

# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Fakulta přírodovědecká

Katedra analytické chemie

## ANALÝZA OPTICKÝCH ISOMERŮ KAPILÁRNÍMI ELEKTROMIGRAČNÍMI TECHNIKAMI

### DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor práce:  
Studijní obor:

Petra Švecová  
Analytická chemie

Vedoucí diplomové práce:

doc. RNDr. Jan Petr, Ph.D.

Olomouc 2016

## **Souhrn**

Tato diplomová práce se zabývá chirální separací léčiva cetirizinu s ohledem na použití vysokých koncentrací borátu sodného jako pufru.

V teoretické části jsou popsány základy kapilární elektroforézy, principy chirální separace, jednotlivé typy chirálních selektorů, sulfatovaný  $\beta$ -CD, cetirizin a látky používané jako aditiva do borátového pufru: glukosa, xylosa, fruktosa, mannitol a aminopropandiol.

Experimentální část se v první řadě zabývá studiem vlivu koncentrace borátu sodného na separaci cetirizinu. Dále se zabývá studiem vlivu různého pH a přísadů glukosy, fruktosy, xylosy, mannitolu a aminopropandiolu na chirální separaci a v neposlední řadě je zkoumán vliv různé koncentrace chirálního selektoru na separaci.

## Summary

This thesis deals with the chiral separation of drug cetirizine with respect to the use of high concentrations of sodium borate buffer.

The theoretical part describes the basics of capillary electrophoresis, principles of chiral separation, different types of chiral selectors, sulfated- $\beta$ -CD, cetirizine and substances used as additives in borate buffer: glucose, xylose, fructose, mannitol and aminopropanediol.

Experimental part primarily studies the influence of concentration of sodium borate in a separation of cetirizine. Further part studies the effect of different pH of 500 mM sodium borate and the addition of glucose, fructose, xylose, mannitol and aminopropanediol in a chiral separation and last but not least, the effects of various concentrations of the chiral selector used for separation.

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.....

.....  
Vlastnoruční podpis

Chtěla bych poděkovat svému vedoucímu práce doc. RNDr. Janu Petrovi, Ph.D., za jeho odborné vedení a pomoc při zpracování diplomové práce.

# OBSAH

<b>1 ÚVOD .....</b>	<b>8</b>
<b>2 TEORETICKÁ ČÁST .....</b>	<b>9</b>
2.1 Kapilární elektroforéza (CE).....	9
2.1.1 Elektroforetická mobilita.....	10
2.1.2 Elektroosmotický tok (EOF) .....	13
2.1.3 Instrumentace CE .....	15
2.1.3.1 Napájení .....	15
2.1.3.2 Kapiláry.....	15
2.1.3.3 Dávkování vzorku .....	16
2.1.3.4 Termostatování.....	18
2.1.3.5 Detekce.....	18
2.1.4 Módy CE.....	21
2.1.4.1 Kapilární zónová elektroforéza (CZE).....	21
2.1.4.2 Micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC).....	23
2.1.4.3 Kapilární izotachoforéza (CITP).....	24
2.1.4.4 Kapilární isoelektrická fokusace (CIEF).....	24
2.1.4.5 Kapilární gelová elektroforéza (CGE) .....	25
2.1.4.6 Kapilární elektrochromatografie (CEC).....	25
2.1.5 Parametry elektroforetické separace.....	26
2.2 Chirální separace.....	28
2.2.1 Isomerie .....	28
2.2.2 Mechanismus chirální separace .....	29
2.2.3 Chirální selektory (CS).....	30
2.2.3.1 Cyklodextriny (CD).....	30
2.2.3.2 Chirální Crown ethery .....	32
2.2.3.3 Makrocyclická antibiotika.....	32
2.2.3.4 Chirální povrchově aktivní látky.....	33
2.2.3.5 Chirální komplexy kovů.....	33
2.2.3.6 Přírodní a syntetické polymery .....	34
2.2.4 Sodná sůl sulfátovaného $\beta$ -CD (S- $\beta$ -CD).....	34
2.2.5 Cetirizin .....	35
2.2.6 D-(+)-Glukosa .....	36
2.2.7 D-(+)-Xylosa .....	37

2.2.8	D-(-)-Fruktosa.....	37
2.2.9	D-Mannitol .....	38
2.2.10	(S)-3-Amino-1,2-propandiol.....	38
2.3	Aplikace CE ve forenzní analýze.....	39
2.4	Cíle práce .....	40
<b>3</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....</b>	<b>41</b>
3.1	Přístrojové vybavení .....	41
3.2	Chemikálie .....	41
3.3	Experimentální podmínky.....	41
3.3.1	Příprava vzorku cetirizinu .....	42
3.3.2	Příprava roztoků elektrolytů .....	42
<b>4</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE .....</b>	<b>43</b>
4.1	Chirální separace <i>R,S</i> -cetirizinu.....	43
4.1.1	Vliv koncentrace borátu sodného pH 9,5 .....	43
4.1.2	Vliv pH 500 mM borátu sodného .....	46
4.1.3	Vliv pH 50 mM borátu sodného .....	48
4.1.4	Vliv pH 500 mM borátu + glukosa.....	50
4.1.5	Vliv koncentrace glukosy .....	53
4.1.6	Vliv koncentrace xylosy .....	54
4.1.7	Vliv koncentrace fruktosy .....	56
4.1.8	Vliv koncentrace D-mannitolu .....	57
4.1.9	Vliv pH 500 mM borátu + (S)-3-amino-1,2-propandiol.....	58
4.1.10	Vliv koncentrace S-β-CD .....	60
4.1.11	Rozsah koncentrací borátu sodného pH 9,5 a 8,5.....	61
4.1.12	Rozsah koncentrací borátu pH 9,5 + 20 mg·ml <sup>-1</sup> CD .....	62
<b>5</b>	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>64</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURA.....</b>	<b>65</b>
<b>7</b>	<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ .....</b>	<b>69</b>

# 1 ÚVOD

Řada chemických látek, jako jsou konzervanty, pesticidy a na prvním místě léčiva, je opticky aktivní. Jejich isomery se mohou lišit v biologických vlastnostech. Např. v případě limonenu má jeho L-isomer citronové aroma a D-isomer pomerančové aroma. Zajímavějším a mnohem nebezpečnějším faktem je však to, že v případě léčiv může být jeden isomer neaktivní a v horším případě i toxický. Příkladem může být thalidomid jehož S-isomer má teratogenní účinky a nebo ethambutol jehož R, R-isomer vyvolává slepotu. Z tohoto důvodu je důležité mít k dispozici techniky, které jsou schopné tyto isomery odlišit<sup>1</sup>.

Existují čtyři preferované techniky pro separaci enantiomerů: plynová chromatografie (GC), vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC), superkritická fluidní chromatografie (SFC) a v neposlední řadě kapilární elektroforéza (CE)<sup>2</sup>. V posledních dvaceti letech je stále častější zájem o použití právě CE k separaci enantiomerů díky její univerzálnosti, vysoké separační účinnosti a nízké spotřebě reagensů a vzorku<sup>3</sup>.

Borát sodný je často používán jako pufr v kapilární elektroforéze. Je schopný formovat komplexy s hydroxy sloučeninami ve vodném prostředí<sup>4</sup>. Mezi sloučeniny schopné tvořit komplexy s borátem patří sacharidy, jako jsou glukosa, fruktosa, xylosa, arabinosa a řada dalších<sup>5</sup>. Dále pak tvoří komplexy s borátem jednoduché dioly např. ethan-1,2-diol nebo propan-1,3-diol<sup>6</sup> a dále je borát schopný tvořit komplexy s alditoly speciálně s mannitolem<sup>5</sup>. Tyto komplexační vlastnosti borátu sodného mohou mít pozitivní účinky na chirální separace. A právě studium těchto komplexačních vlastností borátu sodného a jejich vlivu na chirální separace je náplní této diplomové práce.



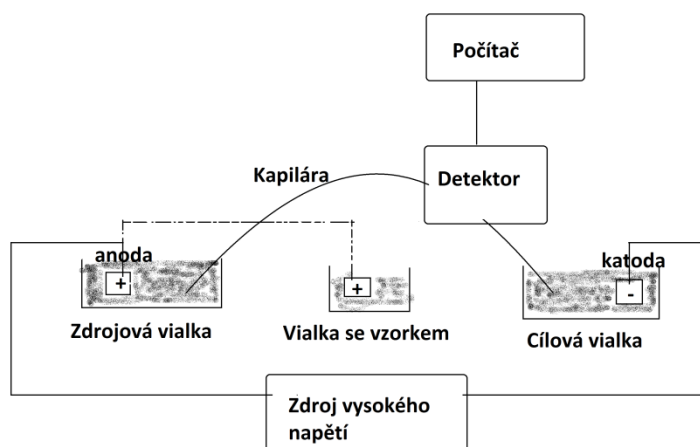
## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Kapilární elektroforéza (CE)

Kapilární elektroforéza je sice relativně nová technika pro separace a analýzy chemických sloučenin, ale v posledních letech se stává stále více používanou technikou<sup>7</sup>.

CE doplňuje řadu separačních technik, jako jsou vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC), plynová chromatografie (GC) a desková gelová elektroforéza. Kapilární elektroforéza má oproti těmto technikám výhody. Mezi tyto výhody patří vyšší účinnost, rychlejší separace a menší spotřeba reagensů. CE může být použita pro analýzy polárních iontových a neiontových sloučenin, nepolárních neiontových sloučenin, biomolekul a chirálních látek<sup>7</sup>.

Kapilární elektroforéza je založena na pohybu elektricky nabitých částic nebo molekul ve vodivém kapalném médiu vlivem elektrického pole. CE může probíhat podle jednoduchého schématu (Obr. 1), kdy konce kapiláry, která je naplněná puftrem, spojují vialky naplněné stejným puftrem. Do vialek jsou ještě vedeny elektrody, které je spojují se zdrojem vysokého napětí<sup>7</sup>. Po aplikaci napětí budou tedy ionty ze vzorku migrovat různými rychlostmi a směry v závislosti na jejich velikosti a náboji<sup>7</sup>.

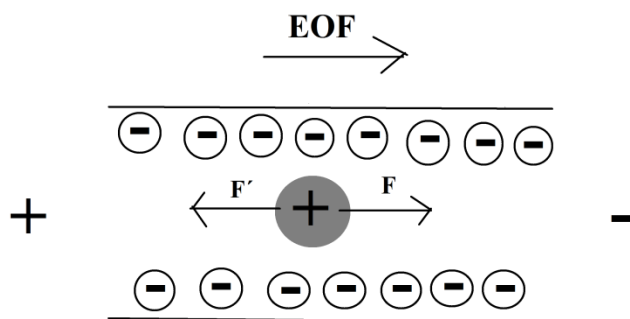


Obr. 1 Schéma CE

## 2.1.1 Elektroforetická mobilita

Vlivem elektrického pole budou elektricky nabitě analyty migrovat skrz kapiláru elektroforetickou rychlostí  $v_{EP}$ . Separace je dosáhnuta díky rozdílné rychlosti migrace analytů skrz kapiláru<sup>7</sup>.

V kapiláře naplněné separačním pufrem působí na ionty dvě síly. Jedna je síla elektrostatická  $F$  a druhá je síla třecí  $F'$ , která působí v opačném směru (Obr. 2). Během elektroforetické separace jsou tyto dvě síly v rovnováze. Elektrostatická síla  $F$  je závislá na náboji iontu  $q$  a na intenzitě elektrického pole  $E$  (Rov. 1). Intenzita el. pole je funkcí napětí vloženého na kapiláru a délky kapiláry. Třecí síla je podle Stokesova zákona pro sférické částice závislá na viskozitě roztoku  $\eta$ , poloměru iontu  $r$  a na elektroforetické rychlosti  $v_{EP}$  (Rov. 2)<sup>1</sup>.



Obr. 2 Síly působící na částici v kapiláře

$$F = qE = qU/L \quad [V \cdot cm^{-1}] \quad (1)$$

$$F' = -6\pi\eta r v_{EP} \quad [V \cdot cm^{-1}] \quad (2)$$

$$qE = 6\pi\eta r v_{EP} \quad (3)$$

U.....napětí

L.....délka kapiláry

E.....intenzita el. pole

q.....náboj iontu

$\eta$ .....viskozita pufru

r.....poloměr iontu

$v_{EP}$ .....elektroforetická rychlost<sup>1,7</sup>

(Rov. 3) popisuje rovnováhu mezi silami působící na částici v kapiláře<sup>1,7</sup>.

Abychom nezapomněli, tak elektroforetická mobilita  $\mu_{EP}$  je přímo úměrná náboji iontu  $q$  a nepřímo úměrná poloměru částice  $r$  a viskozitě roztoku  $\eta$  (Rov. 4)<sup>1</sup>.

$$\mu_{EP} = q/6\pi\eta r \quad [\text{cm}^2/\text{V}\cdot\text{s}] \quad (4)$$

$q$ ....náboj iontu  
 $\eta$ ....viskozita pufru  
 $r$ .... poloměr iontu<sup>1</sup>

Spojením rovnice pro výpočet elektroforetické mobility a rovnice vyjadřující rovnováhu mezi silami působící na částici dostaneme rovnici po elektroforetickou rychlost (Rov. 5)<sup>1, 7</sup>.

$$v_{EP} = \mu_{EP} \cdot E = \mu_{EP} \cdot U/L \quad [\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}] \quad (5)$$

$\mu_{EP}$ .....elektroforetická mobilita  
 $E$ .....intenzita el. pole  
 $U$ .....napětí  
 $L$ .....délka kapiláry<sup>1, 7</sup>

Rychlost molekul analytu je ovlivňována jak elektroforetickou mobilitou, tak elektroosmotickým tokem. Pozorovaná elektroforetická rychlost  $v_{obs}$  se tedy vypočítá jako součet elektroforetické a elektroosmotické rychlosti a pozorovaná elektroforetická mobilita  $\mu_{obs}$  jako součet elektroforetické a elektroosmotické mobility (Rov. 6 a 7)<sup>1, 7</sup>.

$$v_{obs} = v_{EP} + v_{EOF} \quad [\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}] \quad (6)$$

$$\mu_{obs} = \mu_{EP} + \mu_{EOF} \quad [\text{cm}^2/\text{V}\cdot\text{s}] \quad (7)$$

$v_{EOF}$ .....elektroosmotická rychlost  
 $\mu_{EOF}$ .....elektroosmotická mobilita  
 $v_{EP}$ .....elektroforetická rychlost  
 $\mu_{EP}$ .....elektroforetická mobilita<sup>1, 7</sup>

V kapilární elektroforéze má elektroforetická mobilita aniontů opačný směr než elektroosmotická mobilita, proto bude pozorovaná mobilita menší než elektroosmotická. Naopak u kationtů je směr elektroosmotické a elektroforetické mobility stejný a proto bude jejich pozorovaná mobilita větší než elektroosmotická. U neutrálních analytů je pozorovaná mobilita stejná jako elektroosmotická, protože mají nulovou elektroforetickou mobilitu<sup>1, 7</sup>.

## Měření elektroforetické rychlosti a mobility

Migrační čas je čas, který stráví analyt v kapiláře od jeho nástřiku až po jeho detekci v detektoru. Pozorovaná elektroforetická rychlost analytů je nepřímo úměrná migračnímu času a přímo úměrná efektivní délce kapiláry od začátku kapiláry po detektor (Rov. 8)<sup>7</sup>.

$$v_{\text{obs}} = l / t_m \quad [\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}] \quad (8) \quad \begin{array}{l} l \dots \dots \dots \text{efektivní délka kapiláry} \\ t_m \dots \dots \dots \text{migrační čas analytu}^7 \end{array}$$

Elektroosmotická rychlost může být vypočítána na základě (Rov. 9)<sup>7</sup>.

$$v_{\text{EOF}} = l / t_{\text{nm}} \quad [\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}] \quad (9) \quad \begin{array}{l} t_{\text{nm}} \dots \dots \dots \text{migrační čas neutrálního markeru} \\ l \dots \dots \dots \text{efektivní délka kapiláry}^7 \end{array}$$

Elektroforetická rychlost je dána rozdílem mezi pozorovanou elektroforetickou rychlostí a elektroosmotickou rychlostí (Rov. 10)<sup>7</sup>.

$$v_{\text{EP}} = l/t_m - l/t_{\text{nm}} \quad [\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}] \quad (10) \quad \begin{array}{l} l \dots \dots \dots \text{efektivní délka kapiláry} \\ t_m \dots \dots \dots \text{migrační čas analytu} \\ t_{\text{nm}} \dots \dots \dots \text{migrační čas neutrálního markeru}^7 \end{array}$$

Spojením rovnic (Rov. 5) a (Rov. 10) dostaneme vztah pro výpočet elektroforetické mobility (Rov. 11)<sup>7</sup>.

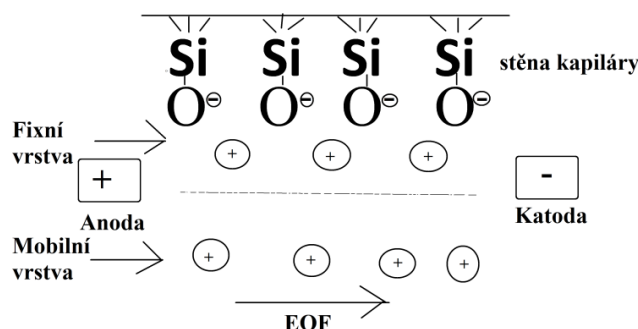
$$\mu_{\text{EP}} = (l/t_m - l/t_{\text{nm}}) (L/U) \quad [\text{cm}^2/\text{V} \cdot \text{s}] \quad (11) \quad \begin{array}{l} L \dots \dots \dots \text{délka kapiláry} \\ U \dots \dots \dots \text{napětí}^7 \end{array}$$

Na základě těchto rovnic můžeme určit, jaké parametry ovlivňují elektroforetickou mobilitu<sup>7</sup>. Z (Rov. 4) můžeme vidět, že cokoliv co ovlivňuje náboj, velikost molekuly anebo viskozitu pufru, může vyvolat změnu elektroforetické mobility. Některé parametry mohou

ovlivnit jak elektroforetickou mobilitu, tak elektroosmotický tok. Např. změna pH a nebo změna viskozity pufru může ovlivnit oba tyto parametry<sup>7</sup>.

## 2.1.2 Elektroosmotický tok (EOF)

Při nadávkování pufru do kapiláry dochází k nabití jejího povrchu a to buď v důsledku ionizace povrchu kapiláry anebo adsorpce iontů z pufru na stěnu kapiláry. V případě křemenné kapiláry jsou povrchové silanolové skupiny ionizovány na negativně nabitě silanoátové skupiny při pH pufru nad 3,0. Negativně nabitě skupiny potom přitahují pozitivně nabitě kationty z pufru a tím se vytvoří vnitřní (fixní) vrstva kationtů u stěny kapiláry. Dále se vytvoří vnější (mobilní) vrstva kationtů, a když vložíme elektrické pole na kapiláru tak se mobilní vrstva kationtů pohybuje směrem k negativně nabitě katodě. Jelikož jsou tyto kationty solvatované, tak unášejí celý roztok sebou směrem ke katodě (Obr. 3)<sup>1,7</sup>.



Obr. 3 Průběh EOF

Rychlost elektroosmotické toku  $v_{EOF}$  a elektroosmotickou mobilitu  $\mu_{EOF}$  můžeme vypočítat na základě rovnic (Rov. 12 a Rov. 13)<sup>1,7</sup>.

$$v_{EOF} = \epsilon \zeta E / 4\pi \eta \quad [\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}] \quad (12)$$

E.....intenzita el. pole

$$\mu_{EOF} = \epsilon \zeta / 4\pi \eta \quad [\text{cm}^2 / \text{V} \cdot \text{s}] \quad (13)$$

$\epsilon$ .....dielektrická konstanta pufru

$\zeta$ .....zeta potenciál

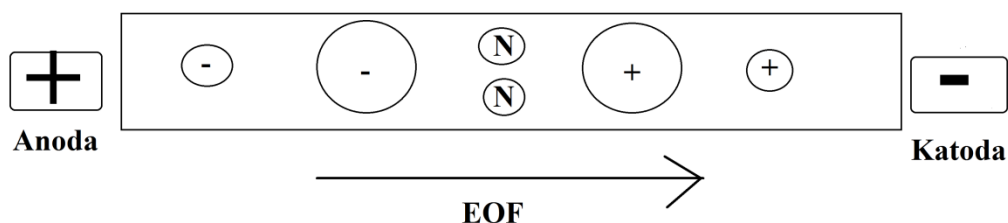
$\eta$ .....viskozita pufru<sup>1,7</sup>

Na základě těchto rovnic můžeme určit, co ovlivňuje EOF<sup>7</sup>.

Aplikované napětí	Zvyšující napětí zvyšuje rychlost EOF <sup>7</sup>
pH pufru	Zvyšující pH pufru zvyšuje EOF <sup>7</sup>
Koncentrace, iontová síla pufru	Zvýšení koncentrace a iontové síly snižuje EOF <sup>7</sup>
Teplota	Zvyšující teplota zvyšuje EOF <sup>7</sup>
Přídavek organického rozpouštědla	Přídavek organického rozp. může jak zvýšit tak snížit EOF a závisí to na změně viskozity, dielektrické konstanty a zeta potenciálu, kterou vyvolá dané rozpouštědlo <sup>7</sup>
Chemická modifikace stěny kapiláry	Modifikací stěny kapiláry můžeme redukovat, eliminovat EOF <sup>7</sup>

Nabitě molekuly analyzovaných látek jsou separovány na základě rozdílné elektroforetické mobility a budou migrovat k elektrodě opačného náboje, než mají ony sami. Negativně nabitě molekuly jsou přitahovány k pozitivně nabitě anodě a bez EOF nebudou procházet kapilárou a detektorem, ale v případě, že je EOF větší než elektroosmotická mobilita negativně nabitých molekul, budou tyto molekuly EOF tokem unášeny směrem ke katodě a přes detektor<sup>7,8</sup>. Pozitivně nabitě molekuly migrují k negativně nabitě katodě působením jak EOF, tak elektroosmotické mobility a pohybují se tedy rychleji než EOF. Neutrální molekuly se pohybují kapilárou rychlostí EOF toku, jelikož nejsou ovlivňovány elektroforetickou mobilitou<sup>7</sup>.

