UV záření. [15]

## 3.4 Spojení CZE – MS

Současná doba a přibývající nové a neznámé látky kladou stále vyšší nároky na identifikační schopnost, citlivost, přesnost a rychlost prováděných analýz. [20] K hojně používané metodě HPLC, byla roku 1987 Smithem přidána nová, alternativní metoda především pro separaci látek iontové povahy. Metoda spočívá ve spojení elektromigračních metod s hmotnostní spektrometrií (CZE – MS). [25]

On-line spojení CE a hmotnostní detekce je považováno za silný analytický nástroj. Metoda spojuje výhody kapilární elektroforézy, její nízkou spotřebu vzorku a toxických organických rozpouštědel, vysokou separační účinnost a krátkou dobu analýzy s výhodami hmotnostních spektrometrů (citlivost, selektivita, univerzálnost). [20, 21]

Avšak, správně instrumentálně spojit tato dvě rozhraní, aby nebyla snížena účinnost CE ani citlivost MS nepatří k nejjednodušším úkolům. [20] Metoda se do popředí dostala a stále více dostává v oblasti farmacie, bioanalytiky, ve forenzních vědách a životním prostředí. [9, 25] Je vhodná pro všechny typy iontů, od anorganických, přes organické až po makromolekuly. [15] Mezi nevýhody této metody patří ovlivňování separačního a sprejovacího napětí a nekompatibilita pufrů. Je na místě volit více těkavé pufrů (octan amonný) oproti těm méně těkavým, užívaným v CE (borát, fosfát). [20]

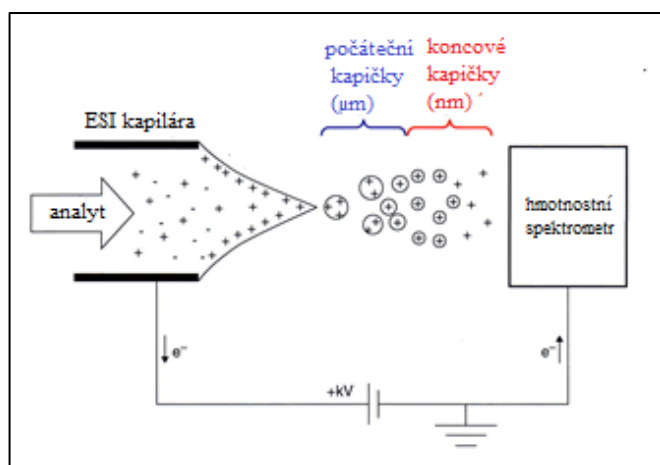
Hmotnostní spektrometrie je analytická metoda, která separuje ionty a fragmenty, vznikající ionizací molekul analytů. Ionizované částice jsou separovány podle tzv. efektivní hmotnosti  $m/z$  (poměr hmotnosti iontu  $m$  ku nábojovému číslu  $z$  elementárního náboje  $e$ ). Ionty jsou urychlovány pomocí silného elektrického pole do homogenního magnetického pole a tam jsou jejich dráhy zakřiveny dle  $m/z$ . Částice se uspořádají do svazků podle efektivních hmotností a dopadají na detektor. Počet dopadlých částic je přímo úměrný intenzitě signálu. [22]

Výhody CE – MS se liší podle použité ionizační techniky. První pozici z nejvíce používaných ionizačních technik drží ionizace elektrosprejem (ESI), méně běžné jsou za ní pak ionizace za atmosférického tlaku (APPI), chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI) a pro biomakromolekuly a oblast proteomiky využívané ionizace laserem za účasti matrice (MALDI). [15]

### **3.4.1 CZE – MS s ionizací elektrosprejem**

Ionizaci elektrosprejem řadíme mezi měkké ionizační techniky, pracující za atmosférického tlaku. Za využití této techniky ve spojení s hmotnostní spektrometrií získal roku 2002 J. Fenn Nobelovu cenu.

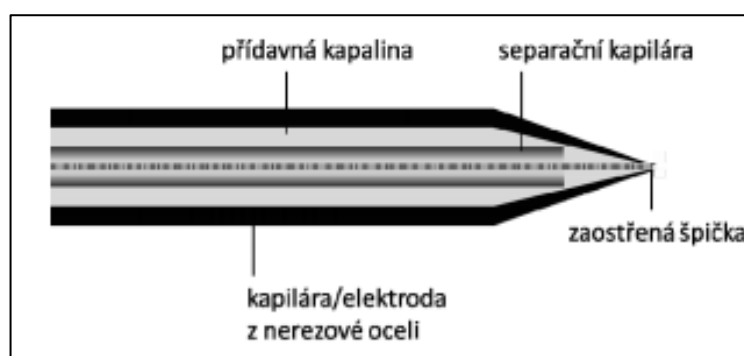
Základní princip ESI je možné shrnout do třech kroků. Tvorbu nabitých kapiček, jejich rozprášení a vznik iontů v plynné fázi. [23, 24, 26]



Obr. 17 Princip ionizace elektrosprejem. Převzato a upraveno z [26]

Problém spojených technik je jejich rozhraní. Kapilární elektroforéza vyžaduje vodivé spojení, obou konců kapilár, se zdrojem vysokého napětí. V samotné CE je to jednoduché, v elektrolytu jsou elektrody a na ně je aplikováno napětí. Hmotnostně spektrometrické detektory jsou ale připojeny až za ústím kapiláry. Jedná se o tzv. „post – column“ detekce. Rozhraní by mělo splňovat následující podmínky. Musí dojít k uzavření separačního okruhu, musí být možné aplikovat sprejovací napětí na konci kapiláry a musí být stále zachována vysoká separační účinnost. Aby byly tyto podmínky splněny, byly vynalezeny tři možná používaná rozhraní – bez a s přidávanou kapalinou a kapalinový spoj. [20]

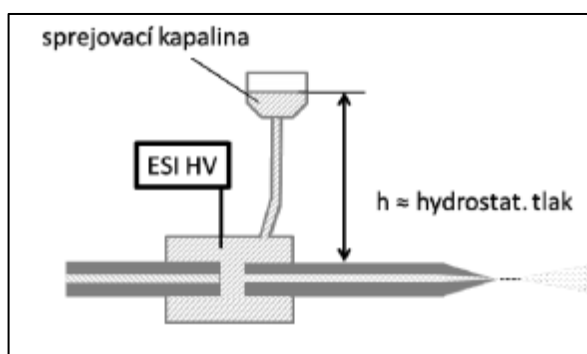
Rozhraní vytvořené bez přidávané kapaliny („Sheatless interface“, obr. 18) je založeno na ústí separační kapiláry do sprejovací. Výhoda spočívá v nezředění zón díky nepřítomnosti jiné kapaliny, jako u dalších dvou typů rozhraní. Ačkoli se jedná o metodu nejcitlivější, je málo robustní, křehká a nestabilní. Díky nízkým průtokům CE vytváří poměrně nestabilní elektrosprej. [25, 20]



Obr. 18 Rozhraní CE-MS vytvořené bez přidávané kapaliny. [25]

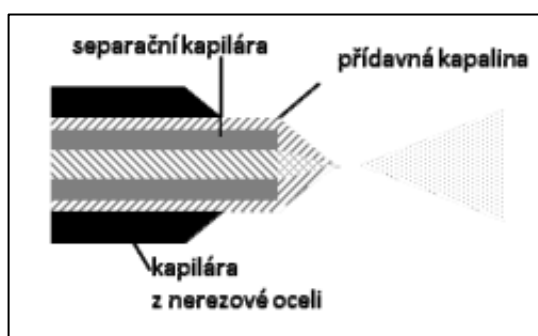


Další dvě zmiňované metody jsou více robustní, ale díky zředování zón se snižuje citlivost. Metoda s kapalinovým spojem („Liquid-Junction Interface, obr. 19) používá ústí separační kapiláry do nádobky s elektrolytem a zvýšeným tlakem. [25] Separační obvod je zde uzavřen. Zvýšený vstupní tlak brání zpětnému toku kapaliny. Tato technika našla své uplatnění zejména v oblasti klinické analýzy [20] a zejména se používá pro čipové techniky.



Obr. 19 Metoda spojení CE-MS pomocí kapalinového spoje. [20]

Schéma na obrázku (20) značí třetí typ rozhraní s přídavným tokem kapaliny („Sheath-Flow Interface“) a jeho třemi možnými uspořádáními. Typické uspořádání je koaxiální, využívající kapilární systém dvou kapilár. Separační kapilára je obklopena druhou kapilárou s větším průměrem a v té proudí vodivá kapalina, na niž je aplikováno elektrické napětí. Kapaliny se potkají při výstupu z kapilár. [23, 26] Použitá přídavná kapalina zvyšuje průtok z CE, a stabilitu elektrospreje. Navíc může být rozdílná oproti elektrolytu, a nést tak vlastnosti podporující tvorbu elektrospreje. [20, 26] Proto se s tímto typem uspořádání setkáváme v na trhu dostupných přístrojích.



Obr. 20 Spojení CE-MS s přídavným tokem kapaliny. [20]

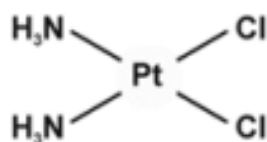
Převážná většina komerčně dostupných přístrojů preferuje ionizace elektrosprejem díky třem podstatným vlastnostem. Jednou z nich je umožnění přenosu analytů z kapalné

fáze separační kapiláry CE přímo do plynné fáze hmotnostního spektrometru přes rozhraní za atmosférického tlaku. [23] Dále tvorba stabilního elektrospreje [20] a v neposlední řadě možnost detekce vícenásobných iontů. [20, 23, 24]

Problém, jak už bylo zmiňováno je kompatibilita pufrů. Kapilární elektroforéza využívá koncentrovanější roztoky, než je schopen zvládnout iontový zdroj ESI, protože dochází k jeho zanášení. Pro hmotnostní spektrometry jsou důležité těkavé pufrы s malou iontovou silou. Nejčastěji využívané jsou kyselina octová, mravenčí a jejich amonné soli. Použití netěkavých pufrů (citrát, fosfát, CHES, TRIS) přináší značná omezení. [20, 23]

### 3.5 Cisplatina

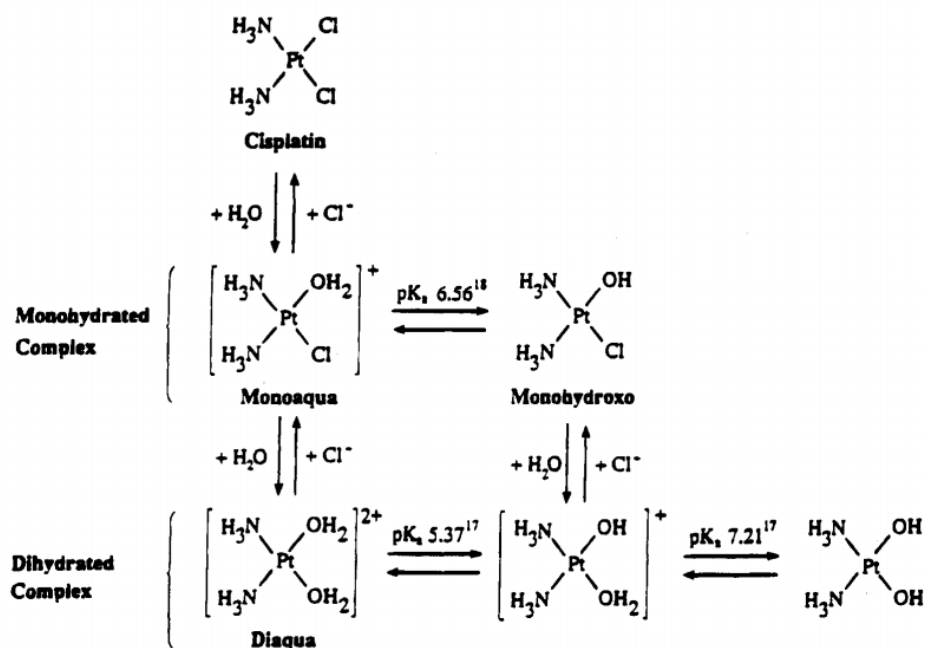
Cisplatina, neboli *cis*-diamino-dichlor platnatý komplex je nejdůležitější a nejúčinnější léčivý přípravek, řadí se do skupiny alkylačních cytostatik. Používá se při léčbě rakoviny, zejména při vzniku karcinomů varlat, hlavy, krku, močového měchýře, plic a rakoviny děložního čípku. Jedná se anorganickou sloučeninu, tvořící kovalentní vazby s DNA. [27, 28]. Jde o látku s planární strukturou a zároveň je vysoce polární. V podstatě neexistuje chemoterapeutická léčba, které by nebyla založena na *cisplatině*, jejich derivátech nebo jakýkoliv látkách neobsahujících platinu. [34]



