

UNIVERZITA PARDUBICE  
FAKULTA CHEMICKO – TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2009

Jana Peterová

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko–technologická  
Katedra analytické chemie

# Využití cyklodextrinů v kapilární elektroforéze

Bakalářská práce

AUTOR: Jana Peterová

VEDOUCÍ PRÁCE: Ing. Václav Staněk, Ph.D.

2009

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Jana PETEROVÁ**

Studijní program: **B2802 Chemie a technická chemie**

Studijní obor: **Chemie a technická chemie**

Název tématu: **Využití cyklodextrinů v kapilární elektroforéze**

### Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

- 1) Proveďte literární rešerši zabývající se možnostmi využití cyklodextrinů pro separace polohových a optických izomerů pomocí kapilární elektroforézy.
- 2) Na základě literárních údajů proveďte elektroforetickou separaci vybraných izomerních látek a porovnejte vliv různých cyklodextrinů na separaci.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

**Podle pokynů vedoucího práce.**

Vedoucí bakalářské práce:

**Ing. Václav Staněk, Ph.D.**

Katedra analytické chemie

Konzultant bakalářské práce:

**doc. Ing. Jan Fischer, CSc.**

Katedra analytické chemie

Ostatní konzultanti:

**Ing. Petr Česla, Ph.D.**

Katedra analytické chemie


Datum zadání bakalářské práce: **23. února 2009**

Termín odevzdání bakalářské práce: **26. června 2009**

  
prof. Ing. Petr Lošťák, DrSc.

děkan

L.S.

  
prof. Ing. Karel Vytrás, DrSc.  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 23. února 2009

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 18.6.2009

Jana Peterová

Za odbornou pomoc a praktické rady při psaní bakalářské práce bych chtěla poděkovat vedoucímu práce, panu Ing. Václavu Staňkovi, Ph.D. a také konzultantu, panu Ing. Petru Česlovi, Ph.D. za odbornou pomoc v průběhu měření dat potřebných v experimentální části bakalářské práce.

Dále bych ráda poděkovala Juraji Mojžišovi za morální podporu a také Jaromíru Kulhánkovi, Grzegorzovi Sztefekovi a Juraji Gregovi za celkovou motivaci a pravopisné a gramatické úpravy.

Nejvíce bych chtěla poděkovat rodičům za finanční a psychickou podporu, kterou mi věnovali během doby celého studia.

## SOUHRN:

Předložená bakalářská práce se zabývá studiem vlivu různých cyklodextrinů na selektivitu elektroforetické separace. V práci jsou popsány teoretické aspekty kapilární elektroforézy a některé v literatuře publikované výsledky o využití cyklodextrinů jako přídavných látek do pracovního elektrolytu pro separace polohových a optických izomerů. V experimentální části pak byl sledován vliv  $\beta$ -cyklodextrinu na selektivitu separace polohových izomerů naftalensulfonových kyselin.

## KLÍČOVÁ SLOVA:

Kapilární elektroforéza, cyklodextriny, polohové izomery, optické izomery, naftalensulfonové kyseliny.

## SUMMARY:

Effects of the addition of various cyclodextrins in the working electrolyte on the selectivity of capillary electrophoretic separation were investigated. This work describes theoretical aspects of capillary electrophoretic methods and some published applications of cyclodextrins as isomeric selector additives for separation of positional isomers and enantiomers. In the experimental part, the effect of  $\beta$ -cyclodextrin on the separation selectivity of isomeric naphthalenesulphonic acids was studied.

## KEYWORDS:

Capillary electrophoresis; Cyclodextrins; Positional isomers; Enantiomers; Naphthalene-sulphonic acids.



## OBSAH

1.	ÚVOD .....	11
2.	KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZA.....	12
2.1.	<i>Techniky CE</i> .....	12
2.1.1.	Kapilární zónová elektroforéza (CZE).....	12
2.1.2.	Micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC).....	13
2.1.3.	Kapilární gelová elektroforéza (CGE) .....	13
2.1.4.	Kapilární elektrochromatografie (CEC).....	14
2.1.5.	Kapilární izotachoforéza (CITP).....	14
2.1.6.	Kapilární izoelektrická fokusace (CIEF) .....	14
2.2.	<i>Teoretické principy CE</i> .....	15
2.2.1.	Elektroforetická pohyblivost.....	15
2.2.2.	Elektroosmotický tok (EOF).....	16
2.2.3.	Zdánlivá pohyblivost .....	17
2.3.	<i>Instrumentace CE</i> .....	17
2.3.1.	Separční kapiláry.....	17
2.3.2.	Dávkování vzorku .....	18
2.3.3.	Zdroj vysokého napětí.....	18
2.3.4.	Detekce signálu .....	18
3.	CYKLODEXTRIN.....	20
3.1.	<i>Chemické a fyzikální vlastnosti</i> .....	20
3.1.1.	Chemická struktura .....	20
3.1.2.	Fyzikální vlastnosti .....	21
4.	APLIKACE CYKLODEXTRÍNŮ V KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZE .....	24
4.1.	<i>Separace polohových izomerů</i> .....	24
4.2.	<i>Chirální separace</i> .....	26
5.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	27
5.1.	<i>Chemikálie</i> .....	27
5.2.	<i>Přístrojové vybavení</i> .....	28
5.3.	<i>Postup práce</i> .....	28
5.4.	<i>Vyhodnocení výsledků</i> .....	29
5.5.	<i>Diskuze</i> .....	29

5.6. Přílohy .....	30
6. ZÁVĚR.....	34
7. POUŽITÁ LITERATURA.....	35

## POUŽITÉ ZKRATKY

CD	cyklodextrin
CE	kapilární elektroforéza
CEC	kapilární elektrochromatografie
CGE	kapilární gelová elektroforéza
CGT	glykosytransferáza
CIEF	kapilární izoelektrická fokusace
CITP	kapilární izotachoforéza
CTAB	cetyltrimethylammonium bromid
CZE	kapilární zónová elektroforéza
DNP	dinitrofenol
EOF	elektroosmotický tok
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
LIF	laserem indukovaná fluorescence
MEKC	micelární elektrokinetická chromatografie
MS	hmotnostní spektrometr
NDSA	naftalendisulfonová kyselina
NSA	naftalensulfonová kyselina
PAGE	polyakrylamidový gel
PQ	primaquin
PVP	polyvinylpyrolidon
QC	quinocin
SDS	dodecylsírán sodný
TNP	trinitrofenol
UV	ultrafialový

## 1. ÚVOD

Kapilární elektroforéza (CE) je moderní analytická separační metoda, při které dochází k dělení nabitých částic působením vnějšího elektrického pole. Vyznačuje se vysokou citlivostí, účinností a reprodukovatelností na úrovni vysokouúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) a své uplatnění nachází při analýze nejen anorganických i organických iontů ale nejrůznějších biologických vzorků.

Historie vývoje CE sahá do minulého století, v roce 1967 sestrojil Hjertén první laboratorní zařízení pro kapilární elektroforézu [1]. V podélně rotujících skleněných trubicích o vnitřním průměru 3 mm provedl elektroforetické separace anorganických iontů, proteinů a nukleových kyselin. Prudký vzestup zájmu o tuto metodu začal ale až v 80. letech 20 století a byl odstartován pracemi Jorgensena a Lukacse [2,3], kteří jako první demonstrovali vysokou účinnost elektroforetické separace v tenké křemenné kapiláře (vnitřní průměr 75  $\mu\text{m}$ ). Jejich jednoduché přístrojové zařízení, které se skládalo ze zdroje vysokého napětí (30 kV), elektrodových nádobek a modifikovaného HPLC UV detektoru je dodnes základem většiny komerčních přístrojů pro kapilární elektroforézu. Dalším důležitým krokem ve vývoji CE bylo zavedení micelární elektrokinetické chromatografie (MEKC) [4], kdy bylo využito přísady povrchově aktivní látky SDS do pracovního elektrolytu za vzniku tzv. micel, které umožnily separaci neutrálních molekul. Spojení separačních principů kapalinové chromatografie a kapilární elektroforézy vedlo k vývoji kapilární elektrochromatografie (CEC), kterou uvedli do praxe Knox a Grant [5,6]. Cyklodextriny jako modifikátory pracovního elektrolytu byly poprvé v oblasti CE použity Tazakim a kol. v roce 1982 při izotachforetickém stanovení kvarterních amoniových solí [7].

V současnosti nejvíce používanými separačními technikami CE jsou kapilární zónová elektroforéza (CZE), MEKC a CEC. Dále se pro separace proteinů a nukleových kyselin používají kapilární gelová elektroforéza a kapilární izoelektrická fokusace [8-10].

## 2. KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZA

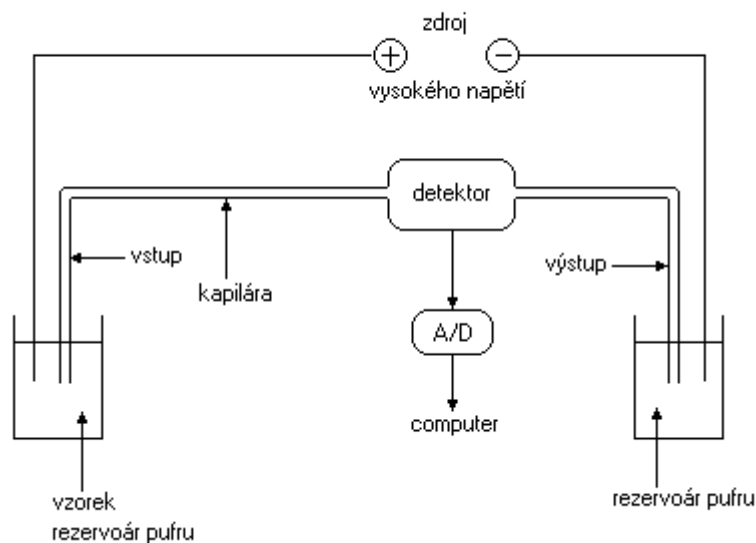
Princip separace složek analyzovaného vzorku pomocí kapilární elektroforézy spočívá v rozdílné rychlosti migrace iontových částic účinkem vnějšího elektrického pole, neboť disociované částice složek vzorku se ve vodném prostředí liší svojí elektroforetickou pohyblivostí (mobilitou).

### 2.1. Techniky CE

V současnosti se rozlišuje šest základních experimentálních technik kapilární elektroforézy: kapilární zónová elektroforéza, micelární elektrokinetická chromatografie, kapilární gelová elektroforéza, kapilární izotachoforéza, kapilární izoelektrická fokusace a kapilární elektrochromatografie. Všechny uvedené techniky jsou založeny na separaci účinkem elektrického pole během migrace v roztoku a společným prvkem je rovněž kapilární formát instrumentace elektroforézy.