Výhodou tedy je, že můžeme najednou analyzovat kationty, anionty a neutrální molekuly analytů. Nabitě molekuly jsou od sebe separovány vlivem různé elektroforetické mobility. Neutrální molekuly jsou odděleny od nabitých, ale neoddelíme je od sebe navzájem. Pro oddělení neutrálních molekul musíme použít jinou techniku např. micelární elektrokinetickou kapilární chromatografii. Jako první tedy migrují kapilárou kationty, dále nerozdělené neutrální molekuly a nakonec anionty (Obr. 4)<sup>7</sup>.



Obr. 4 Migrace kationtů, aniontů a neutrálních molekul v kapiláře

### 2.1.3 Instrumentace CE

Od roku 1988 jsou k dispozici komerční přístroje a počet jejich výrobců roste<sup>9</sup>. Přístroje od různých výrobců se nijak zásadně neliší a to díky velmi jednoduchému separačnímu principu CE. Vývoj lze očekávat v oblasti dávkování vzorku a v počtu a typech detektorů<sup>10</sup>.

#### 2.1.3.1 Napájení

Komerční přístroje by měly mít napětí nastavitelné v rozsahu od -30 kV do +30 kV a udržovat nastavenou hodnotu napětí pokud možno konstantní. Diagram napětí nebo křivka proudu poskytují náznaky možného rušení během analýzy a mohou být prospěšné pro „troubleshooting“<sup>10</sup>.

#### 2.1.3.2 Kapiláry

Na počátcích vývoje CE byly jako materiály pro výrobu kapilár používány teflon nebo pyrexové sklo. Postupem času byly tyto materiály nahrazeny taveným křemenem. Teflonové kapiláry jsou stále používány v izotachoforéze, naopak kapiláry z pyrexu se už dlouho nepoužívají z důvodu jejich neprostupnosti pro elektromagnetické záření nižší než 280 nm. Nejvíce používané jsou křemenné kapiláry a to díky jejich výborné prostupnosti pro UV záření<sup>1, 11</sup>.

Křemenné kapiláry jsou obaleny polyimidovou ochrannou vrstvou. Tato vrstva musí být při spektrofotometrické detekci odstraněna. Z vnější strany kapiláry se odstraňuje vrstva

polyimidu dlouhá 1-10 mm a tohle místo na kapiláře tvoří detekční okénko prostupné pro elektromagnetické záření<sup>1</sup>.

Kapiláry jsou dostupné o různých rozměrech. Nejčastěji jsou dostupné kapiláry o vnějším průměru 365–375 μm a vnitřním průměru 10-75 μm pro nepokryté kapiláry a 50-100 μm pro kapiláry pokryté stacionární fází<sup>1</sup>.

Kapiláry musí být termostatovány z důvodu rozptýlení Jouleova tepla. Existují dva způsoby termostatování. První od firmy Agilent, ve kterém je kapilára umístěna ve speciální kazetě, do níž je přiváděn vzduch a ve druhém např. od firmy Beckman Coulter je kapilára ochlazována kapalinou<sup>1</sup>.

### 2.1.3.3 Dávkování vzorku

Reprodukovatelné dávkování vzorku je jednou z nejdůležitějších věcí v CE. Zóna nadávkovaného vzorku by měla být tak malá, aby nedocházelo k jejímu rozmývání, proto se nejčastěji dávkuje velmi malé objemy vzorku v rozsahu od 2 do 20 nL<sup>10</sup>.

#### 2.1.3.3.1 Hydrodynamické dávkování

Vzorek je dávkován do kapiláry na základě rozdílného tlaku mezi vialkou se vzorkem a koncem kapiláry. Rozdíl tlaků je řádově několik mbarů a doba dávkování je řádově sekundy<sup>1,10</sup>. Tento způsob dávkování je vhodný pro nepokryté kapiláry<sup>10</sup>.

Množství nadávkovaného vzorku  $Q$  můžeme vypočítat na základě rovnice (Rov. 14)<sup>10</sup>.

$$Q = \Delta p \pi r^4 t_i c / 8 \eta L \quad (14)$$

$\Delta p$ .....rozdíl tlaků  
 $t_i$ .....doba dávkování  
 $r$ .....vnitřní poloměr kapiláry  
 $\eta$ .....viskozita vzorku  
 $c$ .....koncentrace vzorku  
 $L$ .....délka kapiláry<sup>10</sup>



### 2.1.3.3.2 Hydrostatické dávkování

Vzorek je dávkován na základě sifonového efektu, který je způsobený rozdílem výšek mezi vialkou obsahující vzorek a vialkou obsahující pufr. Rozdíl výšek je obvykle 5-10 cm a doba dávkování je obvykle 5-45 s<sup>10</sup>.

Množství nadávkovaného vzorku Q můžeme vypočítat na základě rovnice (Rov. 15)<sup>10</sup>.

$$Q = \rho g \pi r^4 \Delta h t_i c / 8 \eta L \quad (15)$$

$\Delta h$ .....rozdíl výšek  
 $t_i$ .....doba dávkování  
 $r$ .....vnitřní poloměr kapiláry  
 $\eta$ .....viskozita vzorku  
 $c$ .....koncentrace vzorku  
 $L$ .....délka kapiláry  
 $\rho$ .....hustota vzorku  
 $g$ .....gravitační zrychlení<sup>10</sup>

### 2.1.3.3.3 Elektrokinetické dávkování

Vzorek je dávkován do kapiláry pomocí vloženého elektrického pole<sup>1</sup>. Na vialku se vzorkem aplikujeme na krátkou dobu napětí a to vyvolá migraci vzorku do kapiláry<sup>10</sup>.

Tento způsob dávkování se používá hlavně při použití pokrytých kapilár, protože nízké tlaky při hydrodynamickém dávkování by nestačily pro naplnění kapiláry se stacionární fází. Tento způsob dávkování je také dobrý pro neutrální analyty, které se nadávkují díky EOF. Může být použit i pro nabitě molekuly, ale při jejich dávkování může docházet k diskriminaci díky jejich rozdílné mobilitě<sup>1, 10</sup>.

Množství nadávkovaného vzorku Q můžeme vypočítat na základě rovnice (Rov. 16)<sup>10</sup>.

$$Q = (\mu_p + \mu_{EOF}) \pi r^2 U_i t_i c / L \quad (16)$$

$U_i$ .....aplikované napětí  
 $t_i$ .....doba dávkování  
 $\mu_p, \mu_{EOF}$ ...mobility  
 $r$ .....vnitřní poloměr kapiláry<sup>10</sup>

#### **2.1.3.3.4 „Sample split“ systém**

„Sample split“ systém, který se používá v chromatografických technikách, se dá použít i v CE. V sample splitteru je ve středu dávkovací kapiláry větev, která ji spojuje se separační kapilárou. Po aplikaci dvou různých napětí na dávkovací a separační kapiláru se vzorek pohybuje ve dvou různých obvodech s dělicím poměrem daným poměrem proudů<sup>10</sup>.

#### **2.1.3.4 Termostatování**

Termostatování je nezbytné pro rozptýlení Jouleova tepla. V komerčních přístrojích jsou používány vzduchový a kapalinový termostat, které udržují teplotu v rozsahu od 15 do 60 °C. Jako chladicí kapalina může být používána voda jen za použití separačním potenciálů nižších než 15 kV, při vyšších potenciálech se musí používat dražší perfluorované uhlovodíky<sup>10</sup>.

#### **2.1.3.5 Detekce**

Jedním z nejrychleji se rozvíjejících aspektů CE je oblast detekce<sup>11, 12</sup>. Používá se několik způsobů detekce, které splňují následující podmínky. Koncentrace vzorku musí být menší než koncentrace pufru, jinak dojde ke změně vodivosti v zóně vzorku, což vede k nestejněměrné migraci a asymetrii zóny<sup>11</sup>. Dále musí být dávkovány velmi malé objemy vzorků kvůli malým průměrům kapilár<sup>12, 13</sup>.

Ve většině případů jsou analyty detekovány přímo v separační kapiláře (on-line způsob detekce). V ojedinělých případech s amperometrickým, konduktometrickým nebo hmotnostně spektrometrickým detektorem můžeme použít (off-line způsob detekce)<sup>10</sup>.

Nejběžnější způsoby detekce v CE jsou UV-vis, fluorescenční, refraktometrická a elektrochemická detekce a jako slibná se začíná jevit i hmotnostně-spektrometrická detekce<sup>11</sup>.

##### **2.1.3.5.1 Spektrofotometrická detekce**

Je jednou z nejvíce používaných způsobů detekce v CE z důvodů dobré prostupnosti kapiláry pro elektromagnetické záření, její univerzálnosti a relativně jednoduché výroby

spektrofotometrických detektorů. Nevýhodou použití tohoto detektoru je nízká citlivost detekce<sup>11, 14</sup>.

Předpokladem pro použití tohoto typu detektoru je schopnost analyzované látky absorbovat záření. Pro látky, které neabsorbují UV-Vis záření, se používá nepřímá detekce<sup>1, 7</sup>. Do roztoku pufru přidáme silně absorbující látku např. imidazol, chroman, ftaláty a při průchodu neabsorbujícího analytu přes detektor dojde k poklesu absorbance, což se projeví jako negativní píky v elektroferogramu<sup>1</sup>.

Pokud chceme použít tento typ detektoru, musíme zaprvé odstranit asi 1 cm dlouhý vnější polyimidový obal kapiláry a dále umístit kapiláru mezi konec štěrbinu monochromátoru a fotonásobič<sup>11, 15, 16, 17</sup>.

Komerčně jsou dostupné 2 typy detektorů. Detektor s variabilní vlnovou délkou (VWD), při němž jsme schopni sbírat data jen za použití jedné vlnové délky nebo detektor diodového pole (DAD), který je schopný snímat více vlnových délek najednou v rozsahu od 190 do 900 nm<sup>1, 13</sup>.

#### **2.1.3.5.2 Fluorescenční detekce**

Fluorescenční detekce je zajímavá z hlediska její vysoké citlivosti<sup>11, 18</sup>.

Fluorescence je jev, při kterém dochází k emisi elektromagnetického záření molekulami, které absorbovali elektromagnetické záření jiné vlnové délky. Sloučeniny schopné fluoreskovat se nazývají fluorofory. Pokud nejsou látky schopné fluoreskovat, můžeme provést jejich derivatizaci a nebo můžeme použít nepřímý způsob detekce jako u UV-vis detekce zmíněný výše<sup>11, 19, 20</sup>.

Analytickým signálem detektoru je intenzita fluorescence  $I_F$ , která je závislá na koncentraci analytu  $c$ . Z rovnice pro intenzitu fluorescence (Rov. 17) můžeme vidět, že je závislá také na intenzitě excitačního záření, proto je výhodné používat jako zdroj záření laser, který je charakteristický velkou intenzitou<sup>1</sup>.

$$I_F = K I_0 \varepsilon l c \quad (17)$$

$I_0$ .....intenzita excitačního záření

$\varepsilon$ .....absorpční koeficient

$l$ .....šířka absorpční vrstvy

$K$ .....rovnovážná konstanta<sup>1</sup>

Konvenčně se jako zdroje záření ve fluorescenčním detektoru používají deuteriová, wolframová nebo xenonová výbojka. Dále je součástí detektoru mřížkový monochromátor, který slouží k výběru vhodné excitační vlnové délky a fotonásobič, který snímá emitované vlnové délky záření<sup>11, 18</sup>.

Jak bylo zmíněno u rovnice pro výpočet intenzity fluorescence (Rov. 17), je výhodné jako zdroj záření ve fluorescenčním detektoru používat laser. Laserem indukovaná fluorescence (LIF) je nejvíce citlivá detekční technika v CE<sup>11</sup>. LIF s argonovým nebo KrF laserem se používá k detekci přírodních aminokyselin a restričních úseků DNA<sup>14</sup>. Dále se LIF používá pro detekci derivatizovaných aminokyselin<sup>15</sup>, amino cukrů<sup>21</sup> a primárních aminů<sup>22</sup>.

#### **2.1.3.5.3 Refraktometrická detekce**

Refraktometrická detekce se používá pro detekci látek, které neabsorbují elektromagnetické záření a ani nefluoreskují. Není to však moc používaný způsob detekce a to z důvodu jeho problematické miniaturizace, během které dochází ke snížení citlivosti detektoru<sup>1</sup>.

Principem detekce je měření změny indexu lomu analyzované látky oproti pufru<sup>1</sup>.

#### **2.1.3.5.4 Elektrochemická detekce**

Elektrochemická detekce se stává čím dál více používanější detekční metodou, protože v kontrastu se spektrofotometrickým způsobem detekce není elektrochemická detekce závislá na velikosti detekční cely a proto i za použití velmi malých objemů detekčních cel nedochází ke snižování citlivosti detekce<sup>11, 23</sup>.

Existují tři typy elektrochemických detektorů: potenciometrický, konduktometrický a amperometrický. Komerčně je používán hlavně konduktometrický detektor. U ostatních dvou detektorů je problém s životností a přípravou elektrod, které by měly mít průměr 75  $\mu\text{m}$  a menší<sup>1</sup>.

Konduktometrický detektor je považován za univerzální detektor a díky své konstrukci neovlivňuje tok kapaliny v kapiláře a nevede k rozšiřování zóny vzorku<sup>24</sup>. Detektor funguje na principu měření změn vodivosti mezi puftrem a zónou vzorku procházející skrz detektor.

Vzorek může mít větší vodivost než pufr a to se projeví pozitivními píky na elektroferogramu a nebo může mít nižší vodivost a to se projeví negativními píky na elektroferogramu<sup>1, 11</sup>.

#### **2.1.3.5.5 Hmotnostně spektrometrická detekce**

Hmotnostní spektrometr je univerzální a citlivý detektor. Bohužel tento typ detektoru není dostupný pro všechny typy laboratoří a to z důvodu jeho vysokých pořizovacích nákladů<sup>11</sup>.

Spojení kapilárních separačních technik s hmotnostním spektrometrem je výhodné díky malé rychlosti toku kapaliny skrz kapiláru (kolem  $1\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ ). Spojení je založeno buď na přímém elektrosprejování z konce kapiláry anebo se použije ještě navíc pomocný tok kapaliny kolem kapiláry<sup>11</sup>.

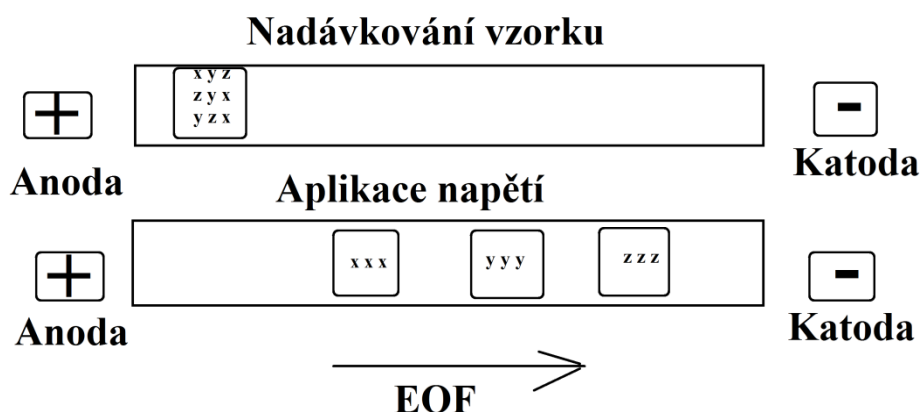
### **2.1.4 Módy CE**

#### **2.1.4.1 Kapilární zónová elektroforéza (CZE)**

CZE je široce rozšířený mód CE a to díky tomu, že se dá použít jak pro analýzu aniontů tak kationtů v jednom kroku a je to relativně jednoduchá technika<sup>7, 25</sup>.

V CZE je kapilára naplněna pufrém o konstantním složení a zdrojová a koncová vialka jsou naplněny stejným pufrém. To je v kontrastu s kapilární isoelektrickou fokusací (CIEF), kde je kapilára naplněna roztokem, který formuje pH gradient a kapilární izotachoforézou (ITP), kde je v kapiláře vedoucí a koncový pufr. Na rozdíl od kapilární gelové elektroforézy (CGE) je kapilára naplněna volným roztokem, takže nedochází k matricovým jevům. V některých případech však může docházet k interakci volného roztoku se stěnou kapiláry<sup>7, 25</sup>.

Průběh CZE separace je na (Obr. 5). Vzorek je nadávkován do kapiláry, která je naplněna roztokem pufru. Po vložení napětí na kapiláru rozpuštěné látky migrují skrz kapiláru různou elektroforetickou rychlostí jako zóny v závislosti na jejich elektroforetické mobilitě<sup>7</sup>.



Obr. 5 Průběh separace v CZE

EOF unáší analyty ve směru od anody ke katodě a pořadí eluce analytů v CZE je tedy následující: první migrují kationty, pak neutrální částice a nakonec anionty. Kationty migrují v kapiláře ve stejném směru jako EOF a jejich rychlost migrace je větší než EOF a na základě jejich poměru náboje k velikosti migrují jako první malé kationty. Anionty, které migrují v opačném směru než je EOF, migrují na základě opačného poměru náboje k velikosti, takže první migrují velké anionty<sup>7</sup>.

CZE může být použita k separaci téměř všech iontových sloučenin, které jsou rozpustné v pufru. CZE umožňuje separace od malých molekul<sup>25</sup> až po velké makromolekuly<sup>25, 26, 27</sup>. Byly popsány i případy separace ve vodě nerozpustných sloučenin za použití nevodných pufrů<sup>28, 29</sup>.

#### 2.1.4.1.1 Principy optimalizace v CZE

##### Vliv pH pufru

Efekt pH na transport analytů směrem k detektoru lze přičíst dvěma faktorům. Prvním faktorem je vliv pH na disociaci silanolových skupin na povrchu kapiláry a tím pádem i na velikost EOF a druhým faktorem je vliv pH na disociaci analytů v roztoku pufru. Optimalizuje se pH v rozmezí od 2,0 do 12,0. Vyšší a nižší hodnoty pH se nepoužívají, protože mají příliš velkou mobilitu  $\text{H}_3\text{O}^+$  a  $\text{OH}^-$  iontů a proto by se museli používat příliš

malé koncentrace pufrů a navíc tyto hodnoty pH špatně snášejí jak kapiláry, tak samotná instrumentace CE. To jsou hlavní důvody pro pH limitaci v CE<sup>10</sup>.

### **Vliv koncentrace pufru**

Vybraná koncentrace pufru by měla být dostatečně vysoká, aby bylo pH pufru během analýzy konstantní a aby nedocházelo k rozmývání zón během analýzy. Vyšší koncentrace pufru mohou být používány při menším vnitřním průměru kapiláry. Pro nejčastěji používané kapiláry o průměru 50  $\mu\text{m}$  se testuje rozmezí koncentrací od 10 do 100 mM<sup>10</sup>.

### **Výběr typu pufru**

Při výběru pufru musíme brát v potaz řadu faktorů. Zaprvé musí být podobná mobilita mezi ionty analytu a pufru, dále by měla být koncentrace pufru větší než koncentrace iontů analyzovaných látek. Potom by měl pufr mít nízkou UV absorpci při detekční vlnové délce, stálé pH a měl by být stabilní<sup>10</sup>.

#### **2.1.4.2 Micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC)**

MEKC se používá pro separaci neutrálních molekul, které nelze separovat v CZE, protože všechny neutrální molekuly mají stejnou rychlost jako EOF<sup>1,30</sup>.

Podle Terabeho můžeme MEKC přirovnat k chromatografii. MEKC obsahuje micelární „pseudostacionární fázi“ přidanou do roztoku pufru a ta interaguje s analyty na základě rozdělovacího mechanismu jako je tomu v chromatografii. EOF působí jako „chromatografická mobilní fáze“<sup>31</sup>.

Při MEKC se přidáním povrchově aktivních látek do pufru v požadované koncentraci, která je dostačující pro tvorbu micel (nadkritická micelární koncentrace), vytvoří micely<sup>1,32</sup>. Nejčastěji používanou povrchově aktivní látkou je aniontový dodecyl sulfát sodný (SDS)<sup>30</sup>.

Vytvořené aniontové micely SDS mají vnitřní hydrofobní a vnější hydrofilní část, která je záporně nabitá. Vlivem el. pole jsou micely taženy směrem k anodě ve směru opačném než je EOF. V alkalickém anebo neutrálním prostředí je však mobilita EOF větší než mobilita micel a micely díky tomu putují směrem ke katodě, ale rychlostí menší než je EOF<sup>1, 30</sup>.

Separace nastává na základě rozdílně silných interakcí mezi analyty a micelami. Čím silnější interakce mezi nimi bude, tím později bude analyt eluovat. Stručně čím více budou analyty polární, tím budou eluovat dříve a čím více budou nepolární, tím budou eluovat později<sup>1, 30</sup>.

#### **2.1.4.3 Kapilární izotachoforéza (CITP)**

CITP je elektroforéza realizovaná v diskontinuálním systému elektrolytů<sup>33</sup>. V CITP jsou používány dva různé elektrolyty. Vedoucí elektrolyt (LE), jehož ionty mají vyšší mobilitu než ionty vzorku a koncový elektrolyt (TE), jehož ionty mají nižší mobilitu než ionty vzorku. CITP probíhá za konstantního el. proudu a po aplikaci stejnosměrného elektrického pole dojde po určitém čase k vytvoření tzv. ustáleného stavu, ve kterém jednotlivé ionty vzorku putují stejnou rychlostí v bezprostředně sousedících diskrétních zónách mezi těmito elektrolyty<sup>33, 34</sup>.

Nejčastěji používaným detektorem při CITP je vodivostní detektor, jehož záznam má klasický stupňovitý charakter, kdy výška stupně odpovídá kvalitě separované látky a délka stupně je přímo úměrná její kvantitě<sup>33</sup>.

Jako nejčastěji používané ionty vedoucího a koncového elektrolytu se v analýze aniontů používají chloridové ionty v LE a citrátové ionty v TE a v analýze kationtů hydroxoniové ionty v LE a tetrabutylamoniové ionty v TE<sup>1</sup>.

#### **2.1.4.4 Kapilární isoelektrická fokusace (CIEF)**

Isoelektrická fokusace je dobře známá a široce rozšířená technika pro analýzu proteinů, peptidů a aminokyselin mající amfoterní charakter<sup>30</sup>.

CIEF separuje směsi látek na základě rozdílů v jejich isoelektrických bodech (pI). Po naplnění kapiláry směsí rozpouštědel a amfolytů se vytvoří pH gradient<sup>35</sup>. Bazický roztok (NaOH) je na katodickém konci a kyselý roztok (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) je na anodickém konci. Po vložení napětí nabitě amfolyty migrují kapilárou, dokud nedosáhnou oblasti jejich isoelektrického bodu a tam se zastaví. Tím se generuje pH gradient uvnitř kapiláry<sup>1, 30</sup>.



