

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI**

**Přírodovědecká fakulta**

**Katedra analytické chemie**

# **DISERTAČNÍ PRÁCE**

**Nové přístupy v ovlivnění selektivity v kapilární  
elektroforéze**

Autor práce:

Studijní obor:

Vedoucí práce:

Konzultant práce:

Mgr. Petra Švecová

Analytická chemie

doc. RNDr. Jan Petr, Ph.D.

RNDr. Tomáš Pluháček, Ph.D.

**Olomouc 2022**

### **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně pod vedením doc. RNDr. Jana Petra, Ph.D. a veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny 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.....

.....

Petra Švecová

## **Poděkování**

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli doc. RNDr. Janovi Petrovi, Ph.D. za odborné vedení a cenné rady po celou dobu mého studia.

Rovněž bych chtěla poděkovat všem kolegům z Katedry analytické chemie ať už současným nebo bývalým za jejich ochotu a pomoc během mého studia, zejména pak Mgr. Danielovi Baronovi, Ph.D. a RNDr. Tomášovi Pluháčkovi, Ph.D. za realizaci spojení CE s ICP-MS, Mgr. Andree Šebestové, Ph.D., Mgr. Janovi Rozsypalovi, Mgr. Danielovi Rimanovi, Ph.D. a M.Sc. Marianně Nytky za pomoc a podporu ať už v laboratoři, tak mimo ni.

Obrovské poděkování patří samozřejmě také mým rodičům, sestře, neteři a přátelům za nepřetržitou podporu po celou dobu mého studia.

Dále bych chtěla poděkovat RNDr. Barboře Papouškové, Ph. D. za pořízená MS spektra pro identifikaci nečistoty.

V neposlední řadě bych chtěla poděkovat projektům GA ČR (19-23033S), GA ČR (20-07350S), IGA\_PrF\_2017\_020, IGA\_PrF\_2018\_027, IGA\_PrF\_2019\_028, IGA\_PrF\_2020\_030 a IGA\_PrF\_2021\_021 za jejichž finanční podpory disertační práce vznikla.

# Souhrn

Předložená disertační práce je zaměřena na nové přístupy v ovlivnění selektivity v kapilární elektroforéze. Teoretická část je rozdělena do pěti hlavních kapitol: kapilární elektroforéza (CE), micelární elektrokinetická kapilární chromatografie (MEKC), chirální látky a jejich separace, přístupy pro zvyšování citlivosti v CE a komplexace borát glukóza. Jednotlivé kapitoly popisují teoretické základy pro experimentální část.

První část experimentální práce je zaměřena na studium vlivu přídavku glukózy do borátového pufru na chirální separaci cetirizinu. Je známo, že diolové sloučeniny (sacharidy) tvoří komplexy s borátovým aniontem. Bylo tedy zkoumáno, jaký vliv mohou mít tyto komplexy na chirální separaci. Jako první byla optimalizovaná metoda pro separaci enantiomerů cetirizinu bez přídavku glukózy. Výsledné složení pufru bylo:  $500 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  borát sodný pH 9,5 obsahující  $15 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  S- $\beta$ -CD. Dále byl zkoumán efekt přídavku glukózy a její koncentrace. Při přídavku  $1000 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  glukózy stačilo použít  $1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  S- $\beta$ -CD, podařilo se tedy 15x snížit množství selektoru. Dále bylo zkoumáno, proč má vlastně přídavek glukózy vliv na separaci. Byl studován vliv typu pufru, typu sacharidu a přítomnosti cyklodextrinu v pufru na chirální separaci. Na závěr byla studovaná tvorba komplexů mezi borátovým aniontem, glukózou, cyklodextrinem a cetirizinem pomocí hmotnostní spektrometrie s ionizací elektrosprejem.

Další část práce je věnována vývoji metody pro ultrastopové stanovení oxaliplatiny a jejích nečistot. Oxaliplatina a její nečistoty mohou být přítomny v ultrastopových koncentracích v životním prostředí, kde negativně ovlivňují další žijící organismy. Z důvodu stanovení takto malých koncentrací musela být CE spojena s citlivým detektorem, v našem případě s ICP-MS a musela být použita „online“ prekoncentrační technika „sweeping“ vhodná pro MEKC mód. Jako první tedy byla metoda vyvinuta a optimalizována pro UV detekci. Optimalizace zahrnovala optimalizaci pH, koncentrace pufru a koncentrace použitého surfaktantu, v tomto případě aniontového surfaktantu, dodecyl sulfátu sodného (SDS), a optimalizace doby dávkování. Výsledné složení pufru bylo:  $25 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  fosfát sodný pH 2,15 s  $175 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  SDS. Dále byla metoda vyvinutá pro UV detekci převedena do ICP-MS, kde byla provedena optimalizace složení pomocné kapaliny. Na závěr byly obě vyvinuté metody, jak sweeping-MEKC-UV, tak sweeping-MEKC-ICP-MS zvalidovány. Metoda sweeping-MEKC-ICP-MS byla také použita pro analýzu oxaliplatiny a jejích nečistot v modelových vzorcích.

# Summary

The submitted dissertation is focused on new approaches in influencing selectivity in capillary electrophoresis. The theoretical part is divided into five main chapters: capillary electrophoresis (CE), micellar electrokinetic chromatography (MEKC), chiral substances and their separations, approaches used to increase sensitivity in CE, and complexation of borate with glucose. Individual chapters describe theoretical fundamentals for the experimental part.

The first part of the experimental work focuses on studying the effect of glucose addition to the borate buffer on the chiral separation of cetirizine. It is known that compounds with diol groups (carbohydrates) form complexes with borate anion. Therefore, it was examined what effect these complexes can have on chiral separation. First, the method for the separation of cetirizine enantiomers was optimized without glucose addition. The final composition of the buffer was: 500 mmol<sup>-1</sup> sodium borate pH 9.5 containing 15 mg·ml<sup>-1</sup> S-β-CD. Furthermore, the effect of glucose addition and its concentration was examined. The addition of 1000 mmol<sup>-1</sup> glucose led to the 15 times decreased consumption of S-β-CD (1 mg·ml<sup>-1</sup>). Further, the research concerned the explanation of glucose's role in dual chiral separation. The effect of buffer type, carbohydrate type, and cyclodextrin concentration in the buffer on the chiral separation was studied. Finally, the formation of complexes between borate anion, glucose, cyclodextrin, and cetirizine was identified by electrospray mass spectrometry.

The next part of the thesis is devoted to the development of the method for the determination of oxaliplatin and its impurities at ultratrace levels. The trace amounts of oxaliplatin and its impurities can negatively affect other living organisms in the environment. In this case, the CE was connected to the ICP-MS, sensitive and selective detector, and „online“ preconcentration technique „sweeping“ to achieve reliable limits of detections. The development of the CE-UV method covered optimization of concentration and buffer pH, the concentration of surfactant (sodium dodecyl sulfate (SDS)), and the injection time. The final composition of the buffer was: 25 mmol·l<sup>-1</sup> sodium phosphate pH 2.15 with 175 mmol<sup>-1</sup> SDS. In addition, the method developed for UV detection was transferred to ICP-MS, where the sheath liquid composition was optimized. Finally, both developed methods, sweeping-MEKC-UV and sweeping-MEKC-ICP-MS, were fully validated. The validated sweeping-MEKC-ICP-MS method was subsequently used for the analysis of oxaliplatin and its impurities in model samples.

# Obsah

1	Úvod.....	1
2	Teoretická část .....	2
2.1	Kapilární Elektroforéza.....	2
2.1.1	Instrumentace kapilární elektroforézy.....	4
2.1.2	Teorie kapilární elektroforézy.....	7
2.1.3	Módy kapilární elektroforézy.....	11
2.2	Micelární elektrokinetická kapilární chromatografie.....	12
2.2.1	Surfaktanty .....	13
2.2.2	Princip MEKC.....	14
2.2.3	Ovlivňování selektivity v MEKC.....	16
2.3	Chirální látky a jejich separace .....	17
2.3.1	Podstata chirální separace v CE.....	18
2.3.2	Chirální selektory v CE.....	20
2.3.3	Ovlivňování selektivity v chirálních separacích .....	24
2.4	Metody zvýšení citlivosti v CE.....	25
2.4.1	Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem.....	26
2.4.2	Online prekoncentrační techniky .....	28
2.5	Komplexace borát glukóza.....	31
3	Cíle disertační práce .....	33
4	Experimentální část.....	34
4.1	Separace enantiomerů cetirizinu kapilární elektroforézou s duálním selektorovým systémem tvořeným komplexem borát-glukóza a S-β-CD .....	34
4.1.1	Úvod.....	34
4.1.2	Chemikálie a vzorky .....	35
4.1.3	Příprava roztoků sepačnic pufrů a standardu .....	36

4.1.4	Instrumentace a experimentální podmínky .....	36
4.1.5	Výsledky a diskuze .....	37
4.1.6	Závěr .....	49
4.2	Ultrastopové stanovení nečistot oxaliplatiny pomocí sweeping-MEKC-ICP-MS .....	50
4.2.1	Úvod.....	50
4.2.2	Chemikálie a vzorky .....	51
4.2.3	Příprava roztoků separačních pufrů a standardů.....	52
4.2.4	Instrumentace a experimentální podmínky .....	53
4.2.5	Výsledky a diskuze .....	55
4.2.6	Validace .....	64
4.2.7	Kvantitativní analýza modelových roztoků.....	68
4.2.8	Závěr .....	70
5	Závěr .....	71
6	Literatura.....	72
7	Seznam zkratk .....	87
8	Životopis .....	89

# 1 Úvod

Výhodou kapilární elektroforézy oproti jiným separačním technikám je její použitelnost pro separaci široké škály látek, ať už velkých biomolekul, malých anorganických iontů, organických molekul nebo látek chirálních, za použití stále stejného analytického přístroje (popřípadě i stejné kapiláry) pouhou změnou separačního módu. Další výhodou je její nejvyšší rozlišovací schopnost ze všech kapalinových separačních technik, které je dosaženo rovným rychlostním profilem elektroosmotického toku a minimální podélnou difúzí. V neposlední řadě je dobré zmínit velmi malou spotřebu chemikálií (nanolitrová spotřeba vzorku a mikrolitrová spotřeba separačního pufru) a menší zátěž pro životní prostředí (odpad z kapilární elektroforézy je většinou tvořen vodným separačním pufrům s minimálním obsahem organických látek) [1].

Řada biologicky aktivních látek ať už přírodního nebo syntetického původu je opticky aktivní, a proto je potřeba mít analytické techniky vhodné pro separace izomerů těchto látek a pro kontrolu jejich optické čistoty. CE je velmi vhodnou technikou pro chirální separace, ať už díky velkému množství rozdílných chirálních selektorů, které lze použít anebo díky jejímu širokému aplikačnímu rozsahu [2]. Mezi nejhojněji používané chirální selektory v CE se řadí cyklodextriny [3]. Nevýhodou jejich použití je relativně vysoká cena. Proto bude první část disertační práce zaměřena na snížení množství použitého chirálního selektoru (S- $\beta$ -CD) při chirální separaci enantiomerů cetirizinu.

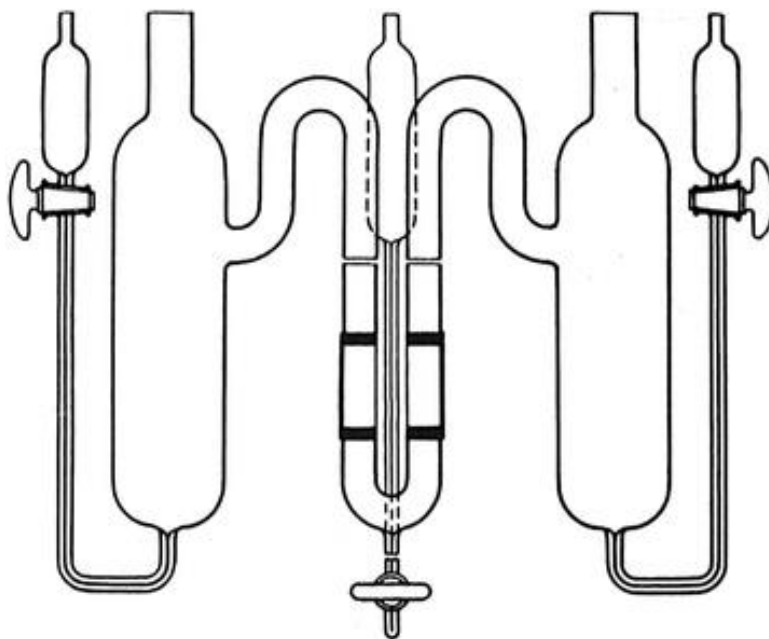
Kapilární elektroforéza v módech CZE a MEKC se běžně používá pro stanovení farmaceutik v životním prostředí. Jelikož jsou farmaceutika přítomná v životním prostředí ve velmi nízkých koncentracích, je potřeba vyvíjet analytické metody s dostatečně nízkými mezemi detekce [4]. Nevýhodou standardní CE-UV jsou vysoké meze detekce a stanovitelnosti způsobené dávkováním menšího množství vzorku do kapiláry (řádově jednotky nL) a krátkou optickou dráhou (dána průměrem kapiláry) v případě UV/Vis detekce. Toto omezení CE může být minimalizováno použitím prekoncentračních technik, spojením CE s detektory dosahujícími velmi nízkých mezí detekce anebo jejich kombinací. Další část práce bude tedy zaměřena na vývoj metody pro ultrastopovové stanovení oxaliplatinu a jejich platinových nečistot pomocí CE-ICP-MS.



## 2 Teoretická část

### 2.1 Kapilární Elektroforéza

Elektroforéza je definovaná jako rozdílný pohyb nabitých částic (iontů) v elektrickém poli vyvolaný přitažlivými nebo odpuzivými silami. Jako separační technika byla poprvé představena Tiseliiem v roce 1937 separací směsi proteinů. Směs proteinů byla umístěna do trubice mezi nádoby s roztokem pufru a po aplikaci el. pole začaly složky vzorku migrovat různou rychlostí podle jejich náboje a mobility [5, 6]. Schéma první použité aparatury je na Obr. 1.



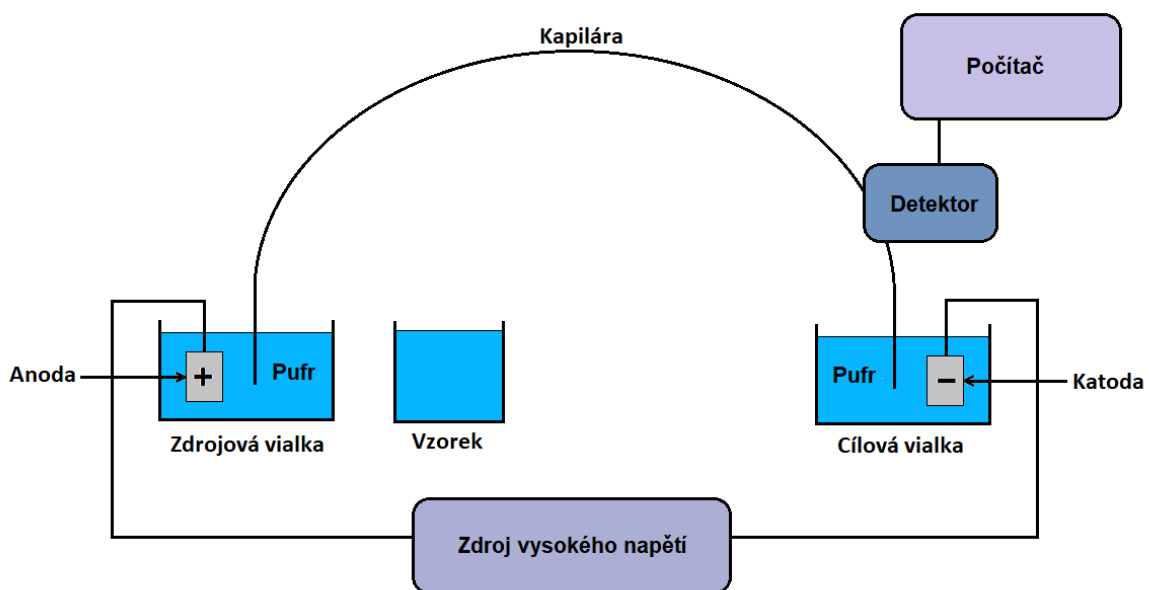
Obr. 1 Aparatura elektroforézy od Tiselie. Převzato z publikace [6].

Toto uspořádání mělo své nedostatky způsobené tepelnou difúzí a prouděním. V současnosti je proto elektroforéza prováděna ve dvou uspořádáních minimalizujících tepelnou difúzi a proudění: plošná gelová elektroforéza, anebo kapilární elektroforéza. Jejich porovnání je v Tab. 1.

Tab. 1 Srovnání plošné a kapilární elektroforézy. Převzato a upraveno z publikace [5].

Plošná elektroforéza	Kapilární elektroforéza (CE)
<ul style="list-style-type: none"> <li>❖ Separace probíhá v polyakrylamidovém nebo agarózovém gelu</li> <li>❖ Separace biologických makromolekul</li> <li>- Dlouhá doba analýzy, nízká účinnost, problémy při detekci</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>❖ Separace probíhá v křemenné kapiláře</li> <li>❖ Separace široké škály molekul (aminokyselin, chirálních látek, anorganických iontů, peptidů, fragmentů DNA...)</li> <li>+ Krátká doba analýzy, vysoká účinnost, snadná detekce</li> </ul>

Klíčovými rysy kapilární elektroforézy je její obecně jednoduchá instrumentace, nízká spotřeba vzorku, chemikálií a rozpouštědel. Schéma systému CE je na Obr. 2. Elektroforetická separace probíhá v křemenné kapiláře naplněné separačním pufr/základním elektrolytem (BGE) jejíž oba konce jsou vedeny skrze elektrody do vialek se separačním pufrzem. Vzorek je nadávkován do kapiláry po záměně vialky (většinou zdrojové) za vialku se vzorkem a aplikaci elektrického napětí, anebo tlaku. Po opakované záměně vialky se vzorkem za zdrojovou vialku a aplikaci el. napětí probíhá samotná separace.



Obr. 2 Systém kapilární elektroforézy. Ilustrace autora.

### **Základními kroky CE analýzy tedy jsou:**

- a) Promytí kapiláry hydroxidem sodným, vodou a následně separačním pufrem před prvním použitím a mezi experimenty. V případě použití kyselých pufrů se může promývat i HCl pro zlepšení opakovatelnosti analýz (NaOH-H<sub>2</sub>O-HCl-H<sub>2</sub>O-pufř nebo mezi analýzami HCl-H<sub>2</sub>O-pufř).
- b) Naplnění zdrojové vialky, kapiláry a koncové vialky základním elektrolytem (obvykle vodný roztok separačního pufru) a promytí kapiláry pufrem.
- c) Nadávkování vzorku do kapiláry a aplikace elektrického napětí.
- d) Migrace a separace analytů uvnitř kapiláry po aplikaci el. napětí.
- e) Detekce analytů v detektoru a získání výsledků analýzy ve formě elektroferogramu [7].

V následujících odstavcích budou popsány teoretické a praktické aspekty kapilární elektroforézy: instrumentace, princip separace a jednotlivé módy CE.

## **2.1.1 Instrumentace kapilární elektroforézy**

**Zdroj vysokého napětí:** Účelem zdroje vysokého napětí je poskytování napětí, proudu a výkonu potřebných pro průběh elektroforézy. Zdroj v CE umožňuje pracovat nejenom za konstantního napětí, ale i proudu a výkonu. Jeho pomocí je také možné měnit polaritu elektrod a pracovat za gradientu napětí, proudu nebo výkonu.

**Zavádění vzorku:** Na rozdíl od HPLC a GC kde je vzorek dávkován do tekoucí kapaliny, anebo proudu plynu, vzorek v CE je dávkován do kapiláry, kterou současně neprotéká pufř. První je totiž vzorek nadávkován do kapiláry, a až poté je vkládáno napětí, které vyvolává pohyb kapaliny uvnitř kapiláry. Vzorek může být dávkován ze vzorkové vialky do kapiláry hydrodynamicky nebo elektrokineticky.

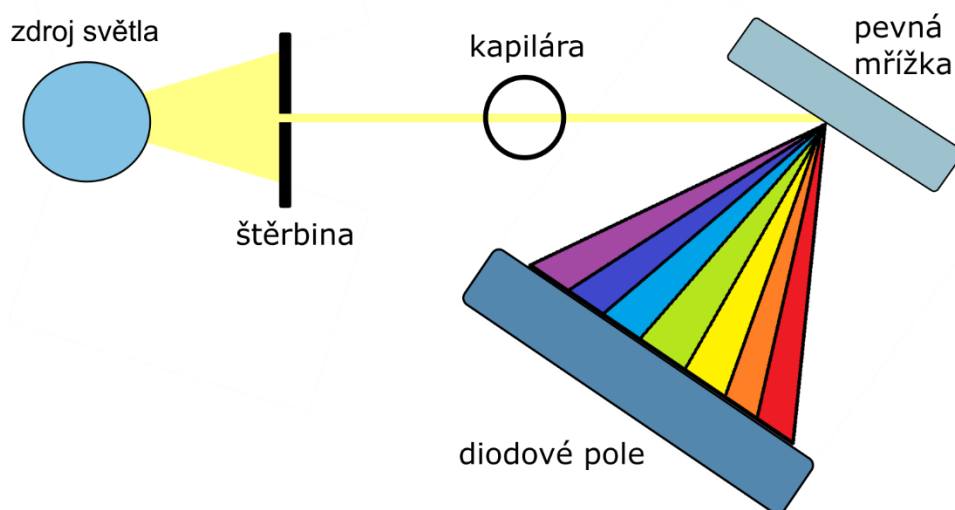
**Kapilára:** Kapiláry pro CE mohou být zhotoveny ze tří materiálů: skla, teflonu nebo taveného oxidu křemičitého. V současnosti se již odstoupilo od používání klasických skleněných kapilár (nepropouští vlnové délky pod 280 nm) a teflonové kapiláry jsou již výhradně používány pro izotachoforézu s vodivostní detekcí. Ve většině případů jsou tedy používány kapiláry z oxidu křemičitého. Kvůli křehkosti taveného křemene jsou kapiláry pokryté ochranou vrstvou polyimidu, která

je však nepropustná pro UV/Vis záření, z tohoto důvodu se pro spektrofotometrickou detekci tato vrstva z povrchu kapiláry odstraňuje opálením nebo mechanicky skalpelem.

**Termostat:** Termostatování kapiláry je důležité pro účinné odvádění Jouleova tepla z jejího povrchu a pro dosažení reprodukovatelných výsledků analýz. Kapilára může být termostatovaná dvěma způsoby: proudícím vzduchem, anebo kapalinou.

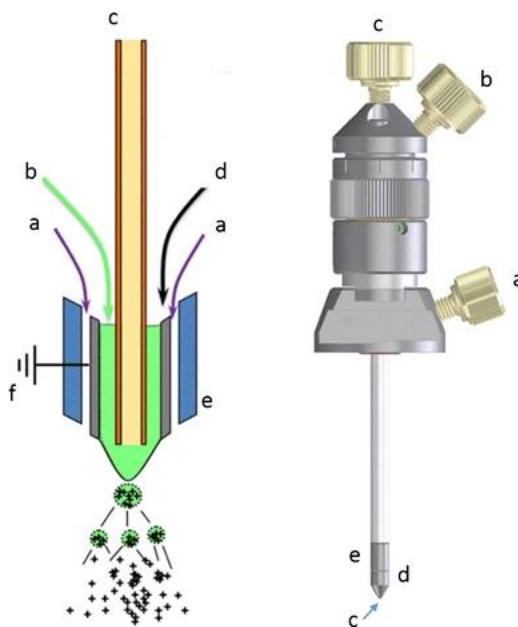
**Detektor:** Mezi nejběžněji používané detekční techniky v CE patří: přímá a nepřímá UV/Vis detekce, přímá a nepřímá fluorescence, laserem indukovaná fluorescence („*Laser-induced fluorescence*“, LIF), vodivostní a amperometrická detekce a v neposlední řadě hmotnostně spektrometrická detekce („*Mass spectrometry*“, MS).

- ❖ **Detektor s diodovým polem („*Diode array detector*“, DAD)** je nejčastěji používaným typem UV/Vis detektoru. Schéma jeho uspořádání je na Obr. 3. Záření ze zdroje (deuteriová lampa) prochází skrz kapiláru přes vypálené okýnko v polyimidu, rozkládá se na holografické mřížce a dopadá na soubor fotodiod (obvykle 200-500). Na jednotlivé fotodiody dopadá záření o velmi úzkém intervalu vlnových délek [3].



Obr. 3 Schéma DAD. Ilustrace autora.

❖ **Molekulová hmotnostní spektrometrie** je univerzální detektor pro CE umožňující vysoce citlivou a selektivní kvalitativní i kvantitativní analýzu širokého spektra látek a přesné stanovení jejich relativních molekulových hmotností a určení jejich molekulární struktury. Pro spojení CE-MS je nejčastěji používána ionizace elektrosprejem („*Electrospray ionization*“, ESI) a tři typy rozhraní: 1) bez přídavné kapaliny, 2) s přídavnou kapalinou a 3) kapalinový spoj [8]. Nejpoužívanější typ rozhraní je s přídavnou kapalinou (Obr. 4). Pro toto rozhraní je typické souosé uspořádání, kdy je separační kapilára umístěna v další kapiláře, kterou proudí přídavná kapalina a jejím prostřednictvím je uzavřen separační okruh a je na ni vloženo sprejovací napětí. Obě kapiláry, jak separační, tak sprejovací ústí v iontovém zdroji, kde dochází k mísení přídavné kapaliny a „eluentu“. Přídavná kapalina má kromě vytvoření vodivého spojení za úkol vytvářet stabilní elektrosprej, protože nízký průtok kapaliny separační kapilárou nemusí být pro stabilní elektrosprej dostatečný. Pro CE-ESI-MS spojení je také důležité používat těkavé pufrů (nejčastěji mravenčan a octan amonný), aby nedocházelo k zanášení iontového zdroje [8, 9].



Obr. 4 CE-ESI-MS spojení s pomocnou kapalinou: a) zmlžující plyn, b) pomocná kapaliny, c) CE kapilára s BGE, d) nerezová sprejovací jehla, e) vnější trubice a f) uzemnění. Převzato z publikace [9].

❖ **Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS)** – detailní popis je uveden v kapitole 2.4.1.

## 2.1.2 Teorie kapilární elektroforézy

### Síly působící na ionty při CE separaci

Na ionty v křemenné kapiláře naplněné separačním pufrem působí dvě síly, elektrostatická síla  $F_1$  a k ní opačná síla třecí  $F_2$ . Po aplikaci separačního napětí jsou tyto dvě síly v rovnováze a platí Rov. 1.

$$qE = 6\pi\eta r v_{ep}, \quad (1)$$

kde  $q$  je náboj částice,  $E$  je intenzita elektrického pole ( $\text{V}\cdot\text{cm}^{-1}$ ),  $\eta$  je dynamická viskozita roztoku ( $\text{kg}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ ),  $r$  je hydrodynamický poloměr částice (m) a  $v_{ep}$  je elektroforetická rychlost ( $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ ). Elektroforetickou rychlost částice vyjadřuje Rov. 2, kde  $\mu_{ep}$  je elektroforetická mobilita ( $\text{cm}^2\cdot\text{V}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ ), kterou popisuje Rov. 3.

$$v_{ep} = \mu_{ep} E \quad (2)$$

$$\mu_{ep} = \frac{q}{6\pi\eta r} \quad (3)$$

Elektroforetická mobilita částic závisí přímo úměrně na jejich náboji a nepřímo úměrně na jejich poloměru a viskozitě prostředí. Pro neutrální částice je mobilita nulová, protože  $q = 0$ .

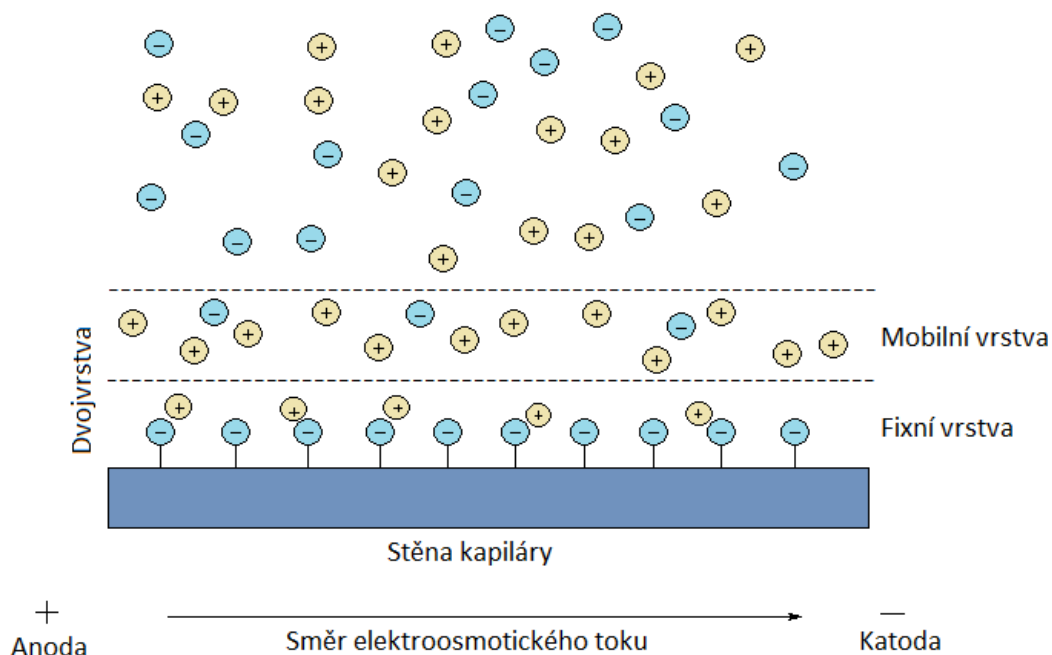
Hodnoty elektroforetických mobilit, které najdeme v tabulkách, jsou fyzikální konstanty a vztahují se pro nekonečně zředěné analyty. Tyto hodnoty tabulkových mobilit se však liší od hodnot mobilit stanovených experimentálně, z tohoto důvodu se zavádí nová veličina: efektivní mobilita  $\mu_{eff}$  beroucí v potaz stupeň ionizace (disociace) analytu  $\alpha$  (Rov. 4) [5].

$$\mu_{eff} = \alpha \cdot \mu_{ep} \quad (4)$$

Efektivní mobilita je značně závislá na pH a složení separačního pufru. Pro daný ion a separační pufr je při dané teplotě efektivní mobilita charakteristickou konstantou, a tedy změnou pufru můžeme ovlivnit selektivitu separace směsí iontů [3].

V kapilární elektroforéze se kromě rozpuštěných iontů pohybuje v kapiláře pod vlivem el. pole i elektrolyt. Tento tok kapaliny v kapiláře se nazývá elektroosmotický tok („*Electroosmotic flow*“, EOF). Předpokladem vzniku EOFu je přítomnost elektrických nábojů na vnitřní stěně kapiláry. Vnitřní stěnu kapiláry můžeme „nabít“ ionizací funkčních skupin na jejím povrchu anebo adsorpcí iontů a dalších

komponent z elektrolytu na stěnu kapiláry [3, 7]. V případě, že je křemenná kapilára naplněna pufrům o pH vyšším než 3, podléhají silanolové skupiny disociaci za tvorby silanoátů, a tím získává stěna kapiláry záporný náboj. Negativní náboje na stěně kapiláry přitahují kationty z elektrolytu a vytvářejí fixní (Sternovu) vrstvu kationtů. Ne všechny negativní náboje na stěně kapiláry jsou však kompenzovány kationty z fixní vrstvy, a proto se formuje sekundární (mobilní) vrstva kationtů, ve které nejsou kationty tak silně vázány. Tyto dvě vrstvy společně tvoří dvojvrstvu kationtů (Obr. 5). Působením el. pole se mobilní vrstva kationtů i se svými solvatačními obaly pohybuje směrem ke katodě, a tím vyvolává nucený tok kapaliny uvnitř separační kapiláry, který má plošný profil [3, 7, 10].



Obr. 5 Diagram tvorby elektrické dvojvrstvy. Ilustrace autora.

Na hranici dvou vrstev vzniká potenciálový rozdíl nazývaný zeta potenciál  $\zeta$ . Elektroosmotický tok je přímo úměrný zeta potenciálu a zeta potenciál je přímo úměrný tloušťce dvojvrstvy  $\delta$ , hustotě náboje na povrchu kapiláry  $e$  a nepřímo úměrný dielektrické konstantě elektrolytu  $\varepsilon$  (Rov. 5) [7].

$$\zeta = 4\pi\delta e/\varepsilon \quad (5)$$

Hustota náboje na povrchu kapiláry je závislá na pH, proto můžeme změnou pH pufru ovlivnit velikost zeta potenciálu a tím i velikost EOFu (s vyšším pH roste velikost EOFu). Tloušťka dvojvrstvy je zase

závislá na koncentraci elektrolytu, proto můžeme změnou koncentrace elektrolytu ovlivňovat velikost zeta potenciálu a tím i EOF (s vyšší koncentrací klesá velikost EOFu).

Velikost elektroosmotického toku je vyjadřována elektroosmotickou mobilitou  $\mu_{EOF}$  (Rov. 6), kde  $\eta$  je viskozita elektrolytu ( $\text{kg}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ ),  $\varepsilon$  je dielektrická konstanta elektrolytu a  $\zeta$  je zeta potenciál.

$$\mu_{EOF} = \frac{\varepsilon\zeta}{4\pi\eta}, \quad (6)$$

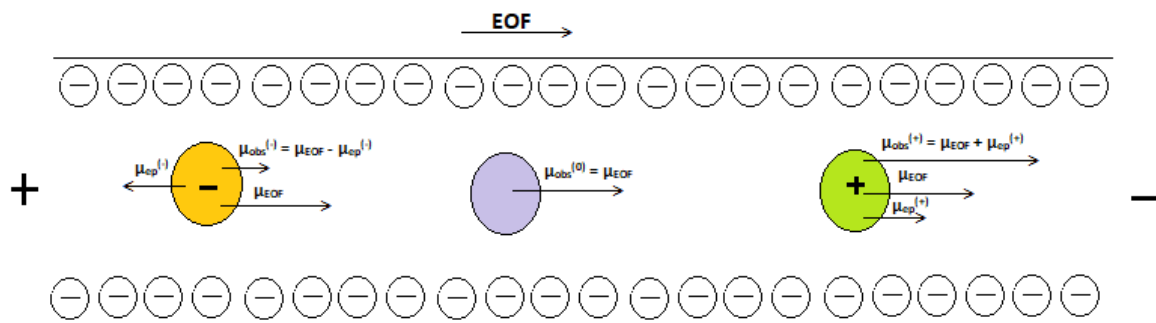
Experimentálně změříme velikost EOFu nadávkováním neutrálního a se složkami pufru neinteragujícího markeru (methanol, formamid, mesityloxid) do křemenné kapiláry naplněné separačním puftrem. Po aplikaci napětí se bude neutrální marker pohybovat kapilárou rychlostí EOFu. Z migračního času markeru  $t_{nm}$  a délky kapiláry  $l$  (od inletu po detektor) vypočítáme rychlost elektroosmotického toku  $v_{EOF}$  (Rov. 7).

$$v_{EOF} = l/t_{nm} \quad (7)$$

## Elektroforetická separace kationtů a aniontů

Působením elektrického pole se částice obsažené ve vzorku pohybují v kapiláře různou rychlostí (elektroforetickou mobilitou) čímž dochází k jejich separaci. V případě nemodifikované křemenné kapiláry a dostatečně velkého EOFu ( $\mu_{EOF} > \mu_{ep}$ ) jsme schopni od sebe odseparovat kationty, anionty a neutrální látky v jednom kroku, a to v následujícím pořadí. První detektoru dosáhnou kationty, jejichž zdánlivá mobilita  $\mu_{obs}^{(+)}$  je dána součtem jejich elektroforetické mobility  $\mu_{ep}^{(+)}$  a mobility EOFu. Dále detektorem procházejí nerozseparované neutrální látky, které se pohybují rychlostí EOFu. Jako poslední detektoru dosáhnou anionty, jejichž zdánlivá mobilita  $\mu_{obs}^{(-)}$  je dána rozdílem mezi elektroosmotickým tokem a jejich elektroforetickou mobilitou  $\mu_{ep}^{(-)}$  (Obr. 6).





Obr. 6 Ukázka separace negativně nabitého, pozitivně nabitého a neutrálního analytu. Ilustrace autora.