#### 2.1.1. Kapilární zónová elektroforéza (CZE)

CZE se provádí v otevřené křemenné kapiláře naplněné elektrolytem (obr. 1). Separace probíhá díky kombinaci vlivu elektroforetické migrace a elektroosmotického toku. Elektroforetická migrace je pohyb nabitých částic v elektrickém poli a elektroosmotický tok je tok elektrolytu způsobený nábojem vnitřní stěny kapiláry a aplikovaným potenciálem (obr. 2a). Silanové skupiny podél vnitřní stěny kapiláry ve styku s elektrolytem mají tendenci ionizovat se a vytvářet tak na rozhraní stěny kapiláry a elektrolytu elektrickou dvojvrstvu. Po aplikaci elektrického napětí se začnou kationty pocházejících z pracovního elektrolytu v blízkosti stěny kapiláry pohybovat směrem ke katodě a strhávají elektrolyt s sebou. Tím se vytváří elektroosmotický tok směrem ke katodě. Částice s různým nábojem se pohybují různým směrem v závislosti na náboji, kladně nabitě částice putují směrem ke katodě, jelikož elektroforetická migrace i elektroosmotický tok mají stejný směr. V případě separace záporně nabitých částic pak elektroosmotický tok a elektroforetická migrace mají opačný směr, ale vzhledem k velikosti elektroosmotického toku jsou anionty rovněž unášeny ve směru katody. V případě potřeby lze velikost a směr elektroosmotického toku změnit modifikací vnitřního povrchu separační kapiláry.



**Obr. 1:** Schéma přístroje pro kapilární zónovou elektroforézu [11].

Čas potřebný k tomu aby separované částice prošly kapilárou, závisí na délce a průměru separační kapiláry, elektroforetické pohyblivosti částic, na použitém elektrolytu a vloženém napětí. Rychlost průchodu částic kapilárou ovlivňuje také jejich tvar, velikost a náboj, dále také koncentrace elektrolytu a jeho pH [8,12].

### 2.1.2. Micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC)

Jedná se o separační techniku, která vznikla kombinací principů micelární chromatografie a kapilární zónové elektroforézy, a slouží k separaci neutrálních molekul. Do základního elektrolytu je přidána povrchově aktivní látka (SDS, CTAB, atd.), schopná vytvářet tzv. micely. Jedná se o kulovité útvary o určité struktuře, nesoucí elektrický náboj a tudíž jsou micely schopny se v elektrickém poli pohybovat jako kterákoliv jiná nabitá částice. I když se vzniklé micely pohybují proti směru EOF, jejich rychlost pohybu je menší než samotného EOF, a proto jsou elektroosmotickým tokem unášeny směrem k detektoru. Analyzované neutrální látky sice nenesou samy o sobě žádný náboj, ale interagují s micelami a dojde k separaci na základě rozdělení složek vzorku mezi vodnou a micelární fází (obr. 2b).

### 2.1.3. Kapilární gelová elektroforéza (CGE)

U CGE se dříve pracovalo s kapilárou, naplněnou různými typy gelů, např. agarosou nebo polyakrylamidovým gelem (PAGE) kovalentně vázaným ke stěně kapiláry. Z důvodu obtížného plnění kapiláry gelem se začaly postupně používat roztoky lineárních polymerů tvořících v kapiláře tzv. molekulová síta.

Na rozdíl od CZE závisí separace vzorku pomocí CGE na elektroforetickém pohybu nabitých molekul gelovou maticí, kdy vlastní gel slouží jako molekulové síto, které umožňuje rozdělit jednotlivé složky vzorku podle míry jejich zpomalení při průchodu sítím. Toto zpomalení je přímo úměrné molekulové hmotnosti separovaných molekul, které se pak rozdělí podle vzrůstající molekulové hmotnosti (obr. 2c). Separace je dále ovlivněna také velikostí separovaných molekul, porozitou použitého gelu, poměrem velikosti molekul a náboje, atd.

#### 2.1.4. Kapilární elektrochromatografie (CEC)

Tato metoda je založena na principech HPLC a CZE. Separální kapilára je zde naplněna stacionární fází a hnací silou je EOF, kdy pracovní elektrolyt je v kontaktu s vnitřní stěnou kapiláry i s povrchem náplně kapiláry [10].

Velkou výhodou této metody je snadná instrumentace a vysoká účinnost převzatá od CZE a vysoká selektivita převzatá od HPLC. Neutrální částice i ionty jsou pak rozděleny na základě rozdílných interakcí se stacionární fází stejně jako u HPLC, ionty se navíc pohybují v elektrickém poli rozdílnými rychlostmi podle jejich elektroforetických pohyblivostí (obr. 2d). Díky plochému rychlostnímu profilu EOF v porovnání s parabolickým profilem toku mobilní fáze u HPLC má pak CEC mnohem vyšší separační účinnost. Ta spolu se selektivitou separace může být také výrazně ovlivněna přidávkem různých modifikátorů do pracovního elektrolytu [13].

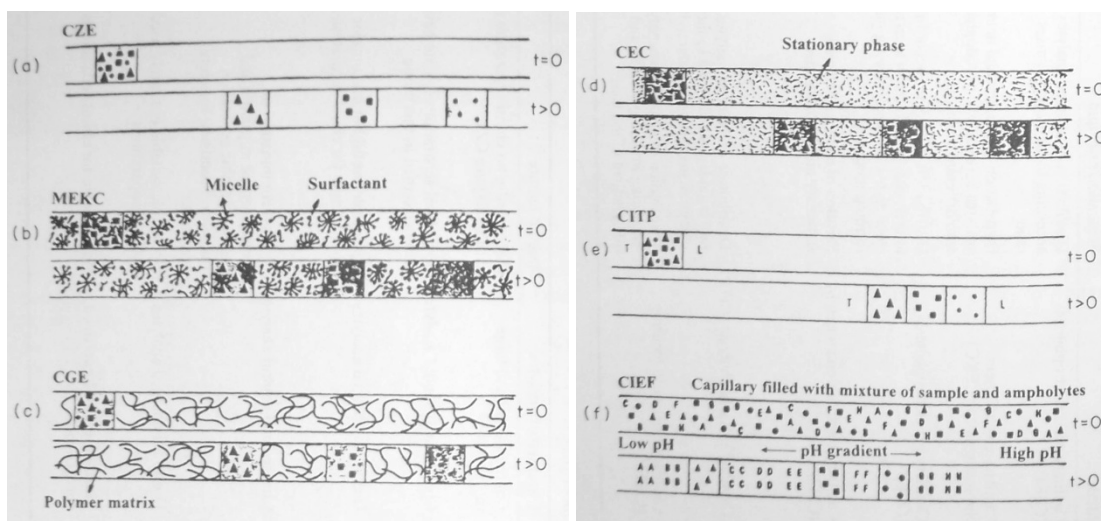
#### 2.1.5. Kapilární izotachoforéza (CITP)

Jedná se opět o techniku umožňující dělení složek vzorku podle efektivní pohyblivosti aniontů nebo kationtů ve stejnosměrném elektrickém poli ale na rozdíl od CZE se zde používají dva různé pracovní elektrolyty. Vedoucí elektrolyt obsahuje vedoucí aniont o větší pohyblivosti než nejrychlejší aniont vzorku a koncový elektrolyt obsahuje aniont, který je pomalejší než nejpomalejší aniont vzorku. Před vlastní analýzou je vzorek nadávkován mezi vedoucí a koncový elektrolyt a složky vzorku se pak působením stejnosměrného napětí rozdělí na základě jejich rozdílných pohyblivostí, přičemž rychlejší ionty se dostávají blíže vedoucímu elektrolytu a pomalejší naopak blíže ke koncovému elektrolytu. Po čase se vytvoří ostré zóny, ve kterých se separované ionty pohybují konstantní rychlostí (obr. 2e).

#### 2.1.6. Kapilární izoelektrická fokusace (CIEF)

Zde používáme kapiláry, jejichž vnitřní povrch je modifikován kvůli minimalizaci EOF a separace probíhá pouze na základě elektroforetické migrace. Kapilára je naplněna směsí vzorku pro separaci a amfolytem, což je elektrolyt disociovaný v širokém rozmezí pH.

Po vložení napětí vytvoří amfolyt v kapiláře lineární pH gradient a jednotlivé molekuly separovaného vzorku pak migrují do místa, kde pH odpovídá jednotlivým izoelektrickým bodům a v tomto místě se zastaví. Vznikají tak zóny molekul se stejným izoelektrickým bodem (obr. 2f).



**Obr. 2:** Schematické znázornění principů separací jednotlivých CE technik [13].

## 2.2. Teoretické principy CE

### 2.2.1. Elektroforetická pohyblivost

Elektroforetická pohyblivost  $\mu_e$  nabitě částice je rychlost jejího pohybu v elektrickém poli o jednotkové intenzitě:

$$\mu = \frac{v}{E}$$

kde  $\mu$  je elektroforetická pohyblivost,  $v$  je rychlost pohybu iontu a  $E$  je intenzita elektrického pole.

Pohyblivost iontu v roztoku je ovlivňována interakcemi mezi ionty a závisí hlavně na jeho náboji a velikosti a viskozitě prostředí. Tuto závislost popisuje Stokesův vztah:

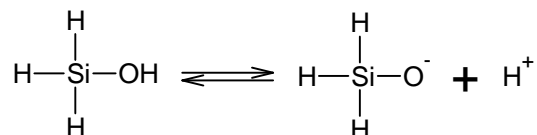
$$\mu = \frac{q}{6\pi\eta\rho}$$

kde  $q$  je náboj iontu,  $\eta$  je viskozita a  $\rho$  je poloměr iontu. [11, 12]



### 2.2.2. Elektroosmotický tok (EOF)

Stěny kapiláry z taveného křemene obsahují silanolové skupiny, které se při kontaktu se zásaditějšími roztoky disociují dle rovnice:



Takto se na stěnách kapiláry vytvoří záporný náboj. Ke stěně je přitažena vrstva kationů pocházejících z pracovního elektrolytu a vzniká tak stabilní elektrická dvojvrstva, tzv. Sternova vrstva. Kationty vyskytující se blíže u středu kapiláry tvoří tzv. difúzní vrstvu. Po vložení napětí začnou kationty migrovat ke katodě. Jelikož jsou kationty  $\text{H}^+$  silně hydratovány, jejich pohyb společně s disociovanými molekulami vody vyvolá tok celého roztoku k detektoru umístěného před katodou. Tomuto jevu se říká elektroosmóza a vzniklý tok se označuje jako elektroosmotický tok (obr. 3). Neutrální částice se pohybují rychlostí elektroosmotického toku, zatímco nabitě částice se pohybují buď rychleji (kationty) nebo pomaleji (anionty) než EOF v závislosti na jejich elektroforetické pohyblivosti [11,14]. Ustavením Sternovy a difúzní vrstvy se vytvářejí potenciálové rozdíly. V difúzní vrstvě vzniká potenciálový rozdíl, který se nazývá zeta potenciál  $\zeta$ . Síla elektroosmotického toku je závislá na pH pracovního elektrolytu, protože zeta potenciál roste s disociací silanolových skupin na vnitřním povrchu kapilární stěny.