Po zafokusování jsou imobilizované zóny vyhnány směrem k detektoru hydrodynamickým tokem vyvolaným přetlakem nebo podtlakem u konců kapiláry anebo elektroelucí. Elektroeluce se vyvolá změnou složení anolytu (elektrodotový roztok u anody) a nebo katolytu (elektrodotový roztok u katody)<sup>32, 33, 36</sup>. Např. přidáním NaCl do jedné z vialok a tím dojde k nerovnováze v pH gradientu a migraci separovaných zón k detektoru<sup>30</sup>.

#### **2.1.4.5 Kapilární gelová elektroforéza (CGE)**

Tradiční gelová elektroforéza je zdaleka nejpoužívanější technika v biomedicině a biochemii pro separaci a charakterizaci proteinů, DNA sekvenování a mapování fragmentů DNA<sup>30</sup>.

CGE kombinuje principy deskové gelové elektroforézy s instrumentací a malým průměrem kapilár CZE<sup>37</sup>. V CGE je díky vkládanému vyššímu elektrickému poli rychlejší separace a také dochází lépe k rozptylování Joulova tepla oproti deskové gelové elektroforéze. Rozlišení a účinnost CGE je srovnatelná s CZE<sup>38, 39</sup>.

V CGE je kapilára naplněna gelem. Obvykle se jako gel používá polyakrylamidový/bisakrylamidový zesíťovaný polymer, lineární nezesíťovaný polyakrylamid a nebo dextran, agarosa a polyethylenoxid<sup>7</sup>.

Gel obsahuje póry a při průchodu nabitých molekul gelem se malé molekuly nezachytí a eluují se jako první a molekuly stejné nebo větší velikosti jako jsou póry se zachytí a eluují se později. Dochází teda k separaci molekul analytů na základě jejich velikosti<sup>7</sup>.

#### **2.1.4.6 Kapilární elektrochromatografie (CEC)**

CEC je technika analogická kapilární HPLC. V CEC je chromatografická stacionární fáze obsažena v kapiláře a interaguje s rozpuštěnými látkami podle obvyklého chromatografického separačního mechanismu. Mobilní fáze je na rozdíl od HPLC poháněna skrz kapiláru za pomoci EOF a ne tlakově hydrodynamickým tokem jako je tomu u HPLC. Výhodou tohoto způsobu pohánění mobilní fáze je dosažení vyšší účinnosti separace díky absenci laminárního toku mobilní fáze<sup>11, 30, 33</sup>.

## 2.1.5 Parametry elektroforetické separace

Parametry jsou migrační čas, účinnost, selektivita a rozlišení. Každý z těchto parametrů je ovlivňován jedním anebo více elektroforetickými parametry jako jsou napětí, elektroforetické mobility, délka kapiláry a EOF<sup>7</sup>.

### Migrační čas $t_m$

Migrační čas analytu je čas, který je potřebný pro transport analytu skrz kapiláru až po jeho detekci v detektoru a je dán následující rovnicí (Rov. 18)<sup>1, 7</sup>.

$$t_m = \frac{L_{\text{eff}} \cdot L_{\text{tot}}}{(\mu_{\text{EP}} + \mu_{\text{EOF}}) \cdot U} \quad (18)$$

$L_{\text{tot}}$ .....totální délka kapiláry  
 $L_{\text{eff}}$ .....efektivní délka kapiláry  
 $U$ .....napětí  
 $\mu_{\text{EP}}, \mu_{\text{EOF}}$ .....elektroforetické mobility<sup>1, 7</sup>

Z této rovnice vyplývá, že kratší kapiláry, vyšší napětí a vyšší mobility vedou ke zkrácení migračního času<sup>40</sup>.

### Účinnost $N$

Účinnost je stejně jako v chromatografických technikách vyjádřena počtem teoretických pater a je dána následující rovnicí (Rov. 19)<sup>41</sup>.

$$N = L^2 / \sigma^2 \quad (19)$$

$L$ .....délka kapiláry  
 $\sigma^2$ .....rozptyl<sup>41</sup>

Během migrace analytů skrz kapiláru může dojít k molekulární difúzi vedoucí k zvětšování rozptylu  $\sigma^2$  (Rov. 20)<sup>40</sup>.

$$\sigma^2 = 2DL / \mu_{\text{obs}} U \quad (20)$$

$D$ .....difúzní koeficient analytu  
 $\mu_{\text{obs}}$ .....zdánlivá mobilita

L.....délka kapiláry

U.....napětí<sup>40</sup>

Ze spojení těchto rovnic vyplývá, že zvýšením napětí zvýšíme účinnost a zmenšením zdánlivé mobility a zvětšením difúzního koeficientu snížíme účinnost<sup>1</sup>.

### Selektivita $\alpha$

Selektivita systému v případě CE může být vyjádřena rovnicí (Rov. 21)<sup>7</sup>. Z této rovnice plyne, že selektivita závisí na poměru elektroforetických mobilit analytů a tudíž efektivní cestou ke změně selektivity je změna pH pufru<sup>42</sup>.

$$\alpha = \frac{t_{m2} - t_{EOF}}{t_{m1} - t_{EOF}} = \mu_1 / \mu_2 \cdot \text{konst.} \quad (21) \quad t_{m2}, t_{m1}, t_{EOF} \dots \text{migrační časy analytů a EOF}$$

$\mu_1, \mu_2 \dots$  elektroforetické mobility analytů<sup>42</sup>

### Rozlišení $R_S$

Dobrého rozlišení je dosaženo, když je velký rozdíl mezi elektroforetickými mobilitami separovaných analytů. Rozlišení je definováno na základě rovnice (Rov. 22)<sup>40, 41</sup>.

$$R_S = \frac{1}{4} \cdot \frac{\Delta\mu_{\text{obs}}}{\mu_{\text{sr}}} \cdot \sqrt{N} \quad (22) \quad N \dots \text{počet teoretických pater}$$

$\Delta\mu_{\text{obs}} = \mu_2 - \mu_1$   
 $\mu_{\text{sr}} = (\mu_2 + \mu_1) / 2$   
 $\mu_1, \mu_2 \dots$  elektroforetické mobility analytů<sup>40, 41</sup>

Rozlišení může být tedy ovlivněno změnou délky kapiláry, změnou parametrů pufru anebo přidávkem organického rozpouštědla<sup>7</sup>.

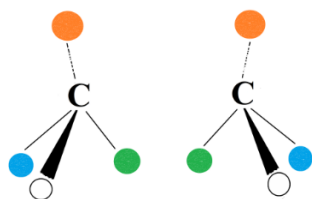
## 2.2 Chirální separace

### 2.2.1 Isomerie

Sloučeniny s identickým atomovým složením, ale rozdílnou strukturou jsou isomery. Rozlišujeme dva typy isomerie. Strukturní (konstituční) isomerie kde jsou jednotlivé atomy vázány různými vazbami a v různém pořadí a stereoisomerie kde jsou atomy stejně vázány, ale jsou různě prostorově uspořádány<sup>1</sup>.

Stereoisomery jsou dále rozděleny na geometrické a optické isomery. Geometrické isomery se liší v uspořádání substituentů kolem dvou uhlíkových atomů v kruhu nebo vázaných dvojnou vazbou. Takové sloučeniny nemohou být za normálních podmínek transformovány do sebe rotací kolem vazby a mají rozdílné fyzikálně chemické vlastnosti. Naopak optické isomery mají asymetrické centrum anebo asymetrický uhlíkový atom a jsou to chirální sloučeniny. Optické isomery mají dvě konfigurace, které jsou svým vzájemným zrcadlovým obrazem (Obr. 6) a nazývají se enantiomery. Tyto enantiomery mají identické fyzikálně chemické vlastnosti až na schopnost stáčet rovinu polarizovaného světla, kdy jeden enantiomer ji stáčí doprava a druhý doleva. Když však máme ekvimolární směs těchto enantiomerů (racemát), tak nedochází ke stáčení roviny polarizovatelného světla, takže mají všechny fyzikálně chemické vlastnosti stejné, proto je důležité umět tyto směsi separovat<sup>1, 43</sup>.

Řada chemických sloučenin jako jsou sloučeniny přírodního původu, aditiva do jídla, pesticidy a léčiva jsou opticky aktivní a jejich isomery se mohou lišit v biologických účincích. Např. S-isomer asparaginu je hořký a R-isomer je sladký. Důležitý je rozdíl v biologických účincích jednotlivých isomerů u léčiv. Např. jeden isomer může být biologicky aktivní a druhý neaktivní až toxický, proto je tak důležité umět tyto isomery účinně separovat<sup>1</sup>.

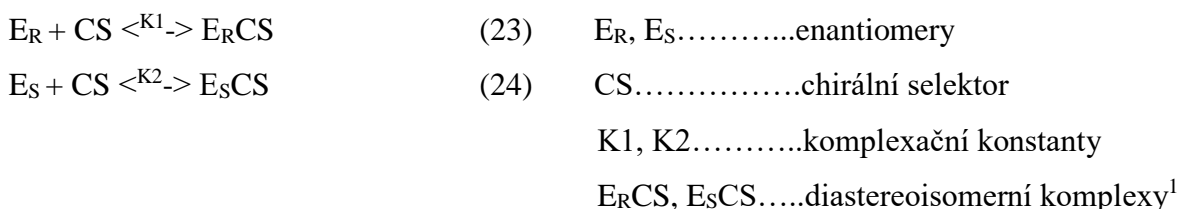


Obr. 6 Zrcadlové obrazy optických isomerů

## 2.2.2 Mechanismus chirální separace

Enantiomery mohou být separovány dvěma cestami. První cesta je za použití mikroorganismů nebo enzymů, které jsou schopny rozložit anebo přeměnit jen jeden z isomerů anebo přeměnit oba dva isomery na směs. Za tímto účelem se používají krystalizační, extrakční, chromatografické a stále častěji elektroforetické metody. Častější cestou je získání opticky čistých enantiomerů jejich separací z racemických směsí<sup>1, 44</sup>. Za tímto účelem se používají polarimetrické, imunologické, chromatografické techniky a kapilární elektroforéza<sup>1, 45, 46</sup>.

Chirální separace v CE dosáhneme na základě rozdílných mobilit enantiomerů. Jelikož však mají enantiomery stejný průměr a stejnou hustotu náboje a tím pádem i mobilitu, tak jejich separace v achirálním prostředí pufru nedosáhneme. Proto je nezbytné pro dosažení separace vytvořit chirální prostředí např. přidavkem chirální sloučeniny do roztoku pufru. Přidavkem chirální sloučeniny dojde ke vzniku tranzitních diastereomerních komplexů (Rov. 23 a 24) a to nám umožní separaci enantiomerů<sup>1, 47, 48</sup>.



Výpočet komplexačních konstant (Rov. 25 a 26)<sup>1</sup>.

$$K_1 = [E_RCS] / [E_R][CS] \quad (25)$$

$$K_2 = [E_SCS] / [E_S][CS] \quad (26)$$

Podmínkou vzniku separace enantiomerů je rozdílnost mezi jejich komplexačními konstantami a tato rozdílnost vede k rozdílné elektroforetické mobilitě diastereoisomerních komplexů podle rovnice (Rov. 27)<sup>49, 50</sup>.

$$\Delta\mu = (\mu^f - \mu^c) \Delta K [CS] / (1 + K_R[CS]) (1 + K_S[CS]) \quad (27)$$

$\mu^f$ .....mobilita enantiomeru

$\mu^c$ .....mobilita komplexu

CS.....chirální selektor

$K_R, K_S$ ...komplexační konstanty

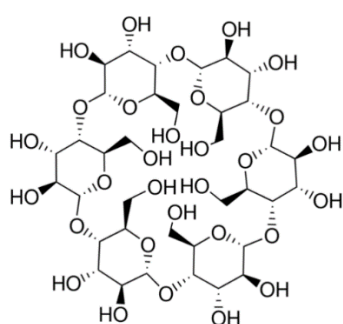
$\Delta K$ .....rozdíly komplexačních konstant<sup>1</sup>

### 2.2.3 Chirální selektory (CS)

Chirální selektory jsou opticky aktivní sloučeniny schopné formovat transitní diastereoisomerní komplexy s enantiomery za použití vodíkových, hydrofobních, dipól-dipólových,  $\pi$ - $\pi$  a van der Waalsových interakcí<sup>51</sup>.

Chirální selektory by měly mít velkou optickou čistotu, schopnost formovat diastereoisomerní komplexy, měly by být chemicky stabilní v roztocích pufrů a neovlivňovat způsob detekce. Z těchto důvodů se jako nejčastější chirální selektory volí cyklodextriny (CD) a jejich deriváty, chirální crown ethery, makrocyclická antibiotika, proteiny, polymery, chirální povrchově aktivní látky, polysacharidy a chirální komplexy kovů<sup>52, 53</sup>.

#### 2.2.3.1 Cyklodextriny (CD)



Obr. 7  $\alpha$ -CD<sup>54</sup>

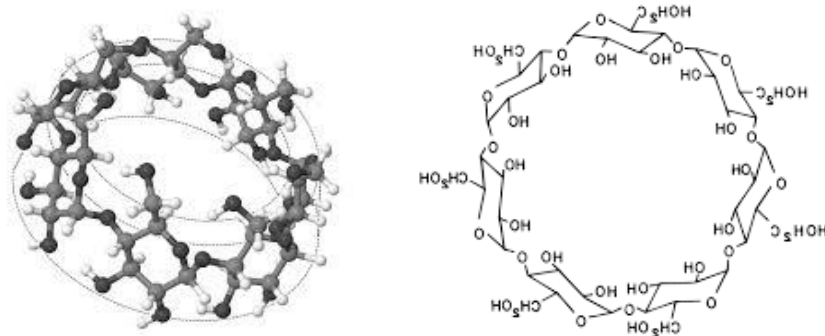
Cyklodextriny jsou chirální selektory, které se v posledních letech v kapilární elektroforéze používají nejvíce<sup>53</sup>. Jsou to cyklické oligosacharidy tvořené glukosovými

jednotkami, které jsou spojené  $\alpha$ -(1->4) glykosidickou vazbou. Přírodní  $\alpha$  (Obr. 7),  $\beta$ , a  $\gamma$  CD jsou tvořené 6, 7 a 8  $\alpha$ -D-glukopyranosovými jednotkami<sup>53, 55</sup>. CD s menším počtem glukosových jednotek než šest enzymaticky nevznikají kvůli značnému pnutí v kruhu, nicméně byl synteticky připraven cyklopentakis-[(1->4)- $\alpha$ -D-glukopyranosyl s pěti glukosovými jednotkami<sup>55, 56</sup>. CD s větším počtem glukosových jednotek než osm rovněž existují, ale jejich příprava a čištění jsou obtížné<sup>55,57</sup>.

První zmínka o CD byla publikována v roce 1891, kdy byla popsána izolace krystalické látky ze škrobu natráveného bakteriemi *Bacillus amylobacter*. Následně bylo ukázáno, že použitím teplotně odolných bakterií *Bacillus macerans* lze získat dvě složky, lišící se mimo jiné výslednou barvou jodového testu. Jejich cyklická struktura byla prokázána a jejich molekulové hmotnosti byly stanoveny koncem třicátých let dvacátého století<sup>55</sup>.

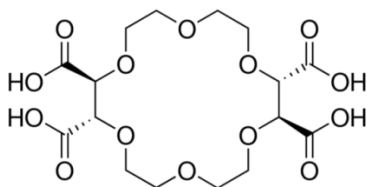
CD mají tvar useknutého komolého kuželu s vnitřní hydrofobní dutinou, jejíž šířka a hloubka umožňuje zahrnutí různě velkých hydrobních částí molekul analytů do této dutiny. Hydroxylové skupiny umožňující vznik vodíkových vazeb, jsou vně dutiny CD<sup>1, 51</sup>. Primární hydroxylové skupiny jsou na C6 uhlících glukosových jednotek na užším okraji CD a sekundární hydroxylové skupiny jsou na C2 a C3 uhlících glukosových jednotek na vnějším širším okraji CD (Obr. 8)<sup>55</sup>. Tato struktura CD umožňuje vznik komplexu mezi CD a enantiomerem. Komplex je stabilizován hydrofobními vazbami uvnitř dutiny a vodíkovými vazbami vně dutiny<sup>51</sup>.

Velikost dutiny a rozpustnost CD může být změněna jejich chemickou modifikací. V CE jsou používány různá aniontová a kationtová analoga CD a mezi nejčastěji používané patří acetyl-, hydroxypropyl-, methyl-, karboxymethyl-, sulfatované nebo fosfatované CD<sup>53</sup>.



Obr. 8 Struktura CD<sup>55</sup>

### 2.2.3.2 Chirální Crown ethery

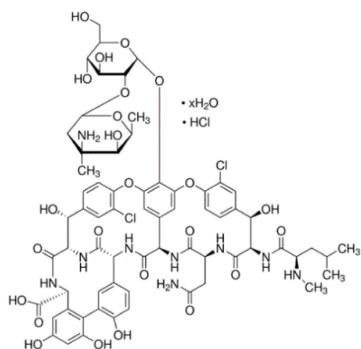


Obr. 9 18-crown-tetrakarboxylová kyselina<sup>58</sup>

Chirální crown ethery jsou syntetické makrocyclické polyethery tvarem připomínající korunu<sup>59</sup>. Mezi nejčastěji používaný crown ether patří 18-crown-tetrakarboxylová kyselina (Obr.9)<sup>59, 60</sup>. Crown ethery jsou schopné formovat inkluzní komplexy s enantiomery a tyto komplexy jsou stabilizovány elektrostatickými a vodíkovými interakcemi díky přítomnosti donorových kyslíkových atomů ve struktuře crown etherů<sup>1</sup>.

Z tohoto důvodu byly crown ethery používány jako selektory pro separaci aminů, aminokyselin, jejich derivátů a amino alkoholů<sup>59, 60</sup>.

### 2.2.3.3 Makrocyclická antibiotika



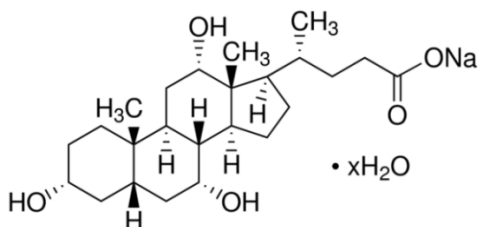
Obr. 10 Vankomycin hydrochlorid hydrát<sup>61</sup>

Makrocyclická antibiotika mají ve své struktuře hodně chirálních center a funkčních skupin schopných interagovat s analyzovanými látkami<sup>1</sup>.



V CE je používáno 6 typů antibiotik: polypeptidové, glykopeptidové, ansamycinové, makrolidové, aminoglykosidové a linkosamidové antibiotika<sup>62, 63, 64</sup>. Nejčastěji používaná antibiotika jsou vankomycin (Obr. 10), teicoplanin a ristocetin A<sup>1</sup>.

#### 2.2.3.4 Chirální povrchově aktivní látky



Obr. 11 Sodná sůl cholové kyseliny<sup>65</sup>

Separace optických isomerů pomocí MEKC je možné dvěma způsoby. První způsob je použití achirálního surfaktantu v nadkritické micelární koncentraci a přidání vhodného chirálního selektoru a ten druhý je použití přímo chirálního surfaktantu např. sodná sůl kyseliny cholové (Obr. 11)<sup>1</sup>.

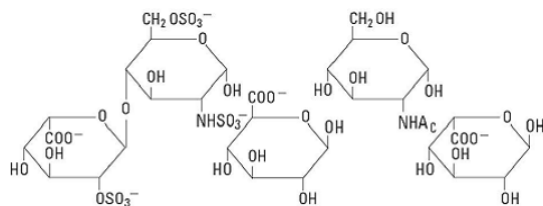
Přírodní chirální surfaktanty jsou soli žlučové kyseliny, digitoniny a saponiny, syntetické jsou aminokyseliny a deriváty cukrů<sup>1, 66</sup>.

#### 2.2.3.5 Chirální komplexy kovů

Separace enantiomerů s ligandovou výměnou spočívá v tvorbě chelatačního komplexu vytvořeného z centrálního kationtu a alespoň dvou bifunkčních ligandů přidaných jako selektory do roztoku pufru<sup>53</sup>.

Nejvíce používané jsou ionty  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ , protože tvoří stabilní komplexy<sup>1</sup>. Tyto typy selektorů jsou používány pro separaci aminokyselin, peptidů, hydroxykyselin, diaminů a amino alkoholů<sup>53</sup>.

### 2.2.3.6 Přírodní a syntetické polymery



Obr. 12 Heparin<sup>67</sup>

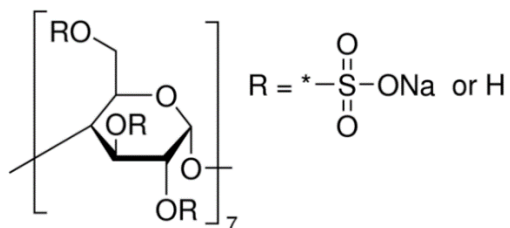
Proteiny jsou přírodní polymery složené z opticky aktivních aminokyselin pozitivního anebo negativního náboje. Mají komplexní strukturu a obsahují řadu funkčních skupin. V závislosti na jejich struktuře jsou schopné elektrostatickými, hydrofobními a vodíkovými interakcemi stereoselektivního rozpoznávání<sup>1, 68</sup>.

Pro analýzy v medicínské oblasti se nejčastěji používají selektory: hovězí, prasečí a krysí albumin, riboflavin, trypsin a chymotrypsin<sup>68</sup>.

Další skupinou přírodně se vyskytujících polymerů, které jsou díky jejich asymetrické struktuře vhodné pro separaci, jsou polysacharidy. Podobně jako u makrocyclických antibiotik a proteinů je mechanismus separace enantiomerů založen na řadě interakcí podle struktury polysacharidu. Nejčastěji používané polysacharidy jsou celuloza, amylosa, dextransy, pektiny, škrob a heparin (Obr. 12)<sup>69</sup>.

Ze syntetických polymerů jsou pro chirální separace používány nejčastěji polyakrylamidy a polyakryláty a používají se pro separace aminokyselin, aminů karboxylových kyselin, peptidů a alkaloidů<sup>59</sup>.