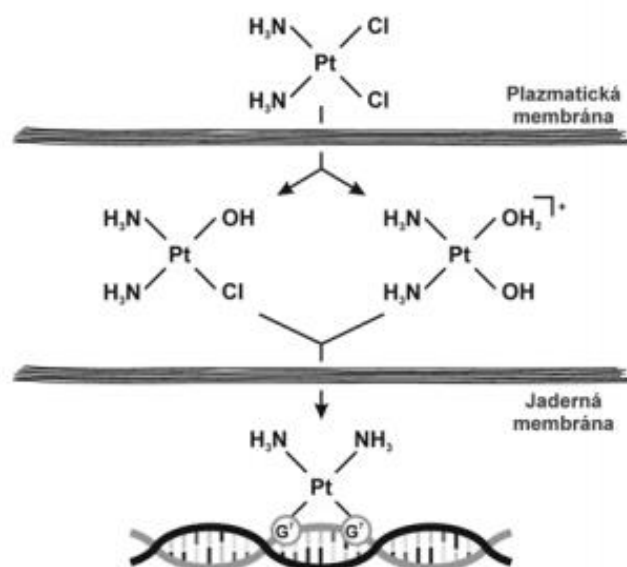
*Obr. 21* Strukturní vzorec *cis*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] – centrální atom Pt a na ní navázány dva nosné ligandy NH<sub>3</sub> a dva ligandy Cl odstupující ve fyziologickém prostředí. [29]

Cisplatina je při léčbě aplikována intravenózně ve formě koncentráту zředěného roztokem chloridu sodného. Látka nesmí přijít do styku s materiály obsahující hliník [28]. Krevním řečištěm je látka dopravena do postižené tkáně a podléhá hydrolyze vazeb Pt-Cl, čímž vznikají (dle následujícího schématu) mono a dihydratované komplexy. Tyto produkty hydrolyzy atakují molekuly DNA. Váží se na atomy dusíku nukleových kyselin. [29] Přetváří narušené a slabé vazby mezi řetězci DNA na pevnější. [30] Vznikají vnitro- a meziřetězové crosslinky. A právě kovalentní vazby mezi řetězci DNA brání separaci

crosslinků při replikaci a inhibují proces transkripce. [27] V podstatě cisplatina ovlivňuje proces buněčného dělení, opravuje poškozenou buňku nebo indukuje buněčnou smrt. [29, 30]



Obr. 22 Popis vzniku monohydratovaného a dehydratovaného komplexu platiny a hodnoty jejich  $\text{pK}$ . [31]



Obr. 23 Naznačení kovalentní interakce molekul cisplatiny s molekulami DNA a jejich vazba na guaninovou bázi jaderné molekuly DNA. [29]

Ačkoli je tedy platina v léčbě nádorů nenahraditelná, její vedlejší účinky mají na organismus závažný dopad. Odumírání zdravých buněk je stále velkým problémem. Způsobuje nefrotoxicitu (onemocnění ledvin), neurotoxicitu (postihnutí nervového systému) a myelosuprese (porucha krvetvorby) [27, 29] a negativně působí na krvetvorbu. [30]

Vylučování cisplatiny probíhá v ledvinách. Aby nedocházelo k jejich rozsáhlému poškození, aplikují se před i po podání cisplatiny infuze, které zajistí dostatečný přívod tekutin. [37]

Izomer transplatiny se rovněž váže na řetězce DNA, ale je klinicky neúčinný. [34]

### 3.5.1 Historie cisplatiny

Za objevem cisplatiny stojí prof. Rosenberg. Roku 1965 se zabýval bakterií *Escherichia coli* a v její kultuře měl ponořenou platinovou elektrodu. Všiml si, že na elektrodě dochází k inhibici růstu bakterií. Bylo zjištěno, že za to mohou platinové komplexy vznikající na elektrodě. [32] Započala tak vývoj protinádorových léčiv na bázi koordinačních sloučenin. Cisplatina byla oficiálně schválena a zařazena na seznam chemoterapeutik v roce 1978. Komplex *cis*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] byl znám již od roku 1844 pod triviálním názvem Peyronova sůl. [29]

### 3.5.2 Transplatina

Izomer transplatiny se váže na řetězce DNA, ale v protinádorové léčbě je neúčinný. [34] Jeho neaktivita je způsobena především dvěma faktory. Prvním z nich je kinetická nestabilita podporující deaktivaci transplatiny. A druhým faktorem je tvorba aduktů s molekulami DNA, jejichž stereochemie a regiosektivita jsou odlišné od izomerů cisplatiny. [35]

### 3.5.3 Detekce a stanovení cisplatiny a transplatiny

Při detekci izomerů platiny zkoumáme i jejich hydratované formy. Ke stanovení jsou využívány metody atomové absorpční spektrometrie (AAS), atomové emisní spektrometrie (AES) a spojené metody indukčně vázaného plazmatu s hmotnostní spektrometrií (ICP-MS) či kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií s využitím ionizace elektrosprejem (LC – MS). [33]

Problémy stanovení představují hydrolytické reakce. Extrakce kapalinovou chromatografií je prováděna na silných iontoměničích nebo revezních fázích. Podstatný je fakt, že v prostředí o nízké pH se komplex platiny štěpí na kationty a ty jsou, na rozdíl od neutrálních molekul, velmi reaktivní. Aquakomplexy reagují se složkami mobilní fáze (elektrolytu), běží-li analýza například v acetronitrilu nebo fosfátu. Dihydratované komplexy podléhají reakci s chloridem sodným (NaCl). Vzhledem k tomu, že pouze minimální část (menší než 1%) monohydratovaných komplexů je převedena na diaqua komplexy. Látku izolujeme jako monohydrát a to už je konečná cytotoxická látka, která bude pacientovi aplikována. [31]

## **4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST**

### **4.1 Materiál**

#### **4.1.1 Chemikálie**

Analýzy byly prováděny ve vodě v čistotě LC-MS od firmy Merck (Darmstadt, Německo). Jako promývací roztok byl použit hydroxid sodný od firmy Sigma-Aldrich (St.Louid, MO, USA). Pro přípravu základních elektrolytů byly použity kyseliny boritá a fosforečná, a standardy látek HEPES, MES, SDS a DNA byly taktéž od firmy Sigma-Aldrich.

#### **4.1.2 Vzorky**

Analyzované vzorky byly připraveny ze standardů cisplatiny a transplatiny od firmy Sigma-Aldrich. Série vzorků byla připravena navážením 0,1 mg cisplatiny a rozpuštěny ve vodě s čistotou LC-MS tak, že výsledná koncentrace činila 0,1 mg/ml. Druhá série cisplatiny a transplatiny byla připravena rozpuštěním 0,1 mg standardu v 1 ml 50 mM NaCl v chromatografické vodě.

### **4.2 Příprava elektrolytů**

Bylo testováno několik základních elektrolytů o různých koncentracích a hodnotách pH. Jejich příprava probíhala vždy stejně. Nejdříve byl připraven zásobní roztok (50 mM) odvážením či odměřením příslušného množství kyseliny (kyseliny borité  $H_3BO_3$  a kyseliny fosforečné  $H_3PO_4$ ) a standardních látek (HEPES, MES) a jejich rozpuštěním v deionizované vodě. Následně byl roztok za stálého míchání titrován 0,1 M roztokem NaOH na požadovanou hodnotu pH, která byla v průběhu titrace kontrolována pH-metrem. Postupným ředěním poté probíhala příprava pufrů o potřebných koncentracích. Dále byly přidávány k základnímu elektrolytu aditiva SDS a DNA, odvážením potřebného množství standardu a rozpuštěním v daném pufru.

### 4.3 Instrumentace a experimentální podmínky

Všechny analýzy cisplatiny i transplatiny byly měřeny pomocí kapilární elektroforézy CE Agilent 7100 s UV detekcí (viz. obr. 24). Vlnová délka byla nastavena na hodnotu 205 nm.

Téměř všechny analýzy běžely v křemenné kapiláře pokryté vrstvou polyimidu. Vnitřní průměr činil 50  $\mu\text{m}$ , a celková délka dosahovala 48,5 cm (MicroSolv Technology, Eatontown, NJ, USA). Efektivní délka kapiláry byla 40 cm.

Křemenná kapilára byla vložena do kazety vytemperované na 25°C. Před první analýzou bylo nutné kapiláru promýt 0,1 M NaOH po dobu 30 minut, vodou v chromatografické čistotě po dobu 15 minut. Poté základním elektrolytem, taktéž po dobu 15 minut. Kapilára byla promývána vždy před měřením, 5 minut 0,1 M NaOH, 3 minuty H<sub>2</sub>O a 2 minuty pomocí BGE.

Pro analýzy hmotnostní spektrometrií s přímým nástřikem byl využit hmotnostní spektrometr Agilent 6460 (Agilent, Waldbronn, Německo) s trojitým kvadrupólovým analyzátozem. Stříkačková mikropumpa (New Era Pump System, Farmingdale, NY, USA) byla využita pro dopravu vzorku do elektrospreje. Průtok byl nastaven na hodnotu 3  $\mu\text{l}/\text{min}$ . Software MassHunter, verze B.06.00, byl použit pro ovládání přístroje i sběr signálu. Data byla sbírána po stabilizaci signálu nejméně 3 minuty a pak bylo analyzováno průměrné spektrum.



Obr. 24 Kapilární elektroforéza Agilent 7100 ve spojení s trojitým kvadrupólovým analyzátozem MS Agilent 6460. Převzato z [39]

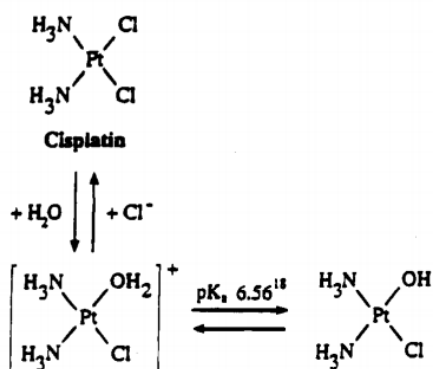
## 5 VÝSLEDKY A DISKUZE

Jedinou prací zabývající se separací derivátů cisplatiny pomocí kapilární elektroforézy publikoval Nussbaumer a kol. [36]. V této práci se autoři zabývali separací cisplatiny, karboplatiny a oxaliplatiny za použití 25 mM fosfátového pufru o pH 7,0 s přidavkem 80 mM SDS.

Jako první bylo tedy studováno použití stejného systému pro separaci cisplatiny a transplatiny. Nicméně, bylo zjištěno, že separace obou derivátů není v tomto prostředí možná. Bylo potřeba nalézt správné experimentální podmínky, spočívající ve výběru vhodného elektrolytu, jeho pH a koncentrace, typu a množství přidávaných látek a také možnosti dávkování.