Pohyblivost elektroosmotického toku lze vyjádřit rovnicí:

$$\mu_{eo} = \frac{\varepsilon \cdot \zeta}{4\pi \cdot \eta \cdot r}$$

$\varepsilon$ ..... permitivita základního elektrolytu

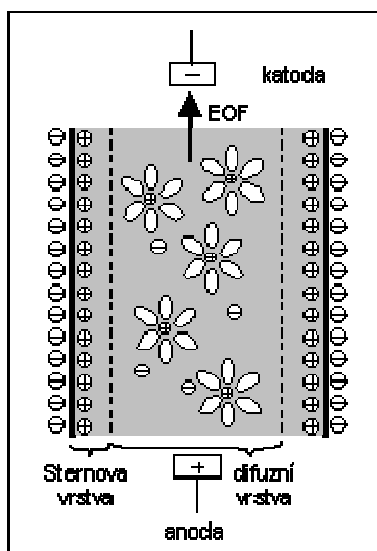
$\zeta$ ..... zeta potenciál

$\eta$ ..... viskozita

$r$ ..... poloměr kapiláry

Z uvedené rovnice vyplývá, že na elektroosmotický tok mají vliv poloměr kapiláry a vlastnosti pracovního elektrolytu. Lineární rychlost EOF lze určit z hodnoty vloženého napětí  $U$  a délky separační kapiláry  $l$  [14]:

$$u_{eo} = \mu_{eo} \cdot E = \mu_{eo} \cdot \frac{U}{l}$$



**Obr. 3:** Vznik elektroosmotického toku [11].

### 2.2.3. Zdánlivá pohyblivost

Nabité částice mají za účasti elektroosmotického toku zdánlivou pohyblivost  $\mu_z$ , která je součtem pohyblivosti elektroforetické a pohyblivosti elektroosmotického toku. Elektroforetická pohyblivost, která má stejný směr jako elektroosmotický tok, má kladné znaménko (pro kationty), elektroforetická pohyblivost, která má opačný směr jako elektroosmotický tok, má záporné znaménko (pro anionty) [8,11].

$$\mu_z = \mu_e + \mu_{eo}$$

## 2.3. Instrumentace CE

Schéma základního přístrojového uspořádání pro CE je znázorněné na obr. 1. Zařízení se skládá ze dvou elektrolytických nádobek naplněných pracovním elektrolytem a ty jsou spojeny separační kapilárou. Dále jsou do nádobek ponořeny pracovní elektrody, které jsou napojeny na zdroj vysokého napětí. Na konci separační kapiláry je umístěn detektor [8,11].

### 2.3.1. Separační kapiláry

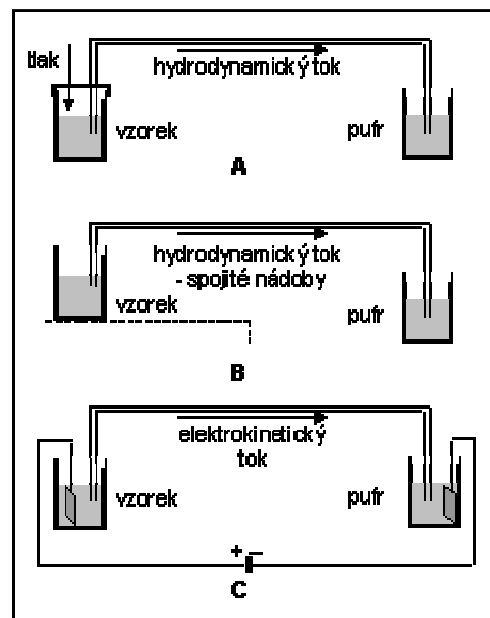
Kapiláry jsou vyráběny z taveného křemene a mají ochranný polyimidový povlak, který chrání kapiláru před poškozením, protože kapilára je velmi křehká. V místě detekce je polyamidový povlak odstraněn. Kapilára je běžně 25 – 100 cm dlouhá s vnitřním průměrem v rozmezí nejčastěji 25 až 100  $\mu\text{m}$ . Vnitřní povrch kapiláry může být chemicky modifikován (eliminace EOF). Pro zajištění stálých podmínek separace je nutné kapiláru termostatovat.

Teplota je udržována na konstantní hodnotě buď prouděním vzduchu, nebo kapalnou chladicí směsí.

### 2.3.2. Dávkování vzorku

Roztok vzorku se dávkuje do vzdálenějšího konce kapiláry od detektoru. Dávkovaný objem vzorku se pohybuje v rozmezí 10-100 nl a vzorková zóna tvoří asi 1-2 % celkové délky kapiláry. Dávkování lze provádět několika způsoby (obr. 4):

- a) dávkování tlakem
  - I. vyvinutím tlaku na straně vzorku
  - II. vytvořením podtlaku na straně pufru
- b) s využitím gravitace – založeno na principu spojených nádob
- c) elektrokinetické dávkování – založeno na elektroforetické migraci vzorku do kapiláry po vložení nízkého napětí na elektrody.



Obr. 4: Dávkování vzorku [11].

### 2.3.3. Zdroj vysokého napětí

Při kapilární elektroforéze se používají vysokonapěťové zdroje poskytující napětí v rozsahu 0 – 30 kV při proudech obvykle v rozmezí 0 – 300  $\mu$ A a umožňující měnit jeho polaritu. Blíže k detektoru se většinou připojuje uzemněná elektroda a druhá, která má vysoký potenciál, je připojena ke druhému konci. Předpokladem dobré reprodukovatelnosti migračních časů je stabilita generovaného napětí ( $\pm 0,1\%$ ) [14].

### 2.3.4. Detekce signálu

Vzhledem na malé rozměry kapiláry musí být detektory pro CE velmi citlivé. Nejčastěji se používají detektory založené na absorpci UV záření a vzniklý záznam, tzv. elektroforegram, je tedy závislost absorbance při dané vlnové délce na čase. Vzhledem ke krátké optické dráze paprsku, dané vnitřním průměrem kapiláry, je lineární detekční rozsah podstatně menší než u kapalinové chromatografie. Optickou dráhu lze prodloužit vytvořením bublinky na kapiláře v místě detekce, tzv. “bubble cell” [14] nebo s použitím speciálních detekčních cel. U látek, které neabsorbují v UV oblasti, můžeme použít tzv. nepřímou detekci, kdy se do pracovního elektrolytu přidá látka, která dobře absorbuje v UV oblasti, což vyvolá

konstantní hodnotu absorpance. Při průchodu analytu detektorem pak hodnota absorpance poklesne na odpovídající hodnotu.

Mnohem vyšší citlivost detekce poskytuje měření fluorescence nebo laserem indukované fluorescence (LIF). Většina analyzovaných látek sama o sobě nefluoreskuje, a proto je třeba vzorky před analýzou derivatizovat. Vhodným výběrem fluoroforu s excitačním maximem v oblasti vlnové délky použitého laseru lze snížit detekční limit až na řádově stovky detekovaných molekul.

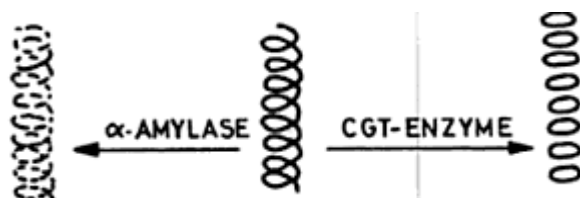
Dále je možné pro detekci využít hmotnostní spektrometr (MS), který je univerzální a umožňuje získat pro každou elektroforetickou zónu hmotnostní spektrum usnadňující identifikaci jednotlivých zón. Komplikací je ale úzký výběr vhodných pracovních elektrolytů z hlediska těkavosti a vůbec náročná instrumentace spojení CZE-MS [15].

### 3. CYKLODEXTRIN

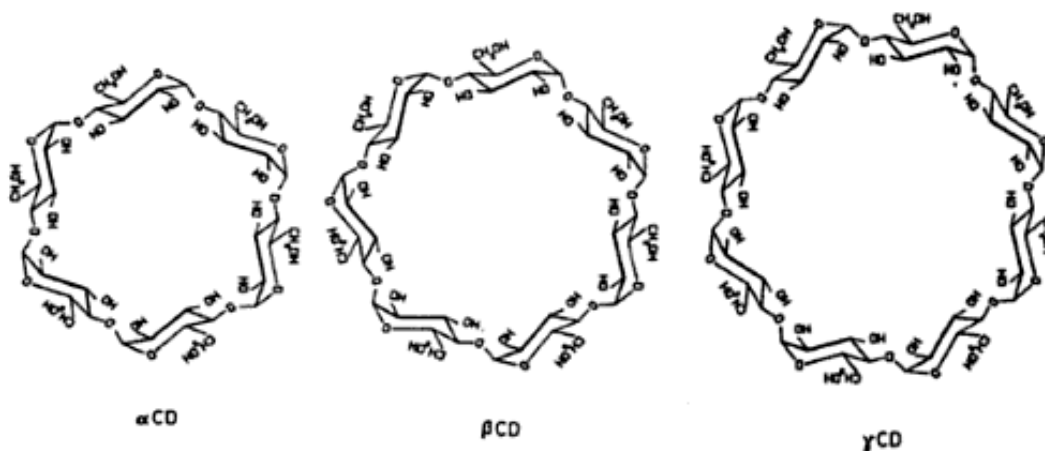
#### 3.1. Chemické a fyzikální vlastnosti

##### 3.1.1. Chemická struktura

Dextriny jsou heterogenní, amorfní a hygroskopické sloučeniny vyráběné ve velkých množstvích pro potravinářský, textilní a papírenský průmysl a pro mnoho dalších oborů [16]. V neizolované formě se používají při výrobě piva nebo chleba. Tento typ degradace škrobu je pravý hydrolytický proces, kde hlavní produkty dělení glykosidových vazeb reagují s molekulou vody. V případě, že je škrob degradován enzymem glykosyltransferasou (CGT), jsou hlavními produkty řetězového intramolekulárního dělení bez přístupu vody  $\alpha$ -1,4-cyklické vazby, známé jako cyklodextriny. Lze tedy říci, že dextriny jsou enzymaticky modifikované škroby [17].



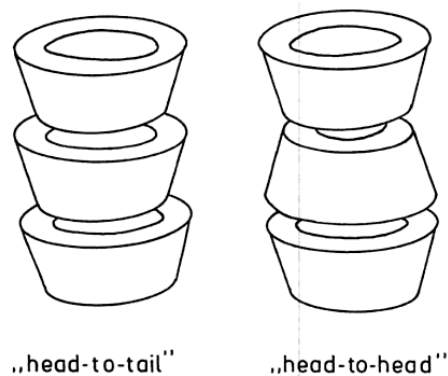
Cyklodextriny (CD), známé též jako Schardingerovy dextriny, jsou neutrální cyklické oligosacharidy tvořené D-(+)-glukopyranosovými jednotkami spojenými glykosidickými vazbami  $\alpha$ -1,4. Molekula cyklodextrinu má tvar dutého kolmého kužele, na jehož užší straně jsou soustředěny primární hydroxylové skupiny (na uhlících C6), na širší straně sekundární hydroxylové skupiny (na uhlících C2 a C3) a vnitřní jádro zůstává hydrofobní. Vzhledem k hydrofilnímu povrchu jsou cyklodextriny poměrně dobře rozpustné ve vodě. Velikost a tvar dutiny molekuly cyklodextrinu závisí na počtu glukopyranosových jednotek; běžně používané cyklodextriny jsou  $\alpha$ -,  $\beta$ - a  $\gamma$ - cyklodextriny tvořené 6, 7 a 8 glukopyranosovými jednotkami (obr 5).