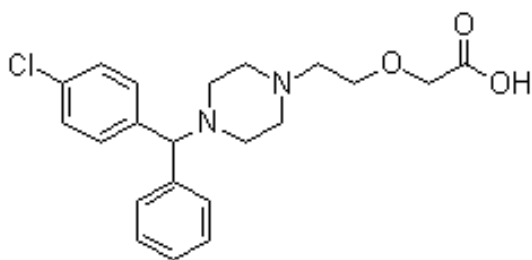
### 2.2.4 Sodná sůl sulfátovaného $\beta$ -CD (S- $\beta$ -CD)



Obr. 13 S- $\beta$ -CD<sup>70</sup>

S- $\beta$ -CD (Obr. 13) patří do skupiny aniontových cyklodextrinů. Je to bílý prášek s průměrným sumárním vzorcem  $C_{42}H_{70-n}O_{35} \cdot (SO_3Na)_n$  a průměrnou molární hmotností  $1135.0 + n \cdot (102.1)$ , kde  $n$  je počet navázaných sulfátových skupin. Jeho rozpustnost v 100 ml rozpouštědla je  $>75$  g ve vodě a  $<1$  g v methanolu a chloroformu. Skladuje se při teplotě 2-8 °C a může obsahovat nečistoty jako je  $\beta$ -CD a sulfát sodný<sup>71</sup>.

### 2.2.5 Cetirizin



Obr. 14 Cetirizin<sup>72</sup>

Jeho sumární vzorec je  $C_{21}H_{25}ClN_2O_3$  a má molekulární hmotnost 388,89. Rozpustnost ve vodě je 101 mg/l a teplota tání je 110-115 °C<sup>72</sup>.

Cetirizin (Obr. 14) patří do druhé generace antihistaminik (H1 receptorových blokátorů) používaných k léčbě alergické rýmy, angioedému a chronické kopřivky<sup>73</sup>. Je to karboxylovaný metabolit hydroxyzinu, který oproti hydroxyzinu vykazuje zlepšení ve vedlejších účincích jako je ospalost, kardiotoxicita a anticholinergní účinek<sup>74</sup>.

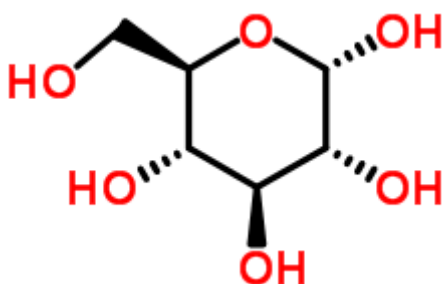
Cetirizin má kvůli obsahu chirálního centra v jeho struktuře dva enantiomery a tyto enantiomery mají rozdílné farmakologické účinky. Levocetirizin (R-forma) je aktivní isomer a má anti-histaminický efekt. Má dvojnásobně vyšší afinitu k H1 receptoru než racemická směs a 30 krát větší afinitu než dextrocetirizin<sup>74</sup>.

Levocetirizin má dlouhý poločas rozpadu v lidském těle kvůli jeho pomalejší metabolizaci a vykazuje taky vyšší biodostupnost oproti racemické směsi<sup>74, 75</sup>.

Byly studovány chirální separace cetirizinu ve farmaceutických sloučeninách a biologických vzorcích jako je plasma a moč za použití HPLC-UV, LC-MS/MS a CE. Jako

chirální stacionární fáze v HPLC byla použita Chiralcel OD-H nebo OD-R polysacharidového typu kolony a  $\alpha_1$ -kyselý glykoprotein glykoproteinového typu kolony<sup>74</sup>.

### 2.2.6 D-(+)-Glukosa



Obr. 15  $\alpha$ -D-glukopyranosa<sup>76</sup>

Její sumární vzorec je  $C_6H_{12}O_6$  a molární hmotnost je 180,16. Teplota tání je 146 °C pro  $\alpha$ -D-glukosu a 150 °C pro  $\beta$ -D-glukosu<sup>77</sup>.

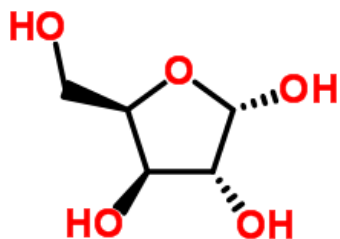
D-glukosa (Obr.15) je také známá pod jménem hroznový cukr anebo dextrosa. Nachází se ve zralém ovoci, spolu s D-fruktosou v medu a v množství kolem 0,1% v krvi. Je stavební jednotkou maltosy, laktosy a sacharózy a je monomerem mnoha polysacharidů např. škrobu, celulosy,  $\beta$ -glukanů a glykogenu<sup>78, 79</sup>.

D-glukosa se vyrábí nejčastěji enzymovou hydrolyzou kukuřičného škrobu, případně pšeničného. D-glukosu je také možné vyrobit enzymovou hydrolyzou sacharózy<sup>78, 79</sup>.

D-glukosa je zdrojem energie živočichů a rostlin. V lékařství se používá v umělé výživě. Mnoho potravinářských procesů začíná hydrolyzou polysacharidů složených z glukosy a potom následují procesy založené na využití glukosy, klasickým příkladem je ethanolické kvašení. Je také důležitou surovinou mnoha potravinářských a farmaceutických produktů. Redukcí D-glukosy se vyrábí D-sorbitol, nejpoužívanější sladidlo<sup>78, 79</sup>.

Glukosa je směs  $\alpha$ - a  $\beta$ -anomeru. Optická rotace  $\alpha$ -anomeru je +112,2° a optická rotace  $\beta$ -anomeru je +18,7°. Když rozpustíme D-glukosu ve vodě tak se její optická rotace mění s časem, až dosáhne finálně +52,7°<sup>77</sup>.

### 2.2.7 D-(+)-Xylosa



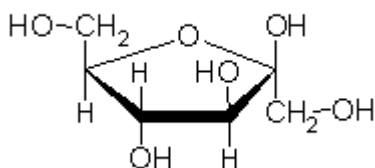
Obr. 16  $\alpha$ -D-xylofuranosa<sup>80</sup>

Její sumární vzorec je  $C_5H_{10}O_5$ , molární hmotnost je 150,13 a teplota tání je 154-158 °C<sup>81</sup>.

D-xylosa (Obr. 16) se vyskytuje v přírodě jako součást hemicelulóz, případně dalších rostlinných polysacharidů<sup>78, 79</sup>.

Potravinářsky významná je xylosa, která se získává hydrolýzou xylanů z kukuřičného šustí. Redukcí D-xylosy vzniká xylitol, což je významné sladidlo, které nachází uplatnění hlavně při výrobě zdravotních cukrovinek a ve žvýkaček<sup>78</sup>.

### 2.2.8 D-(-)-Fruktosa



Obr. 17  $\beta$ -D-fruktofuranosa<sup>82</sup>

Její sumární vzorec je  $C_6H_{12}O_6$ , molární hmotnost je 180,16 a teplota tání je 119-122 °C<sup>83</sup>.

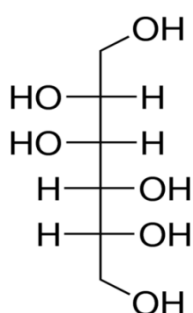
D-fruktosa (Obr. 17) je další důležitý sacharid vyskytující se v přírodě. Jako volný sacharid je obsažena v ovoci a v medu. Má negativní optickou otáčivost takže se ve starší

literatuře někdy nazývá levulosa. D-fruktosa je stavební jednotkou oligo- a polysacharidů jako je např. inulin, levan a oligofruktosid<sup>78, 79</sup>.

Vyrábí se hydrolýzou fruktanů a nebo se izoluje z hydrolyzátu sacharózy. D-fruktosu je také možné vyrobit enzymovou isomerací D-glukosy<sup>78</sup>.

D-fruktosa je sladší než sacharóza, je dobře rozpustná ve vodě a v omezených dávkách je přijatelná pro diabetiky, takže se fruktosa používá k výrobě diabetických potravin např. jogortů a nápojů<sup>78</sup>.

### 2.2.9 D-Mannitol



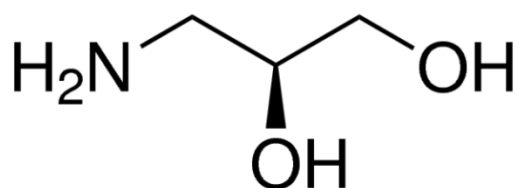
Obr. 18 D-mannitol<sup>84</sup>

Jeho sumární vzorec je  $C_6H_{14}O_6$ , molární hmotnost je 182,17 a teplota tání je 167-170 °C<sup>84</sup>.

D-mannitol (Obr. 18) je přirozeně se vyskytující alkohol v ovoci a zelenině. Má nízkou energetickou hodnotu, protože je ve značné míře vylučován z těla v nezměněné formě<sup>85</sup>.

D-mannitol je osmometrické diuretikum běžně se používající jako nástroj v buněčně biologických studiích, obvykle ke kontrole osmolarity. Také se používá k léčbě oligurie spojené se selháním ledvin<sup>85</sup>.

### 2.2.10 (S)-3-Amino-1,2-propandiol



Obr. 19 (S)-3-Amino-1,2-propandiol<sup>86</sup>

(S)-3-Amino-1,2-propandiol (Obr. 19) má sumární vzorec  $C_3H_9O_2N_1$ , molární hmotnost 91,11, teplotu tání 117-119 °C a hustotu 1,175 g/ml<sup>86</sup>.

## 2.3 Aplikace CE ve forenzní analýze

CE má široké použití v oblasti forenzní analýzy. Samotná forenzní analýza zahrnuje stanovení a analýzy rozličných skupin látek ať už drog nebo výbušnin, opiátů, alkoholu, vzorků DNA a řady dalších. Vzorky pro forenzní analýzu mohou být různé tělní tekutiny (krev, moč) nebo tkáně lidského těla a dále to mohou být různé pevné a kapalné vzorky z místa činu ať už zbytky výbušnin nebo drog.

Jednou z rutinních aplikací CE je analýza DNA zahrnující fingerprinting a sekvenování vzorků DNA pomocí kapilární gelové elektroforézy<sup>87</sup>.

Další velmi rozšířenou oblastí aplikace je analýza drog pomocí CZE nebo MEKC<sup>87</sup>. Např. stanovení opiátů jako je morfin, heroin, kodein, hydrokodein, 6-monoacetylmorfin a folkodin v moči<sup>88</sup> anebo strychninu a brucinu v moči<sup>89</sup>.

Další oblastí je analýza proteinů. Např. důkaz biologického markeru chronického alkoholismu. Markerem je karbohydrát deficientní transferin (CDT)<sup>90</sup> a nebo stanovení hormonu erythropoetinu (EPO). Syntézou vzniklý rekombinantní EPO anebo jeho analogy jsou zneužívány jako drogy<sup>90</sup>.

Dalším zaměřením je analýza výbušnin např. analýza nitraminu a nitroaromatických výbušnin pomocí micelární elektrokinetická kapilární chromatografie (MECC)<sup>91</sup>.

CE je také často používána pro analýzu chirálních drog, jako jsou amfetaminy a jim podobné látky a jejich metabolitů v tělních vzorcích<sup>90</sup>.

CE se nemusí používat jen pro analýzu drog, DNA, proteinů, výbušnin atd., ale může být také účinně použita pro určování pravosti tiskovin a listin analýzou inkoustu pomocí MECC. Analýzou inkoustu můžeme určit např. typ tiskárny, na které byla tiskovina pořízena<sup>92</sup>.

Příkladem chirální separace ve forenzní analýze za použití CE může být analýza metorfanu, což je syntetický analog kodeinu. Jako chirální sloučenina se vyskytuje ve dvou formách lišících se svou aktivitou. L-enantiomer (Levomedorfan) má narkotické účinky

a D-enantiomer (Dextrometorfan) má antitusivní účinky. Od roku 2010 byla vydána řada varování spojená s výrobou heroinu padělaného metorfanem. Proto bylo nutné vynalézt metodu, která bude schopná jednotlivé isomery metorfanu od sebe odlišit, protože dřívější metody pro analýzu heroinu nebyly schopné enantioselektivního rozpoznání. Také je důležité umět určit stereochemickou povahu metorfanu v krvi z předávkování padělaným heroinem, protože každý enantiomer metabolizuje na jinou látku a to nám může pomoci při terapii intoxikace<sup>93</sup>.

## 2.4 Cíle práce

Tato práce je pilotní studií vlivu vysoce koncentrovaného borátu sodného na chirální separace. V tomto případě jsem jako vhodnou modelovou chirální látku zvolila cetirizin a jako vhodný chirální selektor S- $\beta$ -CD, který se běžně používá pro chirální separaci této látky<sup>94, 95</sup>.

Mým cílem bylo tedy zjistit, jak se změní chirální separace cetirizinu za použití takto vysoce koncentrovaného pufru a dále jak ovlivňuje separaci např. přídavek glukosy, mannitolu a fruktosy do borátu sodného.

Problematika vysoce koncentrovaného borátu byla zajímavá proto, že borát sodný je nejvíce používaný pufr v CE a existuje zde možnost, že díky svým dobrým komplexačním vlastnostem bude schopný při jeho vysoké koncentraci jinak ovlivnit chirální separaci, (hypoteticky bude schopný umožnit chirální separaci bez přídávku CS).



## 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1 Přístrojové vybavení

Kapilární elektroforéza HP 3D Agilent vybavená UV-VIS detektorem diodového pole (*Agilent Technologies*), pH metr (*inoLab*), magnetická míchačka (*Thermo electron corporation*), značkovač (*Microsolv*), ultrazvuk (*Bondelin Sonorec digitec*), minitřepačka (*Merci*), analytické váhy (*Mettler toledo*).

### 3.2 Chemikálie

Sulfatovaný  $\beta$ -CD (S- $\beta$ -CD), kyselina boritá, hydroxid sodný, D-(+)-Glukosa, D-(-)-Fruktosa, D-(+)-Xylosa, D-Mannitol, (S)-3-Amino-1,2-propandiol, cetirizin dihydrochloride. Všechny chemikálie až na D-(+)-Xylosu, která je od firmy *Merck*, jsou dodané firmou *Sigma Aldrich*. Všechny chemikálie jsou čistoty p.a. Lichrosolv voda pro chromatografii dodaná firmou *Merck* a destilovaná voda *Millipore*, 18 M $\Omega$ -cm.

### 3.3 Experimentální podmínky

Všechna měření byla prováděna na kapilární elektroforéze HP 3D Agilent v nepokryté křemenné kapiláře o vnitřním průměru 50  $\mu$ m, délce 33,5 cm s efektivní délkou 25 cm (*Microsolv*). Kapilára byla vždy termostatována na teplotu 25 °C. Dále bylo na kapiláru vkládáno napětí +5 kV, +20 kV. Kdy bylo které napětí vkládáno, bude uvedeno u jednotlivých analýz. Vzorek byl dávkován do kapiláry tlakem 50 mbar po dobu 10 sekund.

Na začátku každého pracovního dne byla kapilára promývána 15 minut 0,1 mol/l NaOH a 10 minut deionizovanou vodou. Před každým měřením byla kapilára promývána 2 minuty 0,1 mol/l NaOH, 2 minuty deionizovanou vodou a 3 minuty pracovním elektrolytem.

Jako detektor byl používán UV-Vis detektor s diodovým polem a detekční vlnovou délkou 200 nm.

Každé měření bylo prováděno 3x pokud není u jednotlivých analýz uvedeno jinak.

### 3.3.1 Příprava vzorku cetirizinu

Požadovaná koncentrace cetirizinu byla  $10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Takže jsem připravila roztok o koncentraci  $10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  rozpuštěním naváženého vypočteného množství cetirizinu v 1 ml 500 mM borátu sodného pH=9,5 a z této koncentrace jsem připravila koncentraci  $10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  zředěním.

### 3.3.2 Příprava roztoků elektrolytů

Pro přípravu  $500 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  borátu sodného pH=9,5 jsem navážila vypočtené množství kyseliny borité a rozpustila ji v deionizované vodě a kvantitativně jsem roztok převedla do 100 ml odměrné baňky a doplnila deionizovanou vodou po rysku. Dále jsem získala potřebné pH pufru titrací nasyceným roztokem NaOH. Totéž jsem provedla pro přípravy borátu sodného o jiném pH a jiných koncentracích.

## 4 VÝSLEDKY A DISKUZE

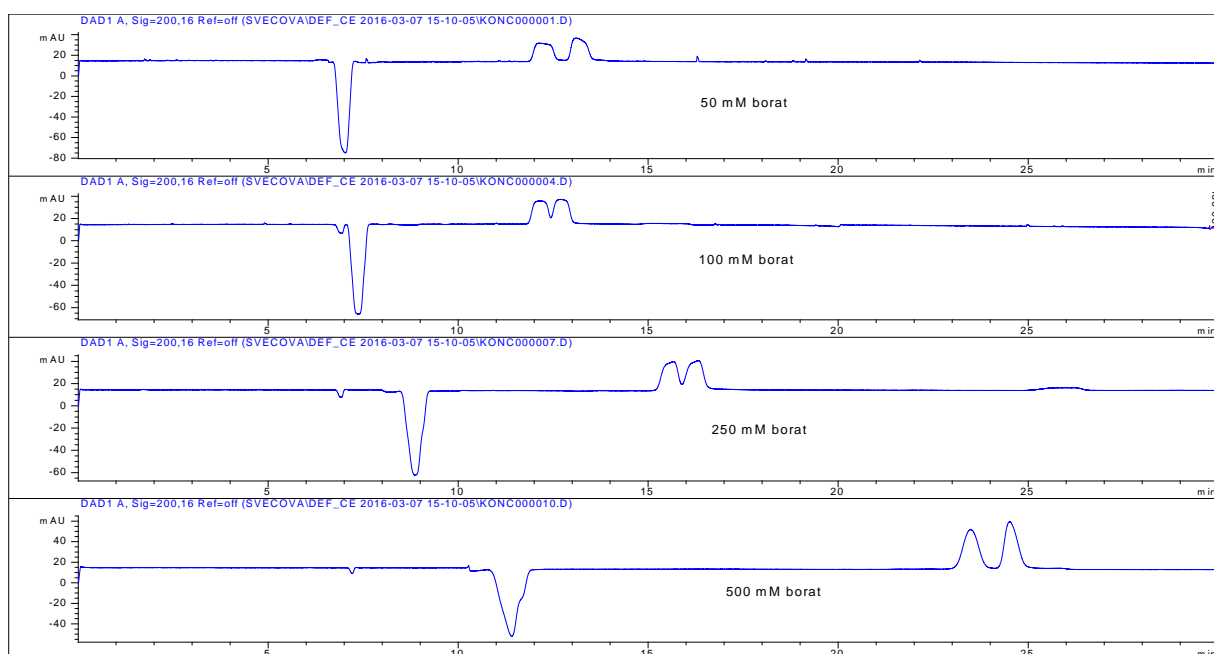
### 4.1 Chirální separace *R,S*-cetirizinu

#### 4.1.1 Vliv koncentrace borátu sodného pH 9,5

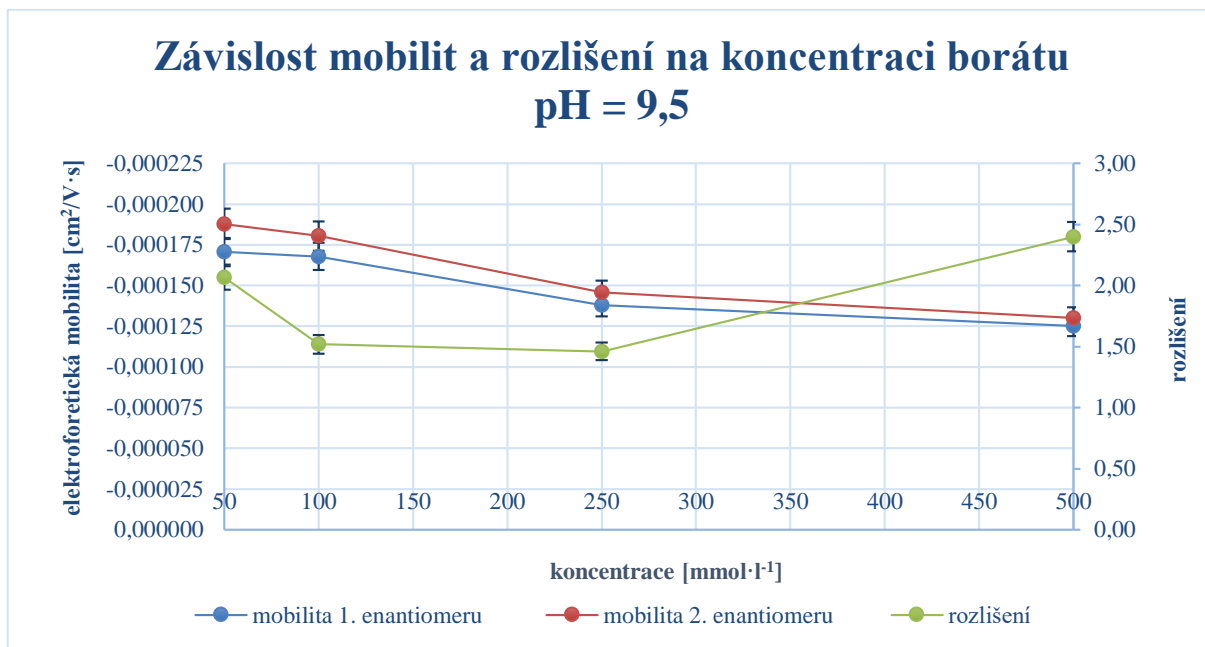
Jako první byl zkoumán vliv koncentrace borátu sodného pH=9,5 na chirální separaci cetirizinu. Jako chirální selektor byl použit S- $\beta$ -CD o koncentraci 40 mg·ml<sup>-1</sup>, tato koncentrace selektoru bude nadále používána i u všech ostatních analýz pokud nebude u dané analýzy uvedeno jinak. Vzorek cetirizinu byl při všech analýzách o koncentraci 10<sup>-4</sup> mol·l<sup>-1</sup>.

Byly tedy připraveny pufrы o koncentraci 50, 100, 250 a 500 mmol·l<sup>-1</sup> a byl zkoumán jejich vliv na mobility, rozlišení a počty teoretických pater enantiomerů cetirizinu.

Napětí vkládané na kapiláru bylo +5 kV.