## Optimalizace podmínek elektroforetické separace

Optimalizace elektroforetických podmínek je nedílnou součástí vývoje analytické metody. Je důležité zvolit co nejvhodnější CE podmínky pro dosažení co nejúčinnější a opakovatelné separace analytů. Optimalizovány jsou následující parametry:

- ❖ **Polarita elektrod** – Při normální polaritě elektrod (anoda je umístěna ve zdrojové vialce a katoda v cílové vialce) je tok kapaliny v kapiláře veden od anody ke katodě ve směru EOFu. V případě, že je požadována změna směru EOFu od katody k anodě, např. pokrytím kapiláry kationtovým surfaktantem, mělo by dojít i ke změně polarity elektrod tak, aby byla anoda lokalizována za detektorem (v cílové vialce). Také v případě analýzy aniontů a potlačeného EOFu musí dojít ke změně polarity elektrod tak, aby byly anionty schopné doputovat k detektoru [3].
- ❖ **Napětí** – Zvýšením napětí (intenzity elektrického pole) zkrátíme čas analýzy a zlepšíme účinnost separace. Pro dané podmínky (složení, koncentrace, pH pufru, délka a průměr kapiláry) vždy existuje maximální napětí, které bychom neměli překročit [11]. Při překročení tohoto napětí dochází k nadměrnému generování Jouleova tepla uvnitř kapiláry, které může vést až k přerušení elektrického obvodu (např. vznikem bublinek – var elektrolytu).
- ❖ **Teplota** – Měla by být kontrolovatelná a po celou dobu analýzy fixní. Při dostatečné selektivitě separace můžeme zvýšením teploty vylepšit tvar píků, zkrátit čas analýzy a také docílit příznivých konformačních změn v případě separace chirálních látek [12].

- ❖ **Délka a průměr separační kapiláry** – Mají také vliv na separaci. V případě delší kapiláry je dosaženo prodloužení migračních časů a tím lepšího rozlišení analytů. Můžeme také aplikovat vyšší napětí než v případě kratších kapilár. V případě kapilár s menším průměrem můžeme rovněž aplikovat vyšší napětí a používat více koncentrované pufrů, a díky tomu ovlivňovat rozlišení separovaných analytů [13].
- ❖ **Pufr** – Kritickým parametrem ovlivňujícím separaci je volba pufru. Při výběru pufru musíme brát v potaz jeho stabilitu, použitý detekční systém a rozsah pH, ve kterém může být daný pufr použitelný ( $pK_a \pm 1$ ). pH pufru ovlivňuje disociaci/ionizaci analytů, které jsou slabé kyseliny nebo zásady, a tím jejich elektroforetickou mobilitu. Také ovlivňuje disociaci silanolových skupin na povrchu kapiláry a tím velikost EOFu. Koncentraci pufru volíme v závislosti na délce a průměru kapiláry a aplikovaném napětí. Zvýšením koncentrace pufru snižujeme EOF, a tím prodlužujeme dobu analýzy a zlepšujeme rozlišení. Do pufru se také mohou přidávat další aditiva (např. SDS), které ovlivňují selektivitu separace [3].

### 2.1.3 Módy kapilární elektroforézy

CE stejně jako HPLC může probíhat v různých módech. Nejčastěji používané módy jsou kapilární zónová elektroforéza („*Capillary zone electrophoresis*“, CZE), micelární elektrokinetická chromatografie („*Micellar electrokinetic chromatography*“, MEKC), kapilární gelová elektroforéza („*Capillary gel electrophoresis*“, CGE), kapilární izoelektrická fokusace („*Capillary isoelectric focusing*“, CIEF) a kapilární izotachoforéza („*Capillary isotachopheresis*“, CITP). Vhodný mód CE vybíráme podle povahy analytů. Jednotlivé módy se často doplňují, jelikož rozdílné módy poskytují rozdílnou selektivitu separace analytů. Např. Bo a kol. srovnávali selektivitu jednotlivých módů CE pro separaci xanthonů [14] a Taylor a kol. srovnávali selektivitu CZE a MEKC pro separaci antimalarik [15].

- ❖ **CZE** je hojně používaný a relativně jednoduchý mód CE vhodný pro separaci téměř všech ionizovatelných látek, které jsou rozpustné v separačním pufru, ať už malých anorganických iontů [16] či velkých makromolekul [17]. Kapilára, zdrojová a cílová vialka jsou naplněny pufrů konstantního složení a analyty jsou separovány na základě rozdílných poměrů náboj/velikost.
- ❖ **MEKC** je mód vhodný pro separaci neutrálních látek a je podrobněji popsán v kapitole 2.2.

- ❖ **CGE** je mód vhodný pro separaci oligonukleotidů [18], fragmentů DNA [19] a proteinů [20]. Kapilára je zde naplněna gelem (polyakrylamid, polyakrylamid/bisakrylamid, dextran, agaróza) [7] a analyty jsou separovány na základě molekulárně síťového efektu podle jejich molekulové hmotnosti.
- ❖ **CIEF** je další mód CE vhodný pro separaci proteinů a amfoterních sloučenin (peptidy a aminokyseliny) [20, 21]. Kapilára je naplněna směsí analytů a amfolytů a po aplikaci el. pole formují amfolyty pH gradient uvnitř kapiláry a analyty se fokusují do úzkých zón podle jejich izoelektrických bodů („*Isoelectric point*“, pI) a následně jsou mobilizovány.
- ❖ **CITP** je mód CE, ve kterém je kapilára naplněna dvěma elektrolyty s rozdílnou mobilitou (vedoucím a koncovým elektrolytem). V případě separace aniontů je kapilára naplněna vedoucím elektrolytem obsahujícím anion s největší mobilitou a koncovým elektrolytem obsahujícím anion s nejmenší mobilitou, po vložení napětí jsou anionty v kapiláře seřazeny podle mobilit od největší po nejmenší a po dosažení rovnováhy migrují k detektoru stejnou rychlostí danou rychlostí vedoucího aniontu [22].

Po popsání teoretických a praktických aspektů kapilární elektroforézy budou následující kapitoly zaměřeny na podrobnější popis MEKC, chirálních látek a jejich separace, metod zvýšení citlivosti v CE a komplexace borát glukóza.

## 2.2 Micelární elektrokinetická kapilární chromatografie

MEKC byla poprvé představena Terabem a kol. a zpočátku ji nazývali „elektrokinetická separace“ [23] a později „elektrokinetická chromatografie“ [24] kvůli její podobnosti s kapalinovou rozdělovací chromatografií. V současnosti se nazývá „micelární elektrokinetická kapilární chromatografie“ [25, 26], kombinuje totiž separační mechanismus chromatografie s elektroforetickým a elektroosmotickým pohybem rozpuštěných látek a pufry. Vývoj MEKC byl významný pro samotnou CE, bez ní by byla totiž aplikovatelnost CE limitována jenom na separaci nabitých analytů, separace elektricky neutrálních látek pomocí CZE totiž nebyla možná [7].

## 2.2.1 Surfaktanty

Surfaktanty jsou amfifilní molekuly obsahující hydrofobní část (například řetězec uhlovodíků) a polární nebo iontovou koncovou skupinu. Podle koncové skupiny mohou být surfaktanty rozděleny na aniontové, kationtové, neiontové a zwitteriontové. Podle povahy hydrofobní části mohou být rozděleny na uhlovodíkové, fluorokarbonové anebo na soli žlučových kyselin [27]. Přehled používaných surfaktantů je uveden v Tab. 2.

Surfaktanty se po přidavku do vodného roztoku v nadkritické micelární koncentraci agregují za tvorby sférických útvarů (micel). Každý surfaktant má specifickou hodnotu kritické micelární koncentrace („*Critical micelle concentration*“, CMC) a agregčního čísla („*Aggregation number*“, AN). AN udává počet molekul surfaktantu tvořících micelu. Jádro micel je tvořeno hydrofobními částmi surfaktantu a hydrofilní části surfaktantu jsou orientovány vně do vodného elektrolytu. Výběr surfaktantu vhodného pro danou analýzu závisí na povaze analytu, na rozpustnosti surfaktantu a na jeho CMC. Nejčastěji používaným surfaktantem je SDS díky jeho vysoké stabilitě, nízké UV absorpci, rozpustnosti a dobré dostupnosti [3].

Tab. 2 Přehled některých surfaktantů používaných v MEKC a jejich CMC a AN. Převzato a upraveno z publikace [7].

Surfaktant	CMC (mmol·l <sup>-1</sup> )	AN
Aniontové		
Dodecyl sulfát sodný (SDS)	8,7	62
Sodná sůl kyseliny cholové	14	2-4
Sodná sůl kyseliny glykocholové	13	2
Kationtové		
Cetyl trimethylamonium bromid (CTAB)	1,3	78
Cetyl trimethylamonium chlorid (CTAC)	1	
Dodecyl trimethylamonium bromid (DTAB)	14	50
Neiontové		
Triton X-100	0,24	140
Zwitteriontové		
CHAPSO	8	11

CHAPSO – 3-([3-Cholamidopropyl]dimethylamonio)-2-hydroxy-1-propansulfonát

## 2.2.2 Princip MEKC

Principem metody je rozdělování látek mezi dvě fáze, „micelární“ (pseudostacionární, tvořenou micelami) a „vodnou“ (tvořenou pufrům). Ve vodě nerozpustné hydrofobní látky vstupují do dutiny micel, a naopak hydrofilní látky zůstávají ve vodném roztoku pufru. Zbytek látek ležících někde mezi těmito dvěma extrémy se bude rozdělovat mezi micely a vodný roztok pufru na základě jejich hydrofobicity [7].

Od začátku představení této metody se předpokládalo, že retence látek v MEKC je závislá převážně na hydrofobicitě analytů. Hydrofobní interakce hrají hlavní roli při interakci mezi analytem a micelou, nicméně variace v migračních pořadích analytů, objevujících se při použití rozdílných pseudostacionárních fázích, naznačovali i existenci dalších typů interakcí. Yang a Khaledi [28] použili Kamletův a Taftův [29, 30] vztah pro lineární solvatační energii („*Linear solvation energy relationship*“, LSER) ke kvantitativnímu popisu retence v MEKC beroucí v potaz strukturní vlastnosti analytu (Rov. 8).

$$\log k' = SP_0 + mV_1/100 + s\pi^* + b\beta + a\alpha, \quad (8)$$

kde  $k'$  je kapacitní faktor,  $SP_0$  je regresní konstanta, ( $m, s, b, a$ ) jsou koeficienty a představují vlastnosti micelárních systémů. Hodnoty těchto koeficientů jsou uvedeny v Tab. 3 a ( $V_1, \pi^*, \alpha$  a  $\beta$ ) popisují vlastnosti rozpuštěné látky.  $V_1$  je molární objem,  $\pi^*$  kvantifikuje dipolaritu/polarizovatelnost,  $\alpha$  je síla rozpuštěné látky jako donoru vodíkové vazby (acidita) a  $\beta$  je síla rozpuštěné látky jako akceptoru vodíkové vazby (bazicita).

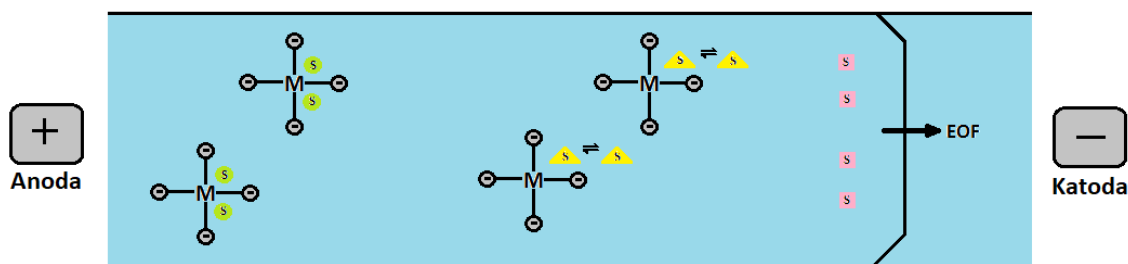
Tab. 3 Příklady koeficientů v LSER modelu pro různé pseudostacionární fáze. Převzato a upraveno z publikace [27].

MEKC systém	$SP_0$	$m$	$s$	$b$	$a$
0,02 M SDS	- 1,87	4,00	- 0,25	- 1,79	0,16
0,04 M SDS	- 1,49	3,95	- 0,26	- 1,80	- 0,18
0,06 M SC	- 1,62	3,89	- 0,27	- 2,88	0,23
0,08 M SC	- 1,38	3,82	- 0,32	- 2,85	0,18
0,01 M C14TAB	- 1,78	3,96	- 0,26	- 2,75	0,99

SDS – dodecyl sulfát sodný, SC – cholát sodný, C14TAB – tetradecyl trimethylamonium bromid

Z dat vyplývá, že důležitou roli při retenci v MEKC také hraje velikost rozpuštěné látky, protože hodnoty koeficientu  $m$  jsou největší v LSER modelu. Kladná hodnota koeficientu indikuje, že objemnější molekuly jsou zadrženy v MEKC déle. Dále výraz  $mV_i/100$  v rovnici odpovídá hydrofobním interakcím v MEKC. V neposlední řadě má také koeficient  $b$  velkou hodnotu a to indikuje, že druhým nejdůležitějším typem interakce v MEKC je vodíková vazba, kdy rozpuštěná látka se chová jako akceptor a rozpouštědlo jako donor. Negativní znak před  $b$  indikuje, že když je rozpuštěná látka silnějším akceptorem (silnější báze), tak bude méně interagovat s micelami a bude méně zadržována.

Na příkladu nejčastěji používaného surfaktantu SDS si názorně ukážeme princip MEKC. SDS micely jsou záporně nabitě a pohybují se vlastní elektroforetickou mobilitou ve směru od katody k anodě. V případě, že je mobilita elektroosmotického toku větší než elektroforetická mobilita micel, jsou micely taženy ve směru EOFu (od anody ke katodě skrze detektor). Analyty jsou rozdělovány mezi SDS micelami a pufrem. Čas, který stráví v micelách, je přímo úměrný jejich hydrofobitě. Ve vodě rozpustné hydrofilní látky nevstupují do micel a tráví veškerý svůj čas v pufru, migrují jako první, rychlostí EOFu  $t_0$ . Extrémně hydrofobní látky naopak tráví veškerý svůj čas v micelách a migrují jako poslední, rychlostí micel  $t_{mc}$ . Látky částečně rozpustné v micelách se rozdělují mezi micelami a pufrem na základě jejich distribučních koeficientů a migrují mezi časy  $t_0$  a  $t_{mc}$  (Obr. 7). Pro stanovení migračních časů  $t_0$  a  $t_{mc}$  se používají markery methanol a Sudan III [7, 24, 27].



Obr. 7 Schématická ilustrace MEKC v kapiláře. Popis: M jsou micely s negativním nábojem, růžové čtverce reprezentují hydrofilní ve vodě rozpustné analyty, zelené kruhy reprezentují hydrofobní v micelách rozpustné analyty a žluté trojúhelníky reprezentují analyty, které se rozdělují mezi micely a vodný roztok pufru. Ilustrace autora.

Kromě neutrálních analytů mohou být pomocí MEKC úspěšně separovány i analyty s nábojem. Separace nabitých látek v MEKC je závislá na třech faktorech: na jejich vlastní elektroforetické mobilitě, na iontových interakcích s iontovými micelami a na distribučních koeficientech mezi micelární fází a pufrům [31].

### 2.2.3 Ovlivňování selektivity v MEKC

Selektivita nám říká, jak daleko od sebe jsou přílehlé rozpuštěné látky při průchodu detektorem, a to odpovídá vzdálenosti mezi vrcholy přílehlých píků v elektroferogramu. Selektivita je dána rovnicí (Rov. 9), kde  $t_2$  a  $t_1$  jsou migrační časy přílehlých píků ( $t_2$  je migrační čas pomalejší látky) a  $t_{nm}$  je migrační čas neutrálního markeru.

$$\alpha = (t_2 - t_{nm}) / (t_1 - t_{nm}) \quad (9)$$

Přeskupením rovnice a dosazením vztahů pro výpočet elektroforetické rychlosti a mobility z elektroferogramu získáme rovnici (Rov. 10), kde  $\mu_1$  a  $\mu_2$  jsou elektroforetické mobility rozpuštěných látek.

$$\alpha = \mu_1 / \mu_2 \cdot konst. \quad (10)$$

Z této rovnice je patrné, že selektivita je závislá na rozdílech v elektroforetických mobilitách analytů, tudíž jakýkoliv faktor, který ovlivní mobilitu analytu, bude mít vliv i na selektivitu[7].

V případě MEKC ovlivňují selektivitu následující faktory:

- ❖ **Typ surfaktantu a kombinace více surfaktantů:** Otsuka a kol. porovnávali vliv SDS a cetyltrimethylamonium bromidu na separaci aminokyselin a zjistili, že se separace analytů kompletně liší za použití rozdílných surfaktantů [32]. Trone a Khaledi zkoumali obecně vliv šesti aniontových surfaktantů na selektivitu v MEKC [33]. Z hlediska selektivity byly testovány i kombinace SDS a Tween 20 [34, 35], SDS a oktyl sulfát sodný [36] a SDS a Brij-35[37]. Použití kombinací SDS a Tween 20, Brij-35 a oktyl sulfátu sodného vedlo ke zlepšení separace studovaných analytů.
- ❖ **pH:** v případě nabitých sloučenin může změna pH pufru vézt ke změně disociace těchto sloučenin a jejich náboje, a tím může ovlivnit jejich elektroforetické mobility a interakce s micelami [38]. Selektivita pro neutrální molekuly může být ovlivněna pH přes změnu iontové síly roztoku elektrolytu, a to může vézt ke změně rozdělovacích koeficientů mezi vodnou a micelární fází [39].

- ❖ **Teplota:** ovlivňuje distribuční koeficienty analytů a tím jejich selektivitu. V případě iontových analytů může změna teploty vézt ke změně pKa analytu a rozdílným interakcím mezi analytem a micelami [40].
- ❖ **Koncentrace, složení pufru a koncentrace surfaktantu:** Michaelsen and kol. testovali vliv koncentrace SDS na separaci aminokyselin. Při změně koncentrace SDS z 100 na 180 mmol·l<sup>-1</sup> se měnilo migrační pořadí některých aminokyselin a při určitých koncentracích SDS nebyly všechny aminokyseliny rozseparovány [41]. Lukarri a kol. dále testovali vliv pěti různých pufrů na separaci pozitivně nabitých bis(amidinohydrazonů) pomocí MEKC a jenom za použití fosfátu sodného se jim podařilo plně rozseparovat všech osm analytů [42].
- ❖ **Přídavek organické látky:** může ovlivnit interakci mezi analyty a micelami anebo samotnou agregaci surfaktantů a velikost micel. Jako aditiva do pufru mohou být použity např. acetonitril, methanol, propanol, dimethylsulfoxid a formamid. Ganñan a kol. zkoumali vliv přídavku acetonitrilu na separaci steroidních sloučenin pomocí MEKC s SDS, zjistili, že s rostoucím obsahem acetonitrilu v pufru se snižuje interakce mezi micelami a analyty [43].

## 2.3 Chirální látky a jejich separace

V případě, že nemůže být molekula superponována na svůj zrcadlový obraz, nazývá se chirální. Původ slova chirální je z řeckého *cheir* „ruka“. Chirální látky mají alespoň jedno asymetrické centrum (nejčastěji asymetrický uhlík) a mohou se vyskytovat ve dvou konfiguracích (enantiomerech/optických izomerech), které jsou svými zrcadlovými obrazy. Enantiomery mají identické fyzikálně chemické vlastnosti, výjimkou je jejich optická aktivita (schopnost stáčet rovinu polarizovatelného světla) [44]. Když však máme ekvimolární směs enantiomerů (racemickou směs), její optická aktivita je nulová [3]. Jelikož chirální látky vykazují optickou aktivitu, říká se někdy enantiomerům optické izomery [44]. Jeden optický izomer stáčí rovinu doleva a je označován (*L*) nebo (-) a druhý stáčí rovinu doprava a je označován (*D*) nebo (+) [45]. Podle Cahn-Ingold-Prelogova pravidla jsou izomery označovány (*S*) nebo (*R*) [46].



Optickou aktivitu vykazují řada látek ať už přírodního nebo syntetického původu: proteiny, enzymy, aminokyseliny, sacharidy, nukleosidy, řada alkaloidů a hormonů a v neposlední řadě také léčiva. Problémem u opticky aktivních látek je, že jejich izomery mohou mít odlišné biologické vlastnosti [44]. V lepším případě se může jednat jenom o změnu senzorických vlastností izomerů. *S*-izomer asparaginu má hořkou chuť, zatímco *R*-izomer je sladký, *S*-limonen má citronové aroma, zatímco *R*-limonen má pomerančové aroma a *S*-karvon má příchut' kmínu a *R*-karvon máty peprné [47]. V horším případě se však může jednat o ztrátu aktivity, nižší aktivitu anebo toxicitu jednoho z izomerů, především v případě léčiv. Mezi léčiva s nižší aktivitou jednoho z izomerů patří: (+)-propranolol, který vykazuje 100x nižší aktivitu než (-)-propranolol [48], (+)-verapamil, který je 20x méně účinnější než (-)-verapamil [49], (-)-citalopram, který má nižší účinnost než (+)-citalopram [50] a (+)-metadon, který je méně účinné analgetikum než (-)-metadon [51]. Dále může být jeden z izomerů toxický: (-)-ethambutol vyvolává slepotu a (-)-naproxen způsobuje otravu jater [52]. Z těchto důvodů je důležité mít možnost získat čisté izomery látek. Čisté izomery můžeme získat buď přímo při jejich stereoselektivní syntéze, během biotransformačních reakcí při jejich syntéze anebo jejich separacemi z racemických směsí. Kromě syntézy chirálně čistých látek je důležitá i kontrola čistoty chirálních látek. Za účelem kontroly čistoty chirálních látek se používají následující techniky: vysokoúčinná kapalinová chromatografie („*High-performance liquid chromatography*“, HPLC); plynová chromatografie („*Gas chromatography*“, GC); chromatografie na tenké vrstvě („*Thin layer chromatography*“, TLC) a CE. V případě CE jsou nejčastěji používány módy CZE, MEKC, CEC a GCE [3].

### 2.3.1 Podstata chirální separace v CE

Enantiomery mají v důsledku stejného náboje a velikosti molekuly stejnou mobilitu, takže v achirálním prostředí pufry není jejich separace možná [3].

$$\mu_S = \mu_R, \quad (11)$$

kde  $\mu_S$  je zdánlivá mobilita *S*-enantiomeru a  $\mu_R$  je zdánlivá mobilita *R*-enantiomeru.

Separace enantiomerů je umožněna dvěma způsoby. Jejich derivatizací za tvorby stabilních diastereomerních komplexů a následnou separací v achirálním prostředí pufry. Anebo běžněji používaný způsob separace enantiomerů probíhající v chirálním prostředí jejich komplexací s chirálními selektory (CS). Podstatou chirálních separací v chirálním prostředí je tedy stereoselektivní interakce mezi CS a enantiomery za tvorby přechodných diastereomerních komplexů [53, 54].



kde  $E_R$ ,  $E_S$  jsou enantiomery,  $CS$  je chirální selektor,  $K_1$ ,  $K_2$  jsou komplexační konstanty a  $E_RCS$ ,  $E_SCS$  jsou komplexy enantiomer-selektor [27].

Na základě komplexačních rovnováh mezi selektorem a enantiomery analytu popsali Wren a Rowe základní rovnici pro separaci (Rov. 13) [55].

$$\Delta\mu = \frac{\mu_1 + \mu_2 K_1 [CS]}{1 + K_1 [CS]} - \frac{\mu_1 + \mu_2 K_2 [CS]}{1 + K_2 [CS]},
 \tag{13}$$

kde  $\Delta\mu$  je rozdíl mobilit enantiomerů daného analytu,  $\mu_1$  je mobilita analytu ve volném roztoku,  $\mu_2$  je mobilita komplexu analyt-CS,  $K_1$  a  $K_2$  jsou konstanty komplexačních rovnováh mezi prvním a druhým enantiomerem a selektorem. V této rovnici je předpokládáno, že efektivní mobility volných enantiomerů v achirálním prostředí jsou stejné a mobility komplexů analyt-CS pro oba enantiomery jsou také stejné. (Rov. 13) tedy předpokládá stejné mobility komplexů analyt-CS pro oba enantiomery, ačkoliv tyto mobility se mohou lišit, a rovnice získává nový tvar (Rov. 14) beroucí v potaz rozdílné mobility  $\mu_{CR}$ ,  $\mu_{CS}$  komplexů CS a  $R$ - a  $S$ -enantiomerů analytu [56, 57].

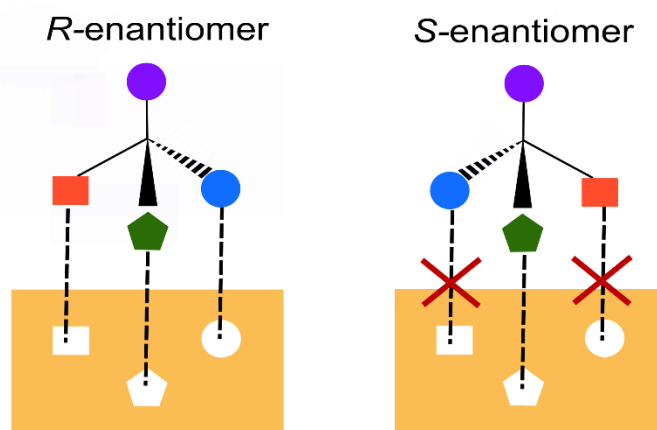
$$\Delta\mu = \frac{\mu_1 + \mu_{CR} K_1 [CS]}{1 + K_1 [CS]} - \frac{\mu_1 + \mu_{CS} K_2 [CS]}{1 + K_2 [CS]},
 \tag{14}$$

Závěrem lze říci, že enantioseparace může být dosaženo na základě rozdílných konstant stability komplexů ( $K_1 \neq K_2$ ), rozdílů v mobilitách komplexů ( $\mu_{CR} \neq \mu_{CS}$ ) anebo mohou být uplatněny oba příspěvky současně. Touto problematikou se ve svém článku zabývali Lomsadze a kol., kteří zjistili, že při použití nižších koncentrací hydroxypropyl- $\beta$ -cyklodextrinu (HP- $\beta$ -CD) došlo k separaci enantiomerů ketokonazolu a terkonazolu na základě rozdílů v konstantách stability komplexů a při vyšších koncentracích HP- $\beta$ -CD měla hlavní podíl na separaci rozdílná mobilita komplexů [58].

Pro vznik komplexů mezi enantiomery a selektorem byla definována vizuální představa tzv. „tříbodové interakce“. Selektor je schopen od sebe odlišit páry enantiomerů v případě, že mezi alespoň jedním z enantiomerů a selektorem dochází alespoň ke třem bodovým interakcím ve třech různých místech [45]. Z Obr. 8 můžeme vidět, že  $R$ -enantiomer interaguje třemi různými substituenty ve třech různých vazebných místech selektoru, naproti tomu  $S$ -enantiomer interaguje se selektorem jenom jedním

substituentem v jednom místě, tenhle rozdíl v interakcích dává selektoru tyto enantiomery rozseparovat (mají rozdílné vazebné konstanty) [45]. Klíčovým faktem tedy je, že musí docházet alespoň ke třem interakcím se třemi různými substituenty chirálních molekul. Z tohoto modelu by se dalo vyvozovat, že jeden substituent reaguje v jednom místě, ale v některých případech je tato představa komplikovanější. Při sterické interakci enantiomeru v dutině selektoru může docházet více než k jedné interakci [59], také při interakci selektoru s enantiomery rigidních struktur je představa „tříbodové interakce“ poněkud komplikovanější, jedná se tedy v tomto případě o geometrický model [59, 60].

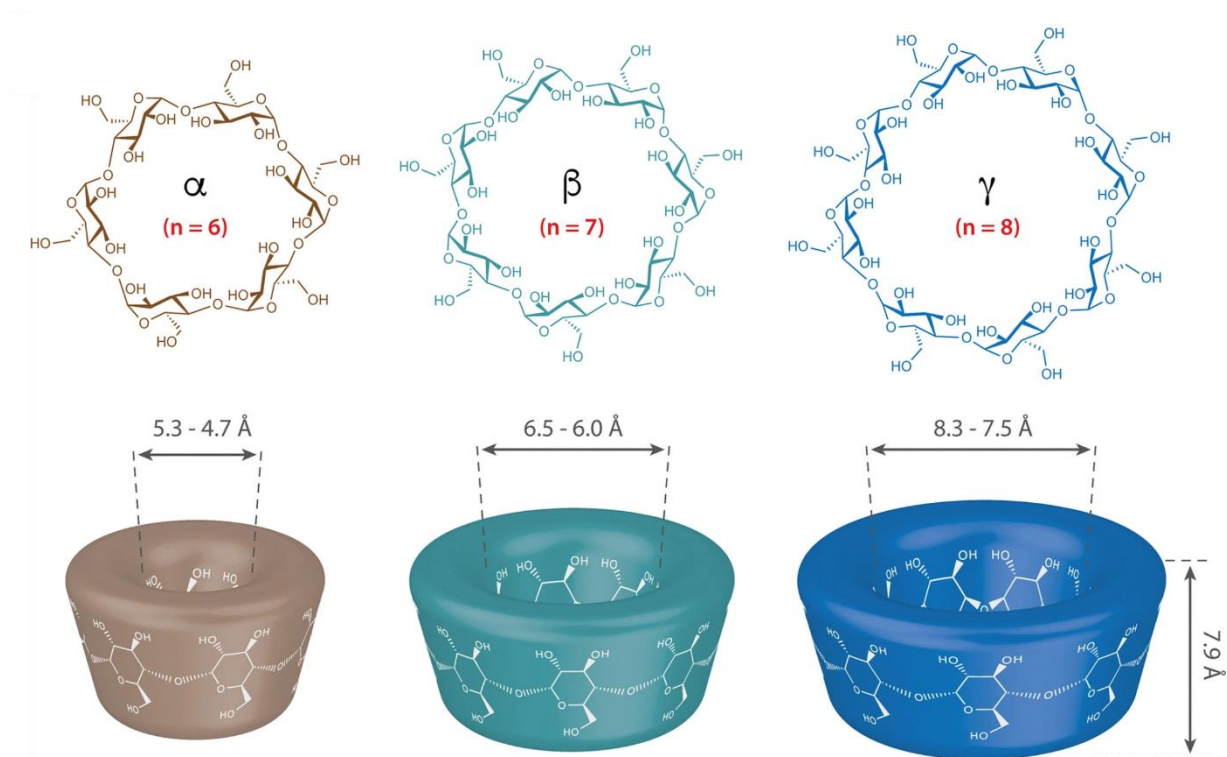
Interakce mezi selektorem a enantiomery jsou převážně nevazebné: iontové interakce, ion-dipólové nebo dipól-dipól interakce, vodíkové vazby,  $\pi$ - $\pi$  interakce, sterické bránění, inkluzní interakce a van der Waalsovi síly [61].



Obr. 8 Představa tříbodové interakce mezi enantiomery a selektorem. Ilustrace autora.

### 2.3.2 Chirální selektory v CE

- ❖ **Cyklodextriny (CD):** Jsou to cyklické oligosacharidy připravené enzymatickou degradací škrobu za působení glykosyltransferáz nebo cyklodextrináz [62]. Mají tvar komolého kužele s otevřenou dutinou a jsou tvořeny D(+)-glukopyranosovými jednotkami vázanými  $\alpha(1,4)$ -glykosidickými vazbami (Obr. 9) [63]. Vnitřní dutina cyklodextrinů má hydrofobní charakter a umožňuje hydrofobní interakce mezi CD a analytem. Vnější strana dutiny má hydrofilní povahu, širší okraj je tvořený sekundárními hydroxylovými skupinami v poloze 2- a 3- a užší okraj je tvořený primárními hydroxylovými skupinami v poloze 6 (cit. [64]).



Obr. 9 Struktura CD. Převzato z publikace [65].

Existují tři typy nativních cyklodextrinů:  $\alpha$ -,  $\beta$ - a  $\gamma$ - lišících se počtem glukopyranosových jednotek a fyzikálními vlastnostmi (Tab. 4) [66, 67]. Derivatizací hydroxylových skupin na povrchu nativních cyklodextrinů získáme derivatizované cyklodextriny, které ve své struktuře obsahují další substituenty. Nativní cyklodextriny mohou podléhat náhodným nebo specifickým substitucím. Specificky substituované CD mohou být monosubstituované, kdy celá molekula obsahuje jenom jeden substituent, dále persubstituované s jedním substituentem ve všech pozicích anebo persubstituované v polohách 2-, 3- nebo 6-, kdy v dané poloze je vždy jeden typ substituentu. V neposlední řadě existují CD s více substituenty v různých pozicích [64].

Použití CD jako chirálních selektorů má řadu výhod. Zaprvé, umožňují separovat enantiomery s planární a axiální chiralitou [68, 69] a enantiomery s chirálními centry ve formě heteroatomů (N, S, P a Si) [70, 71]. Další výhodou CD je, že jejich derivatizací vhodnými funkčními skupinami můžeme dosáhnout potřebné enantioseparace a selektivity [72]. Dále je výhodou derivatizovaných CD jejich dobrá rozpustnost ve vodných a polárně a nepolárně organických prostředích. Změnou prostředí, ve

kterém jsou CD rozpuštěny, ovlivňujeme typy interakcí mezi analytem a CD a tím i selektivitu [73, 74]. Řada článků popisuje použití cyklodextrinů jako CS, a to vypovídá o jejich velké univerzálnosti [62, 75-78].

Tab. 4 Vlastnosti nativních cyklodextrinů. Převzato a upraveno z publikace [27].

Vlastnosti	$\alpha$ -CD	$\beta$ -CD	$\gamma$ -CD
Počet glukózových jednotek	6	7	8
Molekulární hmotnost (Da)	972	1135	1297
Vnější průměr (nm)	1,37	1,53	1,69
Vnitřní průměr (nm)	0,57	0,78	0,95
$[\alpha]_D^{25}$	+150,5	+162,0	+177,4
$pK_a$ hydroxylových skupin	12,1–12,6	12,1–12,6	12,1–12,6
Rozpustnost ve vodě (% w/v)	14,5	1,85	23,2
Rozpustnost v ethanolu (% w/v)	velmi malá	0.1	Velmi malá
Rozpustnost v DMF (% w/v)	Výborná	výborná	výborná
Enkapsulované molekuly	Benzen	naftalen	antracen

V případě, že jsou nativní CD derivatizovány skupinami nesoucí náboj (sulfo-, sulfobutyl-, karboxy-, amino- a aminokarboxy skupinami) můžeme separovat i neutrální enantiomery [79]. U nabitých CD se také uplatňují kromě inkluzních interakcí, vodíkových vazeb a dipolárních interakcí i elektrostatické interakce s analyty nesoucí náboj, a to mění enantioselektivitu CS [27, 80]. Nejčastěji používané deriváty CD jsou aniontové [77, 81]. Byla vydána řada přehledových článků popisující aniontové CD a jejich aplikace [82-84]. Sulfatovaný- $\beta$ -cyklodextrin (S- $\beta$ -CD) se řadí mezi aniontové CD s vysokým stupněm substituce. Vysoká hustota negativního náboje na povrchu cyklodextrinu z něj dělá výborný chirální selektor pro neutrální a pozitivně nabitě analyty [85]. Maximální enantioselektivita je pro tento selektor dosaženo v případě jeho opačné mobility oproti mobilitám analytů [86, 87].

Kromě cyklodextrinů můžeme pro chirální separace v CE použít další typy selektorů. Jejich přehled je uveden níže.

- ❖ **Chirální crown ethery:** Jsou to makrocyclické polyethery s relativně polární dutinou formující inkluzní komplexy s kationty alkalických kovů a alkalických zemin a kationty primárních aminů [27]. Nejběžněji používaný crown ether je 18-crown-tetrakarboxylová kyselina, která je vhodná pro chirální separace látek mající ve své struktuře primární amin/aminy [88-90].

- ❖ **Ligandová výměna:** Ligandová výměna spočívá ve tvorbě chelátového komplexu tvořeného centrálním kationtem  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  nebo  $\text{Zn}^{2+}$  a alespoň dvěma bifunkčními ligandy (obvykle L-aminokyseliny) a následně záměně jednoho z ligandů enantiomerem analytu za tvorby ternárního komplexu [45]. Tyto CS mohou rozlišit enantiomery, které obsahují funkční skupiny schopné vytvářet komplexy s centrálními kationty (např. aminokyseliny, hydroxykyseliny a aminoalkoholy) [91-93].
  
- ❖ **Chirální surfaktanty:** Používají se většinou v MEKC pro „enantiozlišení“ kationtových a neutrálních analytů [94, 95]. Chirální surfaktanty mohou být přírodního původu (žlučové kyseliny, saponiny, digitoniny), ale i syntetického původu ((R)-N-dodecoxykarbonylvalin, apod.) [27]. Nejvíce jsou používány žlučové kyseliny a zjistilo se, že jsou nejvhodnější pro chirální separace látek jejichž struktura má omezenou rotaci [96, 97]. Méně používané jsou potom saponiny a digitoniny [98]. Jedním z nejúčinnějších syntetických surfaktantů je (R)-N-dodecoxykarbonylvalin [99].
  