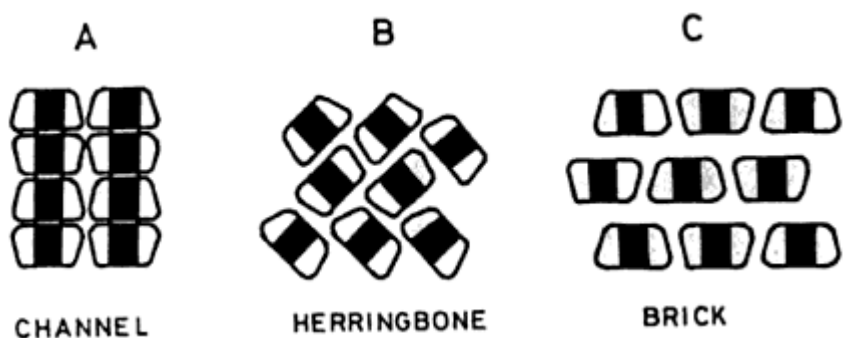
**Obr. 5:** Jednotlivé typy neutrálních cyklodextrinů [17].

### 3.1.2. Fyzikální vlastnosti

V rámci krystalové mřížky se mohou molekuly cyklodextrinu vyskytovat ve dvou formách – krystalové nebo kanálové struktury. V kanálovém (channel) typu struktury jsou molekuly cyklodextrinu naskládány na sebe jako mince ve válečku. Zde jsou molekuly vestavěné v nekonečných kanálcích sestavené jako lineárně sladěné dutiny. Toto zarovnání může být buď ve spojení „hlava-pata“ nebo „hlava-hlava“ (obr. 6).



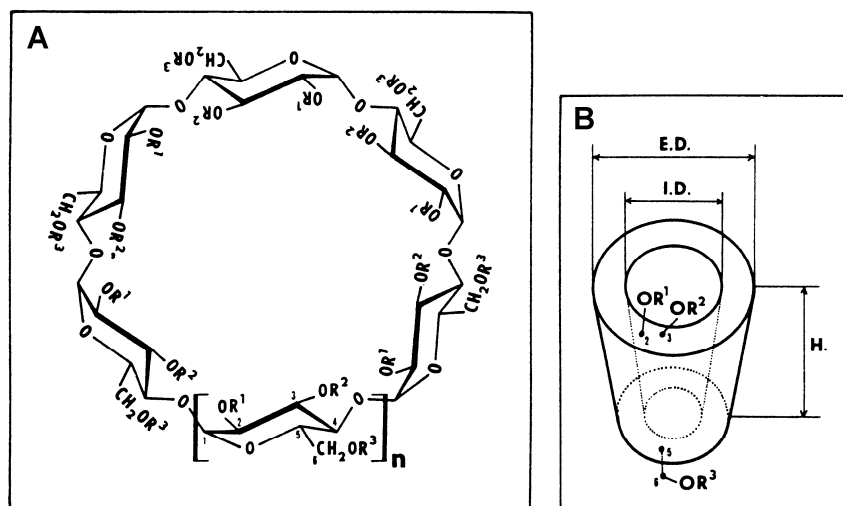
**Obr. 6:** Možnosti seskupení cyklodextrinů [17].



**Obr. 7:** Krystalové struktury cyklodextrinů [17].

V závislosti na podmínkách mohou stejné cyklodextriny vykazovat různé krystalové struktury (obr. 7), např.:  $\alpha$ -cyklodextrin je znám ve třech krystalových strukturách (všechny typu „herringbone“) a  $\beta$ -cyklodextrin je znám ve dvou krystalových strukturách [17].

Chemická struktura a schematický model molekuly cyklodextrinu jsou znázorněny na obr. 8, důležité fyzikální konstanty a vlastnosti neutrálních  $\alpha$ -,  $\beta$ - a  $\gamma$ - cyklodextrinů jsou shrnuty v tabulce 1.



**Obr. 8:** Chemická struktura (A) a schematický model (B) molekuly cyklodextrinu. Hodnoty  $n$ ,  $h$ , I.D., E.D. a substituenty  $R^{1-3}$  jsou uvedeny v tabulce 1 [18].

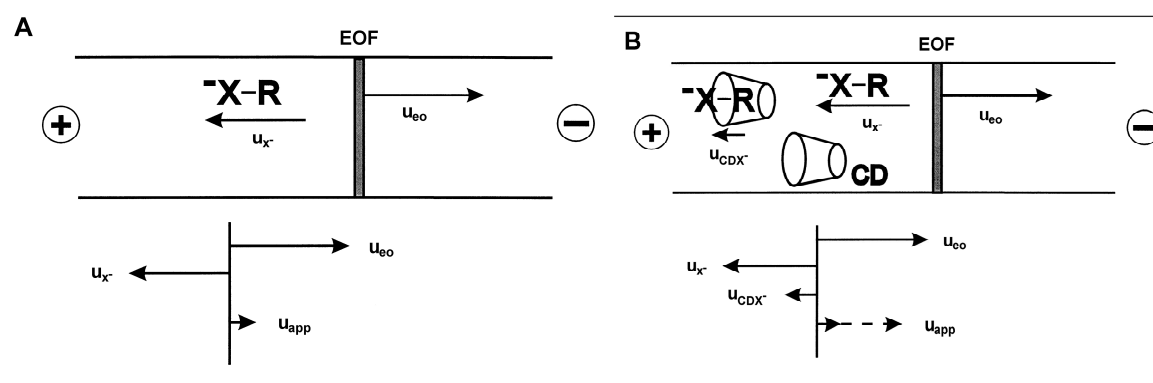
**Tabulka 1:** Přehled fyzikálně-chemických vlastností cyklodextrinů [18,19].

Cyklodextrin	$\alpha$	$\beta$	$\gamma$
$R^1 = R^2 = R^3$	H	H	H
Počet glukopyranosových jednotek	6	7	8
N	1	2	3
Molární hmotnost M [g.mol <sup>-1</sup> ]	972,86	1135,01	1297,15
Průměr kavity (kanálků), I.D. [nm]	0,47 – 0,52	0,60 – 0,64	0,75 – 0,83
Vnější průměr molekul, E.D [nm]	1,46 ± 0,04	1,54 ± 0,04	1,75 ± 0,04
Výška kavity [nm]	0,79 – 0,80	0,79 – 0,80	0,79 – 0,80
Objem kavity [nm <sup>3</sup> ]	0,176	0,346	0,510
pK <sub>a</sub> hydroxylových skupin	12,1 – 12,6	12,1 – 12,6	12,1 – 12,6
Rozpustnost ve vodě při 25°C [g.100 ml <sup>-1</sup> ]	14,50	1,85	23,20
Teplota tání [K]	551	572	540
Specifická otáčivost $[\alpha]_D^{25}$	150,5 ± 0,5	162,5 ± 0,5	177,4 ± 0,5

Charakteristickou vlastností cyklodextrinů je jejich schopnost tvořit komplexy s nejrůznějšími molekulami neutrální i nabitě povahy. Nejspíš jediným požadavkem na hostující molekulu je, aby se vešla, i když třeba jen částečně, do dutiny cyklodextrinu. Naopak, pokud je molekula příliš malá, může z dutiny snadno vypadnout. Právě této schopnosti tvorby tzv. „host – guest“ komplexů se využívá při separacích izomerních látek pomocí CE [18]. Celá řada organických molekul proniká dovnitř dutiny molekuly cyklodextrinu a vytváří inkluzní komplexy, jejichž stabilita závisí na velikosti a tvaru komplexované molekuly (hosta), velikosti dutiny v cyklodextrinu (hostitele) a na dalších faktorech, jako jsou vodíkové můstky, hydrofobní interakce, atd. Různá stabilita inkluzních komplexů se separovanými látkami pak má za následek podstatné změny v migračních rychlostech těchto látek, což vede k výraznému ovlivnění separační selektivity.

Polaritu vnějšího povrchu molekuly cyklodextrinu lze ovlivnit substitucemi nejrůznějších funkčních skupin. Počet substituentů, jejich velikost a polarita výrazně ovlivňuje stabilitu inkluzních komplexů a tím i selektivitu elektroforetické separace. Běžně používanými substituovanými cyklodextriny jsou methyl- $\beta$ -, heptakis(2,6-di-O-methyl)- $\beta$ -, heptakis(2,3,6-tri-O-methyl)- $\beta$ -, (2-hydroxypropyl)- $\beta$ -, (2-hydroxypropyl)- $\gamma$ -, carboxymethyl- $\beta$ - a sulfobutylether- $\beta$ - cyklodextriny [18,20].

Vliv přidavku cyklodextrinu do pracovního elektrolytu je schématicky znázorněn na obr. 9. V pracovním elektrolytu bez přidavku cyklodextrinu (obr. 9A) migrují anionty vzorku, např. naftalensulfonové kyseliny, opačným směrem než elektroosmotický tok a výsledná migrační rychlost je velmi malá a doba analýzy dlouhá. Naproti tomu v pracovním elektrolytu s přidavkem cyklodextrinu (obr. 9B) dochází ke vzniku dynamické rovnováhy, kdy anionty vzorku migrují částečně jako volné anionty a po zbývající dobu migrace jako hostitelské inkluzní komplexy s molekulou cyklodextrinu, tzn. vzhledem k většímu objemu částic nižší rychlostí. Za předpokladu, že na konci separační kapiláry, spojeném se zdrojem, je vloženo kladné napětí, by díky této rovnováze mělo dojít k urychlení migrace záporně nabitých částic směrem k detektoru.



**Obr. 9:** Schéma elektroforetické migrace aniontu v pracovním elektrolytu (A) bez a (B) s přidavkem CD ( $u_x$  je elektroforetická mobilita aniontu  $X^-$ ;  $u_{eo}$  je elektroforetická mobilita elektroosmotického toku;  $u_{CDX^-}$  je elektroforetická mobilita inkluzního komplexu aniontu  $X^-$  s CD a  $u_{app}$  je zdánlivá mobilita).



## 4. APLIKACE CYKLODEXTRÍNŮ V KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZE

### 4.1. Separace polohových izomerů

Elektroforetická separace polohových izomerů organických látek, zejména disociovaných silných či slabých kyselin je v běžných pracovních elektrolytech obtížná z důvodu jejich velmi podobných elektroforetických mobilit. Typickým případem může být CZE separace polohových izomerů aromatických sulfonových kyselin, které jsou důležitými meziprodukty při výrobě syntetických barviv. V čistém pracovním elektrolytu (borátovém nebo fosfátovém) lze pak úspěšně rozdělit pouze skupiny kyselin na základě počtu sulfonových skupin v molekule kyseliny (mono-, di-, tri- a tetra-) [21-23].