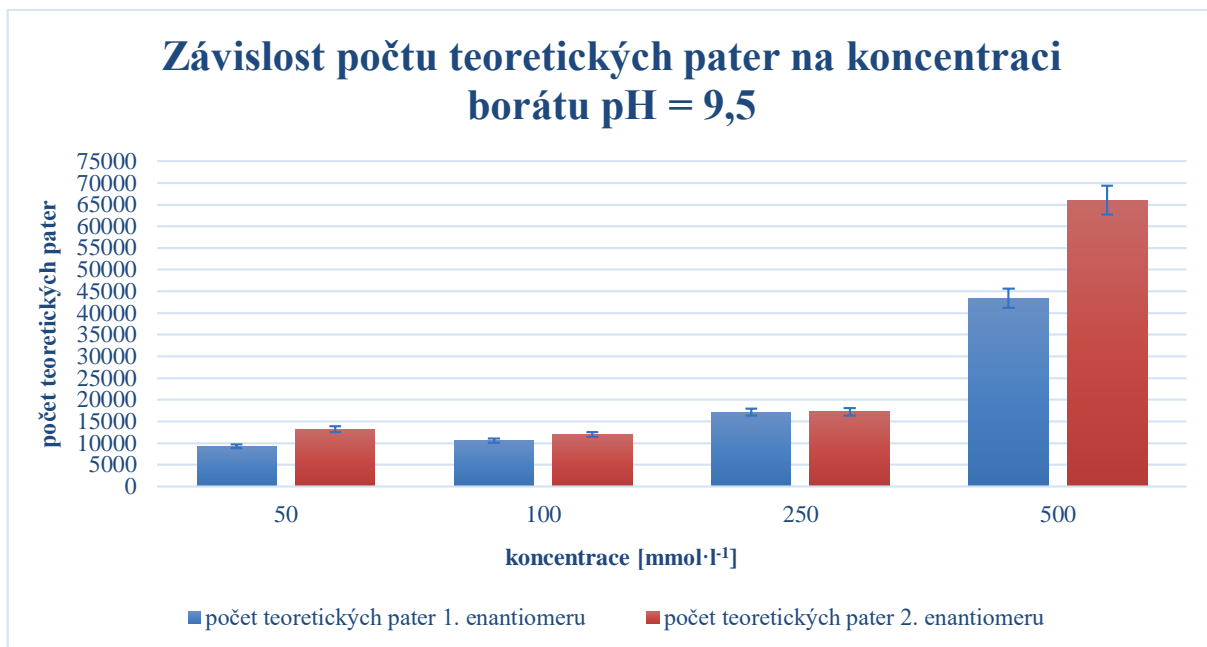
Obr. 20 Elektroferogramy chirální separace cetirizinu v různě koncentrovaném borátu sodném pH=9,5



Obr. 21 Závislost elektroforetických mobilit a rozlišení enantiomerů cetirizinu na koncentraci borátu sodného pH=9,5

Na (Obr. 20 a 21) je vidět, že koncentrace borátu má vliv na rozlišení enantiomerů cetirizinu. Klasicky se při chirální separaci cetirizinu používá 50 mM borát sodný<sup>96</sup>, při jehož použití bylo dosaženo v našem případě rozlišení (2,07). Jak je však vidět z grafu, při koncentraci 500 mM dochází k lepšímu rozlišení (2,40) jednotlivých enantiomerů oproti 50 mM borátu.

Z (Obr. 21) je také vidět, že se zvyšující se koncentrací borátu dochází ke zvyšování mobilit jednotlivých enantiomerů.



Obr. 22 Závislost počtu teoretických pater enantiomerů cetirizinu na koncentraci borátu pH=9,5

Na (Obr. 22) vidíme, jak ovlivňují různé koncentrace pufru počty teoretických pater enantiomerů cetirizinu. Při koncentracích borátu 50, 100 a 250 mM dochází k mírnému nárůstu počtu teoretických pater enantiomerů. Zásadního rozdílu je však dosaženo při koncentraci 500 mM, kdy dochází k výraznému zvětšení počtu teoretických pater enantiomerů oproti nižším koncentracím.

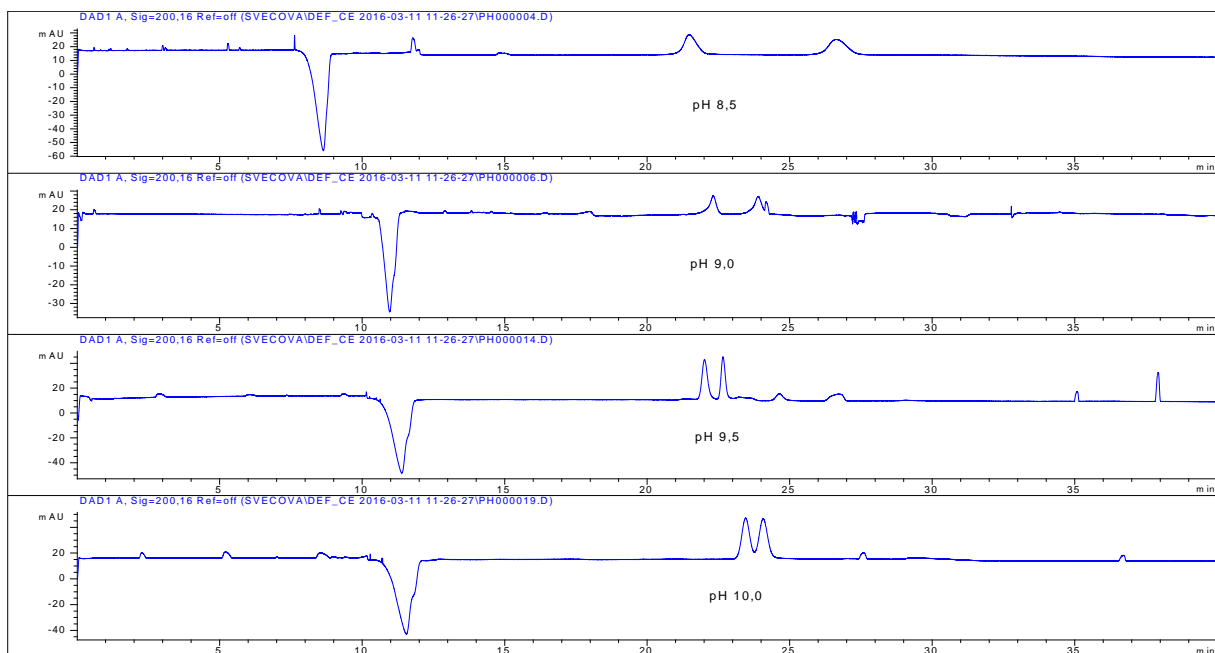
Jak bylo zmíněno výše, vidíme jak ze změn rozlišení, tak počtu teoretických pater, které jsou právě u 500 mM borátu nejvyšší, že vysoká koncentrace borátu může mít vliv na chirální separaci cetirizinu. Proto mým dalším krokem bylo zjistit, jak bude vypadat separace cetirizinu při použití 500 mM borátu sodného, ale za rozdílných hodnot pH.

#### 4.1.2 Vliv pH 500 mM borátu sodného

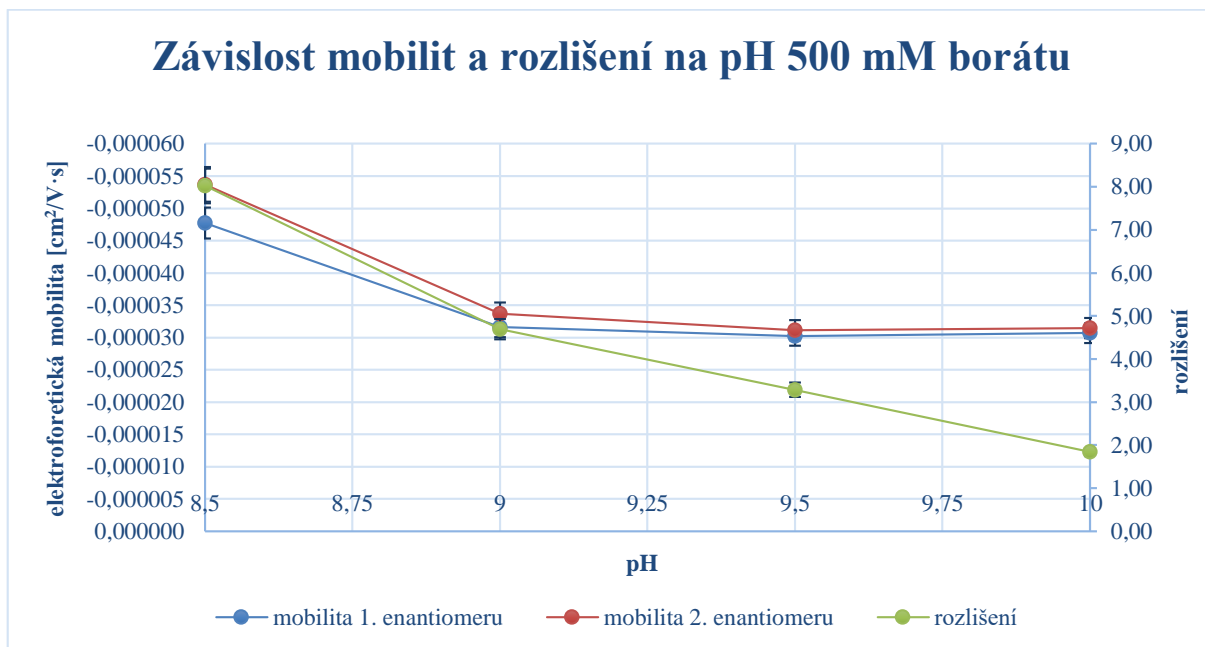
Jako další byl zkoumán 500 mM borát sodný o různém pH.

Byly připraveny pufrы o pH 8,5; 9,0; 9,5 a 10,0 a byl zkoumán jejich vliv na elektroforetickou mobilitu, rozlišení a počet teoretických pater enantiomerů cetirizinu.

Napětí vkládané na kapiláru bylo +5 kV.



Obr. 23 Elektroferogramy chirální separace enantiomerů cetirizinu při různém pH 500 mM borátu

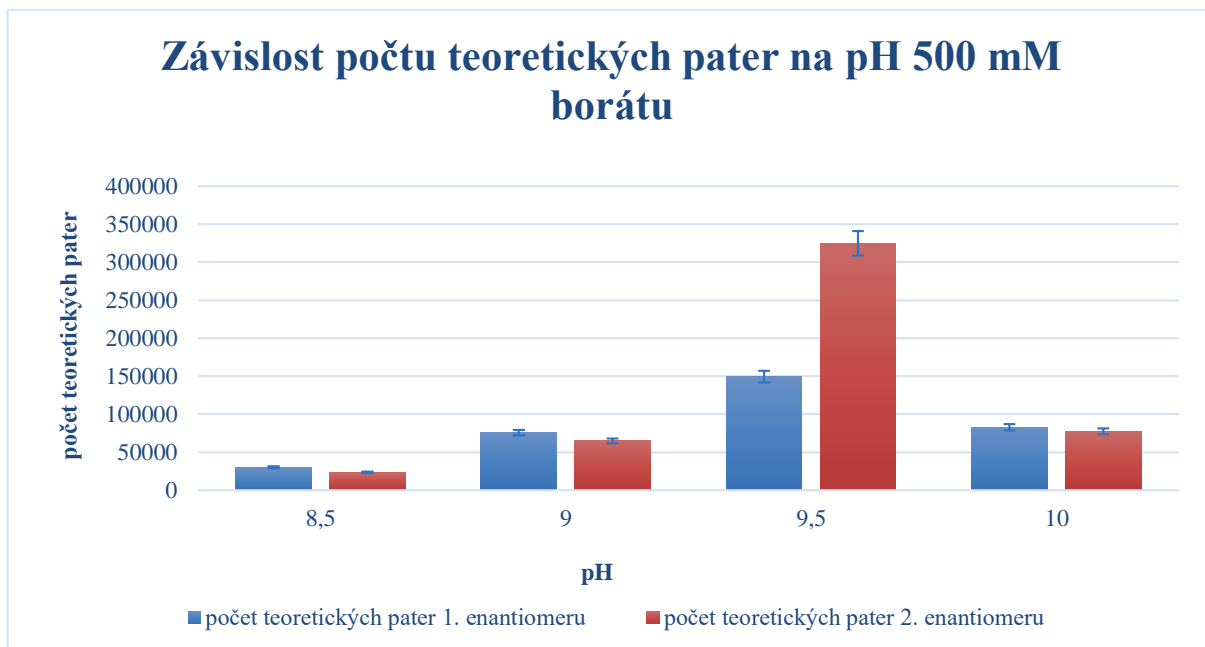


Obr. 24 Závislost elektroforetických mobilit a rozlišení enantiomerů cetirizinu na pH 500 mM borátu

Na (Obr. 23 a 24) vidíme, že se zvyšujícím se pH dochází ke snižování rozlišení enantiomerů cetirizinu. Z křivky závislosti rozlišení na pH však můžeme vidět, že nedochází k lineárnímu poklesu rozlišení, ale mezi hodnotou pH 8,5 a 9,0 je největší pokles rozlišení a od hodnoty 9,0 se už rozlišení zmenšuje lineárně. V tomto případě je tedy dosaženo největšího rozlišení při pH 8,5 kdy se tato hodnota pohybuje kolem 8,0.

Další zajímavou skutečností je to, že když se podíváme na závislosti elektroforetických mobilit jednotlivých enantiomerů na pH, tak vidíme, že při pH 8,5 došlo k významné změně mobilit enantiomerů oproti zbývajícím pH, kdy jsou mobility téměř konstantní.

Jak bylo zmíněno výše, tak jak z výrazné změny mobility, tak ze změny rozlišení enantiomerů při pH 8,5 můžeme předpokládat, že při tomto pH dochází k nějakým komplexačním reakcím borátu sodného a to může mít vliv na separaci.



Obr. 25 Závislost počtu teoretických pater enantiomerů cetirizinu na pH 500 mM borátu

Z (Obr. 25) je vidět, že největšího počtu teoretických pater je dosaženo při pH 9,5 a naopak nejmenšího při pH 8,5. Na druhou stranu je při pH 9,5 největší rozdíl mezi počty teoretických pater jednotlivých enantiomerů cetirizinu.

Při analýze 500 mM borátu o různém pH jsem teda zjistila, že je nejlepšího rozlišení dosaženo při pH 8,5. Jako další krok následovala analýza 50 mM borátu sodného o různých pH a vyhodnocení jak to vypadá v tomto případě, jestli je pH 8,5 také nejlepší.

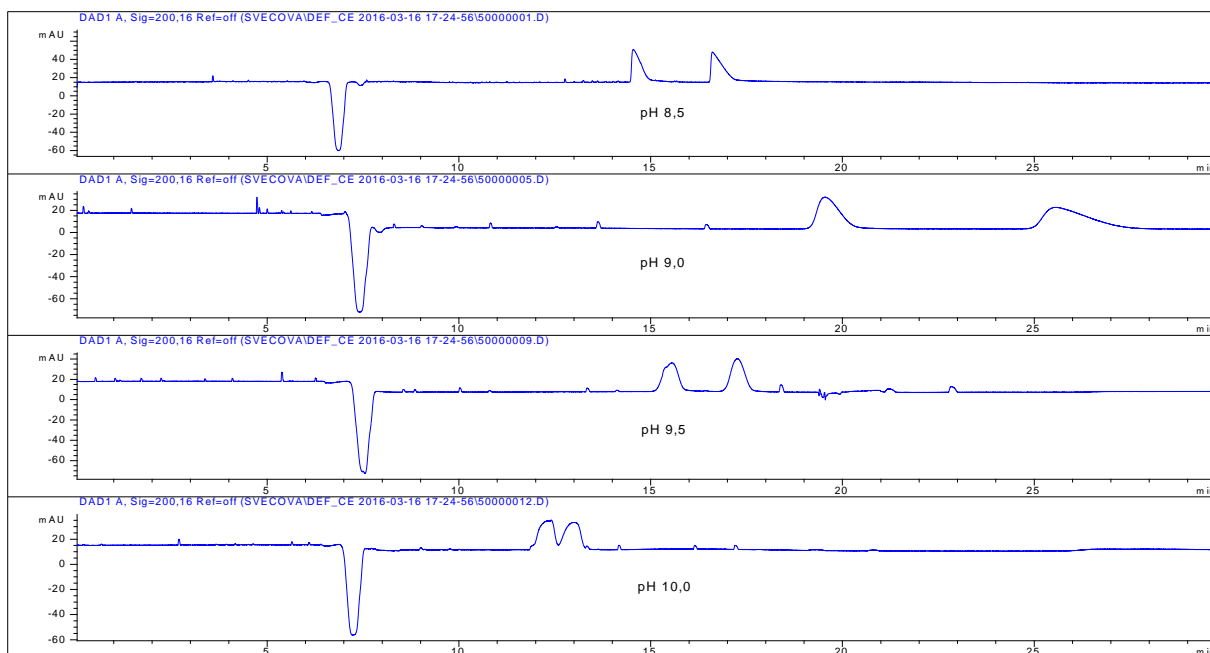
#### 4.1.3 Vliv pH 50 mM borátu sodného

Poté, co jsem vyzkoušela, jaký vliv mají různé pH 500 mM na separaci cetirizinu, jsem chtěla zkusit, jak to funguje u nejčastěji používaného 50 mM borátu<sup>96</sup>.

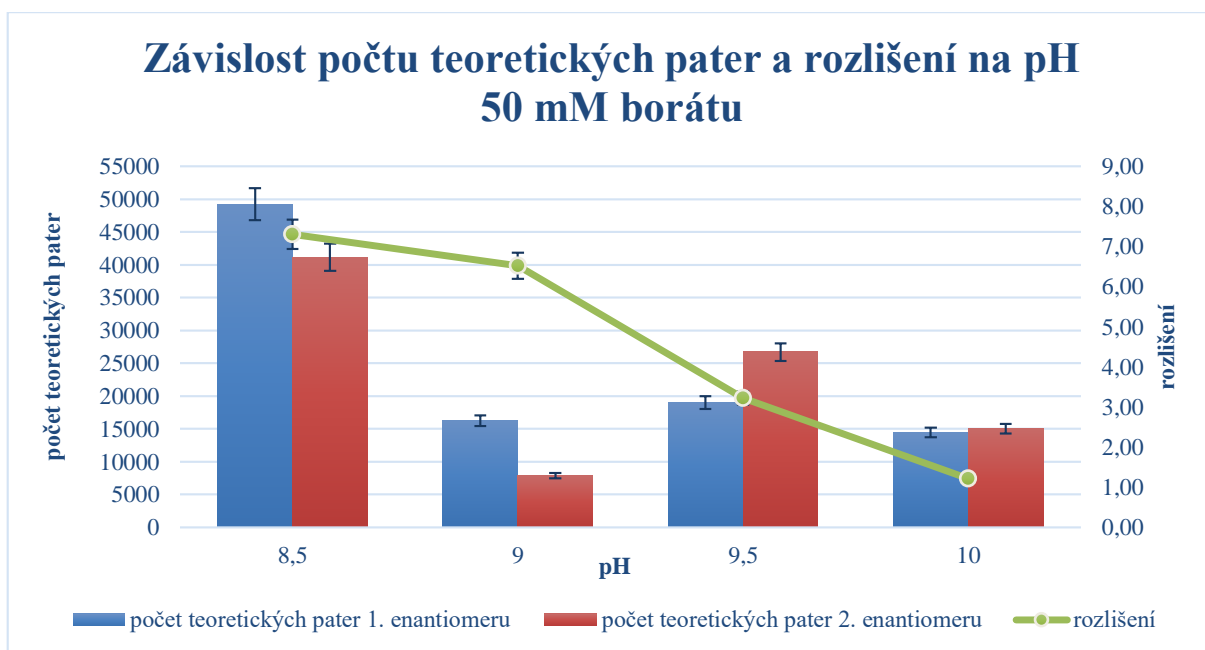
Byly tedy připraveny pufrы o pH 8,5; 9,0; 9,5 a 10 a byl zkoumán jejich vliv na separaci cetirizinu.

Napětí vkládané na kapiláru bylo +5 kV.





Obr. 26 Elektroferogramy chirální separace cetirizinu při různém pH 50 mM borátu



Obr. 27 Závislost počtu teoretických pater a rozlišení enantiomerů cetirizinu na pH 50 mM borátu

Z (Obr. 26 a 27) je vidět, že při pH 8,5 a 9,0 dochází k nejlepšímu rozlišení enantiomerů cetirizinu. pH 8,5 má ještě oproti pH 9,0 dobrý tvar píků a vysoký počet teoretických pater

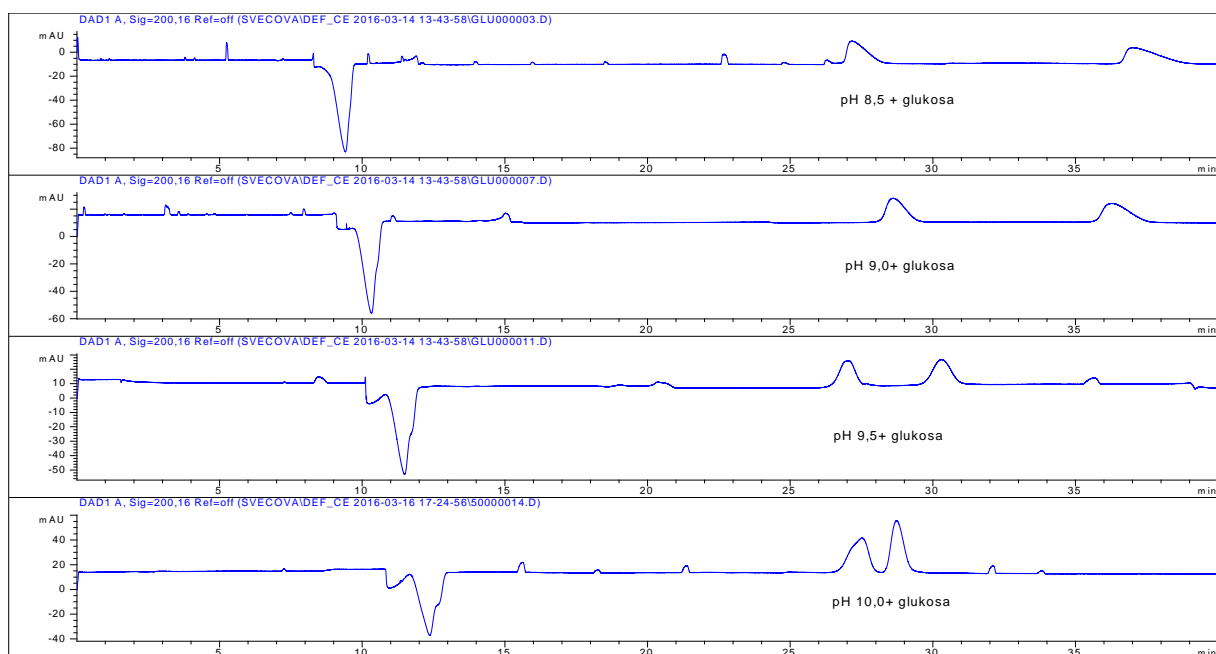
jednotlivých enantiomerů a proto se pH 8,5 stejně jako v případě 500 mM borátu sodného jeví jako nejlepší.