### 5.1 Optimalizace základního elektrolytu

V rámci optimalizace byl nejprve zkoumán vliv složení základního elektrolytu a jeho pH. Z provedených pilotních experimentů (fosfát s SDS) se zdá, že interakce cisplatiny a transplatiny s SDS je minimální (jejich migrace je v tomto prostředí velice rychlá, což neodpovídá jejich interakci s SDS). Navíc oba deriváty se v prostředí o pH 7,0 chovají jako kationty. To odpovídá jejich hydrolyze dle schématu na obr. 25, kdy se z cisplatiny i transplatiny vytváří ve vodném prostředí aquakomplex, který podléhá disociační rovnováze.



Obr. 25 Popis vzniku monohydratovaného komplexu cisplatiny a hodnoty jejich pK. [31]

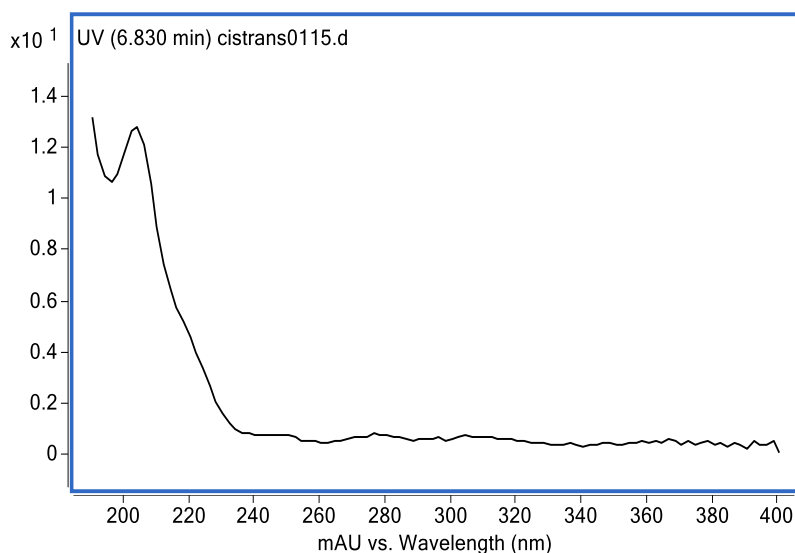


V literatuře lze nalézt hodnoty pK pro oba produkty hydrolyzy cisplatiny i transplatiny a to v rozmezí hodnot 4,4 – 7,3 (viz Tab. 6).

Tab. 6 Hodnoty pK cisplatiny

Hodnota pK	Cisplatina	Transplatina
pK <sub>a1</sub>	5,5	4,4
pK <sub>a2</sub>	7,3	7,3
pK <sub>a3</sub>	6,6	5,6

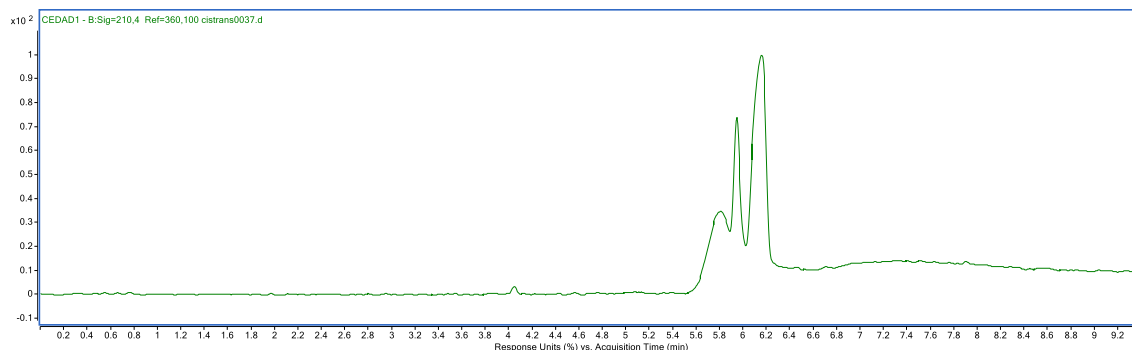
Z pKa hodnot vyplývá, že se změnou pH elektrolytu by mělo dojít k separaci obou zmíněných derivátů. Z tohoto důvodu byl jako první testován vliv pH a to v oblasti pH 6 – 9,5. Použité elektrolyty zahrnovali MES, HEPES, fosfát a borát, všechny o koncentraci 50 mM. Studovala se migrace markeru elektroosmotického toku (mesityloxid, 1000x zředěný v methanolu), cisplatiny, transplatiny a jejich směsi 1:1. Detekce cisplatiny i transplatiny v záznamu ze separace probíhala na základě UV spektra, které mají oba deriváty velmi podobné, viz obrázek 26 (není možné je na základě UV spektra rozlišit mezi sebou, ale je možné je odlišit od ostatních migrujících látek).



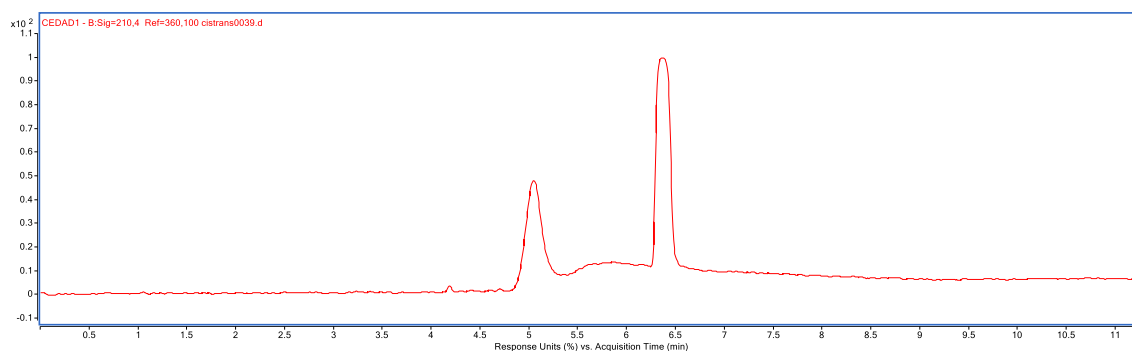
Obr. 26 UV spektrum cisplatiny

### 5.1.1 Vliv základního elektrolytu – fosfát

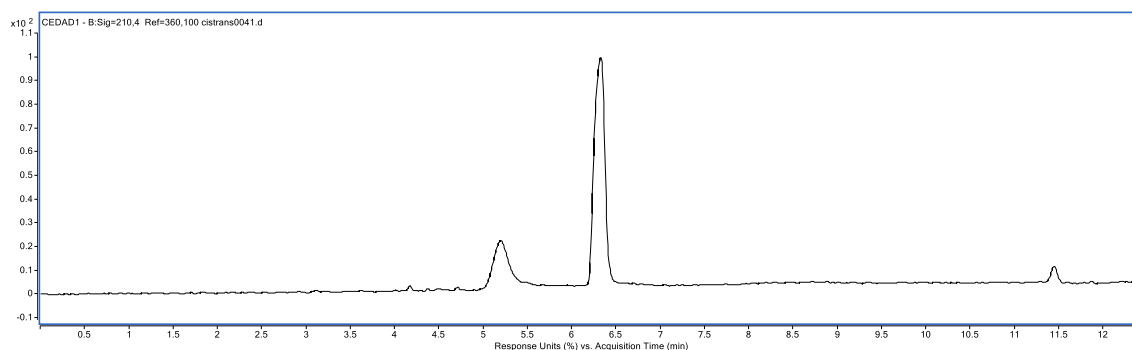
Ukázky analýz ve fosfátových elektrolytech jsou na následujících obrázcích (Obr. 27 – 29). Vyšší pík představuje EOF marker, menší transplatinu.



Obr. 27 Analýza transplatin v 50 mM fosfátu pH 6,5

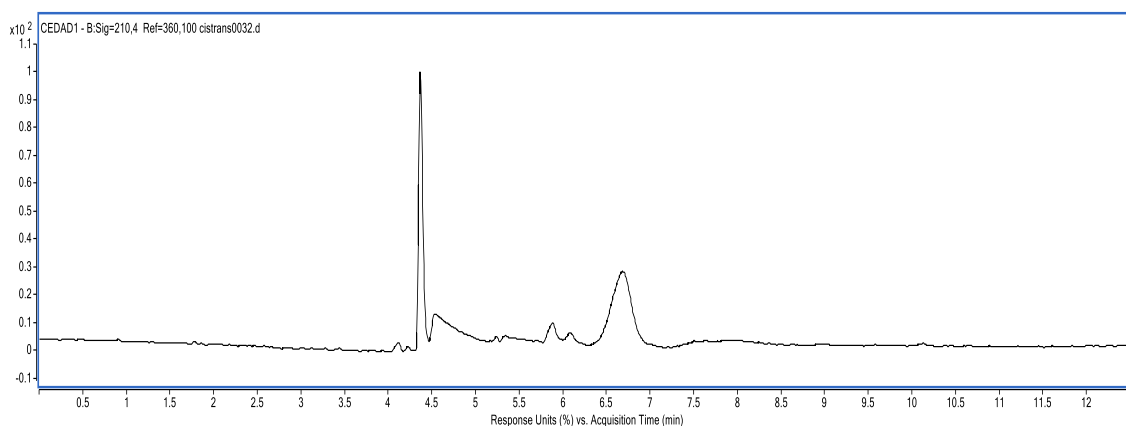


Obr. 28 Analýza transplatin v 50 mM fosfátu pH 7,0



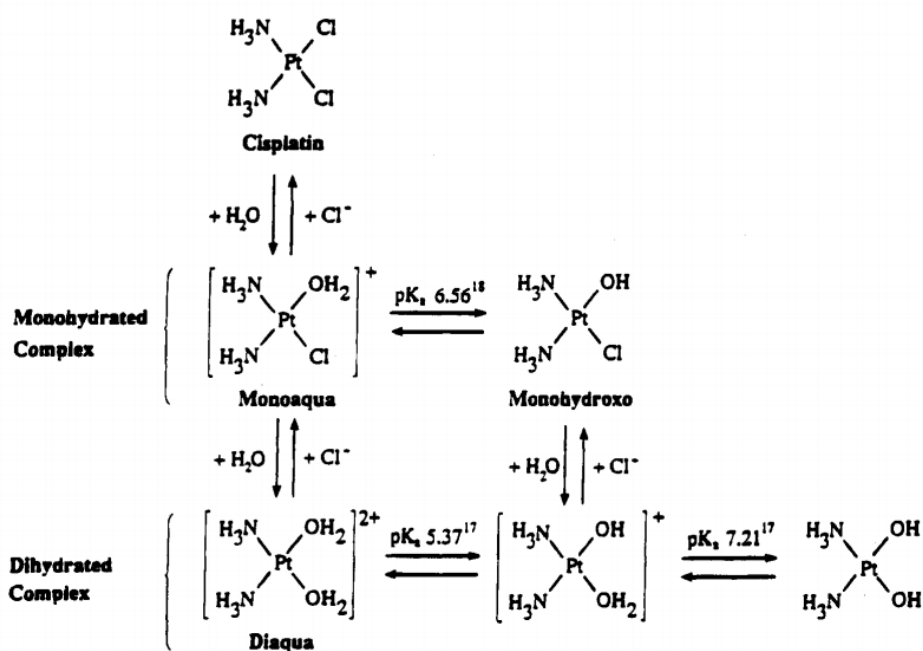
Obr. 29 Analýza transplatin v 50 mM fosfátu pH 7,5

V rámci provedených analýz nebylo možné rozseparovat cisplatinu a transplatinu. Navíc poměrně hodně provedených analýz bylo neopakovatelných, případně v rámci analýz se objevovaly další píky, viz např. obr. 30.