- ❖ **Makrocyclická antibiotika:** Použití této skupiny chirálních selektorů přináší řadu úskalí v důsledku jejich absorpce v UV/Vis oblasti, nízké chemické stabilitě, adsorpci na stěně kapiláry a vysoké ceně. Jsou rozděleny do dvou skupin podle jejich struktury: ansamyciny (např. Rifamycin A) a glykopeptidy (např. Vankomycin) a jsou vhodné pro chirální separace látek rozdílných struktur [100-104].
  
- ❖ **Polysacharidy:** Do této skupiny chirálních selektorů se řadí chondroitin sulfáty, dextransy, dextriny, aminoglykosidy a heparin. Chondroitin sulfáty a heparin jsou hojně používány pro chirální separace [105-108], méně pak dextransy [109] a aminoglykosidy [110].
  
- ❖ **Proteiny:** Mezi proteiny používané v CE patří albuminy: hovězí sérový albumin, lidský sérový albumin [111-114], glykoproteiny: Ovomukoid [115, 116], ovoglykoprotein [117],  $\alpha_1$ -kyselý glykoprotein [118] a enzymy: Pepsin, Lysozym [119, 120].

V případě, že enantioseparace není úspěšná za použití jednoho chirálního selektoru, je možné použít duální selektorový systém, který poskytuje unikátní selektivitu [121]. Duální selektory jsou v CE používány od roku 1994, kdy byla poprvé úspěšně aplikována kombinace nabitého a neutrálního CD [122]. V průběhu let se řada publikací věnovala použití duálních selektorových systémů. Papp a kol.

použili duální CD systém pro chirální separaci lansoprazolu a rabeprazolu [123]. Szabo a kol. zase použili duální selektorový systém pro separaci čtyř H<sub>1</sub>-antihistaminik [124]. Yang a kol. studovali efekt duálního selektorového systému tvořeného CD a chondroitinem sulfátem D na enantioseparaci šesti chirálních drog [125]. Matthijs a kol. použili duální CD systémy pro separaci chirálních farmaceutik [126] a Guan a kol. použili duální selektorový systém pro enantioseparaci pantoprazolu a příbuzných benzimidazolů [127]. V přehledovém článku se problematice duálních selektorových modelů věnovali také Mullerova a kol. [121].

### 2.3.3 Ovlivňování selektivity v chirálních separacích

- ❖ **Koncentrace chirálního selektoru a pH:** Existuje řada teoretických modelů popisující a zabývající se touto problematikou. Jako první navrhli Wren a Rowe model zohledňující efekt koncentrace neutrálního chirálního selektoru na separaci nabitých analytů [55, 128]. Často však v praxi pro tento model není dosaženo maximální selektivity. Proto Rawjee a kol. přišli s novým modelem, který navíc oproti vlivu koncentrace neutrálního chirálního selektoru zahrnuje i pH elektrolytu [129, 130]. Poslední model, který představil Surapanen a kol. popisuje selektivitu separace neutrálních enantiomerů s použitím nabitých a nenabitých CD za absence EOFu [131].
- ❖ **Použití jiného CS anebo více CS:** Znaležiona a kol. studovali vliv různých CD na chirální separaci tapentadolu. Při použití 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyklodextrinu byla umožněna separace *S,R*- a *R,S*-izomerů a za použití 2-hydroxypropyl- $\gamma$ -cyklodextrinu došlo k separaci *S,S*- a *R,R*-izomerů [132]. Gogolashvili a kol. zkoumali použití šesti CD na chirální separaci terbutulinu. Nejlepší separace bylo dosaženo za použití heptakis(2,3-di-*O*-acetyl-6-*O*-sulfo)- $\beta$ -CD (HDAS- $\beta$ -CD) [133]. Hagele a kol. srovnávali vliv  $\beta$ -CD, acetyl- $\beta$ -CD, 2-hydroxypropyl- $\beta$ -CD a karboxymethyl- $\beta$ -CD na chirální separaci derivátů katinonu [134]. V některých případech enantioseparací je použití jednoho chirálního selektoru nedostačující a v těchto případech je možné zvětšit selektivitu použitím více než jednoho CS. Lurie a kol. použili směsi neutrálních a nabitých CD pro chirální separace kationtových léčiv [122], podobně Fillet a kol. zlepšili enantioseparaci kyselých léčiv za použití směsi nabitých a nenabitých CD [135]. Chen a kol. rozseparovali derivatizované aminokyseliny za použití směsi  $\beta$ -CD a taurodeoxycholátu sodného [136].

- ❖ **Přídavek organické látky:** Efekt těchto látek bude stejný v případě elektroforetických mobilit a pKa obou enantiomerů, ale pro asociační konstanty komplexů se bude lišit [137]. Eeckhaut a kol. zkoumali efekt přídavku organických látek do BGE na „enantiorozlišení“ antihistaminik. Zjistili, že zlepšení enantioseparace je závislé na typu CD a přidané organické látce/rozpouštědle. Např. při přídavku methanolu do BGE obsahujícího karboxymethyl- $\beta$ -CD došlo ke zlepšení „enantiorozlišení“ [138]. Guohua a kol. použili nevodné prostředí methanolu pro zlepšení chirální separace anticholinergních léčiv [139].

## 2.4 Metody zvyšování citlivosti v CE

Při optimalizaci elektroforetických podmínek v CE se snažíme dosáhnout co nejnižších mezí detekce (LOD). Vyšší hodnoty LOD v CE jsou způsobeny dvěma faktory: krátkou optickou dráhou při UV/Vis detekci a malým objemem vzorku dávkovaného do křemenné kapiláry (jednotky nl). Nedostatečně nízké meze detekce jsou vnímány jako jedna z hlavních nevýhod elektroforetických separačních metod ve srovnání s kapalinovou chromatografií [140] (meze detekce dosažené pomocí CE jsou obvykle 10-100krát vyšší). Z tohoto důvodu je nutné hledat možnosti, které by vedly ke snížení mezí detekce na hladiny porovnatelné s ostatními separačními technikami. Mezi tyto metody se řadí:

- ❖ Použití jiných detektorů než UV/Vis detektor: elektrochemického [141], chemiluminiscenčního [142], detektoru s laserově indukovanou fluorescencí (LIF) [143], hmotnostního spektrometru (MS) [144] anebo hmotnostního spektrometru s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS) [145].
- ❖ Prodloužení optické dráhy detekce použitím speciálně tvarovaných kapilár v detekční zóně, ve tvaru baňky [146] nebo tvaru Z [147].
- ❖ „Offline“ koncentrační techniky probíhající vně měřicího systému, např. extrakce tuhou fází („*Solid phase extraction*“, SPE) [148] nebo extrakce kapalina/kapalina („*Liquid-liquid extraction*“, LLE) [149].
- ❖ „Online“ koncentrační techniky probíhající přímo uvnitř separačního systému, např. zakoncentrování vzorku zesílením pole („*Field-amplified sample stacking*“, FASS) nebo „sweeping“

V následujících odstavcích budou podrobněji popsány „online“ prekoncentrační techniky v CE a CE-ICP-MS.



## 2.4.1 Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem

V roce 1980 byl publikován první článek o použití indukčně vázaného argonového plazmatu jakožto zdroje iontů pro hmotnostně spektrometrické stanovení stopových prvků [150]. V roce 1983 potom kanadská společnost Sciex představila první komerčně dostupný ICP-MS přístroj vybavený kvadrupólovým analyzátozem. Od roku 1983 tedy vedle sebe koexistovali tři hlavní techniky atomové spektrometrie pro stanovování kovů: Atomová absorpční spektrometrie („*Atomic absorption spectrometry*“, AAS), optická emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem („*Inductively coupled plasma optical emission spectrometry*“, ICP-OES) a ICP-MS. V průběhu posledních dvou desetiletí zaznamenala technika ICP-MS mohutný rozvoj a stala se nejrozšířenější technikou pro stanovení kovů a jejich izotopů v různých odvětvích [151].

Za rozmachem ICP-MS stojí velmi nízké meze detekce, schopnost multielementární analýzy kovů, polokovů a nekovů, široký lineární dynamický rozsah, schopnost rozlišovat jednotlivé izotopy prvků a možnost jeho použití jako selektivního a citlivého detektoru při stanovování specií prvků v biologických vzorcích [152]. Nízké meze detekce a schopnost multielementární analýzy dělají z ICP-MS atraktivní techniku pro analýzy vzorků různých odvětví, ať už z průmyslu, životního prostředí, medicíny anebo archeologie [153].

### 2.4.1.1 Princip ICP-MS

V ICP-MS je nejčastěji kapalný vzorek přiváděn pomocí peristaltického čerpadla do zmlžovače a tam je převeden působením kinetické energie nosného plynu na polydisperzní aerosol. Aerosol následně vstupuje do mlžné komory, kde dochází k separaci jemného aerosolu od větších částic. Jemný aerosol prostupuje injektorem umístěným v plazmové hlavici do indukčně vázaného plazmatu s teplotou až 10 000 K, ve kterém dochází k desolvataci, odpaření, atomizaci a ionizaci prvků za vzniku kladně nabitých iontů. Ionty poté opouští plazma a jsou vedeny do hmotnostního spektrometru přes rozhraní tvořené 2 kónusy, většinou niklovými nebo platinovými („*sampler*“ a „*skimmer*“) s velmi malými kruhovými otvory v jejich vrcholech. Toto spojení patří mezi nejvíce kritické části ICP-MS, protože zprostředkovává přechod iontů z atmosférické části přístroje do vysokého vakua. Dále je svazek iontů zafokusován a veden iontovou optikou do hmotnostního analyzátoru [154, 155]. V hmotnostním analyzátoru jsou následně ionty děleny podle jejich poměru  $m/z$ . Nejčastěji používaným analyzátozem je kvadrupólový analyzátor. Kvadrupólový analyzátor je tvořený 4 tyčemi kruhového průřezu, na které je přiváděno stejnosměrné a střídavé napětí. Na dvě protilehlé tyče je vkládáno kladné stejnosměrné napětí

a na dvě zbývající záporné, na všechny tyče je přiváděno střídavé napětí. Ionty oscilují ve středu osy kvadrupólu a v daný okamžik je pro určitou hodnotu poměru stejnosměrného/střídavého napětí ( $U_Q/V_Q$ ) stabilní oscilace iontu s určitou hodnotou  $m/z$ , tento ion tedy prochází dále směrem k detektoru, kterým nejčastěji bývá elektronásobič. Plynulou změnou  $U_Q$  a  $V_Q$  (poměr zůstává konstantní) postupně opouští analyzátor všechny ionty studovaných analytů [156].

#### 2.4.1.2 CE-ICP-MS

Spojení mezi CE a ICP-MS má řadu výhod, mezi ně patří vysoká separační účinnost, krátká doba analýzy a vysoká selektivita a citlivost detekce. Další výhodou je, že můžeme používat pro separaci v CE celou škálu pufřů a nemusíme se omezovat jenom na těkavé pufry jako v případě spojení kapilární elektroforézy s hmotnostní spektrometrií s ionizací elektrosprejem (CE-ESI-MS). Můžeme také přidávat jakákoliv aditiva do pufry, ať už těkavá nebo netěkavá, a díky tomu můžeme jednoduše uskutečnit řadu „online“ prekoncentračních technik ve spojení s CE-ICP-MS [157, 158].

Robustní rozhraní („interface“) mezi CE a ICP-MS je klíčovou částí pro získání věrohodných a opakovatelných kvantitativních výsledků. Toto spojení musí splňovat několik požadavků: (1) musí stabilně zajistit elektrický obvod mezi „inletovou“ elektrodou a vstupem do ICP-MS (stabilní průchod proudu), (2) musí zajistit dostatečný a opakovatelný průtok pomocné kapaliny, (3) musí zajistit opakovatelné mísení efluentu z CE s co nejnižším rozmytím tak, aby byla zachována separační účinnost CE [158]. První interface pro spojení CE s ICP-MS popsali Olesik a kol. v roce 1995 [159] a od té doby byla publikována řada článků věnujících se spojení CE-ICP-MS [160, 161].

Škála použití CE-ICP-MS je rozsáhlá, pomocí této techniky můžeme analyzovat různé kovy, polokovy a nekovy a jejich specie v rozličných vzorcích od enviromentálních, farmaceutických až po biologické vzorky. Michalke a kol. analyzovali vzorky půdy obsahující různé specie Pt [162], dále byly analyzovány specie antimonu ve vzorcích životního prostředí [163] anebo specie jódu a selenu v tělních tekutinách [164, 165]. CE-ICP-MS také nachází své uplatnění v proteomice [166, 167].

## 2.4.2 Online prekoncetrační techniky

### ❖ CZE

Existuje řada online koncentračních technik v CZE. Jednou z nejjednodušších je: zakoncentrování vzorku zesílením pole („*Field-amplified sample stacking*“, FASS). Při této technice je vzorek rozpuštěn v pufru (100-1000x zředěném) anebo ve vodě a má nižší vodivost než je vodivost BGE [168]. Po hydrodynamickém nadávkování vzorku do kapiláry a aplikaci napětí dojde k rapidnímu urychlení analytů v zóně vzorku (vyšší intenzita elektrického pole), jakmile tyto analyty dosáhnou hranice vzorek/BGE, kde je nižší intenzita elektrického pole, zpomalí se a zakoncentrují se do úzké zóny. Následně jsou tyto analyty separovány podle CZE mechanismu. Wang a kol. použili FASS-CZE pro stanovení dusitanů a dusičnanů v lidské plazmě [169], Chen a kol. tak stanovili amitriptylin a nortriptylin [170] a pomocí FASS-CZE byly stanoveny také alkaloidy v sinomeniu ostrém [171].

Alternativou FASS je technika s elektrokinetickým dávkováním vzorku: polem zesílené dávkování vzorku („*field-amplified sample injection*“, FASI). Gao a kol. použili FASI-CZE pro stanovení chlorfenolů ve vodě [172] a FASI-CZE technika byla také použita pro stanovení tetracyklinů v lidské moči [173].

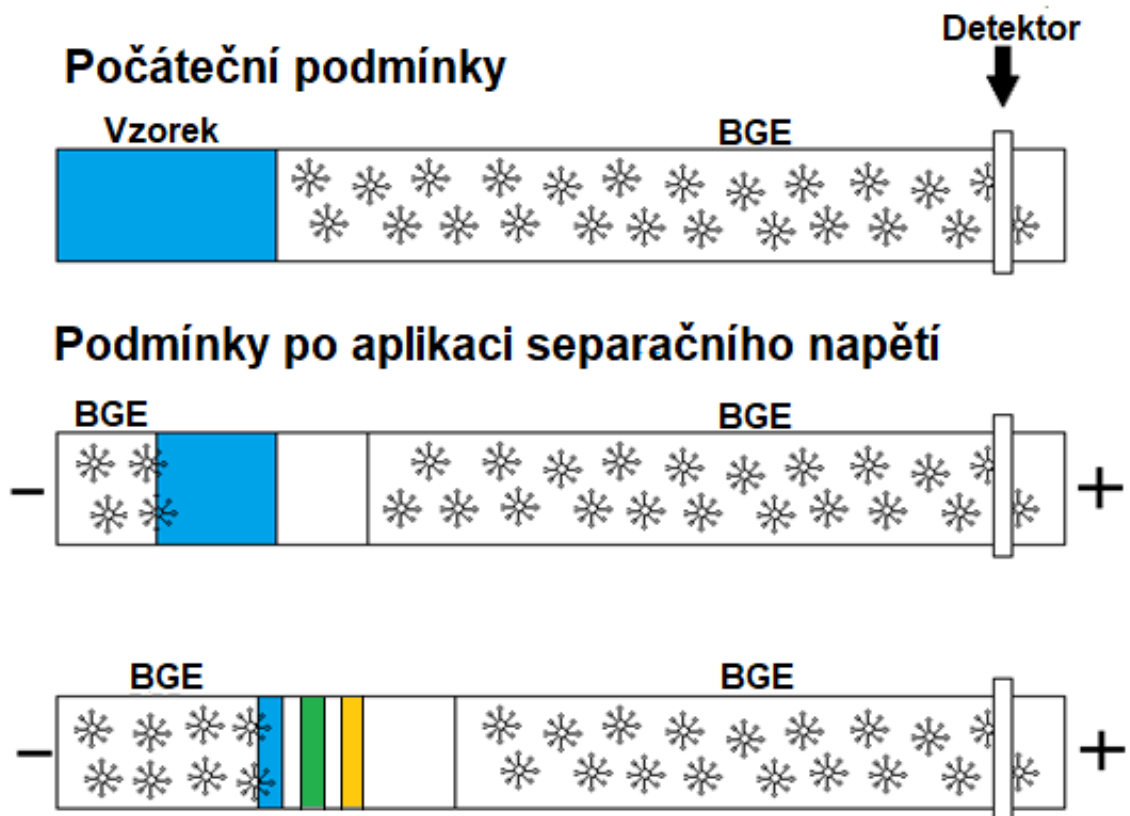
Stejný pufrací systém jako FASS, ale měnící se polaritu elektrod během analýzy, má technika nazývaná zakoncentrování vzorku z velkého objemu („*large volume sample stacking*“, LVSS). Vzorek např. aniontů je jako v případě FASS rozpuštěn ve zředěném pufru nebo ve vodě a nadávkován do kapiláry s pufrům o větší vodivosti. Po aplikaci napětí záporné polaroty se pohybují anionty ke konci kapiláry a kationty a neutrální analyty opouští kapiláru v opačném směru. Poté, co anionty dosáhnou hranice vzorek/BGE, se zakoncentrují. Po zakoncentrování aniontů se přepne polarita elektrod zpět na pozitivní a anionty jsou separovány dále pomocí CZE. Technika LVSS-CZE byla použita pro stanovení tetracyklických antibiotik [174], protizánětlivých léčiv [175] a  $\beta$ -laktamových antibiotik [176].

Dále lze prekoncentrovat analyty pomocí přechodné izotachofórey („*transient isotachopheresis*“, t-ITP), ta lze uskutečnit dvěma způsoby. (1) Ko-ion v BGE má vyšší mobilitu než všechny ionty ve vzorku. Přechodnou izotachofóru tedy uskutečníme nadávkováním krátké zóny koncového elektrolytu (nižší mobilita ko-iontu než ionty ve vzorku) za zónu vzorku. Po zafokusování analytů je vialka s koncovým elektrolytem nahrazena vialkou s vedoucím elektrolytem a probíhá klasická CZE. (2) Ko-ion v BGE má nižší mobilitu než ionty ve vzorku. K uskutečnění přechodné izotachofórey tedy potřebujeme přidat do vzorku ion s nejvyšší mobilitou, který bude sloužit jako vedoucí elektrolyt [7]. Szökő a kol. analyzovali dusitany a dusičnany v biologických vzorcích pomocí t-ITP-CZE [177], t-ITP-CZE byla také použita pro stanovení indikátorů ribonukleotidreduktázové aktivity deoxycytidin difosfátu a deoxycytidin trifosfátu [178].

V neposlední řadě je třeba zmínit použití přechodného pH rozhraní „*dynamic pH junction*“, při kterém diskontinuita pH mezi vzorkem a BGE vede ke změně mobility analytů a tím k jejich prekoncentraci [179]. Např. při stanovení aniontů je dlouhá zóna vzorku (ve fosfátovém pufru) nadávkovaná do kapiláry obsahující BGE o vyšším pH (borátový pufr). V nižším pH jsou analyty neutrální, ale získají náboj ve vyšším pH. Po aplikaci napětí  $\text{OH}^-$  ionty pronikají z alkaličtějšího BGE do zóny vzorku, EOF migruje v opačném směru, výsledkem je fokusace analytů na hranici nižší pH/vyšší pH [180]. Poté následuje separace analytů pomocí klasické CZE. Touto technikou byly prekoncentrovány a stanoveny kationtové analyty v CZE [181], peptidy [182] a aminokyseliny v moči [183].

#### ❖ MEKC

Nejpoužívanější prekoncentrační technikou v MEKC je „nametení“ „*sweeping*“. Podstatou této techniky je „zametání“ a koncentrace analytů do úzkých zón pomocí micel. Kapilára je naplněná BGE o nízkém pH s micelami a vzorek bez micel je hydrodynamicky nadávkován do kapiláry jako dlouhá zóna [3]. Po aplikaci napětí opačné polariry se pohybují negativně nabitě micely skrze zónu vzorku, a tím „zametají“ analyty do úzké zóny, následně analyty interagují s micelami a jsou separovány pomocí klasické MEKC (Obr. 10) [184]. Účinnost této prekoncentrační techniky závisí na afinitě analytu k micelám (čím větší afinita, tím účinnější prekoncentrace). Technika *sweeping*-MEKC byla úspěšně aplikována pro stanovení řady analytů. Hongyuan a kol. ji použili pro stanovení fenolů v odpadních vodách z průmyslu [185]. Nunez a kol. analyzovali herbicidy v odpadních vodách [186], Sun a kol. vylepšili detekci alkaloidů [187], Kubalczyk a kol. stanovovali thiosulfát v moči [188] a Liu a kol. kvantifikovali paliperidon v lidské plazmě [189].



Obr.10. Koncentrace pomocí sweepingu. Dlouhá zóna vzorku bez micel je nadávkovaná do kapiláry naplněné BGE s negativně nabitými micelami. V homogenním elektrickém poli negativní polarity micely pronikají do zóny vzorku a „zametají“ analyty do úzké zóny. Nakonec jsou analyty separovány pomocí MEKC mechanismu [184]. Ilustrace autora.

Další technikou umožňující prekoncentraci analytů v MEKC je FASS. Princip této techniky je obdobný jako v případě FASS-CZE, jediným rozdílem je přítomnost micel v pufru. Vzorek je rozpuštěn ve vodě anebo zředěném pufru bez micel (má nižší vodivost) a BGE obsahuje micely a je vodivější [190]. Oledzka a kol. separovali a stanovovali osm benzodiazepinů v lidské moči pomocí FASS-MEKC [191] a také steroidní hormony v moči pomocí FASS-MEKC [192].

Další možností prekoncentrace analytů v MEKC je použití vzorku s vyšší vodivostí oproti micelárnímu BGE, který má nižší vodivost. Analyty migrují vlivem EOFu ke katodě skrze zakoncentrovanou zónu micel, zde jsou silně zadrženy a zakoncentrují se do úzké zóny.

Jako další techniku můžeme použít FESI „*field-enhanced sample injection*“. Při této technice je do kapiláry naplněné neutrálním pufrům s micelami hydrodynamicky nadávkovaná zóna vody před zónu vzorku a vzorek rozpuštěný v micelárním pufru o nízké vodivosti je nadávkován elektrokineticky (negativní polarita) do kapiláry [3]. Shi a kol. použili FESI-MEKC pro detekci aristolochových kyselin v přípravcích čínské medicíny [193].

Zajímavou technikou prekoncentrace v MEKC je zafokusování analytů micelárním kolapsem („*analyte focusing by micelle collapse*“, AFMC). Podstatou této techniky je rozpuštění vzorku neutrálních analytů v základním elektrolytu obsahujícím micely. Vzorek musí mít větší vodivost než separační pufr a po aplikaci napětí se mezi zónou vzorku a zónou elektrolytu vytváří oblast, kde dochází k rozpadu micel, uvolnění analytů a jejich zakoncentrování [194].

Poslední technikou je zakoncentrování na rozhraní micely-rozpouštědlo („*micelle to solvent stacking*“, MSS). Fokusace analytů je v tomto případě založená na změně jejich efektivní mobility na hranici mezi micelárním roztokem vzorku a základním elektrolytem obsahujícím organické rozpouštědlo [195].

Velkou výhodou prekoncentračních technik je jejich vzájemná kombinovatelnost a z toho plynoucí možnost dosažení ještě nižších mezí detekce pro vybrané analyty. Figeys a kol. použili „SPE-CZE-MS/MS“ pro analýzu proteinů [196], Medrano a kol. použili „SPE-large volume sample stacking-CE“ (SPE-LVSS-CE) pro stanovení umělých sladidel ve vzorcích vody [197] a Zhou a kol. dosáhli při analýze kardiovaskulárních léčiv v lidské moči pomocí „*membrane supported liquid-liquid-liquid microextraction combined with field-amplified sample injection CE-UV*“ (MS-LLLME-FASI-CE-UV) mezi detekce v rozsahu 0,02-0,08  $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  [198].

## 2.5 Komplexace borát glukóza

Kyselina boritá ( $\text{B}(\text{OH})_3$ ) a borátový anion ( $\text{B}(\text{OH})_4^-$ ) v přítomnosti *cis*-1,2 a *cis*-1,3 diolů formují stabilní kovalentní komplexy [199, 200]. V případě sacharidů jsou to jejich *cis*-diolové skupiny, které formují cyklické estery s kyselinou boritou anebo borátem aniontem (borátem) [201, 202]. Hoffstetter-Kuhn a kol. zjistili, že komplexy se sacharidy spíše formuje borát než kyselina boritá [203]. Formace komplexů sacharidů s borátem je znázorněna reakcemi (15 a 16), kde *L* je sacharid,  $B^{-1}$  je borátový anion a  $BL^{-1}$  a  $BL_2^{-1}$  jsou komplexy [204]. První reakce (15) je dobře objasněna, molekula borátu

podléhá esterifikaci s *cis*-diolovými skupinami v sacharidu. V případě druhé reakce (16) může komplex  $BL_2^{-1}$  vznikat postupně z komplexu  $BL_1^{-1}$  anebo může vznikat přímo reakcí dvou sacharidů (2L) a borátového aniontu ( $B^{-1}$ ) [205].



Formace komplexů  $BL^{-1}$  nebo  $BL_2^{-1}$  závisí na pH a koncentraci borátu. Když máme stálou koncentraci sacharidu, ale zvyšujeme pH a/nebo koncentraci borátu, roste i koncentrace vznikajících komplexů [205].

V CE byl borátový pufr použit pro separaci sacharidů, nukleotidů a dalších biologicky aktivních látek kvůli jeho schopnosti formovat komplexy s těmito látkami [203, 206, 207]. Po přidavku chirálních selektorů (cyklodextrinů) do borátového pufru byla umožněna i chirální separace diolových látek [208, 209]. Stefansson a kol. přišli na to, že jsou analyty separovány na základě duálního selektorového systému, podle kterého analyty nejprve interagují s borátem za tvorby komplexů a tyto komplexy dále interagují s chirálním selektorem (cyklodextrinem) [208]. Další možností využití borátového aniontu v chirálních separacích, je jeho použití jako centrálního iontu při chirálních separacích pomocí ligandové výměny. Chirální ligandová výměna s borátovým aniontem, jako centrálním iontem, je možná, když může být během elektroforetické separace formován komplex analyt-borát-selektor a stabilita a/nebo struktura ternárního komplexu s jedním enantiomerem je rozdílná od druhého. Kodama a kol. provedli enantioseparaci DL-pantothenové kyseliny, kde byl borát použit jako centrální ion a (*S*)-3-amino-1,2-propandiol jako chirální selektor [210]. Aizawa a kol. se zabývali studiem mechanismu enantioseparace, kterou provedli Kodama a kol., pomocí  $^{11}B$  NMR při různých teplotách. Objasnili, že ternární komplexy jsou jinak entropicky stabilní a liší se ve své solvované struktuře, a to má za následek jejich rozdílnou elektroforetickou rychlost. Ze svých poznatků dále vyvodili, že i další ternárně komplexní systémy mohou být chirálně separovány [211].

### 3 Cíle disertační práce

Cíle disertační práce jsou shrnuty v následujících bodech:

- ❖ Vývoj a optimalizace metody pro snížení množství použitého chirálního selektoru (S- $\beta$ -CD) při chirální separaci cetirizinu za použití glukózy jako aditiva v borátovém pufru. Studium tvorby komplexů mezi glukózou, borátovým aniontem a S- $\beta$ -CD.
- ❖ Vývoj metody pro ultrastopové stanovení oxaliplatinu a jejích nečistot. Vývoj a optimalizace metod sweeping-MEKC-UV a sweeping-MEKC-ICP-MS a jejich validace. Kvantitativní analýza modelového vzorku oxaliplatinu za použití sweeping-MEKC-ICP-MS.

Nejvýznamnější výsledky byly publikovány ve dvou impaktovaných publikacích:

- ❖ **P. Švecová**, J. Petr, Separation of cetirizine enantiomers by capillary electrophoresis with a dual selector system based on borate-glucose complexes and sulfated- $\beta$ -cyclodextrin. *Talanta* 198 (2019) 154-158.
- ❖ **P. Švecová**, D. Baron, K. A. Schug, T. Pluháček, J. Petr, Ultra-trace determination of oxaliplatin impurities by sweeping-MEKC-ICP-MS. *Microchemical Journal* 172 (2022) 106967.



## 4 Experimentální část

### 4.1 Separace enantiomerů cetirizinu kapilární elektroforézou s duálním selektorovým systémem tvořeným komplexem borát-glukóza a S- $\beta$ -CD

#### 4.1.1 Úvod

Cetirizin je antihistaminikum patřící do skupiny H<sub>1</sub>-antagonistů první generace používaných k léčbě alergických reakcí [212, 213]. Molekula cetirizinu je chirální, a proto cetirizin zaujímá dvě konformace: *R*-enantiomer (levocetirizin) a *S*-enantiomer (dextrocetirizin) (Obr. 11). Na trhu jsou běžně dostupná léčiva (např. analergin, alerid, zodac...) obsahující racemickou směs enantiomerů cetirizinu. Antihistaminický účinek má však jenom jeden z optických izomerů, a to levocetirizin [213, 214]. Z hlediska kontroly kvality farmaceutických přípravků cetirizinu je tedy nutné mít dostupné separační techniky, které jsou schopné enantiomery cetirizinu od sebe odlišit a kvantifikovat.

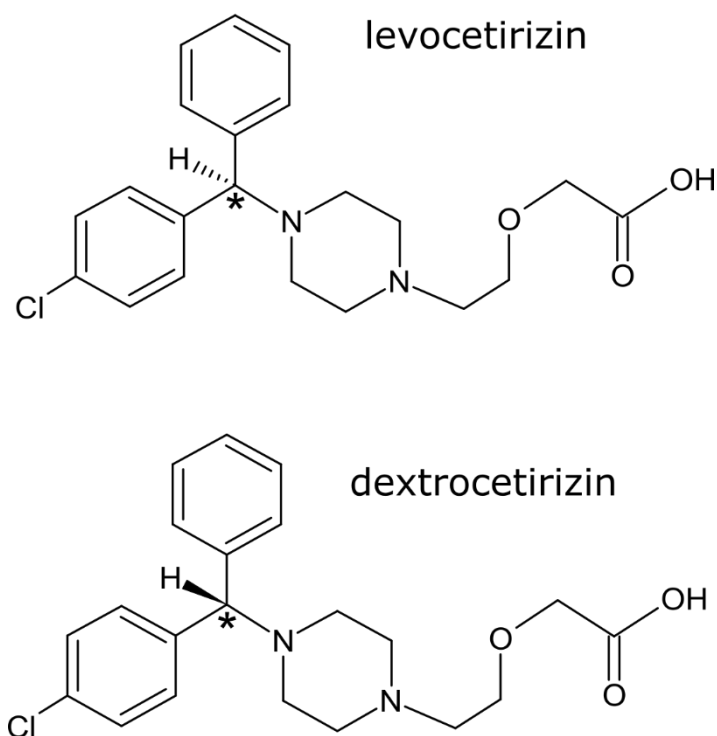
Jednou z technik, která je běžně používaná pro chirální separaci cetirizinu, je kapilární elektroforéza. Byla publikována celá řada článků na téma chirální separace cetirizinu za použití různých typů chirálních selektorů a pufrů. Byly použity např. maltodextrin ve fosfátovém pufru [215], glykogen v Tris-fosfátovém pufru [216] anebo sulfátovaný- $\beta$ -cyklodextrin v borátovém pufru [217]. Byly také publikovány články o využití duálních selektorových systémů pro chirální separaci cetirizinu. Byla použita např. kombinace glykogenu a chondroitin sulfátu A ve fosfátovém pufru pH 3,0 [218] anebo sulfobutylether- $\beta$ -CD s  $\beta$ -CD ve fosfátovém pufru pH 7,0 [219].

Primární nevýhodou použití chirálních selektorů na bázi cyklodextrinů je jejich cena. Proto je práce zaměřena na snížení množství chirálního selektoru (cyklodextrinu) pro chirální separaci cetirizinu a s tím spojenými finančními náklady na analýzu. Myšlenka na způsob snížení množství CS vzešla ze studií, zabývajících se tvorbou komplexů mezi borátovým anionem a sloučeninami obsahujícími diolové skupiny. Borátový anion je totiž známý svou interakcí s *cis*-1,2 a *cis*-1,3 dioly anebo tvorbou 1:1 a 1:2 komplexů s cukry skrze esterifikaci [205, 220]. Navíc Kodama a kol. také studovali použití diol-borátových systémů pro chirální separace založené na principu ligandové výměny [221]. Proto byl v práci studován efekt komplexu borát-glukóza na chirální separaci cetirizinu.

## 4.1.2 Chemikálie a vzorky

Na přípravu roztoků základních elektrolytů byly použity kyselina boritá, kyselina 2-(cyklohexylamino)ethansulfonová (CHES), kyselina 3-(cyklohexylamino)-2-hydroxy-1-propansulfonová (CAPSO) a hydroxid sodný od společnosti Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Jako aditiva byly dále použity D-(+)-glukóza, L-(-)-glukóza a sulfatovaný-beta-cyklodextrin (S- $\beta$ -CD) taktéž od společnosti Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), D-(+)-xylóza od společnosti Merck (Darmstadt, Německo) a D-galaktóza od společnosti Lachema (Brno, Česká republika). Všechny tyto chemikálie byly čistoty p.a. Použitá deionizovaná voda 18,2 M $\Omega$ .cm byla přečištěna systémem Milli-Q-Reference od firmy Millipore (Molsheim, Francie).

Standardy: cetirizin dihydrochlorid (racemát a *R*-enantiomer) byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) v čistotě p.a.



Obr. 11 Struktura levocetirizinu a dextrocetirizinu. Ilustrace autora.

### 4.1.3 Příprava roztoků separačních pufřů a standardu

Separací pufřy byly připraveny rozpuštěním odpovídajícího množství kyseliny v deionizované vodě a jejich následnou úpravou na odpovídající hodnotu pH titrací 50 % (m/m) hydroxidem sodným. Jako separační pufřy byly použity borát/NaOH, CHES/NaOH a CAPSO/NaOH o koncentraci 50 a 500 mmol·l<sup>-1</sup> a pH 9,5. Do pufřů byly následně přidány S-β-CD, D-(+)-glukóza, L-(-)-glukóza, D-(+)-xylóza a D-galaktóza o požadovaných koncentracích. Roztoky byly nakonec přefiltrovány přes stříkačkové 0,45 μm PTFE filtry (Labicom, Česká republika).

Zásobní roztok standardu cetirizinu byl připraven jeho rozpuštěním v deionizované vodě na požadovanou koncentraci 2,5 x 10<sup>-4</sup> mol·l<sup>-1</sup> a jeho následnou filtrací přes stříkačkový 0,22 μm PTFE filtr (Labicom, Česká republika).

### 4.1.4 Instrumentace a experimentální podmínky

Všechny experimenty byly prováděny na přístroji CE1600 od firmy Agilent Technologies (Waldbronn, Německo) vybaveném DAD. Separace byly prováděny v křemenné kapiláře od firmy MicroSolv Technology Corporation (NJ, USA) s vnitřním průměrem 50 μm o celkové délce 64,5 cm, efektivní délce 56 cm a při teplotě 25 °C. Před prvním použitím byla kapilára promyta 15 minut 0,1 mol·l<sup>-1</sup> NaOH, 10 minut deionizovanou vodou a 10 minut separačním pufřem. Mezi experimenty byla kapilára promývána vždy 2 minuty 0,1 mol·l<sup>-1</sup> NaOH, 2 minuty vodou a 3 minuty separačním pufřem. Promývací tlak činil 935 mbar. Vzorek byl dávkován tlakem 50 mbar po dobu 10 s. Napětí vkládané na kapiláru bylo 20 kV a sledovaná vlnová délka byla 200 nm. Všechny experimenty byly opakovány 3x.

CE-ESI-MS a MS/MS měření byla prováděna na QqQ-MS/MS spektrometru Agilent 6460 (Waldbronn, Německo) s elektrosprejovou ionizací (ESI) ovládaným softwarem MassHunter B.06.00. Přímý nástřik vzorků byl prováděn stříkačkovou pumpou New Era NE-1000 (NY, USA) s průtokem 3,0 μl·min<sup>-1</sup>. Sprejovací napětí bylo -3,5 kV, sušící plyn (N<sub>2</sub>) měl teplotu 300 °C a průtok 10 l·min<sup>-1</sup>, zmlžující plyn měl tlak 15 psi. Pro fragmentace byly použity kolizní energie 2, 5, 10 a 20 eV. Výsledkem každého měření bylo průměrné hmotnostní spektrum z min. 205 skenů.

