

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Fakulta přírodovědecká

Katedra analytické chemie

DIPLOMOVÁ PRÁCE

2017

Bc. Pavlína Svobodová

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Fakulta přírodovědecká

Katedra analytické chemie

**Separace chirálních látek pomocí kapilární elektroforézy s využitím
nového derivátu vankomycinu**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor práce: Bc. Pavlína Svobodová

Studijní obor: Analytická chemie

Vedoucí bakalářské práce: doc. RNDr. Jan Petr, Ph.D.

Olomouc 2017

SOUHRN

Tato diplomová práce se zabývá chirální separací léčiv pomocí nově nasyntetizovaného derivátu vankomycinu. Hlavním cílem práce je ověřit možnost aplikace nového chirálního selektoru (CS) v oblasti kapilární elektroforézy a zjistit, zda poskytuje nové možnosti použití v porovnání se strukturně podobným CS vankomycinem.

V teoretické části je popsán princip elektromigračních technik a možnosti ovlivnění separace za využití kapilární elektroforézy (CE). Poté je vysvětlen pojem chiralita a možnosti chirální separace. Větší důraz je kladen na popsání chirálních selektorů v CE. Poslední kapitola vysvětluje dále použité statistické výpočty pro porovnání výsledků.

Část práce nazvaná „Výsledky a diskuze“ obsahuje informace o postupném vývoji metody pro rozlišení modelových enantiomerů analytu. Nejprve byla naměřena elektroforetická mobilita chirálního selektoru v prostředích o různé hodnotě pH. Poté byl CS použit v několika metodách, zahrnující ovlivnění elektroosmotického toku jak pomocí pH, tak i změnou viskozity prostředí. Separace je dále ovlivněna přidavkem povrchově aktivní látky do základního elektrolytu a dále interakcí analytu či CS s funkční skupinou navázanou na povrch nanočástic. Statistickým zpracováním dat je zvolena nejvhodnější metoda.

Ke konci práce jsou získané výsledky porovnány s těmi získanými při použití vankomycinu jako chirálního selektoru.

SUMMARY

This Master's thesis deals with chiral separation of drugs using newly synthesized derivate of vancomycin. The main purpose of this thesis is to verify the possible application of new CS in capillary electrophoresis. Also the purpose is to find out if the new CS has different application to structurally similar CS vancomycin.

In the theoretical part there is described principle of electromigration techniques and possible ways to affect the separation process in capillary electrophoresis (CE). Then there is explained what the term chirality means and the possibilities of chiral separation. The description of chiral selectors is emphasized. The last chapter clarifies statistical calculations for comparison of results used in later parts of this thesis.

The part named "Results and discussion" consists of step-by-step information about development of the method used for resolution of model enantiomers. At first, the electrophoretic mobility of the chiral selector in media with different value of pH was measured. Next, the CS was used in several methods including ones with changed electroosmotic flow using different pH and viscosity of the background electrolyte was changed. Next, the separation was adjusted with addition of surface active compound into the background electrolyte and with interactions between the analyte or the CS and functional groups bonded to the surface of nanoparticles. Using statistical calculation the most suitable method is chosen.

The results are compared to ones obtained using vancomycine as chiral selector at the end of the results and discussion part.

BIBLIOGRAFICKÁ IDENTIFIKACE

Jméno a příjmení autora	Pavčina Svobodová
Název práce	Separace chirálních látek pomocí kapilární elektroforézy s využitím nového derivátu vankomycinu
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Katedra analytické chemie
Vedoucí práce	doc. RNDr. Jan Petr, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2017
Abstrakt	Tato diplomová práce se zabývá chirální separací léčiv pomocí nově nasyntetizovaného derivátu vankomycinu. Hlavním cílem práce je ověřit možnost použití nového chirálního selektoru v oblasti kapilární elektroforézy a zjistit, zda má odlišné možnosti použití oproti strukturně podobnému CS vankomycinu.
Klíčová slova	kapilární elektroforéza, chirální separace, vankomycin, micelární elektrokinetická chromatografie, nanočástice
Počet stran	55
Počet příloh	0
Jazyk	Český

BIBLIOGRAPHICAL IDENTIFICATION

Author's first name and surname	Pavĺina Svobodov
Title	Separation of Chiral Compounds Using Capillary Electrophoresis Using New Derivate of Vancomycin
Type of thesis	Master's
Department	Department of Analytical Chemistry
Supervisor	doc. RNDr. Jan Petr, Ph.D.
The year of presentation	2017
Abstract	This Master's thesis deals with chiral separation of drugs using newly synthesized derivate of vancomycin. The main purpose of this thesis is to verify the possible application of the new chiral selector in capillary electrophoresis. Also the purpose is to find out if the new CS has different application to structurally similar CS vancomycin.
Keywords	capillary electrophoresis, chiral separation, vancomycin, micellar electrokinetic chromatography, nanoparticles
Number of pages	55
Number of appendices	0
Language	Czech

Chtěla bych poděkovat doc. Janu Petrovi za vedení diplomové práce, prof. Danielu W. Armstrongovi a jeho skupině za poskytnutí chirálního selektoru a spolupráci při mém pobytu na University of Texas at Arlington a Nadačnímu fondu UP za finanční podporu.

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

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

V Olomouci dne

Vlastnoruční podpis

OBSAH

1.	ÚVOD	1
2.	TEORETICKÁ ČÁST	2
2.1.	Kapilární elektroforéza.....	2
2.1.1.	Základní představa o rychlosti migrace v CZE	2
2.1.2.	Elektroosmotický tok	4
2.1.3.	Ovlivnění separace pomocí pH BGE	5
2.1.4.	Ovlivnění separace výběrem povrchu vnitřní stěny kapiláry.....	6
2.1.5.	Ovlivnění separace pomocí volby iontové síly pufru.....	6
2.1.6.	Rozlišení v CZE	7
2.1.7.	Detekční systémy pro CZE	7
2.2.	Chiralita.....	9
2.2.1.	Získávání čistých opticky aktivních látek	11
2.2.2.	Chirální selektory	11
2.2.3.	Cyklodextriny.....	12
2.2.4.	Chirální crown ethery.....	13
2.2.5.	Makrocyclická antibiotika	13
2.2.6.	Pokrytí vnitřní stěny kapiláry chirálním selektorem	16
2.3.	Povrchově aktivní látky.....	16
2.3.1.	Povrchově aktivní látky v CE	17
2.4.	Nanočástice oxidu železa	18
2.4.1.	Výroba nanočástic železa	19
2.4.2.	Charakterizace nanočástic	20
2.5.	Vlastnosti analytů.....	21
2.5.1.	Ibuprofen.....	21
2.6.	Statistické zpracování dat.....	22
2.6.1.	Dean-Dixonův test	22
2.6.2.	Test shody středních hodnot, „test shodnosti“	23
3.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	26
3.1.	Přístrojové vybavení a pomůcky	26
3.2.	Chemikálie	26
4.	VÝSLEDKY A DISKUZE	27
4.1.	Měření elektroforetické mobility selektoru vankomycinu CDP.....	27
4.2.	Měření v oblasti nízké rychlosti EOF - ovlivnění pomocí pH	31
4.3.	Ovlivnění EOF pomocí viskozity.....	31
4.4.	Ovlivnění EOF dynamickým povrchem vnitřního povrchu kapiláry	32
4.5.	Ovlivnění EOF kovalentním povrchem vnitřního povrchu kapiláry	32
4.6.	Separace v oblasti vysokých hodnot pH a v PVA kapiláře	32

4.7.	Micelární elektrokinetická chromatografie	33
4.8.	Přídavek organického aditiva do BGE obsahující PAL	37
4.9.	Přídavek nanočástic.....	37
4.10.	Chirální separace ibuprofenu pomocí vankomycinu	38
5.	ZÁVĚR	40
6.	LITERATURA.....	41
7.	SEZNAM ZKRATEK.....	44

1. ÚVOD

Separace optických izomerů je neustále se rozvíjející oblastí chemie. Důvodem pro její důležitost je rozdílné chování jednotlivých enantiomerů látky v asymetrickém prostředí, jejímž typickým příkladem je lidský organismus. V symetrickém prostředí (například vodného roztoku) mají stejné vlastnosti a tudíž je obtížné je rozlišit. Díky těmto skutečnostem hrají chirální separace důležitou roli mimo jiné ve farmaceutickém průmyslu.

Jako příklad stavu, kdy dva izomery léčiva mají odlišné biologické účinky je uváděna látka thalidomid (aktivní látka léku Contergan). Zatímco optický izomer (R)- působí proti těhotenským nevolnostem, optický izomer (S)- je silným teratogenem (způsobuje znetvoření především horních končetin plodu). Z tohoto důvodu je nutné sledovat chirální čistotu léčiv před jejich uvedením na trh.

V současné době existuje již řada postupů pro rozlišení enantiomerů látky za použití řady analytických technik. Jedny z nich jsou i kapilární elektroforéza a kapalinová chromatografie. Během práce byla vyvinuta metoda pro chirální separaci léčiva ibuprofenu pomocí nového chirálního selektoru. Tento selektor byl získán ve spolupráci se skupinou prof. Daniela W. Armstronga z University of Texas at Arlington a doposud byl použit pouze v oblasti kapalinové chromatografie. Cílem práce je ověřit použitelnost tohoto selektoru v oblasti kapilární elektroforézy a prokázat jeho odlišnou aplikovatelnost oproti strukturně podobnému vankomycinu.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Kapilární elektroforéza

Kapilární zónová elektroforéza (CZE) je moderní analytická metoda, která spadá do oblasti elektromigračních metod. Ty poskytují separaci jednotlivých látek působením vnějšího elektrického pole. To způsobí elektrokinetické jevy – elektroforézu a elektroosmózu. Elektroforéza je označení pohybu nabitých částic v elektrickém poli. Elektroosmóza je objemový tok kapaliny způsoben působením elektrického pole [1,2].

V CZE je separace způsobena rozdílnou rychlostí pohybu nabitých částic ve stejnosměrném elektrickém poli. Probíhá především v křemenných kapilárách vyplněných tekutým prostředím. Toto prostředí je označováno jako pufr, elektrolyt či základní elektrolyt (BGE). Buď se jedná o vodný roztok, organické rozpouštědlo či jejich směs s přidavkem pufru pro udržení konstantní hodnoty pH [1].

Výhody této metody spočívají především v relativně vysoké účinnosti a rychlosti metody, nízkých nákladech a vysoké životnosti kapilár (v porovnání s HPLC kolonami) a nízké spotřebě vzorku i chemikálií. CZE je možno použít na velké množství odlišných typů sloučenin bez nutnosti změny kapiláry. Například je možné použít jednu kapiláru pro měření polárních látek a látek nepolárních [2].

2.1.1. Základní představa o rychlosti migrace v CZE

Elektroforetická separace je založena na rozdílné rychlosti pohybu nabitých částic ve stejnosměrném elektrickém poli. V prostředí kapiláry naplněné BGE na iont působí dvě síly. Tou první je elektrostatická síla F , kterou lze vypočítat pomocí rovnice č. 1:

$$F = qE \quad (1)$$

Kde F je elektrostatická síla, q je náboj iontu a E je intenzita elektrického pole v jednotkách $[V \cdot cm^{-1}]$ [2].

Tou druhou silou, která působí v opačném směru oproti F je třecí síla F' , pro kterou platí Stoeksova rovnice pro kulové částice. Tu lze vypočítat pomocí rovnice č. 2:

$$F' = -6\pi\eta r v_{ep} \quad (2)$$

Kde F' je třecí síla, η je viskozita prostředí [$\text{kg m}^{-1}\text{s}^{-1}$], r je iontový poloměr [m] a v_{ep} je elektroforetická rychlost [ms^{-1}] [1].

Během elektroforézy jsou tyto síly v rovnováze (viz rovnice č. 3):

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

Případ rovnováhy elektrostatické a třecí síly [1].

A zároveň platí rovnice č. 4:

$$\mu_{ep} = \frac{q}{6\pi r \eta} \quad (4)$$

Kde μ_{ep} je elektroforetická mobilita přímo úměrná náboji iontu a nepřímo úměrná iontovému poloměru r [m] a viskozitě prostředí η [$\text{kg m}^{-1}\text{s}^{-1}$] [1].

Ze vztahů popsaných výše a jejich rovnováhy vyplývá závislost č. 5:

$$v_{ep} = \mu_{ep} E \quad (5)$$

Závislost elektroforetické rychlosti, která je přímo úměrná elektroforetické mobilitě a velikosti intenzity elektrického pole [1].

Tudíž při dělení směsi obsahující neutrální molekuly, kladně i záporně nabitě ionty o rozdílné velikosti poloměru a velikosti náboje bude situace následující: Do vstupní („inletové“) vialky vzorku je vložena anodická část kapiláry a do výstupní („outletové“) vialky katodická. V tomto případě budou kladně nabitě ionty migrovat k záporně nabitě elektrodě na konci kapiláry a ty záporně nabitě ke kladně nabitému začátku elektrody. Rychlost, jakou se budou pohybovat, závisí přímo úměrně na náboji (q) a nepřímo úměrně na velikosti iontu (r). Neutrální molekuly o (q) = 0 nepodléhají migraci. Navíc je mobilita ovlivněna změnami teploty, protože změna teploty ovlivní viskozitu prostředí, disociaci a tudíž i v_{ep} [2].

2.1.2. Elektroosmotický tok

Po vložení pufru do kapiláry dochází k nabití jejího vnitřního povrchu. A to pomocí ionizace povrchu či adsorpce částic z elektrolytu na vnitřní stěnu kapiláry. V případě křemenných kapilár, které obsahují povrchové silanolové skupiny (Si-OH), dochází k jejich ionizaci (Si-O⁻) při pH BGE vyšším než 3. Tyto záporně nabitě skupiny poté přitahují kladně nabitě ionty z BGE. Tímto způsobem je na vnitřní stěně kapiláry vytvořena primární vrstva kationtů, označovaná jako fixní vrstva či Sternova vrstva [1,2].

Ta ale nevytváří dostatečný kladný náboj pro kompenzaci záporného náboje stěny. Z tohoto důvodu je vytvořena sekundární vrstva kationtů. Tato vrstva je z důvodu větší vzdálenosti od povrchu přitahována méně, je označována jako mobilní či difuzní vrstva [1,2]. Pokud je do takto popsaného prostředí vloženo elektrické napětí, dochází k migraci difuzní vrstvy kationtů k záporně nabitě elektrodě. Z důvodu solvatace těchto iontů, dochází k pohybu celého objemu BGE v kapiláře. Tento jev je označován jako elektroosmotický tok [2].