Obr. 30 Analýza cisplatiny v 50 mM fosfátu pH 6,0

Důvodem neopakovatelných analýz může být již několikrát zmíněná hydrolyza cisplatiny i transplatiny. Hydrolyza nemusí probíhat pouze do formy monoaquakomplexu, ale může probíhat do formy diaquakomplexu, viz obr. 31.

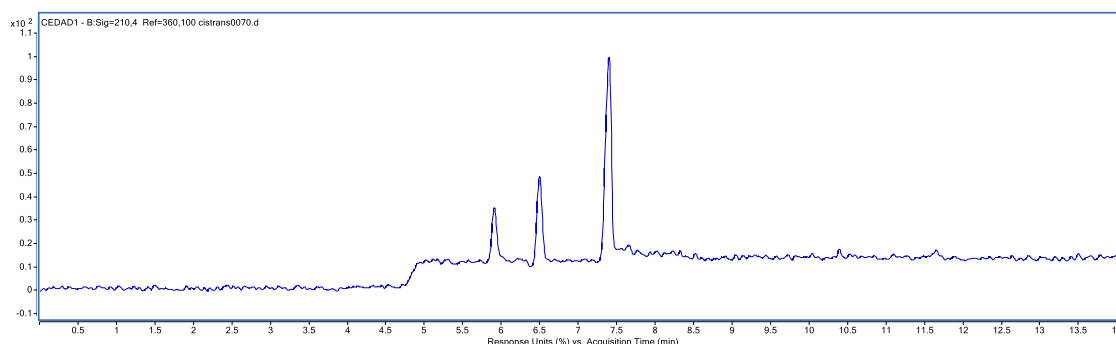


Obr. 31 Popis hydrolyzy cisplatiny [31]

Jedním z řešení, jak zabránit, resp. potlačit hydrolyzu je přidavek chloridů do vzorku. Nussbaumer a kol. [36] používali ve své práci přidavek 150 mM NaCl do vzorku a popsali, že k hydrolyze nedocházelo. Tato koncentrace je nicméně velmi vysoká a vede k dalším nežádoucím efektům jako je častější nestabilita elektrického proudu, rozšíření píky analytu,

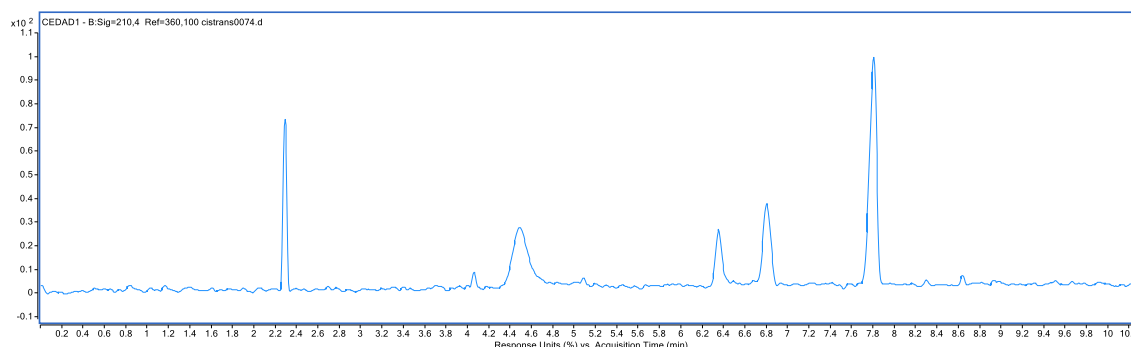
případně problémy s opakovatelností. Z tohoto důvodu bylo použito rozpuštění vzorku v 50 mM NaCl, což se ukázalo jako dostatečné pro zajištění stability elektrického proudu v CE analýzách.

Nicméně i v tomto případě dochází k postupné degradaci obou derivátů platiny, které se projevují detekcí více signálů v elektroforegramu, viz např. obr. 32. Tato degradace je viditelná zhruba po 24 hodinách od přípravy standardního roztoku. Je tedy nutné připravovat standardy před analýzou vždy čerstvé.



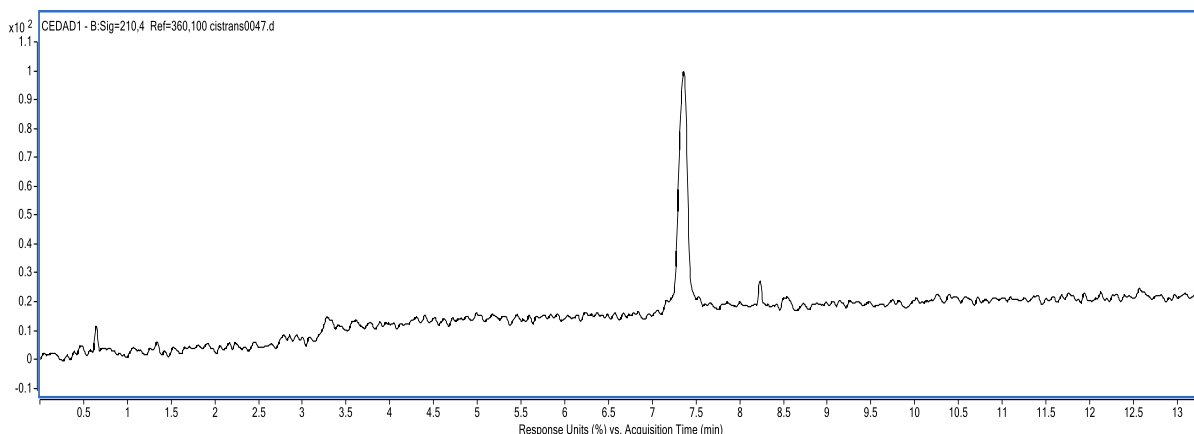
*Obr. 32 Analýza cisplatinu rozpuštěného v NaCl v 50 mM fosfátu pH 7,0*

Jako poměrně zajímavý se jevil přídavek SDS do výše uvedeného pufru s dávkováním hydrolyzovaných derivátů platiny (obr. 33). Z obrázku je patrné, že pomocí SDS lze některé produkty hydrolyzy separovat. Nicméně toto, včetně studia vlastních produktů, nebylo cílem diplomové práce, proto tato problematika nebyla dále studována.



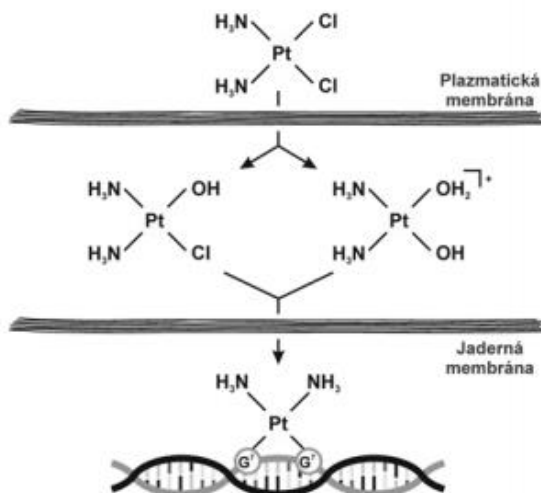
*Obr. 33 Analýza cisplatinu rozpuštěného v NaCl v 50 mM fosfátu pH 7,0 s 20 mM SDS*

Nicméně ani s přídavkem NaCl do vzorku nebylo možné cisplatinu a transplatinu v těchto prostředích separovat, viz ukázka na obr. 34.



Obr. 34 Analýza směsi transplatinu a cisplatinu rozpuštěné v NaCl v 50 mM fosfátu pH 6,5

Vzhledem k tomu, že cisplatinu a transplatinu se v prostředí fosfátového pufru nepodařilo rozseparovat, byly testovány další dva základní elektrolyty – HEPES a MES. Důvodem jejich použití je hypotetická možnost jejich interakce s oběma deriváty platiny. Cisplatin (i transplatin) interagují s DNA, viz teoretická část, resp. schéma na obr. 35, díky hydrolyze „chloro ligandu“ na „aqua ligand“ a následné komplexaci s dusíky guaninových bazí DNA. Hypoteticky by tedy bylo možné, aby cisplatin a transplatin interagovali s dusíky v molekulách HEPES a MES.

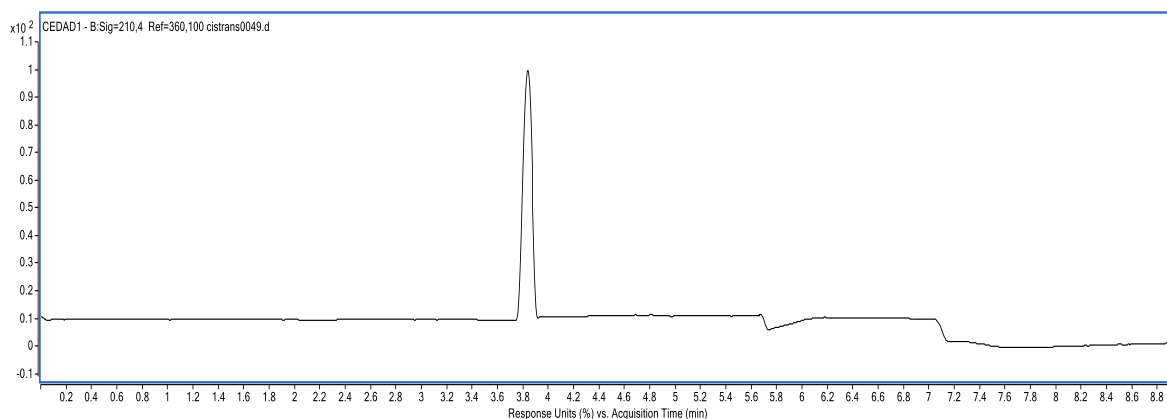


Obr. 35 Naznačení interakce molekul cisplatinu s molekulami DNA [29]

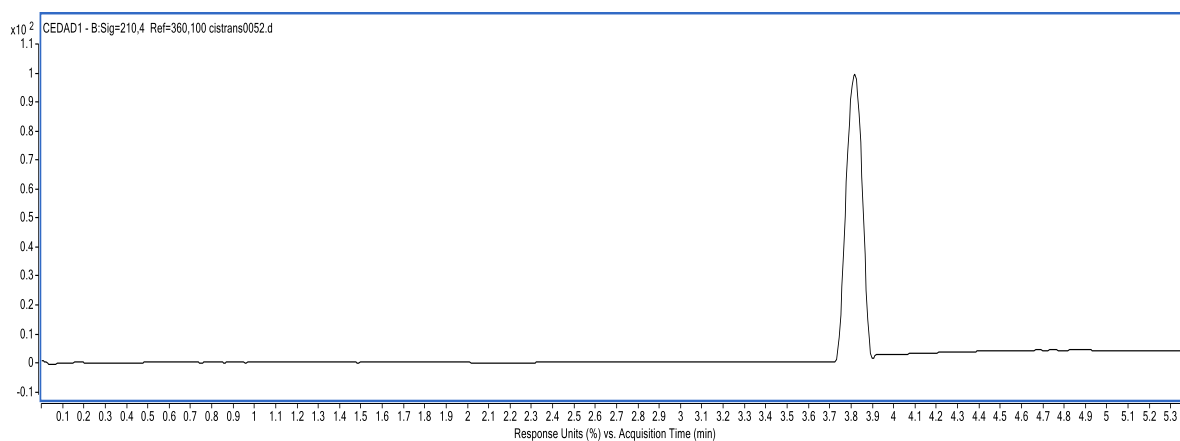
### 5.1.2 Vliv základního elektrolytu – HEPES

HEPES byl připraven rozpuštěním ve vodě s čistotou LC-MS, a jeho koncentrace byla 50 mM. Poté byl vytitrován do pH 6,5 a 7, vzhledem k tomu, že tato oblast pH se pro fosfát jevila jako nejpříjemnější řešení (a zároveň je blízká fyziologické hodnotě pH). Na

následujících obrázcích (obr. 36 a 37) jsou ukázány analýzy směsi cisplatiny a transplatiny ve studovaných pufrch.