Poté co jsem tedy vyzkoušela, jaký vliv mají různá pH 50 a 500 mM borátu na chirální separaci cetirizinu, jsem chtěla zjistit, jak se změní chirální separace cetirizinu po přidavku látek, které tvoří dobře komplexy s borátem sodným. Mezi látky tvořící snadno komplexy s borátem sodným patří sacharidy, dioly a v neposlední řadě D-mannitol<sup>5, 6</sup>.

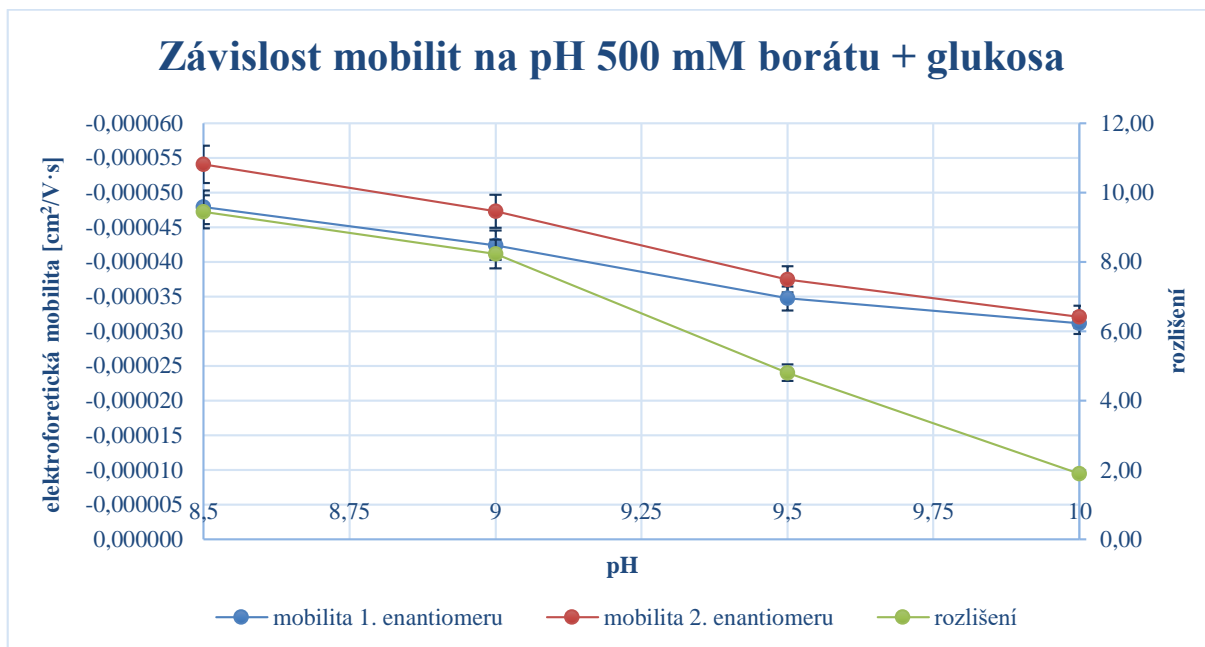
#### 4.1.4 Vliv pH 500 mM borátu + glukosa

Jako první byl zkoumán vliv přidavku 50 mM glukosy na chirální separaci cetirizinu. Byly tedy připraveny 500 mM boráty sodné o pH 8,5; 9,0; 9,5 a 10,0 a každý z těchto pufrů obsahoval kromě S- $\beta$ -CD ještě 50 mM glukosu.

Na kapiláru bylo vkládáno napětí +5 kV.



Obr. 28 Elektroferogramy chirální separace cetirizinu při různém pH 500 mM borátu sodného s přidavkem 50 mM glukosy

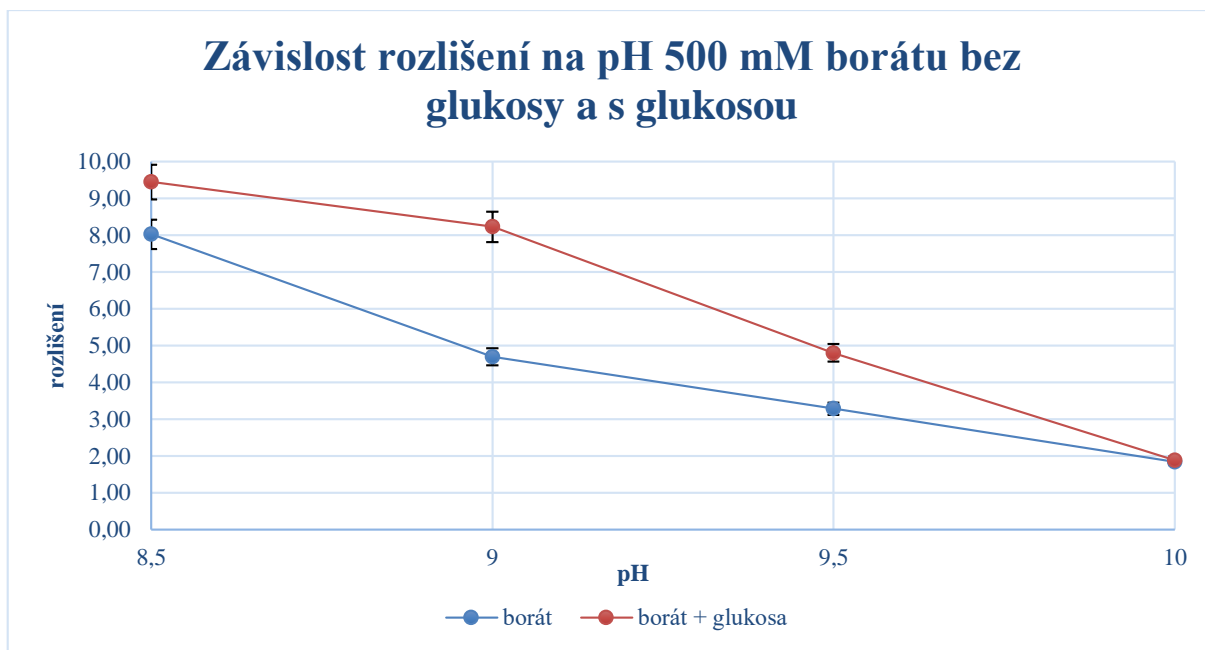


Obr. 29 Závislost elektroforetických mobilit a rozlišení enantiomerů cetirizinu na pH 500 mM borátu sodného s přidavkem 50 mM glukosy

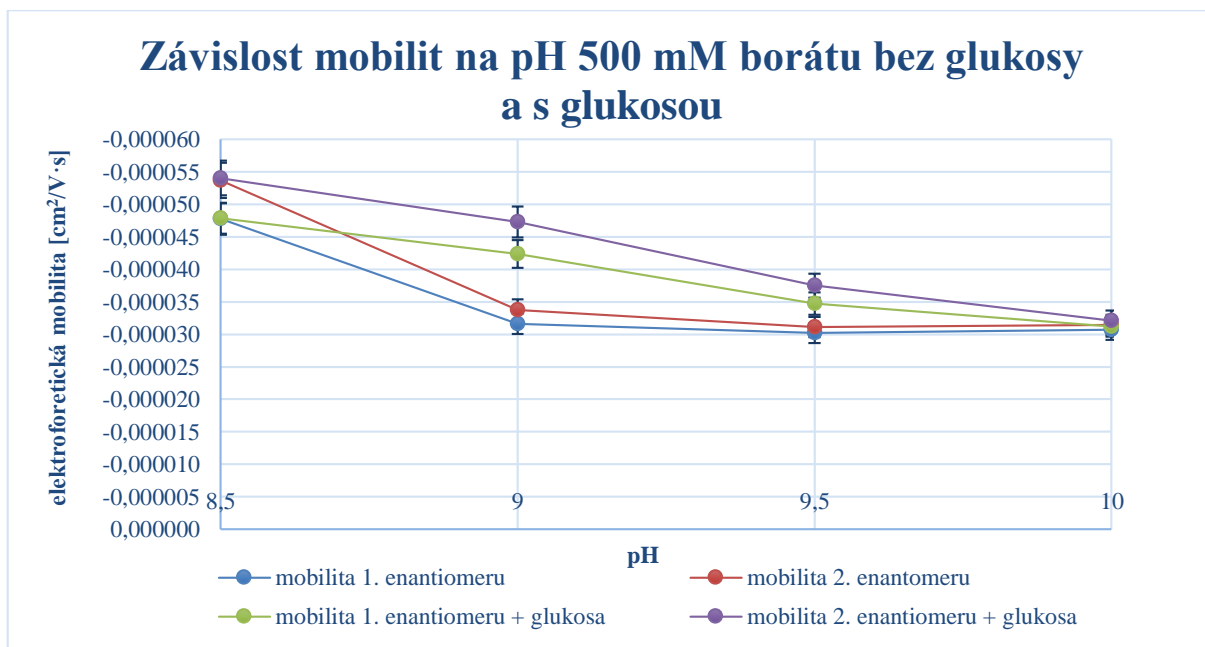
Z (Obr. 28 a 29) vidíme, že se zvyšujícím se pH roste elektroforetická mobilita, ale klesá rozlišení enantiomerů cetirizinu. Ke zvyšování elektroforetických mobilit a snižování rozlišení enantiomerů docházelo i v případě použití samotného 500 mM borátu sodného o různých pH bez přidavku glukosy (Obr. 24). Pro posouzení vlivu přidavku glukosy do pufru tedy srovnáme rozlišení a elektroforetické mobility enantiomerů bez přidavku glukosy a s přidavkem glukosy mezi sebou.

Na (Obr. 30) můžeme vidět, že přidavek glukosy do pufru zvětšuje rozlišení enantiomerů oproti analýzám bez přidavku glukosy. Tento rozdíl je nejmarkantnější u pH 9,0. Co se týče elektroforetických mobilit, tak na (Obr. 31) je vidět jak se mění mobility jednotlivých enantiomerů při různém pH bez přidavku a s přidavkem glukosy. Jak je patrné, tak při přidavku glukosy do pufru dochází téměř k lineárnímu nárůstu elektroforetických mobilit jednotlivých enantiomerů při rostoucím pH pufru. Naproti tomu bez přidavku glukosy dochází ke skokovému nárůstu elektroforetických mobilit enantiomerů při pH 9,0. Když si srovnáme mobility enantiomerů bez přidavku a s přidavkem glukosy mezi sebou, tak vidíme, že při pH 8,5 a 10 jsou mobility téměř totožné a při pH 9,0 a 9,5 se mobility enantiomerů s přidavkem glukosy snížily. Z těchto poznatků může vyplývat fakt, že při pH 8,5 může

samotný borát vytvářet složitější celky podobající se komplexům, které vznikají po přidavku glukosy do borátu sodného.



Obr. 30 Závislost rozlišení enantiomerů cetirizinu na pH 500 mM bez a po přidavku 50 mM glukosy



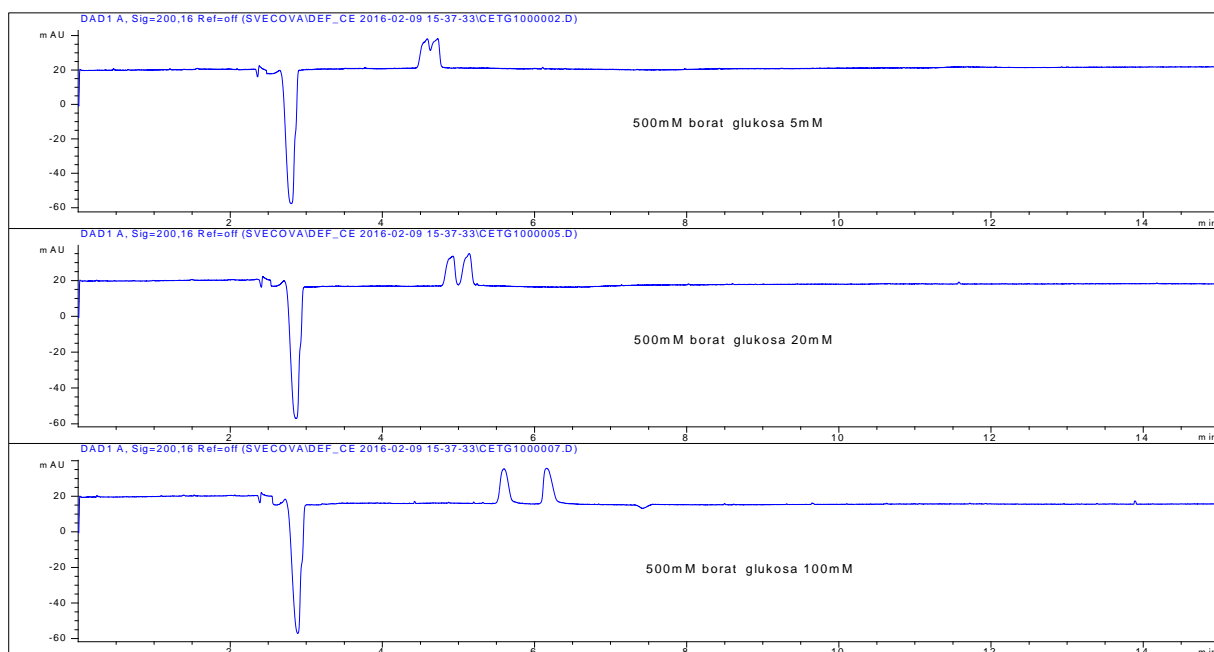
Obr. 31 Závislost elektroforetických mobilit enantiomerů cetirizinu na pH 500 mM bez a po přidavku 50 mM glukosy

### 4.1.5 Vliv koncentrace glukosy

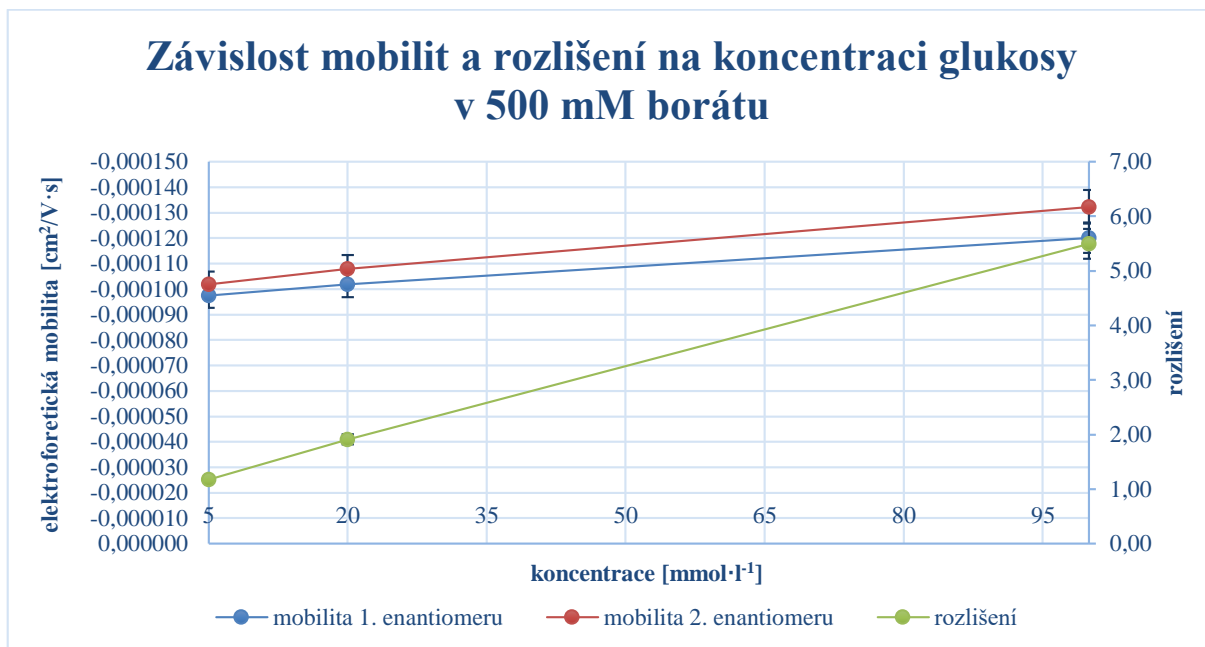
Koncentrace glukosy 50 mM, jak bylo ukázáno v předchozím měření, má pozitivní vliv na chirální separaci cetirizinu. Mým dalším krokem bylo vyzkoušet, jak se bude měnit chirální separace cetirizinu po přidavku jiných koncentrací glukosy do borátu sodného.

Byly připraveny roztoky glukosy o koncentraci 5, 20, 100 mM v 500 mM borátu sodném pH 9,5 a byl sledován jejich vliv na chirální separaci cetirizinu.

Na kapiláru bylo vkládáno napětí +20 kV.



Obr. 32 Elektroferogramy chirálních separací cetirizinu při různých koncentracích glukosy v 500 mM borátu pH 9,5



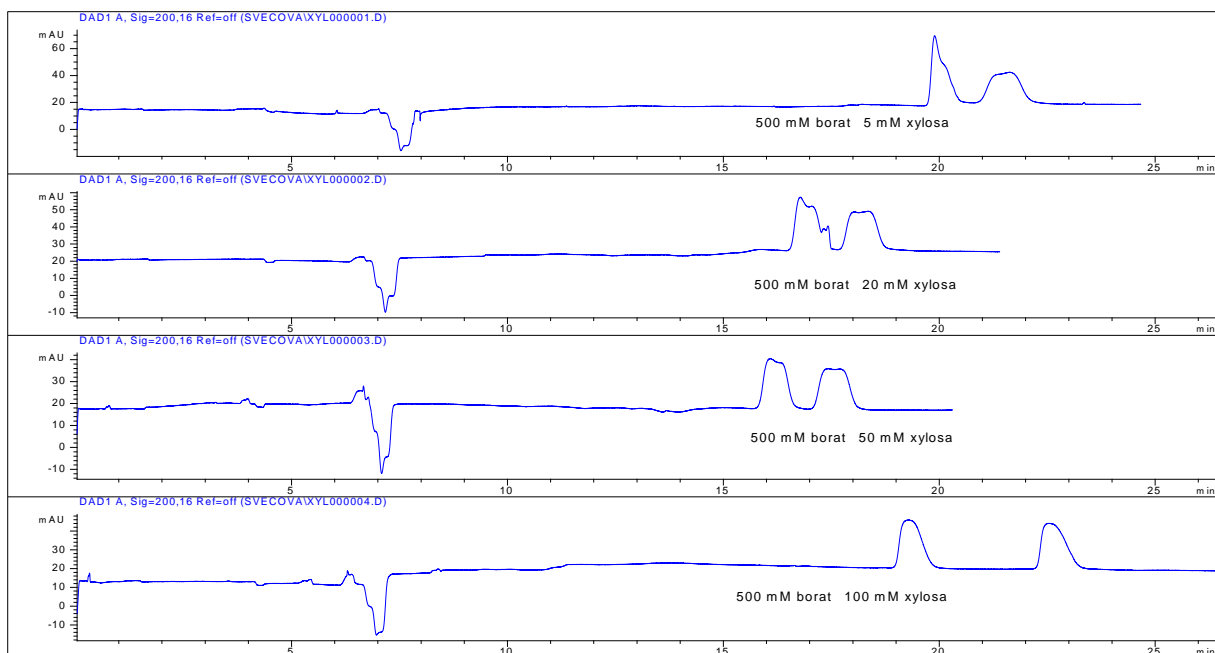
Obr. 33 Závislost elektroforetických mobilit a rozlišení enantiomerů cetirizinu na koncentraci glukosy v 500 mM borátu sodném pH=9,5

Z (Obr. 32 a 33) je vidět, že se zvyšující se koncentrací glukosy dochází k lineárnímu poklesu elektroforetických mobilit enantiomerů, rozdíl elektroforetických mobilit ovšem není tak markantní. Dochází ale k výraznému lineárnímu nárůstu rozlišení jednotlivých enantiomerů se zvyšující se koncentrací glukosy. Při koncentraci 5 mM ještě není dosaženo dostatečného rozlišení, ale dostatečného rozlišení je dosaženo už při koncentraci 20 mM.

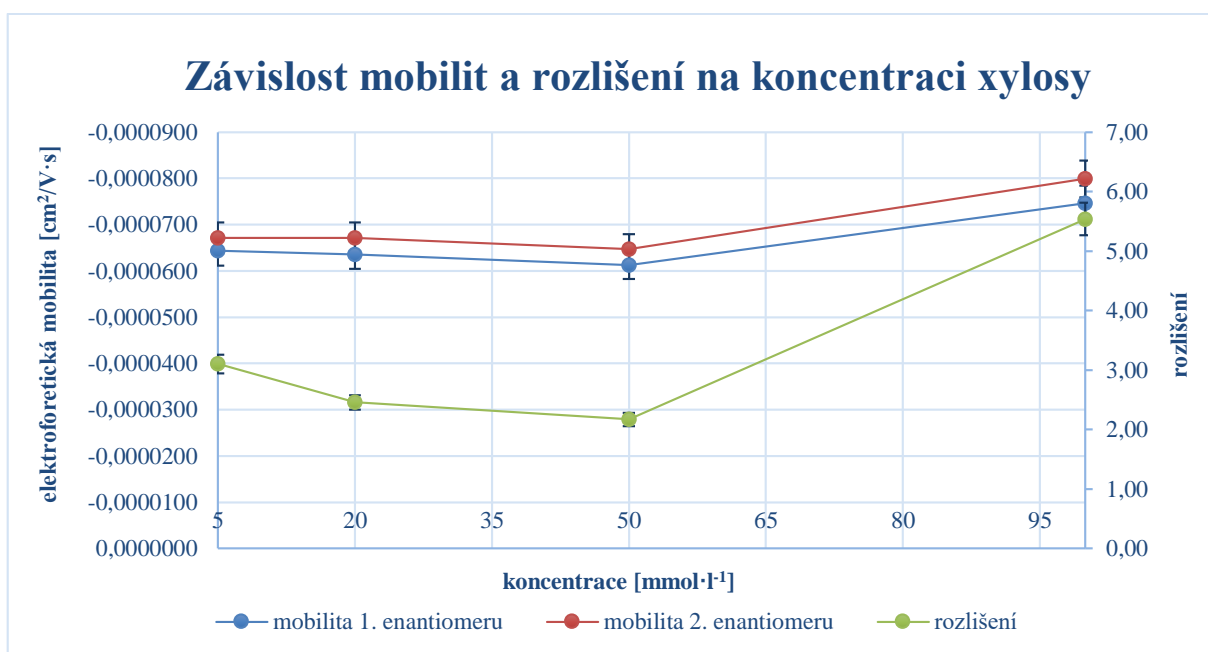
#### 4.1.6 Vliv koncentrace xylosy

Jako další sacharid umožňující vznik komplexů s borátem sodným byla vybrána xylosa<sup>5</sup>. Byl zkoumán vliv přídavku různých koncentrací xylosy do borátu sodného na chirální separaci cetirizinu.