Mezi rovinou primární stacionární vrstvy a sekundární mobilní vrstvy se vyskytuje tzv. rovina stříhu a společně se označují jako difuzní dvojvrstva [1,2]. Na této rovině se vytváří rozdíl potenciálů, označován jako ζ -potenciál a je popisován rovnicí č. 6:

$$\zeta = \frac{4\pi\delta e}{\varepsilon} \quad (6)$$

Kde δ je tloušťka difuzní dvojvrstvy, e je náboj vztažen na jednotky plochy a ε je dielektrická konstanta roztoku [2].

Rychlost EOF je dána rovnicí č. 7:

$$v_{EOF} = \frac{\varepsilon\zeta E}{4\pi\eta} \quad (7)$$

Kde ε je dielektrická konstanta, ζ je ζ -potenciál, E je vložené napětí [$V\text{ cm}^{-1}$] a η je viskozita prostředí [$\text{kg m}^{-1}\text{s}^{-1}$] [2].

Elektroosmotická mobilita je dána rovnicí č. 8:

$$\mu_{EOF} = \frac{\varepsilon\zeta}{4\pi\eta} \quad (8)$$

Elektroosmotická mobilita je tudíž dána pouze veličinami charakterizující BGE a nezávislá na vloženém elektrickém napětí. Rychlost EOF je významně ovlivněna podmínkami, za nichž je provedena analýza a je vhodné ji měřit. Měření je prováděno pomocí neutrálních markerů EOF, které nepodléhají migraci. Typickými zástupci markerů jsou aceton, thiokarbamid, mesityl oxid a dimethylsulfoxid [1].

Je žádoucí také vypočítat elektroforetickou mobilitu analytu dle rovnice č. 9:

$$\mu_A = \mu_{obs} - \mu_{EOF} \quad (9)$$

Kde μ_A je elektroforetická mobilita analytu, μ_{obs} je pozorovaná mobilita analytu a μ_{EOF} je elektroosmotická mobilita [1].

Pozorovanou elektroforetickou mobilitu analytu lze vypočítat z experimentálních údajů pomocí rovnice č. 10:

$$\mu_{obs} = \frac{L_{ef}L}{tV} \quad (10)$$

Kde L_{ef} je efektivní délka kapiláry [cm], L celková délka kapiláry [cm], t je migrační čas analytu [s] a V je separační napětí [V].

2.1.3. Ovlivnění separace pomocí pH BGE

Jak bylo zmíněno výše, pH BGE výrazně ovlivňuje ionizaci silanolových skupin na vnitřním povrchu kapiláry. Se zvyšující se hodnotou pH (převážně mezi pH 4 až pH 9) dochází k nárůstu počtu ionizovaných silanolových skupin. Důsledkem je zvyšování hustoty záporného náboje na vnitřní stěně kapiláry. Vzhledem k tomu, že ζ -potenciál je přímo úměrný povrchovému náboji, zvýší se tato veličina a tudíž se i zvýší rychlost EOF (viz rovnice č. 8) [1,2].

Hodnota pH BGE také ovlivňuje ionizaci analytu. Pokud je analytem slabá kyselina, pak se zvyšující se hodnotou pH bude růst stupeň disociace molekuly a zároveň bude růst její elektroforetická mobilita (viz rovnice č. 4). Zároveň se snižující se hodnotou pH bude docházet k neutralizaci záporného náboje pomocí H^+ iontů za postupné tvorby elektroneutrální molekuly. Z tohoto důvodu je při separaci nutné použít konstantní hodnotu pH a tudíž použít prostředí tlumivého roztoku (pufru) [1]. Většinou je pH BGE voleno pro dosažení optimální separace a ne nutně optimální elektroforetické mobility [2].

Zvláštní důraz na hodnotu pH je kladen při separaci analytů s amfoterními vlastnostmi (například proteiny). Elektroforetická pohyblivost je ovlivněna jak disociací slabé kyseliny (např. $-\text{COOH}$), tak i protonizací slabé zásady (např. $-\text{NH}_2$). Tudíž lze odvodit, že pokud bude mít BGE hodnotu pH vyšší než je hodnota pI, pak látka se záporným nábojem migruje ke kladné elektrodě. V případě kdy $\text{pH} < \text{pI}$, pak kladně nabitá látka migruje k záporně nabitě elektrodě. Při $\text{pH} = \text{pI}$, je látka nenabitá a tudíž buď nemigruje, nebo je unášena EOF[1].

2.1.4. Ovlivnění separace výběrem povrchové skupiny vnitřní stěny kapiláry

Polarita a hustota náboje na vnitřní stěně kapiláry je základní veličinou ovlivňující průběh separace. Přítomnost disociovaných silanolových skupin na vnitřní stěně křemenné kapiláry má za následek vznik EOF (viz výše). Pro zamezení či ovlivnění rychlosti vzniku EOF či interakcí mezi analytem a nábojem na vnitřní stěně kapiláry lze:

- pracovat při pH nižším než 2
- pracovat s analytem s vhodným nábojem
- použít aditiva, která po přidání do BGE dynamicky pokryjí vnitřní stěnu kapiláry (surfaktanty DDAB, TTAB, CTAB, polymery PVA, PEO či jiné)
- na vnitřní povrch kapiláry kovalentně navázat vhodnou látku pro zamezení přístupu k silanolovým skupinám (PAA, PVA, PEO, PEI a jiné) [1]

2.1.5. Ovlivnění separace pomocí volby iontové síly pufru

Iontová síla BGE je významnou charakteristikou ovlivňující ζ -potenciál. Zvýšení iontové síly roztoku způsobí snížení hodnoty δ , což sníží dle rovnice č. 6 ζ -potenciál a zároveň sníží EOF [2].

Mezi obvykle používané pufrů patří následující (viz tabulka č. 1):

CZE pufr	pKa	Použitelné rozmezí pH
Fosfátový	2,12	1,14 – 3,14
	7,21	6,20 – 8,20
	12,32	10,80 – 13,00
Citrátový	3,06	3,77 – 4,77
	4,74	5,40 – 7,40
	5,40	
Octanový	4,75	3,76 – 5,76
MES	6,15	5,15 – 7,15
Borátový	9,24	8,14 – 10,14

Tabulka č. 1: Přehled obvykle používaných pufrů [1].

2.1.6. Rozlišení v CZE

Separované látky jsou při analýze rozlišeny, pokud mají dostatečně rozdílnou elektroforetickou mobilitu. Nejvyššího rozlišení je dosaženo v případě, kdy má elektroosmotický tok stejnou absolutní hodnotu, ale opačný směr průměrné elektroforetické mobility separovaných látek. ² Z experimentálních údajů lze rozlišení vypočítat pomocí následující rovnice č. 11:

$$R = \frac{2(t_1 - t_2)}{w_1 + w_2} \quad (11)$$

Rozlišení R je přímo úměrné rozdílu migračních časů píků a nepřímo úměrné součtu jejich šířek při základně [2].

Situaci, kdy nejsou píky dostatečně rozlišeny (R menší než 1,5) lze řešit několika způsoby. Lze při analýze změnit složení pufru či použít přídavek organického rozpouštědla.

2.1.7. Detekční systémy pro CZE

Pro detekci analyzovaných látek v kapalném BGE lze použít širokou škálu systémů o rozdílné citlivosti, selektivitě a dynamickém rozsahu měření. Mezi komerčně dodávané systémy jsou zahrnuty měření UV/Vis absorpce v přímém a nepřímém módu, fluorescence a laserem indukovaná fluorescence, hmotnostní spektrometrie, vodivostní detektor, amperometrický detektor a refraktometrický detektor [1].

Díky prostupnosti křemenných kapilár UV zářením je jedním z nejčastěji používaných detektorů pro CZE spektrofotometrický detektor. Pro jeho použití je zapotřebí, aby analyzovaná látka absorbovala záření v rozmezí vlnových délek 190 až 900 nm. Ačkoliv řada organických látek absorbuje záření o nižších vlnových délkách, absorpce vzduchu zamezuje jejich použití. Pokud látka neabsorbuje v daném rozmezí, je možné použít nepřímou detekci. V tom případě je do BGE přidána látka obsahující chromofor a tudíž vykazující vysokou absorpci UV/Vis záření a dochází ke zvýšení signálu pozadí. Pokud neabsorbující analyt dosáhne detektoru, na elektroferogramu je zobrazen jako negativní pík. Pro tento účel jsou do BGE přidávány například ftaláty, kyselina naftalensulfonová, imidazol, 1-naftylamin, chinin nebo malachitová zeleň [1].

Měřeným parametrem spektrofotometrickým detektorem je absorbance, kterou lze vypočítat pomocí rovnice č. 12:

$$A = \epsilon cl \quad (12)$$

Lambert-Beerův zákon kde A je absorbance, ϵ je molární absorpční koeficient a l je délka optické dráhy.

Ze vztahu vyplývá, že absorbance je přímo úměrná koncentraci a také délce optické dráhy. Délka optické dráhy odpovídá vnitřnímu poloměru kapiláry, což při jejich snižování vede ke ztrátě citlivosti detektoru. Tento problém nejen při miniaturizaci systému je částečně řešen rozdílným technickým řešením tvaru detekční cely. Příkladem je rozšíření vnitřního průměru kapiláry za pomoci lokálního ohřevu a kontrolovaného proudu vzduchu k vytvoření „bubliny“, která je použita jako detekční cely s delší optickou dráhou a tudíž vyšší citlivostí měření [1].

Dalším často používaným detektorem pro CZE je hmotnostní spektrometrie (MS). Jedná se o citlivou a univerzální techniku, která poskytuje informaci o struktuře analyzované látky ve formě poměru hmoty a náboje analytu. Spojení CZE a MS je nejčastěji realizováno za použití ionizace elektrosprejem (ESI). Při CZE-ESI-MS je konec kapiláry veden do MS a je na něj vloženo napětí několik tisíc voltů. Následkem je kapalina z CZE sprejována ve formě vysoce nabitých kapek. V případě práce v pozitivním módu vznikají mimo jiné kladně nabitě pseudomolekulární ionty. Ty poskytují informaci o molární hmotnosti analytu [1].

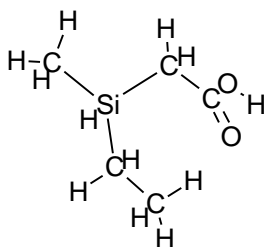
Zatímco tato detekční technika poskytuje vysokou citlivost měření, tak je při volbě detektoru vhodné vzít v potaz výrazně vyšší cenu oproti UV/Vis detektoru a také technické komplikace spojení. Například nutnost použití delší kapiláry a úpravy spojovacího konce kapiláry.

2.2. Chiralita

Chiralita, jinak známá jako optická aktivita, je vlastnost látek stáčet rovinu polarizovaného světla. Jednotlivé enantiomery stáčí rovinu o stejnou absolutní hodnotu úhlu, ale s rozdílným znaménkem (+/-). Často jsou označovány jako optické antipody, zkráceně antipody [3]. Jako opticky aktivní látky jsou uváděny ty, které jsou asymetrické. Toto zjednodušení není přesné, protože se najde řada chirálních látek obsahující prvek symetrie. Příkladem je kyselina vinná, která obsahuje dvojčetnou rotační osu symetrie [4].

Symetrie molekuly závisí na vztahu mezi jejími substrukturálními jednotkami a to jak jejich kvalitou (identitou), tak i geometrickém uspořádání. Existuje řada způsobů, jak popsat jejich geometrii. Většinou je uspořádání vztaženo k bodu (center), ose (axis), rovině (plane) či šroubovici (helix). Od tohoto řazení je odvozena chiralita centrální, axiální, planární a helikální [3].

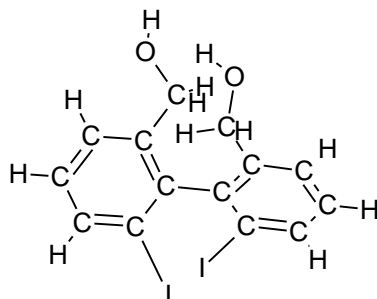
Chirální centrum je označení pro referenční bod, kolem nějž jsou rozmístěny ligandy definující chiralitu centra. Typickým příkladem je centrum tvořeno atomem uhlíku či křemíku, na který jsou navázány čtyři rozdílné substituenty a, b, c a d (viz obr. č. 1). Výsledkem je rozrušení symetrie pravidelného tetraedrického uspořádání a chiralita centra [3].



Obr. č. 1: Příklad sloučeniny obsahující chirální centrum

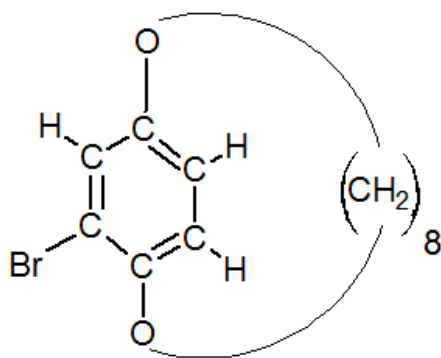
Axiální chiralita může být odvozena od předchozího typu protažením symetrického tetraedru podél jedné z os rotační symetrie. Tato operace eliminuje osm ze třinácti prvků

symetrie a pro vytvoření chirální sloučeniny je už pouze nutná rozdílná substituce na obou koncích zbylých os. Základními modely pro axiální chiralitu jsou 1,3-disubstituované alleny či bifenyly (viz obr. č. 2) [3].



Obr. č. 2: Příklad sloučeniny obsahující axiální chiralitu způsobenou sterickým zamezením otáčivosti aromatických cyklů.

Pro odvození planární chirality lze použít model planární sloučeniny bez roviny symetrie. Pokud je na takovéto uspořádání nahlíženo z bodů mimo její rovinu nad a pod rovinou, pak vzniknou dva zrcadlové obrazy, které nelze navzájem překrýt. Příkladem těchto látek jsou převážně látky, ve kterých jsou dva vzdálené body planární struktury spojeny řetězcem, který je dostatečně krátký pro zábranu rotace kolem roviny symetrie (viz obr. č. 3).