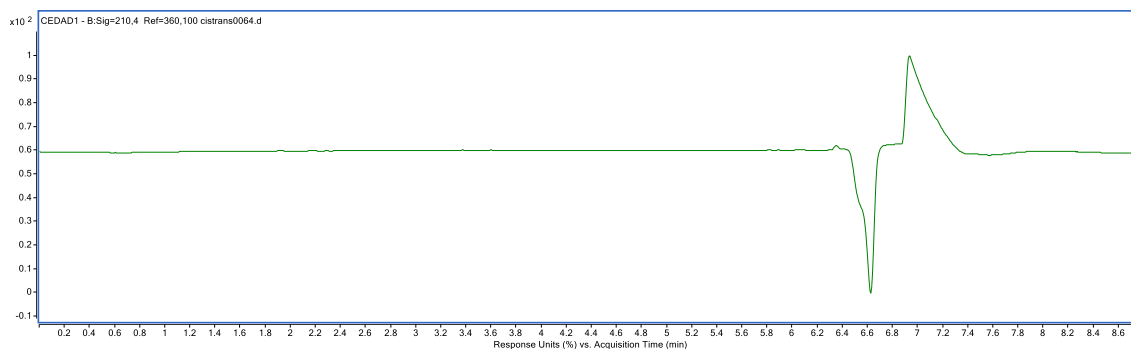


*Obr. 36 Analýza směsi transplatiny a cisplatiny rozpuštěné v NaCl v 50 mM HEPES pH 6,5*



*Obr. 37 Analýza směsi transplatiny a cisplatiny rozpuštěné v NaCl v 50 mM HEPES pH 7,0*

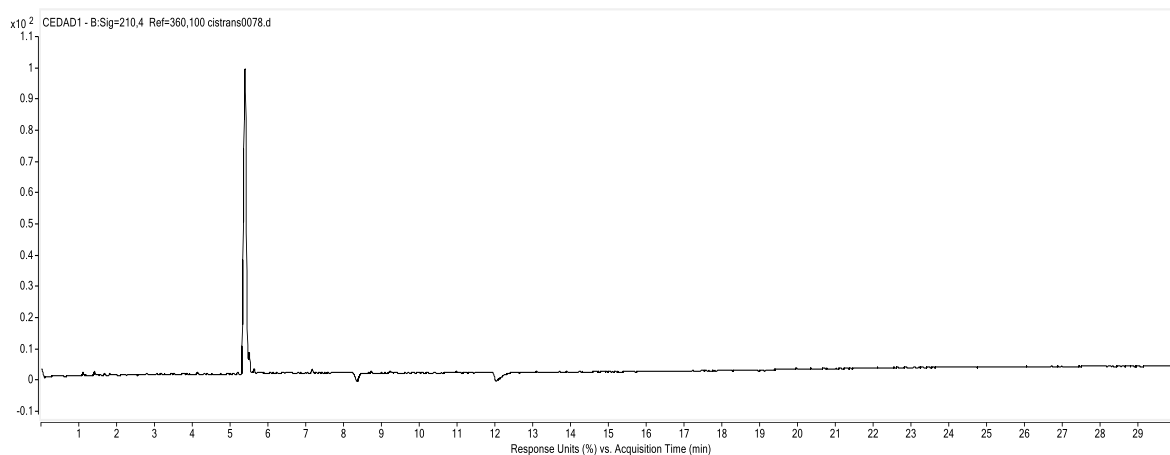
Vzhledem k tomu, že použití HEPES pufru nevedlo k separaci obou izomerů, byl testován přídavek methanolu o koncentraci 10 % (v/v), přídavek 20 mM SDS, a přídavek SDS i MeOH. Ukázka analýzy je na obr. 38. Ani v jednom případě však nedošlo k separaci.



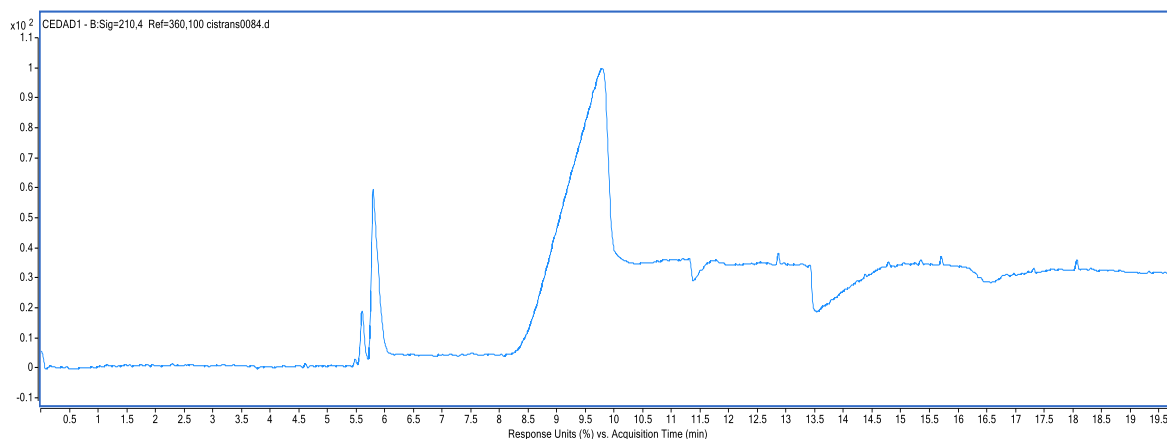
*Obr. 38 Analýza směsi transplatiny a cisplatiny rozpuštěné v NaCl v 50 mM HEPES pH 7,0 + 10% MeOH + 20 mM SDS; záporný pik představuje marker EOFu, kladný pak migraci derivátů platiny*

### 5.1.3 Vliv základního elektrolytu typu MES

V dalším kroku bylo zvoleno prostředí typu MES. Opět byl připraven jako 50 mM o pH 6 a 6,5. A opět byl testován přírdek 10% methanolu a 20 mM SDS. Ukázky analýz jsou na obrázcích 39 a 40. Ani zde nebylo dosaženo požadované separace.



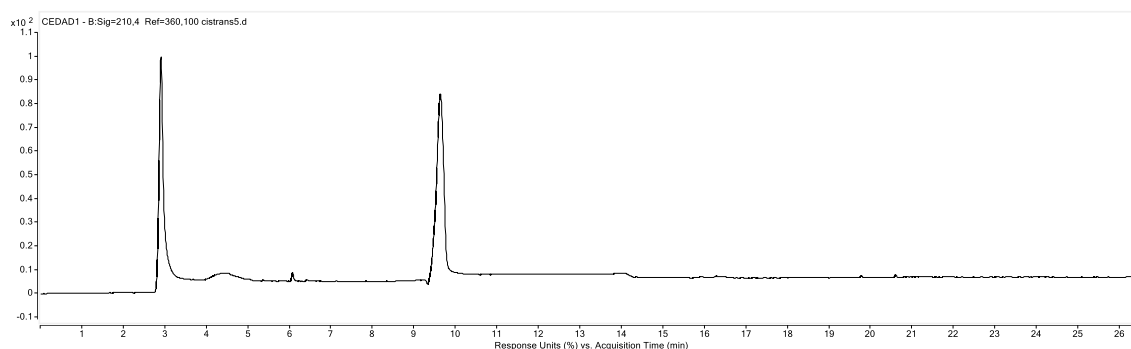
*Obr. 39 Analýza směsi transplatiny a cisplatiny rozpuštěné v NaCl v 50 mM MES pH 6,0*



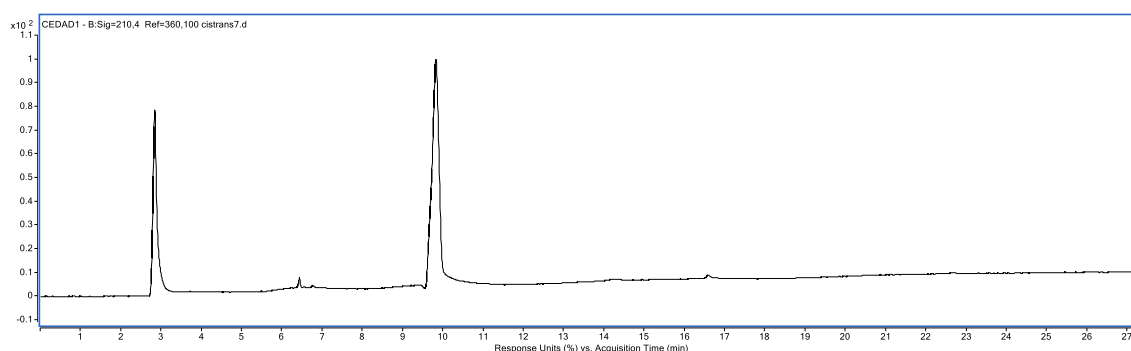
*Obr. 40 Analýza směsi transplatiny a cisplatiny rozpuštěné v NaCl v 50 mM MES pH 6,0 s 20 mM SDS, pík v 5,5 minutě identifikován jako EOF marker, pík v 5,8 minutě jako transplatina a cisplatina, ostatní píky neidentifikovány*

#### 5.1.4 Vliv borátového základního elektrolytu

V další části práce byl zkoumán vliv borátového základního elektrolytu. Borát je znám pro svoji schopnost interakce s vicinálními dioly. Nedávno bylo prokázáno, že je schopný interagovat i s piperazinovým kruhem některých léčiv. Proto byla testována možnost jeho interakce s deriváty platiny a zároveň možnost jejich analýzy ve více alkalickém pH. Aby byla podpořena možnost komplexace borátu, byla pro analýzy zvolena jeho vysoká koncentrace 500 mM. Dále byl studován vliv pH borátu v rozmezí 8,5 až 9,5 a přidavek SDS 2,5 mM, 10 mM, 25 mM, 100 mM a 250 mM. Následující obrázky (obr. 41 – 45) představují ukázky analýz v těchto prostředích.

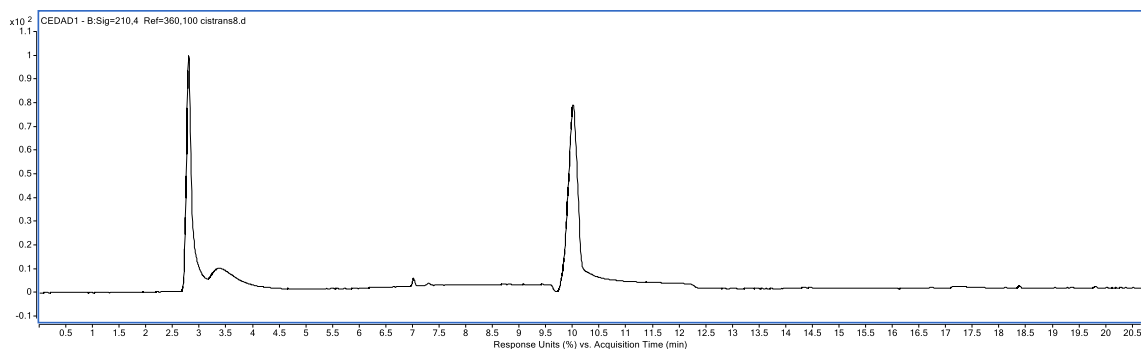


*Obr. 41 Analýza cisplatiny v 500 mM borátu pH 8,5, pík v 3 minutě identifikován jako EOF marker, pík v 9,7 minutě jako cisplatina, ostatní píky neidentifikovány*