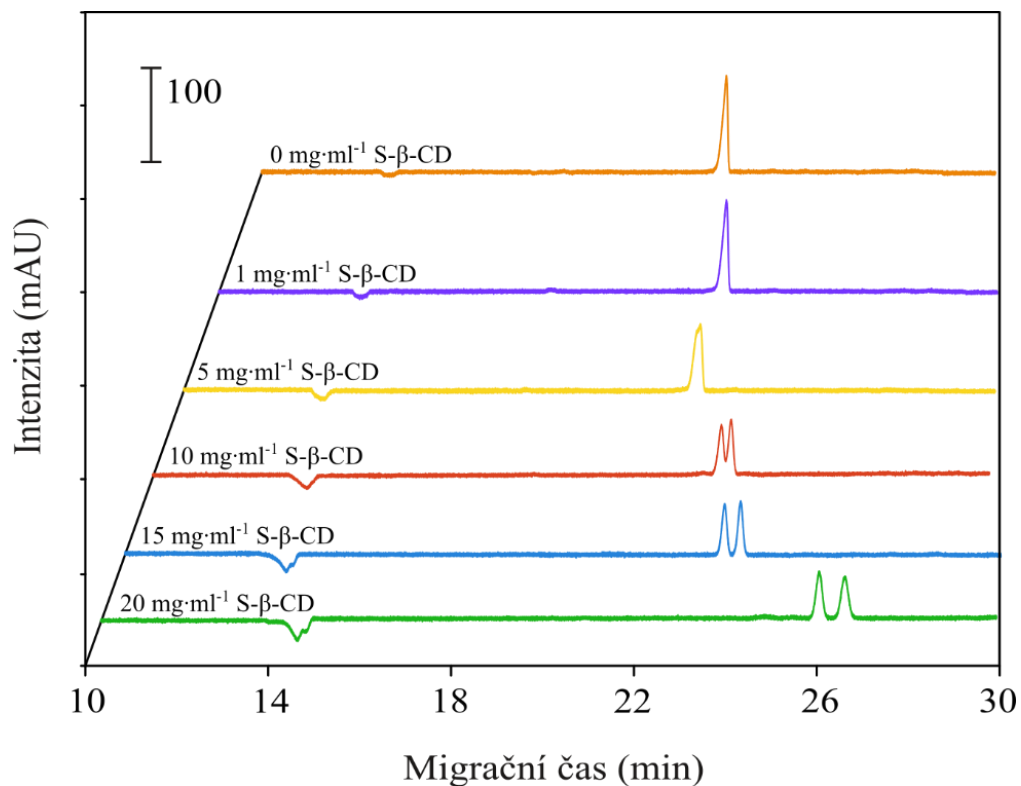
## 4.1.5 Výsledky a diskuze

### 4.1.5.1 Vývoj metody

Jak již bylo zmíněno výše, práce je zaměřena na snížení koncentrace chirálního selektoru (S- $\beta$ -CD) běžně používaného při chirální separaci cetirizinu pomocí CE. Důvodem bylo snížení provozních nákladů na danou separaci a také menší zátěž na životní prostředí.

Disociace analytu (cetirizinu) je popsána třemi disociačními konstantami,  $pK_1 = 2,2$ ,  $pK_2 = 2,9$  a  $pK_3 = 8,0$  [217]. Cetirizin se v CE nejčastěji analyzuje v alkalickém prostředí, ve kterém dochází k disociaci karboxylové skupiny cetirizinu a analyt je poté přítomen ve formě aniontu. S ohledem na předchozí publikované články zabývající se chirální separací cetirizinu byl vybrán S- $\beta$ -CD a borát sodný jako chirální selektor a separační pufr.

Jako první byl testován vliv pH a koncentrace borátu sodného a také vliv koncentrace přidaného chirálního selektoru na chirální separaci. Testované koncentrace borátu sodného pH 9,5 s přidavkem 20 mg·ml<sup>-1</sup> S- $\beta$ -CD byly: 50, 100, 250 a 500 mmol·l<sup>-1</sup>. Nejlepšího rozlišení bylo dosaženo při použití pufru o koncentraci 500 mmol·l<sup>-1</sup>. Dále byl testován vliv pH 500 mmol·l<sup>-1</sup> borátu sodného v rozsahu 8,5; 9,0; 9,5 a 10,0. Pufry znovu obsahovaly 20 mg·ml<sup>-1</sup> selektoru. Nejlepšího rozlišení bylo dosaženo za použití pufru o pH 9,5. Nakonec byl testován vliv koncentrace přidaného chirálního selektoru, v našem případě S- $\beta$ -CD. Do 500 mmol·l<sup>-1</sup> borátu sodného pH 9,5 byly přidány a testovány následující koncentrace S- $\beta$ -CD: 0, 1, 5, 10, 15 a 20 mg·ml<sup>-1</sup>. Elektroferogramy těchto analýz jsou uvedeny na Obr. 12. Nejnižší koncentrace, která poskytla separaci izomerů na základní linii byla koncentrace 15 mg·ml<sup>-1</sup> (Tab. 5). Migrační pořadí izomerů za daných podmínek je: první migruje *S*-izomer a jako druhý *R*-izomer.



Obr. 12 Elektroferogramy chirální separace cetirizinu, BGE: 500 mmol·l<sup>-1</sup> borát sodný pH 9,5 s 0; 1; 5; 10; 15 a 20 mg·ml<sup>-1</sup> S-β-CD, koncentrace cetirizinu: 2,5 x 10<sup>-4</sup> mol·l<sup>-1</sup>.

Tab. 5 Závislost rozlišení a selektivity chirální separace cetirizinu na koncentraci chirálního selektoru (S-β-CD)

Koncentrace S-β-CD (mg·ml <sup>-1</sup> )	R <sub>s</sub>	α
0	-	-
1	-	-
5	0,27	1,01
10	0,96	1,02
15	1,81	1,04
20	2,45	1,05

#### 4.1.5.2 Efekt přidavku glukózy

S ohledem na předchozí studie, které se zabývaly tvorbou komplexů mezi cukry, dioly a borátovým aniontem a také použitím borátového aniontu jako centrálního iontu v chirální ligandové výměně, byl zkoumán vliv přidavku glukózy do pufru na chirální separaci cetirizinu.

Jako první byl zkoumán efekt přidavku 50, 75 a 100 mmol·l<sup>-1</sup> D-glukózy do pufru (500 mmol·l<sup>-1</sup> borát sodný pH 9,5) obsahujícího 5 a 10 mg·ml<sup>-1</sup> S-β-CD na separaci. Z Tab. 6 můžeme vidět, že jak rozlišení, tak selektivita se zvyšovaly s rostoucí koncentrací glukózy. Migrační pořadí enantiomerů zůstalo stejné jako v případě separaci bez přidavku glukózy, tedy první S-enantiomer a jako druhý R-enantiomer.

Tab. 6 Závislost rozlišení a selektivity chirální separace cetirizinu na přidavku glukózy

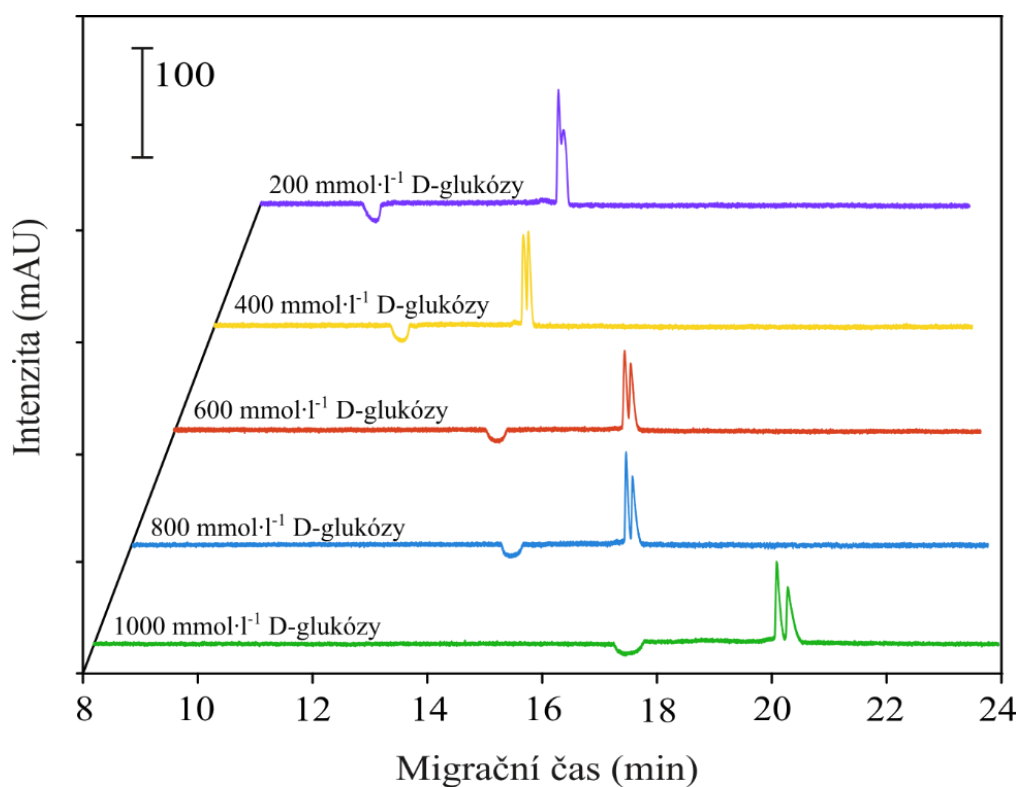
Koncentrace S-β-CD (mg·ml <sup>-1</sup> )	Koncentrace glukózy (mmol·l <sup>-1</sup> )	R <sub>s</sub>	α
10	50	1,38	1,03
	75	2,31	1,06
	100	3,45	1,08
5	50	0,72	1,01
	75	0,80	1,02
	100	1,75	1,04

Po otestování přidavku D-glukózy do pufru, byl také otestován přídavek L-glukózy. L-glukóza poskytovala stejné rozlišení, selektivitu a také stejné migrační pořadí enantiomerů jako D-glukóza. V důsledku levnější pořizovací ceny D-glukózy oproti L-glukóze byla pro další měření použita výhradně D-glukóza.

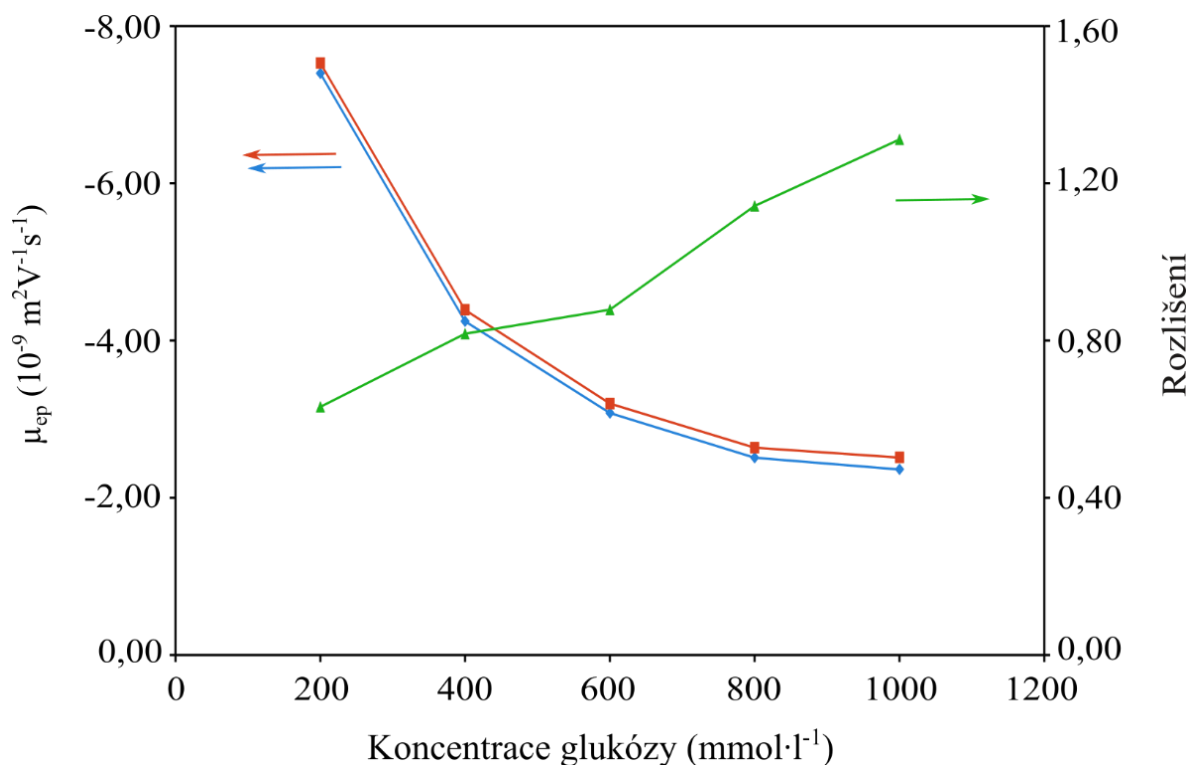
#### 4.1.5.3 Efekt koncentrace glukózy

Dále byl zkoumán vliv koncentrace přidané glukózy na chirální separaci cetirizinu. Jako pufr byl použit 500 mmol·l<sup>-1</sup> borát sodný pH 9,5 s přidavkem 1 mg·ml<sup>-1</sup> S-β-CD. Koncentrace S-β-CD byla vybrána co nejmenší s ohledem na co největší snížení ceny analýzy. Byla testována také koncentrace

0,5 mg·ml<sup>-1</sup> S-β-CD, ale při použití takto nízké koncentrace v daném koncentračním rozsahu použitého přídatku glukózy nebylo dosaženo separace enantiomerů na základní linii. Na Obr. 13 můžeme vidět elektroferogramy chirální separace cetirizinu s přidavkem 200, 400, 600, 800 a 1000 mmol·l<sup>-1</sup> D-glukózy do pufru obsahujícího 1 mg·ml<sup>-1</sup> S-β-CD. Dále je efekt koncentrace glukózy na rozlišení a na mobilitu enantiomerů cetirizinu vyobrazen na Obr. 14. S rostoucí koncentrací D-glukózy se zvyšovalo rozlišení enantiomerů a mobilita enantiomerů se snižovala. Za optimálních podmínek bylo při koncentraci 1000 mmol·l<sup>-1</sup> glukózy v pufru dosaženo kvalitativního rozlišení enantiomerů (R = 1,31).



Obr. 13 Efekt koncentrace přidané D-glukózy na chirální separaci cetirizinu, BGE: 500 mmol·l<sup>-1</sup> borát sodný pH 9,5 obsahující 1 mg·ml<sup>-1</sup> S-β-CD a 200, 400, 600, 800 a 1000 mmol·l<sup>-1</sup> D-glukózy, koncentrace cetirizinu: 2,5 x 10<sup>-4</sup> mol·l<sup>-1</sup>.



Obr. 14 Efekt koncentrace D-glukózy na rozlišení a mobilitu enantiomerů cetirizinu, BGE: 500 mmol·l<sup>-1</sup> borát sodný (pH 9,5) obsahující 1 mg·ml<sup>-1</sup> S-β-CD a 200–1000 mmol·l<sup>-1</sup> D-glukózy. Zelené trojúhelníky: rozlišení, červené čtverce: mobilita R-enantiomeru, modré kosočtverce: mobilita S-enantiomeru.

V důsledku zvyšujících se se migračních časů enantiomerů cetirizinu se zvyšující se koncentrací D-glukózy byla změřena efektivní viskozita pufrů obsahujících dané koncentrace glukózy (200–1000 mmol·l<sup>-1</sup>). Viskozita byla změřena na základě publikovaného protokolu [222]. Zjednodušeně, vzorek cetirizinu byl nadávkován do kapiláry tlakem 50 mbar po dobu 10 s a zdrojová a cílová vialka byly naplněny roztoky 200–1000 mmol·l<sup>-1</sup> glukózy. Následně byl aplikován tlak 50 mbar a detekován signál cetirizinu. Dynamická viskozita glukózových roztoků byla následně vypočítána pomocí Hagen-Poiseuillova zákona, kde  $\eta$  je dynamická viskozita (Pa·s),  $\Delta P$  je aplikovaný tlak (mbar),  $d_c$  je vnitřní průměr kapiláry (m),  $t_d$  je čas detekce signálu cetirizinu (s) a  $L$  a  $l$  jsou celková délka kapiláry a délka kapiláry po detekční okénko (m).

$$\eta = \frac{\Delta P d_c^2}{32lL} \cdot t_d \quad (17)$$



Z Tab. 7 můžeme vidět, že s rostoucí koncentrací glukózy v roztocích se zvyšuje jejich dynamická viskozita.

Tab. 7 Efekt koncentrace glukózy v roztoku na jeho dynamickou viskozitu

Koncentrace glukózy (mmol·l <sup>-1</sup> )	Dynamická viskozita (mPa·s)
200	1,04
400	1,16
600	1,25
800	1,37
1 000	1,49

BGE: 500 mmol·l<sup>-1</sup> borát sodný pH 9,5 obsahující 200–1 000 mmol·l<sup>-1</sup> D-glukózy

Zvyšující se viskozita roztoků D-glukózy je pochopitelně ve shodě se snižující se mobilitou enantiomerů cetirizinu v těchto roztocích. Naskytla se tedy otázka, jestli není zvyšující se rozlišení enantiomerů cetirizinu s rostoucí koncentrací roztoků glukózy způsobeno právě zvyšující se viskozitou těchto roztoků. Se zvyšující se viskozitou roztoků, ve kterých probíhá chirální separace, totiž získáváme delší dobu pro interakci mezi CS a enantiomery. Proto byl dále studován efekt napětí na chirální separaci cetirizinu. Kdyby totiž bylo zvyšujícího se rozlišení enantiomerů dosaženo jenom z důvodu delší doby analýzy, tak by se při vkládaném nižším napětí mělo rozlišení enantiomerů zvětšit. Jak však můžeme vidět z Tab. 8, s klesajícím napětím klesalo jak rozlišení, tak selektivita chirální separace enantiomerů cetirizinu. Z toho vyplývá, že zlepšení rozlišení nebylo dosaženo v důsledku delší doby chirální separace, ale díky větší koncentraci D-glukózy jako takové. Lze tedy předpokládat, že dochází k tvorbě komplexů glukóza-borát a/nebo glukóza-borát-cykloextrin a ty ovlivňují chirální separaci.

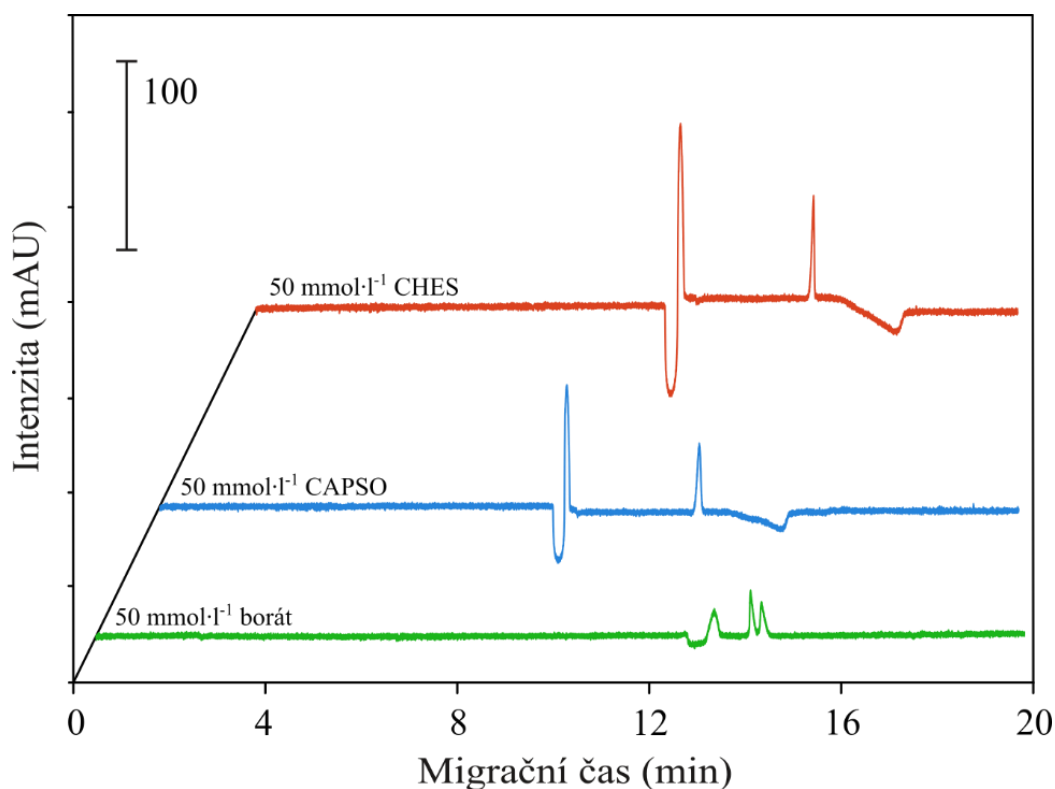
Tab. 8 Závislost rozlišení a selektivity enantiomerů cetirizinu na napětí

Napětí (kV)	Rs	$\alpha$
20	0,71	1,022
10	0,68	1,021
5	0,53	1,017

BGE: 500 mmol·l<sup>-1</sup> borát sodný pH 9,5 obsahující 200 mmol·l<sup>-1</sup> D-glukózy a 1 mg·ml<sup>-1</sup> S- $\beta$ -CD.

#### 4.1.5.4 Efekt typu pufru a přítomnosti CD

Pro ukázkou důležitosti použití právě borátu sodného jako pufru pro chirální separaci cetirizinu byl zkoumán efekt použití jiných pufrů pro tuto chirální separaci. Bylo otestováno použití dalších dvou pufrů: CAPSO a CHES sodného jejichž kyseliny mají podobné hodnoty pKa jako kyselina boritá (pKa 9,2); CAPSO (pKa 9,6) a CHES (pKa 9,3). Koncentrace všech pufrů byla 50 a 500 mmol·l<sup>-1</sup> o pH 9,5 a vždy s přidavkem 1000 mmol·l<sup>-1</sup> D-glukózy a 1 mg·ml<sup>-1</sup> S-β-CD. Výsledky ukázaly (Obr. 15), že separace enantiomerů cetirizinu je dosaženo skutečně jenom při použití borátu sodného jako pufru. To potvrdilo teorii, že komplexy borát-glukóza ovlivňují chirální separaci.



Obr. 15 Elektroferogramy chirální separace cetirizinu v 50 mmol·l<sup>-1</sup> borátu sodném pH 9,5; 50 mmol·l<sup>-1</sup> CAPSO sodném pH 9,5 a 50 mmol·l<sup>-1</sup> CHES sodném 9,5 s přidavkem 1000 mmol·l<sup>-1</sup> D-glukózy a 1 mg·ml<sup>-1</sup> S-β-CD, koncentrace cetirizinu: 2,5 x 10<sup>-4</sup> mol·l<sup>-1</sup>.

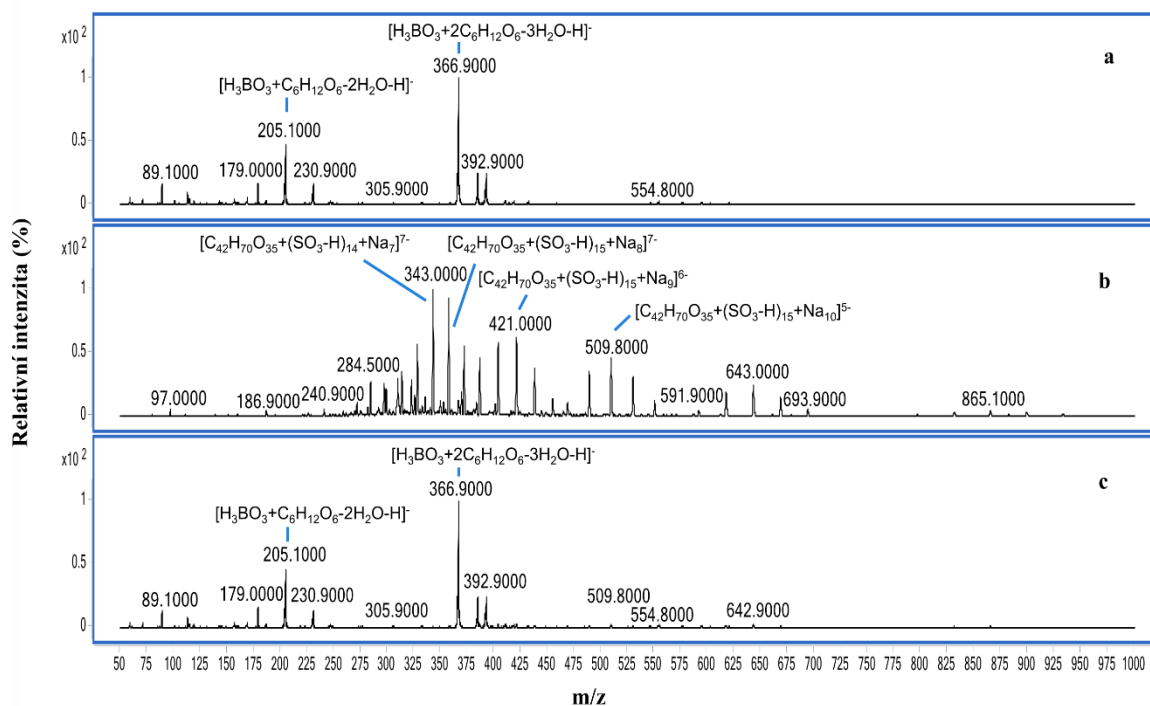
Dále bylo zkoumáno, jestli je pro chirální separaci cetirizinu nutná přítomnost S- $\beta$ -CD v separačním pufru. Byl zkoumán efekt přidavku S- $\beta$ -CD do 500 mmol·l<sup>-1</sup> borátu sodného pH 9,5 obsahujícího 1000 mmol·l<sup>-1</sup> D-glukózy na separaci enantiomerů cetirizinu. Jak bylo předpokládáno, bez přítomnosti S- $\beta$ -CD nedošlo k chirální separaci – přítomnost cyklodextrinu tedy hraje klíčovou roli pro chirální separaci.

#### 4.1.5.5 Studium tvorby komplexů mezi glukózou, borátem a cyklodextrinem

Za účelem objasnění mechanismu chirální separace cetirizinu byly provedeny MS analýzy všech elektrolytů používaných během chirální separace cetirizinu: (1) borátu sodného s D-glukózou, (2) borátu sodného s S- $\beta$ -CD a (3) borátu sodného s D-glukózou a S- $\beta$ -CD. Vzorčky byly dávkovány přímým nástříkem a koncentrace jednotlivých složek byly: 1 mg·ml<sup>-1</sup> S- $\beta$ -CD, 50 mmol·l<sup>-1</sup> borát sodný a 100 mmol·l<sup>-1</sup> D-glukóza, koncentrace borátu sodného a D-glukózy byly sníženy z důvodu zajištění stability elektrospreje. Hmotnostní spektra tří elektrolytů zmíněných výše jsou prezentována na Obr. 16.

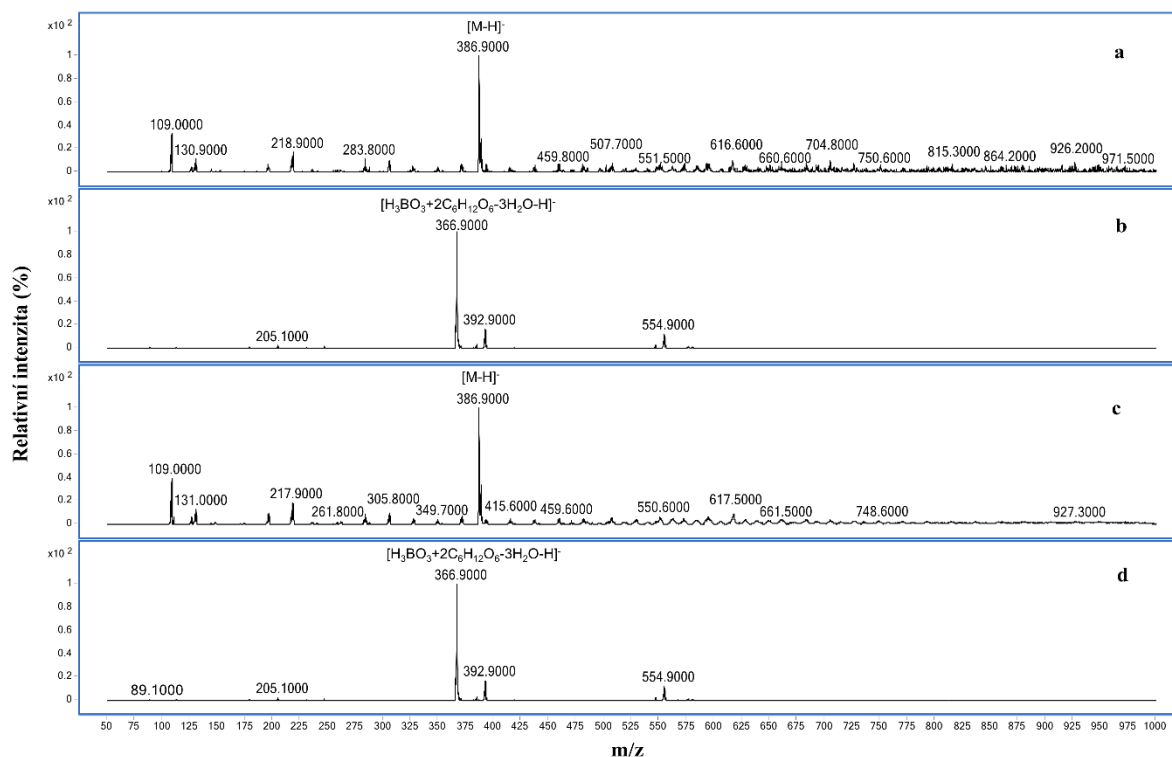
Jak bylo očekáváno, D-glukóza tvoří komplexy s borátem a v hmotnostním spektru jsou přítomny charakteristické signály  $m/z$  205,1 ( $[\text{H}_3\text{BO}_3 + \text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 - 2\text{H}_2\text{O} - \text{H}]^+$ ) a  $m/z$  366,9 ( $[\text{H}_3\text{BO}_3 + 2\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 - 3\text{H}_2\text{O} - \text{H}]^+$ ). Dále jsou v MS spektru S- $\beta$ -CD v borátovém elektrolytu přítomny série několikanásobně nabitých iontů S- $\beta$ -CD, kde např. signály  $m/z$  328,3; 343,0; 357,6 a 372,2 odpovídají 7x nabitým iontům lišících se jenom v počtu sulfoskupin (např.  $m/z$  328,3 odpovídá 13 sulfoskupinám a  $m/z$  343,0 odpovídá 14 sulfoskupinám). Nejzajímavějších výsledků bylo dosaženo při analýze borátu sodného obsahujícího jak S- $\beta$ -CD, tak D-glukózu. V hmotnostním spektru jsou přítomny pouze signály odpovídající komplexu borát-glukóza a S- $\beta$ -CD (Obr. 16c, intenzity signálů iontů S- $\beta$ -CD jsou nižší pravděpodobně v důsledku předností ionizace komplexů borát-glukóza).

Z těchto výsledků vyplývá, že v roztoku nedochází k tvorbě komplexů mezi S- $\beta$ -CD a komplexem borát-glukóza a separační mechanismus tedy zřejmě odpovídá duálnímu selektorovému systému tvořeném S- $\beta$ -CD (jeden selektor) a komplexem borát-glukóza (druhý selektor).



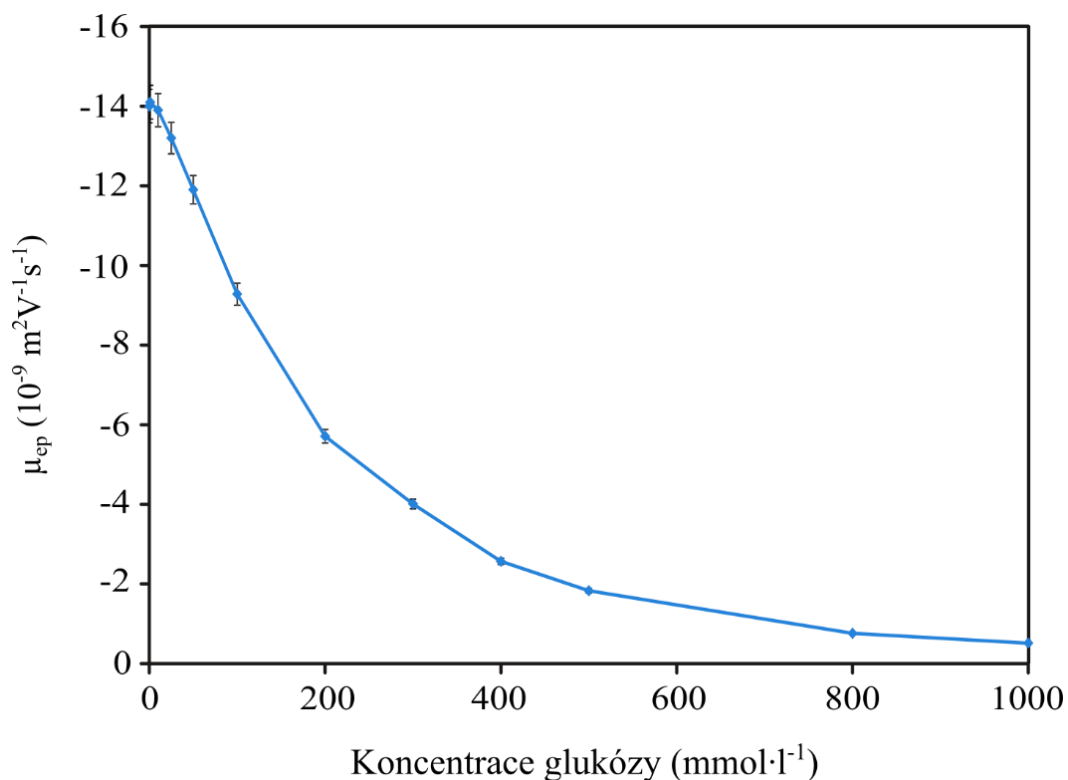
Obr. 16 Hmotnostní spektra elektrolytů obsahujících glukózu, borát sodný a cyklodextrin: (a) borát sodný obsahující D-glukózu, (b) borát sodný obsahující S- $\beta$ -CD a (c) borát sodný obsahující D-glukózu a S- $\beta$ -CD.

Dále byly všechny elektrolyty proměřeny znovu, tentokrát s přidavkem *R*-cetirizinu o koncentraci  $1 \times 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Zajímavé bylo, že signály cetirizinu byly vidět jenom v borátu sodném a borátu sodném obsahujícím S- $\beta$ -CD, ( $m/z$  386,9 odpovídá signálu  $[\text{M-H}]^-$  iontu). Po přidavku D-glukózy do borátu sodného signály cetirizinu nebyly detekovány (Obr. 17). Ve spektru byly detekovány jenom signály odpovídající komplexům borát-D-glukóza a žádné „aduktové“ ionty s cetirizinem nebyly detekovány. Proto byla tedy zvýšena koncentrace cetirizinu na  $1 \times 10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a signály charakteristických iontů cetirizinu byly ve spektru znovu detekovány. Enantiomery cetirizinu mohou tedy tvořit nenabitě komplexy s D-glukózou a borátem nedetekovatelné pomocí MS.



Obr. 17 MS spektra *R*-cetirizinu ( $C_{21}H_{25}ClN_2O_3$ ) v různých elektrolytech: (a) borát sodný, (b) borát-glukóza elektrolyt, (c) borát-S- $\beta$ -CD elektrolyt a (d) borát-glukóza-S- $\beta$ -CD elektrolyt.