Separací dvanácti polohových izomerů mono- až tetra-naftalensulfonových kyselin pomocí CZE v borátovém pufru ( $25 \text{ mmol.l}^{-1}$ ,  $\text{pH} = 9,0$ ) s přidavkem neutrálních cyklodextrinů ( $\alpha$ -,  $\beta$ - a  $\gamma$ -) o koncentraci  $10 \text{ mmol.l}^{-1}$  se zabývali Jandera a kol. [22,23]. Pro dosažení separace v přijatelném čase bylo nutné analýzu urychlit přetlakem  $2500 \text{ Pa}$  na kapiláře. Přídavek  $\alpha$ -CD do pracovního elektrolytu umožnil pouze separaci 1- a 2- naftalensulfonové kyseliny, avšak separace naftalendisulfonových kyselin byla nedostatečná. Naopak po přidavku  $\beta$ - a  $\gamma$ -CD do pracovního elektrolytu došlo k výraznému zlepšení separační selektivity analyzovaných kyselin, což lze vysvětlit na základě porovnání velikosti dutiny jednotlivých cyklodextrinů [18], kdy velikost a tvar naftalensulfonových kyselin pravděpodobně mnohem lépe kopíruje tvar dutiny  $\beta$ - a  $\gamma$ -CD než  $\alpha$ -CD.

Vliv čtyř různých substituovaných cyklodextrinů na separaci polohových izomerů naftalensulfonových kyselin a jejich amino- a hydroxy- derivátů byl studován v práci [24]. Úplné separace všech analyzovaných nesubstituovaných naftalensulfonových kyselin bylo dosaženo v borátovém pufru ( $25 \text{ mmol.l}^{-1}$ ,  $\text{pH} = 9,0$ ) s přidavkem methyl- $\beta$ -CD o koncentraci  $10 \text{ mmol.l}^{-1}$ , zatímco substituované amino- a hydroxy- naftalensulfonové kyseliny se nejlépe rozdělily v borátovém pufru s přidavkem nesubstituovaného  $\beta$ -cyklodextrinu.

Fischer a kol. studovali možnosti ovlivnění separace naftalensulfonových kyselin v pracovních elektrolytech s přidavkem  $\beta$ -CD na kapilárách s eliminovaným elektroosmotickým tokem, kdy bylo využito pokrytí vnitřní stěny křemenné kapiláry polyakrylamidem [25]. V porovnání se separací v nepokrytých kapilárách došlo k otočení pořadí separovaných kyselin a celkově i k urychlení separace.

CZE byla také využita ke stanovení hlavních složek a nečistot ve vzorcích technické H-kyseliny (H-, chromotropová, Kochova a W- kyseliny) a Cleve-kyseliny (Cleve-1,6-, Cleve-1,7-, Laurentova, peri a amino-F- kyseliny), používaných jako meziprodukty pro výrobu syntetických barviv [22]. Jedná se opět o elektroforetickou separaci směsí polohových izomerů amino- a hydroxy- naftalensulfonových kyselin ve fosfátových a borátových pufrech s přidavkem nesubstituovaného  $\beta$ -CD, zároveň vzhledem k acidobazickému charakteru analyzovaných kyselin bylo nutné určit vhodnou hodnotu  $\text{pH}$  pracovního elektrolytu. Za optimalizovaných separačních podmínek byly kalibrační křivky závislosti integrovaných

ploch píků jednotlivých kyselin na jejich koncentracích ve sledovaném koncentračním rozmezí lineární a bylo možné stanovit minoritní složky v koncentracích do 0,02 %.

Stopová množství devíti polohových izomerů naftalensulfonových kyselin ve vzorcích pitné vody analyzovali pomocí CZE Chen a Ding [26] v 15 mM borátovém pufru o pH = 9,2 s přídatkem 10 mM směsi  $\beta$ - a  $\gamma$ -CD v poměru 3:7. Po provedení optimalizace bylo možné stanovit analyzované sulfonové kyseliny v detekčních limitech  $4 \mu\text{g.l}^{-1}$  za použití UV detektoru při vlnové délce detekce 214 nm. Ti samí autoři rovněž úspěšně rozdělili sedm izomerních naftalensulfonových kyselin v kyselém 20 mM fosfátovém pufru (pH = 3) obsahujícím  $\beta$ -CD, ovšem za použití reverzní polarizace elektrod, tzn. záporného pólu u nástřikového konce kapiláry a kladného pólu u detektoru [27].

Z. Chen a kol. provedli separaci izomerů o-, m- a p- kresolu pomocí CEC na monolitických kolonách, kdy připravený monolit byl během tvorby modifikován přídatkem  $\beta$ -CD. Separace byla provedena v mobilní fázi o složení  $50 \text{ mmol.l}^{-1}$  fosfátový pufr o pH = 7,5 / methanol v poměru 80 / 20 [28].

Byly rovněž popsány aplikace CZE pro separaci a stanovení syntetických i přírodních potravinářských izomerních barviv v pracovních elektrolytech s přídatky cyklodextrinů [29-31]. H. Y. Huang a kol. stanovili sedm syntetických potravinářských barviv (žlutý SY, červeně Allura AC, ponceau 4R, tartrazin, patentní modř V, brilantní modř a indigotin) a jedno barvivo přírodní (kyselina karmínová) v mléčných nápojích v 15 mM borátovém pufru o pH = 10,0 s přídatkem 7,0 mM  $\beta$ -cyklodextrinu ve velmi krátkých časech, kdy doba analýzy nepřesáhla deset minut [32].

Čtrnáct sulfonovaných azobarviv bylo analyzováno pomocí CZE na nepokrytých kapilárách a kapilárách pokrytých lineárním polyakrylamidem ve fosfátovém pufru o koncentraci  $25 \text{ mmol.l}^{-1}$  a o pH = 6,0 s přídatkem 10 mM  $\beta$ -CD [33]. Podařilo se rozdělit nejen polohové izomery analyzovaných barviv, ale také stereoizomery (cis-, trans-) některých kovokomplexních barviv.

Kartsova a Komarova [34] podrobily separaci pomocí CZE polohové izomery nitro-, amino-, chlor- a hydroxy- benzoových kyselin. Do pracovního elektrolytu (10mM borátový pufr) bylo přidáno  $1-10 \text{ mmol.l}^{-1}$  neutrálního  $\alpha$ - a  $\beta$ -CD. Z experimentálních dat bylo zjištěno, že  $\beta$ -CD vytváří s aminobenzoovými kyselinami stabilnější komplexy než  $\alpha$ -CD, naopak izomerní chlorbenzoové kyseliny se v borátovém pufru s  $\beta$ -CD nepodařilo úplně rozdělit. Optimalizací koncentrace přidaného cyklodextrinu se dosáhlo velmi krátkých časů analýzy.

Dvanáct derivátů a izomerů odvozených od kyselin benzoové a ftalové bylo analyzováno Wuem a kol. [35]. Ke kompletní separaci došlo v 10 mM fosfátovém pufru o pH = 11,0 s přídatkem 12 mM směsi  $\alpha$ - a  $\beta$ -CD v poměru 1:2 a současném přídatku polyethylenglykolu 600 (4 %).

Tian a kol. stanovovali pět izomerních derivátů antrachinonu v rostlinném materiálu (*Polygonum cuspidatum*) pomocí CZE s přídatkem 20 mM nesubstituovaného  $\beta$ -CD do 35 mM fosfátového pufru, přičemž doba analýzy nepřesáhla šest minut [36].

$\beta$ -CD a polyvinylpyrolidon (PVP) byli použity jako komplexační aditiva do pracovního elektrolytu pro stanovení deseti polohových izomerů nitrofenolů v dešťové, pitné a odpadní vodě pomocí CZE [37]. K detekci byl použit UV/VIS detektor s vlnovou délkou detekce 254 nm. Byl zkoumán vliv koncentrace  $\beta$ -CD v pracovním elektrolytu v koncentračním rozmezí 2 – 4 mmol.l<sup>-1</sup>. Vyšší koncentrace CD v elektrolytu měly za následek, že se některé izomery nepodařilo rozdělit, což ale nebylo pozorováno u elektrolytu s přídatkem PVP.

Podobně jako u nitrofenolů lze výrazně ovlivnit elektroforetickou separaci polohových izomerů chlorfenolů, které jsou stejně jako nitrofenoly významnými kontaminanty životního prostředí. Groom a Luong [38] a také Janini a kol. [39] použili pro CZE separace izomerních chlorfenolů přídatek sulfobutylether- $\beta$ -CD. Vzhledem k acidobazickým vlastnostem chlorfenolů je také důležité provést optimalizaci pH pracovního elektrolytu.

#### 4.2. Chirální separace

I když původně bylo využití cyklodextrinů v elektromigračních separačních metodách navrženo a také aplikováno právě pro separace opticky aktivních (chirálních) látek, aby bylo možné rozdělit a stanovit jednotlivé optické izomery, je tato bakalářská práce zaměřena převážně na separace polohových izomerů. Nicméně jen díky úspěšnému využití cyklodextrinů pro dělení optických izomerů se postupně vědci začali zabývat otázkou, zda budou cyklodextriny ovlivňovat separace polohových izomerů stejným způsobem.

Obrovský potenciál pro využití chirálních separací pomocí CZE a příbuzných technik má farmaceutický průmysl, kdy je nutné při vývoji nových léčiv velmi pečlivě stanovit zastoupení obou optických izomerů dané substance. Zároveň nachází chirální CE separace široké využití ve zdravotnictví v klinické diagnostice [13]. Stejně jako v oblasti CE separací polohových izomerů, tak i v případě chirálních separací se využívá celá škála nesubstituovaných i substituovaných (kationtových i aniontových) cyklodextrinů. Lze říci, že pro potřeby chirálních separací se neustále syntetizují nové a nové typy cyklodextrinů, např. v oblasti střední Evropy je významným výrobcem maďarská firma Cyclolab.

Již publikovaných prací týkajících se chirálních separací pomocí CE je v současnosti již tak ohromné množství, že není v možnostech této bakalářské práce mít tak široký záběr. Pro snazší orientaci v dané problematice jsou pravidelně publikovány přehledové články (reviews) o posledních trendech a poznacích [40-43], ze kterých lze poté snadno čerpat další údaje.