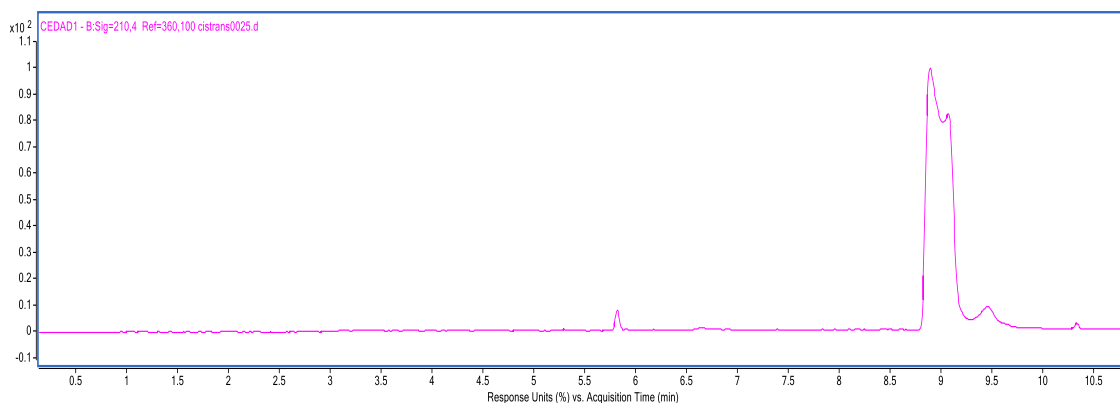


*Obr. 42 Analýza cisplatiny v 500 mM borátu pH 8,5 + 10 mM SDS, pík v 3 minutě identifikován jako EOF marker, pík v 10 minutě jako cisplatina, ostatní píky neidentifikovány*

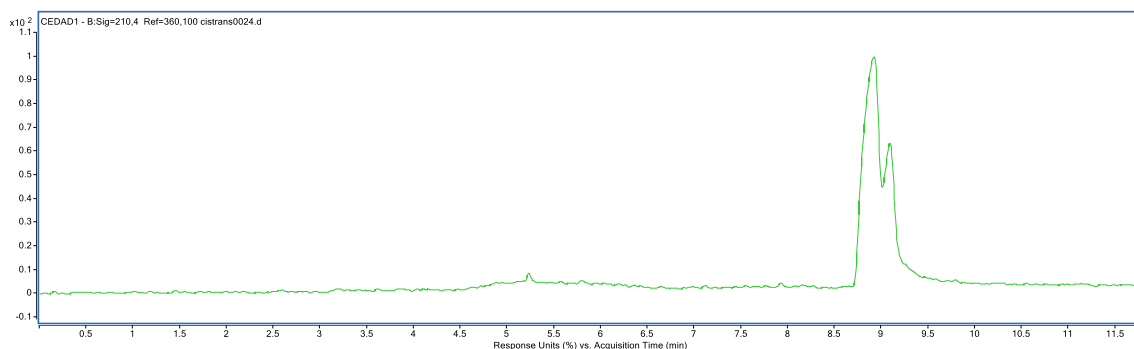




Obr. 43 Analýza cisplatiny v 500 mM borátu pH 8,5 + 25 mM SDS, pík v 3 minutě identifikován jako EOF marker, pík v 10 minutě jako cisplatina, ostatní píky neidentifikovány



Obr. 44 Analýza cisplatiny v 500 mM borátu pH 8,5 + 250 mM SDS, pík v 5,8 minutě identifikován jako EOF marker, pík v 8,9 minutě jako cisplatina, ostatní píky neidentifikovány



Obr. 45 Analýza transplatiny v 500 mM borátu pH 8,5 + 250 mM SDS, pík v 5,3 minutě identifikován jako EOF marker, pík v 8,7 minutě jako transplatina, ostatní píky neidentifikovány

Z výše uvedených obrázků je patrné, že s přidávkem SDS dochází k posunu migračních časů (odpovídající změně iontové síly pufru). Zároveň je detekováno zvláštní rozštěpení píku cisplatinu a transplatinu v případě 250 mM SDS. Nicméně ani v tomto případě nedojde k separaci cisplatinu a transplatinu v případě, že jsou nadávkovány ve směsi. Změna pH pufru nevede k zlepšení separace. Je zajímavé, že pozorované dva píky v případě použití 250 mM SDS se objevují i při jiném pH pufru. Zřejmě jde o další hydrolytický produkt či nečistotu obou derivátů platiny. Vyšší koncentrace SDS nebyla testována z důvodů vysokých elektrických proudů při jejich použití (a tím i jejich nestabilitě a špatné opakovatelnosti analýz).

### 5.1.5 ESI – QQQ – MS

Vzhledem k neúspěchu v separaci cisplatinu a transplatinu a časté špatné opakovatelnosti analýz, bylo přistoupeno k možnosti otestovat cisplatinu a transplatinu pomocí ESI-MS (hmotnostní spektrometr s trojitým kvadrupólem a ionizací elektrosprejem), aby byla potvrzena struktura analyzovaných látek v prostředí, které je pro analýzu využíváno.

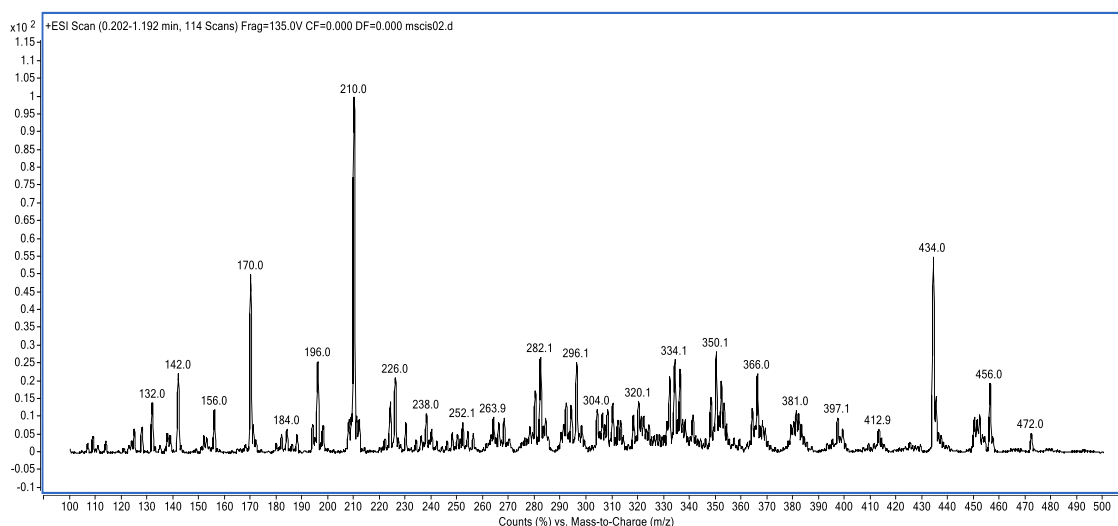
Experimentální podmínky byly optimalizovány, aby bylo dosaženo co největší odezvy, a byly nastaveny takto: sprejovací napětí -3,5 kV, teplota nebulizačního plynu N<sub>2</sub> 300°C, průtok 11 L min<sup>-1</sup>, nebulizační plyn aplikován pod tlakem 15 psi (1 psi = 6894,76 Pa), napětí na fragmentoru: 135 V. Vzorky cisplatinu a transplatinu byly připraveny rozpuštěním standardů látek ve vodě o čistotě LC-MS na koncentraci 0,05 mg/ml. Takto připravené roztoky byly přímo dávkovány do ESI-MS.

MS spektrum cisplatinu i transplatinu bude poměrně složité, protože se platina přirozeně vyskytuje ve dvou přibližně stejně zastoupených izotopech <sup>194</sup>Pt (32,8 %) a <sup>195</sup>Pt (33,8 %) a dále v méně zastoupeném izotopu <sup>196</sup>Pt (25,2 %). Další izotopy Pt představují minimální příspěvky ke tvaru spektra. Navíc cisplatina i transplatina nesou ve své struktuře další dva atomy chloru, který se rovněž vyskytuje ve formě dvou izotopů <sup>35</sup>Cl (75,8 %) a <sup>37</sup>Cl (24,2 %). Díky tomu bude i MS spektrum standardu bohaté jednotlivé m/z hodnoty, jak popisuje např. práce Cui a kol. [33], viz Tab. 7.

Tab.7 Hodnoty m/z, vzhledem k  $^{194}\text{Pt}$  [33]

Sloučenina	Hodnoty m/z						
	A <sup>n</sup>	A+1	A+2	A+3	A+4	A+5	A+6
Cisplatina, Na <sup>+</sup> adukt	321	322	323	324	325	326	327
Monohydrát cisplatiny	281	282	283	284	285		
Dihydrát cisplatiny	263	264	265	266	267		

Ukázka změřeného MS spektra cisplatiny je na obrázku 46.



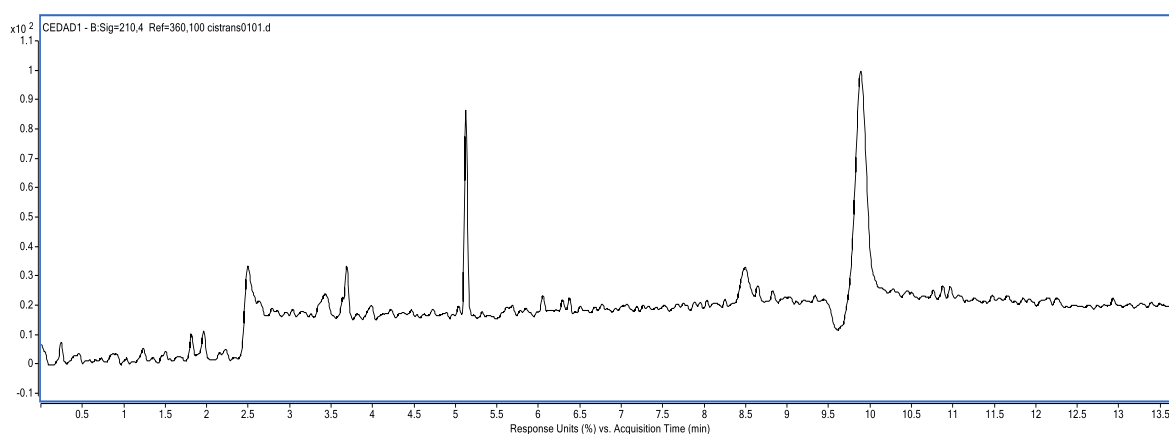
Obr. 46 MS spektrum cisplatiny

Interpretace MS spektra (obr. 46) je složitá, nicméně pomocí selektivního monitorování iontů bylo potvrzeno, že ve vodném roztoku se cisplatina i transplatina vyskytují ve formě monoqua a diaqua komplexu (m/z 281, 263 atd.). Zároveň byly pravděpodobně detekovány i další adukty cisplatiny i transplatiny. Vzhledem k tomu, že hydrolyza nastává téměř okamžitě (ihned po smíchání standardů s vodou bylo provedeno měření na ESI-MS), lze předpokládat, že v rámci elektroforetické analýzy je nutné počítat s možností horší opakovatelnosti v případě pomalých separací (potvrzuje to závěry z předešlých analýz).