Byly připraveny roztoky xylosy v 500 mM borátu sodném pH=9,5 o koncentraci 5, 20, 50, 100 mM a napětí vkládané na kapiláru bylo + 20 kV.



Obr. 34 Elektroferogramy chirální separace cetirizinu při různých koncentracích xylosy v 500 mM borátu pH=9,5.



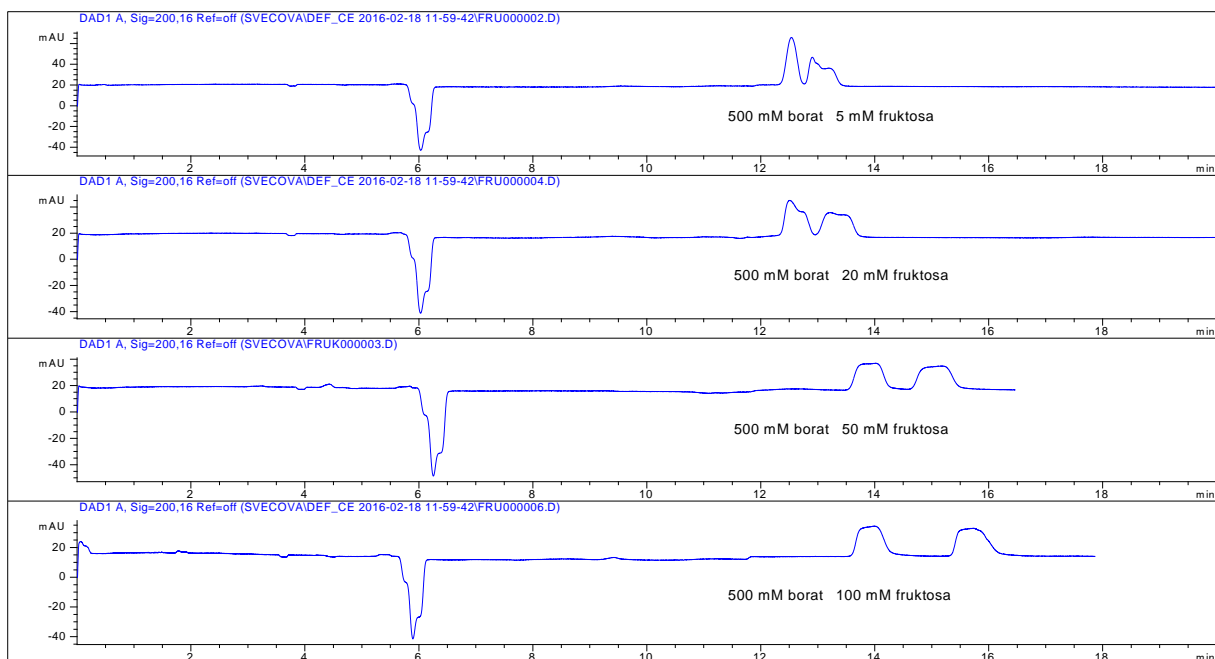
Obr. 35 Závislost elektroforetických mobilit a rozlišení enantiomerů cetirizinu na koncentraci xylosy v 500 mM borátu sodném pH=9,5

Z (Obr. 34 a 35) je vidět, že různé koncentrace xylosy v pufru nijak významně neovlivňují elektroforetickou mobilitu jednotlivých enantiomerů až na koncentraci 100 mM, kdy jsou elektroforetické mobility enantiomerů nepatrně nižší, ale i v tomto případě tento rozdíl oproti dalším mobilitám není nijak významný. Co se týče rozlišení, tak dostatečného rozlišení je dosaženo u všech koncentrací xylosy, ale nejlepšího rozlišení je dosaženo při koncentraci 100 mM.

#### 4.1.7 Vliv koncentrace fruktosy

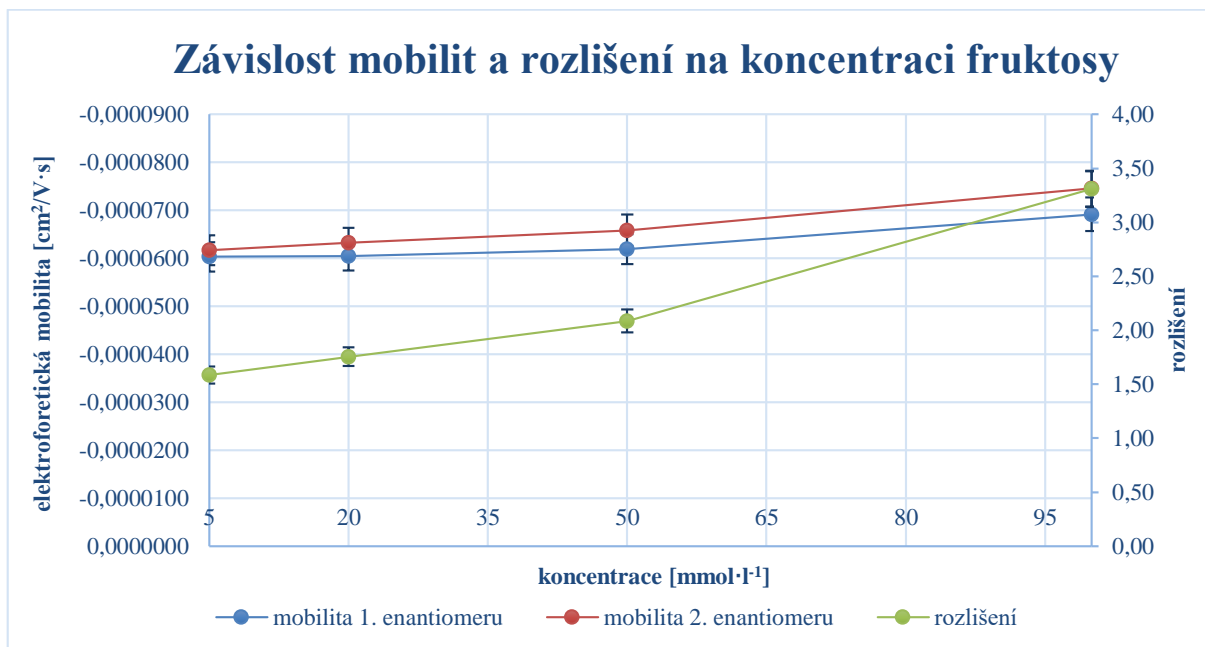
Jako další sacharid komplexující s borátem byla vybrána fruktosa<sup>5</sup> a byl testován vliv její koncentrace na chirální separaci cetirizinu.

Byly připraveny roztoky fruktosy v 500 mM borátu sodném pH=9,5 o koncentraci 5, 20, 50 a 100 mM a napětí vkládané na kapiláru bylo + 20 kV.



Obr. 36 Elektroferogramy chirální separace cetirizinu při různých koncentracích fruktosy v 500 mM borátu pH=9,5





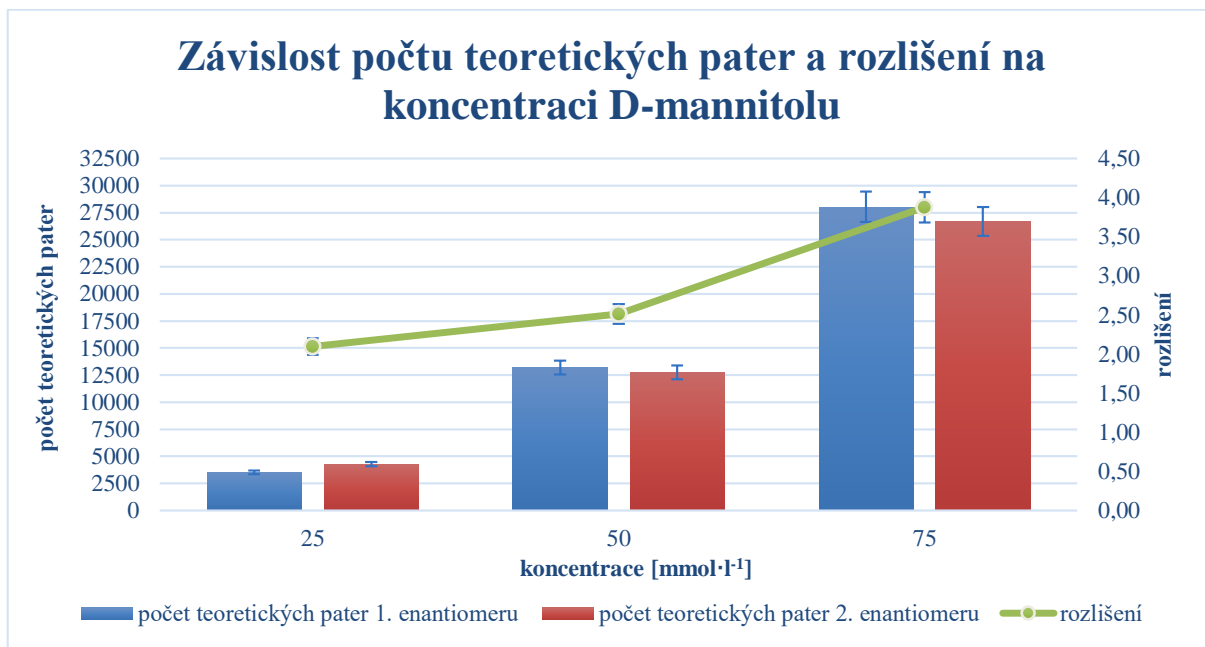
Obr. 37 Závislost elektroforetických mobilit a rozlišení enantiomerů cetirizinu na koncentraci fruktosy v 500 mM borátu pH=9,5

Z (Obr. 36 a 37) je patrné, že se zvyšující se koncentrací fruktosy dochází ke zvětšování rozlišení enantiomerů cetirizinu. Dostatečného rozlišení je dosaženo už při koncentraci 5mM a nejlepšího rozlišení je dosaženo při koncentraci 100 mM. Také je z (Obr. 35 a 37) vidět, že různé koncentrace fruktosy taktéž jako u xylozy nijak významně neovlivňují elektroforetické mobility enantiomerů cetirizinu.

#### 4.1.8 Vliv koncentrace D-mannitolu

Další látka umožňující komplexaci s borátem je D-mannitol<sup>5</sup> a byl zkoumán vliv různé koncentrace D-mannitolu na chirální separaci cetirizinu.

Byly připraveny roztoky D-mannitolu v 500 mM borátu sodném pH=9,5 o koncentraci 25, 50 a 75 mM a na kapiláru bylo vkládáno napětí +20 kV.



Obr. 38 Závislost počtu teoretických pater a rozlišení enantiomerů cetirizinu na koncentraci D-mannitolu v 500 mM borátu sodném pH=9,5

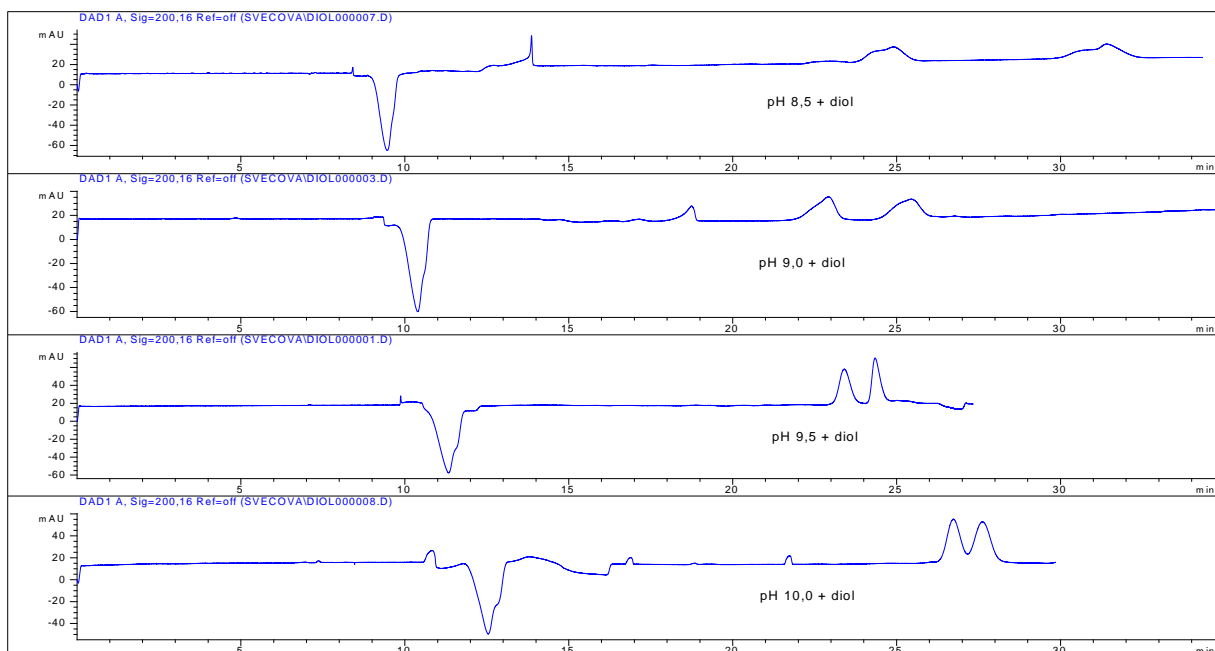
Z (Obr. 38) lze vidět, že se zvyšující se koncentrací D-mannitolu dochází ke zvětšování rozlišení a počtu teoretických pater enantiomerů cetirizinu. Dostatečného rozlišení je dosaženo už při koncentraci 25 mM.

#### 4.1.9 Vliv pH 500 mM borátu + (S)-3-amino-1,2-propandiol

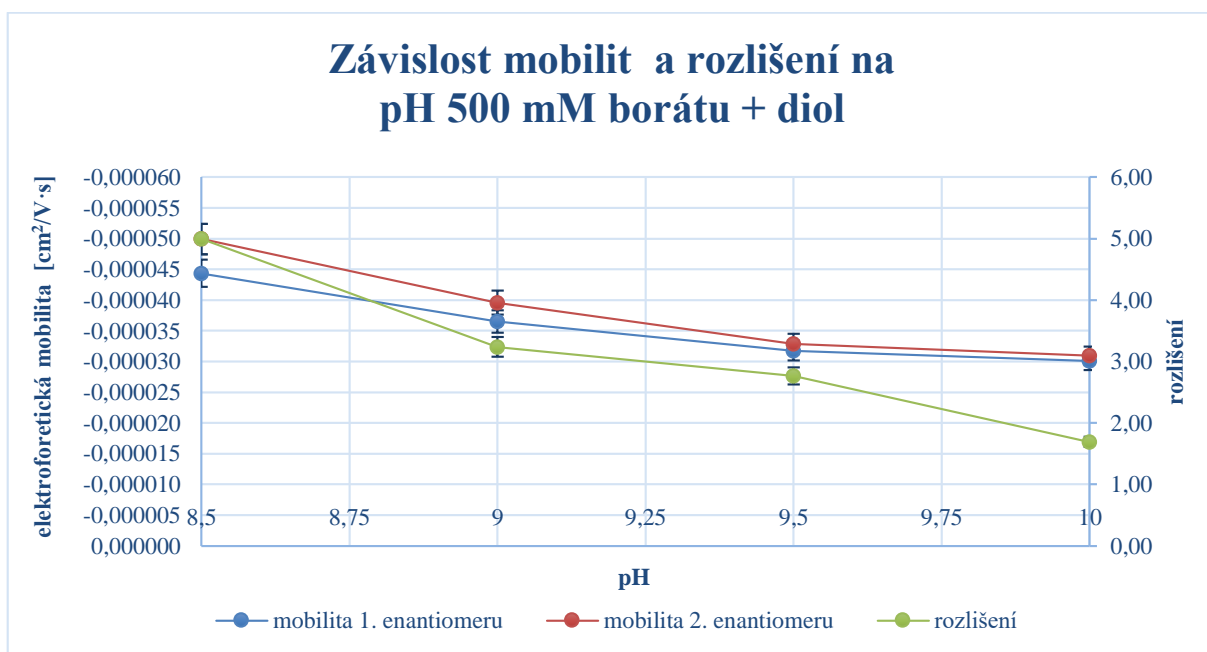
V neposlední řadě byl zkoumán vliv přídatku (S)-3-amino-1,2-propandiolu jako komplexačního činidla s borátem na chirální separaci cetirizinu.

Byly připraveny 500 mM boráty sodné o pH 8,5; 9,0; 9,5 a 10,0 a každý z těchto pufrů obsahoval 0,01 mol·l<sup>-1</sup> (S)-3-amino-1,2-propandiolu.

Na kapiláru bylo vkládáno napětí + 5kV.



Obr. 39 Elektroferogramy chirální separace cetirizinu v 500 mM borátu sodném o různém pH s přidavkem (S)-3-amino-1,2-propandiolu



Obr. 40 Závislost elektroforetických mobilit a rozlišení enantiomerů cetirizinu na pH 500 mM borátu sodného s přidavkem (S)-3-amino-1,2-propandiolu

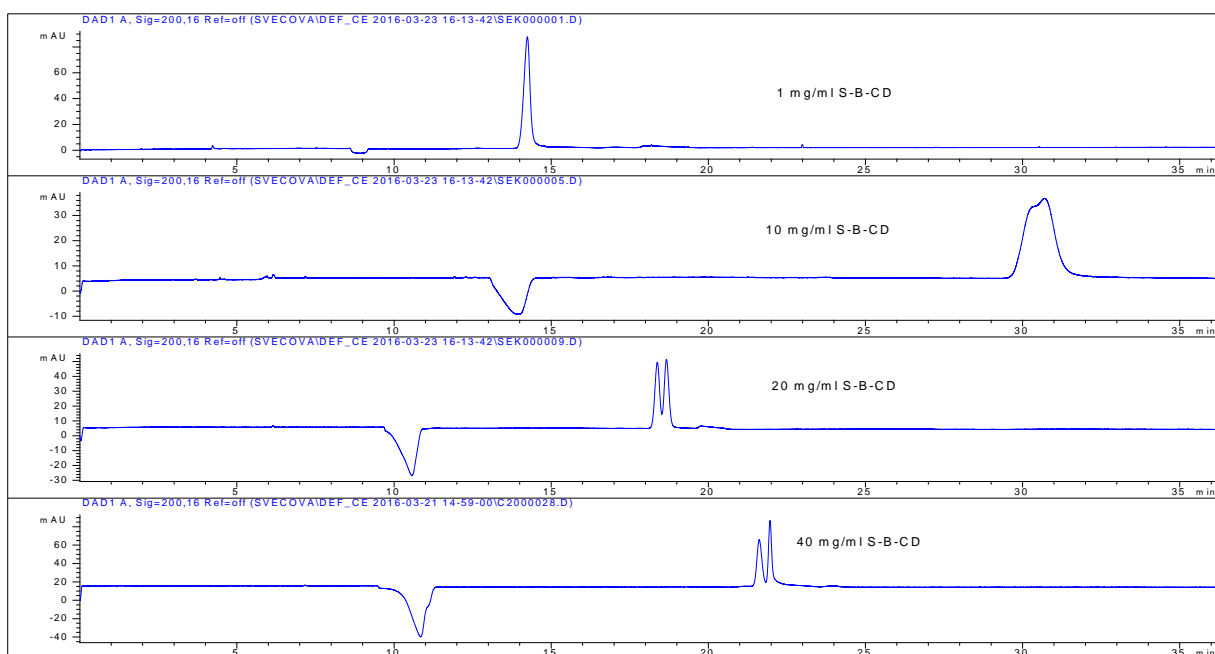
Z (Obr. 39 a 40) je patrné snižující se rozlišení enantiomerů se zvyšujícím se pH 500 mM borátu. Nejlepšího rozlišení je dosaženo při pH 8,5. Se zvyšujícím se pH borátu také dochází k nepatrnému nárůstu elektroforetických mobilit enantiomerů cetirizinu.

#### 4.1.10 Vliv koncentrace S- $\beta$ -CD

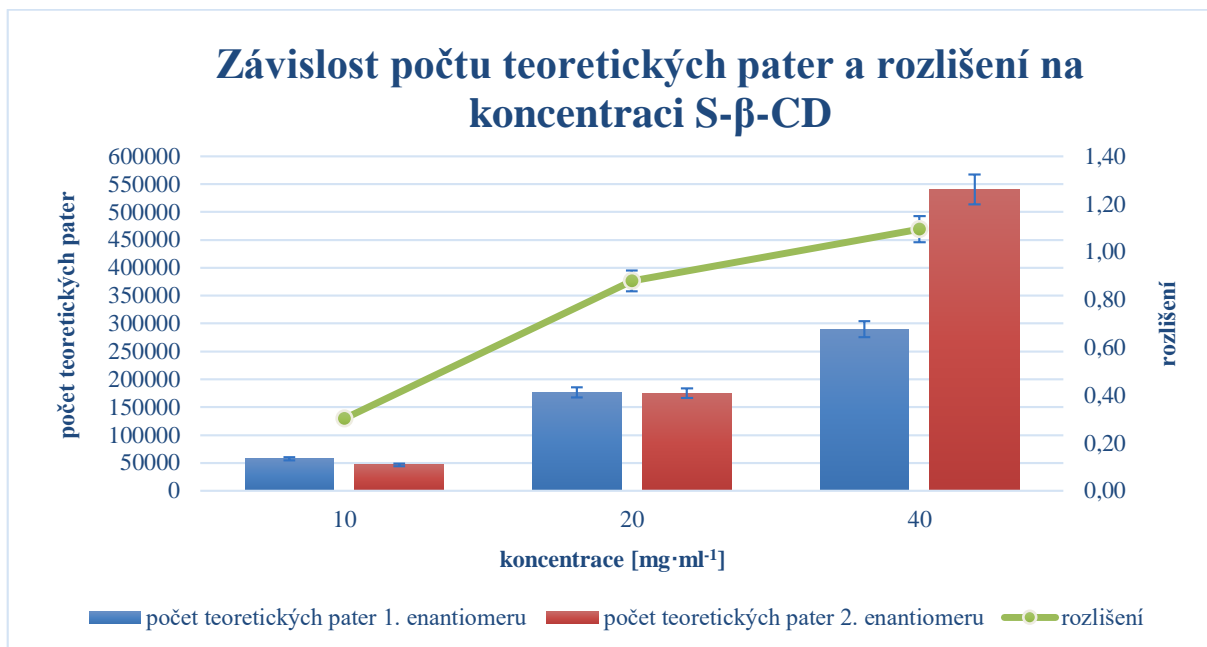
Ve všech předchozích analýzách byl S- $\beta$ -CD o koncentraci 40 mg·ml<sup>-1</sup>. Dalším krokem bylo tedy testování vlivu různých koncentrací S- $\beta$ -CD na chirální separaci.