Obr. č. 3: Příklad látky obsahující planární chiralitu. Řetězec obsahující osm CH_2 skupin zamezuje otáčení cyklu.

Šroubovice jsou ze své podstaty chirální a rozlišuje se, zda jsou levotočivé či pravotočivé a nezávisí na jejich konstituci. Pravotočivé šroubovice jsou označovány jako

ty, které se odvíjejí po směru hodinových ručiček. Levotočivé se odvíjejí proti směru. Typickým příkladem jsou nukleové kyseliny (DNA) [3].

2.2.1. Získávání čistých opticky aktivních látek

Existuje řada metod pro získávání čistých opticky aktivních látek. Jako příklad je vhodné uvést biochemické metody. V roce 1857 Pasteur pozoroval, že pravotočivá forma kyseliny vinné je přednostně rozkládána některými mikroorganismy. Například plísní *Penicillium glaucum*. Jestliže se plísní působí na racemát, pak je možné nespotřebovaný levotočivý enantiomer získat v čisté formě [4].

Dalším, dnes již pouze historickým, příkladem dělení chirálních látek je dělení výběrem krystalů jinak označováno jako mechanická metoda. Již roku 1848 Pasteur pozoroval, že z vodných roztoků vinanu sodno-amonného se vylučují dva typy krystalů, které jsou svými zrcadlovými obrazy. Tento pokus byl prvním případem, kdy byla látka opticky aktivní získána z látky inaktivní [3,4].

Mnohem důležitější metodou je dělení za vzniku diastereomerních sloučenin. Na štěpený racemát l_1d_1 se působí opticky aktivním činidlem d_2 , přičemž se získá nový pár sloučenin l_1d_2 a d_1d_2 , které už nejsou navzájem enantiomerní, ale diastereomerní. Tudíž se již liší fyzikálními vlastnostmi a jsou oddělitelné [4].

Pokud dochází k adsorpci opticky chirálních sloučenin na opticky aktivní sorbent, pak jednotlivé enantiomerní sloučeniny s ním interagují odlišným fyzikálním způsobem. Tento efekt je využit při dělení za pomoci kapalinové chromatografie s využitím chirálních stacionárních fází. Použití opticky aktivní stacionární fáze bylo také využito v plynové chromatografii a při iontové výměně [3].

2.2.2. Chirální selektory

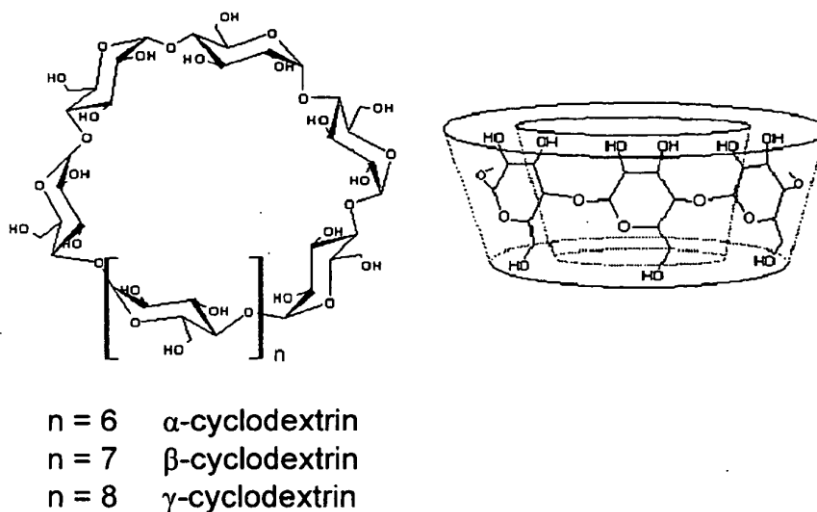
Chirální selektory jsou opticky aktivní sloučeniny, které jsou schopny vytvořit tranzitní diastereomerní sloučeniny s analyzovanými látkami. K tvorbě sloučenin jsou využívány vodíkové vazby, hydrofobní interakce, elektrostatické interakce (dipól-dipól a π - π) a van der Waalovy síly. Chirální selektory by měly vykazovat vysokou optickou čistotu, měly by být schopny interagovat s analyty, být stabilní a zároveň rozpustné v BGE a také mít přijatelnou pořizovací cenu. Nejčastěji užívané chirální selektory jsou cyklodextriny a jejich

deriváty, chirální crown ethery, chirální surfaktanty, makrocyclická antibiotika, chirální metalokomplexy a některé polymery, proteiny a polysacharidy [1].

2.2.3. Cyklodextriny

Cyklodextriny (CD) jsou jedny z nejrozšířenějších chirálních selektorů pro využití v CE. Jedná se o ve vodě rozpustné oligosacharidy se šesti (α -CD), sedmi (β -CD) nebo osmi (γ -CD) α -D-glukopyranosovými jednotkami (viz obr. č. 4). Obsahují charakteristický prstencový tvar tvořen z hydrofobní kavity a hydrofilní vnější plochy (nad a pod prstencem). Průměr kavity se liší dle počtu glukopyranosových jednotek. Jako přibližné hodnoty průměrů jsou uváděny: 0,5 nm pro α -CD, 0,63 nm pro β -CD a 0,8 nm pro γ -CD [2]. Tyto hodnoty jsou jedním z hlavních kritérií ovlivňující sterickou přístupnost molekuly pro hydrofobní interakci.

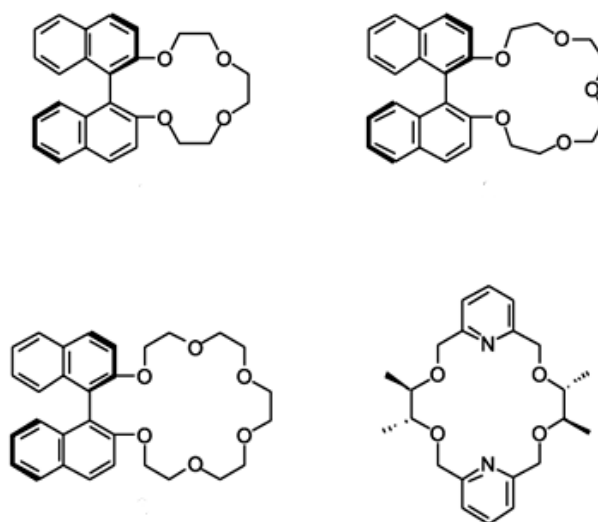
Počet hydroxylových skupin vně prstence ovlivňuje velikost hydrofilní interakce. Z tohoto důvodu jejich derivatizace zásadně ovlivňuje chirální selektivitu. Jako chirální selektory jsou využívány β -methylované-CD, β -karboxymethylované-CD, α -hydroxypropylované-CD, β -hydroxypropylované-CD, β -sulfatované-CD a jiné. V některých případech použití nederivatizovaného CD nepovede k separaci jednotlivých enantiomerů látky. CD jsou většinou používány při koncentracích 10 až 100 mM pro dosažení chirální separace [2].



Obr. č. 4: Struktura cyklodextrinů [5]

2.2.4. Chirální crown ethery

Crown ethery jsou makrocyclické polyethery, jejichž tvar připomíná korunu (anglicky „crown“, viz obr. č. 5). Kyslík, vyskytující se v jejich struktuře, představuje donor elektronů pro stabilizaci vznikajících inkluzních komplexů enantiomer-selektor s řadou sloučenin. Ke stabilizaci dochází pomocí elektrostatických interakcí a vodíkových vazeb. Z tohoto důvodu jsou crown ethery převážně užívány při chirálních separacích aminů, aminokyselin a jejich derivátů, aminoalkoholů a podobných látek. Jejich nevýhodou je malá rozpustnost ve vodě a tudíž je při jejich aplikaci často nezbytné použít přídavek organického rozpouštědla v BGE [1].



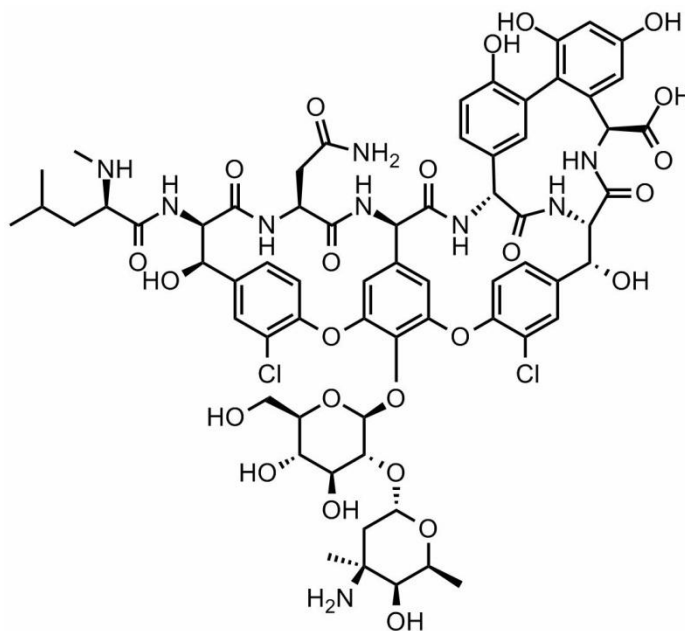
Obr. č. 5: Příklady některých chirálních crown etherů [6]

2.2.5. Makrocyclická antibiotika

Makrocyclická antibiotika představují širokou skupinu chirálních selektorů užívaných v CZE. Dělí se na šest hlavních skupin: polypeptidy, glykopeptidy, ansamyciny, makrolidy, aminoglykosidy a lincosamidy [1]. Jejich molekulová hmotnost se pohybuje v rozmezí přibližně 600 až 2200 g/mol. Obecně mají více chirálních center a také obsahují různé funkční skupiny, což jak známo přispívá k stereoselektivě interakcí těchto molekul. Obsah ionizovatelných funkčních skupin v molekule ovlivňuje nejen chirální interakce s analyzovanými látkami, ale také i elektroforetické vlastnosti selektoru [7].

Glykopeptidická makrocyclická antibiotika (GMA) obsahují peptidové jádro tvořeno komplexními aminokyselinami spojenými fenolickými skupinami, jednou nebo více neutrální

jednu aminoskupinu, což vede ke tvorbě micel zabraňující interakci. Teicoplanin sice obsahuje dvě aminoskupiny, ale ty jsou stericky bráněny velkým počtem navázaných sacharidů. Z tohoto důvodu chirální separace s využitím avoparcinu a vankomycinu jako CS vedou k vyšším migračním časům než separace za využití teicoplaninu a ristocetinu [8].



Vancomycin

Obr. č. 7: Struktura vankomycinu

Pro omezení interakce mezi GMA a vnitřní stěnou kapiláry je možné zvýšit koncentraci BGE a zároveň použít vyšší separační napětí během analýzy. Bohužel se zároveň zvyšuje generace Joulova tepla a snižuje se účinnost separace. Pro potlačení tohoto efektu je vhodné použít vyšší koncentrace BGE, ale nižší separační napětí [8].

Při chirálních separacích s využitím GMA pH BGE neovlivňuje pouze interakci mezi analyzovanou látkou a CS, ale i samotný chirální selektor. Obecně platí, že se snižujícím se pH BGE dochází k lepšímu rozlišení jednotlivých separovaných enantiomerů. Uplatnění tohoto efektu je omezeno hodnotou pH 5, kdy dochází k protonaci CS a vzniku neutrální sloučeniny. Použití neutrální sloučeniny jako CS již vede k nižší hodnotě rozlišení jednotlivých enantiomerů. V případě většiny GMA je nutno zohlednit stabilitou látky převážně omezenou na rozmezí hodnot pH 4 a 9. I v tomhle intervalu GMA tvoří pouze omezeně stabilní roztoky. V případě nejméně stabilního vankomycinu dochází k degradaci roztoku již během šesti

až sedmi dnů při uchovávání při 4°C. Po jeho degradaci dojde k vysrážení bílého zákalu a je nezbytné připravit nový roztok CS [9].

Jak struktura vankomycinu napovídá, jedná se o látku absorbující elektromagnetické záření při vlnových délkách nižších než 250 nm [10]. Po jeho přidání do BGE může docházet k velkému zvýšení šumu na elektroferogramu především při měření pod výše zmíněným limitem. Pro vyřešení tohoto problému je možné použít tři přístupy. Prvním je měřit při vyšších vlnových délkách, což nemusí být vhodné pro všechny typy analytů. Druhým je použít dostatečně nízkou koncentraci vankomycinu, což ale nemusí vést k dosažení chirální separace. Třetím řešením je použít částečné plnění kapiláry („partial filling“). V tomto přístupu je pufr obsahující přídavek CS nadávkován při tlaku nástříku po definovanou dobu tak, aby byla kapilára tímto pufrem naplněna jen částečně, a jeho zóna nedosahovala detekčního okénka. Tímto způsobem je dosaženo efektu, kdy analyt „promigruje“ zónu CS a dosáhne detektoru dříve, než vysoce absorbující složka způsobující šum. V tomto případě vankomycin. K dosažení vysoce selektivní a rychlé metody je možné použít kombinaci výše zmíněných přístupů [10].

2.2.6. Pokrytí vnitřní stěny kapiláry chirálním selektorem

Vnitřní pokrytí kapiláry lze také použít pro separaci izomerů chirálních látek. Shukla a kol. publikovali využití pokrytí vnitřní stěny kapiláry tetrahedrálními nanočásticemi zlata modifikovanými D- či L-cysteinem. Takto modifikovaná kapilára poskytla separaci opticky aktivních izomerů léčiva propranolol [11].

2.3. Povrchově aktivní látky

Povrchově aktivní látky (PAL) jsou amfifilní látky tvořeny hydrofobním řetězcem a polární částí molekuly. Dle typu polární skupiny se dělí na anionické (například dodecylsulfát sodný), kationické (například cetyltrimethylamonium bromid) a neutrální PAL (například kondenzáty dlouhého alkylového řetězce a etylenoxidu) [12]. Tato skutečnost zajišťuje jejich hromadění na rozhraní mezi polární a nepolární fází soustavy. Ve vodných roztocích se seskupují do tzv. micel. Ty se tvoří pouze při teplotě vyšší než je Krafftova teplota a při koncentraci PAL vyšší než je kritická micelární koncentrace (CMC). CMC je charakteristická pro danou PAL a dané prostředí [13].