## 5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 5.1. Chemikálie

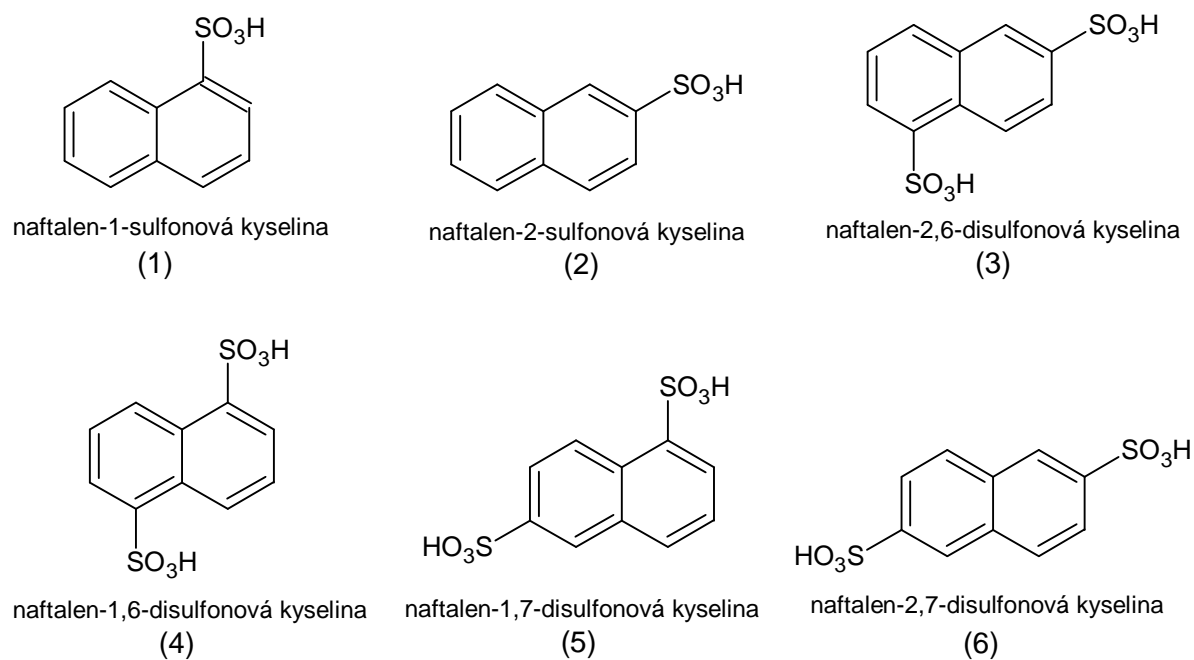
Kyselina boritá –  $\text{H}_3\text{BO}_3$  (Fluka, Buchs, Švýcarsko), čistota  $\geq 99,5\%$  (HPLC).

Dodekahydrát tetraboritanu sodného –  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  (Fluka, Buchs, Švýcarsko), čistota  $\geq 99,5\%$  (HPLC).

$\beta$ -cyklodextrin (Fluka, Buchs, Švýcarsko), čistota  $\geq 99,5\%$  (HPLC).

Pevné vzorky šesti naftalensulfonových kyselin (Spolana Neratovice, Neratovice, Česká republika).

(1-naftalensulfonová kyselina, 2-naftalensulfonová kyselina, 1,6- naftalensulfonová kyselina, 1,7- naftalensulfonová kyselina, 2,6- naftalen-sulfonová kyselina, 2,7- naftalensulfonová kyselina).



**Obr. 10:** Analyzované naftalensulfonové kyseliny (číslování – viz. obr. 12 – 17).

## 5.2. Přístrojové vybavení

pH metr Orion Star 3 (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA), (obr. 11a).

Kapilární elektroforetický systém CAPEL – 105M (obr. 11b) (LUMEX, St. Peterburg, Rusko), který je vybaven:

- a) zdrojem vysokého napětí,
- b) autosamplermem ,
- c) spektrofotometrickým detektorem s deuteriovou lampu pracující v rozmezí vlnových délek 190 – 380nm,
- d) dvojicí platinových elektrod,
- e) nástřikovým systémem,
- f) výměnnou kazetou pro kapiláru,
- g) kapalinou chlazeným systémem,
- h) počítačem s ovládacím a vyhodnocovacím programem ELFORUN



**Obr. 11:** a) pH metr;



b) kapilární elektroforetický systém

## 5.3. Postup práce

Veškeré experimenty byly provedeny v laboratoři CE na Katedře analytické chemie. Z připravených roztoků kyseliny borité a tetraboritanu sodného byl pomocí pH metru připraven borátový pufr o koncentraci 25 mmol.l<sup>-1</sup> a o pH = 9,1. V tomto pufru byla rozpuštěna navážka β-cyklodextrinu, aby byl získán pracovní elektrolyt s koncentrací 10 mmol.l<sup>-1</sup> β-cyklodextrinu.

Byla připravena kapilára o vnitřním průměru 75  $\mu\text{m}$ , vnějším průměru 375  $\mu\text{m}$  a délky 58 cm. V délce 50 cm od nástřikového konce kapiláry bylo uděláno detekční okénko. Kapilára byla vložena do kazety a poté byla kazeta nainstalována do kapilárního elektroforetického přístroje s vnějším vodním chlazením kapiláry. Kapilára byla nejprve promývána 15 min asi 0,5 M NaOH a poté 15 min destilovanou vodou. Po těchto přípravách mohlo proběhnout vlastní měření.

K separaci bylo použito šest vzorků mono- a di- naftalensulfonových kyselin (viz. výše), které byly třikrát podrobeny separaci v elektrolytu bez použití  $\beta$ -cyklodextrinu a poté třikrát v elektrolytu s přídavkem  $\beta$ -cyklodextrinu a byly sledovány změny v jednotlivých měřeních. Dávkování vzorku bylo hydrodynamické po dobu 5 s při tlaku 20 mBar. Měření bylo provedeno při teplotě 20 °C. Zaznamenané elektroforegramy (závislosti absorbance na čase) jsou součástí přílohy.

#### 5.4. Vyhodnocení výsledků

Elektroforetická analýza vzorků mono- a di- naftalensulfonových kyselin byla provedena v 25 mM borátovém pufru o  $\text{pH} = 9,07$  v kapiláře o délce 58 cm a vnitřním průměru 75  $\mu\text{m}$ . Za těchto podmínek bylo provedeno dvojí měření. První bez přítomnosti jakéhokoliv aditiva pracovním elektrolytu (obr. 12 – 14) a druhé po přídavku 10  $\text{mmol.l}^{-1}$   $\beta$ -cyklodextrinu do pracovního elektrolytu (obr. 15 – 17).

První skupina elektroforegramů (obr. 12 – 14) znázorňuje závislosti absorbance na čase bez přítomnosti aditiva v pracovním elektrolytu. Jsou zde rozeznatelné pouze dva píky patřící souhrnně první mono- a druhý di- sulfonovým kyselinám. Uvedený počet píků dokazuje, že selektivita separace analyzovaných kyselin je velmi nízká. Oproti tomu na dalších elektroforegramech (obr. 15 – 17), kdy byl přidán do pracovního elektrolytu  $\beta$ -cyklodextrin, je jasně rozeznatelných pět píků, tudíž došlo k výraznému zlepšení separační selektivity. Počet píků by měl být šest, nicméně kyseliny 1-naftalensulfonová a 2,6-naftalendisulfonová se nerozdělily.

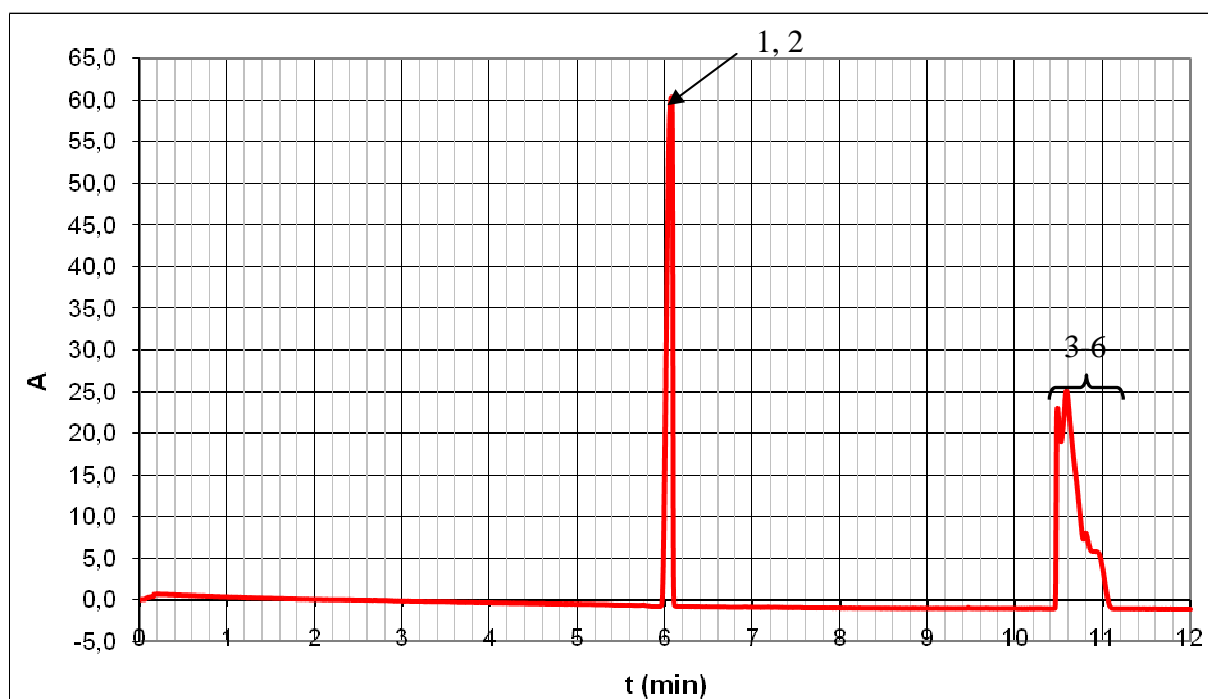
#### 5.5. Diskuze

Elektroforegramy na obr. 12 – 14 představují nedokonalou separaci polohových izomerů naftalensulfonových kyselin. První pík zahrnuje izomery 1- a 2-NSA, které mají velice podobné migrační časy a nelze je tudíž rozeznat. Šířku druhého píku lze zdůvodnit jednak vyšším počtem separovaných naftalendisulfonových kyselin a jednak určitými velmi malými rozdíly v jejich migračních časech.