Byly připraveny roztoky o koncentraci 1, 10, 20 a 40 mg·ml<sup>-1</sup> S- $\beta$ -CD v 500 mM borátu sodném pH 9,5.

Na kapiláru bylo vkládáno napětí +5 kV.



Obr. 41 Elektroferogramy chirální separace cetirizinu za použití různých koncentrací S- $\beta$ -CD



Obr. 42 Závislost počtu teoretických pater a rozlišení enantiomerů cetirizinu na koncentraci S-β-CD

Jak je vidět z (Obr. 41) při koncentraci 1 mg·ml<sup>-1</sup> CD nedochází k chirální separaci cetirizinu. Při koncentraci 10 mg·ml<sup>-1</sup> je už však vidět začínající separace.

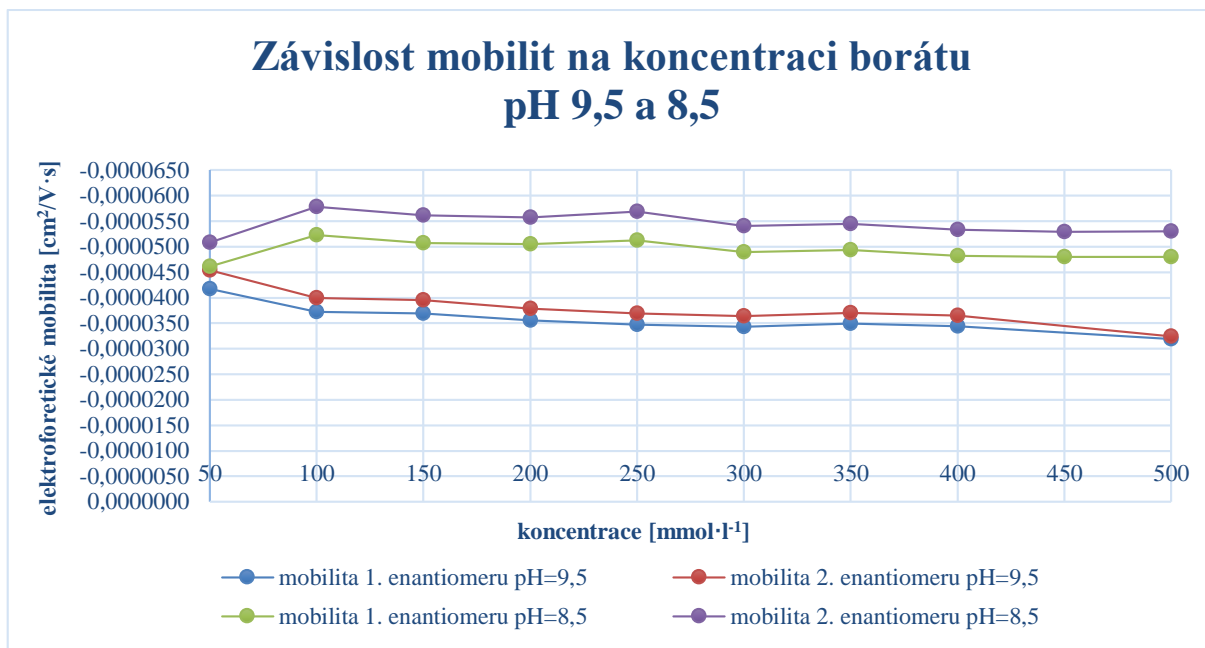
Z (Obr. 41 a 42) je patrné, že se zvyšující se koncentrací CD roste rozlišení a taktéž počet teoretických pater enantiomerů cetirizinu. Nejnižší koncentrace, při které je dosaženo dostatečného rozlišení je 40 mg·ml<sup>-1</sup> a proto se tato koncentrace běžně používá při chirální separaci cetirizinu.

#### 4.1.11 Rozsah koncentrací borátu sodného pH 9,5 a 8,5

Poté co jsem vyzkoušela, jaký vliv mají přídavky látek komplexující s borátem na chirální separaci cetirizinu, jsem se vrátila k samotné problematice 500 mM borátu sodného o různém pH. Podrobněji jsem se zabývala pH 9,5 a pH 8,5, které se jevilo jako nejideálnější pro chirální separaci cetirizinu v mém případě.

Byly připraveny roztoky borátu sodného pH 8,5 a 9,5 v rozsahu koncentrací od 50 mM do 500 mM a zkoumaly se u nich elektroforetické mobility jednotlivých enantiomerů při dané koncentraci.

Na kapiláru bylo vkládáno napětí +5 kV.



Obr. 43 Závislost elektroforetických mobilit enantiomerů cetirizinu na koncentraci borátu pH 8,5 a 9,5

Na (Obr. 43) je vidět, že jak při pH 9,5, tak 8,5 nedochází k nijak významným změnám elektroforetických mobilit enantiomerů. Při pH 9,5 jsou až na koncentrace 50 a 500 mM, které se mírně odlišují, elektroforetické mobility při všech ostatních koncentracích téměř totožné. Zajímavý však je fakt, že při koncentraci 450 mM dochází k vymizení separace.

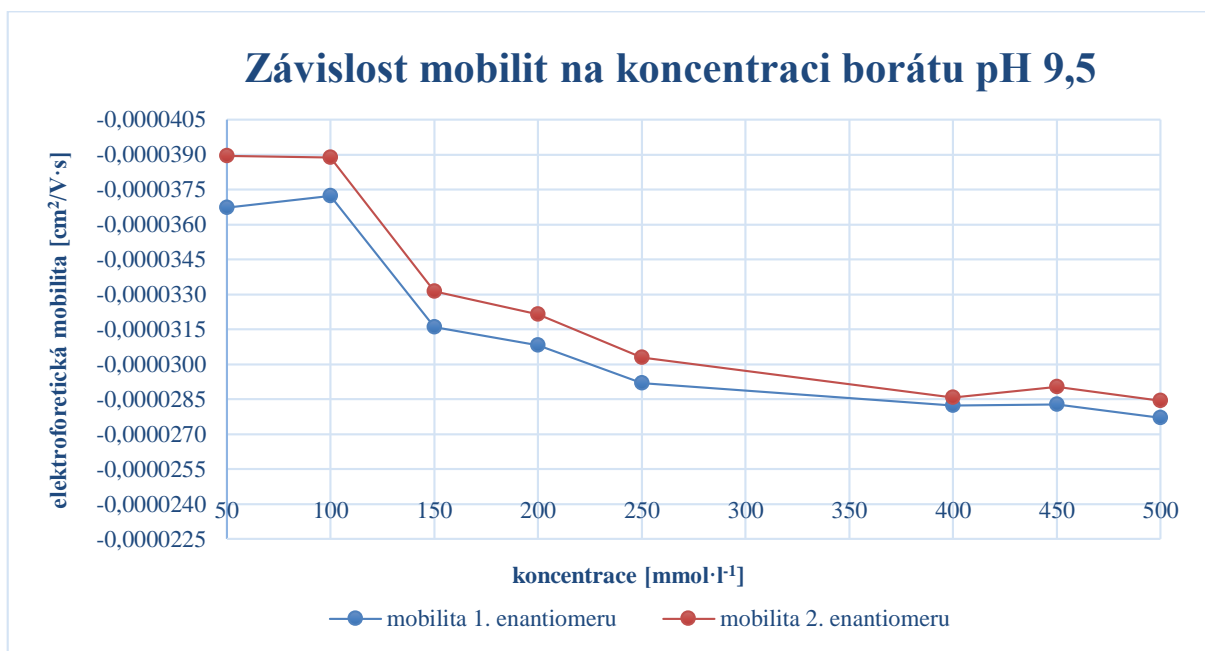
Při pH 8,5 je největší změny elektroforetických mobilit dosaženo při koncentraci 50 mM a při všech ostatních koncentracích jsou mobility téměř stejné.

#### 4.1.12 Rozsah koncentrací borátu pH 9,5 + 20 mg·ml<sup>-1</sup> CD

Jelikož v předchozích případech nedošlo k nijak výrazným změnám elektroforetických mobilit enantiomerů, tak jsem jako další možnost vyzkoušela různé koncentrace borátu sodného pH 9,5 znovu. Na rozdíl od předchozího případu kdy byla koncentrace S-β-CD v borátu sodném 40 mg·ml<sup>-1</sup>, tak teď jsem zvolila koncentraci 20 mg·ml<sup>-1</sup> a sledovala jsem, jaký to bude mít vliv na elektroforetické mobility enantiomerů

Připravila jsem si teda borát sodný pH 9,5 v rozsahu koncentrací od 50 do 500 mM s 20 mg·ml<sup>-1</sup> S-β-CD.

Na kapiláru bylo vkládáno napětí +5 kV.



Obr. 44 Závislost elektroforetických mobilit enantiomerů cetirizinu na koncentraci borátu sodného pH=9,5 s 20 mg·ml<sup>-1</sup> S-β-CD

Z (Obr. 44) je vidět, že až na koncentrace 50 a 100 mM, kdy jsou elektroforetické mobility enantiomerů nižší, jsou elektroforetické mobility enantiomerů při ostatních koncentracích téměř totožné. Zajímavějším faktem je však to, že při koncentraci 300 a 350 mM náhle vymizí chirální separace cetirizinu a znovu se objeví při 400 mM. To by mohlo poukazovat na možnost různé komplexace samotného borátu při vyšších hodnotách jeho koncentrace.

## 5 ZÁVĚR

Předmětem mé diplomové práce bylo studium vysoce koncentrovaného borátu sodného a jeho možného pozitivního vlivu na chirální separace. V mém případě se jednalo o studium vlivu na separaci chirálního léčiva cetirizinu.

V minulosti byla publikována řada článků popisující dobré komplexační vlastnosti borátu sodného s dioly a sacharidy<sup>5,6</sup>. Zajímalo mě tedy, jaké budou mít tyto komplexační vlastnosti borátu vliv na samotnou chirální separaci. V případě vysoce koncentrovaného borátu sodného zde existuje také možnost, že on sám anebo s přidavkem dalších komplexujících činidel bude schopný bez přidavku chirálního selektoru vytvářet chirální prostředí umožňující chirální separaci.

V mém případě jsem prvotně vyzkoušela, jaký mají vliv různé koncentrace borátu sodného na separaci a skutečně u koncentrace 500 mM bylo dosaženo nejlepšího rozlišení a největšího počtu teoretických pater enantiomerů cetirizinu. Dále jsem zkoušela, jaký mají vliv různé pH 500 mM borátu sodného na separaci a nejlepšího rozlišení kolem 8,0 bylo dosaženo při pH=8,5. To znamená, že v mém případě, jsou při tomto pH vytvářeny nejideálnější podmínky pro chirální separaci cetirizinu. Dále jsem zkoumala vlivy přidavků komplexujících látek na chirální separaci. Zjistila jsem, že při přidavku 100 mM glukosy, fruktosy a xylosy dojde ke zlepšení rozlišení enantiomerů cetirizinu.

Zjistila jsem tedy, že vysoce koncentrovaný borát jak bez přidavku, tak s přidavkem sacharidů má pozitivní vliv na chirální separaci a existuje zde tedy možnost, že umožní separaci i bez přidavku chirálního selektoru. Vyzkoušela jsem to i v mém případě separace cetirizinu, kde však k separaci bez přidavku selektoru bohužel nedošlo.



## 6 LITERATURA

1. Buszewski B., Dziubakiewicz E., Szumski M. (Eds): *Electromigration Techniques*. Springer, Polish 2013.
2. Rezanka P., Navratilova K., Rezanka M.: *Electrophoresis* 35, 2701 (2014).
3. Stavrou I. J., Breitbach Z. S., Kapnissi-Cristodoulou C. P.: *Electrophoresis* 36, 101 (2015).
4. Berg R., Peters J. A., Bekkum H.: *Carbohydrate Research* 253, 1 (1994).
5. Chapelle S., Verchere J.: *Tetrahedron* 44, 4469 (1988).
6. Kennedy G. R., How M. J.: *Carbohydrate Research* 28, 13 (1973).
7. Baker D. R.: *Capillary electrophoresis*. John Wiley a Sons, New York 1995.
8. Jorgenson J. W., Lukacs K. D.: *Anal. Chem.* 53, 1298 (1981).
9. Beck W.: *Nachr. Chem. Techn.* 1993, 41.
10. Engelhardt H., Beck W., Schmitt T.: *Capillary Electrophoresis*. Friedr. Vieweg a Sohn, Braunschweig/Wiesbaden 1996.
11. Marina M. L., Torre M.: *Talanta* 41, 1411 (1994).
12. Rahn P. C.: *Int. Lab.* 1990, 44.
13. Heiger D. N.: *High Performance Capillary Electrophoresis*. Hewlett Packard Company, France 1992.
14. Milofsky R. E., Yeung E. S.: *Anal. Chem.* 65, 153 (1993).
15. Nickerson B., Jorgenson J. W.: *J. High. Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun.* 11, 533 (1988).
16. Lux J. A., Huasing U., Schomburg G.: *J. High. Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun.* 13, 373 (1990).
17. McCormick R. M., Zagursky R. J.: *Anal. Chem.* 63, 750 (1991).
18. Burgi D. S., Salomon K., Chien R. L.: *J. Liq. Chromatogr.* 14, 847 (1991).
19. Rose D. J., Jorgenson J. W.: *J. Chromatogr.* 447, 117 (1988).
20. Albin M., Weinberger R., Sapp E., Moring S.: *Anal. Chem.* 63, 417 (1991).
21. Liu J., Shirota O., Novotny M.: *Anal. Chem.* 63, 413 (1991).
22. Liu J., Hsich Y. Z., Wiesler D., Novotny M.: *Anal. Chem.* 63, 408 (1991).
23. O'Shea T. J., Lunte S. M., LaCourse W. R.: *Anal. Chem.* 65, 948 (1993).
24. Avdalovic C. A. P., Rocklin R., Stillian J. R.: *Anal. Chem.* 65, 1470 (1993).

25. Lauer H. H., McManíggill D.: *Anal. Chem.* 58, 166 (1986).
26. Harrold M. P., JoWajtusik M., Riviello J., Henson P.: *J. chromatogr.* 640, 463 (1993).
27. Jandik P., Jones W. R.: *J. Chromatog.* 546, 431 (1991).
28. Walbroehl Y., Jorgenson J. W.: 1984. *J. Chromatog.* 315, 135 (1984).
29. Walbroehl Y., Jorgenson J. W.: *Anal. Chem.* 58, 479 (1986).
30. Tagliaro F., Manetto G., Crivellente F., Smith F. P.: *Forensic Sci. Int.* 92, 75 (1998).
31. Terabe S., Chen N., Otsuka K.: *Adv. Electrophor.* 7, 87 (1994).
32. Vindevogel J., Sandra P.: *Introduction to Micellar Electrokinetic Chromatography*. Huthig, Heidelberg 1992.
33. Kašička V.: *Chem. Listy* 91, 320 (1997).
34. Everaerts F. M., Beckers T. L., Verheggen T. P. E. M.: *Isotachophoresis, Theory, Instrumentation and Applications*. Elsevier, Amsterdam 1976.
35. Carchon H., Eggermont E.: *Am. Lab.* 1992, 67.
36. Hjertén S., Zhu M.: *J. Chromatogr.* 347, 265 (1985).
37. Cohen A. S., Karger B. L.: *J. Chromatog.* 397, 409 (1987).
38. Guttman A., Cohen A. S., Heigen D. N., Karger B. L.: *Anal. Chem* 62, 137 (1990).
39. Baba Y., Matsuura T., Wakamoto K., Morita Y., Nishitsu Y., Tshako M.: *Anal. Chem.* 64, 1221 (1992).
40. Marina M. L., Rios A., Varcacel M. (Eds): *Analysis and Detection by Capillary Electrophoresis*. Elsevier, The Netherlands 2005.
41. Landers J. P.: *Handbook of Capillary and Microchip Electrophoresis and Associated Microtechniques*. CRC press, New York 2008.
42. Schwer C., Kenndler E.: *Chromatographia* 30, 546 (1990).
43. McMurry J.: *Organická chemie*. VŠCHT Praha, Praha 2015.
44. Dzygiel P., Wieczorek P. P.: *Wiadomości Chemiczne* 58, 943 (2004).
45. Simo C., Garcia-Canas V., Cifuentes A.: *Electrophoresis* 31, 1142 (2010).
46. Szczepaniak W.: *Metody instrumentalne w analizie chemicznej*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2002.
47. Wang F., Khaledi M. G.: *J. Chromatogr. A* 875, 277 (2000).
48. Maier N. M., Franco P., Lindner W.: *J. Chromatogr. A* 906, 3 (2001).
49. Chankvetadze B.: *Capillary Electrophoresis in Chiral Analysis*. Willey, Chichester 1997.

50. Chankvetadze B.: *J. Chromatogr. A* 1168, 45 (2007).
51. Fanali S.: *J. Chromatogr. A* 875, 89 (2000).
52. Gubitz G., Schmid M. G.: *J. Chromatogr. A* 1204, 140 (2008).
53. Blanco M., Valverde I.: *Trends Anal. Chem.* 22, 428 (2003).
54. [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com), staženo 15. 1. 2016.
55. Horský J., Jindřich J.: *Chem. Listy* 107, 769 (2013).
56. Nakagawa T., Koji U., Kashiwa M., Watanabe J.: *Tetrahedron Lett.* 35, 1921 (1994).
57. Szejtli J.: *Chem. Rev.* 98, 1743 (1998).
58. [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com), staženo 15. 1. 2016.
59. Ali I., Kumerer A. K., Aboul -Enein H. Y.: *Chromatographia* 63, 295 (2006).
60. Ivanyi T., Pal K., Lazar D. : *J. Chromatogr. A.* 1028, 325 (2004).
61. [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com), staženo 15. 1. 2016.
62. Ward T. J., Oswald T. M.: *J. Chromatogr. A.* 792, 309 (1997).
63. Ward T. J., Farris III A. B.: *J. Chromatogr. A.* 906, 73 (2001).
64. Prokhorova A. F., Shapovalova E. N., Shpigun O. A.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 53, 1170 (2010).
65. [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com), staženo 15. 1. 2016.
66. Bluhm L., Huang J., Li T. Y.: *Anal. Bioanal. Chem.* 382, 592 (2005).
67. [www.rxlist.com](http://www.rxlist.com), staženo 15. 1. 2016.
68. Lloyd D. K., Aubry A. F., De Lorenzi E.: *J. Chromatogr. A.* 792, 349 (1997).
69. Nishi H.: *J. Chromatogr. A* 792, 327 (1997)
70. [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com), staženo 29. 1. 2016.
71. [www.cyclolab.hu](http://www.cyclolab.hu), staženo 29. 1. 2016.
72. [www.chemnet.com](http://www.chemnet.com), staženo 29. 1. 2016.
73. <http://livertox.nih.gov>, staženo 29. 1. 2016.
74. Eom H. Y.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 117, 380 (2016).
75. Tillement J. P., Testa B., Bree F.: *Biochem. Pharmacol.* 66, 1123 (2003).
76. [www.chemspider.com](http://www.chemspider.com), staženo 2. 2 2016.
77. [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com), staženo 2. 2. 2016.
78. Čopíková J.: *Chemie a analytika sacharidů*. VŠCHT, Praha 1997.

79. Pelikán M.: *Technologie sacharidů*. Mendělova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Brno 1999.
80. www.chemspider.com, staženo 2. 2. 2016.
81. www.sigmaaldrich.com, staženo 2. 2. 2016.
82. <http://old.pglbc.cz/files/chv/slovník/sacharosa.html>, staženo 2. 2. 2016.
83. www.sigmaaldrich.com, staženo 2. 2. 2016.
84. www.sigmaaldrich.com, staženo 13. 2. 2016.
85. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>, staženo 13. 2. 2016.
86. www.sigmaaldrich.com, staženo 2. 3. 2016.
87. Tagliaro F., Bortolotti F.: *Electrophoresis* 29, 260 (2008).
88. Taylor R. B., Low A. S., Reid R. G.: *J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl.* 675, 213 (1996).
89. Li J., Ye J.: *Biomed. Chromatogr.* 24, 186 (2010).
90. Tagliaro F., Bortolotti F., Pascali J. P.: *Anal. Bioanal. Chem.* 388, 1359 (2007).
91. Oehrle S. A.: *J. Chromatogr. A* 745, 233 (1996).
92. Szafarska M., Wietecha-Posluszny R., Woźniakiewicz M., Kościelniak P.: *Forensic Sci. Int.* 212, 78 (2011).
93. Bertaso A., Musile G., Gottardo R., Seri C., Tagliaro F.: *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 1000, 130 (2015).
94. Chou Y. W., Huang W. S., Ko C. C., Chen S. H.: *J. Sep. Sci.* 31, 845 (2008).
95. Mikus P., Valaskova I., Havranek E.: *J. Sep. Sci.* 28, 1278 (2005).
96. Deng X. L.: *Chirality* 24, 276 (2012).

## 7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

CD	cyklodextrin
CDT	karbohydrát deficientní transferin
CE	kapilární elektroforéza
CEC	kapilární elektrochromatografie
CGE	kapilární gelová elektroforéza
CIEF	kapilární izoelektrická fokusace
CITP	kapilární izotachoforéza
CS	chirální selektory
CZE	kapilární zónové elektroforéza
DAD	detektor diodového pole
el.	elektrický
EOF	elektroosmotický tok
EPO	erythropoetin
GC	plynová chromatografie
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
LC	kapalinová chromatografie
LE, TE	vedoucí elektrolyt, terminující elektrolyt
LIF	laserem indukovaná fluorescence
MECC	micelární elektrokinetická kapilární chromatografie
MEKC	micelární elektrokinetická chromatografie
MS	hmotnostní spektrometrie
např.	například
pI	isoelektrický bod
SDS	dodecyl sulfát sodný
SFC	superkritická fluidní chromatografie
S- $\beta$ -CD	sulfatovaný- $\beta$ -CD
UV, Vis	ultrafialové (ultraviolet), viditelné
VWD	detektor s variabilní vlnovou délkou
$\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$	alfa, beta, gama