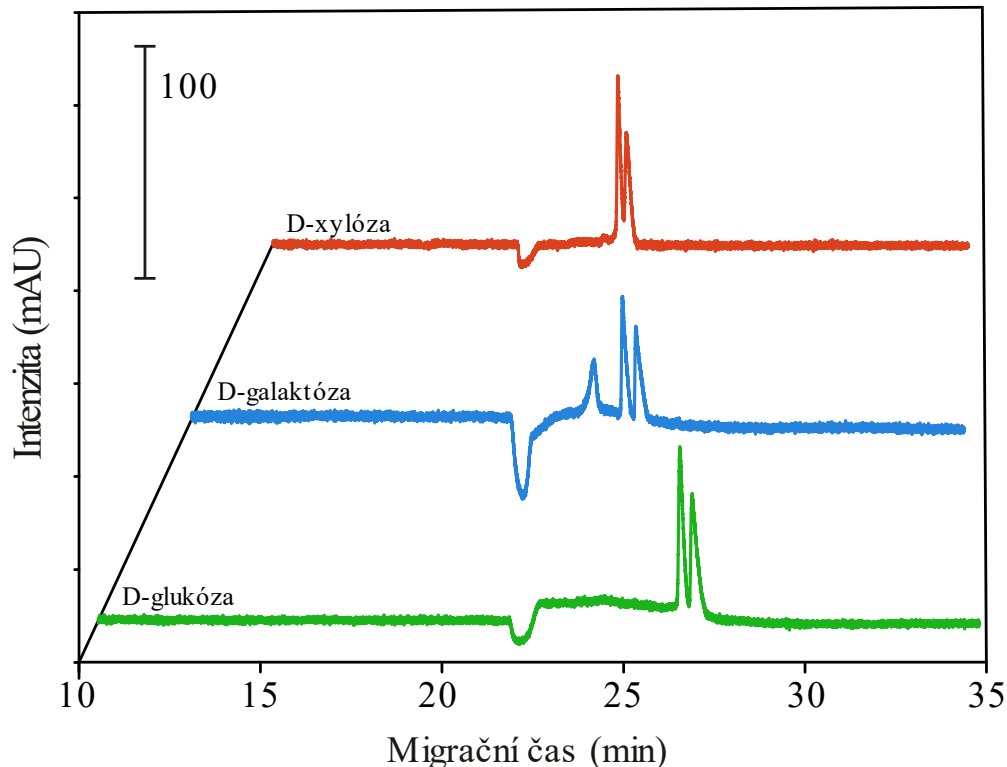
Pro ověření hypotézy tvorby neutrálního borát-cetirizin-D-glukóza komplexu, byla provedena CE analýza *R*-cetirizinu v borátových elektrolytech o pH 9,5 s rostoucí koncentrací D-glukózy od 0 do 1000  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  (bez přídavku S- $\beta$ -CD). Bylo zjištěno, že se mobilita cetirizinu v těchto elektrolytech snižuje z  $-14 \times 10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$  (0  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  D-glukózy) na  $-0,5 \times 10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$  (1000  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  D-glukózy) (Obr. 18), což potvrzuje tvorbu neutrálního komplexu borát-cetirizin-D-glukóza. Interakční konstanta mezi cetirizinem a komplexem borát-D-glukóza byla vypočtena pomocí dvojité reciproké metody [223]. Experimentálně získaná hodnota je  $4,3 \pm 0,9 \text{ M}^{-1}$ . Interakční konstanty mezi cyklodextriny a takto malými molekulami léčiv (cetirizin) jsou většinou 10x–100x větší než v případě interakční konstanty mezi cetirizinem a komplexem borát-D-glukóza [224, 225]. Nicméně i takto „slabá“ interakce se jeví dostačující pro chirální separaci cetirizinu v duálním selektorovém systému.



Obr. 18 Efekt přidavku glukózy do pufru (borát sodný bez S-β-CD) na efektivní mobilitu *R*-cetirizinu. BGE: 50 mmol·l<sup>-1</sup> borát sodný pH 9,5 s přidavkem různých koncentrací D-glukózy.

#### 4.1.5.6 Efekt přidaného sacharidu

Jako poslední byl studován efekt typu přidaného cukru na chirální separaci enantiomerů cetirizinu. Místo D-glukózy byla použita D-galaktóza a D-xylóza. Jako pufr byl znovu použitý 500 mmol·l<sup>-1</sup> borát sodný pH 9,5 obsahující 1 mg·ml<sup>-1</sup> S-β-CD. Přídavek cukrů byl jako v případě D-glukózy 1000 mmol·l<sup>-1</sup>. Použití jiných cukrů vedlo tak jako v případě D-glukózy k úspěšné chirální separaci. Za přidavku D-galaktózy bylo dosaženo rozlišení 1,41 a D-xylózy 1,25 (Obr. 19).



Obr 19. Efekt přidavku různých cukrů na chirální separaci cetirizinu, BGE: 500 mmol·l<sup>-1</sup> borát sodný pH 9,5 obsahující 1 mg·ml<sup>-1</sup> S-β-CD s 1000 mmol·l<sup>-1</sup> D-xylózy, D-galaktózy a D-glukózy, koncentrace cetirizinu: 2,5 x 10<sup>-4</sup> mol·l<sup>-1</sup>.

D-glukóza, D-galaktóza a D-xylóza poskytují ve vodě 2 anomery, α-anomer a β-anomer, a ty se odlišují polohou -OH skupiny na uhlíku C1 [226, 227]. Pro tvorbu komplexů borát-cukr je důležité, aby poloha -OH skupin ve struktuře cukru byla v pozici *cis*-1,2-. Tahle podmínka je splněna, když jsou cukry ve formě α-anomeru. Zastoupení α-glukózy a α-xylózy ve vodě je 36-38 % a 32,1-34,8 % [228]. Díky většímu zastoupení α-glukózy ve vodě poskytuje větší rozlišení než α-xylóza. D-galaktóza ve srovnání s předchozími dvěma cukry obsahuje o dvě -OH skupiny v *cis*- poloze více, takže poskytuje ještě lepší rozlišení než glukóza.

#### 4.1.6 Závěr

Byla vyvinuta a optimalizována metoda pro chirální separaci enantiomerů cetirizinu využívající velmi malého množství chirálního selektoru (S- $\beta$ -CD) v kombinaci s přidavkem D-glukózy do separačního pufru, borátu sodného. Jako první byla metoda optimalizována pro chirální separaci bez přidavku glukózy. Byla testována koncentrace pufru, pH pufru a množství chirálního selektoru. Optimální složení separačního pufru bylo: 500 mmol·l<sup>-1</sup> borát sodný pH 9,5 s přidavkem 15 mg·ml<sup>-1</sup> S- $\beta$ -CD. Za těchto podmínek bylo rozlišení enantiomerů cetirizinu 1,81.

Dále byl zkoumán vliv přidavku glukózy do separačního pufru. Byla stanovena koncentrace D-glukózy, při které je možné použít minimální množství chirálního selektoru a stále je dosaženo kvalitativní separace enantiomerů. Tato koncentrace byla 1000 mmol·l<sup>-1</sup> a bylo při ní možné použít 1 mg·ml<sup>-1</sup> S- $\beta$ -CD, což je 15x méně selektoru než v případě separace bez přidavku D-glukózy.

Práce je také zaměřena na objasnění funkce D-glukózy a jejího vlivu na výrazné snížení množství chirálního selektoru v separačním pufru. Byl testován vliv typu pufru, typu přidaného sacharidu a absence S- $\beta$ -CD na separaci. Z obdržených výsledků je zřejmé, že borát sodný jako pufr hraje klíčovou roli, jelikož tvoří komplexy s D-glukózou a je tedy možné výrazně snížit množství chirálního selektoru pro separaci chirálních sloučenin. Chirální separace je tedy hypoteticky umožněna díky duálnímu selektorovému systému tvořeném S- $\beta$ -CD (1. selektor) a komplexem borát-D-glukóza (2. selektor).

V neposlední řadě byly provedeny MS analýzy elektrolytů obsahujících D-glukózu, S- $\beta$ -CD, borát sodný a cetirizin pro objasnění mechanismu tvorby komplexů mezi danými látkami. Byla potvrzena tvorba komplexu borát-D-glukóza a absence komplexu borát-D-glukóza-S- $\beta$ -CD, což potvrdilo hypotézu duálního selektorového systému. Rovněž byla vypočtena hodnota interakční konstanty mezi komplexem borát-D-glukóza a cetirizinem. Tato konstanta je sice řádově 10-100x menší než v případě interakčních konstant mezi cetirizinem a cyklodextriny, ale i to postačuje pro separaci enantiomerů cetirizinu v duálním selektorovém systému.

Na závěr je důležité zdůraznit, že přidavkem D-glukózy do pufru tedy došlo ke snížení použitého množství chirálního selektoru, a jelikož je D-glukóza výrazně levnější než S- $\beta$ -CD došlo ke snížení ceny analýzy přibližně 4x. Tato metoda může být po provedení validace úspěšně aplikována pro kontrolu optické čistoty cetirizinu.



## 4.2 Ultrastopové stanovení nečistot oxaliplatinu pomocí sweeping-MEKC-ICP-MS

### 4.2.1 Úvod

Nádorová onemocnění jsou v současné době druhá nejzávažnější onemocnění na světě. V roce 2018 na tato onemocnění zemřelo 9,6 milionu lidí [229]. Při léčbě nádorových onemocnění se obvykle kombinuje více léčebných postupů (např. chemoterapie, chirurgický zákrok a radioterapie). Nejčastěji využívaná léčba je chemoterapie, při ní se podávají pacientům cytostatika za účelem zástavy buněčného dělení či úplného zničení nádorového bujení. Bylo vyvinuto mnoho druhů chemoterapeutik s různými mechanismy účinku, např. alkylační činidla, antimetabolity a inhibitory topoisomerasy I a II. Nejpoužívanější z nich jsou chemoterapeutika s alkylačním účinkem, jejichž účinek spočívá ve vnesení alkylové skupiny na řetězec DNA vedoucí k poškození DNA a k buněčné smrti [230].

Nejvýznamnější skupinou cytostatik s alkylačním účinkem jsou platinová cytostatika. Prvním klinicky používaným platinovým cytostatikem byla cisplatina. Ta měla vynikající cytostatické účinky, ale zároveň i četné nežádoucí účinky. Od zavedení cisplatinu do klinické praxe bylo schváleno dalších 5 platinových cytostatik pro léčbu nádorových onemocnění, a to karboplatina, oxaliplatina, nedaplatina, heptaplatina a lobaplatina [230, 231].

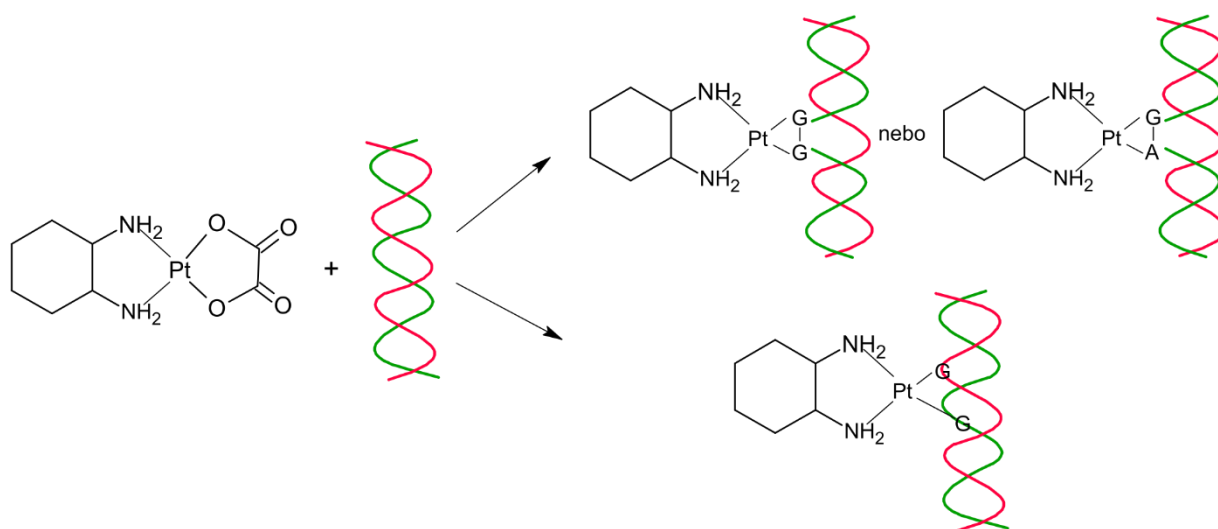
Oxaliplatina se běžně používá k léčbě rakoviny vaječníků, plic, tlustého střeva anebo konečníku [232-234]. Výhodou jejího použití oproti jejím analogům je zesílení jejího léčebného účinku při souběžném užívání dalších protirakovinových léčiv (např. 5-fluoruracilu anebo folinové kyseliny [235]). Další výhodou užívání oxaliplatinu je její menší škodlivost pro krvinky, mírnější vedlejší účinky na trávicí soustavu a skoro žádná zátěž pro ledviny [236].

Farmaceuticky stabilní vzorek oxaliplatinu pro „parenterální“ podání neobsahuje žádné další sloučeniny a neměl by obsahovat více než 2 % nečistot uvedených v lékopise [237]. Mezi tyto nečistoty patří kyselina šťavelová (nečistota A), diaquodiaminocyklohexanplatina (nečistota B), dihydroxyderivát (*R,R*)-oxaliplatinu (nečistota C), (*S,S*)-oxaliplatina (nečistota D) a dimer diaquodiaminocyklohexanplatinu (nečistota E) [238, 239].

Používání cytostatik pro léčbu rakoviny má však i svou stinnou stránku. V současnosti se začíná objevovat čím dál tím více důkazů o přítomnosti cytostatik (zvláště těch obsahujících platinu) v životním prostředí, kde negativně ovlivňují metabolické procesy a rozmnožování dalších žijících organismů (např.

ryb a řas) [240, 241]. Stejný efekt na životní prostředí mohou mít i platiny obsahující nečistoty oxaliplatinu, protože stejně jako oxaliplatina mohou interagovat s DNA (Obr. 20).

Pro důkaz a stanovení ultrastopových koncentrací nečistot oxaliplatinu a oxaliplatinu samotné v životním prostředí je nutné vyvinout analytické metody dosahující nízkých mezí detekce a stanovitelnosti. CE, jako separační technika, již byla v minulosti použita pro analýzu řady protirakovinových léčiv [242] a mód CE, MEKC, byl již použit pro analýzu kancerostatik na bázi platiny [243, 244]. Nízkých mezí detekce a stanovitelnosti je pro tuto techniku možné dosáhnout použitím online prekoncentrace tzv. „sweepingu“ a spojením CE s ICP-MS detektorem.



Obr. 20 Interakce oxaliplatinu s DNA. Ilustrace autora.

#### 4.2.2 Chemikálie a vzorky

Na přípravu roztoků separačních pufrů byly použity kyselina fosforečná a hydroxid sodný a jako aditivum byl použit dodecylsulfát sodný (SDS). Všechny tyto chemikálie byly od společnosti Sigma-Aldrich o čistotě p.a. Použitá deionizovaná voda 18,2 MΩ.cm byla přečištěna systémem Milli-Q-Reference od firmy Millipore (Molsheim, Francie).

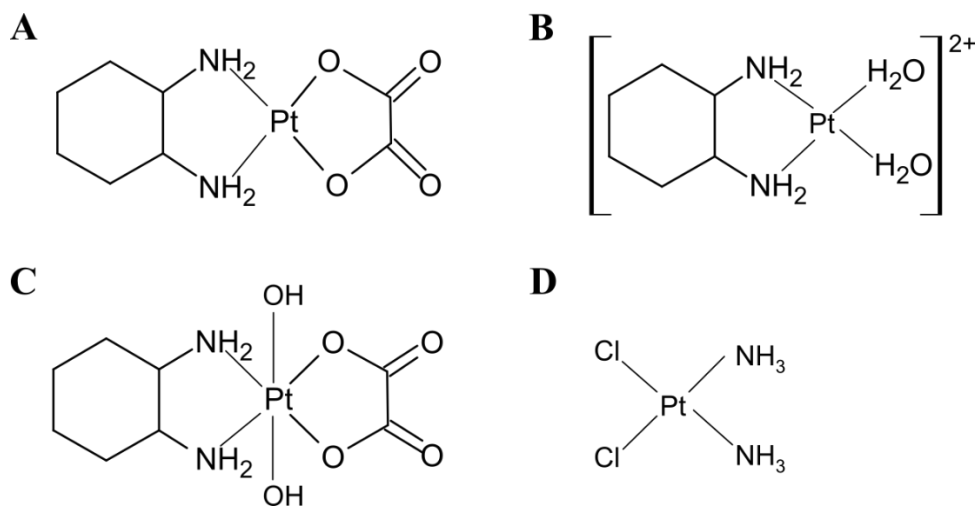
Na přípravu pomocné kapaliny pro ICP-MS byla použita kyselina 2-brompropionová a hydroxid amonný, obojí o čistotě p.a. od firmy Sigma-Aldrich.

Standardy: (*R,R*)-oxaliplatina, diaquodiaminocyklohexanplatina (nečistota B), dihydroxyderivát (*R,R*)-oxaliplatiny (nečistota C) a cisplatina všechny od firmy Sigma-Aldrich a Certipur® gold ICP Standard (1000 mg·l<sup>-1</sup>, 969 ± 5 mg·kg<sup>-1</sup>) od firmy Merck KGaA (Darmstadt, Německo).

### 4.2.3 Příprava roztoků separačních pufřů a standardů

Separací puřřy byly připraveny rozpuštěním odpovídajícího množství kyseliny v deionizované vodě a jejich následnou úpravou na odpovídající hodnotu pH titrací 50 % (m/m) hydroxidem sodným. Jako separační puřř byl použit fosfát/NaOH o koncentraci 25 mmol·l<sup>-1</sup> a pH 2,15. Do puřřu bylo následně přidáno SDS o požadované koncentraci.

Zásobní roztoky oxaliplatiny, její nečistoty B a C a cisplatiny byly připraveny jejich rozpuštěním v ultračisté vodě na požadovanou koncentraci 2 mg·ml<sup>-1</sup> v případě oxaliplatiny a jejích nečistot a na koncentraci 2 μg·ml<sup>-1</sup> v případě cisplatiny. Struktury oxaliplatiny, nečistoty B a C a cisplatiny jsou uvedeny na Obr. 21.



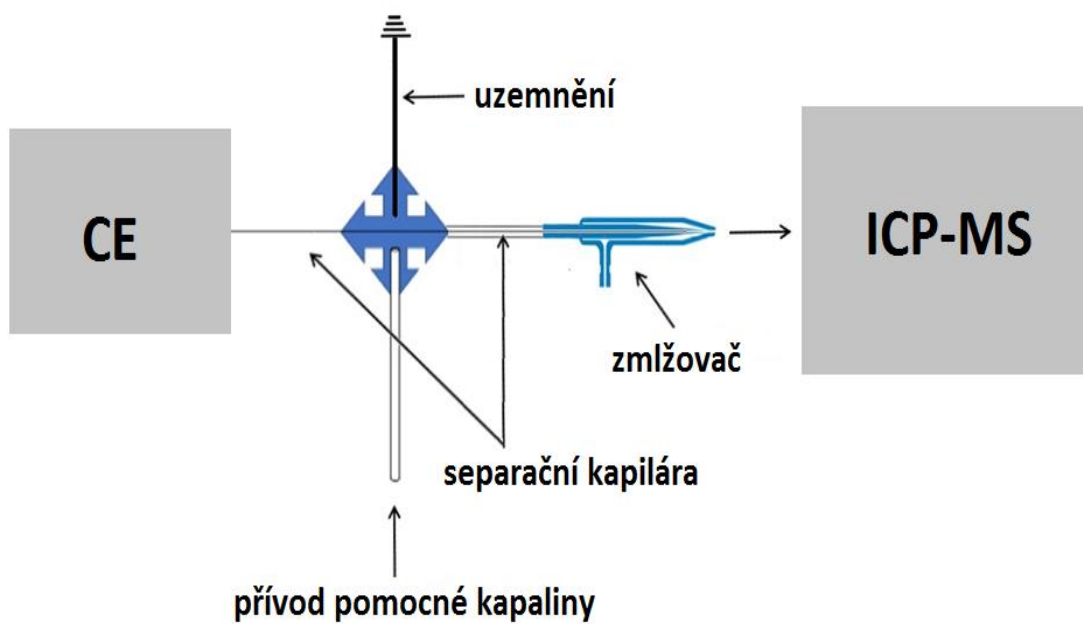
Obr. 21 Struktura (A) oxaliplatiny, (B) nečistoty B, (C) nečistoty C a (D) cisplatiny. Ilustrace autora.

#### 4.2.4 Instrumentace a experimentální podmínky

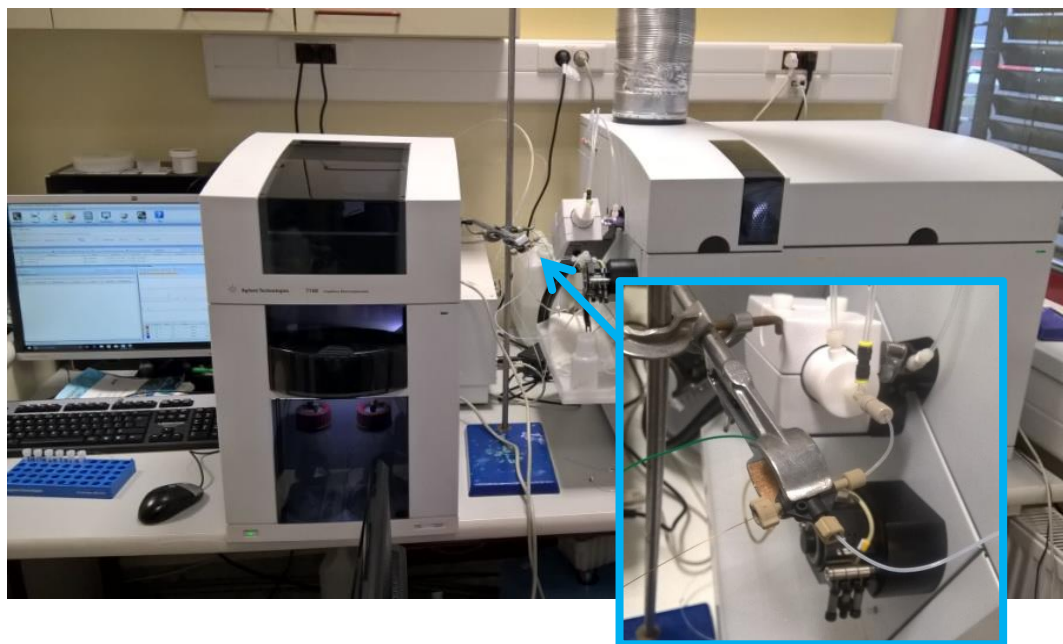
Všechny experimenty byly provedeny na přístroji CE7100 od firmy Agilent Technologies (Waldbronn, Německo) vybaveném DAD. Separace byly prováděny v křemenné kapiláře od firmy Molex (IL, USA) s vnitřním průměrem 50  $\mu\text{m}$  a o celkové délce 64,5 cm pro (MEKC-UV) a 56,0 cm pro (MEKC-ICP-MS) z důvodu zachování stejné efektivní délky 56 cm pro oba typy detekce. Všechny experimenty byly prováděny při teplotě 25  $^{\circ}\text{C}$  a ve třech opakováních, pokud není uvedeno jinak. Před prvním použitím byla kapilára promyta 20 minut 0,1  $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  NaOH, 20 minut deionizovanou vodou a 10 minut separačním pufrem. Mezi experimenty byla kapilára promývána vždy 2 minuty 0,1  $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  NaOH, 2 minuty vodou a 4 minuty separačním pufrem. Promývací tlak činil 935 mbar. Vzorky byly dávkovány tlakem 50 mbar po dobu 90 s. Napětí vkládané na kapiláru bylo v případě MEKC-UV -30 kV a generovalo proud 95  $\mu\text{A}$ . V případě MEKC-ICP-MS analýz se pracovalo za konstantního proudu 95  $\mu\text{A}$  s napětím pohybujícím se kolem -27 kV. Analyty byly v případě klasické MEKC-UV detekovány při 200 nm.

Dále byla kapilární elektroforéza CE7100 spojena s kvadrupólovým ICP-MS 7700x od firmy Agilent Technologies (Tokyo, Japan) pomocí CE-ICP-MS rozhraní vyvinutého na Katedře analytické chemie v Olomouci [245, 246]. CE-ICP-MS rozhraní se skládá ze dvou základních částí, a to z křížové spojky a zmlžovače ICP-MS přístroje. Křížová spojka je velmi důležitou součástí spojení a slouží (1) k uzemnění kapilární elektroforézy skrze zemnicí platinovou elektrodu, (2) ke kontinuálnímu přívodu pomocné kapaliny a (3) k nastavení správné pozice separační kapiláry tak, aby byla umístěna co nejbližší vstupu vnitřní kapiláry koncentrického zmlžovače „MicroMist“ s průtokovou rychlostí 50  $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$  (Obr. 22). V tomto uspořádání je efluent ze separační kapiláry mísen s pomocnou kapalinou těsně před vstupem do koncentrického zmlžovače, pomocí kterého je kapalný vzorek převáděn na jemný aerosol vhodný pro následnou ICP-MS analýzu. Před vlastními CE-ICP-MS analýzami byly optimalizovány ICP-MS parametry jako jsou například průtok Ar a pozice plazmové hlavičky, nastavení iontové optiky, kvadrupólového analyzátoru a detektoru. Optimalizace byla provedena za použití ladícího roztoku složeného z Li, Y, Ce a Tl o koncentraci 1  $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ . Optimální ICP-MS podmínky byly: příkon generátoru 1550 W, průtok vnějšího plazmového plynu 14,95  $\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ , průtok středního plazmového plynu 0,9  $\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ , průtok nosného plynu 0,85  $\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$  a průtok přídavného plynu 0,20  $\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ . Integrační čas byl 300 ms pro  $^{194}\text{Pt}$  a  $^{195}\text{Pt}$  a 100 ms pro  $^{197}\text{Au}$ . Izotop  $^{195}\text{Pt}$  byl použit pro všechny kvantitativní výpočty, protože poskytoval větší poměr signálu k šumu ve srovnání s  $^{194}\text{Pt}$  (vyšší přirozené zastoupení izotopu  $^{195}\text{Pt}$ ). Kontinuální monitorování izotopu  $^{197}\text{Au}$  bylo důležité pro sledování stability přivádění pomocné kapaliny, ale i plazmového výboje. Pomocná kapalina byla pro všechny analýzy složená z 800  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  2-brompropionové kyseliny titrované  $\text{NH}_4\text{OH}$  na pH 2,45 a s přídavkem 50  $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$  Au.

A



B



Obr. 22 Schéma CE-ICP-MS rozhraní

## 4.2.5 Výsledky a diskuze

### 4.2.5.1 Vývoj metody

#### **Sweeping-MEKC-UV**

Jelikož jsou oxaliplatin a nečistota C nenabité koordinační komplexy platiny, musel být pro jejich separaci použit MEKC mód. Již byly publikovány studie, které se zabývaly separací kancerostatik na bázi platiny pomocí MEKC s SDS jako surfaktantem, proto jsme i v naší práci vycházeli z použití SDS jako surfaktantu. S ohledem na MEKC mód a následný prekoncentrační krok „sweeping“, bylo potřeba zvolit jako separační elektrolyt pufr o nízkém pH, při kterém je v kapiláře zanedbatelný elektroosmotický tok. Jako pufr byl tedy zvolen fosfát sodný o nízkém pH (kyselina fosforečná;  $pK_1 = 2,12$ ;  $pK_2 = 7,21$  a  $pK_3 = 12,67$ ).

- **pH a koncentrace pufru**

Jako první byl testován vliv pufru (pH a koncentrace fosfátu sodného) na separaci oxaliplatin, nečistoty B a nečistoty C. Testované hodnoty pH 25 mmol·l<sup>-1</sup> fosfátu sodného byly: 2,15; 2,40; 2,55; 2,70; 2,85 a 3,00 a následně testované koncentrace fosfátu sodného o pH 2,15 byly: 25, 40, 55, 70, 85 a 100 mmol·l<sup>-1</sup>. Všechny testované elektrolyty vždy obsahovaly přídavek 80 mmol·l<sup>-1</sup> SDS. Oba testované parametry, jak pH, tak koncentrace, měly minimální vliv na intenzitu signálů a separaci analytů. Ve všech studovaných elektrolytech bylo dosaženo separace analytů na základní linii. Výsledná koncentrace fosfátu sodného byla tedy zvolena na základě proudu procházejícího kapilárou. Při koncentracích fosfátu sodného 40 mmol·l<sup>-1</sup> a více přesahovaly hodnoty proudu v kapiláře 100 μA, a to by mohlo vést k horší opakovatelnosti analýz. Proto byla jako vhodná koncentrace pufru vybrána 25 mmol·l<sup>-1</sup>, při které proud v kapiláře nepřesahoval 100 μA. Hodnota pH byla vybrána na základě rychlosti analýzy. Při pH 2,15 byla analýza nejrychlejší.

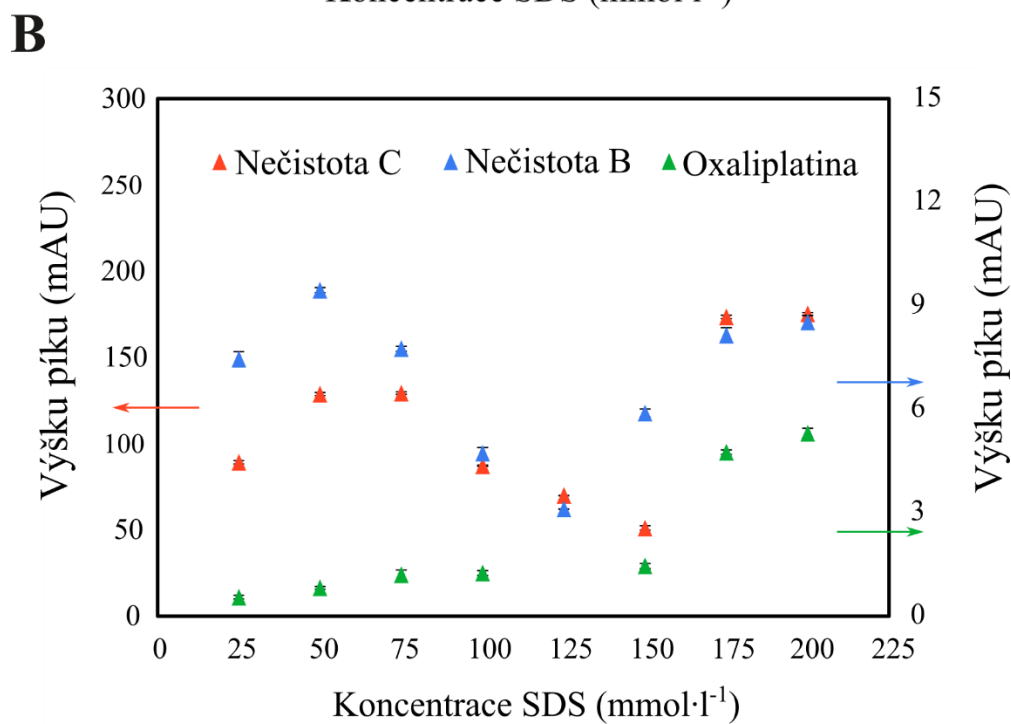
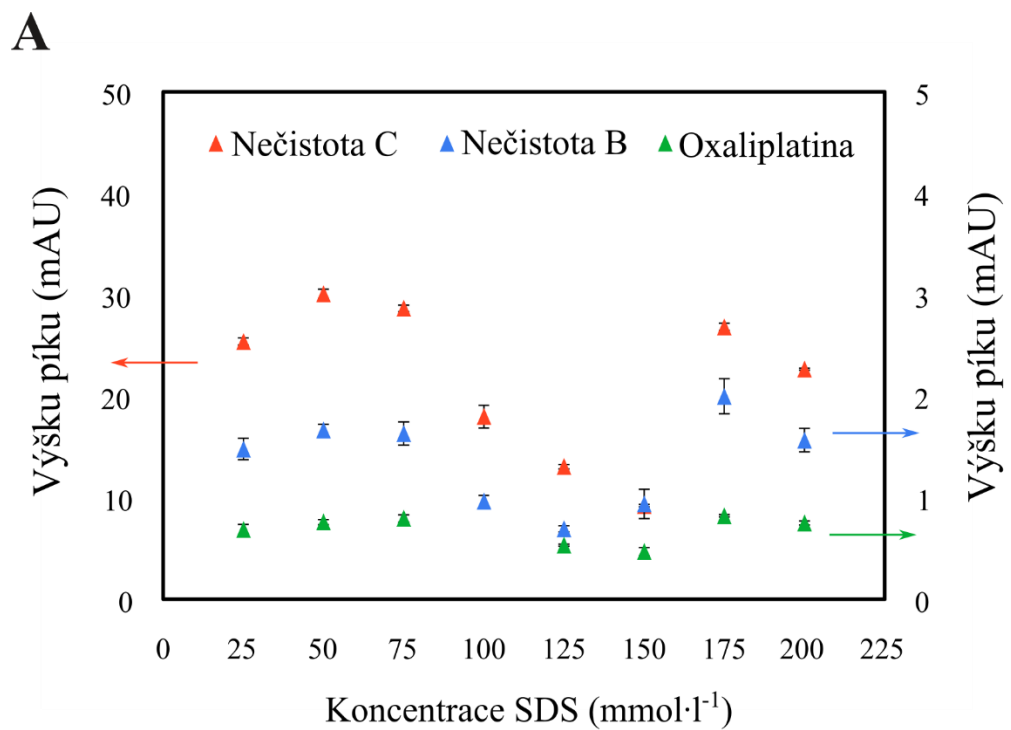
- **Koncentrace SDS**

Kritickým parametrem, který ovlivňuje, jak samotnou separaci analytů, tak jejich následnou prekoncentraci, je koncentrace SDS. Na optimalizaci koncentrace SDS byl tedy kladen velký důraz. Vliv koncentrace SDS na separaci a prekoncentraci analytů byl testován pro dvě různé doby dávkování: 10 a 60 s a v rozmezí koncentrací od 25 do 200 mmol·l<sup>-1</sup> SDS. Na Obr. 23 A, B znázorňujících závislosti

výšek signálů analytů na koncentraci SDS jsou jasně viditelné dvě oblasti s rozdílnou výškou píků. Jedna oblast je od 25 do 125 mmol·l<sup>-1</sup> a druhá od 125 do 200 mmol·l<sup>-1</sup>.

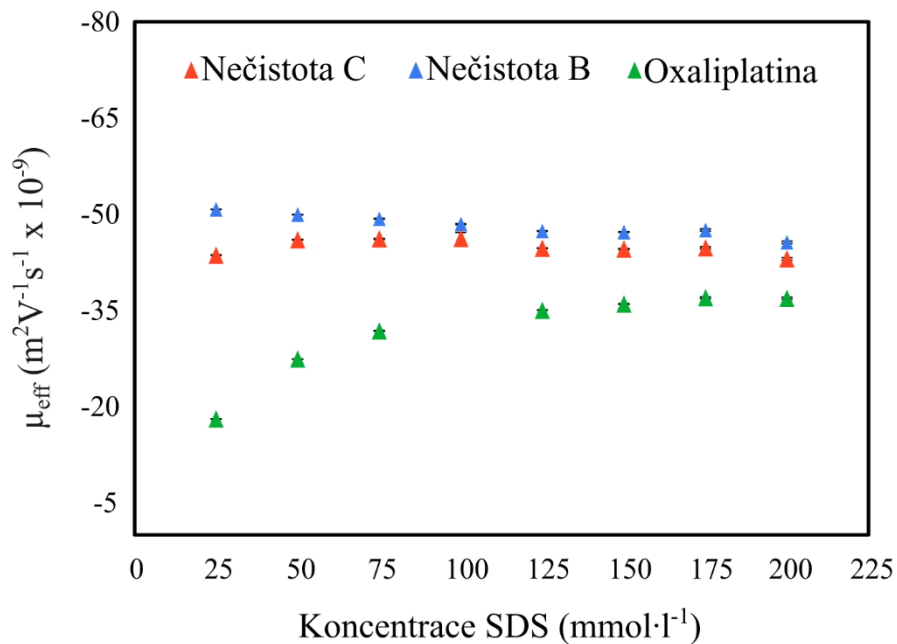
Na Obr. 24 je pak dále vyobrazena závislost efektivní mobility analytů na koncentraci SDS. Se zvyšující se koncentrací SDS roste „aniontová“ efektivní mobilita oxaliplatinu, a to z důvodu silnější interakce mezi micelami a oxaliplatinou. Pro nečistotu C se její „aniontová“ efektivní mobilita zvyšuje od koncentrace 25 do 100 mmol·l<sup>-1</sup> SDS a od koncentrace 125 mmol·l<sup>-1</sup> a vyšší se její mobilita nepatrně snižuje. V porovnání s nečistotou C a oxaliplatinou se efektivní mobilita nečistoty B pořád nepatrně snižovala. Z dosažených výsledků se dá usuzovat, že od koncentrace 125 mmol·l<sup>-1</sup> SDS dochází ke změně struktury micel (např. ze sférických na elipsoidní) a/nebo ke změně samotné interakce. Výsledky také poukazují na to, že interakce mezi negativně nabitými micelami a pozitivně nabitou nečistotou B jsou čistě povrchově-elektrostatického charakteru a nečistota B tedy nevstupuje do dutiny micel.