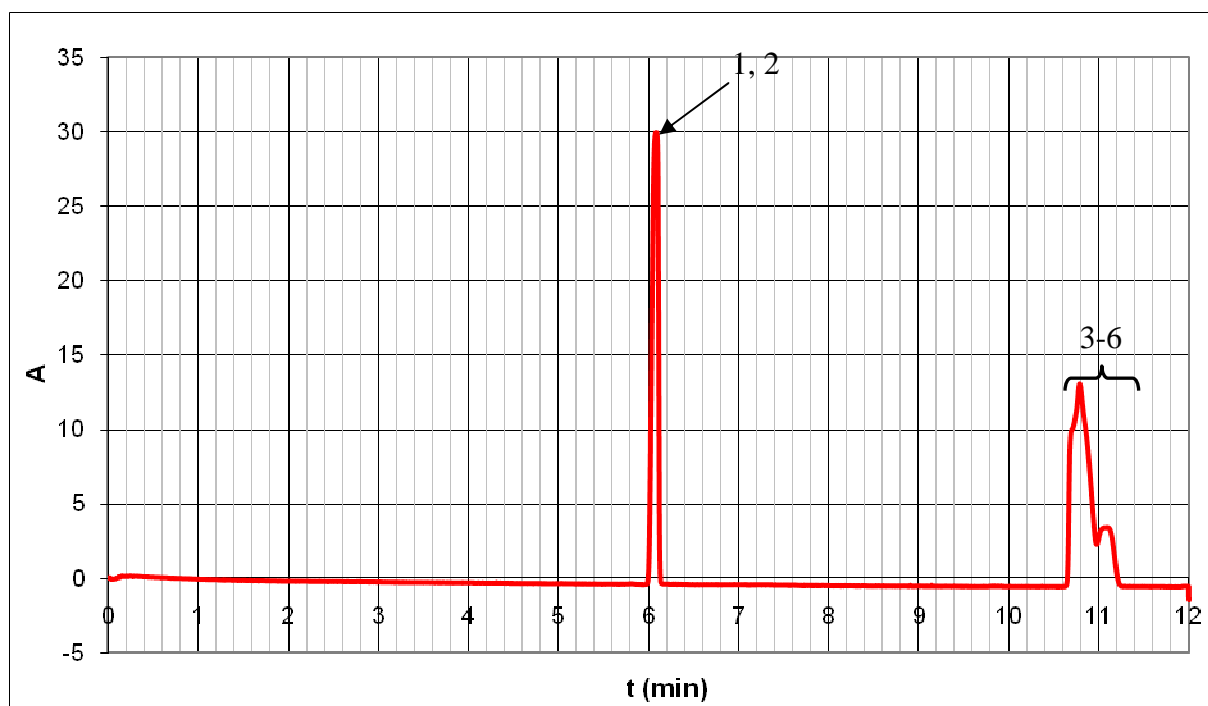
Oproti tomu elektroforegramy na obr. 15 – 17 znázorňují mnohem lépe rozdělenou směs polohových izomerů analyzovaných kyselin než tomu bylo v případě první série měření, přesto však tato separace není úplná, protože v pořadí třetí pík zahrnuje 1-NSA a 2,6-NDSA.

Předmětem dalšího zkoumání budou možnosti, jak tyto dvě sloučeniny úspěšně rozdělit, např. s použitím přídavku jiného cyklodextrinu ( $\gamma$ -CD) či směsi cyklodextrinů do pracovního elektrolytu. Identifikace jednotlivých píků byla provedena porovnáním s literaturou [23] a přídavkem vybraných standardů do směsi a sledováním nárůstu výšky odpovídajících píků. Šum znatelný na obr. 16 a 17, kde lze pozorovat vznik malých píků, byl patrně způsoben EOF. Ten má také za následek skok po 4. minutě na obr. 17.

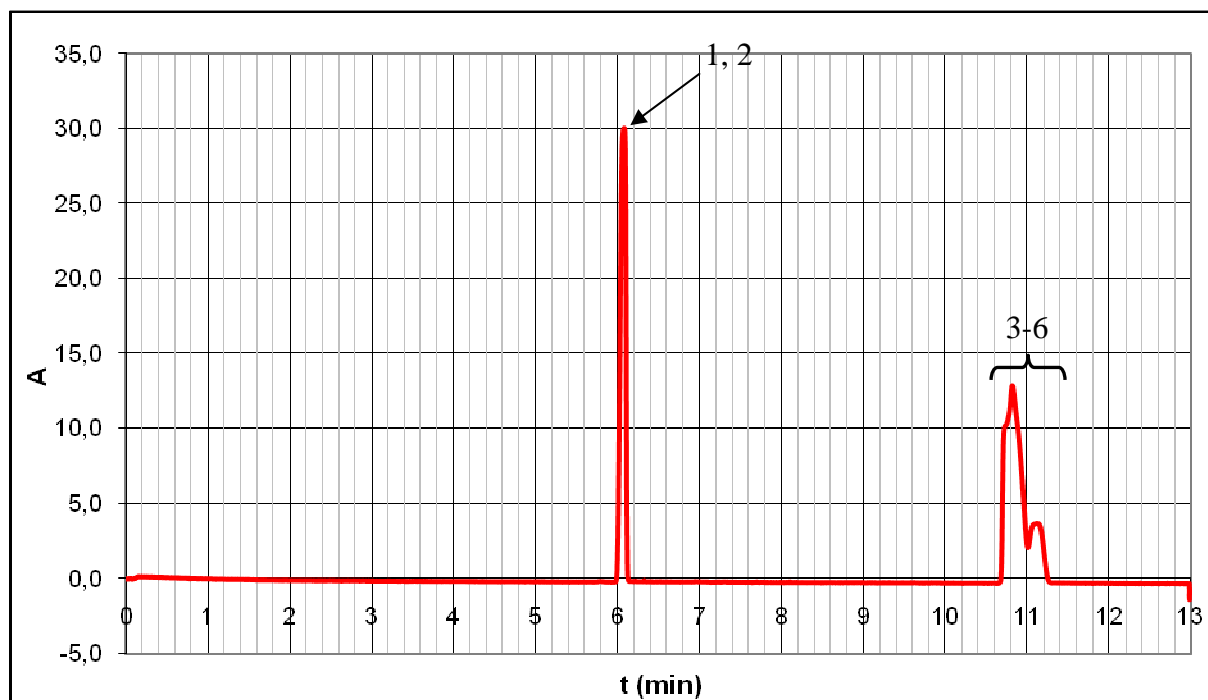
### 5.6. Přílohy



**Obr. 12:** Separace polohových izomerů NSA bez použití  $\beta$ -CD. Křemenná kapilára 58 (50) cm x 75  $\mu$ m I.D.; borátový pufr (25 mmol.l<sup>-1</sup> o pH = 9,1); UV detekce 230 nm; dávkování vzorku 20 mBar x 5 sec.