Na povrchu micely kulovitého tvaru ve vodném prostředí se vyskytují polární skupiny molekuly, které zajišťují interakce s rozpouštědlem a ionty v roztoku. Hydrofobní interakce stabilizují agregaci hydrofobních řetězců uvnitř micely. V nepolárních rozpouštědlech vznikají obrácené micely. Jádro micely tvoří polární část molekuly a vnější část je tvořena hydrofobními řetězci PAL [13].

Micely mají široké uplatnění jak v průmyslu, tak i v biologických soustavách díky schopnosti nepolárních látek přecházet do nepolárního jádra micely a dále putovat vodnou fází v micelle. Jsou používány především jako detergenty, při organických syntézách, pěnové flotaci či při těžbě ropy [13].

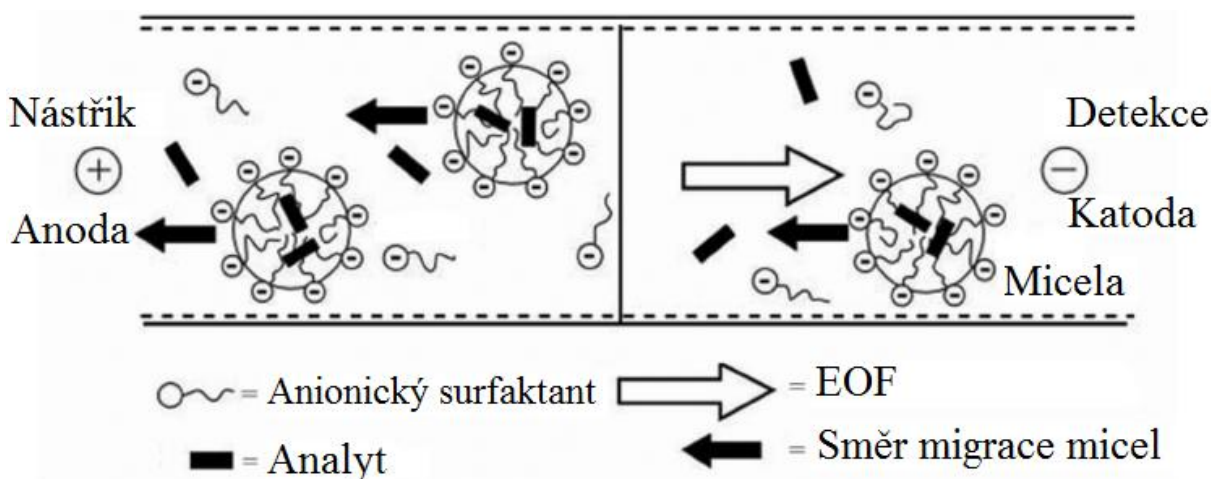
2.3.1. Povrchově aktivní látky v CE

Mezi nejužívanější PAL v CE patří anionický surfaktant dodecylsulfát sodný (SDS). Mezi často užívané kationické surfaktanty patří cetyltrimethylamonium bromid (CTAB), tetradecyltrimethylamonium bromid (TDAB) a kvartérní amoniové soli. Bývají využity pro vytvoření dynamického pokrytí vnitřní stěny kapiláry a v micelární elektrokinetické chromatografii [12].

V případě, kdy dochází k nabití vnitřní stěny křemenné kapiláry (viz kapitola 2.1), je možné ovlivnit hustotu povrchového náboje přidávkem kationické PAL do BGE. Dochází k adsorpci kationické skupiny PAL na negativně nabitý povrch tvořen silanolovými skupinami za vzniku monovrstvy surfaktantu. Výsledná neutralizace povrchu má za následek redukci či úplné potlačení EOF. Pokud je koncentrace PAL nadále zvýšena, další molekuly PAL interagují nepolární částí molekuly s monovrstvou za vzniku dvojvrstvy. V takovém případě dochází k vytvoření dynamického pokrytí vnitřního povrchu kapiláry kladně nabitými skupinami PAL a obrácení směru EOF [12].

Základem micelární elektrokinetické chromatografie (MEKC) je přídavek PAL o vyšší koncentraci než je CMC do BGE. V popsaném případě dochází k vytvoření pseudostacionární nabitě fáze micel. Je tak vytvořen hybridní systém elektroforézy a chromatografie kombinující separační možnosti těchto technik. Pokud je na popsanou soustavu aplikováno stejnosměrné elektrické pole, pak začnou micely migrovat ve stejném či opačném směru EOF dle svého náboje (viz obr. č. 8). Analyty v roztoku mohou s micelami interagovat jak hydrofobně s jádrem micely, či elektrostaticky s jejím povrchem.

Tato skutečnost umožňuje separaci i nenabitých látek. Nabité látky jsou děleny na základě kombinace elektromigrace (dle náboje a velikosti) a chromatografie (dle repulze či iontového párování látky s micelami). Další faktory ovlivňující separaci jsou tvar, dipólový moment a interakce vodíkových vazeb PAL a analyzované látky [12]. Pro změnu elektroforetických vlastností analytů je možné do BGE obsahující PAL přidat organické aditivum, například metanol (MeOH). Přídavek změní jak polaritu, tak i viskozitu prostředí v kapiláře, tudíž upraví vlastnosti charakterizující elektroforetický děj [14].



Obr. č. 8: Schéma principu separace v micelární elektrokinetické chromatografii [14]

2.4. Nanočástice oxidu železa

Skupinu nanočástic označovaných jako „oxidy železa“ tvoří γ - Fe_2O_3 (maghemit) a Fe_3O_4 ($\text{FeO}\cdot\text{Fe}_2\text{O}_3$ magnetit). Částice těchto oxidů o velikosti menší než 30 nm jsou biokompatibilní a zároveň vykazují superparamagnetické vlastnosti. Oproti ostatním oxidům železa vykazují vyšší hodnotu saturační magnetizace $M_s = 80\text{-}100 \text{ A}\cdot\text{m}^2\cdot\text{kg}^{-1}$ (přibližně o 2 řády). Pod touto hodnotou a zároveň pod kritickou teplotou (Currieho T_C , Neelova T_N) dochází k nárůstu hodnoty magnetizace s nárůstem hodnoty intenzity magnetického pole. Po dosažení M_s zůstává magnetizace téměř konstantní. Hodnota M_s je tudíž důležitou charakteristikou pro každý magnetický materiál. Po dosažení T_C (T_N) se látka stává paramagnetikem a ztrácí své magnetické vlastnosti [15].

Superparamagnetické nanočástice γ - Fe_2O_3 (NPs) tvoří ve vodném prostředí tekutiny bez magnetických vlastností, stabilní suspenze, tzv. ferrofluida či „magnetické kapaliny“.

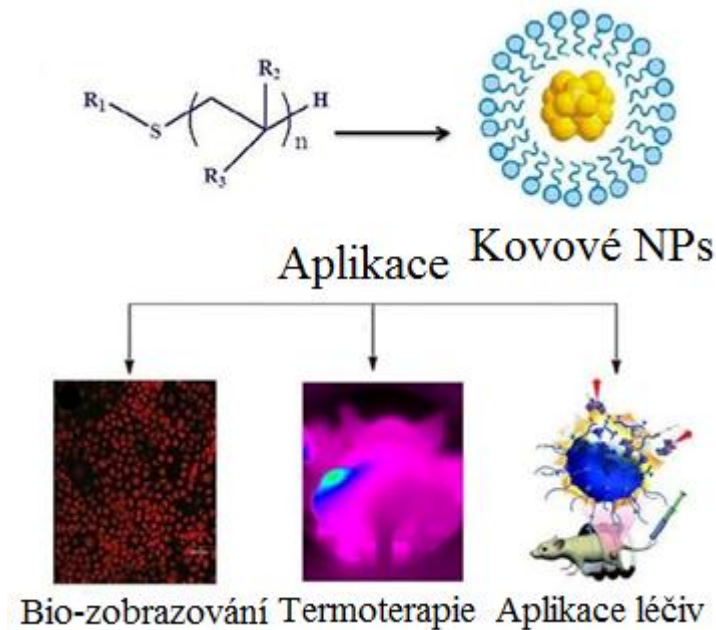
Tyto tekutiny byly poprvé popsány Papellem v roce 1965 [16]. Tyto NPs mají široké rozmezí použití. Od možnosti přenosu tepla a mikromechaniky přes biotechnologii až po biomedicínu. Například mají velký potenciál pro možnosti použití jako kontrastních látek při vyšetření za pomoci magnetické rezonance pro specifickou aplikaci léčiv v organismu (drug delivery), či jako mediátory pro přenos tepla při léčbě rakovinných onemocnění teplem (termoterapie) [17].

Veškeré biomedicínské využití NPs vyžaduje, aby vykazovaly vysoké hodnoty magnetizace a zároveň měly velikost menší než 100 nm o úzké distribuci velikosti. To zajišťuje uniformní vlastnosti částic. Magnetické vlastnosti částic vysoce souvisí s jejich strukturou. Především s jejich velikostí, tvarem a s prostředím, ve kterém jsou rozptýleny. Jejich aplikace v biologických soustavách především záleží na jejich polydisperzitě, náboji a vlastnostech pokrytí jejich povrchu [18].

2.4.1. Výroba nanočástic železa

Pro přípravu NPs je možné využít hned několik postupů. Mechanické mletí magnetitové rudy je historicky nejstarší. Metoda je drahá na provedení a částice, které jí byly vyrobeny, vykazovaly polydisperzitu. Tato metoda byla tudíž nahrazena chemickými postupy. Jedná se o tepelný rozklad organometalických sloučenin železa, o výrobu pomocí hydrotermálních procesů a o koprecipitaci solí zásadami [15].

Díky nízkým nákladům výroby (výhoda oproti hydrotermálním procesům), možnosti další modifikace povrchu (ten je u metod tepelného rozkladu zneprístupněn povrchově aktivními látkami) a velké variabilitě ovlivnění výsledných vlastností produktu, je koprecipitační metoda tou nejpoužívanější [15]. Při této metodě dochází ke koprecipitaci Fe^{2+} a Fe^{3+} iontů v alkalickém prostředí (nejčastěji za přítomnosti NH_4OH) [16]. Poté jsou částice stabilizovány (polymery či anionty) [15] a dle zamýšleného použití (viz obr. č. 9) je modifikován jejich povrch (funkcionalizace nanočástic).



Obr. č. 9: Schéma možných aplikací modifikovaných nanočástic [21]

Obvykle jsou na povrch NPs kovalentně navázány či naadsorbovány organické molekuly. Ty poskytují elektrostatické nebo elektrosterické repulze působící mezi částicemi a zabraňují jejich aglomeraci. Zároveň tato organická vrstva ovlivňuje vlastnosti NPs jako je jejich velikost, povrchový náboj, přítomnost funkčních skupin (například amino či karboxylová skupina) a jejich sterickou dostupnost. Tudíž cílové aplikace vzniklých core/shell nanočástic jsou výrazně ovlivněny touto povrchovou vrstvou [18-21].

2.4.2. Charakterizace nanočástic

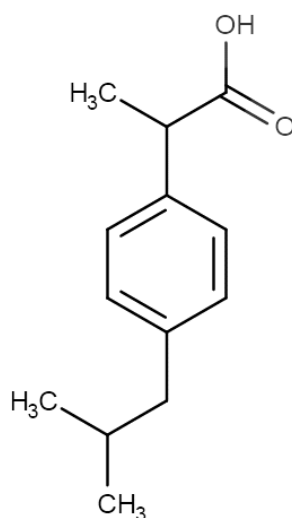
K charakterizaci NPs se běžně používají metody: skenovací elektronová mikroskopie (SEM), transmisní elektronová mikroskopie (TEM), dynamický rozptyl světla (DLS), prášková rentgenová difrakce (XRD) a v případě magnetických NPs jsou pro popis používána magnetická měření například na SQUID magnetometru pro určení saturační magnetizace. Pomocí SEM a TEM lze určit pevný poloměr, tvar a distribuci velikosti částic. Pomocí DLS lze měřit hydrodynamickou velikost a distribuci velikostí částic [15].

Pro charakterizaci NPs se dále využívá infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací (FTIR), hmotnostní spektrometrie (MS), nukleární magnetická rezonance (NMR) či kapilární elektroforéza (CZE) [22].

2.5. Vlastnosti analytů

2.5.1. Ibuprofen

Ibuprofen je chirálním derivátem kyseliny propionové (viz obr. č. 10). Jedná se o typickou nesteroidní protizánětlivou látku s analgetickými a antipyretickými vlastnostmi. Biologický poločas léčiva je uváděn jako dvě až čtyři hodiny. Pacientům bývá podáván ve formě tablet orálně i ve formě roztoku intravenózně. Léky obsahující ibuprofen jako aktivní látku jsou známy pod označením Caldolor, Ibuprofen, Neoprofen, Alivio, Advil a jiné [23].



Obr. č. 10: Strukturální vzorec ibuprofenu [23]

In vivo dochází k enantiomerní konverzi R-enantiomeru (53 až 65%) na biologicky aktivnější S-enantiomer. V organismu je oxidativně metabolizován na dva inaktivní metabolity: kyselina (+)-2-[4'-(2-hydroxy-2-methylpropyl)fenyl]propionová a kyselina (+)-2-[4'-(2-karboxypropyl)fenyl]propionová. V moči pacientů se objevují i malé množství 1-hydroxyibuprofenu a 3-hydroxyibuprofenu. Hlavním katalyzátorem oxidativních procesů je cytochrom P450 2C9 [23].

Mezi experimentálně naměřené hodnoty ibuprofenu patří hodnota $pK_a = 4,91$, což odpovídá vypočtené hodnotě 4,85. Molekula obsahuje benzenové jádro, tudíž absorbuje záření v ultrafialové oblasti [23].

2.6. Statistické zpracování dat

2.6.1. Dean-Dixonův test

Jedná se o statistický test, který je nástrojem k odhalení odlehlých výsledků, neboli výsledků, které jsou zatíženy hrubou chybou. V případě nevykloučení by odlehlé výsledky zkreslily data. Test je používán pro soubory dat obsahující 30 a méně hodnot [24].