Na základě dosažených výsledků byla zvolena koncentrace 175 mmol·l<sup>-1</sup> SDS jako nejlepší. Při použití 200 mmol·l<sup>-1</sup> SDS bylo sice dosaženo lepší prekoncentrace analytů, ale hodnoty proudu v kapiláře se pohybovaly nad 100 μA, což může vést k tvorbě nežádoucího nadměrného tepla v kapiláře. I když i při použití 175 mmol·l<sup>-1</sup> SDS dosahovaly hodnoty proudu v kapiláře ke 100 μA, z grafu Ohmova zákona na Obr. 25 můžeme vidět, že nedocházelo k nadměrnému zahřívání v kapiláře.

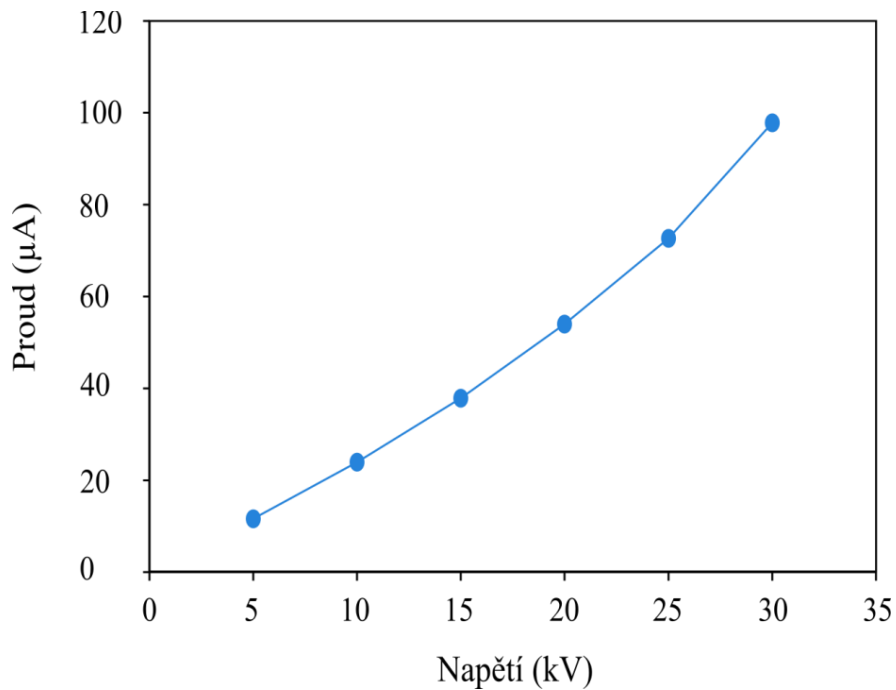


Obr. 23 Efekt koncentrace SDS na výšku píků nečistot B, C a oxaliplatiny s dobou dávkování 10 s (A) a 60 s (B) tlakem 50 mbar. BGE: 25 mmol·l<sup>-1</sup> fosfát sodný pH 2,15. Koncentrace pro nečistotu B, C a oxaliplatinu byly 0,05; 0,1 a 0,01 mg·ml<sup>-1</sup>.





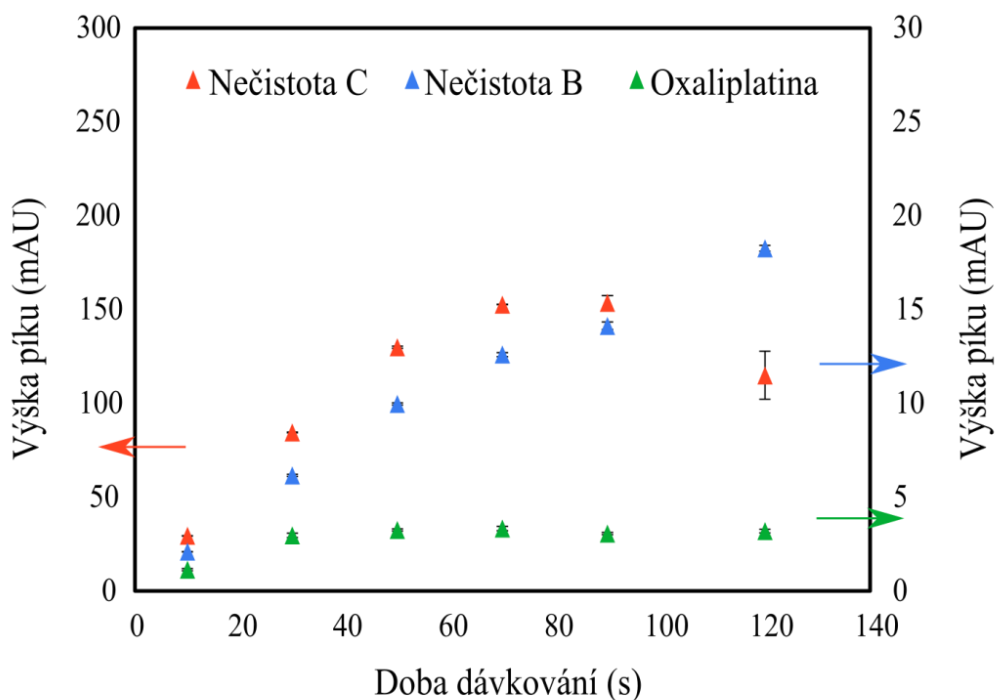
Obr. 24 Efekt koncentrace SDS na mobilitu nečistot B, C a oxaliplatiny, doba dávkování 10 s tlakem 50 mbar. BGE: 25 mmol·l<sup>-1</sup> fosfát sodný pH 2,15. Koncentrace pro nečistotu B, C a oxaliplatinu byly 0,05; 0,1 a 0,01 mg·ml<sup>-1</sup>.



Obr. 25 Graf Ohmova zákona, BGE: 25 mmol·l<sup>-1</sup> fosfát sodný pH 2,15 s 175 mmol·l<sup>-1</sup> SDS, negativní polarita.

- **Doba dávkování**

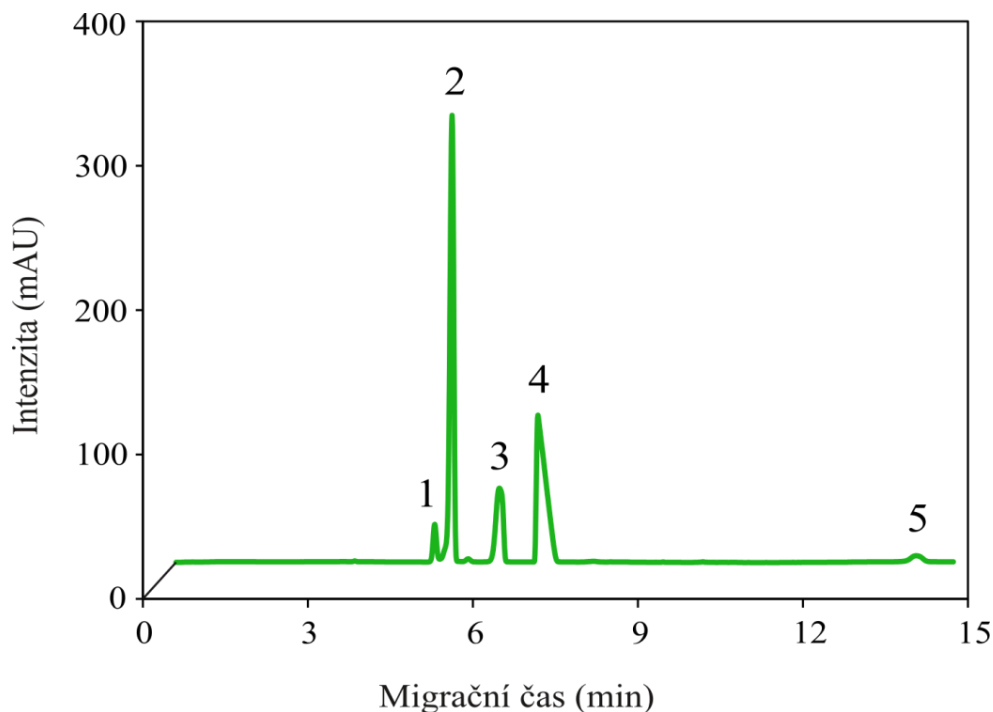
Posledním kritickým parametrem pro online prekoncentraci („sweeping“) byla optimalizace doby dávkování. Byl testován vliv doby dávkování od 10 do 120 s na výšku píků analytů (Obr. 26). Výška píků se zvyšovala od 10 do 90 s (50 mbar) pro všechny analyty. S časem delším než 90 s se píky oxaliplatinu a nečistoty C začaly zmenšovat, proto byl čas dávkování 90 s (50 mbar) vybrán jako optimální.



Obr. 26 Efekt doby dávkování na výšku píků nečistoty B, C a oxaliplatinu, BGE: 25 mmol·l<sup>-1</sup> fosfát sodný pH 2,15 s 175 mmol·l<sup>-1</sup> SDS. Koncentrace pro nečistotu B, C a oxaliplatinu byly 0,05; 0,1 a 0,01 mg·ml<sup>-1</sup>.

Elektroferogram separace oxaliplatinu a nečistot B a C za finálních podmínek: 25 mmol·l<sup>-1</sup> fosfát sodný pH 2,15 s 175 mmol·l<sup>-1</sup> SDS a dobou dávkování 90 s je na Obr. 27. K obrázku je třeba poznamenat, že na něm vidíme pět signálů: cisplatinu jako vnitřní standard („*Internal standard*“, IS), oxaliplatinu, nečistotu B, nečistotu C a 4-methylbenzensulfonát (4-MBS), který je přítomný ve standardu nečistoty B k její neutralizaci. 4-MBS má ve své struktuře benzenové jádro, takže je dobře viditelný v UV/Vis oblasti

a může být při nižších koncentracích ve vzorcích mylně považován za nečistotu B, jelikož má oproti ní vyšší molární absorpční koeficient.



Obr. 27 Sweeping-MEKC-UV separace oxaliplatiny a nečistot B a C, BGE: 25 mmol·l<sup>-1</sup> fosfát sodný pH 2,15 s 175 mmol·l<sup>-1</sup> SDS, napětí 30 kV negativní polarita, detekce 200 nm, doba dávkování 90 s (50 mbar). Koncentrace oxaliplatiny a nečistoty B a C byla 0,1 mg·ml<sup>-1</sup>. Popis píků: (1) nečistota B, (2) nečistota C, (3) oxaliplatina, (4) 4-methylbenzensulfonát a (5) cisplatina.

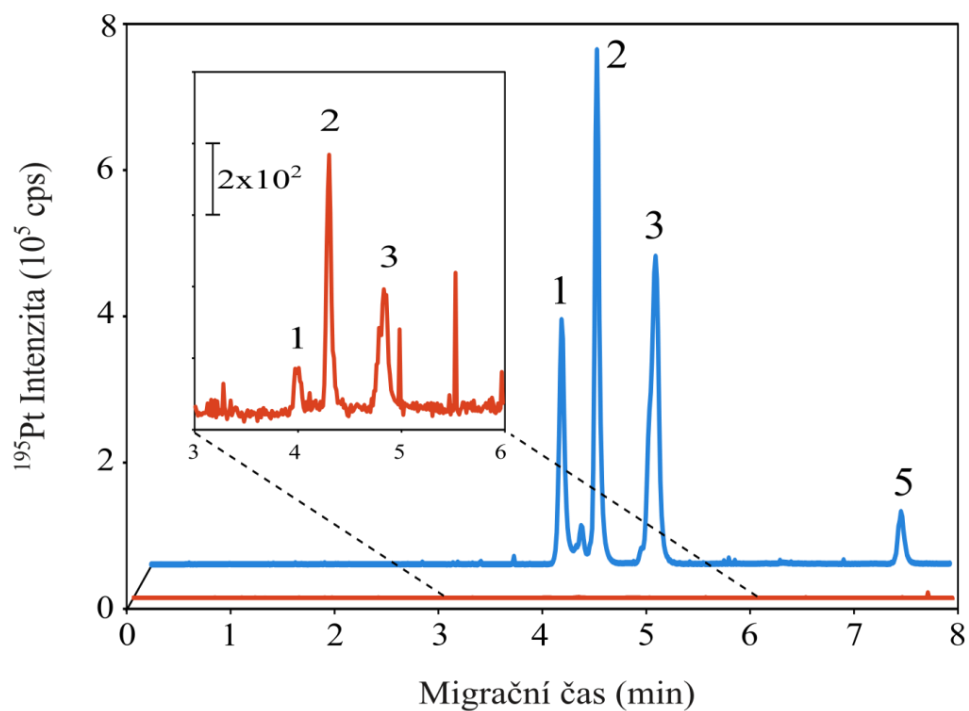
### Sweeping-MEKC-ICP-MS

Po vývoji a optimalizaci sweeping-MEKC-UV metody byla separační metoda použita pro sweeping-MEKC-ICP-MS. Jako první bylo nutné optimalizovat složení pomocné kapaliny. V návaznosti na předešlé práce [245, 246] byly jako pomocná kapalina prvně zkušeny tyto pufr: 25 mmol·l<sup>-1</sup> fosfát sodný bez SDS a tento pufr 10x a 20x zředěný. Při jejich použití však docházelo k nestabilitě elektrického proudu. Proto byl dále použit jako pomocná kapalina samotný separační pufr (25 mmol·l<sup>-1</sup> fosfát sodný pH 2,15 s 175 mmol·l<sup>-1</sup> SDS). Použití tohoto pufru vedlo ke stabilnímu el. proudu, ale po pár analýzách došlo k ucpání zmlžovače. Dalším krokem bylo použít jako pomocnou

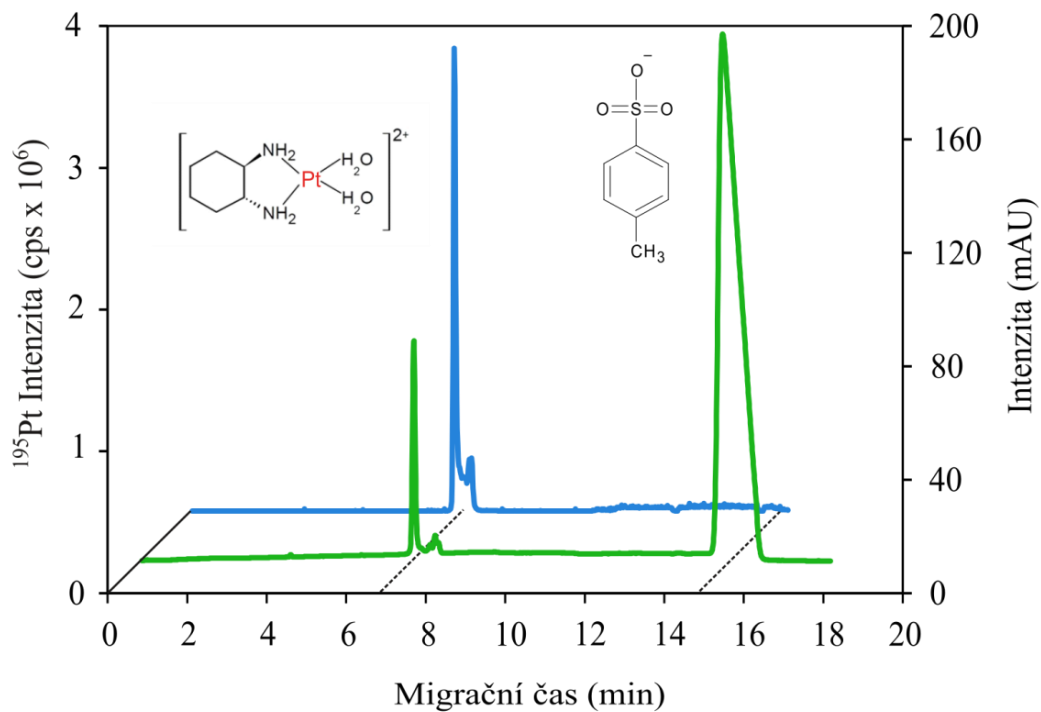
kapalinu takový elektrolyt, který bude mít stejnou iontovou sílu jako separační pufr. Jelikož by samotný fosfát sodný bez SDS musel mít koncentraci  $300 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ , aby měl stejnou iontovou sílu jako separační pufr, což není vhodné kvůli jeho vysoké vodivosti, nebyl tento elektrolyt použit. Dále byl vyzkoušen  $190 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  chlorid sodný. Takto vysoká koncentrace chloridu sodného však také není vhodná pro dlouhodobější použití z důvodu postupného zanášení kónusů ICP-MS a ucpávání zmlžovače. Následovalo tedy použití roztoku ( $20\text{--}200 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) kyseliny dusičné vytitrované hydroxidem amonným na pH 2,45 (přídavek  $175 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  SDS zvýší pH fosfátu sodného z 2,15 na 2,45). Ani při použití této pomocné kapaliny však nebylo dosaženo stabilního el. proudu. Jako poslední byla vyzkoušena  $800 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  2-brompropionová kyselina (tato kyselina má podobné hodnoty pK a hustotu jako kyselina fosforečná) vytitrovaná hydroxidem amonným na pH 2,45. Za použití této pomocné kapaliny byly konečně získány reprodukovatelné analýzy se stabilním elektrickým proudem. Nakonec bylo ještě ověřeno, že hodnota koncentrace 2-brompropionové kyseliny vypočítaná pomocí PeakMasteru [247] je ta správná. Byla otestována série elektrolytů v rozsahu koncentrací od  $400 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  do  $1000 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  a bylo potvrzeno, že koncentrace  $800 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  je skutečně ta nejvhodnější. Finální složení pomocné kapaliny tedy bylo  $800 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  kyselina 2-brompropionová vytitrovaná na pH 2,45 s přídavkem  $50 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$  Au. Au v našem případě sloužilo jako vnitřní standard pro monitorování stability přívodu pomocné kapaliny a stability CE-ICP-MS rozhraní.

Všechny parametry (pH a koncentrace pufru, koncentrace SDS a doba dávkování) optimalizované pro sweeping-MEKC-UV zůstaly stejné i v případě sweeping-MEKC-ICP-MS. Jediným rozdílem bylo, že sweeping-MEKC-UV probíhal za konstantního napětí, zatímco sweeping-MEKC-ICP-MS za konstantního proudu ( $95 \mu\text{A}$ , negativní polarita), a to z důvodu lepší reprodukovatelnosti analýz.

Separaci oxaliplatiny a nečistot B a C pomocí sweeping-MEKC-ICP-MS za finálních podmínek můžeme vidět na Obr. 28., oproti Obr. 27 zde můžeme pozorovat detekci pouze čtyř píků a to proto, že molekula stabilizačního aniontu 4-MBS neobsahuje ve své struktuře atom Pt. ICP-MS nám tedy jako prvkově specifický detektor pomohl identifikovat sloučeniny obsahující platinu. Pro lepší pochopení jsou na Obr. 29 záznamy analýz standardu nečistoty B pomocí sweeping-MEKC-UV a sweeping-MEKC-ICP-MS.



Obr. 28 Sweeping-MEKC-ICP-MS separace oxaliplatinu a nečistot B a C, BGE: 25 mM fosfát sodný pH 2,15 s  $175 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  SDS, proud  $95 \mu\text{A}$  negativní polarita, doba dávkování 90 s (50 mbar). Koncentrace oxaliplatinu a nečistoty B a C byla  $10 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$  (červená) a  $1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  (modrá). Popis píků: (1) nečistota B, (2) nečistota C, (3) oxaliplatina a (5) cisplatina.



Obr. 29 Srovnání analýz standardu nečistoty B pomocí sweeping-MEKC-UV (zelená) koncentrace  $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  a sweeping-MEKC-ICP-MS (modrá) koncentrace  $50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . BGE:  $25 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  fosfát sodný pH 2,15 s  $175 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  SDS, doba dávkování 90 s (50 mbar).

## 4.2.6 Validace

### 4.2.6.1 Sweeping-MEKC-UV

Po vývoji a optimalizaci sweeping-MEKC-UV metody následovala její validace. Mezi posuzované validační parametry patřila: linearita, mez detekce („*limit of detection*“, LOD), mez stanovitelnosti („*limit of quantification*“, LOQ), pravdivost, preciznost a reprodukovatelnost migračních časů.

Linearita byla testovaná změřením kalibračních standardů v koncentračním rozsahu 2,5–150  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  pro nečistotu B, 1–500  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  pro nečistotu C a 5–2000  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  pro oxaliplatinu (Obr. 30 A) a výpočtem koeficientů determinace lineární regrese. Meze detekce a stanovitelnosti byly spočítány podle ICH Q2 (R1) použitím následujících rovnic:  $\text{LOD} = 3,3\text{SD}/s$  a  $\text{LOQ} = 10\text{SD}/s$ , kde  $\text{SD}$  je směrodatná odchylka intenzity signálu a  $s$  je směrnice kalibrační křivky. Pravdivost a preciznost byly testovány analýzou modelových vzorků obsahujících všechny analyty současně na 3 koncentračních hladinách (25, 50 a 126  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  pro nečistotu B a 10, 50 a 250  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  pro nečistotu C a oxaliplatinu). Reprodukovatelnost migračních časů byla spočítána z opakovaných analýz série kalibračních standardů.

Všechny kalibrační závislosti byly lineární s koeficienty determinace větší než 0,9966 a s lineárními dynamickými rozsahy většími než 3 řády. Pro nečistotu C byly dosaženy meze detekce a stanovitelnosti 0,2 a 0,8  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Pravdivost (vyjádřená jako výtěžnost v %) a preciznost (opakovatelnost, vyjádřená jako směrodatná odchylka v %) byly v rozsahu 104–117 %, 1–3 % pro nečistotu C, 82–108 %, 6–15 % pro nečistotu B a 98–110 %, 1–2 % pro oxaliplatinu. Reprodukovatelnost normalizovaných migračních časů byla pro všechny analyty nižší než 2 %. Kompletní výsledky validace metody jsou shrnuty v Tab. 9.

Tab. 9 Výsledky validace metody sweeping-MEKC-UV

Parametr	Nečistota B	Nečistota C	Oxaliplatina
Kalibrační rozsah ( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ )	2,5–150	1–500	5–2000
Koeficient determinace	0,9966	0,9998	0,9994
LOD ( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ )	1,5	0,2	1,4
LOQ ( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ )	5,1	0,8	4,5
Pravdivost (%)	H <sub>1</sub> : 82 H <sub>2</sub> : 102 H <sub>3</sub> : 108	H <sub>1</sub> : 113 H <sub>2</sub> : 117 H <sub>3</sub> : 104	H <sub>1</sub> : 110 H <sub>2</sub> : 98 H <sub>3</sub> : 104
Preciznost (%)	H <sub>1</sub> : 15 H <sub>2</sub> : 6 H <sub>3</sub> : 12	H <sub>1</sub> : 1 H <sub>2</sub> : 1 H <sub>3</sub> : 3	H <sub>1</sub> : 2 H <sub>2</sub> : 1 H <sub>3</sub> : 1
Reprodukovatelnost migračních časů (%)	1 %	1 %	2 %

Nečistota B: Hladina 1 (H<sub>1</sub>) – 25  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ , Hladina 2 (H<sub>2</sub>) – 50  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ , Hladina 3 (H<sub>3</sub>) – 126  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$

Nečistota C: Hladina 1 (H<sub>1</sub>) – 10  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ , Hladina 2 (H<sub>2</sub>) – 50  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ , Hladina 3 (H<sub>3</sub>) – 250  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$

Oxaliplatina: Hladina 1 (H<sub>1</sub>) – 10  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ , Hladina 2 (H<sub>2</sub>) – 50  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ , Hladina 3 (H<sub>3</sub>) – 250  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$

#### 4.2.6.2 Sweeping-MEKC-ICP-MS validace

Tak jako metoda sweeping-MEKC-UV, tak i metoda sweeping-MEKC-ICP-MS byla úspěšně zvalidovaná. Validační parametry jsou shrnuty v Tab. 10. Linearita byla testovaná změřením kalibračních standardů v koncentračním rozsahu 0,025–251  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  pro nečistotu B; 0,001–500  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  pro nečistotu C a 0,01–1000  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  pro oxaliplatinu (Obr. 30 B) a určením koeficientů determinace. Meze detekce a stanovitelnosti byly spočítány podle ICH Q2 (R1) použitím následujících rovnic:  $\text{LOD} = 3,3\text{SD}/s$  a  $\text{LOQ} = 10\text{SD}/s$ , kde  $\text{SD}$  je směrodatná odchylka intenzity signálu a  $s$  je sklon kalibrační křivky. Správnost a přesnost byla testovaná analýzou modelových vzorků na 4 koncentračních hladinách rozprostřených napříč celým lineárním dynamickým rozsahem (0,13; 2,5; 50 a 126  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  pro nečistotu B, 0,1; 5; 100 a 250  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  pro nečistotu C a 0,25; 5; 100 a 250  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  pro oxaliplatinu). Reprodukovatelnost migračních časů byla spočítána z opakovaných analýz série kalibračních standardů.



Všechny kalibrační závislosti byly lineární s koeficienty determinace většími než 0,9989 a s lineárními dynamickými rozsahy většími než 5 řádů. Pro nečistotu C byly dosaženy meze detekce a stanovitelnosti 1 ng·ml<sup>-1</sup> (98 femtogramů v nadávkované zóně) a 3 ng·ml<sup>-1</sup> (293 femtogramů v nadávkované zóně). LOD nečistoty C odpovídá 227 attomolům Pt v nadávkované zóně. Pravdivost (vyjádřená jako výtěžnost v %) a preciznost (opakovatelnost, vyjádřená jako směrodatná odchylka v %) byly v rozsahu 94–107 %, 3–8 % pro nečistotu C, 76–95 %, 10–19 % pro nečistotu B a 104–116 %, 2–7 % pro oxaliplatinu. Reprodukovatelnost normalizovaných migračních časů byla pro všechny analyty menší než 5 %. Obecně validační data pro nečistotu B byly mírně horší a dávaly větší odchylky než v případě nečistoty C a oxaliplatinu. To mohlo být způsobeno rozdílnými interakcemi micel s nečistotou B a z toho vyplývající rozdílný prekoncentrační efekt oproti oxaliplatině a nečistotě C. Nicméně i v tomto případě jsou všechna data plně přijatelná z pohledu ultrastopových analýz. Validovaná metoda tedy může být použita pro rutinní analýzy.

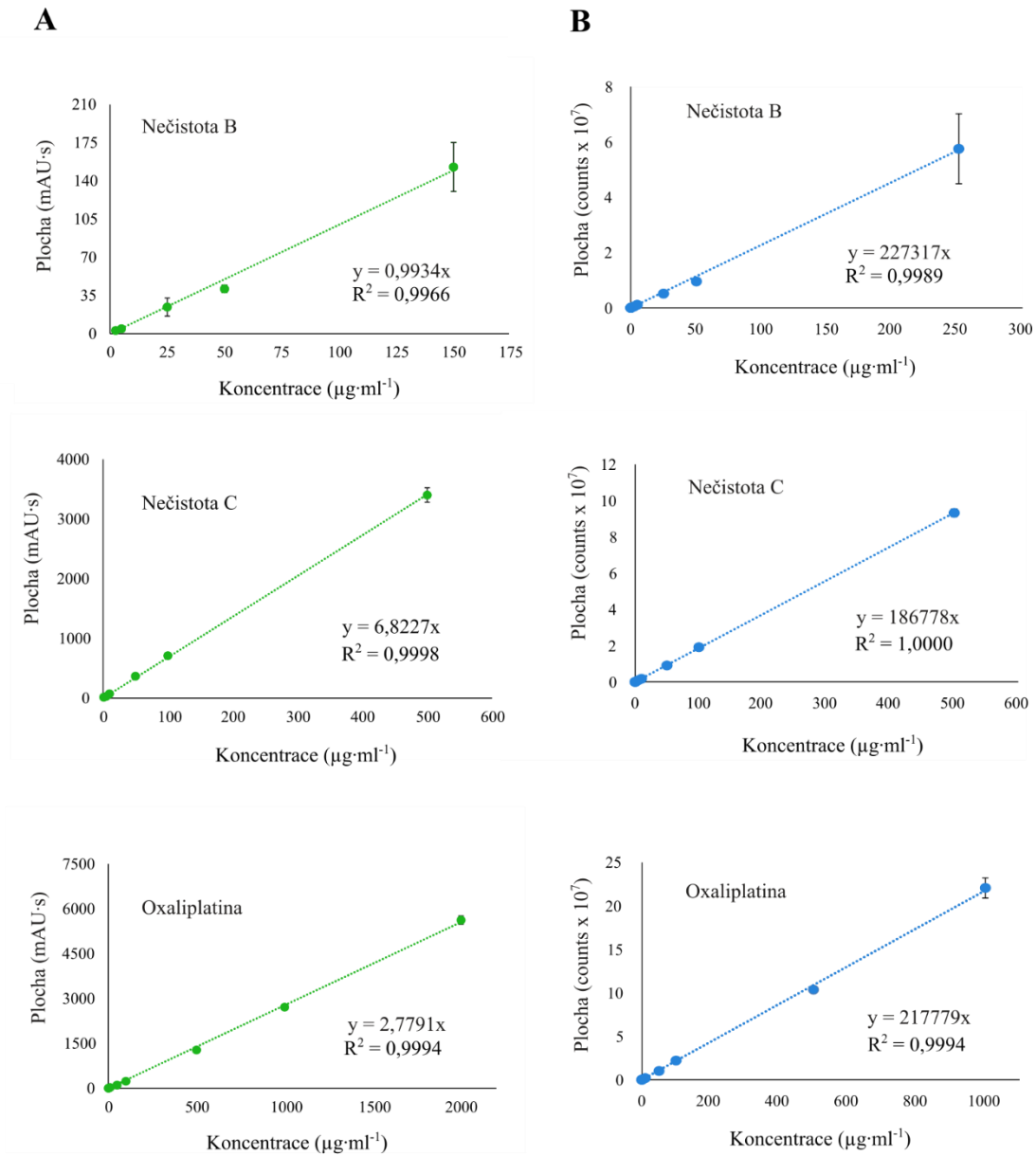
Tab. 10 Výsledky validace metody sweeping-MEKC-ICP-MS

Parametr	Nečistota B	Nečistota C	Oxaliplatina
Kalibrační rozsah (μg·ml <sup>-1</sup> )	0,025–251	0,001–500	0,01–1000
Koeficient determinace	0,9989	1,0000	0,9994
LOD (ng·ml <sup>-1</sup> )	2	1	3
LOQ (ng·ml <sup>-1</sup> )	7	3	9
Pravdivost (%)	H <sub>1</sub> : 76 H <sub>2</sub> : 81 H <sub>3</sub> : 95 H <sub>4</sub> : 82	H <sub>1</sub> : 97 H <sub>2</sub> : 107 H <sub>3</sub> : 94 H <sub>4</sub> : 115	H <sub>1</sub> : 104 H <sub>2</sub> : 116 H <sub>3</sub> : 106 H <sub>4</sub> : 109
Preciznost (%)	H <sub>1</sub> : 16 H <sub>2</sub> : 10 H <sub>3</sub> : 19 H <sub>4</sub> : 12	H <sub>1</sub> : 3 H <sub>2</sub> : 4 H <sub>3</sub> : 5 H <sub>4</sub> : 8	H <sub>1</sub> : 2 H <sub>2</sub> : 4 H <sub>3</sub> : 6 H <sub>4</sub> : 7
Reprodukovatelnost migračních časů (%)	3 %	5 %	4 %

Nečistota B: H<sub>1</sub> – 125,6 ng·ml<sup>-1</sup>, H<sub>2</sub> – 2,5 μg·ml<sup>-1</sup>, H<sub>3</sub> – 50 μg·ml<sup>-1</sup>, H<sub>4</sub> – 126 μg·ml<sup>-1</sup>

Nečistota C: H<sub>1</sub> – 100 ng·ml<sup>-1</sup>, H<sub>2</sub> – 5 μg·ml<sup>-1</sup>, H<sub>3</sub> – 100 μg·ml<sup>-1</sup>, H<sub>4</sub> – 250 μg·ml<sup>-1</sup>

Oxaliplatina: H<sub>1</sub> – 250 ng·ml<sup>-1</sup>, H<sub>2</sub> – 5 μg·ml<sup>-1</sup>, H<sub>3</sub> – 100 μg·ml<sup>-1</sup>, H<sub>4</sub> – 250 μg·ml<sup>-1</sup>



Obr. 30 Kalibrační křivky pro metody sweeping-MEKC-UV (A) a sweeping-MEKC-ICP-MS (B), BGE: 25 mmol·l<sup>-1</sup> fosfát sodný pH 2,15 s 175 mmol·l<sup>-1</sup> SDS, doba dávkování 90 s (50 mbar).

#### 4.2.6.3 Porovnání metod sweeping-MEKC-UV a sweeping-MEKC-ICP-MS

Obě zvalidované metody využívají „sweeping“ pro prekoncentraci analytů, ale liší se typem detekčního systému (UV vs. ICP-MS). První důležitou výhodou ICP-MS jako detektoru je jeho prvkově/izotopická specifita. V této práci je pomocí ICP-MS správně určena nečistota B, která může být chybně identifikována použitím UV detekce. Další výhodou použití ICP-MS jako detektoru je dosahování velmi nízkých mezí detekce, především pro sloučeniny obsahující kovy. Ve srovnání se sweeping-MEKC-UV bylo dosaženo 750-, 200- a 400-krát nižších mezí detekce pro nečistotu B, C a oxaliplatinu a ve srovnání s metodou MEKC-UV, která nepoužívá žádný prekoncentrační krok, jsou to 3500-, 1700- a 2100-krát nižší meze detekce. V neposlední řadě jsou výhodou ICP-MS detekce oproti UV detekci široké lineární dynamické rozsahy. V práci byly pro sweeping-MEKC-ICP-MS analýzy lineární dynamické rozsahy větší než 5 řádů a pro sweeping-MEKC-UV analýzy jenom 3 řády.

#### 4.2.7 Kvantitativní analýza modelových roztoků

Na závěr byla zvalidovaná sweeping-MEKC-ICP-MS metoda použita pro analýzu 3 reálných vzorků oxaliplatinu: oxaliplatinu o koncentraci  $1\ 000\ \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ , oxaliplatinu o koncentraci  $1\ 000\ \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  s přídavkem 0,06 % nečistoty B a 0,1 % nečistoty C a oxaliplatinu o koncentraci  $1\ 000\ \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  s přídavkem 0,6 % nečistoty B a 1,0 % nečistoty C (Obr. 31). Všechny vzorky byly změřeny 3x a výsledky byly vyjádřeny jako průměr  $\pm$  SD.

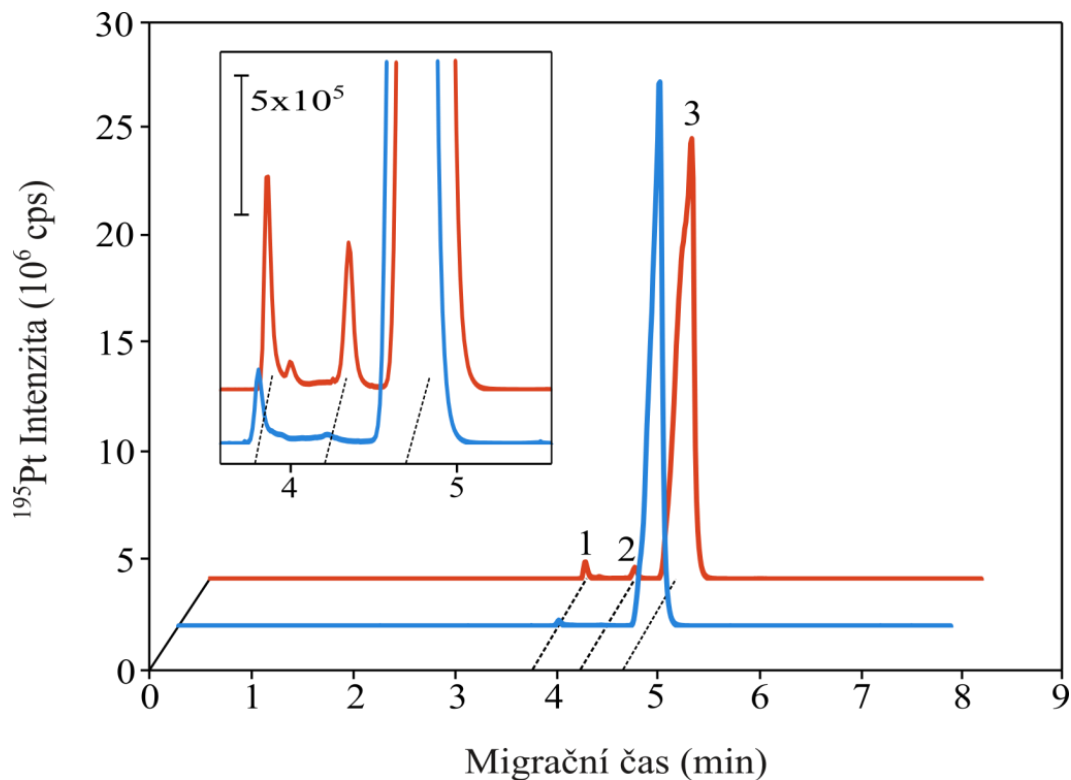
Průměrná koncentrace oxaliplatinu ve vzorcích byla  $1\ 097 \pm 75\ \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Nečistota B byla detekována jako hlavní nečistota ve vzorku oxaliplatinu (Tab. 11). Správnost stanovení obsahu nečistot ve vzorcích oxaliplatinu se pohybovala v rozmezí 100–114 %.