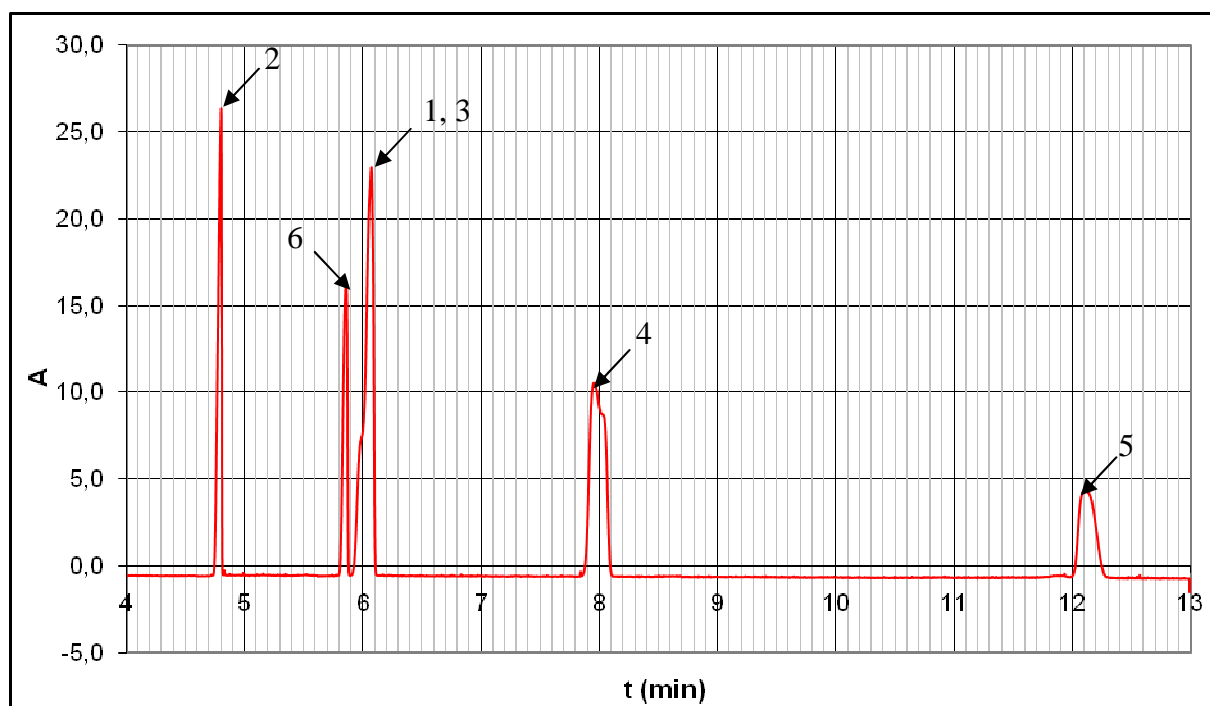


**Obr. 13:** Separace polohových izomerů NSA bez použití  $\beta$ -CD. Separáční podmínky, viz obr. 12.

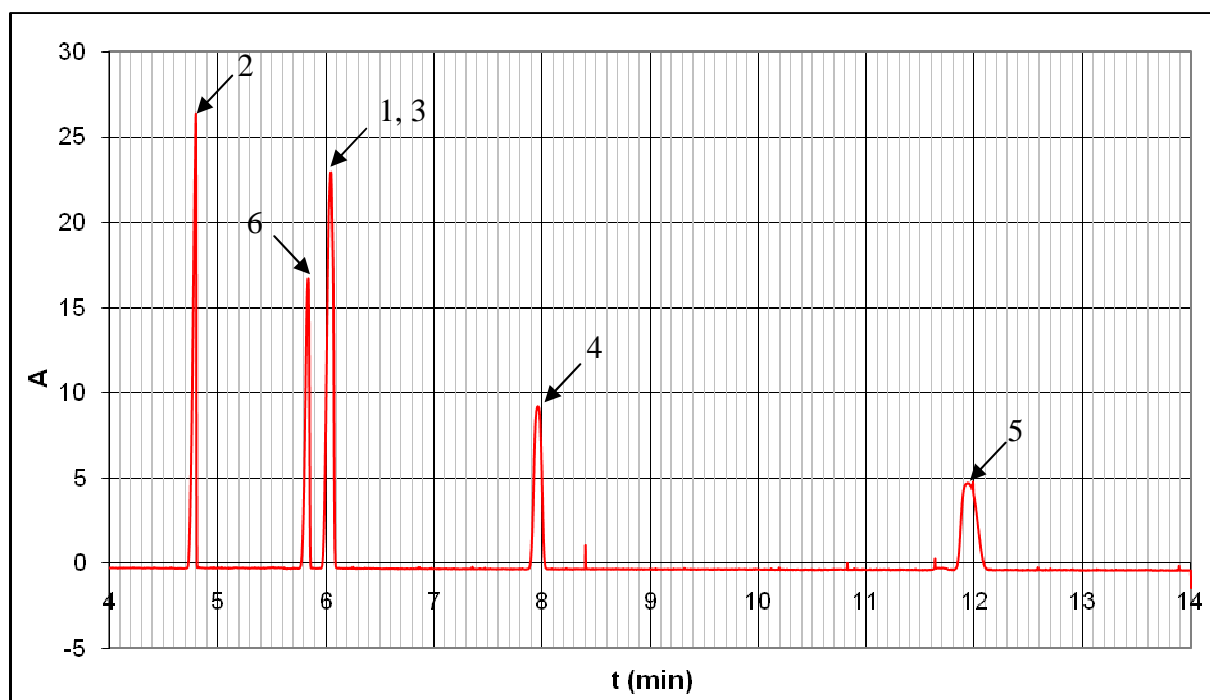


**Obr. 14:** Separace polohových izomerů NSA bez použití  $\beta$ -CD. Separáční podmínky, viz obr. 12.

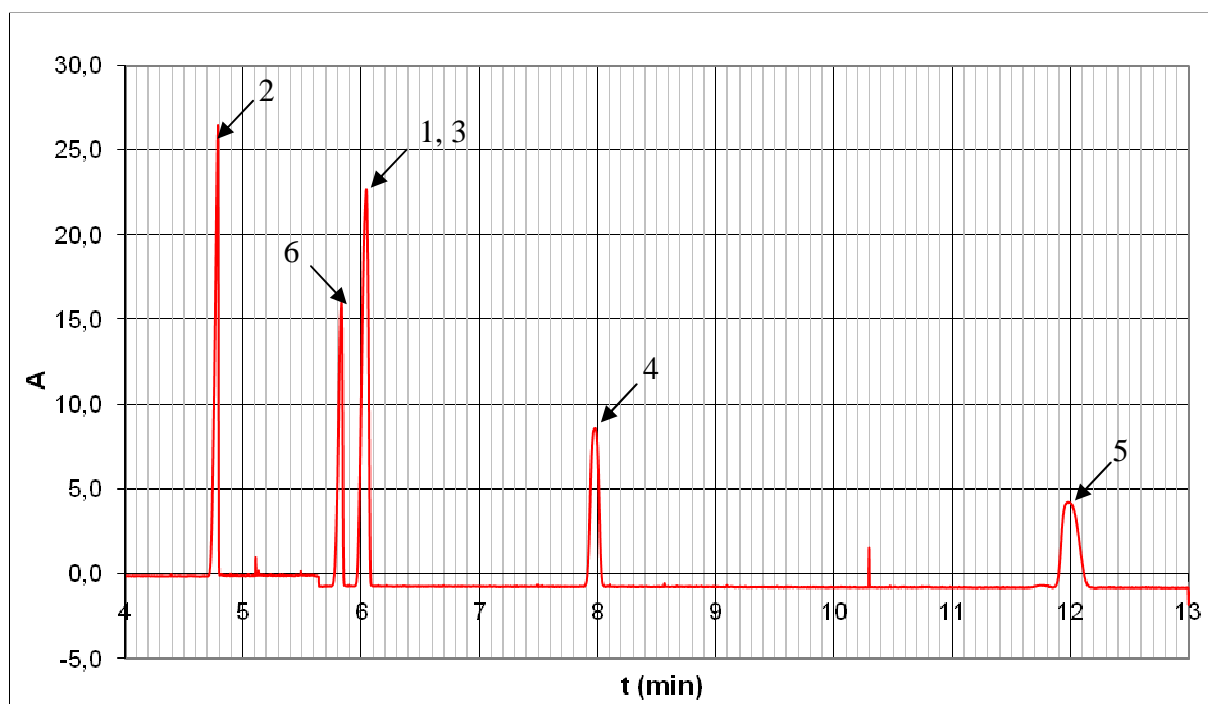




**Obr. 15:** Separace polohových izomerů NSA s použitím  $\beta$ -CD. Křemenná kapilára 58 (50) cm x 75  $\mu$ m I.D.; borátový pufr (25 mmol.l<sup>-1</sup> o pH = 9,1) s přidavkem  $\beta$ -CD o koncentraci 10 mmol.l<sup>-1</sup>; UV detekce 230 nm; dávkování vzorku 20 mBar x 5 sec.



**Obr. 16:** Separace polohových izomerů NSA s použitím  $\beta$ -CD. Separáční podmínky, viz obr. 15.



**Obr. 17:** Separace polohových izomerů NSA s použitím  $\beta$ -CD. Separční podmínky, viz obr. 15.

## 6. ZÁVĚR

Kapilární elektroforetické metody patří v současné době mezi významné instrumentální analytické metody pro separace látek v kapalně fázi. Díky vysoké separační účinnosti, rychlosti a reprodukovatelnosti analýz a jednoduché instrumentaci jsou rutinně používané například ve farmaceutickém průmyslu při analýze syntetizovaných léčiv, v potravinářském i chemickém průmyslu při analýze syntetických i přírodních barviv a v mnoha dalších odvětvích.

V této bakalářské práci jsou shrnuty formou rešerše poznatky o principech kapilární elektroforézy a také dosavadní výsledky a zkušenosti s využitím různých nesubstituovaných i substituovaných cyklodextrinů při elektroforetických separacích a jejich vlivu na separační selektivitu, a to jak optických izomerů, tak zejména polohových izomerů.

Možnosti separace polohových izomerů pak byly experimentálně demonstrovány na příkladu naftalensulfonových kyselin za využití pracovního elektrolytu s přídavkem  $\beta$ -cyklodextrinu. Díky tvorbě různě stabilních inkluzních komplexů mezi naftalen mono- a di-sulfonovými kyselinami a použitým cyklodextrinem se podařilo v analyzované směsi rozdělit 2-NSA, 2,7-NDSA, 1,6- NDSA a 1,7-NDSA, pouze pár 1-NSA a 2,6-NSDA zůstal nerozdělen. V porovnání se separací v pracovním elektrolytu bez přídavku cyklodextrinu tak došlo k významnému zlepšení selektivity separace.

## 7. POUŽITÁ LITERATURA

- [1] S. Hjertén, *Chromatogr. Rev.* 9 (1967) 122.
- [2] J.W. Jorgenson, K.D. Lukacs, *Anal. Chem.*, 53 (1981) 1298.
- [3] J.W. Jorgenson, K.D. Lukacs, *J. Chromatogr.*, 218 (1981) 209.
- [4] S. Terabe, K. Otsuka, K. Ichikawa, A. Tsuchuya, T. Ando, *Anal. Chem.*, 56 (1984) 111.
- [5] J. H. Knox, I. H. Grant, *Chromatographia*, 24 (1987) 135.
- [6] J. H. Knox, I. H. Grant, *Chromatographia*, 32 (1991) 317.
- [7] M. Tazaki, M. Tahali, U. Kejhej, *Chem. Lett.* 5 (1982) 639.
- [8] S. F. Y. Li, *Capillary Electrophoresis – Principles, Practice and Applications*, Elsevier, Amsterdam, 1992.
- [9] M. G. Khaledi, *High-Performance Capillary Electrophoresis*, John Wiley & Sons, New York, 1998.
- [10] Z. Deyl, F. Švec (Eds.), *Capillary Electrochromatography*, Elsevier, Amsterdam, 2001.
- [11] P. Klouda, *Moderní analytické metody*, Pavel Klouda s.r.o., Ostrava, 2003.
- [12] V. Kašička, *Chem. Listy*, 91(1997) 320.
- [13] B. Chankvetadze, *Capillary Electrophoresis in Chiral Analysis*, John Wiley & Sons, New York, 1997.
- [14] D. N. Heger, *High Performance Capillary Electrophoresis*, Hewlett-Packard, Waldbronn, 1992.
- [15] J. Preisler, F. Foret, B. L. Karger, *Anal. Chem.*, 70 (1998) 5278.
- [16] O. Červinka a kol., *Chemie organických sloučenin*, SNTL, Praha, 1985.
- [17] G. A. Webb, *Annual Reports in NMR Spectroscopy*, Academic Press, Oxford, 1993, p60- 61.
- [18] J. Snopek, I. Jelínek, E. Smolková-Keulemansová, *J. Chromatogr.*, 452 (1988) 571.
- [19] S. Li, W. C. Purdy, *Chem. Rev.* 92 (1992) 1457.
- [20] S. Fanali, *J. Chromatogr. A*, 875 (2000) 89.

- [21] S. J. Kok, E. H. M. Koster, C. Gooijer, N. H. Velthorst, U. A. Th. Brinkman, O. Zerbinati, *J. High Resol. Chromatogr.*, 19 (1996) 99.
- [22] P. Jandera, P. Fischer, V. Staněk, M. Kučerová, P. Zvoníček, *J. Chromatogr. A*, 738 (1996) 201.
- [23] J. Fischer, P. Jandera, V. Staněk, *J. Chromatogr. A*, 772 (1997) 385.
- [24] V. Staněk, P. Jandera, H. A. Cleassens, *J. Chromatogr. A*, 948 (2002) 235.
- [25] J. Fischer, P. Jandera, P. Česla, V. Staněk, *J. Sep. Sci.*, 26 (2003) 1035.
- [26] H. C. Chen, W. H. Ding, *J. Chromatogr. A*, 996 (2003) 205.
- [27] H. C. Chen, W. H. Ding, *J. Chromatogr. A*, 1033 (2004) 167.
- [28] Z. Chen, H. Ozawa, K. Uchiyama, T. Hobo, *Electrophoresis*, 24 (2003) 2550.
- [29] S. Suzuki, M. Shirao, M. Aizawa, H. Nakazawa, K. Sasa, H. Sasagawa, *J. Chromatogr. A*, 680 (1994) 541.
- [30] S. Razee, A. Tamura, T. Masujima, *J. Chromatogr. A*, 715 (1995) 179.
- [31] M. Masár, D. Kaniansky, V. Madajová, *J. Chromatogr. A*, 724 (1996) 327.
- [32] H. Y. Huang, Y. C. Shih, *J. Chromatogr. A*, 959 (2002) 317.
- [33] P. Česla, J. Fischer, E. Tesařová, P. Jandera, V. Staněk, *J. Chromatogr. A*, 1149 (2007) 358.
- [34] L. A. Kartsova, N. V. Komarova, *J. Anal. Chem.*, 58 (2003) 972.
- [35] C. H. Wu, Y. S. Lo, H. C. Nian, Y. Y. Lin, *J. Chromatogr. A*, 1003 (2003) 179.
- [36] K. Tian, H. Zhang, X. Chen, Z. Hu, *J. Chromatogr. A*, 1123 (2006) 134.
- [37] D. Kaniansky, E. Krčmová, V. Madajová, M. Masár, J. Marák, F. I. Onuska, *J. Chromatogr. A*, 772 (1997) 327.
- [38] C. A. Groom, J. H. T. Luong, *Electrophoresis*, 18 (1997) 1166.
- [39] G. M. Janini, G. M. Muschik, H. J. Issaq, *Electrophoresis*, 17 (1996) 1575.
- [40] T. J. Ward, J. A. Baker, *Anal. Chem.*, 80 (2008) 4363.
- [41] T. Cserhati, *Biomed. Chromatogr.*, 22 (2008) 563.
- [42] G. K. E. Scriba, *J. Sep. Sci.*, 31 (2008) 1991.
- [43] B. Preinerstorfer, M. Lämmerhofer, W. Lindner, *Electrophoresis*, 30 (2009) 100.