### 5.1.6 Vliv DNA na separaci cisplatiny a transplatiny

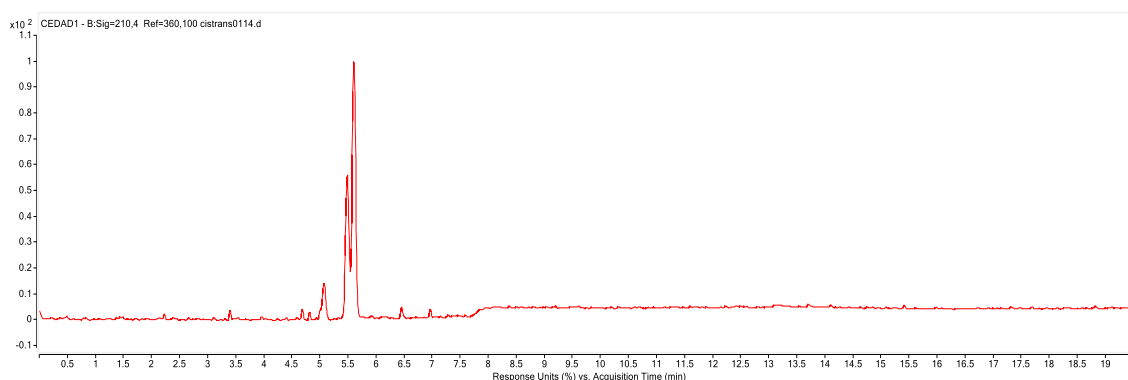
Dalším možným řešením, které by umožnilo separaci cisplatiny od transplatiny je využití jejich interakce s molekulami DNA (viz teoretická část). Interakce s DNA je známá a zároveň je pro oba izomery rozdílná (proto se používá jako léčivo cisplatina). Pro účel separace obou derivátů byla vybrána nízkomolekulární DNA a fosfátový pufr o pH 7 kvůli stabilitě struktury DNA.

Nejprve byla optimalizována koncentrace DNA v rozmezí  $10^{-7}$  mol/l až  $10^{-3}$  mol/l. Při vysokých koncentracích DNA, dochází pravděpodobně k navázání DNA i na stěnu kapiláry a analýzy jsou neopakovatelné, viz např. obr. 47.



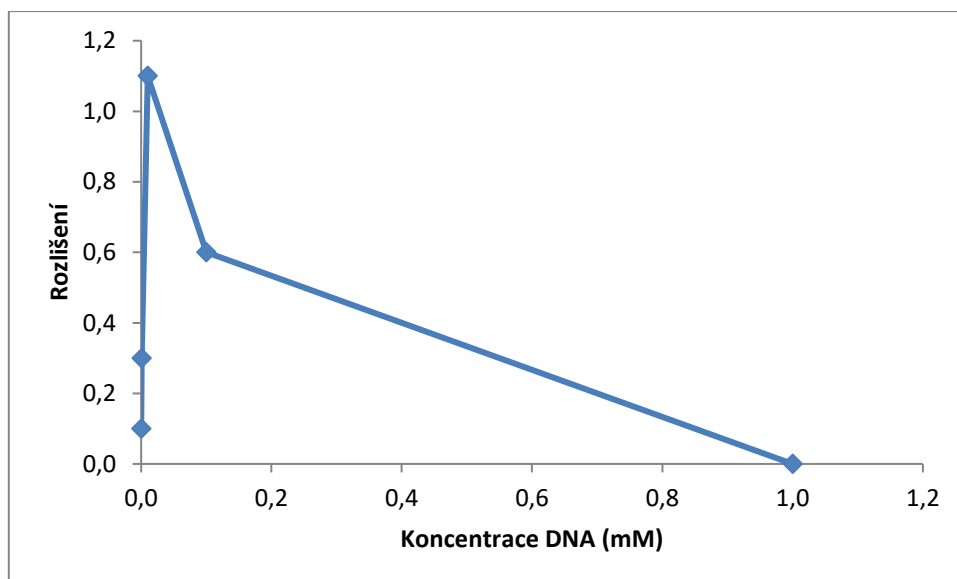
*Obr. 47 Analýza cisplatiny v 50 mM fosfátu pH 7,0 + 1 mM DNA, pík v 10 minutě identifikován jako EOF marker, ostatní píky neidentifikovány (cisplatina nedetekována)*

Naopak pokud se použije nižší koncentrace DNA, dochází k částečné separaci cisplatiny a transplatiny, viz obrázek 48. Migrační pořadí je transplatina a cisplatina, což odpovídá většímu zadržování cisplatiny na molekulách DNA.



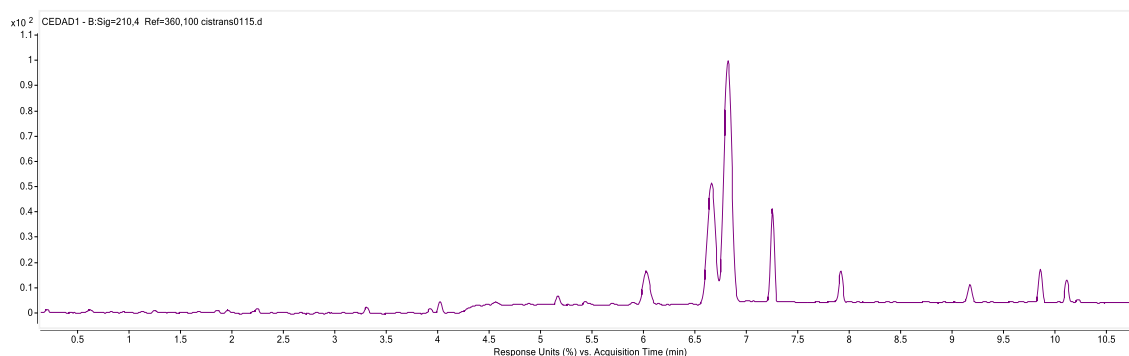
*Obr. 48 Separace cisplatiny a transplatiny v 50 mM fosfátu pH 7,0 + 0,1 mM DNA*

Se snižující se koncentrací DNA roste rozlišení obou derivátů do koncentrace 0,01 mM DNA, pak rozlišení klesá (obr. 49).



Obr. 49 Závislost rozlišení cisplatiny a transplatiny na koncentraci DNA

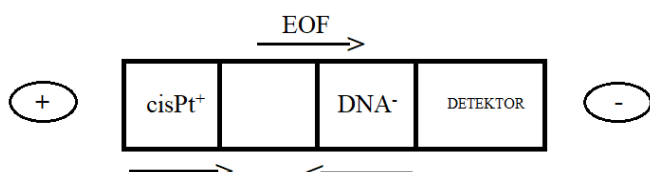
Nicméně i v tomto případě je možné po 4 hodinách pozorovat další píky v záznamu separace, viz obr. 50. Pravděpodobně může jít buď o produkty degradace cisplatiny a transplatiny nebo o adukty derivátů s DNA, které se uvolnily z DNA, která je např. vázána na vnitřní stěně kapiláry.



Obr. 50 Separace cisplatiny a transplatiny v 50 mM fosfátu pH 7,0 + 0,01 mM DNA

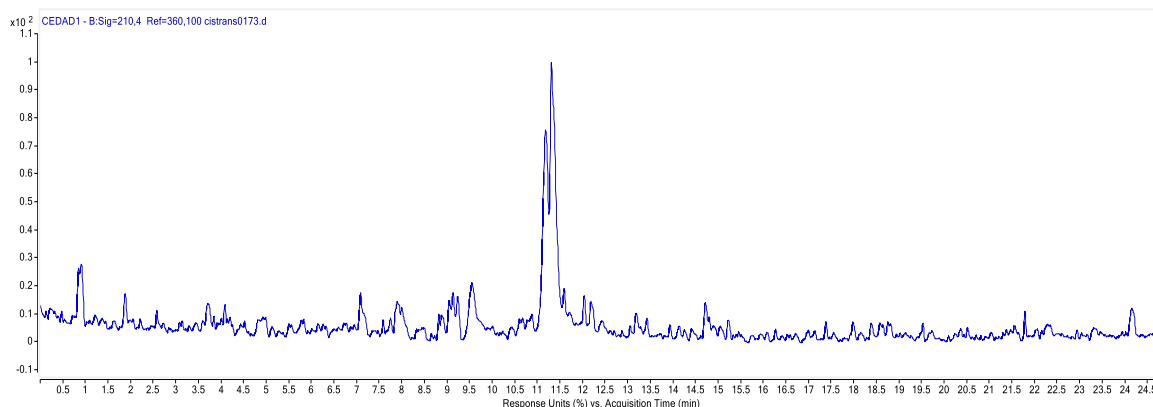
## 5.2 Diskontinuální dávkování

Pro zlepšení opakovatelnosti separace bylo testováno diskontinuální dávkování. Dávkování probíhalo postupně, dle následujícího obrázku 51. Po promytí kapiláry fosfátovým pufrém byl nejdříve dávkován roztok DNA ve fosfátovém pufru (10 s), pak pouze fosfátový pufr (5 s) a poté vzorek cisplatinu a transplatinu (5 s).



Obr. 51 Schéma diskontinuální dávkování pro kapilární zónovou elektroforézou

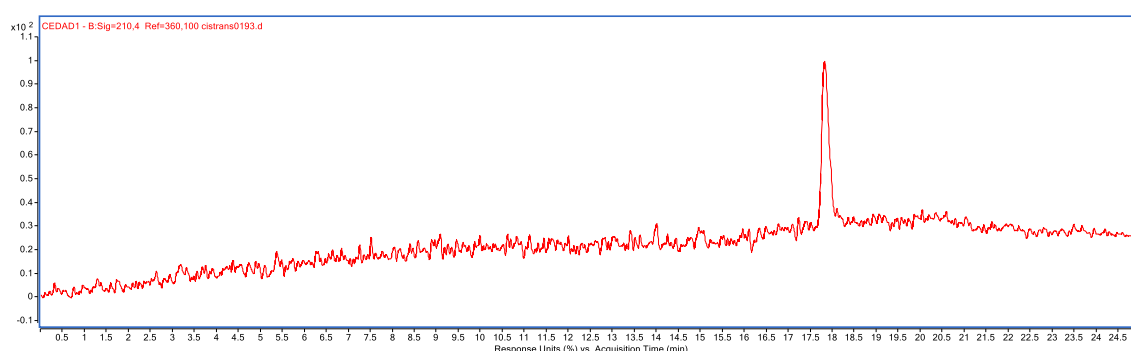
V tomto případě byl předpoklad, že DNA se nebude příliš vázat na kapiláru, resp. interakce DNA a derivátů platiny bude probíhat po omezenou dobu a tím bude více opakovatelná. Opět byla optimalizována koncentrace DNA a to v rozmezí  $10^{-8}$  mol/l až  $10^{-4}$  mol/l. Na obrázku 52 je ukázána úspěšná separace obou derivátů za použití  $10^{-7}$  mol/l DNA. Separace byla možná i v případě  $10^{-6}$  mol/l DNA, nicméně rozlišení bylo horší. Zároveň je ale nutné zmínit, že opakovatelnost separace v tomto diskontinuálním uspořádání byla daleko horší. Pravděpodobně přítomnost DNA v celém objemu kapiláry umožňuje stabilizaci podmínek pro interakci, kdežto v případě nadávkované zóny dochází k interakci náhodně a tím může vzniknout více komplexů derivátů platiny a DNA, což vede k horší opakovatelnosti analýz. Druhou variantou je, že DNA interaguje se stěnou kapiláry a značně tak ovlivňuje jak vlastní interakci, tak velikost elektroosmotického toku.



Obr. 52 Separace cisplatinu a transplatinu v 50 mM fosfátu pH 7,0 s diskontinuálně dávkovanou DNA o koncentraci  $10^{-7}$  mol/l

Jako poslední experiment bylo provedeno diskontinuální dávkování derivátů platiny v kapiláře s pokrytým vnitřním povrchem polyakrylamidem. V tomto uspořádání by měl být eliminován vliv EOF a sorpce na stěnu kapiláry. Hypoteticky by tedy měly být analýzy opakovatelnější. Nicméně pokud by důvodem menší opakovatelnosti analýz byla interakce mezi deriváty platiny a DNA, pak by tento krok neměl mít na opakovatelnost analýz vliv.

V případě použití pokrytých kapilár nedošlo k separaci cisplatinu a transplatinu i přes optimalizaci koncentrace DNA v rozmezí  $10^{-8}$  mol/l až  $10^{-4}$  mol/l. Navíc opakovatelnost záznamů byla srovnatelná s použitím nepokrytých kapilár. Ukázka analýzy je na obrázku 53.