Sweeping-MEKC-ICP-MS nám umožňuje stanovit oxaliplatinu a její nečistoty od 0,0003 % ve vzorku, což dělá tuto metodu velmi vhodnou pro kontrolu kvality farmaceutických přípravků. Dále může být tato metoda použita pro stanovení ultrastopových koncentrací oxaliplatinu a jejích nečistot v omezeném množství vzorku, což vede ke snížení množství/ceny vzorku pro analýzu a k minimalizaci vzniklých odpadů.

Tab. 11 Výsledky kvantitativní analýzy modelových roztoků oxaliplatin (n=3)

Vzorek	Koncentrace ( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ )		
	Nečistota B	Nečistota C	Oxaliplatina
Oxaliplatina	$6 \pm 1$	nedetekovaná	$1\,012 \pm 53$
Oxaliplatina + 0,06 % nečistoty B + 0,1 % nečistoty C	$6 \pm 2$	$1,0 \pm 0,1$	$1\,124 \pm 68$
Oxaliplatina + 0,6 % nečistoty B + 1,0 % nečistoty C	$12 \pm 3$	$11 \pm 1$	$1\,155 \pm 104$

Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr  $\pm$  SD



Obr. 31 Sweeping-MEKC-ICP-MS analýza reálného vzorku oxaliplatin:  $1\text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  (modrá) a vzorku oxaliplatin:  $1\text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1} + 0,6\%$  nečistoty B +  $1,0\%$  nečistoty C (červená). BGE:  $25\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  fosfát sodný pH 2,15 s  $175\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  SDS, doba dávkování 90 s (50 mbar).

## 4.2.8 Závěr

Byla úspěšně vyvinuta metoda pro ultrastopové stanovení oxaliplatinu a jejích nečistot (nečistota B a nečistota C). Jako první byla metoda vyvinuta a optimalizována pro UV detekci. Jako separační technika byla použita CE v MEKC módu, a to z důvodu neutrální povahy oxaliplatinu a nečistoty C. Pro snížení mezí detekce a stanovitelnosti byla použita prekoncentrační metoda „sweeping“. S ohledem na danou prekoncentrační metodu musela být separace prováděna v kyselém prostředí, kde byl potlačen EOF a při obrácené polaritě elektrod. Jako první bylo optimalizováno pH a koncentrace pufru, dále pak koncentrace surfaktantu (SDS) a jako poslední byla optimalizována doba dávkování. Finální podmínky byly: 25 mmol·l<sup>-1</sup> fosfát sodný pH 2,15 s 175 mmol·l<sup>-1</sup> SDS a dobou dávkování 90 s.

Po optimalizaci metody pro UV detekci byla metoda využita i pro sweeping-MEKC-ICP-MS experimenty, avšak klíčovým krokem byla optimalizace složení pomocné kapaliny. Její finální složení bylo 800 mmol·l<sup>-1</sup> kyselina 2-brompropionová vytitrovaná na pH 2,45 s přídavkem 50 ng·ml<sup>-1</sup> Au. Na rozdíl od metody CE-UV se v metodě CE-ICP-MS pracovalo za konstantního proudu.

Po optimalizacích obou metod byla provedena jejich validace. Validovanými parametry pro obě metody byly mez detekce, stanovitelnosti, pravdivost, preciznost, kalibrační rozsah a reprodukovatelnost migračních časů. Ve srovnání s metodou sweeping-MEKC-UV má sweeping-MEKC-ICP-MS 750-, 200-, 400-krát nižší meze detekce pro nečistotu B, C a oxaliplatinu a lineární dynamické rozsahy jsou v případě sweeping-MEKC-ICP-MS větší než 5 řádů, oproti tomu sweeping-MEKC-UV má lineární dynamické rozsahy kolem 3 řádů. ICP-MS detektor jako prvkově/izotopově specifický detektor v kombinaci s ESI-MS/MS také pomohl správně určit nečistotu B a její stabilizační anion, který byl detekovatelný v CE-UV.

Na závěr byla metoda použita pro stanovení obsahu nečistot B a C ve 3 modelových vzorcích oxaliplatinu o průměrné koncentraci 1000 µg·ml<sup>-1</sup>. Nečistota B byla detekována jako hlavní nečistota ve vzorku oxaliplatinu. Za optimálních podmínek bylo dosaženo mezí detekce v jednotkách ng·ml<sup>-1</sup> a ve srovnání s předchozími články zabývajícími se použitím CE-ICP-MS pro stanovení Pt obsahujících sloučenin bylo dosaženo více než o řád nižších mezí detekce.

Závěrem lze konstatovat, že metoda sweeping-MEKC-ICP-MS může sloužit jako metoda vhodná pro kontrolu kvality farmaceutických přípravků anebo pro stanovení oxaliplatinu a jejích nečistot v životním prostředí.

## 5 Závěr

V souladu se stanovenými cíli byly v experimentální části práce vyvinuty a optimalizovány dvě metody. Jedna pro snížení množství chirálního selektoru (S- $\beta$ -CD), používaného při separaci enantiomerů cetirizinu, přidavkem mnohem levnější D-glukózy do pufru a druhá pro ultrastopové stanovení oxaliplatinu a jejích platinových nečistot.

V prvním případě, chirální separace cetirizinu, byla separace prováděna pomocí CE v CZE módu s UV/Vis detekcí. Jako pufr byl použit borát sodný a do něj byla k chirálnímu selektoru přidána D-glukóza. Ukázalo se, že přidavkem glukózy je možné snížit 15x množství použitého chirálního selektoru a tím i cenu analýzy. Na tomto příkladu si můžeme ukázat jednu z výhod CE. Ke změně selektivity chirální separace cetirizinu postačuje přidavek glukózy do pufru k chirálnímu selektoru a není tedy potřeba syntéza žádných dalších speciálních chirálních stacionárních fází. Po provedení validace může být vyvinutá metoda používána např. pro kontrolu optické čistoty levocetirizinu.

V další části práce, věnující se ultrastopovému stanovení oxaliplatinu a jejích nečistot, byla separace a stanovení prováděno pomocí CE v MEKC módu s „online“ prekoncentrací a s UV/Vis a ICP-MS detekcí. Spojením CE s ICP-MS byla eliminována jedna z nevýhod CE, a tou jsou vyšší meze detekce v případě použití UV/Vis detektoru. V případě separace oxaliplatinu a jejích nečistot bylo pomocí sweeping-MEKC-ICP-MS dosaženo mezí detekce řádově v jednotkách  $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Validovaná sweeping-MEKC-ICP-MS metoda byla použita pro stanovení oxaliplatinu a jejích nečistot v modelových vzorcích. Z dosažených výsledků vyplývá, že sweeping-MEKC-ICP-MS je vhodná metoda pro stanovení velmi nízkých koncentrací oxaliplatinu a jejích nečistot v životním prostředí anebo pro kontrolu kvality vyráběných léčivých přípravků oxaliplatinu.

## 6 Literatura

- [1] H.J. Issaq, A decade of capillary electrophoresis, *Electrophoresis*, 21 (2000) 1921-1939.
- [2] A. Van Eeckhaut, Y. Michotte, Chiral separations by capillary electrophoresis: Recent developments and applications, *Electrophoresis*, 27 (2006) 2880-2895.
- [3] B. Buszewski, E. Dziubakiewicz, M. Szumski, *Electromigration Techniques*, Springer, Berlin 2013.
- [4] E. O'Sullivan-Carroll, S. Howlett, C. Pyne, P. Downing, A. Rafael, M. Lynch, A.M. Hogan, E.J. Moore, Determination of Pharmaceuticals in Surface and Wastewater by Capillary Electrophoresis (CE): A Minireview, *Anal. Lett.*, 55 (2022) 495-504.
- [5] H.H. Lauer, G.P. Rozing, *High Performance Capillary Electrophoresis*, Agilent Technologies, Germany 2010.
- [6] A. Tiselius, A new apparatus for electrophoretic analysis of colloidal mixtures, *Trans. Faraday Soc.*, 33 (1937) 524-531.
- [7] Baker D. R., *Capillary Electrophoresis Techniques in Analytical Chemistry*, Wiley, New York 1995.
- [8] R. Norková, J.J. Dytrtová, V.J.C.I. Kašička, Ionizační techniky a rozhraní pro spojení kapilárních elektromigračních metod s hmotnostně spektrometrickou detekcí, *Chem. Listy*, 107 (2013) 949-955.
- [9] P.W. Lindenburg, R. Haselberg, G. Rozing, R.J.C. Ramautar, Developments in interfacing designs for CE-MS: towards enabling tools for proteomics and metabolomics, *Chromatographia*, 78 (2015) 367-377.
- [10] V. Kasicka, Theoretical bases and separation principles of capillary electromigration methods, *Chem. Listy*, 91 (1997) 320-329.
- [11] B. Chankvetadze, *Capillary electrophoresis in chiral analysis*, Wiley, Chichester 1997.
- [12] M.L. Marina, A. Ríos, A. Ríos Castro, M. Valcárcel, M. Valcárcel Cases, *Analysis and detection by capillary electrophoresis*, Elsevier, Amsterdam 2005.
- [13] X.C. Xuan, D. Sinton, D.Q. Li, Thermal end effects on electroosmotic flow in a capillary, *Int. J. Heat Mass Transf.*, 47 (2004) 3145-3157.
- [14] T. Bo, F. Liu, K.A. Li, H.W. Liu, Comparison of different capillary electrophoresis models and HPLC for the separation of xanthenes, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, 26 (2003) 993-1003.
- [15] R.B. Taylor, R.G. Reid, Analysis of basic antimalarial-drugs by cze and mekc .1. critical factors affecting separation, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 11 (1993) 1289-1294.
- [16] M. Chen, R.M. Cassidy, Separation of metal ions by capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A*, 640 (1993) 425-431.
- [17] G. Lu, C.L. Crieffield, S. Gattu, L.M. Veltri, L.A. Holland, *Capillary Electrophoresis Separations of Glycans*, *Chem. Rev.*, 118 (2018) 7867-7885.
- [18] B. Chen, M.G. Bartlett, Determination of therapeutic oligonucleotides using capillary gel electrophoresis, *Biomed. Chromatogr.*, 26 (2012) 409-418.
- [19] D.N. Heiger, A.S. Cohen, B.L. Karger, Separation of DNA restriction fragments by high performance capillary electrophoresis with low and zero crosslinked polyacrylamide using continuous and pulsed electric fields, *J. Chromatogr. A*, 516 (1990) 33-48.
- [20] D. Wu, F.E. Regnier, Sodium dodecyl sulfate-capillary gel electrophoresis of proteins using non-cross-linked polyacrylamide, *J. Chromatogr. A*, 608 (1992) 349-356.

- [21] S. Tang, D.P. Nesta, L.R. Maneri, K.R. Anumula, A method for routine analysis of recombinant immunoglobulins (rIgGs) by capillary isoelectric focusing (cIEF), *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 19 (1999) 569-583.
- [22] F. Kvasnička, V. Janda, D. Rousová, J. Manda, L. Kollerová, Determination of inorganic oxyhalides in drinking water by on-line coupled capillary isotachopheresis— capillary zone electrophoresis, *Cent. Eur. J. Chem.*, 3 (2005) 137-145.
- [23] S. Terabe, K. Otsuka, K. Ichikawa, A. Tsuchiya, T. Ando, Electrokinetic separations with micellar solutions and open-tubular capillaries, *Anal. Chem.*, 56 (1984) 111-113.
- [24] S. Terabe, K. Otsuka, T. Ando, Electrokinetic chromatography with micellar solution and open-tubular capillary, *Anal. Chem.*, 57 (1985) 834-841.
- [25] D.E. Burton, M.J. Sepaniak, M.P. Maskarinec, Analysis of B6 Vitamers by Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography with Laser-Excited Fluorescence Detection, *J. Chromatogr. Sci.*, 24 (1986) 347-351.
- [26] H. Nishi, N. Tsumagari, S. Terabe, Effect of tetraalkylammonium salts on micellar electrokinetic chromatography of ionic substances, *Anal. Chem.*, 61 (1989) 2434-2439.
- [27] M. G. Khaledi, *High Performance Capillary Electrophoresis*, Wiley, New York 1998.
- [28] S.Y. Yang, M.G. Khaledi, Chemical selectivity in micellar electrokinetic chromatography - characterization of solute micelle interactions for classification of surfactants, *Anal. Chem.*, 67 (1995) 499-510.
- [29] M.J. Kamlet, R.M. Doherty, M.H. Abraham, Y. Marcus, R.W. Taft, Linear solvation energy relationships .46. an improved equation for correlation and prediction of octanol water partition-coefficients of organic nonelectrolytes (including strong hydrogen-bond donor solutes), *J. Phys. Chem.*, 92 (1988) 5244-5255.
- [30] R.W. Taft, M.H. Abraham, G.R. Famini, R.M. Doherty, J.L.M. Abboud, M.J. Kamlet, Solubility properties in polymers and biological media .5. an analysis of the physicochemical properties which influence octanol water partition-coefficients of aliphatic and aromatic solutes, *J. Pharm. Sci.*, 74 (1985) 807-814.
- [31] H. Nishi, N. Tsumagari, T. Kakimoto, S. Terabe, Separation of  $\beta$ -lactam antibiotics by micellar electrokinetic chromatography, *J. Chromatogr. A*, 477 (1989) 259-270.
- [32] K. Otsuka, S. Terabe, T. Ando, Electrokinetic chromatography with micellar solutions - separation of phenylthiohydantoin-amino acids, *J. Chromatogr.*, 332 (1985) 219-226.
- [33] M.D. Trone, M.G. Khaledi, Characterization of Chemical Selectivity in Micellar Electrokinetic Chromatography. 4. Effect of Surfactant Headgroup, *Anal. Chem.*, 71 (1999) 1270-1277.
- [34] M. Wang, D. Wu, Q. Yao, X. Shen, Separation and selectivity in micellar electrokinetic chromatography using sodium dodecyl sulfate micelles or Tween 20-modified mixed micelles, *Anal. Chim. Acta*, 519 (2004) 73-78.
- [35] E. Yukihiro, K. Mikio, I. Tokuji, K. Kenji, Hydrogen-bonding interaction-assisted micellar electrokinetic chromatography using mixed surfactant systems, *J. Chromatogr. A*, 736 (1996) 273-280.
- [36] R.A. Wallingford, P.D. Curry Jr, A.G. Ewing, Retention of catechols in capillary electrophoresis with micellar and mixed micellar solutions, *J. Microcolumn Sep.*, 1 (1989) 23-27.
- [37] E.S. Ahuja, J.P. Foley, Influence of dodecyl-sulfate counterion on efficiency, selectivity, retention, elution range, and resolution in micellar electrokinetic chromatography, *Anal. Chem.*, 67 (1995) 2315-2324.



- [38] K. Otsuka, S. Terabe, T. Ando, Electrokinetic chromatography with micellar solutions - retention behavior and separation of chlorinated phenols, *J. Chromatogr.*, 348 (1985) 39-47.
- [39] J.H. Jumppanen, S.K. Wiedmer, H. Siren, M.L. Riekkola, H. Haario, Optimized separation of 7 corticosteroids by micellar electrokinetic chromatography, *Electrophoresis*, 15 (1994) 1267-1272.
- [40] S. Terabe, T. Katsura, Y. Okada, Y. Ishihama, K. Otsuka, Measurement of thermodynamic quantities of micellar solubilization by micellar electrokinetic chromatography with sodium dodecyl-sulfate, *J. Microcolumn Sep.*, 5 (1993) 23-33.
- [41] S. Michaelsen, P. Moller, H. Sorensen, Analysis of dansyl amino-acids in feedstuffs and skin by micellar electrokinetic capillary chromatography, *J. Chromatogr. A*, 680 (1994) 299-310.
- [42] P. Lukkari, J. Jumppanen, T. Holma, H. Siren, K. Jinno, H. Elo, M.L. Riekkola, Effect of the buffer solution on the elution order and separation of bis(amidinohydrazones) by micellar electrokinetic capillary chromatography, *J. Chromatogr.*, 608 (1992) 317-323.
- [43] J. Ganan, S. Morante-Zarzero, I. Sierra, Influence of organic modifier additives to separate steroids by micellar electrokinetic chromatography: determination of solute-micelle association constants at different acetonitrile concentrations, *Anal. Lett.*, 47 (2014) 1513-1527.
- [44] L.A. Nguyen, H. He, C. Pham-Huy, Chiral drugs: an overview, *Int. J. Biomed. Sci.*, 2 (2006) 85-100.
- [45] A. Berthod, *Chiral Recognition in Separation Methods*, Springer, Heidelberg 2010.
- [46] R.S. Cahn, C. Ingold, V. Prelog, Specification of Molecular Chirality, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, 5 (1966) 385-415.
- [47] M.J. Cope, SAC 92. Understanding chirality: how molecules that are mirror images of each other can act differently in the body, *Anal. Proc.*, 30 (1993) 498-500.
- [48] A.M. Barrett, V.A. Cullum, The biological properties of the optical isomers of propranolol and their effects on cardiac arrhythmias, *Br. J. Pharmacol.*, 34 (1968) 43-55.
- [49] H. Echizen, M. Manz, M. Eichelbaum, Electrophysiologic effects of dextro- and levo-verapamil on sinus node and AV node function in humans, *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 12 (1988) 543-546.
- [50] K.M. Rentsch, The importance of stereoselective determination of drugs in the clinical laboratory, *J. Biochem. Biophys. Methods*, 54 (2002) 1-9.
- [51] C. Pham-Huy, N. Chikhi-Chorfi, H. Galons, N. Sadeg, X. Laqueille, N. Aymard, F. Massicot, J.-M. Warnet, J.-R. Claude, Enantioselective high-performance liquid chromatography determination of methadone enantiomers and its major metabolite in human biological fluids using a new derivatized cyclodextrin-bonded phase, *J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl.*, 700 (1997) 155-163.
- [52] N. Singh, L. Sharma, Enantioseparation of D- and L-isomers of Chiral Drugs for Improving their Bioavailability: Some Techniques Including Micellization with Gemini Surfactants, *Indian J. Pharm. Educ. Res.*, 52 (2018) 334-341.
- [53] F. Wang, M.G. Khaledi, Enantiomeric separations by nonaqueous capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A*, 875 (2000) 277-293.
- [54] N.M. Maier, P. Franco, W. Lindner, Separation of enantiomers: needs, challenges, perspectives, *J. Chromatogr. A*, 906 (2001) 3-33.
- [55] S.A.C. Wren, R.C. Rowe, Theoretical aspects of chiral separation in capillary electrophoresis: I. Initial evaluation of a model, *J. Chromatogr. A*, 603 (1992) 235-241.
- [56] B. Chankvetadze, W. Lindner, G.K.E. Scriba, Enantiomer Separations in Capillary Electrophoresis in the Case of Equal Binding Constants of the Enantiomers with a Chiral Selector: Commentary on the Feasibility of the Concept, *Anal. Chem.*, 76 (2004) 4256-4260.

- [57] G.K.E.V. Scriba, Cyclodextrins in capillary electrophoresis enantioseparations – Recent developments and applications, *J. Sep. Sci.*, 31 (2008) 1991-2011.
- [58] K. Lomsadze, A.B. Martínez-Girón, M. Castro-Puyana, L. Chankvetadze, A.L. Crego, A. Salgado, M.L. Marina, B. Chankvetadze, About the role of enantioselective selector–selectand interactions and the mobilities of diastereomeric associates in enantiomer separations using CE, *Electrophoresis*, 30 (2009) 2803-2811.
- [59] V.A. Davankov, The nature of chiral recognition: Is it a three-point interaction?, *Chirality*, 9 (1997) 99-102.
- [60] A. Berthod, Chiral recognition mechanisms, *Analytical Chemistry*, 78 (2006) 2093-2099.
- [61] G.K.E. Scriba, Chiral Recognition Mechanisms in Analytical Separation Sciences, *Chromatographia*, 75 (2012) 815-838.
- [62] S. Fanali, Enantioselective determination by capillary electrophoresis with cyclodextrins as chiral selectors, *J. Chromatogr. A*, 875 (2000) 89-122.
- [63] M. Blanco, I. Valverde, Choice of chiral selector for enantioseparation by capillary electrophoresis, *TrAC, Trends Anal. Chem.*, 22 (2003) 428-439.
- [64] P. Řezanka, K. Navrátilová, M. Řezanka, V. Král, D. Sýkora, Application of cyclodextrins in chiral capillary electrophoresis, *Electrophoresis*, 35 (2014) 2701-2721.
- [65] G. Crini, S. Fourmentin, É. Fenyvesi, G. Torri, M. Fourmentin, N. Morin-Crini, Cyclodextrins, from molecules to applications, *Environ. Chem. Lett.*, 16 (2018) 1361-1375.
- [66] W. Saenger, Cyclodextrin inclusion compounds in research and industry, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 19 (1980) 344.
- [67] V. Schurig, H.-P. Nowotny, Gas chromatographic separation of enantiomers on cyclodextrin derivatives, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 29 (1990) 939.
- [68] C. García-Ruiz, A.L. Crego, M.L. Marina, Comparison of charged cyclodextrin derivatives for the chiral separation of atropisomeric polychlorinated biphenyls by capillary electrophoresis, *Electrophoresis*, 24 (2003) 2657-2664.
- [69] Z. Wang, Z. Tang, Z. Gu, Z. Hu, S. Ma, J. Kang, Enantioseparation of chiral allenic acids by micellar electrokinetic chromatography with cyclodextrins as chiral selector, *Electrophoresis*, 26 (2005) 1001-1006.
- [70] P. Schmitt, A.W. Garrison, D. Freitag, A. Kettrup, Application of cyclodextrin-modified micellar electrokinetic chromatography to the separations of selected neutral pesticides and their enantiomers, *J. Chromatogr. A*, 792 (1997) 419-429.
- [71] J.L. Jarman, W.J. Jones, L.A. Howell, A.W. Garrison, Application of Capillary Electrophoresis To Study the Enantioselective Transformation of Five Chiral Pesticides in Aerobic Soil Slurries, *J. Agric. Food Chem.*, 53 (2005) 6175-6182.
- [72] Z. Juvancz, J. Szejtli, The role of cyclodextrins in chiral selective chromatography, *TrAC, Trends Anal. Chem.*, 21 (2002) 379-388.
- [73] M. Lämmerhofer, Chiral separations by capillary electromigration techniques in nonaqueous media: I. Enantioselective nonaqueous capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A*, 1068 (2005) 3-30.
- [74] S. Sanchez-Vindas, G. Vigh, Non-aqueous capillary electrophoretic enantiomer separations using the tetrabutylammonium salt of heptakis(2,3-O-diacetyl-6-O-sulfo)-cyclomaltoheptaose, a single-isomer sulfated  $\beta$ -cyclodextrin highly-soluble in organic solvents, *J. Chromatogr. A*, 1068 (2005) 151-158.
- [75] T. Schmitt, H. Engelhardt, Charged and uncharged cyclodextrins as chiral selectors in capillary electrophoresis, *Chromatographia*, 37 (1993) 475-481.

- [76] I. Fejós, E. Kalydi, M. Malanga, G. Benkovics, S. Béni, Single isomer cyclodextrins as chiral selectors in capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A*, 1627 (2020) 461375.
- [77] J.M. Saz, M.L. Marina, Recent advances on the use of cyclodextrins in the chiral analysis of drugs by capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A*, 1467 (2016) 79-94.
- [78] J. Zhou, J. Tang, W. Tang, Recent development of cationic cyclodextrins for chiral separation, *TrAC, Trends Anal. Chem.*, 65 (2015) 22-29.
- [79] C. Foulon, J.-F. Goossens, E. Fourmaintraux, J.-P. Bonte, C. Vaccher, Chiral capillary electrophoretic determination of the enantiomeric purity of tetrahydronaphthalenic derivatives, melatonergic ligands, using highly sulfated  $\beta$ -cyclodextrins, *Electrophoresis*, 23 (2002) 1121-1128.
- [80] F. Wang, M.G. Khaledi, Capillary electrophoresis chiral separation of basic pharmaceutical enantiomers with different charges using sulfated  $\beta$ -cyclodextrin, *J. Microcolumn Sep.*, 11 (1999) 11-21.
- [81] I.J. Stavrou, M.C. Mavroudi, C.P. Kapnissi-Christodoulou, Chiral selectors in CE: Recent developments and applications (2012-mid 2014), *Electrophoresis*, 36 (2015) 101-123.
- [82] C.J. Guo, Y. Xiao, Negatively charged cyclodextrins: Synthesis and applications in chiral analysis-A review, *Carbohydr. Polym.*, 256 (2021) 19.
- [83] T. de Boer, R.A. de Zeeuw, G.J. de Jong, K. Ensing, Recent innovations in the use of charged cyclodextrins in capillary electrophoresis for chiral separations in pharmaceutical analysis, *Electrophoresis*, 21 (2000) 3220-3239.
- [84] C. Guo, Y. Xiao, Negatively charged cyclodextrins: Synthesis and applications in chiral analysis-A review, *Carbohydr. Polym.*, 256 (2021) 117517.
- [85] L.H. Zuo, Y.F. Zhao, F.F. Ji, M. Zhao, Z. Jiang, T.M. Sun, X.J. Guo, Determination of the enantiomeric and diastereomeric impurities of RS-glycopyrrolate by capillary electrophoresis using sulfated-beta-cyclodextrin as chiral selectors, *Electrophoresis*, 35 (2014) 3339-3344.
- [86] C.E. Evans, A.M. Stalcup, Comprehensive strategy for chiral separations using sulfated cyclodextrins in capillary electrophoresis, *Chirality*, 15 (2003) 709-723.
- [87] S. Rudaz, T. Le Saux, J. Prat, P. Gareil, J.-L. Veuthey, Ultrashort partial-filling technique in capillary electrophoresis for infinite resolution of tramadol enantiomers and its metabolites with highly sulfated cyclodextrins, *Electrophoresis*, 25 (2004) 2761-2771.
- [88] H. Nishi, K. Nakamura, H. Nakai, T. Sato, Separation of enantiomers and isomers of amino compounds by capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography utilizing crown ethers, *J. Chromatogr. A*, 757 (1997) 225-235.
- [89] Y. Kuwahara, H. Nagata, H. Nishi, Y. Tanaka, K. Takechi, Detection and separation of free amino acid enantiomers by capillary electrophoresis with a chiral crown ether and indirect photometric detection, *Chromatographia*, 62 (2005) 505-510.
- [90] R. Kuhn, F. Erni, T. Bereuter, J. Hausler, Chiral recognition and enantiomeric resolution based on host guest complexation with crown ethers in capillary zone electrophoresis, *Anal. Chem.*, 64 (1992) 2815-2820.
- [91] M.G. Schmid, O. Lecnik, U. Sitte, G. Gübitz, Application of ligand-exchange capillary electrophoresis to the chiral separation of  $\alpha$ -hydroxy acids and  $\beta$ -blockers, *J. Chromatogr. A*, 875 (2000) 307-314.
- [92] Z.-X. Zheng, Y. Wei, J.-M. Lin, Chiral separation based on ligand-exchange capillary electrophoresis using a copper(II)-L-ornithine ternary complex as selector, *Electrophoresis*, 26 (2005) 1007-1012.

- [93] S. Kodama, A. Yamamoto, S.-i. Aizawa, Y. Honda, K. Suzuki, T. Kemmei, A. Taga, Enantioseparation of  $\alpha$ -hydroxy acids by chiral ligand exchange CE with a dual central metal ion system, *Electrophoresis*, 33 (2012) 2920-2924.
- [94] H. Nishi, T. Fukuyama, M. Matsuo, S. Terabe S, Chiral separation of diltiazem, trimetoquinol and related compounds by micellar electrokinetic chromatography with bile salts, *J. Chromatogr. A*, 515 (1990) 233-243.
- [95] R.O. Cole, M.J. Sepaniak, W.L. Hinze, J. Gorse, K. Oldiges, Bile salt surfactants in micellar electrokinetic capillary chromatography: Application to hydrophobic molecule separations, *J. Chromatogr. A*, 557 (1991) 113-123.
- [96] R.O. Cole, M.J. Sepaniak, W.L. Hinze, Optimization of binaphthyl enantiomer separations by capillary zone electrophoresis using mobile phases containing bile salts and organic solvent, *J. High Resol. Chromatogr.*, 13 (1990) 579-582.
- [97] H. Nishi, T. Fukuyama, M. Matsuo, S. Terabe, Chiral separation of optical isomeric drugs using micellar electrokinetic chromatography and bile salts, *J. Microcolumn Sep.*, 1 (1989) 234-241.
- [98] Y. Ishihama, S. Terabe, Enantiomeric separation by micellar electrokinetic chromatography using saponins, *J. Liq. Chromatogr.*, 16 (1993) 933-944.
- [99] J. R. Mazzeo, E.R. Grover, M.E. Swartz, J.S. Petersen, Novel chiral surfactant for the separation of enantiomers by micellar electrokinetic capillary chromatography, *J. Chromatogr. A*, 680 (1994) 125-135.
- [100] M. G. Jang, M. D. Jang, J.H. Park, Doxycycline as a new chiral selector in capillary electrophoresis., *J. Chromatogr. A*, 1508 (2017) 176-181.
- [101] C. Desiderio, C.M. Polcaro, P. Padiglioni, S. Fanali, Enantiomeric separation of acidic herbicides by capillary electrophoresis using vancomycin as chiral selector, 781 (1997) 503-513.
- [102] T.J. Ward, Ch. Ward, A. Blaylock, Enantiomeric resolution using the macrocyclic antibiotics rifamycin B and rifamycin SV as chiral selectors for capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A*, 715 (1995) 337-344.
- [103] T.J. Ward, C. Dann, A. Blaylock, Enantiomeric resolution using the macrocyclic antibiotics rifamycin B and rifamycin SV as chiral selectors for capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A*, 715 (1995) 337-344.
- [104] R. Vespalec, H. Corstjens, H.A.H. Billiet, J. Frank, K. Luyben, Enantiomeric separation of sulfur-containing and selenium-containing amino-acids by capillary electrophoresis using vancomycin as a chiral selector, *Anal. Chem.*, 67 (1995) 3223-3228.
- [105] S.L.L. Liu Y., Stege P. W., Enantiomeric separation of  $\beta$ -blockers and tryptophan using heparin as stationary and pseudostationary phases in capillary electrophoresis, *Chirality*, 30 (2018) 988-995.
- [106] S.A.M. Jin Y., Application of heparin to chiral separations of antihistamines by capillary electrophoresis., *Electrophoresis*, 19 (1998) 2119-2123.
- [107] D.Y. Zhang Q., Chen, J. Xu G., Yu T., Hua X., Zhang J., Investigation of chondroitin sulfate D and chondroitin sulfate E as novel chiral selectors in capillary electrophoresis, 406 (2014) 1557-1566.
- [108] N.M. Agyei, K.H. Gahm, A.M. Stalcup, Chiral separations using heparin and dextran sulfate in capillary zone electrophoresis, *Anal. Chim. Acta*, 307 (1995) 185-191.
- [109] I.S. Nishi H., Nakamura K., Nakai H., Sato T, Dextran and dextrin as chiral selectors in capillary zone electrophoresis, *Chromatographia*, 42 (1996) 617-630.
- [110] H. Nishi, K. Nakamura, H. Nakai, T. Sato, Enantiomer separation by capillary electrophoresis using DEAE-Dextran and aminoglycosidic antibiotics, *Chromatographia*, 43(1996) 426-430.

- [111] H. Xu, X. Yu, H. Chen, Enantiomeric separation of basic drugs with partially filled serum albumin as chiral selector in capillary electrophoresis, *Anal. Sci.*, 2004 (20) 1409-1413.
- [112] K.J. Hödl H., Schmid M. G., Gübitz G., Chiral resolution of tryptophan derivatives by CE using canine serum albumin and bovine serum albumin as chiral selectors., *Electrophoresis*, 2006, pp. 4755-4762.
- [113] R. Vespalec, V. Šustáček, P. Boček, Prospects of dissolved albumin as a chiral selector in capillary zone electrophoresis, *J. Chromatogr. A*, 638 (1993) 255-261.
- [114] S. Busch, J.C. Kraak, H. Poppe, Chiral separations by complexation with proteins in capillary zone electrophoresis, *J. Chromatogr. A*, 635 (1993) 119-126.
- [115] Y. Ishihama, Y. Oda, N. Asakawa, Y. Yoshida, T. Sato, Optical resolution by electrokinetic chromatography using ovomucoid as a pseudo-stationary phase, *J. Chromatogr. A*, 666 (1994) 193-201.
- [116] Y. Tanaka, S. Terabe, Partial separation zone technique for the separation of enantiomers by affinity electrokinetic chromatography with proteins as chiral pseudo-stationary phases, *J. Chromatogr. A*, 694 (1995) 277-284.
- [117] J. Haginaka, N. Kanasugi, Separation of basic drug enantiomers by capillary zone electrophoresis using ovoglycoprotein as a chiral selector, *J. Chromatogr. A*, 782 (1997) 281-288.
- [118] Y. Tanaka, S. Terabe, Separation of the enantiomers of basic drugs by affinity capillary electrophoresis using a partial filling technique and  $\alpha$ 1-acid glycoprotein as chiral selector, *Chromatographia*, 44 (1997) 119-128.
- [119] T. Bo, S.K. Wiedmer, M.-L. Riekkola, Phospholipid-lysozyme coating for chiral separation in capillary electrophoresis, *Electrophoresis*, 25 (2004) 1784-1791.
- [120] J. Haginaka, Enantiomer separation of drugs by capillary electrophoresis using, *J. Chromatogr. A*, 875 (2000) 235-254.
- [121] L. Mullerova, P. Dubsy, B. Gas, Twenty years of development of dual and multi-selector models in capillary electrophoresis: A review, *Electrophoresis*, 35 (2014) 2688-2700.
- [122] I.S. Lurie, R.F.X. Klein, T.A. Dalcason, M.J. Lebel, R. Brenneisen, R.E. Weinberger, Chiral resolution of cationic drugs of forensic interest by capillary electrophoresis with mixtures of neutral and anionic cyclodextrins, *Anal. Chem.*, 66 (1994) 4019-4026.
- [123] L.A. Papp, G. Hancu, A. Gyeresi, H. Kelemen, Z.I. Szabo, B. Noszal, P. Dubsy, G. Toth, Chiral separation of lansoprazole and rabeprazole by capillary electrophoresis using dual cyclodextrin systems, *Electrophoresis*, 40 (2019) 2799-2805.
- [124] Z.I. Szabo, C. Toth, G. Hancu, D.L. Muntean, Simultaneous Chiral Separation of Four H1-Antihistamines by Capillary Zone Electrophoresis Using a Dual Cyclodextrin System, *Chromatographia*, 78 (2015) 1377-1384.
- [125] X. Yang, Z. Yan, T. Yu, Y.X. Du, J.Q. Chen, Z.R. Liu, Y. Xi, Study of the enantioselectivity and recognition mechanism of chiral dual system based on chondroitin sulfate D in capillary electrophoresis, *Anal. Bioanal. Chem.*, 410 (2018) 5889-5898.
- [126] N. Matthijs, S. Van Hemelryck, M. Maftouh, D.L. Massart, Y. Vander Heyden, Electrophoretic separation strategy for chiral pharmaceuticals using highly-sulfated and neutral cyclodextrins based dual selector systems, *Anal. Chim. Acta*, 525 (2004) 247-263.
- [127] J. Guan, H. Li, F. Yan, S. Shi, S.L. Wang, Optimization and validation of a novel CE method for the enantioseparation of pantoprazole and related benzimidazole using a dual chiral selector system, *Electrophoresis*, 35 (2014) 2800-2806.

- [128] S.A.C. Wren, R.C. Rowe, R.S. Payne, A theoretical approach to chiral capillary electrophoresis with some practical implications, *Electrophoresis*, 15 (1994) 774-778.
- [129] Y.Y. Rawjee, D.U. Staerk, G. Vigh, Capillary electrophoretic chiral separations with cyclodextrin additives: I. acids: Chiral selectivity as a function of pH and the concentration of  $\beta$ -cyclodextrin for fenopfen and ibuprofen, *J. Chromatogr. A*, 635 (1993) 291-306.
- [130] Y.Y. Rawjee, R.L. Williams, G. Vigh, Capillary electrophoretic chiral separations using  $\beta$ -cyclodextrin as resolving agent: II. Bases: Chiral selectivity as a function of pH and the concentration of  $\beta$ -cyclodextrin, *J. Chromatogr. A*, 652 (1993) 233-245.
- [131] S. Surapaneni, K. Ruterbories, T. Lindstrom, Chiral separation of neutral species by capillary electrophoresis evaluation of a theoretical model, *Journal of Chromatography A*, 761 (1997) 249-257.
- [132] J. Znalezniona, I. Fejős, J. Ševčík, M. Douša, S. Béni, V. Maier, Enantiomeric separation of tapentadol by capillary electrophoresis—Study of chiral selectivity manipulation by various types of cyclodextrins, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 105 (2015) 10-16.
- [133] A. Gogolashvili, E. Tatunashvili, L. Chankvetadze, T. Sohajda, J. Szeman, M. Gumustas, S.A. Ozkan, A. Salgado, B. Chankvetadze, Separation of terbutaline enantiomers in capillary electrophoresis with cyclodextrin-type chiral selectors and investigation of structure of selector-selectand complexes, *J. Chromatogr. A*, 1571 (2018) 231-239.
- [134] J.S. Hagele, E.M. Hubner, M.G. Schmid, Chiral separation of cathinone derivatives using beta-cyclodextrin-assisted capillary electrophoresis-Comparison of four different beta-cyclodextrin derivatives used as chiral selectors, *Electrophoresis*, 40 (2019) 1787-1794.
- [135] M. Fillet, I. Bechet, G. Schomburg, P. Hubert, J. Crommen, Enantiomeric separation of acidic drugs by capillary electrophoresis using a combination of charged and uncharged  $\beta$ -cyclodextrins as chiral selectors, *J. High Resolut. Chromatogr.*, 19 (1996) 669-673.
- [136] F. Chen, S. Zhang, L. Qi, Y. Chen, Chiral capillary electrophoretic separation of amino acids derivatized with 9-fluorenylmethylchloroformate using mixed chiral selectors of  $\beta$ -cyclodextrin and sodium taurodeoxycholate, *Electrophoresis*, 27 (2006) 2896-2904.
- [137] M.-L. Riekkola, S.K. Wiedmer, I.E. Valkó, H. Sirén, Selectivity in capillary electrophoresis in the presence of micelles, chiral selectors and non-aqueous media, *J. Chromatogr. A*, 792 (1997) 13-35.
- [138] A. Van Eeckhaut, M.R. Detaevernier, J. Crommen, Y. Michotte, Influence of methanol on the enantioresolution of antihistamines with carboxymethyl-beta-cyclodextrin in capillary electrophoresis, *Electrophoresis*, 25 (2004) 2838-2847.
- [139] D. Guohua, L. Qin, X. Jianwei, Y. Liuhong, Z. Bohua, L. Keliang, Nonaqueous Capillary Electrophoretic Chiral Separations of Anticholinergic Drugs with Heptakis(2,3-di-O-Methyl-6-O-Sulfato)- $\beta$ -Cyclodextrin, *Chromatographia*, 61 (2005) 527-531.
- [140] M.C. Breadmore, Recent advances in enhancing the sensitivity of electrophoresis and electrochromatography in capillaries and microchips, *Electrophoresis*, 28 (2007) 254-281.
- [141] Y.F. Yik, S.F.Y. Li, Capillary electrophoresis with electrochemical detection, *TrAC, Trends Anal. Chem.*, 11 (1992) 325-332.
- [142] Y.-M. Liu, J.-K. Cheng, Ultrasensitive chemiluminescence detection in capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A*, 959 (2002) 1-13.
- [143] T.T. Lee, E.S. Yeung, High-sensitivity laser-induced fluorescence detection of native proteins in capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A*, 595 (1992) 319-325.
- [144] G.A. Valaskovic, N.L. Kelleher, F.W. McLafferty, Attomole Protein Characterization by Capillary Electrophoresis-Mass Spectrometry, *Science*, 273 (1996) 1199.

- [145] M. Van Holderbeke, Y.N. Zhao, F. Vanhaecke, L. Moens, R. Dams, P. Sandra, Speciation of six arsenic compounds using capillary electrophoresis inductively coupled plasma mass spectrometry, *J. Anal. At. Spectrom.*, 14 (1999) 229-234.
- [146] N.M. Djordjevic, M. Widder, R. Kuhn, Signal enhancement in capillary electrophoresis by using a sleeve cell arrangement for optical detection, *HRC-J. High Resolut. Chromatogr.*, 20 (1997) 189-192.
- [147] S.E. Moring, R.T. Reel, R.E.J. Vansoest, Optical improvements of a z-shaped cell for high-sensitivity uv absorbency detection in capillary electrophoresis, *Anal. Chem.*, 65 (1993) 3454-3459.
- [148] P. Puig, F. Borrull, M. Calull, C. Aguilar, Recent advances in coupling solid-phase extraction and capillary electrophoresis (SPE-CE), *TrAC, Trends Anal. Chem.*, 26 (2007) 664-678.
- [149] S.-W. Huang, M.-M. Hsieh, S.Y. Chang, Sensitive determination of sertraline by capillary electrophoresis with dispersive liquid-liquid microextraction and field-amplified sample stacking, *Talanta*, 101 (2012) 460-464.
- [150] R.S. Houk, V.A. Fassel, G.D. Flesch, H.J. Svec, A.L. Gray, C.E. Taylor, Inductively coupled argon plasma as an ion source for mass spectrometric determination of trace elements, *Anal. Chem.*, 52 (1980) 2283-2289.
- [151] D. Potter, A commercial perspective on the growth and development of the quadrupole ICP-MS market, *J. Anal. At. Spectrom.*, 23 (2008) 690-693.
- [152] F. Cubadda, Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry for the Determination of Elements and Elemental Species in Food: A Review, *J. AOAC Int.*, 87 (2004) 173-204.
- [153] K.L. Linge, K.E. Jarvis, *Quadrupole ICP-MS: Introduction to Instrumentation, Measurement Techniques and Analytical Capabilities*, *Geostand. Geoanal. Res.*, 33 (2009) 445-467.
- [154] R. Thomas, *Practical Guide to ICP-MS: A Tutorial for Beginners*, Second Edition, CRC press 2008.
- [155] J.A.C. Broekaert, *Inductively Coupled Plasmas in Analytical Atomic Spectrometry Eds.: A. Montaser and D. W. Golightly VCH, Weinheim, 2nd Edition. 1992, ISBN 3-527-28339-0, 984 pp., Hardcover, DM 296,—, Acta Hydrochim. Hydrobiol.*, 21 (1993) 327-328.
- [156] V. Havlicek, F. Turecek, *The Quadrupole Mass Analyzer and Ion Traps*, *Chem. Listy*, 114 (2020) 106-112.
- [157] J.W. Olesik, J.A. Kinzer, E.J. Grunwald, K.K. Thaxton, S.V. Olesik, The potential and challenges of elemental speciation by capillary electrophoresis-inductively coupled plasma mass spectrometry and electrospray or ion spray mass spectrometry, *Spectrochim. Acta, Part B*, 53 (1998) 239-251.
- [158] B. Michalke, *Capillary electrophoresis-inductively coupled plasma-mass spectrometry: A report on technical principles and problem solutions, potential, and limitations of this technology as well as on examples of application*, *Electrophoresis*, 26 (2005) 1584-1597.
- [159] J.W. Olesik, J.A. Kinzer, S.V. Olesik, *Capillary electrophoresis inductively-coupled plasma spectrometry for rapid elemental speciation*, *Anal. Chem.*, 67 (1995) 1-12.
- [160] J.E. Sonke, D.J. Furbish, V.J.M. Salters, Dispersion effects of laminar flow and spray chamber volume in capillary electrophoresis-inductively coupled plasma-mass spectrometry: a numerical and experimental approach, *J. Chromatogr. A*, 1015 (2003) 205-218.
- [161] D. Schaumlöffel, A. Prange, A new interface for combining capillary electrophoresis with inductively coupled plasma-mass spectrometry, *Fresenius' J. Anal. Chem.*, 364 (1999) 452-456.
- [162] B. Michalke, S. Lustig, P. Schramel, Analysis for the stability of platinum-containing species in soil samples using capillary electrophoresis interfaced on-line with inductively coupled plasma mass spectrometry, *Electrophoresis*, 18 (1997) 196-201.

- [163] B. Michalke, P. Schramel, Antimony speciation in environmental samples by interfacing capillary electrophoresis on-line to an inductively coupled plasma mass spectrometer, *J. Chromatogr. A*, 834 (1999) 341-348.
- [164] B. Michalke, P. Schramel, Iodine speciation in biological samples by capillary electrophoresis - inductively coupled plasma mass spectrometry, *Electrophoresis*, 20 (1999) 2547-2553.
- [165] B. Michalke, P. Schramel, Selenium speciation by interfacing capillary electrophoresis with inductively coupled plasma-mass spectrometry, *Electrophoresis*, 19 (1998) 270-275.
- [166] A.R. Timerbaev, K. Pawlak, S.S. Aleksenko, L.S. Foteeva, M. Matczuk, M. Jarosz, Advances of CE-ICP-MS in speciation analysis related to metalloproteomics of anticancer drugs, *Talanta*, 102 (2012) 164-170.
- [167] J. Bettmer, M. Montes Bayón, J. Ruiz Encinar, M.L. Fernández Sánchez, M.d.R. Fernández de la Campa, A. Sanz Medel, The emerging role of ICP-MS in proteomic analysis, *J. Proteomics*, 72 (2009) 989-1005.
- [168] M.C. Breadmore, J.R.E. Thabano, M. Dawod, A.A. Kazarian, J.P. Quirino, R.M. Guijt, Recent advances in enhancing the sensitivity of electrophoresis and electrochromatography in capillaries and microchips (2006–2008), *Electrophoresis*, 30 (2009) 230-248.
- [169] X. Wang, E. Masschelein, P. Hespel, E. Adams, A. Van Schepdael, Simultaneous determination of nitrite and nitrate in human plasma by on-capillary preconcentration with field-amplified sample stacking, *Electrophoresis*, 33 (2012) 402-405.
- [170] C.-C. Chen, S.-M. Wu, Y.-H. Huang, W.-K. Ko, H.-S. Kou, H.-L. Wu, On-line field-amplified sample stacking in capillary electrophoresis for analysis of amitriptyline and its metabolite nortriptyline in plasma, *Anal. Chim. Acta*, 517 (2004) 103-110.
- [171] L.L. Wang, H.F. Xu, H.Z. Ye, L.S. Yu, Z.Y. Lin, X.X. Liu, G.N. Chen, Field-amplified sample stacking in capillary electrophoresis for the determination of alkaloids in *Sinomenium acutum*, *Anal. Methods*, 5 (2013) 5267-5271.
- [172] F. Gao, X. Chen, X. Li, J. Li, H. Liu, L. Chen, Field-amplified sample injection combined with capillary electrophoresis for the simultaneous determination of five chlorophenols in water samples, *Electrophoresis*, 40 (2019) 1771-1778.
- [173] D. Moreno-González, M. Krulišová, L. Gámiz-Gracia, A.M. García-Campaña, Determination of tetracyclines in human urine samples by capillary electrophoresis in combination with field amplified sample injection, *Electrophoresis*, 39 (2018) 608-615.
- [174] X. Wu, Z. Xu, Z. Huang, C. Shao, Large volume sample stacking of cationic tetracycline antibiotics toward 10 ppb level analysis by capillary electrophoresis with UV detection, *Electrophoresis*, 37 (2016) 2963-2969.
- [175] A. Macià, F. Borrull, C. Aguilar, M. Calull, Improving sensitivity by large-volume sample stacking using the electroosmotic flow pump to analyze some nonsteroidal anti-inflammatory drugs by capillary electrophoresis in water samples, *Electrophoresis*, 24 (2003) 2779-2787.
- [176] M.I. Bailón-Pérez, A.M. García-Campaña, C. Cruces-Blanco, M. del Olmo Iruela, Large-volume sample stacking for the analysis of seven  $\beta$ -lactam antibiotics in milk samples of different origins by CZE, *Electrophoresis*, 28 (2007) 4082-4090.
- [177] É. Szökő, T. Tábi, A.S. Halász, M. Pálfi, K. Magyar, High sensitivity analysis of nitrite and nitrate in biological samples by capillary zone electrophoresis with transient isotachophoretic sample stacking, *J. Chromatogr. A*, 1051 (2004) 177-183.



- [178] S.-W. Huang, H.-F. Tzeng, Simultaneous determination of deoxycytidine diphosphate and deoxycytidine triphosphate by capillary electrophoresis with transient isotachophoretic stacking: A sensitive monitoring method for ribonucleotide reductase activity, *Electrophoresis*, 33 (2012) 536-542.
- [179] J. Horáková, J. Petr, V. Maier, J. Znaležiona, A. Staňová, J. Marák, D. Kaniansky, J. Ševčík, Combination of large volume sample stacking and dynamic pH junction for on-line preconcentration of weak electrolytes by capillary electrophoresis in comparison with isotachophoretic techniques, *J. Chromatogr. A*, 1155 (2007) 193-198.
- [180] C.H. Lin, T. Kaneta, On-line sample concentration techniques in capillary electrophoresis: Velocity gradient techniques and sample concentration techniques for biomolecules, *Electrophoresis*, 25 (2004) 4058-4073.
- [181] J.-B. Kim, Y. Okamoto, S. Terabe, On-line sample preconcentration of cationic analytes by dynamic pH junction in capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A*, 1018 (2003) 251-256.
- [182] M.R.N. Monton, K. Imami, M. Nakanishi, J.-B. Kim, S. Terabe, Dynamic pH junction technique for on-line preconcentration of peptides in capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A*, 1079 (2005) 266-273.
- [183] Y.H. Tak, G.W. Somsen, G.J. de Jong, Optimization of dynamic pH junction for the sensitive determination of amino acids in urine by capillary electrophoresis, *Anal. Bioanal. Chem.*, 401 (2011) 3275-3281.
- [184] A.T. Aranas, A.M. Guidote, J.P. Quirino, Sweeping and new on-line sample preconcentration techniques in capillary electrophoresis, *Anal. Bioanal. Chem.*, 394 (2009) 175-185.
- [185] Y. Hongyuan, Y. Gengliang, Q. Fengxia, L. Haiyan, C. Li, Determination of phenol pollutants in industrial waste water by MEKC and on-line sweeping technique, *Chem. J. Internet*, 6 (2004) 26.
- [186] O. Núñez, J.-B. Kim, E. Moyano, M.T. Galceran, S. Terabe, Analysis of the herbicides paraquat, diquat and difenzoquat in drinking water by micellar electrokinetic chromatography using sweeping and cation selective exhaustive injection, *J. Chromatogr. A*, 961 (2002) 65-75.
- [187] S.-W. Sun, H.-M. Tseng, Sensitivity improvement on detection of Coptidis alkaloids by sweeping in capillary electrophoresis, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 37 (2005) 39-45.
- [188] P. Kubalczyk, G. Chwatko, R. Glowacki, Fast and simple MEKC sweeping method for determination of thiosulfate in urine, *Electrophoresis*, 37 (2016) 1155-1160.
- [189] H.Y. Liu, T.J. Hwang, I.L. Tsai, C.H. Kuo, Use of high-conductivity sample solution with sweeping-micellar electrokinetic capillary chromatography for trace-level quantification of paliperidone in human plasma, *Electrophoresis*, 36 (2015) 534-542.
- [190] Z.Y. Liu, P. Sam, S.R. Sirimanne, P.C. McClure, J. Grainger, D.G. Patterson, Field-amplified sample stacking in micellar electrokinetic chromatography for on-column sample concentration of neutral molecules, *J. Chromatogr. A*, 673 (1994) 125-132.
- [191] I. Oleđzka, Z. Kulińska, A. Prah, T. Ba,czek, Simultaneous Separation of Eight Benzodiazepines in Human Urine Using Field-Amplified Sample Stacking Micellar Electrokinetic Chromatography, *J. Anal. Toxicol.*, 39 (2015) 436-443.
- [192] I. Oleđzka, P. Kowalski, A. Plenis, T. Ba,czek, Evaluation of various approaches to the isolation of steroid hormones from urine samples prior to FASS-MEKC analysis, *Electrophoresis*, 38 (2017) 1632-1643.
- [193] S. Shi, W. Li, Y. Liao, Z. Cai, H. Liu, Online concentration of aristolochic acid I and II in Chinese medicine preparations by micellar electrokinetic chromatography, *J. Chromatogr. A*, 1167 (2007) 120-124.

- [194] J.P. Quirino, P.R. Haddad, Online sample preconcentration in capillary electrophoresis using analyte focusing by micelle collapse, *Anal. Chem.*, 80 (2008) 6824-6829.
- [195] J.P. Quirino, Micelle to solvent stacking of organic cations in capillary zone electrophoresis with electrospray ionization mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, 1216 (2009) 294-299.
- [196] D. Figeys, Y. Zhang, R. Aebersold, Optimization of solid phase microextraction capillary zone electrophoresis mass spectrometry for high sensitivity protein identification, *Electrophoresis*, 19 (1998) 2338-2347.
- [197] L.C. Medrano, J.F. Flores-Aguilar, G. Islas, J.A. Rodriguez, I.S. Ibarra, Solid-Phase Extraction and Large-Volume Sample Stacking-Capillary Electrophoresis for Determination of Artificial Sweeteners in Water Samples, *Food Anal. Meth.*, 12 (2019) 526-533.
- [198] X. Zhou, M. He, B. Chen, Q. Yang, B. Hu, Membrane supported liquid-liquid-liquid microextraction combined with field-amplified sample injection CE-UV for high-sensitivity analysis of six cardiovascular drugs in human urine sample, *Electrophoresis*, 37 (2016) 1201-1211.
- [199] W.G. Henderson, M.J. How, G.R. Kennedy, E.F. Mooney, The interconversion of aqueous boron species and the interaction of borate with diols: a  $^{11}\text{B}$  n.m.r. study, *Carbohydr. Res.*, 28 (1973) 1-12.
- [200] G.R. Kennedy, M.J. How, The interaction of sugars with borate: an n.m.r. spectroscopic study, *Carbohydr. Res.*, 28 (1973) 13-19.
- [201] D.H. Kim, B.N. Marbois, K.F. Faull, C.D. Eckhart, Esterification of borate with  $\text{NAD}^+$  and  $\text{NADH}$  as studied by electrospray ionization mass spectrometry and  $^{11}\text{B}$  NMR spectroscopy, *J. Mass Spectrom.*, 38 (2003) 632-640.
- [202] S.G. Penn, H. Hu, P.H. Brown, C.B. Lebrilla, Direct Analysis of Sugar Alcohol Borate Complexes in Plant Extracts by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Fourier Transform Mass Spectrometry, *Anal. Chem.*, 69 (1997) 2471-2477.
- [203] S. Hoffstetterkuhn, A. Paulus, E. Gassmann, H.M. Widmer, Influence of borate complexation on the electrophoretic behavior of carbohydrates in capillary electrophoresis, *Anal. Chem.*, 63 (1991) 1541-1547.
- [204] S. Chapelle, J.-F. Verchere, A  $^{11}\text{B}$  and  $^{13}\text{C}$  nmr determination of the structures of borate complexes of pentoses and related sugars, *Tetrahedron*, 44 (1988) 4469-4482.
- [205] J.P. Quirino, CZE and ESI-MS of Borate-Sugar Complexes, *Chromatographia*, 72 (2010) 503-510.
- [206] J.P. Landers, R.P. Oda, M.D. Schuchard, Separation of boron-complexed diol compounds using high-performance capillary electrophoresis, *Anal. Chem.*, 64 (1992) 2846-2851.
- [207] T. Tadey, W.C. Purdy, Capillary electrophoretic separation of nucleotide isomers via complexation with cyclodextrin and borate, *J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl.*, 657 (1994) 365-372.
- [208] M. Stefansson, M. Novotny, Electrophoretic resolution of monosaccharide enantiomers in borate oligosaccharide complexation media, *J. Am. Chem. Soc.*, 115 (1993) 11573-11580.
- [209] T. Jira, A. Bunke, M.G. Schmid, G. Gübitz, Chiral resolution of diols by capillary electrophoresis using borate-cyclodextrin complexation, *J. Chromatogr. A*, 761 (1997) 269-275.
- [210] S. Kodama, A. Yamamoto, R. Iio, K. Sakamoto, A. Matsunaga, K. Hayakawa, Chiral ligand exchange capillary electrophoresis using borate anion as a central ion, *Analyst*, 129 (2004) 1238-1242.
- [211] S. Aizawa, A. Yamamoto, S. Kodama, Mechanism of enantioseparation of DL-pantothenic acid in ligand exchange capillary electrophoresis using a diol-borate system, *Electrophoresis*, 27 (2006) 880-886.
- [212] E.A. Taha, N.N. Salama, S. Wang, Enantioseparation of cetirizine by chromatographic methods and discrimination by  $^1\text{H}$ -NMR, *Drug Test. Anal.*, 1 (2009) 118-124.

- [213] A.M. Snowman, S.H. Snyder, Cetirizine: Actions on neurotransmitter receptors, *J. Allergy Clin. Immunol.*, 86 (1990) 1025-1028.
- [214] D. Wang, F. Hanotte, C. De Vos, P.J.A. Clement, Effect of cetirizine, levocetirizine, and dextrocetirizine on histamine-induced nasal response in healthy adult volunteers, *Allergy*, 56 (2001) 339-343.
- [215] S. Nojavan, A.R. Fakhari, Chiral separation and quantitation of cetirizine and hydroxyzine by maltodextrin-mediated CE in human plasma: Effect of zwitterionic property of cetirizine on enantioseparation, *Electrophoresis*, 32 (2011) 764-771.
- [216] J. Chen, Y. Du, F. Zhu, B. Chen, Glycogen: A novel branched polysaccharide chiral selector in CE, *Electrophoresis*, 31 (2010) 1044-1050.
- [217] X. Deng, B. De Cock, R. Vervoort, D. Pamperin, E. Adams, A. Van Schepdael, Development of a validated capillary electrophoresis method for enantiomeric purity control and quality control of levocetirizine in a pharmaceutical formulation, *Chirality*, 24 (2012) 276-282.
- [218] J. Chen, Y. Du, F. Zhu, B. Chen, Evaluation of the enantioselectivity of glycogen-based dual chiral selector systems towards basic drugs in capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A*, 1217 (2010) 7158-7163.
- [219] Z.-I. Szabó, C. Tóth, G. Hancu, D.-L. Muntean, Simultaneous Chiral Separation of Four H1-Antihistamines by Capillary Zone Electrophoresis Using a Dual Cyclodextrin System, *Chromatographia*, 78 (2015) 1377-1384.
- [220] M. Van Duin, J.A. Peters, A.P.G. Kieboom, H. Van Bekkum, Studies on borate esters 1: The pH dependence of the stability of esters of boric acid and borate in aqueous medium as studied by <sup>11</sup>B NMR, *Tetrahedron*, 40 (1984) 2901-2911.
- [221] S. Kodama, A. Yamamoto, R. Iio, S.-i. Aizawa, K. Nakagomi, K. Hayakawa, Chiral ligand exchange micellar electrokinetic chromatography using borate anion as a central ion, *Electrophoresis*, 26 (2005) 3884-3889.
- [222] Y. François, K. Zhang, A. Varenne, P. Gareil, New integrated measurement protocol using capillary electrophoresis instrumentation for the determination of viscosity, conductivity and absorbance of ionic liquid–molecular solvent mixtures, *Anal. Chim. Acta*, 562 (2006) 164-170.
- [223] K.L. Rundlett, D.W. Armstrong, Examination of the origin, variation, and proper use of expressions for the estimation of association constants by capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A*, 721 (1996) 173-186.
- [224] L. Asensi-Bernardi, L. Escuder-Gilabert, Y. Martín-Biosca, S. Sagrado, M.J. Medina-Hernández, Characterizing the interaction between enantiomers of eight psychoactive drugs and highly sulfated- $\beta$ -cyclodextrin by counter-current capillary electrophoresis, *Biomedical Chromatography*, 28 (2014) 120-126.
- [225] A.W. Lantz, M.A. Rodriguez, S.M. Wetterer, D.W. Armstrong, Estimation of association constants between oral malodor components and various native and derivatized cyclodextrins, *Anal. Chim. Acta*, 557 (2006) 184-190.
- [226] I. Peña, S. Mata, A. Martín, C. Cabezas, A.M. Daly, J.L. Alonso, Conformations of d-xylose: the pivotal role of the intramolecular hydrogen-bonding, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 15 (2013) 18243-18248.
- [227] N. Le Barc'H, J.M. Grossel, P. Looten, M. Mathlouthi, Kinetic study of the mutarotation of D-glucose in concentrated aqueous solution by gas-liquid chromatography, *Food Chem.*, 74 (2001) 119-124.

- [228] H. Kersters-Hilderson, M. Claeysens, E. Van Doorslaer, C.K. De Bruyne, Determination of the anomeric configuration of D-xylose with D-xylose isomerases, *Carbohydr. Res.*, 47 (1976) 269-273.
- [229] World Health Organization, [https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1), staženo 2. prosince 2021.
- [230] J. Svoboda, K. Syslová, P.J.C.I. Kačer, Cílený transport platinových cytostatik, *Chem. Listy*, 110 (2016) 909-916.
- [231] E. Wexselblatt, D. Gibson, What do we know about the reduction of Pt(IV) pro-drugs?, *J. Inorg. Biochem.*, 117 (2012) 220-229.
- [232] I. Monnet, S. Brienza, F. Hugret, S. Voisin, J. Gastiburu, J.C. Saltiel, P. Soulié, J.P. Armand, E. Cvitkovic, H. de Cremoux, Phase II study of oxaliplatin in poor-prognosis non-small cell lung cancer (NSCLC), *Eur. J. Cancer*, 34 (1998) 1124-1127.
- [233] P. Li, X. Zhang, H. Wang, L. Wang, T. Liu, L. Du, Y. Yang, C. Wang, MALAT1 Is Associated with Poor Response to Oxaliplatin-Based Chemotherapy in Colorectal Cancer Patients and Promotes Chemoresistance through EZH2, *Mol. Cancer Ther.*, 16 (2017) 739.
- [234] P. Chollet, M.A. Bensmaïne, S. Brienza, C. Deloche, H. Curé, H. Caillet, E. Cvitkovic, Single agent activity of oxaliplatin in heavily pretreated advanced epithelial ovarian cancer, *Anna. Oncol.*, 7 (1996) 1065-1070.
- [235] J.L. Misset, H. Bleiberg, W. Sutherland, M. Bekradda, E. Cvitkovic, Oxaliplatin clinical activity: a review, *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 35 (2000) 75-93.
- [236] J.L. Misset, Oxaliplatin in practice, *Br. J. Cancer*, 77 (1998) 4-7.
- [237] H. Ibrahim, R.-Y. Mauvernay, Pharmaceutically stable preparation of oxaliplatin, US, 1998.
- [238] S.C. Upadhyay, M.K. Pananchukunnath, A.K. Singh, D. Jain, D.J. Parshotamdas, R. Mukharjee, A.C. Burman, stable oxaliplatin formulation, US, 2010.
- [239] D. Whittaker, A. Liu, Acid containing oxaliplatin formulations, US, 2005.
- [240] A. Parrella, M. Lavorgna, E. Criscuolo, C. Russo, V. Fiumano, M. Isidori, Acute and chronic toxicity of six anticancer drugs on rotifers and crustaceans, *Chemosphere*, 115 (2014) 59-66.
- [241] D.L. Dayanidhi, B.C. Thomas, J.S. Osterberg, M. Vuong, G. Vargas, S.K. Kwartler, E. Schmaltz, M.M. Dunphy-Daly, T.F. Schultz, D. Rittschof, W.C. Eward, C. Roy, J.A. Somarelli, Exploring the Diversity of the Marine Environment for New Anti-cancer Compounds, *Frontiers in Marine Science*, 7 (2021).
- [242] I. Ali, A. Haque, W.A. Wani, K. Saleem, M. Al Za'abi, Analyses of anticancer drugs by capillary electrophoresis: a review, *Biomed. Chromatogr.*, 27 (2013) 1296-1311.
- [243] S. Nussbaumer, S. Fleury-Souverain, J. Schappler, S. Rudaz, J.-L. Veuthey, P. Bonnabry, Quality control of pharmaceutical formulations containing cisplatin, carboplatin, and oxaliplatin by micellar and microemulsion electrokinetic chromatography (MEKC, MEEKC), *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 55 (2011) 253-258.
- [244] B.W. Wenclawiak, M. Wollmann, Separation of platinum(II) anti-tumour drugs by micellar electrokinetic capillary chromatography, *J. Chromatogr. A*, 724 (1996) 317-326.
- [245] D. Baron, J. Rozsypal, A. Michel, E. Secret, J.-M. Siaugue, T. Pluháček, J. Petr, Study of interactions between carboxylated core shell magnetic nanoparticles and polymyxin B by capillary electrophoresis with inductively coupled plasma mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, 1609 (2020) 460433.

[246] A. Šebestová, D. Baron, R. Pechancová, T. Pluháček, J. Petr, Determination of oxaliplatin enantiomers at attomolar levels by capillary electrophoresis connected with inductively coupled plasma mass spectrometry, *Talanta*, 205 (2019) 120151.

[247] <https://web.natur.cuni.cz/gas/peakmaster.html>, staženo 1. října 2021.

## 7 Seznam zkratek

4-MBS	4-methylbenzensulfonát
AAS	atomová absorpční spektrometrie
AFMC	zafokusování analytu micelárním kolapsem
AN	agregační číslo
BGE	základní elektrolyt
C14TAB	tetradecyl trimethylamonium bromid
CAPSO	kyselina cyklohexylaminohydroxypropansulfonová
CD	cyklodextrin
CE	kapilární elektroforéza
CGE	kapilární gelová elektroforéza
CIEF	kapilární izoelektrická fokusace
CITP	kapilární izotachoforéza
CMC	kritická micelární koncentrace
CS	chirální selektor
CZE	kapilární zónová elektroforéza
DAD	detektor diodového pole
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EOF	elektroosmotický tok
ESI	ionizace elektrosprejem
FASI	polem zesílené dávkování vzorku
FASS	zakoncentrování vzorku zesílením pole
GC	plynová chromatografie
HDAS- $\beta$ -CD	heptakis(2,3-di- <i>O</i> -acetyl-6- <i>O</i> -sulfo)-beta-cyklodextrin
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HP- $\beta$ -CD	hydroxypropyl-beta-cyklodextrin
CHES	kyselina cyklohexylaminoethansulfonová
ICP-MS	hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem
ICP-OES	optická emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem
IS	vnitřní standard
LLE	extrakce kapalina-palina
LLLME	mikroextrakce kapalina-kapalina-kapalina

LOD	mez detekce
LOQ	mez stanovitelnosti
LSSER	lineární solvatační energie
LVSS	zakoncentrování vzorku z velkého objemu
MEKC	micelární elektrokinetická chromatografie
MS	hmotnostní spektrometrie
MSS	zakoncentrování na rozhraní micely-rozpouštědlo
pI	izoelektrický bod
SC	cholát sodný
SD	směrodatná odchylka
SDS	dodecyl sulfát sodný
SPE	extrakce tuhou fází
S-β-CD	sulfatovaný-beta-cyklodextrin
TLC	tenkovrstvná chromatografie
UV/Vis	ultrafialový/viditelný

## 8 Životopis

### Osobní údaje

Jméno: Petra Švecová  
Adresa: Žlutava 243, 763 61, Žlutava  
E-mail: [svecova.petra@post.cz](mailto:svecova.petra@post.cz)

### Vzdělání

- ❖ 08/2011 – 06/2014  
Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta, Katedra analytické chemie, bakalářský obor Chemie, obdržel titul Bc.  
bakalářská práce: „Separace optických isomerů kapilární elektroforézou“
- ❖ 08/2014 – 05/2016  
Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta, Katedra analytické chemie, magisterský navazující obor Analytická chemie, obdržel titul Mgr.  
diplomová práce: „Analýza optických isomerů kapilárními elektromigračními technikami“
- ❖ 09/2017 – současnost  
Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta, Katedra analytické chemie, doktorské studium oboru Analytická chemie

### Stáže

- ❖ 09 – 12/2019  
Vědecko-výzkumná stáž – Sorbonne Université (Physico-chimie des Electrolytes et Nanosystemes Interfaciaux), Paříž, Francie

### Projekty

- ❖ Grantová agentura ČR, 19-23033S, „Zlepšení citlivosti detekce v chirálních separacích pomocí kapilární elektroforézy ve spojení s ESI-MS nebo ICP-MS“, člen řešitelského týmu
- ❖ OP PIK APLIKACE, CZ.01.1.02/0.0/0.0/16\_084/0010317, „TFC-X – Charakterizace, optimalizace a validace GMP-grade výroby nového biotechnologického léčivého přípravku“, člen řešitelského týmu



- ❖ Grantová agentura ČR, 20-07350S „Elektrochemické a analytické aspekty transportu návykových a psychotropních látek přes modelové biologické bariery“, člen řešitelského týmu
- ❖ Interní grantová agentura UP Olomouc, IGA\_PrF\_2017\_020, „Matricový efekt a mez detekce“, člen řešitelského týmu
- ❖ Interní grantová agentura UP Olomouc, IGA\_PrF\_2018\_027, „Efektivní zpracování vzorků se složitými matricemi“, člen řešitelského týmu
- ❖ Interní grantová agentura UP Olomouc, IGA\_PrF\_2019\_028, „Inovativní metody analýzy vzorků se složitými matricemi“, člen řešitelského týmu
- ❖ Interní grantová agentura UP Olomouc, IGA\_PrF\_2020\_030, „Moderní trendy v analýze vzorků se složitými matricemi“, člen řešitelského týmu
- ❖ Interní grantová agentura UP Olomouc, IGA\_PrF\_2021\_021, „Nové trendy v analýze komplexních vzorků“, člen řešitelského týmu

### **Pedagogická činnost**

- ❖ LS 2017/2018 – ACH/ACC (Cvičení z analytické chemie – 6 hod./týd.)
- ❖ LS 2018/2019 – ACH/ACC (Cvičení z analytické chemie – 6 hod./týd.)
- ❖ LS 2019/2020 – ACH/ACC (Cvičení z analytické chemie – 6 hod./týd.)

### **Publikace**

- ❖ **Petra Švecová**, Jan Petr, Separation of cetirizine enantiomers by capillary electrophoresis with a dual selector system based on borate-glucose complexes and sulfated- $\beta$ -cyclodextrin. *Talanta* 198 (2019) 154-158.
- ❖ **Petra Švecová**, Daniel Baron, Kevin A. Schug, Tomáš Pluháček, Jan Petr, Ultra-trace determination of oxaliplatin impurities by sweeping-MEKC-ICP-MS. *Microchemical Journal* 172 (2022) 106967.
- ❖ Ester Drastíková, Klára Konderlová, Andrea Šebestová, Daniel Baron, **Petra Švecová**, Petra Táborská, Kateřina Vítková, Veronika Pospíšilová, Serhiy Forostyak, Zdeněk Kořístek, Ludmila Porubová, Jan Petr, Determination of total protein content in biomedical products by the PDMS-assisted lab-in-a-syringe assay using 3D printed scaffolds removal. *Journal of Analytical Science and Technology* 12 (2021) 56.

## Konference

- ❖ Chiranal 2018 Olomouc, 29. 1. - 1. 2. 2018  
Poster: A pilot study of the effect of glucose on the chiral separation of cetirizine
- ❖ ISSS 2018 Slovensko - Jasná, 17. 6. - 20. 6. 2018  
Poster: Separation of cetirizine enantiomers by capillary electrophoresis with dual selector system based on borate-glucose complexes and sulfated- $\beta$ -cyclodextrin.
- ❖ Česká chromatografická škola - HPLC 2019 - Zaječí, 12. 5. - 15. 5. 2019  
Poster: Separation of oxaliplatin impurities by micellar electrokinetic chromatography
- ❖ 72. sjezd chemiků Praha, 6. 9. - 9. 9. 2020  
Poster: Syntéza a charakterizace magnetických „core-shell“ nanočástic s karboxylovými skupinami na povrchu
- ❖ Česká konference hmotnostní spektrometrie 2021 Praha, 11. 10. - 12. 10. 2021  
Přednáška: Ultra-trace determination of oxaliplatin and its compendial impurities by sweeping-MEKC-ICP-MS

## Další aktivity

- ❖ Účast na popularizačních akcích (Veletrh vědy a výzkumu, Muzejní noc, Noc vědců, Dětská univerzita, Den otevřených dveří) a exkurzí škol.
- ❖ Oponent diplomových prací Ivety Hlouškové, Kateřiny Holušové, Michaely Kotkové, Evy Müllerové a bakalářské práce Matěje Horného.
- ❖ Tajemník chemické olympiády pro Olomoucký kraj.

## Přílohy

Příloha č. 1: **P. Švecová**, J. Petr, Separation of cetirizine enantiomers by capillary electrophoresis with a dual selector system based on borate-glucose complexes and sulfated- $\beta$ -cyclodextrin. *Talanta* 198 (2019) 154-158.

Příloha č.2: **P. Švecová**, D. Baron, K. A. Schug, T. Pluháček, J. Petr, Ultra-trace determination of oxaliplatin impurities by sweeping-MEKC-ICP-MS. *Microchemical Journal* 172 (2022) 106967.