Postup testu je následující: data jsou seřazena vzestupně a je vypočteno rozpětí hodnot R , které odpovídá rozdílu nejvyšší a nejnižší hodnoty. Poté jsou dle vzorce 13 a 14 vypočteny hodnoty Q_1 a Q_n , které jsou dále porovnány s tabelovanou kritickou hodnotou $Q_{\text{krit}}(\alpha, n)$ (viz tabilka č. 2). Pokud je hodnota Q_1 či Q_n vyšší než Q_{krit} , pak je daná hodnota odlehlá. Kritérium Q_{krit} lze získat z tabulek [24].

$$Q_1 = \frac{x_2 - x_1}{R} \quad (13)$$

$$Q_2 = \frac{x_n - x_{n-1}}{R} \quad (14)$$

n	α : 0,05	0,01	n	α : 0,05	0,01
3	0,941	0,988	17	0,32	0,416
4	0,765	0,889	18	0,313	0,407
5	0,642	0,78	19	0,306	0,398
6	0,56	0,698	20	0,3	0,391
7	0,507	0,637	21	0,295	0,384
8	0,468	0,59	22	0,29	0,378
9	0,437	0,555	23	0,285	0,372
10	0,412	0,527	24	0,281	0,367
11	0,392	0,502	25	0,277	0,362
12	0,376	0,482	26	0,273	0,357
13	0,361	0,465	27	0,269	0,353
14	0,349	0,45	28	0,266	0,349
15	0,338	0,438	29	0,263	0,345
16	0,329	0,426	30	0,26	0,341

Tabulka č. 2: Tabulka kritických hodnot Q_{krit} pro Dean-Dixonův test [25]

2.6.2. Test shody středních hodnot, „test shodnosti“

Jedná se o statistický test, který slouží k porovnání dvou výběrů. Nejčastěji bývá používán k:

- porovnání výsledků získaných různými instrumentálními metodami či laboratořemi
- ověřování nutnosti dělení heterogenních výběrů od homogenních podskupin
- hodnocení rozdílu mezi rozdílnými materiály a přístroji [24]

Podmínkou pro použití testu je existence dvou souborů nezávislých dat, které pocházejí z normálního rozdělení. Postup při testování shody středních hodnot dvou rozptylů je následující. Nejprve je ověřena normalita rozdělení obou souborů. Poté je proveden test shody rozptylů. To je provedeno například klasickým či modifikovaným Fisher-Snedecorovým F-testem. Na závěr je proveden test shody středních hodnot dvou rozptylů. Ten je proveden například klasickým Studentovým t-testem [24].

F-test je proveden dle vzorce č. 15:

$$F = \frac{s_2^2}{s_1^2} \quad (15)$$

Kde s je výběrový odhad směrodatné odchylky jednotlivých výběrů a F je kritérium pro porovnání s tabelovanou hodnotou. Pokud má kritérium F menší hodnotu než $F_{\text{krit}}(n_1-1; n_2-1)$, pak jsou rozptyly obou výběrů shodné. Kritérium lze získat pomocí funkce FINV v programu microsoft excel či z tabulek [24].

Pokud jsou rozptyly shodné a zároveň oba soubory obsahují stejný počet hodnot, pak je test shody proveden dle vzorce č. 16:

$$t = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{\sqrt{\frac{(n_1-1)s_1^2 + (n_2-1)s_2^2}{n_1+n_2}}} \sqrt{\frac{n_1 n_2 (n_1 + n_2 - 2)}{n_1 + n_2}} \quad (16)$$

Kde jsou \bar{x}_1 a \bar{x}_2 aritmetické průměry jednotlivých souborů, a n je počet hodnot v souboru. Vypočtená hodnota t je dále porovnána s tabelovanou hodnotou t_{krit} pro $(n_1 + n_2 - 2)$ stupně volnosti. Kritérium lze získat pomocí funkce TINV v programu microsoft excel či z tabulek. Jako hladinu významnosti α pro výpočet je použita obvyklá hodnota 5% [24].

Pokud jsou rozptyly shodné a zároveň oba soubory neobsahují stejný počet hodnot, pak je test shody proveden dle vzorce č. 17:

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{s \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}} \quad (17)$$

Kde s je hodnota vypočtena pomocí vzorce č. 18:

$$s = \sqrt{\frac{(n_1-1)s_1^2 + (n_2-1)s_2^2}{n_1 + n_2 - 2}} \quad (18)$$

Vypočtená hodnota t je dále porovnána s tabelovanou hodnotou t_{krit} pro $(n_1 + n_2 - 2)$ stupně volnosti. Jako hladinu významnosti α pro výpočet je použita obvyklá hodnota 5% [24].

Pokud rozptyly nejsou shodné, pak je test proveden dle vzorce č. 19 [24]:

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}} \quad (19)$$

Vypočtená hodnota t je porovnána s t_{krit} pro ν stupňů volnosti, kterou lze vypočítat pomocí vzorce č. 20 [24]:

$$\nu = \left\{ \frac{\left(\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2} \right)^2}{\frac{\left(\frac{s_1^2}{n_1} \right)^2}{n_1 + 1} + \frac{\left(\frac{s_2^2}{n_2} \right)^2}{n_2 + 1}} \right\} - 2 \quad (20)$$

Pro oba případy platí, že pokud je hodnota t menší než t_{krit} , pak jsou střední hodnoty souborů shodné [24].

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1. Přístrojové vybavení a pomůcky

HP 3D Kapilární elektroforéza s DAD detektorem (Agilent Technologies, Waldbronn, Německo), křemenná kapilára celkové délky 33,5 cm, efektivní délky 25 cm (Polymicro Technologies, Phoenix, USA), křemenná kapilára s kovalentním pokrytím polyvinylalkoholem a polyakrylamidem celkové délky 33,5 cm, efektivní délky 25 cm (Polymicro Technologies, Phoenix, USA), automatická pipeta Eppendorf Research plus (10 – 100 μ l; 0,1 – 20 μ l a 100 – 1000 μ l), automatická pipeta (1000 – 5000 μ l), odpovídající špičky, pH metr.

3.2. Chemikálie

Kyselina fosforečná, kyselina citronová monohydrát, kyselina octová, 2-(N-morpholino)ethansulfonová kyselina monohydrát (MES), 3-(N-morpholino)propansulfonová kyselina (MOPS), kyselina boritá, hydroxid sodný, kyselina chlorovodíková, tamsulosin, selegilin, efedrin, ibuprofen, fenylalanin, tyrosin, tryptofan, polyvinylalkohol (PVA), hydroxyethylcelulosa (HEC), cetyltrimethylammonium bromid (CTAB), dodecylsulfát sodný (SDS), metanol, vankomycin hydrochlorid. Výše zmíněné chemikálie byly zakoupeny od firmy Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Vzorek strukturně pozměněného vankomycinu CDP (dva cykly v molekule vankomycinu byly porušeny za vzniku dvou volných karboxylových skupin) byl obdržen od prof. Daniel W. Armstronga, University of Texas at Arlington, TX, USA. Nanočástice železa ($[\text{Fe}] = 0,0078 \text{ M}$, COOH/Peg AMCP1C7 a $[\text{Fe}] = 0,011 \text{ M}$, NH_2 /Peg AMCP1cit) byly obdrženy od prof. Jean-Michel Siaugue, Université de Pierre et Marie Curie, Paříž, Francie. Před použitím byly naředěny deionizovanou vodou (faktor ředění $f = 50$).

4. VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1. Měření elektroforetické mobility selektoru vankomycinu CDP

Pro výběr vhodného BGE bylo provedeno měření elektroforetické mobility derivátu vankomycinu. Měření byla provedena v křemenné kapiláře o délce L 33,5 cm, z čehož 25 cm tvořilo efektivní délku L_{ef} . Kapilára byla před každým měřením propláchnuta 3 min roztokem NaOH o koncentraci 0,1 mol/l, poté 4 min deionizovanou vodou a nakonec 3 min BGE o koncentraci 50 mmol/l. Dále byl při tlaku 50 mbar působící 5 s nastříknut roztok vankomycinu CDP o koncentraci 1 mmol/l v BGE nebo 1% roztok mesityl oxidu v MeOH jako marker EOF. Pro převedení derivátu na rozpustnou sůl (hydrochlorid) bylo nutné do roztoku přidat 10 μ l HCl (konc.). Všechna měření byla provedena při separačním napětí 10 kV a odezva detektoru byla sledována při vlnové délce 254,2 nm.

Byly použity následující pufrы: fosfátový (pH 2,5), citrátový (pH 3,6), octanový (pH 4,5), MES (pH 6,0), MOPS (pH 7,5), borátový (pH 8,5; 9,5 a 10). Pro úpravu na požadované pH byly roztoky titrovány pomocí NaOH. Pro výpočet μ_V byly použity rovnice 9 a 10. Pro identifikaci píku byla zobrazena UV spektra a porovnána se spektry čisté látky. Měření, která byla zopakována pouze dvakrát, nebyla zopakována z důvodu velkého překryvu píků na elektroferogramech. Hodnota jejich migračních časů je uvedena spíše jako orientační. Pro jednotlivé migrační časy byla vypočtena hodnota mobility (viz rovnice č. 10) a pro další výpočet byl použit aritmetický průměr vypočtených hodnot (viz tabulka č. 3). Pro výpočet intervalu spolehlivosti μ_A byl použit všeobecně známý zákon šíření chyb.

pH 2,5				
	t_{CS}	t_{EOF}	μ_{obs}	μ_{EOF}
1. opakování	4,87	6,76	0,000287	0,000206
2. opakování	5,26	7,47	0,000265	0,000187
3. opakování	5,67	8,41	0,000246	0,000166
4. opakování	5,79	8,84	0,000241	0,000158
průměr	5,40	7,87	0,000260	0,000179
výběrový odhad směrodatné odchylky			0,000021	0,000022
interval spolehlivosti			$\pm 0,000033$	$\pm 0,000035$
μ_A	$8,048 \times 10^{-5}$	$\pm 4,792 \times 10^{-5}$		
pH 3,6				
	t_{CS}	t_{EOF}	μ_{obs}	μ_{EOF}
1. opakování	5,07	5,28	0,000275	0,000265
2. opakování	5,41	5,62	0,000258	0,000248

3. opakování	5,61	5,82	0,000249	0,000240
4. opakování	5,92	6,17	0,000236	0,000226
průměr	5,50	5,72	0,000255	0,000245
výběrový odhad směrodatné odchylky			0,000017	0,000016
interval spolehlivosti			± 0,000026	± 0,000025
μ_A	$9,886 \times 10^{-6}$	$\pm 3,676 \times 10^{-5}$		
pH 4,5				
	t_{CS}	t_{EOF}	μ_{obs}	μ_{EOF}
1. opakování	3,92	3,60	0,000356	0,000387
2. opakování	4,01	3,26	0,000348	0,000428
3. opakování	4,17	3,53	0,000335	0,000395
průměr	4,03	3,47	0,000346	0,000404
výběrový odhad směrodatné odchylky			0,000011	0,000021
interval spolehlivosti			± 0,000027	± 0,000053
μ_A	$-5,739 \times 10^{-5}$	$\pm 5,964 \times 10^{-5}$		
pH 6				
	t_{CS}	t_{EOF}	μ_{obs}	μ_{EOF}
1. opakování	9,05	9,32	0,000154	0,000150
2. opakování	9,26	9,54	0,000151	0,000146
průměr	9,15	9,43	0,000153	0,000148
výběrový odhad směrodatné odchylky			0,000002	0,000002
interval spolehlivosti			± 0,000022	± 0,000022
μ_A	$4,545 \times 10^{-6}$	$\pm 3,125 \times 10^{-5}$		
pH 7,5				
	t_{CS}	t_{EOF}	μ_{obs}	μ_{EOF}
1. opakování	9,40	9,48	0,000148	0,000147
2. opakování	9,55	9,61	0,000146	0,000145
průměr	9,48	9,54	0,000147	0,000146
výběrový odhad směrodatné odchylky			0,000002	0,000001
interval spolehlivosti			± 0,000015	± 0,000013
μ_A	$1,020 \times 10^{-6}$	$\pm 1,973 \times 10^{-5}$		
pH 8,5				
	t_{CS}	t_{EOF}	μ_{obs}	μ_{EOF}
1. opakování	6,98	4,41	0,000200	0,000317
2. opakování	8,19	4,99	0,000170	0,000280
3. opakování	7,92	4,73	0,000176	0,000295
4. opakování	7,36	5,36	0,000190	0,000260
průměr	7,61	4,87	0,000184	0,000288
výběrový odhad směrodatné odchylky			0,000013	0,000024
interval spolehlivosti			± 0,000021	± 0,000038
μ_A	$-1,038 \times 10^{-4}$	$\pm 4,347 \times 10^{-5}$		

pH 9,5				
	t_{CS}	t_{EOF}	μ_{obs}	μ_{EOF}
1. opakování	4,89	5,01	0,000286	0,000279
2. opakování	5,36	5,47	0,000260	0,000255
3. opakování	6,58	6,72	0,000212	0,000208
průměr	5,61	5,73	0,000253	0,000247
výběrový odhad směrodatné odchylky			0,000037	0,000036
interval spolehlivosti			$\pm 0,000093$	$\pm 0,000090$
μ_A	$5,422 \times 10^{-6}$	$\pm 1,291 \times 10^{-4}$		
pH 10,0				
	t_{CS}	t_{EOF}	μ_{obs}	μ_{EOF}
1. opakování	3,15	2,82	0,000444	0,000496
2. opakování	3,12	2,80	0,000448	0,000499
3. opakování	3,11	2,60	0,000449	0,000537
průměr	3,12	2,74	0,000447	0,000511
výběrový odhad směrodatné odchylky			0,000003	0,000023
interval spolehlivosti			$\pm 0,000007$	$\pm 0,000057$
μ_A	$-6,373 \times 10^{-5}$	$\pm 5,703 \times 10^{-5}$		

Tabulka č. 3: Naměřené hodnoty migračních časů CS a EOF v prostředích o různém pH. Veškeré hodnoty μ , včetně intervalů spolehlivosti, mají rozměr $cm^2V^{-1}s^{-1}$ a migrační časy mají rozměr minut.

Příklad výpočtu pro pH 3,6:

Migrační časy vankomycinu CDP (t_V) měřené v minutách: 5,067; 5,406; 5,607; 5,918. Migrační časy markery EOF (t_{EOF}) měřené v minutách: 5,277; 5,619; 5,823; 6,168.

$$\mu_{obs1} = \frac{33,5 * 25}{10000 * 5,07 * 60} = 2,75 * 10^{-4} cm^2V^{-1}s^{-1}$$

$$\mu_{EOF1} = \frac{33,5 * 25}{10000 * 5,28 * 60} = 2,65 * 10^{-4} cm^2V^{-1}s^{-1}$$

Jednotlivé vypočtené hodnoty $\mu_{obs} = 0,000275; 0,000258; 0,000249; 0,000236$. Aritmetický průměr hodnot je 0,000255. Jednotlivé vypočtené hodnoty $\mu_{EOF} = 0,000265; 0,000248; 0,000240; 0,000226$. Aritmetický průměr hodnot je 0,000245. Mobilita derivátu vankomycinu je vypočtena dle vzorce č. 9, do kterého byly hodnoty dosazeny bez předchozího zaokrouhlení.

$$\mu_V = \mu_{obs} - \mu_{EOF} = 0,098 * 10^{-4} cm^2V^{-1}s^{-1}$$

Intervaly spolehlivosti jsou vypočteny pomocí známého vzorce:

$$IS_{obs} = \bar{x} \pm s \frac{t_{(1-\frac{\alpha}{2}; n-1)}}{\sqrt{n}} = 0,00025 \pm 0,000017 \frac{3,182}{\sqrt{4}} = (2,5 \pm 0,26) * 10^{-4} \text{ cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$$

IS_{EOF} byl vypočten stejným způsobem. IS_{EOF} = (2,45 ± 0,25) * 10⁻⁴ cm²V⁻¹s⁻¹

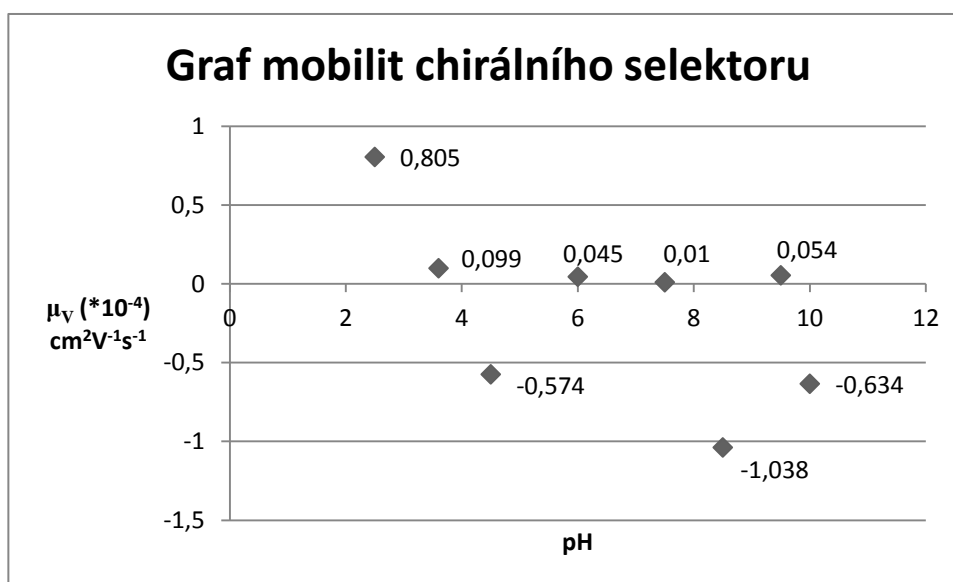
Pro výpočet chyby stanovení μ_v byl použit známý vzorec pro šíření chyb:

$$\text{chyba} = \sqrt{0,26^2 + 0,25^2} = 0,368 * 10^{-5} \text{ cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$$

Všechny výsledné hodnoty jsou shrnuty v tabulce č. 4 a grafu č. 1.

pH	μ _v [hodnota * 10 ⁻⁴ cm ² V ⁻¹ s ⁻¹]
2,5	0,805 ± 0,479
3,6	0,099 ± 0,368
4,5	-0,574 ± 0,597
6	0,045 ± 0,313
7,5	0,010 ± 0,197
8,5	-1,038 ± 0,435
9,5	0,054 ± 1,291
10	-0,637 ± 0,570

Tabulka č. 4: Naměřené hodnoty elektroforetických mobilit chirálního selektoru pro prostředí s rozdílnou hodnotou pH.



Graf č. 1: Závislost elektroforetické mobility chirálního selektoru na pH BGE.

4.2. Měření v oblasti nízké rychlosti EOF - ovlivnění pomocí pH

Analýzy byly provedeny v prostředí fosfátového pufru, pH 2,5 o koncentraci 50 mmol/l. Jako analyty byly zvoleny látky tamsulosin, selegilin a efedrin. Zmíněné látky v použité oblasti pH migrují jako kation. V jednotlivých analýzách byla kapilára propláchnuta hydroxidem (3 min), vodou (4 min) a poté použitým BGE (3 min). Dále byla kapilára částečně naplněna roztokem vankomycinu CDP po dobu 60 s a tlaku 50 mbar. Analyt byl dávkován po dobu 5 s a tlaku 50 mbar.

Nebyla pozorována chirální separace. Ta také nebyla pozorována při snížení či zvýšení doby částečného plnění kapiláry. Na elektroferogramech bylo zjevné zvýšení absorpce pozadí, jež se dá vysvětlit částečnou sorpcí CS na vnitřní stěnu křemenné kapiláry. Dále byl pozorován překryv signálu analytu signálem silně absorbujícího vankomycinu. Tento efekt se dá vysvětlit migrací samotného CS (viz graf č. 1). Dále je nutné vzít v potaz velké množství ionizovatelných skupin použitého makrocyclického antibiotika, jež je výrazně vyšší než počet ionizovatelných skupin analytů. Což má za výsledek nižší elektroforetickou mobilitu analytu a následné překrytí píkem CS. Pro tamsulosin byla vypočtena hodnota $\mu = 0,391 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$, jež je mnohem nižší než hodnota naměřena pro CS (viz. tabulka č. 2).

4.3. Ovlivnění EOF pomocí viskozity

Měření byla prováděna v prostředí pufru MOPs o pH 7,5 a koncentraci 50 mmol/l. Do BGE byl přimíchán přídavek 0; 0,01%; 0,1% a 0,5 % polyvinylalkoholu (PVA) a 0; 0,01%; 0,1% a 0,5 % hydroxyethylcelulosy (HEC). Ve zmíněných prostředích byla měřena elektroforetická mobilita CS (dle postupu v 4.1).

Cílem pokusu bylo zpomalit elektroosmotickou mobilitu, která je nepřímo závislá na viskozitě (rovnice č. 8). Ve zmíněném pH prostředí je CS dle naměřených hodnot (tabulka č. 2) elektroneutrální, tudíž je pouze unášen proudem EOF. Jeho zpomalení by mělo za následek oddělení signálu migrujícího analytu od interferujícího pozadí. Výsledkem pokusu byla neopakovatelná data, což lze vysvětlit změnou povrchu vnitřní stěny kapiláry po sorpci polymeru. Tudíž postup nebyl dále využit.

4.4. Ovlivnění EOF dynamickým pokrytím vnitřního povrchu kapiláry

Ze stejných důvodů jako výše, byla měření prováděna v prostředí pufru MOPS o pH 7,5 a koncentraci 50 mmol/l. Do BGE byl přimíchán přídavek a 0 mM, 0,1 mM, 0,25 mM, 0,5 mM a 1 mM cetyltrimethylammonium bromidu (CTAB). Ve zmíněných prostředích byl nadávkován jako vzorek vankomycin CDP, poté byla spuštěna analýza při napětí +10 kV po dobu 30 min. Pro každé prostředí byla analýza pětkrát zopakována.

Zatímco v BGE bez přídávku CTABu byl pozorován pík CS v průměru v čase 2,26 min, po přídávku CTABu vymizel. Z toho lze vyvodit potlačení EOF či obrácení jeho směru. Pro další práci byl vybrán přídavek 0,1 mM a 0,5 mM CTABu v BGE.

Jako analyty byly vybrány aminokyseliny fenylalanin, tyrosin a tryptofan. Důvodem výběru byla jak jejich schopnost absorbovat UV záření, tak i jejich schopnost migrace v použité oblasti pH (dochází k deprotonizaci molekuly). Opět nebyla pozorována chirální separace analytu a byly pozorovány obdobné potíže jako v bodě 4.2.

4.5. Ovlivnění EOF kovalentním pokrytím vnitřního povrchu kapiláry

Byla provedena měření v kapilárách s vnitřním pokrytím polyvinylalkoholem (PVA) a polyakrylamidem (PAA). Před analýzou byla kapilára promyta 5 minut vodou a poté 5 minut BGE. Jako BGE byl použit 50 mM MOPS o pH 7,5. Vankomycin CDP byl dávkován tlakem 50 mbar po dobu 30, 60, 120 a 180 sekund. Jako analyt byl použit roztok 0,1 mM ibuprofenu v deionizované vodě. Separační napětí bylo -10 kV.

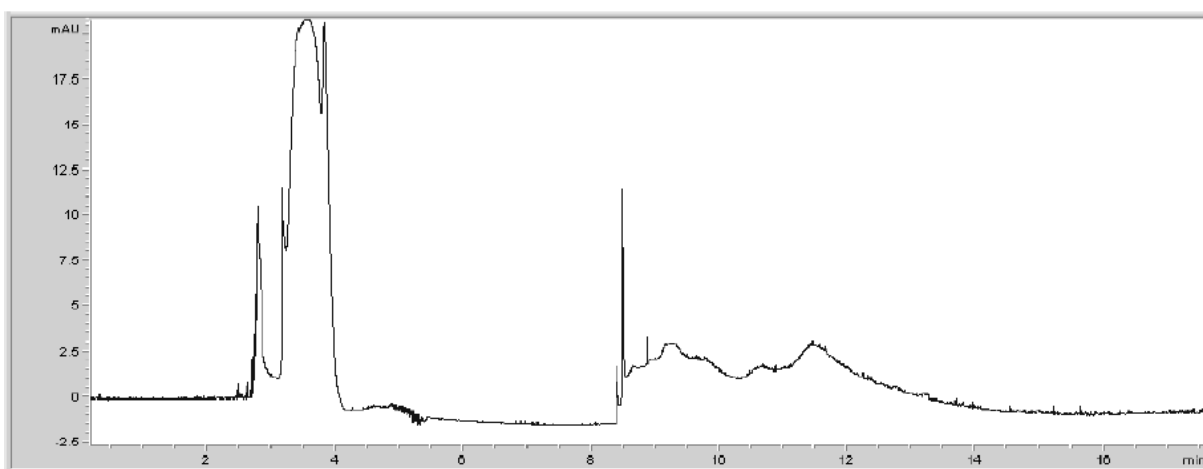
Při použití PVA kapiláry nebyl pozorován pík CS. To bylo způsobeno potlačením EOF a jeho elektroneutralitou ve zmíněném prostředí (viz. 4.1). Sice docházelo k migraci analytu, ale nebyla pozorována chirální separace. Při použití PAA kapiláry docházelo po nadávkování CS k ucpaní kapiláry. To lze vysvětlit interakcí PAA a CS vytvářející sraženinu v kapiláře.

4.6. Separace v oblasti vysokých hodnot pH a v PVA kapiláře

Z důvodu snahy o změnu interakce mezi CS a ibuprofenem (interakce analytu s jiným chirálním centrem CS) bylo provedeno měření v BGE 50 mM borátu o pH 10,0. Před analýzou byla kapilára promyta 10 minut vodou a 5 minut BGE. Po skončení řady

analýz byla kapilára opět promyta vodou po dobu 15 minut. Použité separační napětí bylo zvoleno 10 kV. Částečné plnění kapiláry CS bylo použito 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180 a 240 sekund při tlaku 50 mbar. Pro měření EOF byl dávkován MO po dobu 10 s a tlaku 50 mbar. Jako analyt byl použit ibuprofen. Také byl dávkován po dobu 10 s a tlaku 50 mbar.

Při použitím pH docházelo k částečnému rozpouštění povrchu kapiláry. To mělo za následek slabý EOF při měření. Ačkoliv se během prvotních měření na elektroferogramu objevoval náznak chirální separace, tak po zopakování měření vymizel a nebylo možné ho již znovu zopakovat (viz obr. č. 11).



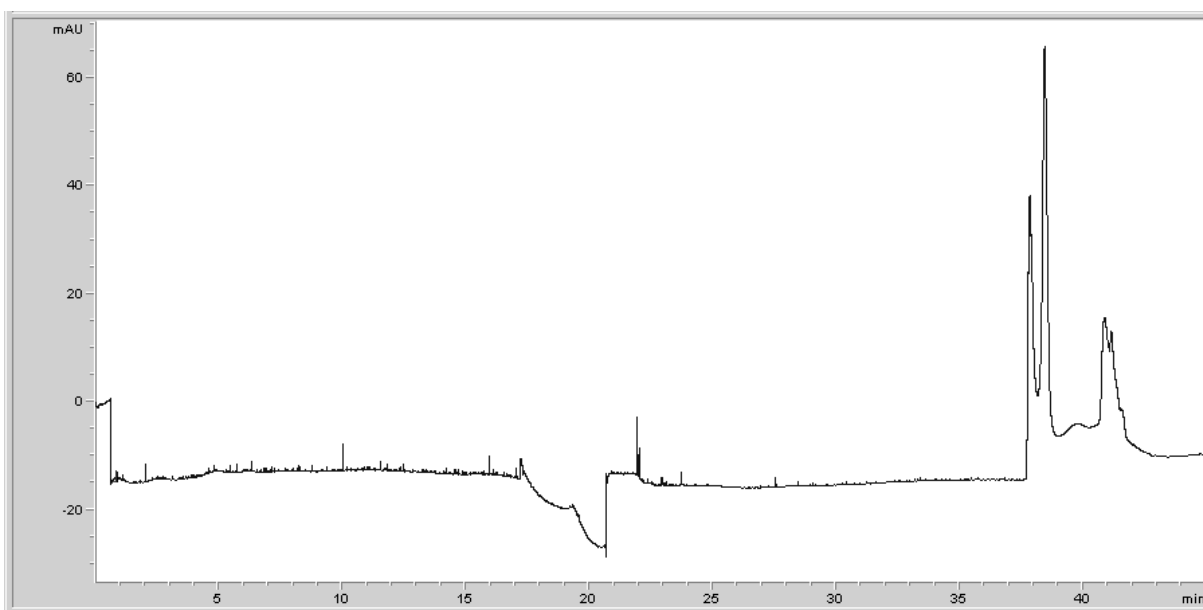
Obr. č. 11: Příklad analýzy při částečném plnění kapiláry po dobu 30 sec

4.7. Micelární elektrokinetická chromatografie

Pro zanesení další rovnováhy do systému byl použit přídavek dodecylsulfátu sodného (SDS) o koncentraci 5, 10, 25 a 50 mM do BGE. Jako BGE byl použit 50 mM MES o pH 6,0. Byla použita křemenná kapilára o celkové délce 33,5 cm a efektivní délce 25 cm. CS byl rozpuštěn v BGE s přídávkem 10 μ l HCl (konc.). Byl dávkován pod tlakem 50 mbar po dobu 15, 30, 45, 60, 90, 120 a 180 sekund. Jako analyt byl použit ibuprofen, který byl dávkován 10 sekund tlakem 50 mbar. Použité separační napětí bylo 10 kV.

Při koncentraci 5 mM SDS byl vidět náznak chirální separace při dávkování CS po dobu 90 a 120 sekund. Při koncentraci 10 mM SDS byla pozorována chirální separace při dávkování CS po dobu 180 sekund (viz obr. č. 13 a 14, tabulka č. 5). Při koncentraci 25 mM SDS a přídávku CS po dobu 120 sekund byla pozorována separace (viz obr. č. 12,

tabulka č. 4). Ve zbylých případech a při koncentraci 50 mM SDS separace pozorována nebyla.



Obr. č. 12: Příklad separace ibuprofenu při přidavku 25 mM SDS do BGE. Jednotlivé enantiomery migrovaly v čase 37,84 a 38,44 minut.

25 mM SDS					
120 sekund	t1 (min)	t2 (min)	w1 (min)	w2 (min)	R
	35,85	37,07	0,42	0,48	2,71
	37,84	38,44	0,24	0,23	2,51
	40,82	41,95	0,37	0,38	3,04
	průměr				2,8±0,7

Tabulka č. 4: Jednotlivé migrační časy (t) a šířky piků (w) a rozlišení (R) při separaci enantiomerů ibuprofenu. K separaci nastalo při částečném plnění kapiláry roztokem CS po dobu 120 sekund.

Pro výpočet rozlišení jednotlivých enantiomerů byl použit vzorec číslo 11. Pro separaci z obr. č. 12 výpočet proběhl následovně:

$$R = \frac{2(37,07 - 35,85)}{0,42 + 0,48} = 2,71$$

Vzhledem k rozdílům mezi vypočtenými hodnotami, je nutné zjistit, zda některá z hodnot není odlehlá. Z tohoto důvodu je dále použit Dean-Dixonův test.

$$Q_1 = \frac{2,71-2,51}{3,04-2,51} = 0,377 \text{ a } Q_3 = \frac{3,04-2,71}{3,04-2,51} = 0,623$$

$$Q_{\text{krit}(3;0,05)} = 0,941$$

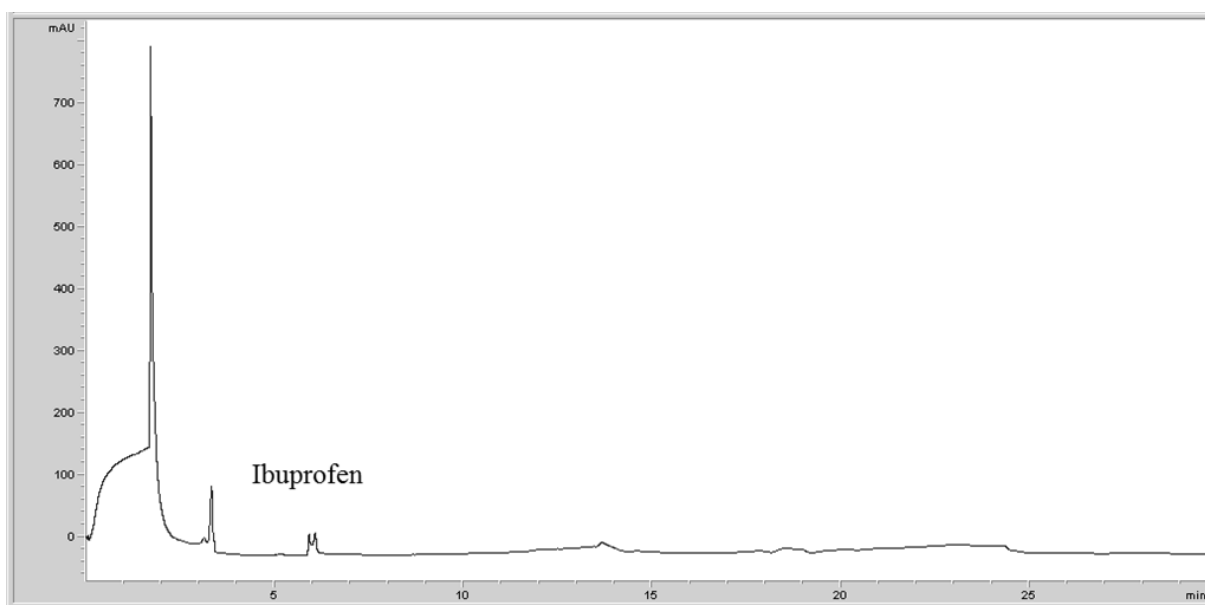
$Q_1 < Q_{\text{krit}}$ i $Q_3 < Q_{\text{krit}}$, z toho plyne, že ani jedna z hodnot není odlehlá. Průměrné rozlišení jednotlivých izomerů ibuprofenu touto metodou je 2,8.

Rozlišení jednotlivých enantiomerů ibuprofenu za přidavku 10 mM SDS do BGE bylo dosaženo částečným plnění kapiláry roztokem CS po dobu 180 sekund (viz tabulka č. 5).

10 mM SDS					
180 sekund	t1 (min)	t2 (min)	w1 (min)	w2 (min)	R
	5,91	6,07	0,07	0,10	1,93
	6,26	6,44	0,06	0,06	2,80
	6,28	6,53	0,08	0,08	2,95
	6,90	6,96	0,01	0,04	2,08
	průměr				2,4±0,8

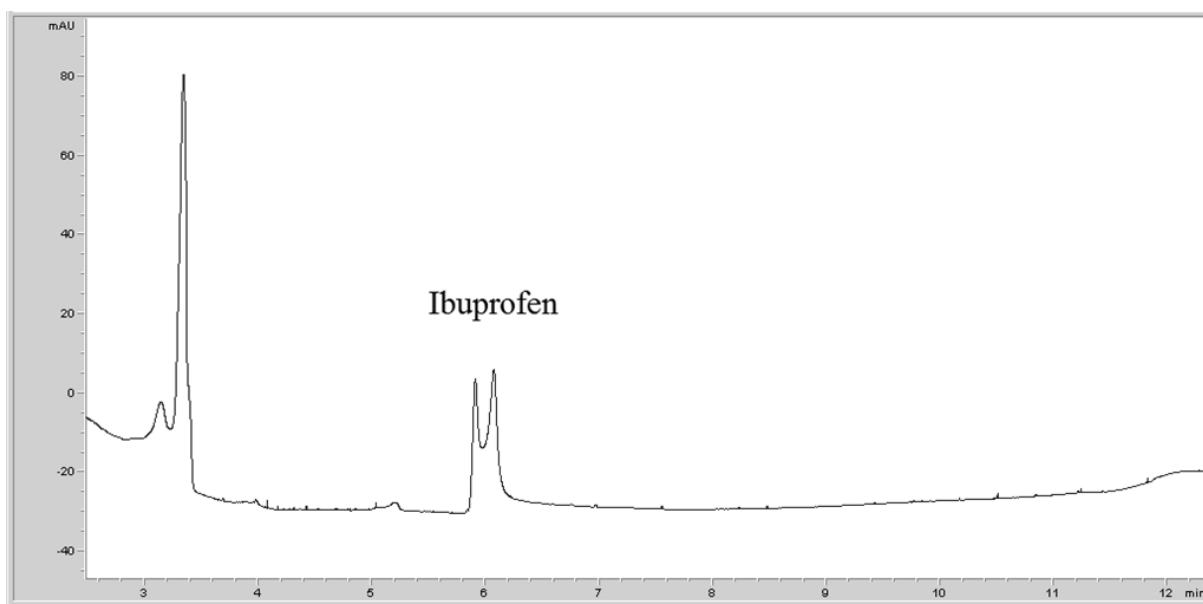
Tabulka č. 5: Jednotlivé migrační časy (t) a šířky piků (w) a rozlišení (R) při separaci enantiomerů ibuprofenu. K separaci nastalo při částečném plnění kapiláry roztokem CS po dobu 180 sekund.

Příklad elektroferogramu za uvedených podmínek je zobrazen na obr. č. 13.



Obr. č. 13: Elektroferogram rozlišení enantiomerů ibuprofenu.

Z důvodu vysoké absorpce složek je pro lepší zobrazení chirální separace nutno provést zvětšení potřebné části elektroferogramu (viz obr č. 14):



Obr. č. 14: Chirální separace ibuprofenu.

Vzhledem k rozdílům mezi vypočtenými hodnotami, je nutné zjistit, zda některá z hodnot není odlehlá. Z tohoto důvodu je opět použit Dean-Dixonův test.

$$Q_1 = \frac{2,08-1,93}{2,95-1,93} = 0,147 \text{ a } Q_4 = \frac{2,95-2,80}{2,95-1,93} = 0,147$$

$$Q_{\text{krit}(3;0,05)} = 0,795$$

$Q_1 < Q_{\text{krit}}$ i $Q_4 < Q_{\text{krit}}$, z toho plyne, že ani jedna z hodnot není odlehlá. Průměrné rozlišení jednotlivých izomerů ibuprofenu touto metodou je 2,44.

Porovnání aritmetických průměrů není vhodné k posouzení, která metoda poskytuje lepší rozlišení. Z tohoto důvodu je pro porovnání rozlišení metod obsahující v BGE 10 mM a 25 mM SDS použit test shodnosti:

$$F = \frac{0,510^2}{0,268^2} = 3,62$$

$$F_{\text{krit}(2; 3)} = 9,552$$

$F < F_{\text{krit}}$, tudíž jsou rozptyly shodné. Soubory ale obsahují odlišný počet hodnot, proto musíme před výpočtem kritéria t vypočítat hodnotu s :

$$s = \sqrt{\frac{(4-1)0,510^2 + (3-1)0,268^2}{3+4-2}} = 0,430$$

$$t = \frac{(2,75-2,44)}{0,43 \sqrt{\frac{1}{2,75} + \frac{1}{2,44}}} = 0,93$$

$$t_{\text{krit}(0,975; 5)} = 2,571$$

$t < t_{\text{krit}}$, tudíž se střední hodnoty neliší.

Vzhledem k tomu, že se hodnoty rozlišení mezi jednotlivými metodami výrazně neliší a také z důvodu výrazně kratšího času nutného k separaci je vhodnější zvolit následující metodu: Separace v BGE, který je tvořen 50 mM MOPs pH 6,0 s přídavkem 10 mM SDS. Částečné plnění kapiláry roztokem 1 mM vankomycinu CDP v 50 mM MOPs pH 6,0 po dobu 180 sec a tlakem 50 mbar, poté dávkování 10 sec roztoku 0,1 mM ibuprofenu v deionizované vodě. Separace probíhá při napětí 10 kV, detekce při vlnové délce 254 nm.

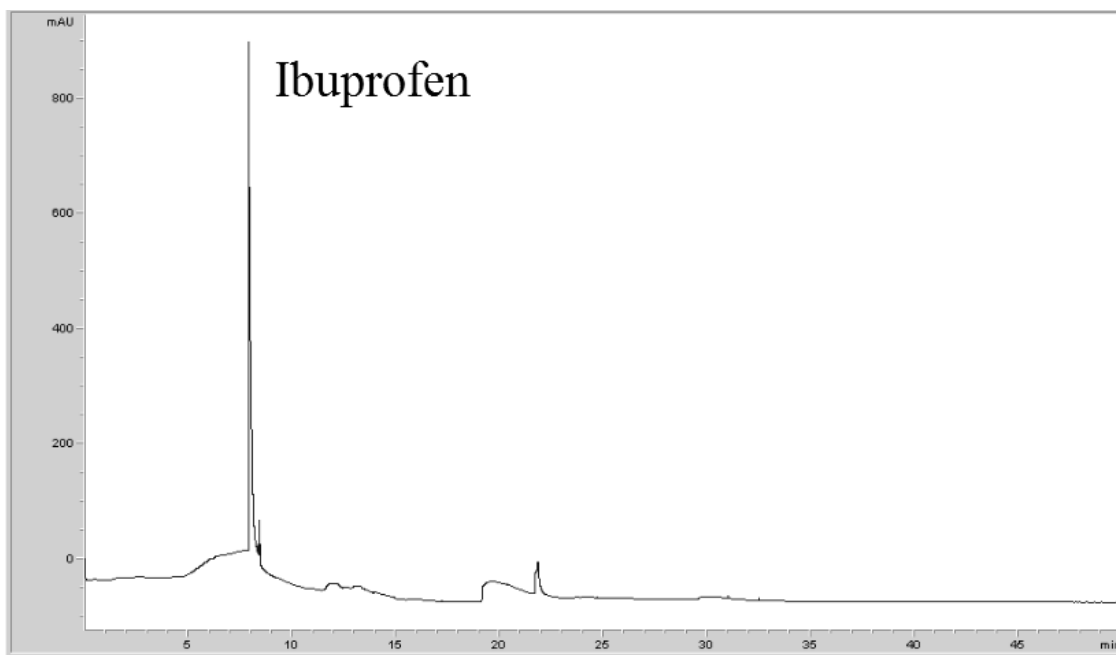
4.8. Přídavek organického aditiva do BGE obsahující PAL

Při měření bylo použito složení BGE jako v kapitole 4.7 s tím rozdílem, že do jednotlivých pufrů bylo přidáno 5 % MeOH. Následně bylo provedeno měření, při kterém bylo provedeno částečné plnění kapiláry CS po dobu 90 a 120 sekund u jednotlivých koncentrací SDS v BGE. Za takovýchto podmínek došlo ke ztrátě rozlišení jednotlivých enantiomerů (viz 4.7) a tudíž byla jako finální metoda pro chirální separaci ibuprofenu za využití nového chirálního selektoru ta, která byla vyvinuta v kapitole 4.7.

4.9. Přídavek nanočástic

Při měření byla použita výše vyvinutá metoda s tím rozdílem, že po nadávkování vzorku ibuprofenu byl při tlaku 50 mbar nadávkován vodný roztok nanočástic železa. Nanočástice obsahující na povrchu NH_2 skupinu i ty obsahující COOH skupinu byly dávkovány 10, 20 a 60 sekund. Veškerá měření byla třikrát zopakována.

Vzhledem k tomu, že CS obsahuje řadu ionizovatelných skupin, byla předpokládána možnost interakce těchto skupin s funkčními skupinami na povrchu NPs za tvorby 3D struktur ovlivňující chirální separaci analytu. Během měření pravděpodobně došlo k interakci analytu a NPs vedoucí ke zvýšení signálu ibuprofenu. Tato interakce ale také potlačila chirální separaci enantiomerů (viz obr. č. 15) a tudíž není přidavek NPs vhodný pro další postup.



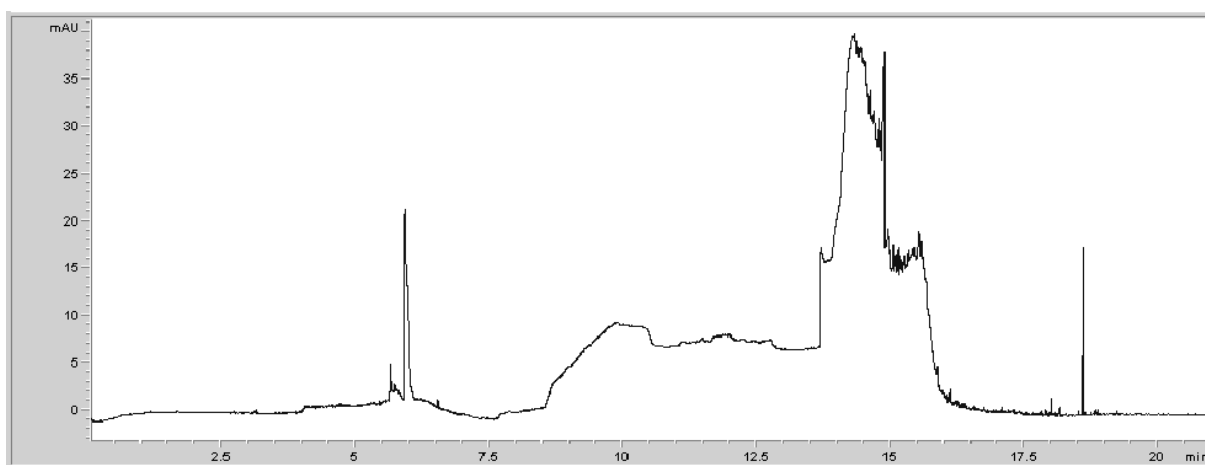
Obr. č. 15: Potlačení chirální separace po přidavku nanočástic s NH_2 skupinou (dávkování 20 s)

4.10. Chirální separace ibuprofenu pomocí vankomycinu

Při měření byly zvoleny následující podmínky:

Separace v BGE, který je tvořen 50 mM MOPs pH 6,0 s přidavkem 10 mM SDS. Částečné plnění kapiláry roztokem 1 mM vankomycinu v 50 mM MOPs pH 6,0 po dobu 60, 90, 120, 150, 180, 220 a 250 sec a tlakem 50 mbar, poté dávkování 10 sec roztoku 0,1 mM ibuprofenu v deionizované vodě. Separace probíhá při napětí 10 kV, detekce při vlnové délce 254 nm. Měření při jednotlivých dobách částečného plnění kapiláry bylo zopakováno čtyřikrát.

Na rozdíl od měření s vankomycinem CDP jako CS nebyla pozorována chirální separace ibuprofenu ani při jedné z uvedených dob částečného plnění kapiláry (viz obr. č. 16).



Obr. č. 16: Částečné plnění kapiláry vankomycinem po dobu 90 sekund s komerčně přístupným vankomycinem jako CS.

5. ZÁVĚR

Cílem práce bylo zkoumat možnosti aplikace nového chirálního selektoru v kapilární elektroforéze. Během práce byla naměřena elektroforetická mobilita CS, bylo měřeno při nízké hodnotě pH i vysoké hodnotě pH BGE, vyšší viskozitě BGE, v dynamicky i kovalentně pokrytých kapilárách, s přidavkem nanočástic do BGE za vzniku interakce NPs s CS a s analyzovanou látkou a v režimu micelární elektrokinetické chromatografie.

Separace analyzované látky (léčiva ibuprofenu) s průměrným rozlišením enantiomerů 2,44 bylo dosaženo do 7 minut za následujících podmínek: BGE je tvořen 50 mM MOPs pH 6,0 s přidavkem 10 mM SDS. Částečné plnění kapiláry roztokem 1 mM vankomycinu CDP v 50 mM MOPs pH 6,0 po dobu 180 sec a tlakem 50 mbar, poté dávkování po dobu 10 sekund roztoku 0,1 mM ibuprofenu v deionizované vodě. Separace probíhala při napětí 10 kV, detekce při vlnové délce 254 nm.

Za daných podmínek byl použit i vankomycin s tím rozdílem, že nebyla pozorována chirální separace analytu. Tudíž byla prokázána rozdílná použitelnost vankomycinu CDP oproti vankomycinu a je možné ho považovat za nový chirální selektor využitelný v oblasti kapilární elektroforézy.

6. LITERATURA

1. B. Buszewski, E. Dziubakiewicz, M. Szumski, *Electromigration techniques*, Springer, Torún (2013).
2. D. Baker, *Capillary electrophoresis*, John Wiley and Sons INC., New York (1995).
3. M. Nógrádi, *Stereochemistry Basic Concepts and Applications*, Akadémiai Kiadó, Budapešť (1981).
4. V.M. Potapov, *Stereochemie*, Chimija, Moskva (1976).
5. D. Cataldo, B. Evrard, A. Noel, J.M. Foidart, Use of cyclodextrin for treatment and prevention of bronchial inflammatory diseases, Patent EP 1799231 B1 (2010).
6. Shu, Kobayashi, H. Tomoaki, S. Nagayama, K. Manabe, Asymmetric Catalysis in Aqueous Media: Use of Metal-Chiral Crown Ethers as Efficient Chiral Lewis Acid Catalysts in Asymmetric aldol Reactions, *Journal of the Brazilian Chemical Society* 12 (2001) 627-633.
7. D.W. Armstrong, K.L. Rundlett, J.R. Chen, Evaluation of the Macrocyclic Antibiotic Vancomycin as a Chiral Selector for Capillary Electrophoresis, *Chirality* 6 (1994) 496-509.
8. D.W. Armstrong, U.B. Nair, Capillary electrophoretic enantioseparations using macrocyclic antibiotic as chiral selectors, *Electrophoresis* 18 (1997) 2331-2342.
9. M.P. Gasper, A. Berthod, U.B. Nair, D.W. Armstrong, Comparison and Modeling Study of Vancomycin, Ristocetin A, and Teicoplanin for CE Enantioseparations, *Analytical Chemistry* 68 (1996) 2501-2514.
10. G. Scriba, G. Li, J. Kang, *Chiral Separations: Methods and Protocols*, Humana Press, New York (2013).
11. N. Shukla, D. Yang, A.J. Gellman, Enantiomeric separations of Chiral pharmaceuticals using chirally modified tetrahedral Au nanoparticles, *Surface Science* 648 (2016) 29-34.

12. C.D. García, K.Y. Chumbimuni-Torres, E. Carrilho, *Capillary Electrophoresis and Microchip Capillary Electrophoresis: Principles, Application, and Limitations*, John Wiley & Sons, New Jersey (2013).
13. P. Atkins, J.D. Paula, *Fyzikální chemie, VŠCHT v Praze, Praha* (2013).
14. G. Hancu, A. Rusu, B. Simon, G. Boia, Á. Gyéresi, Simultaneous Separation of Ciprofloxacin, Norfloxacin and Ofloxacin by Micellar Electrokinetic Chromatography, *Journal of the Brazilian Chemical Society* 23 (2012) 1889-1894.
15. M. Babič, *Superparamagnetické nano- a mikročástice s hydrofilními povrchy, Disertační práce, UK Praha a AV ČR* (2012).
16. R. Massart, Preparation of aqueous magnetic liquids in alkaline and acetic media, *IEEE Transactions on Magnetics* 17 (1981) 1247–1248.
17. S.S. Papell, Low viscosity magnetic fluid obtained by the colloidal suspension of magnetic particles, *US Patent US3215572 A* (1965).
18. F. d'Orlye', A. Varenne, P. Gareil, Size-based characterization of nanometric cationic maghemite particles using capillary zone electrophoresis, *Electrophoresis* 29 (2008) 3768-3778.
19. F. d'Orlye', A. Varenne, T. Georgelin, J.M. Siaugue, B. Teste, S. Descroix, P. Gareil, Charge-based characterization of nanometric cationic bifunctional maghemite/silica core/shell particles by capillary zone electrophoresis, *Electrophoresis* 30 (2009) 2572-2582.
20. K. Pušnik, T. Goršak, M. Drogenik, D. Makovec, Synthesis of aqueous suspensions of magnetic nanoparticles with the co-precipitation of iron ions in the presence of aspartic acid, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. 413 (2016) 65-75.
21. S. Razzaque, S.Z. Hussain, I. Hussain, B. Ten, Design and Utility of Metal/Metal Oxide Nanoparticles Mediated by Thioether End-Functionalized Polymeric Ligands, *Polymers* 8 (2016) 156.
22. J. Petr, B. Teste, S. Descroix, J.M. Siaugue, P. Gareil, A. Varenne, Separation of α -lactalbumin grafted and non-grafted maghemite core/silica shell

nanoparticles by capillary zone electrophoresis, *Electrophoresis* 31 (2010) 2754-2761.

23. D.S. Wishart, C. Knox, A.C. Guo, S. Shrivastava, M. Hassanali, P. Stothard, Z. Chang, J. Woolsey, DrugBank: a comprehensive resource for in siliciodrug discovery and exploration, *Nucleotic Acids Research (Database issue)*: D668-72, 16381955 (2006).
24. M. Meloun, J. Militký, *Kompendium statistického zpracování dat*, Academia, Praha (2002).
25. Kanji, K. Gopal, *100 Statistical Tests*. London : SAGE Publication Ltd. (1993).

7. SEZNAM ZKRATEK

α	hladina významnosti
δ	tloušťka difuzní dvojvrstvy
ε	dielektrická konstanta roztoku
ε	molární absorpční koeficient
η	viskozita prostředí
μ_A	elektroforetická mobilita analytu
μ_{EOF}	elektroosmotická mobilita analytu
μ_{ep}	elektroforetická mobilita
μ_{obs}	pozorovaná mobilita analytu
ν	počet stupňů volnosti
ν_{ep}	elektroforetická rychlost
ζ	ζ -potenciál
A	absorbance
BGE	základní elektrolyt (background electrolyte)
CD	cyklodextrin
CDP	interní označení derivátu vankomycinu
CE	kapilární elektroforéza (capillary electrophoresis)
CMC	kritická micelární koncentrace (critical micellar concentration)
CS	chirální selektor
CTAB	cetyltrimethylamonium bromid
CZE	kapilární zónová elektroforéza (capillary zone electrophoresis)
DAD	detektor s diodovým polem (diode array detektor)
DDAB	dicetyldimethylamonium bromid
DLS	dynamický rozptyl světla (dynamic light scattering)
DNA	deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleic acid)
e	náboj vztažen na jednotku plochy
E	intenzita elektrického pole
EOF	elektroosmotický tok (electroosmotic flow)
ESI	ionizace elektrosprejem (electrospray ionization)
F	elektrostatická síla
F	hodnota F-testu

F'	třecí síla
F _{krit}	kritická hodnota pro F-test
FTIR	infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací (Fourier transformation infrared spectroscopy)
GMA	glykopeptidická makrocyclická antibiotika
HEC	hydroxyethylcelulosa
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (high performance liquid chromatography)
l	délka optické dráhy
L	celková délka kapiláry
L _{ef}	efektivní délka kapiláry
MEKC	micelární elektrokinetická chromatografie (micellar electrokinetic chromatography)
mbar	milibar (1 mbar = 100 Pa)
MeOH	methanol
MES	2-(N-morfolino)ethansulfonová kyselina
MO	mesityl oxid
MOPS	3-(N-morfolino)propansulfonová kyselina
M _s	saturační magnetizace
MS	hmotnostní spektrometrie (mass spectrometry)
n	počet hodnot
NMR	nukleární magnetická rezonance
NPs	nanočástice (nanoparticles)
PAA	polyakrylamid
PAL	povrchově aktivní látka
Peg	polyethylenglykol
PEI	polyethylenimin
PEO	polyethylenoxid
PVA	polyvinylamid
q	náboj
Q _n	hodnota Dean-Dixonova testu
Q _k	kritická hodnota pro Dean-Dixonův test

r	iontový poloměr
R	rozlišení (resolution)
R	rozpětí hodnot
s	výběrový odhad směrodatné odchylky
s	hodnota testu shodnosti
SDS	dodecylsírán sodný (sodiumdodecyl sulfate)
SEM	skenovací elektronová mikroskopie
SQUID	supravodivé kvantové interferenční zařízení (superconducting quantum interference device)
t	migrační čas analytu
t	hodnota testu shodnosti
T_C	Currieho teplota
TDAB	tetradecyltrimethylammonium bromid
TEM	transmisní elektronová mikroskopie
t_{krit}	kritická hodnota pro test shodnosti
T_N	Neelova teplota
TTAB	tetradecyltrimethylammonium bromid
UV	ultrafialová (ultraviolet)
UV/Vis	ultrafialová a viditelná oblast záření (ultraviolet/visible)
V	separační napětí
w	šířka píku při základně (width)
\bar{x}	aritmetický průměr souboru hodnot
XRD	prášková rentgenová difrakce (X-ray powder diffraction)