Obr. 53 Analýza cisplatinu a transplatinu v 50 mM fosfátu pH 7,0 s diskontinuálně dávkovanou DNA o koncentraci  $10^{-6}$  mol/l

Jako nejlepší pro separaci cisplatinu a transplatinu se tedy jeví použití kontinuálního způsobu analýzy, kdy DNA je přítomna v celém objemu kapiláry a zároveň ve vstupní i výstupní víálce. Rozlišení 1,1 v 50 mM fosfátu pH 7,0 s 0,01 mM DNA je dostačující i pro úkoly forenzní kontroly preparátů cisplatinu. Pokud by se na trhu objevil preparát cisplatinu, který by vykazoval špatné vlastnosti (např. z pololegální syntetické laboratoře, resp. z laboratoře, kde nejsou dodrženy standardy výroby, např. ze syntetických laboratoří/firem v rozvojových zemích) je možné jej pomocí vyvinuté metody rychle zkontrolovat co do obsahu transplatinu (do 8 minut). Z forenzního pohledu by tedy bylo možné do 8 minut podat informaci o přítomnosti nečistoty a vyvodit z toho patřičné právní úkony ve vztahu k danému produktu, případně dodavateli či výrobci.

## 6 ZÁVĚR

Předložená diplomová práce si kladla za cíl rozseparovat cisplatinu a transplatinu pomocí kapilární elektroforézy. V práci bylo testováno použití různých elektrolytů (fosfát, HEPES, MES, borát) o různém pH a s přísávkami různých aditiv. Jako nejlepší se ukázal přísávek nízkomolekulární DNA, kdy vzhledem k rozdílné interakci transplatiny s DNA oproti cisplatině s DNA, došlo k jejich separaci. Dále byla optimalizována koncentrace DNA a bylo testováno diskontinuální uspořádání experimentu. Jako nejlepší pro separaci cisplatiny a transplatiny se jevílo použití kontinuálního způsobu analýzy, kdy DNA je přítomna v celém objemu kapiláry a zároveň ve vstupní i výstupní víálce. Rozlišení 1,1 v optimálním 50 mM fosfátu pH 7,0 s 0,01 mM DNA je dostačující i pro úkoly forenzní kontroly preparátů cisplatiny. Díky vyvinuté metodě by bylo možné do 8 minut podat informaci o přítomnosti nečistoty v preparátu a vyvodit z toho patřičné právní úkony ve vztahu k danému produktu, případně dodavateli či výrobci.

Závěrem lze říci, že kapilární zónová elektroforéza je nástroj vhodný pro separaci chemoterapeutických léčiv cisplatiny a její nečistoty transplatiny a je tedy vhodná i pro kontrolu ve forenzních vědách.



## 7 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] K. Kovka, Objev, který hodně překvapil! Jak dlouho provází lidstvo rakovina? 24. 3. 2019 dostupné z: <https://veda.instory.cz/objevy/369-objev-ktery-hodne-prekvapil-jak-dlouho-provazi-lidstvo-rakovina.html>
- [2] ČTK, Rakovina není choroba moderní doby, lidé ji trpěli už před miliony let. 24. 3. 2019, dostupné z: <https://zpravy.aktualne.cz/zahranici/rakovina-neni-choroba-moderni-doby-lide-ji-trpeli-uz-pred-mi/r~3d0d92806c5311e683920025900fea04/?redirected=1553424007>
- [3] Národní onkologický ústav, Česká republika a rakovina v číslech, 24. 3. 2019, dostupné z: <https://www.linkos.cz/narodni-onkologicky-program/co-musite-vedet/ceska-republika-a-rakovina-v-cislech/>
- [4] V. Kašička, Teoretické základy a separační principy kapilárních elektromigračních metod, Chem. Listy 91 (1997) 320–329.
- [5] K. Štulík, Analytické separační metody, Praha: Karolinum 2004.
- [6] Agilent Technologies: High performance capillary electrophoresis: An Introduction 2000.
- [7] Kapilární elektroforéza, 24. 2. 2019 dostupné z: <http://www.amedis.cz/laboratorni-technika/kapilarni-elektroforeza/>.
- [8] J. Pazourek, Moderní elektroforetické analytické metody. Přednášky pro magisterské studium. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita v Brně, Ústav chemických léčiv, [online] (2003)
- [9] P. Schmitt-Kopplin, M. Frommberger, Capillary electrophoresis-mass spektrometry: 15 years of developments and applications, Electrophoresis 24 (2003) 3837-3867.
- [10] D. Baron Charakterizace nanoobjektů pomocí kapilárních elektromigračních technik. Diplomová práce, Univerzita Palackého, Olomouc 2014.
- [11] P. Camilleri, Capillary electrophoresis: theory and practice, 2.vydání, CRC Press LLC, USA (1998).

- [12] D. Baker, Capillary electrophoresis. New York: Wiley 1995.
- [13] P. Coufal, Capillary Zone Electrophoresis, 23. 2. 2019, dostupné z: <https://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/cze.html>
- [14] K. Cammann, W. Kleiböhmer, E. Mussenbrock, B. Rob, F. Zuther, Fast chromatographic separation techniques as competitors to chemical and biochemical sensor systems, Analytical Chemistry 5 (1994) 349:338-345
- [15] M. Švidrnoch, Analýza ethylenglukuronidu pomocí kapilární elektroforézy s hmotností spektrometrií, diplomová práce, Univerzita Palackého, Olomouc 2012.
- [16] UV/VIS HPLC detektory, 28. 2. 2019, dostupné z: [http://www.hplc.cz/Teorie/UV\\_VIS\\_detector.html](http://www.hplc.cz/Teorie/UV_VIS_detector.html)
- [17] Elektrochemické HPLC detektory, 2. 3. 2019, dostupné z : [http://www.hplc.cz/Teorie/EC\\_detector.html](http://www.hplc.cz/Teorie/EC_detector.html).
- [18] K. Pecková, V. Mocko, F. OPeckar, M. Greg Swain, J. Zima, J. Barek, Miniaturized Amperometric Detectors for HPLC and Capillary Zone Electrophoresis, Chem. Listy 100 (2006) 124-132.
- [19] Vodivostní HPLC detektory, 3. 3. 2019 dostupné z: [http://www.hplc.cz/Teorie/COND\\_detector.html](http://www.hplc.cz/Teorie/COND_detector.html)
- [20] R. Norková, R. Jaklová Dyrtrtová, V. Kašička, Ionizační techniky a rozhraní pro spojení kapilárních elektromigračních metod s hmotnostně spektrometrickou detekcí., Chem. Listy 107 (2013) 949-955.
- [21] J. E. Maxwell, D. D. Y. Chen, Twenty years of interface development for capillary electrophoresis – electrospray ionization – mass spektrometry, Analytical Chimica Acta 627 (2008) 25-33.
- [22] Z. Holzbecher, J. Churáček a kol., Analytická chemie. Praha: SNTL – Nakladatelství technické literatury 1987.
- [23] P. Pantůčková, P. Gebauer, P. Boček, L. Křivánková, Electrolyte systems for on-line CE-MS: Detection requirements and separation possibilities, Electrophoresis 30 (2009) 203-214.

- [24] Ionizační technika, 4. 3. 2019, dostupné z: [http://holcapek.upce.cz/teaching/02\\_Ionizacni\\_techniky.pdf](http://holcapek.upce.cz/teaching/02_Ionizacni_techniky.pdf)
- [25] Spojení MS a separačních technik, 5. 3. 2019, dostupní z: [http://holcapek.upce.cz/teaching/06\\_Spojeni\\_MS\\_separace.pdf](http://holcapek.upce.cz/teaching/06_Spojeni_MS_separace.pdf) [cit. 2019-03-05].
- [26] G. Jong, Capillary electrophoresis – Mass Spectrometry (CE-MS): Principles and Applications. Weinheim: Wiley-Vch 2016.
- [27] M. Sefrtová, M. Řezáčová, Molekulární mechanismy účinku cisplatin, 11. 3. 2019, dostupné z: <https://zdravi.euro.cz/clanek/postgradualni-medicina/molekularni-mechanismy-ucinku-cisplatin-455575>.
- [28] CISPLATIN KABI, 11. 3. 2019, dostupné z: <http://www.sukl.cz/>
- [29] P. Štarha, Z. Trávníček, Protinádorově účinné komplexy přechodných kovů: Historie a současnost, Chem. Listy 112 (2018) 412-420.
- [30] J. Štefánek, Cisplatin, 12. 3. 2019, dostupné z: <https://www.stefajir.cz/?q=cisplatina>.
- [31] H. Ehersson, I. B. Wallin, A. Andersson, Cisplatin, Transplatin, and Their Hydrated Complexes: Separation and Identification Using Porous Graphitic Carbon and Electrospray Ionization Mass Spectrometry, Anal. Chem. 75 (2003) 5847-5853.
- [32] J. Klener, J. Klener jr., Nová protinádorová léčiva a léčebné strategie v onkologii. Praha: Grada, 2010.
- [33] M. Cui, L. Ding, Z. Mester, Separation of Cisplatin and Its Hydrolysis Products Using Electrospray Ionization High-Field Asymmetric Waveform Ion Mobility Spectrometry Coupled with Ion Trap Mass Spectrometry. Anal. Chem. 75 (2003) 5847-5853
- [34] S. Nafisi, Z. Norouzi, A comparative study on the interaction of cis- and trans-platin with DNA and RNA. DNA and Cell Biology 28 (2009) 469-77.
- [35] M. Coluccia, G. Natile, Trans-platinum complexes in cancer therapy, Anti-Cancer Agents in Medical Chemistry, 7 (2007).

- [36] P. Heringova, J. Woods, F. S. Mackay, J. Kasparkova, P. J. Sadler, V. Brabec, Transplatin is cytotoxic when photoactivated enhanced formation of DNA cross-links, *J. Med. Chem.* 49 (2006) 7792-7798.
- [37] Cisplatin (účinná látka) 18. 3. 2019, dostupné z: <https://www.linkos.cz/slovnicek/cisplatina-ucinna-latka/>.
- [38] S. Nussbaumer, S. Fleury – Souverain, J. Schappler, S. Rudaz, J. L. Veuthey, P. Bonnabry, Quality control of pharmaceutical formulations containing cisplatin, carboplatin, and oxaliplatin by micellar and microemulsion electrokinetic chromatography (MEKC, MEEKC), *J. Pharm. Biomed Anal.* 55 (2011) 253-258.
- [39] 28. 3. 2019, <https://petrlab.upol.cz/photogallery>

## 8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

CE	kapilární elektroforéza
CZE	kapilární zónová elektroforéza
CITP	izotachoforéza
CIEF	izoelektrická fokusace
CGE	kapilární gelová elektroforéza
MEKC	elektrokinetická chromatografie
CEC	kapilární elektrochromatografie
EOF	elektroosmotický tok
BGE	základní elektrolyt
UV	ultrafialový
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
SDS	dodecyl síran sodný
MES	kyselina 2-(N-morfolino)-ethansulfonová
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
CTAB	cetyl trimethylammonium bromide
TWEEN	polyoxyethylensorbitan
TFA	kyselina trifluoroctová
PAL	povrchově aktivní látky
CMC	kritická micelární koncentrace
DAD	detektor diodového pole
CCD	charge coupled detector
MS	hmotnostní spektrometrie
ESI	ionizace elektrosprejem
APCI	ionizace elektrosprejem za atmosférického tlaku
APPI	chemická ionizace za atmosférického tlaku
MALDI	ionizace elektrosprejem za účasti matrice
CHES	N-Cyclohexyl-2-aminoethanesulfonová kyselina
TRIS	tris(hydroxymethyl)aminoethan
DNA	deoxyribonukleová kyselina
AAS	atomová absorpční spektrometrie
AES	atomová emisní spektrometrie
ICP – MS	hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem