

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

**Katedra analytické chemie**

Analýza, charakterizace a separace derivátů kyseliny  
2,6-diaminopimelové kapilární zónovou elektroforézou  
a micelární elektrokinetickou chromatografií

Analysis, Characterization and Separation of 2,6-Diaminopimelic Acid  
Derivatives by Capillary Zone Electrophoresis  
and Micellar Electrokinetic Chromatography

Diplomová práce  
studijního programu Klinická a toxikologická analýza

Praha 2010

Miloslava Vítovcová

Tato diplomová práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru AV0Z40550506 a MSM0021620857.

## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně, pod vedením školitele-garanta, Doc. RNDr. Pavla Coufala, PhD., a školitele-specialisty, RNDr. Václava Kašičky, CSc., a že jsem všechny použité prameny řádně citovala.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze a Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i., je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity a Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i.

V Praze dne ...

## Poděkování

Ráda bych poděkovala svému školiteli-specialistovi, RNDr. Václavu Kašíčkovi, CSc., a školiteli-garantovi, Doc. RNDr. Pavlu Coufalovi, PhD., za možnost pracovat v Laboratoři elektromigračních metod Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i, a za odborné vedení při vypracování této práce, poskytnutí konzultací a za cenné rady a konstruktivní připomínky k textu.

Poděkování patří celému kolektivu Laboratoře elektromigračních metod za poskytnutí dobrého pracovního zázemí.

Mé poděkování patří také mé rodině za poskytnuté zázemí a trpělivost po celou dobu mého studia.

## **Abstrakt**

V rámci diplomové práce byly metodami kapilární zónové elektroforézy (CZE) a micelární elektrokinetické chromatografie (MEKC) s UV-fotometrickou detekcí určeny stupně chemické čistoty, meze detekce (LOD) a meze stanovitelnosti (LOQ) *N*-acyl derivátů kyseliny 2,6-diaminopimelové (DAP). Charakterizace derivátů DAP byla provedena stanovením jejich efektivních elektroforetických pohyblivostí korigovaných na referenční teplotu 25 °C v několika základních elektrolytech, v kyselé i v alkalické oblasti pH. Separace směsi derivátů DAP byla provedena metodou MEKC v kyselém základním elektrolytu, 500 mmol·dm<sup>-3</sup> kyselině octové, pH 2,54, s přídavkem anionického tenzidu 60 mmol·dm<sup>-3</sup> dodecylsulfátu sodného (SDS).

**Předmětová slova:** analytická chemie, separační metody, kapilární elektromigrační metody, deriváty aminokyselin

**Klíčová slova:** kapilární zónová elektroforéza, micelární elektrokinetická chromatografie, deriváty kyseliny 2,6-diaminopimelové

## **Abstract**

In this work, capillary zone electrophoresis (CZE) and micellar electrokinetic chromatography (MEKC) with UV-photometric detection were used for the determination of degree of chemical purity, limit of detection (LOD) and limit of quantitation (LOQ) of *N*-acyl derivatives of 2,6-diaminopimelic acid (DAP). The characterization of DAP derivatives was performed by determination of their effective electroforetic mobilities in several background electrolytes in acidic and alkalic pH range. The mobilities were corrected to reference temperature 25 °C. Separation of the mixture of DAP derivatives were achieved by MEKC in acid background elektrolyte (500 mmol·dm<sup>-3</sup> acetic acid, pH 2.54) using anionic surfactant 60 mmol·dm<sup>-3</sup> sodium dodecylsulfate (SDS) as a constituent of the micellar pseudostationary phase.

**Subject words:** analytical chemistry, separation methods, capillary electromigration methods, derivatives of amino acids

**Key words:** capillary zone electrophoresis, micellar electrokinetic chromatography, derivatives of 2,6-diaminopimelic acid

## Seznam použitých zkratek

ACN	acetonitril
AMK	aminokyselina
BGE	základní (nosný) elektrolyt
CCD	bezkontaktní vodivostní detektor
CE	kapilární elektroforéza
CEC	kapilární elektrochromatografie
CEKC	kapilární elektrokinetická chromatografie
CGE	kapilární gelová elektroforéza
CIEF	kapilární izoelektrická fokusace
CITP	kapilární izotachoforéza
CMC	kritická micelární koncentrace
CTAB	cetyltrimethylamoniumbromid
CZE	kapilární zónová elektroforéza
DAP	kyselina 2,6-diaminopimelová
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DTAB	dodecyltrimethylamoniumbromid
ECD	elektrochemická detekce
EOF	elektroosmotický tok
ESI	ionizace elektrosprejem
FITC	fluorescein izothiokyanát
FMOC-Cl	fluorenylmethyl chlorformiát
FSCE	kapilární elektroforéza ve volném roztoku
GABA	kyselina $\gamma$ -amino máselná
HEC	hydroxyethyl celulóza
HPCE	vysokoúčinná kapilární elektroforéza
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
2-HP- $\beta$ -CD	2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyklodextrin
CHAPS	3-[(3-cholamidopropyl)dimethylamonio]-1-propansulfonát
CHAPSO	3-[(3-cholamidopropyl)dimethylamonio]-2-hydroxy-1-propansulfonát
ID	vnitřní průměr

IDAA	kyselina iminodioctová
LED	dioda vyzařující světlo
LIF	laserem indukovaná fluorescence
LOD	mez detekce
LOQ	mez stanovitelnosti
MEKC	micelární elektrokinetická chromatografie
MS	hmotnostní spektrometrie
NBD-F	4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol
NDA	naftalen-2,3-dikarboxyaldehyd
NMR	nukleární magnetická rezonance
NQS	1,2-naftochinon-4-sulfonát
OPA	<i>ortho</i> -ftalaldehyd
RNA	ribonukleová kyselina
SIFA	<i>N</i> -hydroxysukcinimidyl fluorescein- <i>O</i> -acetát
SDS	dodecylsulfát sodný
TLC	tenkovrstvá chromatografie
Triton X-100	oktylfenol ethylen oxid
TRIS	tris(hydroxymethyl)aminomethan
UV	ultrafialový

## Seznam symbolů

$A_c$	korigovaná plocha píku
$A_{206}$	absorbance při 206 nm (AU)
$c$	molární koncentrace ( $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ )
$c_{ef}$	efektivní molární koncentrace ( $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ )
$D$	difúzní koeficient ( $\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ )
$E$	intenzita elektrického pole ( $\text{V}\cdot\text{m}^{-1}$ )
$F_e$	síla elektrického pole (N)
$F_f$	frikční síla (N)
$H$	výškový ekvivalent teoretického patra
$I$	elektrický proud (A)
$L$	délka kapiláry (m)
$L_{eff}$	efektivní délka kapiláry (m)
$L_{tot}$	celková délka kapiláry (m)
$m$	elektroforetická pohyblivost ( $\text{m}^2\cdot\text{V}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ )
$m_{eff}$	efektivní elektroforetická pohyblivost ( $\text{m}^2\cdot\text{V}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ )
$\Delta m$	rozdíl mobilit
$\bar{m}$	průměrná mobilita ( $\text{m}^2\cdot\text{V}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ )
$M_r$	relativní molekulová hmotnost
$n$	šum (V)
$N$	počet teoretických pater
$\bar{N}$	průměrný počet teoretických pater
$P$	disipovaný elektrický výkon ( $\text{W}\cdot\text{m}^{-3}$ )
$P_{CA}$	stupeň čistoty vyhodnocený dle relativní korigované plochy píku (%)
$pI$	izoelektrický bod
$q$	náboj (C)
$r$	poloměr iontu (nm)
$R$	elektrický odpor ( $\Omega$ )
$R_S$	rozlišení
$R_D$	napěťová odezva detektoru (V)
$S$	plocha průřezu kapiláry ( $\text{m}^2$ )



$S_D$	citlivost detektoru ( $V \cdot mol^{-1} \cdot dm^3$ )
$t$	čas (s)
$t_{eof}$	migrační čas markeru elektroosmotického toku (s)
$t_{mig}$	migrační čas analytu (s)
$T$	teplota ( $^{\circ}C$ )
$U$	separační napětí (V)
$w$	šířka píku
$w_{1/2}$	šířka píku v polovině výšky píku
$\eta$	viskozita prostředí ( $N \cdot m^{-2} \cdot s$ )
$\kappa$	měrná vodivost ( $\Omega^{-1} \cdot m^{-1}$ )
$\sigma$	standardní odchylka
$\sigma^2$	rozptyl
$v$	migrační rychlost ( $m \cdot s^{-1}$ )

# Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod .....</b>	<b>12</b>
<b>2</b>	<b>Výzkumné cíle.....</b>	<b>14</b>
<b>3</b>	<b>Teoretická část .....</b>	<b>15</b>
3.1	Elektroforetická pohyblivost.....	15
3.2	Elektroosmotický tok.....	16
3.3	Disperzní vlivy .....	17
3.3.1	Jouleovo teplo .....	17
3.3.2	Elektromigrační disperze .....	18
3.3.3	Difúze .....	18
3.3.4	Adsorpce na stěnu kapiláry .....	19
3.4	Separační účinnost a rozlišení .....	19
3.4.1	Separační účinnost.....	19
3.4.2	Rozlišení.....	20
3.5	Kapilární elektromigrační metody .....	21
3.5.1	Kapilární zónová elektroforéza (CZE).....	21
3.5.2	Kapilární elektrokinetická chromatografie (CEKC).....	22
3.5.3	Ostatní módy kapilárních elektromigračních metod.....	26
3.5.3.1	Kapilární izotachoforéza (CITP).....	26
3.5.3.2	Kapilární izoelektrická fokusace (CIEF).....	26
3.5.3.3	Kapilární gelová elektroforéza (CGE).....	27
3.5.3.4	Kapilární elektrochromatografie (CEC).....	27
<b>4</b>	<b>Analýza aminokyselin kapilární elektroforézou .....</b>	<b>28</b>
<b>5</b>	<b>Deriváty kyseliny 2,6-diaminopimelové.....</b>	<b>34</b>
<b>6</b>	<b>Experimentální část.....</b>	<b>37</b>
6.1	Chemikálie.....	37
6.2	Úprava vzorků .....	37
6.3	Přístrojové vybavení .....	37
<b>7</b>	<b>Výsledky a diskuze.....</b>	<b>39</b>
<b>7.1</b>	<b>Analýza derivátů DAP .....</b>	<b>39</b>
7.1.1	Složení základních elektrolytů .....	39
7.1.2	Stanovení stupně čistoty .....	40

7.1.3 Stanovení meze detekce a meze stanovitelnosti.....	45
7.2 Charakterizace derivátů DAP .....	48
7.2.1 Korekce efektivních elektroforetických pohyblivostí na referenční teplotu 25 °C.....	48
7.2.2 Stanovení efektivní elektroforetické pohyblivosti .....	49
7.3 Separace derivátů DAP .....	52
<b>8 Závěr.....</b>	<b>57</b>
<b>Použitá literatura .....</b>	<b>58</b>

# 1 Úvod

Možnost separace individuálních látek směsi a jejich izolace je důležitým požadavkem v chemii a biochemii. Často se objevují případy, kdy jediné pokud je látka k dispozici v čisté formě, můžeme získat znalosti o její struktuře a funkci. Hlavní separační metody k izolaci látek ze směsí známé od středověku do počátku minulého století byly v chemii pouze filtrace, destilace, precipitace a krystalizace. Nicméně stále zvyšující se komplexnost studovaných systémů, zejména v biochemii, vedla k rozvoji nových analytických a preparativních separačních technologií. Došlo k rozvoji v oblasti separačních technik, jako je centrifugace, chromatografie a elektromigrace (elektroforéza) [1].

Počátky elektromigračních separačních metod spadají do 19. století, kdy byly prováděny první experimenty v U-trubicích (F. von Reuss, G. Wiedeman, H. Buff, O. Lodge, W. Whetham). O rozšíření elektroforézy se značným dílem zasloužil švédský chemik A. Tiselius [2], který ji v roce 1937 představil jako separační metodu. Zjistil, že proteiny migrují v trubici s pufrem v elektrickém poli na základě jejich náboje a mobility různými rychlostmi a na tomto principu je lze od sebe oddělit. Za svoji práci v oblasti separací získal Tiselius v roce 1948 Nobelovu cenu.

Ve druhé polovině 20. století došlo k rozvoji elektromigračních technik, při kterých byly používány trubice s malým vnitřním průměrem a později kapiláry. Kromě Tiselie se zónovou elektroforézou zabýval i švédský biochemik S. Hjertén, který používal rotující trubice o vnitřním průměru 1-3 mm [3,4]. S vývojem metod a instrumentace došlo k nahrazení trubic kapilárami a dále k postupnému snižování průměru kapilár [5].

Za průkopnickou práci moderní kapilární elektroforézy je považována práce J. W. Jorgensona a K. D. Lukacsové, kteří jako první prakticky demonstrovali vysokou účinnost separace v úzké kapiláře s vnitřním průměrem menším než 100  $\mu\text{m}$  [6,7]. Významnými mezníky jsou i realizace dalších separačních principů v kapilárním formátu, jako je izotachoforéza [8], izoelektrická fokusace [9], elektrokinetická chromatografie [10,11] a elektrochromatografie [12,13]. V roce 1989 byl na trh uveden první komerční přístroj [14].

Kapilární elektroforéza (CE) patří dnes mezi moderní vysokoúčinné separační techniky, kde je separace založena na rozdílných rychlostech pohybu iontů v kapalném

prostředí v elektrickém poli. Kapilární elektromigrační metody jsou pro svou účinnost dosahující stovek tisíc až milionů teoretických pater a citlivost na úrovni femtomol - zeptomol ( $10^{-15}$  –  $10^{-21}$  mol) analytu v nano- až pikolitrových objemech analyzovaných vzorků považovány za nejúčinnější a nejcitlivější analytické separační metody. Jsou stále více uznávaným protějškem resp. doplňkem dosud nejrozšířenějších separačních metod různých variant vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) [15].

Využití elektromigračních metod sahá od analýzy malých iontů a molekul jako jsou anorganické [16] i organické ionty [17,18], aminokyseliny [19–21], až po analýzu složitých biomolekul, jako jsou peptidy [20,22], proteiny [23,24], polysacharidy [25] či fragmenty nukleových kyselin [26,27]. Mimořádně významný je přínos kapilární elektroforézy v projektu sekvenace lidského genomu [28], v aplikacích proteomického [29], peptidomického [30] a metabolického výzkumu [31–33] nebo pro analýzy mikroorganismů [34–36] a jednotlivých organel buňky [37–39].

## 2 Výzkumné cíle

Cílem této diplomové práce bylo:

- 1) Stanovit stupně čistoty, určit limit detekce a limit stanovitelnosti *N*-acyl derivátů kyseliny 2,6-diaminopimelové metodami kapilární zónové elektroforézy (CZE) a micelární elektrokinetické chromatografie (MEKC) s UV-fotometrickou detekcí v různých základních elektrolytech v kyselé i alkalické oblasti pH.
- 2) Charakterizovat jednotlivé deriváty kyseliny 2,6-diaminopimelové jejich efektivní elektroforetickou pohyblivostí metodou kapilární zónové elektroforézy (CZE) a micelární elektrokinetické chromatografie (MEKC) v různých základních elektrolytech. Hodnoty pohyblivostí korigovat na referenční teplotu 25 °C.
- 3) Najít vhodné podmínky pro separaci směsi strukturně podobných *N*-acyl derivátů kyseliny 2,6-diaminopimelové kapilární zónovou elektroforézou (CZE) a micelární elektrokinetickou chromatografií (MEKC).

## 3 Teoretická část

### 3.1 Elektroforetická pohyblivost

Elektroforetická pohyblivost,  $m$ , hraje klíčovou roli ve všech elektroforetických separacích bez ohledu na to jedná-li se o plošnou či kapilární techniku. Je definována jako rychlost pohybu nabitých částic,  $\nu$ , v kapalném prostředí ve stejnosměrném elektrickém poli o jednotkové intenzitě,  $E$ :

$$m = \frac{\nu}{E} \quad (\text{m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}) \quad (1)$$

Elektroforetická migrace nabitých analytů probíhá v médiu, které je nazýváno základní elektrolyt (BGE). Aplikací elektrického pole o konstantní intenzitě,  $E$ , ionty podléhají elektrostatické síle,  $F_e$ , která je úměrná intenzitě elektrického pole,  $E$ , a náboji,  $q$ , jednotlivého iontu:

$$F_e = q \cdot E \quad (2)$$

Tato síla,  $F_e$ , urychluje ionty směrem k opačně nabitě elektrodě. Ve viskózním médiu opačně působí frikční (brzdící) síla, která zpomaluje pohyb iontů. Podle Stokesova zákona pro sférické částice, tato frikční síla může být vyjádřena následovně:

$$F_f = -6\pi \cdot \eta \cdot r \cdot \nu \quad (3)$$

kde  $\eta$  je viskozita kapaliny,  $r$  je poloměr částice nebo iontu a  $\nu$  je migrační rychlost.

Z rovnosti těchto opačně orientovaných sil v ustáleném stavu, tj.  $F_e = -F_f$ , lze pro elektroforetickou pohyblivost,  $m$ , odvodit:

$$m = \frac{\nu}{E} = \frac{q}{6\pi \cdot \eta \cdot r} \quad (4)$$

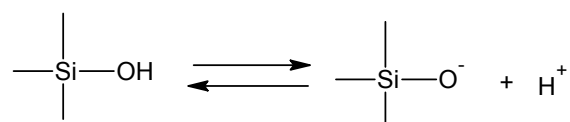
Z rovnice (4) vyplývá, že pohyblivost iontu je přímo úměrná jeho náboji a nepřímo

úměrná jeho poloměru a viskozitě roztoku, je tedy vlastností daného iontu při daných podmínkách. V principu, tento parametr je fyzikální konstanta a měla by být měřena pro celkově nabitý analyt a extrapolována na nekonečné zředění. To se ale obvykle liší od určení experimentálního [15,40,41].

### 3.2 Elektroosmotický tok

Kromě elektroforetického pohybu je častým transportním jevem v kapilárních elektromigračních metodách elektroosmotický tok (EOF) neboli elektroosmóza. Jedná se o elektrokinetický jev, kdy působením vnějšího elektrického pole na prostorový náboj elektrické dvojvrstvy v kapalině dochází k pohybu této kapaliny.

Stěny kapilár z taveného křemene obsahují silanolové skupiny, které se v kontaktu s roztoky o vyšším pH disociují, jak je ukázáno na obrázku 1:



**Obrázek 1:** Disociace silanolových skupin vnitřní stěny křemenné kapiláry.

Disociací se vytváří záporný náboj na stěně kapiláry. Ke stěně je přitahována vrstva iontů základního elektrolytu a vzniká stabilní elektrická dvojvrstva (tzv. Sternova vrstva). Kationty  $\text{H}^+$  bývají silně hydratovány a jejich pohyb společně s asociovanými molekulami vody vyvolává tok celého roztoku k detektoru umístěného před katodou. Tok je tak silný, že unáší ke katodě i anionty. Neutrální částice se pohybují rychlostí EOF toku vlastní. EOF unáší všechny přítomné ionty stejnou rychlostí, tj. z hlediska separace působí jako neselektivní síla, významně však ovlivňuje výslednou migrační rychlost přítomných analytů a tím i účinnost separace a dobu analýzy. Ustanovením Sternovy a difúzní vrstvy se vytvářejí potenciálové rozdíly. Difúzní vrstvě přísluší potenciálový rozdíl, který se nazývá elektrokinetický potenciál neboli zeta potenciál [42].

Elektrokinetický potenciál je v podstatě určen povrchovou hustotou náboje na vnitřní stěně kapiláry. Jelikož disociace ionogenních silanolových skupin na vnitřním



povrchu křemenných kapilár je závislá na pH roztoku, jímž je kapilára naplněna, je EOF v těchto kapilárách silně závislý na pH nosného elektrolytu při elektromigračních separacích. Mezi pH 3-8 elektroosmotický tok několikanásobně stoupá a elektroosmotická pohyblivost převyšuje elektroforetickou pohyblivost i rychlých malých iontů, např. chloridů. Elektrokinetický potenciál a tudíž i EOF lze regulovat změnou složení nosného elektrolytu (pH, iontová síla), úpravou vnitřního povrchu kapiláry nebo též vnějším příčným polem.

Význačnou předností elektroosmotického toku ve srovnání s laminárním prouděním hydrodynamického toku je jeho téměř pravoúhlý rychlostní profil v celém průřezu kapiláry na rozdíl od parabolického rychlostního profilu hydrodynamického toku, takže jeho příspěvek k celkové disperzi zón je zanedbatelný [15].

### 3.3 Disperzní vlivy

Při elektromigraci některé faktory ovlivňují průběh separace. Jde především o Jouleovo teplo, elektroosmózu, difúzi a sorpci. Tyto jevy mohou často působit velmi negativně tak, že během elektromigrace působí proti separaci látek. Vzniklé individuální zóny látek jsou pak těmito rušivými efekty rozmývány a promíchávány [43].

#### 3.3.1 Jouleovo teplo

Elektrický ohřev je hlavním limitujícím faktorem pro používání vysokých intenzit elektrického pole, a tím i proudů a elektrických výkonů, při snaze o zrychlení analýzy. Je zřejmé, že dvojnásobné zrychlení analýzy vyžaduje dvojnásobné napětí, avšak tepelný výkon tím stoupne čtyřikrát.

Při průchodu elektrického proudu sloupcem elektrolytu o průřezu,  $S$ , ( $m^2$ ) a měrné vodivosti,  $\kappa$ , ( $\Omega^{-1} \cdot m^{-1}$ ) je produkováno Jouleovo teplo:

$$P = \frac{E \cdot I}{S} = \frac{I^2}{\kappa \cdot S^2} \quad (5)$$

kde  $P$  značí disipovaný elektrický výkon ( $W \cdot m^{-3}$ ),  $I$  je elektrický proud (A) a  $E$  je intenzita elektrického pole ( $V \cdot m^{-1}$ ).

Produkcí Jouleova tepla v kapiláře se zvyšuje střední teplota uvnitř kapiláry. Teplota elektrolytu uvnitř kapiláry je nehomogenně rozložena, z čehož vyplývá radiální teplotní profil. Teplotní profil má zhruba parabolický tvar s maximem teploty uprostřed a minimem u chlazených stěn kapilár. Mobilita iontů je teplotně závislá, a proto se vzrůstem teploty o 1 K vzroste hodnota pohyblivosti cca o 2 %. Teplotní gradient způsobuje rozdílnou rychlost migrace iontů blízko stěn a ve středu kapiláry. Radiální teplotní profil přináší samozřejmě nehomogenitu i dalších chemicko-fyzikálních vlastností, pH, hustoty, viskozity atd.

S ohledem na závislost pohyblivosti na teplotě, silné účinky Jouleova tepla na disperzi zón jsou tedy zcela zřejmé. Teplotní efekty mohou být minimalizovány optimalizací elektrolytových systémů či konstrukcí aparatury. V praxi to znamená použití pufrů s nízkou iontovou silou a elektrickou vodivostí. Konstrukční metoda snížení efektů Jouleova tepla spočívá ve zlepšení odvodu tepla z kapiláry a to zvýšením plochy povrchu, který je chlazen [43,44].

### 3.3.2 Elektromigrační disperze

Elektromigrační disperze způsobuje deformaci zóny analytu. Pro silné elektrolyty platí, že pokud je mobilita analytu vyšší než mobilita koiontu základního elektrolytu, vedoucí rozhraní zóny látky podléhá difúzi a koncové rozhraní zóny je ostré. Má-li analyt pomalejší pohyblivost než koiont elektrolytu, situace je opačná. Jsou-li mobility stejné, pík není deformován a má tvar gaussovského píku [41].

Elektromigrační disperze se uplatňuje tím méně, čím nižší je koncentrace látek v zónách oproti koncentraci základního elektrolytu. Pro snížení elektromigrační disperze je tedy výhodné dávkovat vzorek o nižší koncentraci, tím současně ale vzrůstají nároky na citlivost detekce [43].

### 3.3.3 Difúze

Vzorek k elektroforetické analýze, tak jak je nadávkován do separační kapiláry, reprezentuje zónu analyzovaných látek, na jejímž rozhraní je velmi ostrý skok koncentrací těchto látek. S postupem času se ostrý skok koncentrací plynule rozmývá difúzí. Za zjednodušujícího předpokladu, že dávkovaný vzorek tvoří v čase  $t = 0$  pravoúhlý tenký obdélníkový schod koncentrací analyzovaných látek, pak po určitém

čase  $t$  jsou výsledkem difúze koncentrační profily zvonovitého tzv. gaussovského tvaru. Lze je charakterizovat rozptylem,  $\sigma^2$ , či standardní odchylkou,  $\sigma$ , danou vztahem:

$$\sigma = \sqrt{2Dt}, \quad (6)$$

kde  $t$  je čas a  $D$  je difúzní koeficient [43].

### 3.3.4 Adsorpce na stěnu kapiláry

Mezi ionty separovaných látek a kapilární stěnou dochází k interakci, z toho důvodu dochází ke změně v jejich migračním chování. Nepotažené stěny křemenných kapilár jsou v kontaktu s roztokem elektrolytu, které vždy obsahují ionizované skupiny, a ty přitahují opačně nabitě ionty z roztoku elektrolytu. Tedy kapilára se chová jako iontoměnič a podporuje sorpci makromolekul s malými difúzními koeficienty. Fixace separovaných látek na kapilární stěnu může být i tak silná, že tyto látky nemusí být prakticky vůbec z kapiláry eluovány.

Adsorbce separovaných zón na stěnu kapiláry je jedna z největších překážek zvláště v separaci vysokomolekulárních látek pomocí CZE. Zatím neexistuje univerzální metoda eliminace tohoto interferujícího efektu. Ačkoli tato interakce může být také někdy využívaná pro selektivní separace, preferuje se minimalizace tohoto efektu jak je jen možné [44].

## 3.4 Separační účinnost a rozlišení

### 3.4.1 Separační účinnost

Účinnost elektroforetické separace je vyjádřena analogicky s chromatografií a to počtem teoretických pater,  $N$ :

$$N = \frac{L_{eff}^2}{\sigma^2} \quad (7)$$

kde  $L_{eff}$  je efektivní délka kapiláry (migrační dráha) a  $\sigma^2$  je celkový rozptyl

koncentračního profilu zóny.

Výškový ekvivalent teoretického patra (nebo výška patra),  $H$ , je vyjádřen jako diferenciál zvýšení rozptylu zóny během migrace kapilárou:

$$H = \frac{d\sigma^2}{dL} \quad (8)$$

který je často používán k charakterizaci disperzních vlastností separačního systému.

Pro výškový ekvivalent teoretického patra a počet teoretických pater platí společný vztah:

$$N = \frac{L}{H} \quad (9)$$

Počet teoretických pater (nebo výškový ekvivalent teoretického patra) charakterizuje rozšíření zóny píku během průchodu kapilárou. Vyšší počet pater odpovídá užším píkům a lepší separační účinnosti. Jestliže detekované píky jsou symetrické a mají gaussovský profil, k výpočtu separační účinnosti se používá vztah:

$$N = 5,545 \cdot \left( \frac{t}{w_{1/2}} \right)^2 \quad (10)$$

$$N = 16 \cdot \left( \frac{t}{w} \right)^2 \quad (11)$$

kde  $t$  je migrační čas a  $w$  je šířka píku při základně a  $w_{1/2}$  je šířka píku v polovině jeho výšky [44].

### 3.4.2 Rozlišení

Pro kvantitativní popis separace dvou analytů je používán parametr rozlišení  $R_S$ . Obecně je rozlišení definováno vztahem:

$$R_s = \frac{2(t_2 - t_1)}{w_1 + w_2} \quad (12)$$

kde  $t$  je migrační čas a  $w$  je šířka píku při základně. Hodnota rozlišení umožňuje číselně vyjádřit úroveň separace. Látky považujeme za zcela oddělené, je-li  $R_s \geq 1,5$ . Rozlišení může být také vyjádřeno se vztahem k účinnosti:

$$R_s = \frac{1}{4} \cdot \bar{N}^{\frac{1}{2}} \cdot \left( \frac{\Delta m}{\bar{m}} \right), \quad (13)$$

kde  $\Delta m = m_2 - m_1$ ,  $\bar{m} = \frac{m_2 + m_1}{2}$  a  $\bar{N}$  je průměrný počet teoretických pater [45].

## 3.5 Kapilární elektromigrační metody

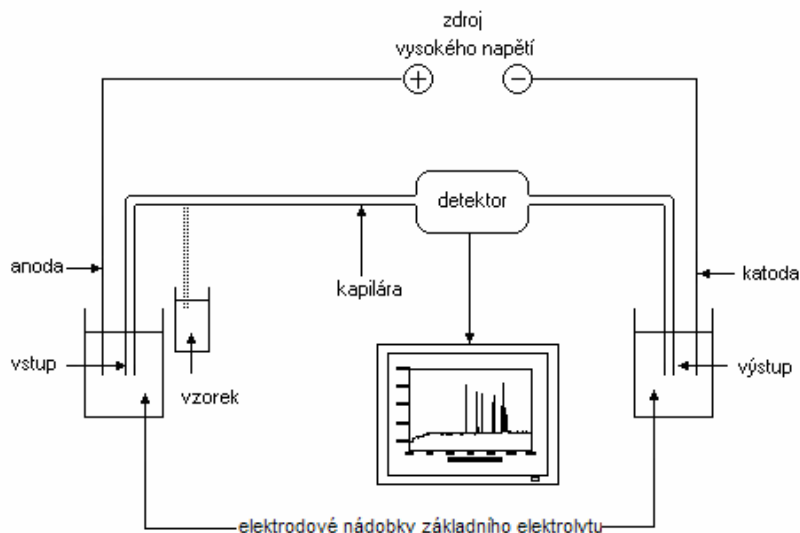
### 3.5.1 Kapilární zónová elektroforéza (CZE)

Kapilární zónová elektroforéza je nejjednodušší elektromigrační technikou a bývá také někdy označována jako kapilární elektroforéza ve volném roztoku (free solution capillary electrophoresis – FSCE). Oblast jejího použití je velice rozsáhlá.

Složky vzorku lišící se svými pohyblivostmi se v kapiláře pohybují různými elektroforetickými rychlostmi směrem k detektoru a na tomto principu se od sebe oddělují. Složení základního elektrolytu (background electrolyte – BGE) je konstantní v celé kapiláře a s časem se nemění. Kromě elektroforetického pohybu samotných nabitých částic je celý objem roztoku uvnitř kapiláry unášen elektroosmotickým tokem. V křemenných kapilárách s chemicky nemodifikovaným povrchem je tento tok orientován směrem ke katodě a jeho rychlost je relativně vysoká (většinou vyšší než elektroforetická), takže výsledná rychlost pohybu kationtů a aniontů má stejný směr, oba typy iontů tedy mohou být separovány v jednom experimentu. Neutrální látky jsou unášeny EOF a tudíž nemohou být rozděleny.

Instrumentální uspořádání pro CZE, které může být využito i pro ostatní techniky vysokoúčinné kapilární elektroforézy (HPCE), je znázorněno na **obrázku 2**. Vnitřní

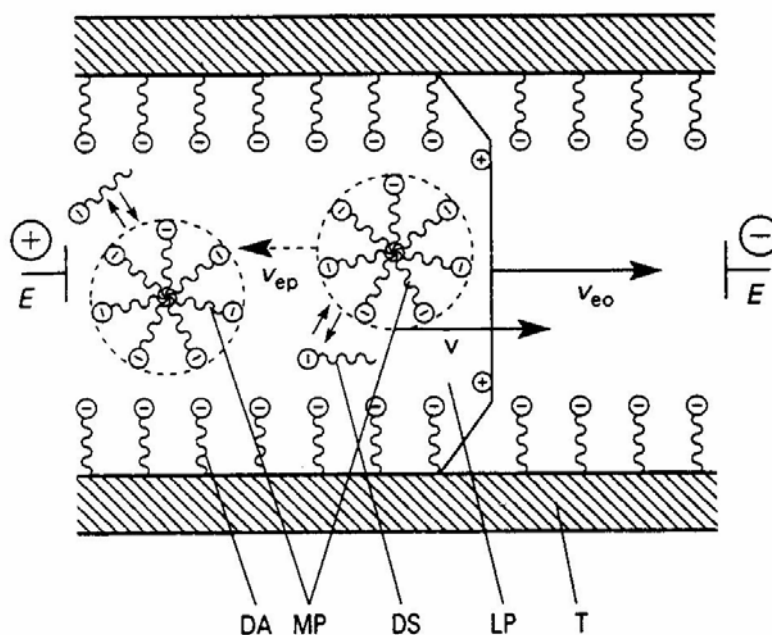
průměr křemenné kapiláry je obvykle menší než 100  $\mu\text{m}$  a její délka je většinou v rozsahu 30-80 cm. Kapilární formát separačního prostoru dovoluje relativně účinný odvod Jouleova tepla, což umožňuje použití vysokých intenzit elektrického pole (desítky  $\text{kV} / \text{m}$ ) a tím i dosažení vysokých účinností a rychlostí separace [15,45].



**Obrázek 2:** Schéma zařízení pro kapilární elektromigrační metody.

### 3.5.2 Kapilární elektrokinetická chromatografie (CEKC)

CEKC je jeden ze způsobů separace v CE. Metodika byla vynalezena v roce 1984 Terabem a spol. [10] a je nejmladší ze separačních principů CE. Tato metoda kombinuje princip chromatografie a CE. Separace je založena na rozdílné distribuci analyzovaných látek mezi pseudostacionární fází a vodnou fází roztoku nosného elektrolytu, ve které je pseudostacionární fáze rovnoměrně rozptýlena. Relativní pohyb těchto pseudostacionárních fází vůči sobě je vyvolán elektroosmotickým tokem dvoufázového systému jako celku, který se pohybuje rychlostí,  $v_{eo}$ , a elektroforetickým pohybem nabitě pseudostacionární fáze, jež se pohybuje rychlostí,  $v_{ep}$ , ve směru opačném (**obrázek 3**). Absolutní hodnota rychlosti  $v_{eo}$  je vyšší než než elektroforetická rychlost  $v_{ep}$ , výsledný směr pohybu obou fází je stejný, ale jejich rychlosti jsou různé.



**Obrázek 3:** Schéma vzniku relativního pohybu vodné a micelární fáze v elektrokinetické chromatografii.

T – kapilára, E – elektrody, LP – vodná fáze, MP – micelární pseudofáze iontového detergentu (např. SDS), DS – monomer detergentu ve vodné fázi, DA – detergent adsorbovaný na vnitřní stěnu kapiláry,  $v_{ep}$  – elektroforetická rychlost micelární fáze,  $v_{eo}$  – rychlost EOF roztoku v kapiláře,  $v$  – výsledná rychlost micelární fáze.

(Převzato z [15])

V důsledku různých afinit složek vzorku k pseudofázi jsou tyto složky rozdílně zpomalovány zpětným pohybem pseudofáze, což vede k jejich rozdílné migrační rychlosti, a tudíž i k jejich separaci v pořadí zvyšující se afinity k micelární fázi (**obrázek 4**).

MEKC využívá jako pseudostacionární fázi povrchově aktivní látky viz **tabulka 1** v koncentraci vyšší než je tzv. kritická micelární koncentrace (CMC). Povrchově aktivní látka se v koncentracích nižších než CMC chová jako normální elektrolyt. Po překročení určité mezní koncentrace (CMC) dojde však k prudké změně několika fyzikálních vlastností jako jsou osmotický tlak, elektrická vodivost a povrchové napětí. Tyto změny jsou způsobeny tvorbou agregátů - micel. Shluky se skládají z monomerů povrchově aktivní látky, která má hydrofóbní a hydrofilní část. Hydrofóbní část se orientuje dovnitř micely a hydrofilní vně do vodného prostředí. Micela určitého tenzidu

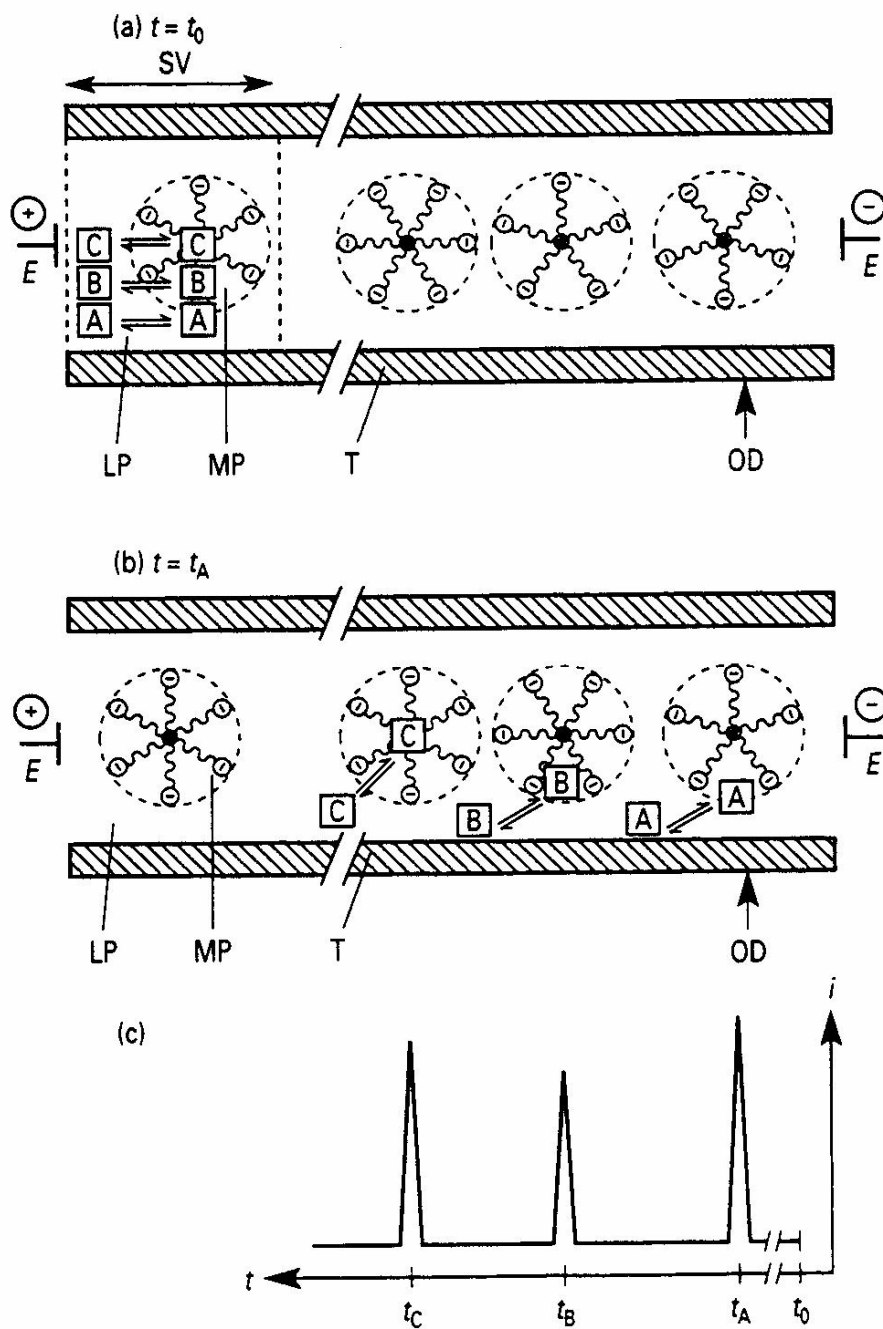
je charakterizována počtem asociovaných molekul, kterému se říká agregační číslo. Micely jsou obvykle nabitě a pohybují se ve směru nebo proti EOF (závisí to na náboji). Anionický tenzid např. SDS migruje směrem k anodě, tedy v opačném směru EOF. EOF je většinou rychlejší než migrační rychlost micel v neutrálním nebo bazickém pH, výsledný pohyb analytů je tedy ve směru EOF, tedy ke katodě. Při použití kationického tenzidu je kapilární stěna potažena pozitivně nabitými molekulami, které obrátí směr EOF. Proto je potřeba otočit polaritu elektrod v uspořádání CE.

Kromě micel lze u EKC využít i jiné typy pseudostacionárních fází, např. cyklodextriny a jejich deriváty, ionogenní polymery a olejové mikroemulze. EKC nabízí díky kombinaci obou principů (chromatografie a CE) jedinečné vlastnosti, mezi něž patří: vysoká účinnost, vysoká rychlost analýzy, potřeba malého množství vzorku a malá spotřeba rozpouštědla. Oproti chromatografii lze zde dosáhnout vyšší separační účinnosti a počet teoretických pater může být až několikanásobně vyšší [15,40,45].

**Tabulka 1:** Přehled používaných tenzidů v MEKC [45].

	Detergent	CMC (mM)	Agregační číslo
anionické	SDS	8,2	62
kationické	DTAB	14	50
	CTAB	1,3	78
neionogenní	Triton X-100	0,24	140
zwitterionty	CHAPS	8	10
	CHAPSO	8	11
žlučové kyseliny	kyselina cholová	14	2-4
	kyselina deoxycholová	5	4-10
	kyselina taurocholová	10-15	4





**Obrázek 4:** Separáčnı́ princip elektrokinetické chromatografie.

a – počáteční stav v  $t_0$ : do kapiláry (T) naplněné roztokem skládajícím se z vodné fáze (LP) a micelární fáze (MP) je zavedena zóna vzorku (SV) obsahující složky A,B,C se vzrůstající afinitou k micelární fázi; E–elektrody, b – stav separace v čase  $t_A$ : složka A s nejnižší afinitou k micelární fázi prochází jako první detektorem (OD), c – schematický chromatogram:  $i$  – signál detektoru,  $t_A$ ,  $t_B$ ,  $t_C$  – migrační časy složek A, B, C.

(Převzato z [15])

### 3.5.3 Ostatní módy kapilárních elektromigračních metod

#### 3.5.3.1 Kapilární izotachoforéza (CITP)

Kapilární izotachoforéza představuje elektroseparační metodu, při které se vzorek separuje v diskontinuálním elektrolytovém systému vytvořeném vedoucím a koncovým elektrolytem. Za těchto podmínek lze separovat buď anionty nebo kationty. Vedoucím iontem, který je součástí vedoucího elektrolytu, je ion s největší efektivní pohyblivostí a naopak koncový elektrolyt obsahuje iont s nejmenší efektivní pohyblivostí. Protiiont vedoucího elektrolytu je volen tak, aby měl pufrační kapacitu při daném pH separace, protiiont koncového elektrolytu je do značné míry libovolný. Pokud k takto definovanému prostředí připojíme stejnosměrné elektrické pole, dochází k pohybu iontů k příslušným elektrodám a ze směsné zóny vzorku se vyděluje rychlejší a pomalejší složka. Po určitém čase dojde k vytvoření tzv. ustáleného stavu, ve kterém jednotlivé složky vzorku putují stejnou rychlostí v bezprostředně sousedících zónách s velmi ostrými rozhraními.

Záznam ITP separace má charakteristický stupňovitý průběh, kde výška schodu odpovídá kvalitě a délka schodu kvantitě analyzované látky [15,40].

#### 3.5.3.2 Kapilární izoelektrická fokusace (CIEF)

CIEF dělí molekuly mající amfolytickou povahu (aminokyseliny, peptidy, proteiny) na základě jejich rozdílných izoelektrických bodů  $pI$  (tj.  $pH$ , při kterém má molekula celkový náboj roven nule a v elektrickém poli se nepohybuje).

CIEF umožňuje separaci látek, které se liší alespoň o 0,005 - 0,01 jednotek  $pI$ . Separace probíhá v gradientu  $pH$ , který je vytvořen aplikací elektrického pole na komplexní směs amfolytů v kapiláře, které jsou schopny pufrovat celý rozsah  $pH$ . Amfolyty jsou molekuly, které obsahují kyselou i bazickou část a mají hodnoty  $pI$  v požadované oblasti  $pH$ . Dělené látky migrují roztokem, dokud nedoputují do té části separačního prostředí, jehož  $pH$  je rovno jejich izoelektrickému bodu. V této chvíli se z nich stanou neutrální látky, zastaví se a vytvoří úzkou zónu – “zafokusují se“. CIEF většinou probíhá při redukci elektroosmotického toku, který by jinak mohl způsobit vymytí amfolytů před kompletním zafokusováním. Po fokusaci je nutné zóny mobilizovat, aby mohly být detekovány. Mobilizace se uskutečňuje buď

hydrodynamickým tokem vyvolaným přetlakem nebo podtlakem u konců kapiláry, nebo elektroelucí. Elektroeluce se vyvolá změnou složení anolytu (elektrodotový roztok u anody) nebo katolytu (elektrodotový roztok u katody), např. náhradou kyseliny bazí nebo přidávkem solí, které způsobí anodický nebo katodický pohyb pH gradientu, a tudíž i pohyb fokusovaných zón k detektoru [15,45].

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

CGE je druh elektroforézy, při níž se látky rozdělují na základě pohyblivosti v gelu. Pohyblivost v gelu závisí na náboji separované molekuly, její molekulové hmotnosti a samozřejmě na typu a porozitě gelu.

Kapilární gelová elektroforéza se využívá zejména pro separaci velkých iontů, jakými jsou polysacharidy, peptidy, bílkoviny, fragmenty DNA a RNA [40,41].

### *3.5.3.4 Kapilární elektrochromatografie (CEC)*

CEC dělí nabitě i neutrální látky na základě jejich rozdílných rozdělovacích koeficientů mezi mobilní a stacionární fázi. Mobilní fáze je unášena pomocí elektroosmotického toku přes stacionární fázi v naplněné kapiláře. Molekuly dělených látek jsou unášeny mobilní fází k detektoru a zároveň zpoždovány interakcí se stacionární fází. CEC je díky pravoúhlému profilu EOF a možnosti použití jemnějšího zrnění stacionární fáze [15,46].

## 4 Analýza aminokyselin kapilární elektroforézou

Z fyzikálně-chemického hlediska jsou aminokyseliny amfolyty. Tyto analyty mohou nést kladný, záporný nebo efektivní nulový náboj podle pH okolního prostředí. Každá aminokyselina má specifický izoelektrický bod  $pI$  ( $pI$  je pH, při kterém jsou aminokyseliny celkově elektricky neutrální). pH elektrolytu odlišné od  $pI$  aminokyselin umožňuje jejich analýzu metodou CE. Je možné stanovovat AMK v jejich kationtové formě v kyselém prostředí (cca  $pH < 5$ ) nebo jako anionty v bazickém prostředí ( $pH 8$  a vyšší). Při pH elektrolytu vyšším než  $pI$  nese aminokyselina negativní náboj a putuje směrem k anodě, při pH nižším než  $pI$  nese pozitivní celkový náboj a migruje směrem k záporně nabitě elektrodě (katodě).

Analýzy AMK se provádějí metodami HPLC a dříve též chromatografií na tenké vrstvě (TLC). CE má některé výhody oproti těmto metodám. Patří k nim vysoká účinnost separace, malá spotřeba činidel, rychlá analýza, absence vysokého tlaku a poměrně jednoduchá instrumentace.

Nedostatek chromoforů u alifatických AMK je limitující při jejich detekci v CE nejčastěji používanou UV-absorpční detekcí, kterou lze s dostatečnou citlivostí využít pouze pro aromatické aminokyseliny. Tento problém s neabsorbujícími AMK lze řešit jejich derivatizací. Této úpravě se dosáhne připojením vhodného chromoforu nebo fluoroforu ke stanovované látce. G. Lunn a L. Hellwig napsali velice rozsáhlou příručku [47] věnující se této problematice, kde se nejen zaměřují na samotné derivatizační látky, ale i na jejich reakční a separační podmínky.

Pro detekci AMK jsou používány různé detektory pracující na různých principech. Nejčastěji využívanou detekcí při analýzách AMK pomocí CE je přímá UV-absorpční detekce [4] v oblasti, ve které absorbuje vhodný chromofor připojený k AMK, většinou v rozsahu vlnových délek 200 až 220 nm. Pro UV detekci se jako chromofory používají např. 5-dimethylaminonaftalen-1-sulfonyl chlorid, jež tvoří dansylované AMK nebo fenylizothiokyanát vytvářející stabilní fenylthiohydantoinové deriváty. Citlivost detektoru se může též zvýšit použitím speciálních typů detekčních cel, jako jsou například cely ve tvaru Z, U, „sleeve“ nebo bubliny.

Hlavní výhodou fluorescenční detekce [48] je získání o několik řádů lepší citlivosti

než při použití UV absorpčních detektorů. Určení nativních aminokyselin je možné jen u aromatických aminokyselin jako je Tyr nebo Trp, které však vyžadují vlnovou délku excitace nízké oblasti UV 210-290 nm. Běžněji se využívá značení AMK fluorescenčními značkami, které mohou být excitovány při vlnových délkách komerčně dostupných laserů (např. He-Cd nebo Ar laser) [49]. Mezi nejběžněji používané fluorofory patří např. fluorescein izothiokyanát, fluoresceinamin, *O*-ftaldialdehyd nebo naftalen-2,3-dikarboxaldehyd.

Hmotnostní spektrometrie (MS) má také své místo v detekci aminokyselin. Nejběžněji používaným iontovým zdrojem je elektrosprej (ESI), který umožňuje rychlou charakterizaci elektroforeticky separovaných aminokyselin jejich relativními molekulovými hmotnostmi [50].

Elektrochemická detekce (ECD) [51] je další, i když ne tak častý způsob detekce AMK v CE. Do elektrochemické detekce můžeme zařadit detekci amperometrickou [52], potenciometrickou [5] a vodivostní [53]. Amperometrická a voltmetrická detekce jsou techniky vysoce citlivé i selektivní a používají se pro AMK obsahující ve své struktuře oxidovatelné a redukovatelné funkční skupiny, tedy pro aminokyseliny jako tyrosin, cystein nebo tryptofan.

Separace enantiomerů AMK je důležitým aspektem v analýze AMK, jelikož se jedná o opticky aktivní látky, které tvoří základní stavební kameny peptidů a bílkovin všech živých organismů. AMK se nacházejí v biogenních makromolekulách peptidech a bílkovinách převážně ve svých L-formách. K rozlišení jednotlivých forem může být využito přímých a nepřímých metod. Přímé metody se provádí s přidavkem chirálního selektoru k základnímu elektrolytu jako jsou cyklodextriny, ionty kovů, chirální ligandy či antibiotika. U nepřímé metody stanovení dochází k převedení enantiomerů na diastereomery pomocí chirálních derivatizačních činidel [54].

Některé příklady stanovení AMK s využitím CE metod jsou shrnuty v **tabulce 2**.

**Tabulka 2:** Příklady analýz aminokyselin kapilárními elektromigračními metodami.

**2a) Analýzy AMK ve farmaceutických preparátech**

<b>Analýza</b>	<b>Složení a pH BGE</b>	<b>Derivatizace</b>	<b>Detekce</b>	<b>Ref.</b>
Stanovení 1-[(2 <i>s</i> )-3-merkaptó-2-methylpropionyl]-L-Pro (kaptopril), ve farmaceutických preparátech.	20 mM fosfát, pH 12,0	5-iodoacetamido-fluorescein	LIF	[55]
Stanovení bazických AMK (His, Arg, Lys) ve farmaceutických preparátech.	Vedoucí elektrolyt-10mM potassium acetát pH 4, koncový elektrolyt-10 mM $\beta$ -alanin	-		[56]
Stanovení AMK (Lys, His, Thr, Trp, Tyr, $\alpha$ -keto-Leu, $\alpha$ -keto-Ile, $\alpha$ -keto-Val, $\alpha$ -keto-Phe a $\alpha$ -hydroxy-Met ) obsažené v preparátu Ketosteril.	40 mM Tris a 160 mM kyselina boritá, upravené hydroxidem sodným při pH 10,0	-	UV, 214 nm	[57]
Stanovení Arg (allantoinu a cholinu) v Rhizoma Dioscoreae.	30 mM fosfátový pufr, pH 9,25	-	UV, 200 nm	[58]
Stanovení 1-(aminomethyl)cyclohexanacetátu (gabapentin) v lécích a tobolkách.	5 mM 5-sulfosalicylová kyselina, 0,5 mM CTAB, pH 11,0	-	Nepřímá UV, 215 nm, využití sulfosalicylového iontu jako chromoforu	[59]

<b>Analýza</b>	<b>Složení a pH BGE</b>	<b>Derivatizace</b>	<b>Detekce</b>	<b>Ref.</b>
Stanovení homotaurinu – jako nečistoty v kalcium acetylhomotaurinu ve farmaceutických preparátech.	40 mM borát, pH 9,2	Fluoreskamin	UV, 205 nm	[60]
Separace a stanovení N-acetyl-Cys a jeho nečistot ve farmaceutických preparátech.	100 mM borát, pH 8,4	-	UV, 214 nm	[61]

## 2b) Analýzy AMK v biologických matricích

<b>Analýza</b>	<b>Složení a pH BGE</b>	<b>Derivatizace</b>	<b>Detekce</b>	<b>Ref.</b>
Stanovení AMK v moči (Lys, Arg, His, Gly, Ala, Ser, Val, Ile, Leu, Pro, Thr, Met, Glu, Phe, Asp, Tyr).	2 M kyselina mravenčí, 20% methanol	-	TOF - MS	[62]
Stanovení AMK v kapilární krvi (His, Trp, Phe, Tyr, homo-Cys, Cys, karnosin).	10 mM fosfát, pH 2,8	-	UV 200 nm	[63]
Stanovení AMK v plodové vodě (β-Ala, ornithin, kreatinin, citrulin, 4-hydroxy-Pro, 1-methyl-His, GABA).	1,7 M acetát, 0,1% HEC, pH 2,15	-	CCD	[64]

<b>Analýza</b>	<b>Složení a pH BGE</b>	<b>Derivatizace</b>	<b>Detekce</b>	<b>Ref.</b>
Stanovení AMK ve slinách. (Pro, Ser Gly, Glu)	20 mM borát, pH 9,5	FITC	LIF, 488 nm	[65]
AMK v séru ( Glu, Asp).	10 mM borát, pH 9,3	NDA	LED-IF	[66]
Stanovení AMK neurotransmiterů (Glu, Asp, GABA, Gly, Tau a Gln).	100 mM kyselina boritá, 100 mM SDS, 8 % v/v methanol, pH 9,6	SIFA	LIF, 488 nm	[67]
Stanovení AMK neurotransmiterů (Glu, GABA, Gly, Tau, Ser, Asn, Arg, Lys, Phe, Leu, Ile, Tyr, Val, citrulin, Met, $\beta$ -Ala, His, Ala, Gln, Thr).	100 mM borát, 20 mM 2-HP- $\beta$ -CD	NBD-F	LIF, 488 nm	[68]
Stanovení 17 proteinogenních AMK v pojivové tkáni při prolapsu pánevních orgánů (Pro, Phe, Met, Asn, Glu, Gln, Ala, Val, Leu, His, Gly, Asp, Thr, Try, trans-4-hydroxy-Pro, Arg, Ile).	1 M kyselina mravenčí	-	ESI - MS	[69]



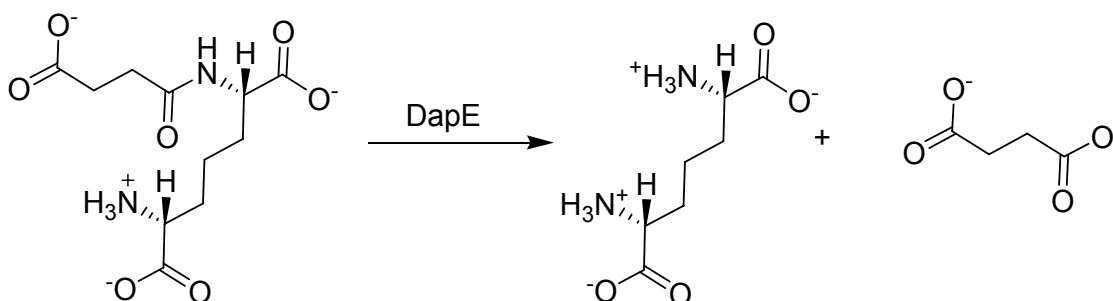
<b>Analýza</b>	<b>Složení a pH BGE</b>	<b>Derivatizace</b>	<b>Detekce</b>	<b>Ref.</b>
Stanovení AMK z endotheliálních buněk cév (Ala, Tau, Gly, Glu, Asp).	20 mM borát, pH 9,0 pro FITC deriváty 20 mM borát, 20 % ACN, 10 mM β-CD pro OPA deriváty	FITC OPA	LIF	[70]
Stanovení AMK v extraktech čajových lístků (Arg, Trp, Tyr, Phe, Leu, Ile, His, Asn, Thr, Thea, Val, Met, Gln, GABA, Ser, Ala, Asp, Pro, Cys, Lys, Gly).	10 mM Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> , pH 9,3	NDA	LED-IF	[71]
Stanovení S-alk(en)yl-Cys-S-oxidů v běžné konzumované zelenině (brokolice, zelí, ředkev, cibule, česnek,...).	20 mM borát, 20 mM SDS, 10% (v/v) methanol pH 9,2	FMOC-Cl	UV-VIS, 265 nm	[72]
Stanovení dimethyl-L-Arg a jemu strukturálně a funkčně podobných látek v lidské plazmě (N <sup>G</sup> -monomethyl-L-Arg, L-Arg, L-homo-Arg, L-ornithin, L-citrulin).	koncentrovaný borát, pH 9,4	NBD-F	UV, 200-254 nm	[73]

## 5 Deriváty kyseliny 2,6-diaminopimelové

Analyzované deriváty kyseliny 2,6-diaminopimelové jsou odvozeny ze společného strukturního základu, kyseliny 2,6-diaminopimelové, k jejíž aminoskupině je amidickou vazbou připojen příslušný acyl: alifatický, aromatický, s volnou karboxylovou skupinou nebo s esterifikovanou karboxylovou skupinou (viz **tabulka 3**). Deriváty DAP byly syntetizovány s cílem připravit potenciální inhibitory enzymu *N*-sukcinyl-L,L-diaminopimelát desukcinylasy [74].

Bakteriální infekce jsou podstatným a stále rostoucím problémem na celém světě. Důvodem této hrozby ale nejsou jen početné druhy bakterií, ale zejména jejich neustále narůstající rezistence vůči antibiotikům. Vědci po celém světě se nepřetržitě snaží o vývoj nových léků proti onemocněním způsobeným bakteriemi.

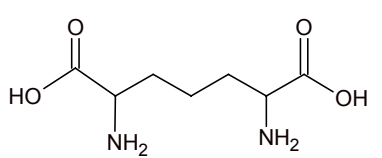
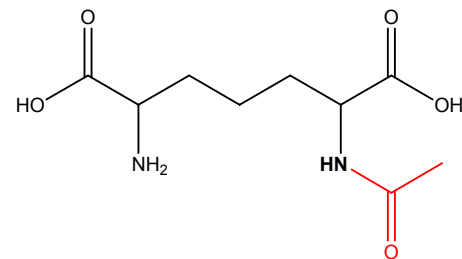
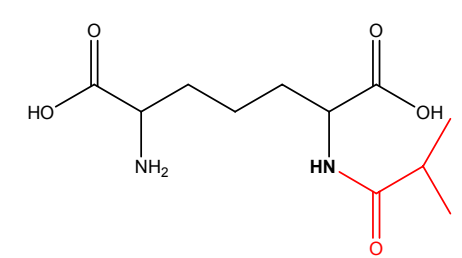
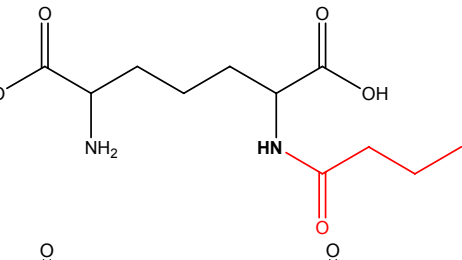
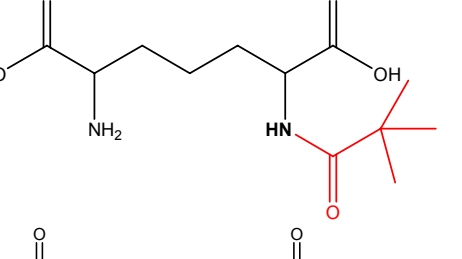
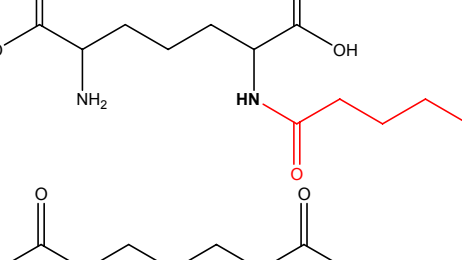
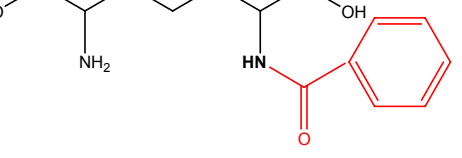
Jedním ze způsobů působení antibiotik je působení na buněčnou stěnu bakterie, např. inhibice syntézy kyseliny diaminopimelové, jež je intermediátem v biosyntéze lysinu [75]. DAP i lysin jsou klíčovými složkami peptidoglykanů, které tvoří síť buněčné stěny bakterie. Lysin je potřebný při stavbě buněčné stěny u grampozitivních bakterií, DAP se naopak uplatňuje v buněčné stěně u gramnegativních bakterií a mykobakterií [76]. Přerušení syntézy stavebních složek buněčné stěny, jako je DAP nebo lysin, je tedy pro bakterii letální. K zastavení syntézy těchto stavebních složek může dojít inhibicí příslušného enzymu v syntéze. Bylo prokázáno, že delece genu kódujícího enzym z DAP/lysinové biosyntetické cesty je letální pro *Helicobacter pylori* a *Mycobacterium smegmatis*. Jedná se o gen *dapE*, který kóduje *N*-sukcinyl-L,L-diaminopimelát desukcinylasu (DapE) (EC 3.5.1.18). Tento enzym katalyzuje hydrolýzu *N*-sukcinyl-L,L-diaminopimelátu na L,L-diaminopimelát (viz **obrázek 5**).



**Obrázek 5:** Hydrolýza *N*-sukcinyl-L,L-diaminopimelátu na L,L-diaminopimelát.

(převzato z [74])

**Tabulka 3:** Přehled strukturních vzorců a relativních molekulových hmotností ( $M_r$ ) kyseliny 2,6-diaminopimelové (DAP) a jejich *N*-acyl derivátů.

Označení/název analytu	Strukturní vzorec	$M_r$
<b>DAP</b> Kyselina 2,6-diaminopimelová		190,2
<b>A1</b> <i>N</i> -acetyl-DAP		232,1
<b>A2</b> <i>N</i> -isobutyryl-DAP		260,3
<b>A3</b> <i>N</i> -butyryl-DAP		260,3
<b>A4</b> <i>N</i> -pivalyl-DAP		374,3
<b>A5</b> <i>N</i> -valeryl-DAP		374,3
<b>A6</b> <i>N</i> -benzoyl-DAP		294,3

Označení/název analytu	Strukturní vzorec	M <sub>r</sub>
<b>E1</b> <i>N</i> -fumaryl, Me-ester-DAP		302,3
<b>E2</b> <i>N</i> -malonyl, Et-ester-DAP		304,3
<b>E3</b> <i>N</i> -2-Me-sukcinyl, Me-ester-DAP		318,3
<b>C1</b> <i>N</i> -glutaryl-DAP		304,3
<b>C2</b> <i>N</i> -3-Me-glutaryl-DAP		318,3
<b>C3</b> <i>N</i> -3,3-diMe-glutaryl-DAP		332,4
<b>C4</b> <i>N</i> -3,3-tetrafluoro-sukcinyl-DAP		362,2

## 6 Experimentální část

### 6.1 Chemikálie

Všechny použité chemikálie dosahovaly stupně čistoty p.a.

- Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS) – Serva (Heidelberg, Německo)
- kyselina fosforečná, kyselina octová a hydroxid sodný – Lachema (Brno, ČR)
- methanol - Penta (Chrudim, ČR),
- kyselina iminodioctová (IDAA) – Bachem (Bubendorf, Švýcarsko)
- cetyltrimethylamoniumbromid (CTAB), dodecylsulfát sodný (SDS) – Fluka (Buchs, Švýcarsko)
- acetonitril (ACN) – Sigma Aldrich (Praha, ČR)

Základní elektrolyty byly filtrovány přes filtr s porozitou 0,45  $\mu\text{m}$  filtr Millipore (Bedford, MA, USA).

### 6.2 Úprava vzorků

Deriváty DAP byly syntetizovány na pevné fázi v Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR (ÚOCHB) a purifikovány HPLC s obrácenou fází [74]. Pro CE analýzu byly všechny vzorky rozpuštěny v deionizované vodě. Koncentrace vzniklých roztoků se pohybovaly v rozmezí 3,6-5,8  $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ .

### 6.3 Přístrojové vybavení

Měření byla provedena na CE analyzátoru domácí výroby ÚOCHB AV ČR [77]. Příklad byl obsluhován manuálně, sběr a zpracování dat byly provedeny chromatografickou stanicí Clarity (DataApex, Praha, ČR). Experimenty byly provedeny v křemenné kapiláře (vně pokryté polyimidem) dodané firmou Polymicro Technologies (Phoenix, AR, USA) o vnějším průměru 375  $\mu\text{m}$  a vnitřním průměru 50  $\mu\text{m}$ , celkové délky 40 cm a efektivní délky 29 cm. Dávkování bylo provedeno hydrodynamickým způsobem. Příklad nebyl vybaven aktivním chlazením kapiláry, teplota okolního prostředí při měření se pohybovala v rozmezí od 22 do 26  $^{\circ}\text{C}$ , proto hodnoty efektivních

elektroforetických pohyblivostí byly korigovány na referenční teplotu 25 °C. Analyzované látky byly detekovány pomocí UV-absorpčního fotometrického detektoru při vlnové délce 206 nm, zdrojem záření byla bezelektrodová vysokofrekvenčně buzená jódová výbojka (LKB-Pharmacia, Uppsala, Švédsko), detektorem záření byla UV-senzitivní křemíková fotodioda s vestaveným předzesilovačem (Hamamatsu Photonics Deutschland, Herrsching, Německo).

Kapilára byla mimo dobu měření uložena v 0,5 M kyselině octové, při každém uvedení přístroje do provozu byla kapilára promývána vodou, 0,1 M hydroxidem sodným (případně 1 M hydroxidem sodným) a základním elektrolytem. Mezi jednotlivými měřeními byla kapilára promývána základním elektrolytem. Velikost separačního napětí byla +12 kV nebo -12 kV. Vzorky byly dávkovány tlakem 6-10 mbar po dobu 3-20 s.

## 7 Výsledky a diskuze

### 7.1 Analýza derivátů DAP

#### 7.1.1 Složení základních elektrolytů

Důležitými parametry pro volbu základního elektrolytu (BGE) v CE je jeho separační selektivita a účinnost pro dané analyty a jejich příměsi. BGE řídí nejen ionizaci a migraci analytu, ale taky velikost EOF, který je způsoben reziduálními náboji na vnitřní stěně separační kapiláry. Nejdůležitější charakteristikou BGE pro separaci slabých elektrolytů a amfolytů je pH, neboť efektivní pohyblivost těchto analytů je na pH silně závislá. Pro amfolyty typu aminokyselin včetně analyzovaných derivátů DAP jsou vhodné dvě oblasti pH a to kyselá oblast (pH 2,0-4,0), kde bazické aminoskupiny jsou protonované a kyselé karboxylové skupiny jsou pouze částečně disociované a analyty migrují jako kationty, nebo zásaditá oblast (pH 8,0-10,0), kde aminoskupiny jsou protonované pouze částečně, karboxylové skupiny jsou plně disociované, analyty nesou negativní náboj a migrují jako anionty. Základní elektrolyty musí mít také dostatečnou pufrací kapacitu, aby byly schopné zajistit požadované pH v zóně putujícího analytu.

Na základě strategie pro racionální volbu experimentálních podmínek bylo testováno několik druhů BGE v kyselém i alkalickém pH: klasické pufrů (Tris/acetát, Tris/fosfát), koncentrované slabé kyseliny (kyselina octová) a izoelektrický BGE (kyselina iminodioctová) pro metodu CZE a výše uvedené BGE s přísávkou anionických (SDS) i kationických (CTAB) tensidů pro metodu MEKC. Složení a pH použitých BGE a separační napětí a proudy v těchto BGE jsou uvedeny v **tabulce 4**.

**Tabulka 4:** Přehled používaných základních elektrolytů.

Zkratka	Složení základního elektrolytu	pH	U (kV)	I (μA)
<b>BGE I</b>	500 mM kyselina octová	2,54	12	7,1
<b>BGE II</b>	100 mM TRIS; 50 mM kyselina octová	8,20	12	23,3
<b>BGE III</b>	20 mM TRIS; 5 mM kyselina fosforečná; 50 mM SDS	8,64	12	18,6
<b>BGE IV</b>	200 mM kyselina iminodioctová	2,28	12	35
<b>BGE V</b>	100 mM kyselina fosforečná; 50 mM TRIS	2,18	12	45
<b>BGE VI</b>	500 mM kyselina octová; 60 mM SDS	2,54	12	24
<b>BGE VII</b>	100 mM TRIS; 50 mM kyselina octová; 5 mM CTAB	8,20	12	23
<b>BGE VIII</b>	100 mM TRIS; 50 mM kyselina octová; 10 mM CTAB	8,20	12	23,5

### 7.1.2 Stanovení stupně čistoty

Deriváty DAP jsou prvně syntetizované a poprvé analyzované látky, tudíž nejsou dostupné odpovídající standardy a nelze tedy použít pro jejich kvantitativní a kvalitativní analýzu metodu kalibrační křivky nebo metodu standardního přídatku. Stupně čistoty byly kvantifikovány na základě vyhodnocení relativní korigované plochy píku,  $P_{CA}$ , podle vztahu:

$$P_{CA(i)} = \frac{A_{c,(i)}}{\sum_{i=1}^n A_{c,(i)}} \cdot 100 \quad (\%) \quad (14)$$

kde  $A_{c,(i)}$  je korigovaná plocha píku  $i$ -té složky daného preparátu a  $n$  je počet složek tohoto preparátu. Korigovaná plocha píku je plocha píku dělená migračním časem tohoto píku. Takto stanovený stupeň čistoty je pouze přibližný, neboť molární absorpční koeficienty jednotlivých složek ve vzorku se mohou lišit. Vzhledem k očekávané strukturální podobnosti příměsí a hlavních syntetických produktů lze však předpokládat i podobné hodnoty jejich molárních absorpčních koeficientů, a tudíž i relativně dobrý odhad stupně čistoty.



Analýza a určení stupně čistoty derivátů DAP byly provedeny metodou CZE v základních elektrolytech BGE I a BGE II a metodou MEKC v BGE III. Hodnoty  $P_{CA}$  se pohybovaly v rozmezí 90,8 ~ 100 %. V **tabulce 5** jsou shrnuty stupně čistoty pro všechny analyty, zjištěné ve vybraných základních elektrolytech (kyselý BGE I, zásaditý BGE II a s přidavkem SDS BGE III).

Příklady analýz vybraných derivátů DAP jsou znázorněny na **obrázku 6**. Pro srovnání jsou ukázány záznamy analýzy analytů E1 a C3 v jednotlivých elektrolytových systémech BGE I, BGE II a BGE III. Analyt E1 byl vyhodnocen vysokým stupněm čistoty (~ 100 %) ve všech třech použitých základních elektrolytech (viz **obrázek 6A, B, C**), u analytu C3 byla v BGE I a II nalezena jedna neidentifikovaná příměs (pík x) s pohyblivostí menší než je pohyblivost tohoto analytu a jeho stupeň čistoty byl vyhodnocen na 94,8 % v BGE I a na 94,1 % v BGE II, viz **obrázky 6D a 6E** a **tabulka 5**. Metodou MEKC v BGE III byly v preparátu tohoto analytu zjištěny tři neidentifikované minoritní příměsi  $x_1$ ,  $x_2$ ,  $x_3$  (viz **obrázek 6F**) a jeho stupeň čistoty dosáhl pouze 90,8 %.

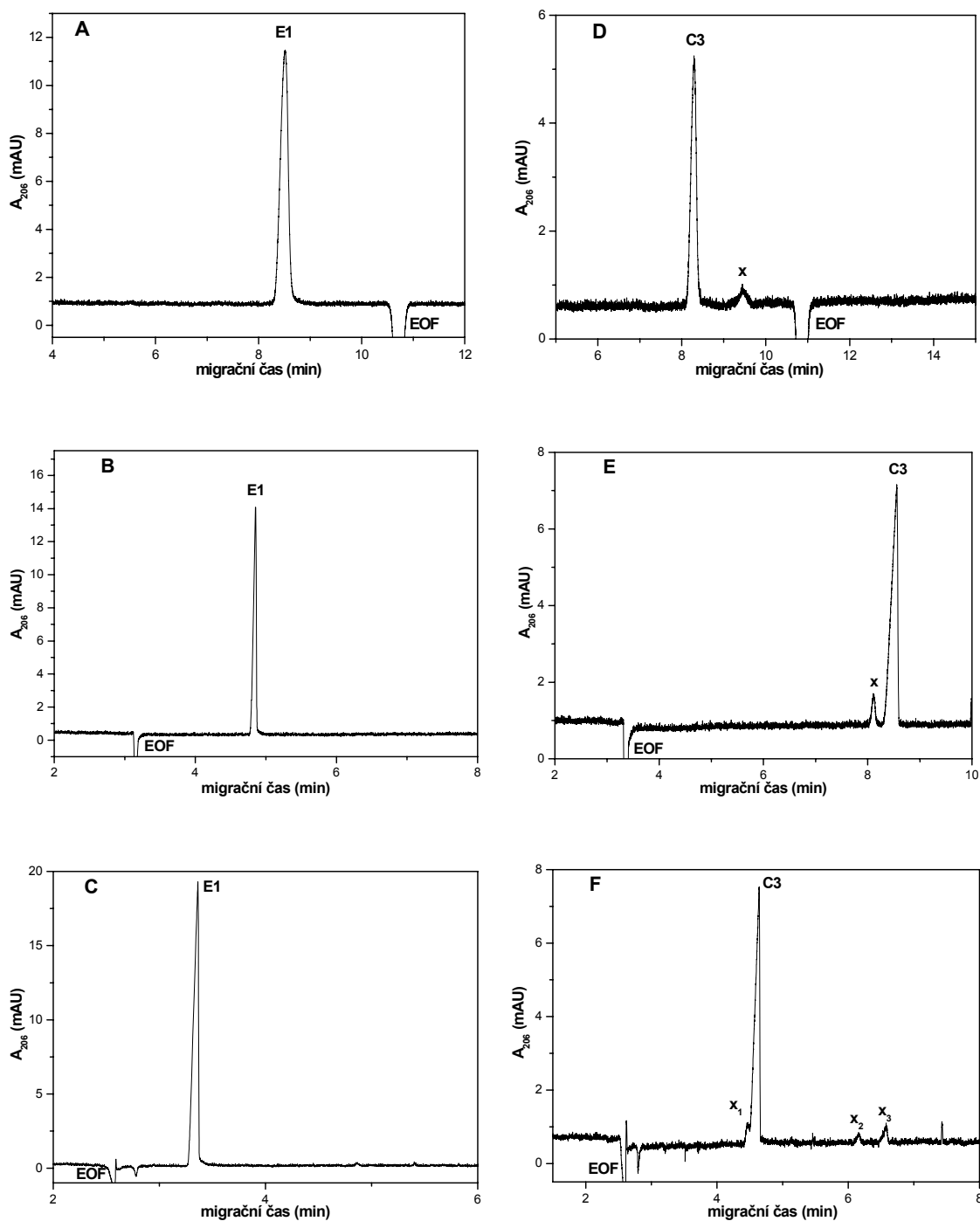
Z výsledků analýz je vidět, že se mohou vyskytovat rozdíly ve stupni čistoty v závislosti na použité metodě (CZE x MEKC) a zvoleném základním elektrolytu, což je dokumentováno i na **obrázku 7**. Analyt C4 vykazuje v BGE I vysoký stupeň čistoty (~100 %), ve zbylých dvou elektrolytech BGE II a III však byly nalezeny jedna resp. dvě minoritní příměsi a stupeň čistoty dosahoval pouze 97,1 resp. 95 %. U látky C1 byl metodou CZE v BGE I a II taky stanoven vysoký stupeň čistoty (~100 %), avšak metodou MEKC v BGE III byly v tomto preparátu objeveny dvě minoritní příměsi  $x_1$  a  $x_2$  a stupeň čistoty dosahoval pouze hodnoty 94,5 %.

Metoda MEKC v BGE III se tedy jeví pro dané analyty jako účinnější separační metoda než metoda CZE v BGE I a II, neboť byla schopna oddělit příměsi, které zůstávaly metodou CZE neodhalené.

**Tabulka 5:** Stupeň čistoty  $P_{CA}$  jednotlivých analytů vyjádřený relativní korigovanou plochou píku stanovený metodou CZE v BGE I a BGE II a metodou MEKC v BGE III.

Složení BGE viz **tabulka 4** a označení analytů viz **tabulka 3**.

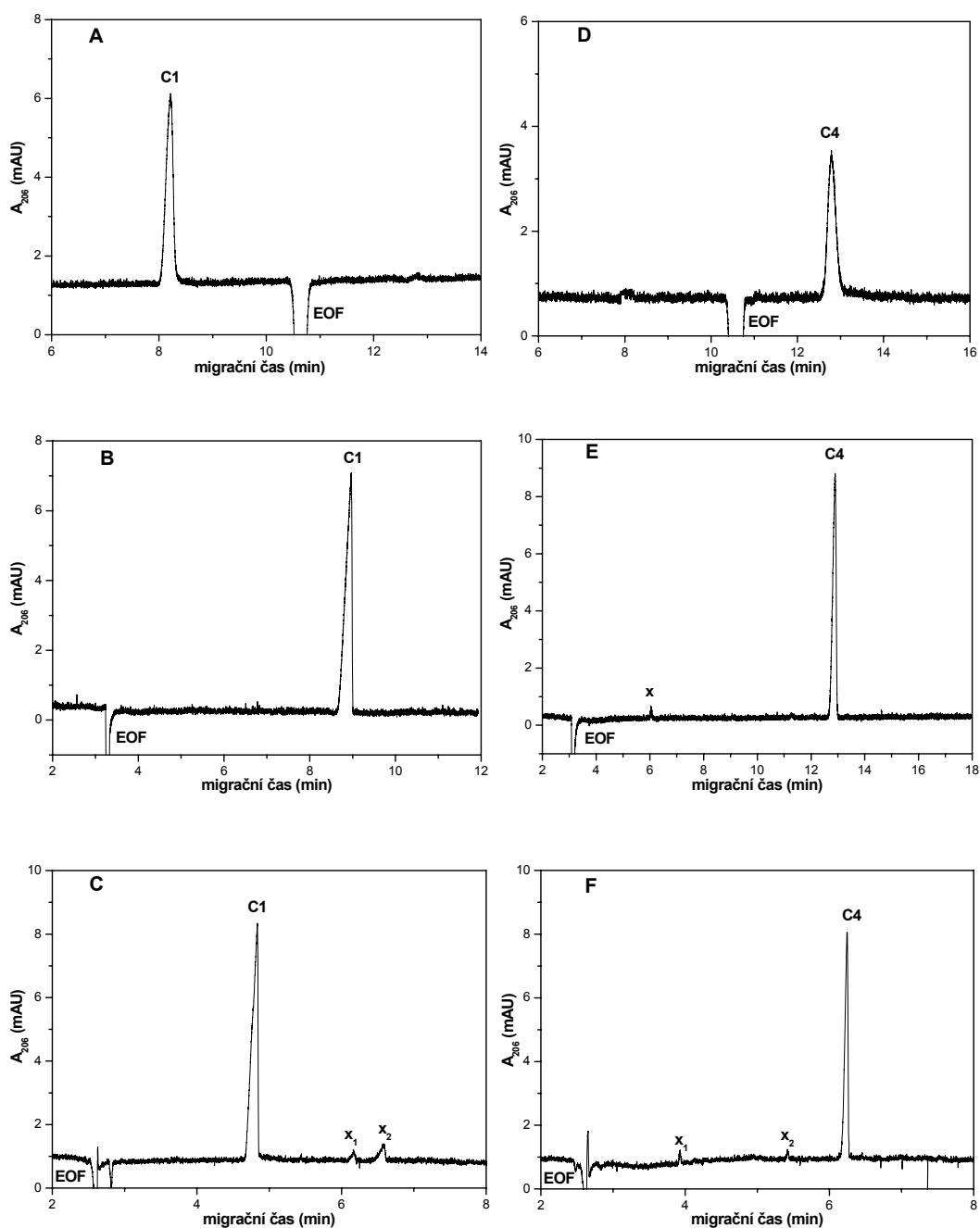
Analyt	$P_{CA}$ (%)		
	BGE I	BGE II	BGE III
<b>DAP</b>	~ 100	~ 100	~ 100
<b>A1</b>	94,5	93,6	93,7
<b>A2</b>	95,8	95,4	96,1
<b>A3</b>	96,6	97,1	97,0
<b>A4</b>	94,3	95,0	95,8
<b>A5</b>	95,6	96,5	95,6
<b>A6</b>	95,2	95,4	96,2
<b>E1</b>	~ 100	~ 100	~ 100
<b>E2</b>	94,3	91,4	95,1
<b>E3</b>	94,4	93,4	95,9
<b>C1</b>	~ 100	~ 100	94,5
<b>C2</b>	96,9	98,4	93,2
<b>C3</b>	94,8	94,1	90,8
<b>C4</b>	~ 100	97,1	95,0



**Obrázek 6:** Analýzy derivátů DAP (analytů E1 a C3) metodou CZE v BGE I a BGE II a metodou MEKC v BGE III.

(A) E1,  $c = 3,97$  mM, ( $P_{CA} \sim 100$  %) v BGE I; (B) E1,  $c = 3,97$  mM, ( $P_{CA} \sim 100$  %) v BGE II; (C) E1,  $c = 3,97$  mM, ( $P_{CA} \sim 100$  %) v BGE III; (D) C3,  $c = 3,91$  mM, ( $P_{CA} = 94,8$  %) v BGE I; (E) C3,  $c = 3,91$  mM, ( $P_{CA} = 94,1$  %) v BGE II; (F) C3,  $c = 3,91$  mM, ( $P_{CA} = 90,8$  %) v BGE III; x - neidentifikované minoritní příměsi;  $A_{206}$ , absorpance při vlnové délce 206 nm; dávkování 10 mbar, 5 s

Složení BGE viz **tabulka 4** a označení analytů viz **tabulka 3**, ostatní experimentální podmínky viz kapitola 6.3.



**Obrázek 7:** Analýzy derivátů DAP (analytů C1 a C4) metodou CZE v BGE I a BGE II a metodou MEKC v BGE III.

(A) C1,  $c = 4,11$  mM, ( $P_{CA} \sim 100$  %) v BGE I; (B) C1,  $c = 4,11$  mM, ( $P_{CA} \sim 100$  %) v BGE II; (C) C1,  $c = 4,11$  mM, ( $P_{CA} = 94,5$  %) v BGE III; (D) C4,  $c = 3,59$  mM, ( $P_{CA} \sim 100$  %) v BGE I; (E) C4,  $c = 3,59$  mM, ( $P_{CA} = 97,1\%$ ) v BGE II; (F) C4,  $c = 3,59$  mM, ( $P_{CA} = 95,0\%$ ) v BGE III; x - neidentifikované minoritní příměsi;  $A_{206}$ , absorbance při vlnové délce 206 nm; dávkování 10 mbar, 5 s

Složení BGE viz **tabulka 4** a označení analytů viz **tabulka 3**, ostatní experimentální podmínky

viz kapitola 6.3.

### 7.1.3 Stanovení meze detekce a meze stanovitelnosti

Citlivost analýz v CE je závislá na typu použitého detektoru. Pro detekci měřených látek byl používán UV-fotometrický detektor při emisní vlnové délce 206 nm. Parametry detektoru jako je šum, odezva detektoru, poměr signál/šum, citlivost, mez detekce a mez stanovitelnosti byly určeny pro všechny vzorky metodou CZE v BGE I a BGE II a pomocí MEKC v BGE III. Pro srovnání je v **tabulkách 6, 7 a 8** přidána k derivátům DAP i samotná kyselina 2,6-diaminopimelová. Koncentrace analytů byly přepočítány na efektivní koncentraci,  $c_{ef}$ , podle hodnot stupňů čistoty určených v kapitole 7.1.2. S efektivní koncentrací bylo počítáno v dalších parametrech.

Citlivost detektoru,  $S_D$ , byla vyjádřena podle vztahu:

$$S_D = \frac{R_D}{c} \quad (15)$$

kde  $R_D$  je napěťová odezva detektoru (V),  $c$  je koncentrace analytu ( $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ). Limit detekce  $LOD$  a limit stanovitelnosti  $LOQ$  jsou podle vztahů

$$LOD = 3 \frac{n}{S_D} \quad (16)$$

$$LOQ = 10 \frac{n}{S_D} \quad (17)$$

kde  $n$  je šum (V) a  $S_D$  je citlivost detektoru ( $\text{V}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{dm}^3$ ).

Z porovnání jednotlivých parametrů u BGE I – BGE III viz **tabulky 6, 7 a 8** je vidět, že největší citlivosti detektoru je dosaženo u většiny analytů v BGE III (20 mM TRIS; 5 mM kyselina fosforečná; 50 mM SDS) z důvodu, že tento elektrolyt neabsorbuje v UV oblasti záření a naopak nejmenší citlivost se jeví u analýz v relativně silně absorbujícím elektrolytu BGE I (500 mM kyselina octová).

Porovnání hodnot  $LOD$  a  $LOQ$  u DAP a derivátů DAP je uvedeno v **tabulkách 6, 7 a 8**. Podle předpokladu nejnižší hodnoty  $LOD$  i  $LOQ$  byly určeny pro analyt A6, který

ve své struktuře obsahuje aromatickou skupinu a naopak nejvyšší hodnoty pro kyselinu 2,6-diaminopimelovou, která obsahuje pouze dvě karboxylové skupiny, avšak neobsahuje žádnou amidovou vazbu.

**Tabulka 6:** Charakteristiky detektoru stanovené při analýze DAP a derivátů DAP metodou CZE v BGE I.

<b>Analyt</b>	<b><i>c</i></b> (mmol·dm <sup>-3</sup> )	<b><i>c<sub>ef</sub></i></b> (mmol·dm <sup>-3</sup> )	<b><i>R<sub>D</sub></i></b> (mV)	<b><i>R<sub>D</sub>/n</i>*</b> (-)	<b><i>S<sub>D</sub></i></b> (V·mol <sup>-1</sup> ·dm <sup>3</sup> )	<b><i>LOD</i></b> (mmol·dm <sup>-3</sup> )	<b><i>LOQ</i></b> (mmol·dm <sup>-3</sup> )
<b>DAP</b>	7,10	7,10	15,12	7,56	2,13	2,80	9,39
<b>A1</b>	5,80	5,48	49,75	24,28	9,08	0,66	2,20
<b>A2</b>	3,84	3,68	40,20	20,10	10,92	0,55	1,83
<b>A3</b>	5,19	5,01	72,03	36,02	14,38	0,42	1,39
<b>A4</b>	4,19	3,95	48,86	24,43	12,37	0,49	1,62
<b>A5</b>	4,74	4,53	47,49	23,75	10,48	0,57	1,91
<b>A6</b>	4,40	4,19	165,67	82,84	39,54	0,15	0,51
<b>E1</b>	3,97	3,97	118,57	59,29	29,87	0,20	0,67
<b>E2</b>	4,93	4,65	58,30	29,15	12,54	0,48	1,59
<b>E3</b>	4,40	4,15	49,43	24,72	11,91	0,50	1,68
<b>C1</b>	4,11	4,11	54,26	27,13	13,20	0,45	1,51
<b>C2</b>	3,93	3,81	50,73	25,37	13,32	0,45	1,50
<b>C3</b>	3,91	3,71	53,70	26,85	14,47	0,41	1,38
<b>C4</b>	3,59	3,59	31,16	15,58	8,67	0,69	2,30

\**n* ~ 2 mV

**Tabulka 7:** Charakteristiky detektoru stanovené při analýze DAP a derivátů DAP metodou CZE v BGE II.

<b>Analyt</b>	<b><i>c</i></b> (mmol·dm <sup>-3</sup> )	<b><i>c<sub>ef</sub></i></b> (mmol·dm <sup>-3</sup> )	<b><i>R<sub>D</sub></i></b> (mV)	<b><i>R<sub>D</sub>/n</i>*</b> (-)	<b><i>S<sub>D</sub></i></b> (V·mol <sup>-1</sup> ·dm <sup>3</sup> )	<b><i>LOD</i></b> (mmol·dm <sup>-3</sup> )	<b><i>LOQ</i></b> (mmol·dm <sup>-3</sup> )
<b>DAP</b>	7,10	7,10	20,01	10,01	2,82	2,13	7,09
<b>A1</b>	5,80	5,43	79,04	39,52	14,56	0,41	1,37
<b>A2</b>	3,84	3,66	67,41	33,71	18,42	0,33	1,09
<b>A3</b>	5,19	5,04	94,85	47,43	18,82	0,32	1,06
<b>A4</b>	4,19	3,98	63,61	31,81	15,98	0,38	1,25
<b>A5</b>	4,74	4,57	65,24	32,62	14,28	0,42	1,40
<b>A6</b>	4,40	4,20	147,71	73,86	35,17	0,17	0,57
<b>E1</b>	3,97	3,97	144,42	72,21	36,38	0,17	0,55
<b>E2</b>	4,93	4,51	105,31	52,66	23,35	0,26	0,86
<b>E3</b>	4,40	4,11	60,35	30,18	14,68	0,41	1,36
<b>C1</b>	4,11	4,11	89,72	44,86	21,83	0,28	0,92
<b>C2</b>	3,93	3,88	61,19	30,60	15,77	0,38	1,26
<b>C3</b>	3,91	3,68	67,10	33,55	18,23	0,33	1,10

<b>C4</b>	3,59	3,49	90,85	45,43	26,03	0,23	0,77
-----------	------	------	-------	-------	-------	------	------

\* $n \sim 2$  mV

**Tabulka 8:** Charakteristiky detektoru stanovené při analýze DAP a derivátů DAP metodou MEKC v BGE III.

<b>Analyt</b>	<b><math>c</math></b> (mmol·dm <sup>-3</sup> )	<b><math>c_{ef}</math></b> (mmol·dm <sup>-3</sup> )	<b><math>R_D</math></b> (mV)	<b><math>R_D/n</math> *</b> (-)	<b><math>S_D</math></b> (V·mol <sup>-1</sup> ·dm <sup>3</sup> )	<b><math>LOD</math></b> (mmol·dm <sup>-3</sup> )	<b><math>LOQ</math></b> (mmol·dm <sup>-3</sup> )
<b>DAP</b>	7,10	7,10	37,85	18,93	5,33	1,13	3,75
<b>A1</b>	5,80	5,44	107,93	53,97	19,84	0,30	1,01
<b>A2</b>	3,84	3,69	81,80	40,90	22,17	0,27	0,90
<b>A3</b>	5,19	5,03	109,42	54,71	21,75	0,28	0,92
<b>A4</b>	4,19	4,01	90,68	45,34	22,61	0,27	0,89
<b>A5</b>	4,74	4,53	93,86	46,93	20,72	0,29	0,97
<b>A6</b>	4,40	4,23	352,63	176,32	83,36	0,07	0,24
<b>E1</b>	3,97	3,97	217,5	108,75	54,79	0,11	0,37
<b>E2</b>	4,93	4,69	98,50	49,25	21,00	0,29	0,95
<b>E3</b>	4,40	4,22	98,33	49,17	23,30	0,26	0,86
<b>C1</b>	4,11	3,88	97,16	48,58	25,04	0,24	0,80
<b>C2</b>	3,93	3,66	86,12	43,06	23,53	0,26	0,85
<b>C3</b>	3,91	3,55	90,41	45,21	25,47	0,24	0,79
<b>C4</b>	3,59	3,41	86,25	43,13	25,29	0,24	0,79

\* $n \sim 2$  mV

## 7.2 Charakterizace derivátů DAP

### 7.2.1 Korekce efektivních elektroforetických pohyblivostí na referenční teplotu 25 °C

Přístroj, na kterém byly měřeny všechny analýzy, nedisponuje aktivním chlazením kapiláry tzn. měření byla prováděna při aktuální laboratorní teplotě. Z důvodu proměnlivých teplot během dne u jednotlivých měření a kvůli tvorbě Jouleova tepla v kapiláře bylo potřeba vypočítané elektroforetické pohyblivosti daných látek pro jejich vzájemné porovnávání zpřesnit přepočítáním na referenční teplotu 25 °C.

Pomocí 20 mM vodného roztoku chloridu draselného byl proměřen elektrický proud při širokém rozsahu vloženého napětí při jinak stejných experimentálních podmínkách jako při ostatních CE experimentech. Přírůstek teploty,  $\Delta T$ , (rozdíl teploty uvnitř kapiláry a okolní teploty) byl vypočítán ze změn elektrického odporu,  $R$ , při určitém příkonu vkládaném na kapiláru podle vztahu:

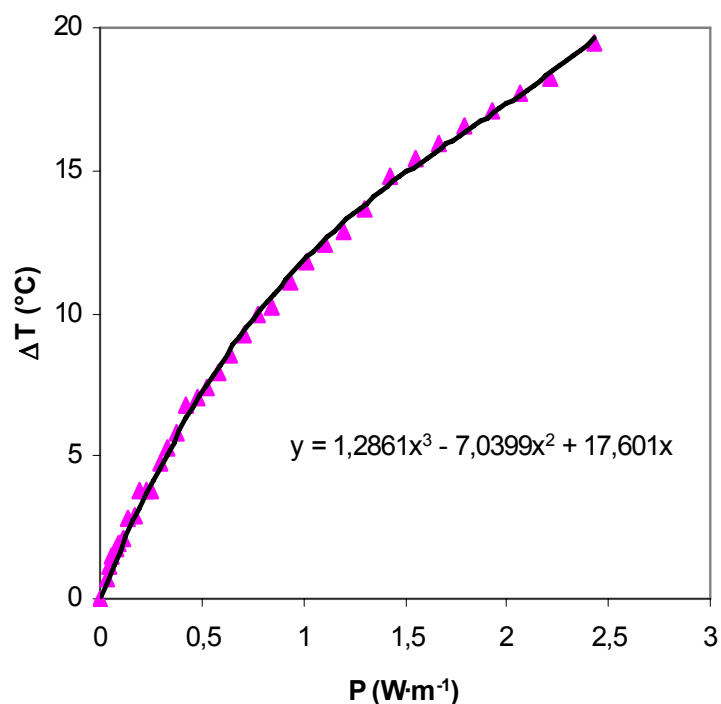
$$\Delta T = \frac{R_0 - R}{0,02R} \quad (18)$$

kde  $R_0$  je odpor při nízkém příkonu, kdy zvýšení teploty se může zanedbat,  $R$  je odpor při daném příkonu. Z příkonu vkládaného na kapiláru a jemu odpovídajícímu přírůstku teploty je sestaven graf (**obrázek 8**). Dosazením hodnot příkonu do regresní rovnice této závislosti je vypočítán přírůstek teploty pro dané CE experimentální podmínky a hodnota je využita ve vztahu pro výpočet efektivních elektroforetických pohyblivostí,  $m_{eff,25}$ , vztažených k referenční teplotě s nárůstem efektivní pohyblivosti o 2 % na 1 °C podle vztahu:

$$m_{eff,25} = m_{eff,T_i} [1 - 0,020(T_0 + \Delta T - 25)] \quad (19)$$

kde  $m_{eff,25}$  je efektivní elektroforetická pohyblivost při 25 °C,  $m_{eff,T_i}$  je efektivní elektroforetická pohyblivost při aktuální teplotě experimentu,  $T_0$  je okolní teplota během analýzy a  $\Delta T$  je rozdíl teplot uvnitř kapiláry oproti okolí [78].





**Obrázek 8:** Graf závislosti nárůstu teploty uvnitř kapiláry na elektrickém příkonu vztaženém na jednotku délky kapiláry.

### 7.2.2 Stanovení efektivní elektroforetické pohyblivosti

Všechny analyzované deriváty DAP byly charakterizovány efektivní elektroforetickou pohyblivostí, která byla vypočtena z experimentálně naměřených údajů podle následujícího vztahu:

$$m_{eff,i} = \left( \frac{1}{t_{mig,i}} - \frac{1}{t_{eof}} \right) \cdot \frac{L_{eff} \cdot L_{tot}}{U} \quad (20)$$

kde  $t_{mig,i}$  je migrační čas daného analytu (s),  $t_{eof}$  je migrační čas elektroosmotického toku (s),  $L_{eff}$  je délka kapiláry k detektoru (m),  $L_{tot}$  celková délka kapiláry (m) a  $U$  je vložené napětí (V). Vypočítané hodnoty byly přepočítané na efektivní pohyblivosti při 25 °C viz kapitola 7.2.1. Tato korekce je velice důležitá pro případné pozdější analýzy těchto látek na přístrojích jiného typu. Efektivní elektroforetické pohyblivosti v elektrolytech BGE I - BGE VIII jsou uvedeny v **tabulce 9**. Údaje jsou průměrnými hodnotami ze dvou naměřených hodnot, které se nelišily více než o 0,03 - 0,8 %.

**Tabulka 9:** Efektivní elektroforetické pohyblivosti korigované na referenční teplotu 25 °C,  $m_{\text{eff},25}$ , derivátů DAP stanovené metodou CZE v BGE I, II, IV a V a metodou MEKC v BGE III, VI, VII a VIII.

Analyt	$m_{\text{eff},25} \cdot 10^9 \text{ (m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}\text{)}$							
	BGE I	BGE II	BGE III	BGE IV	BGE V	BGE VI	BGE VII	BGE VIII
A1	4,7	-15,7	-14,2	7,3	8,5	-9,2	-14,2	-13,0
A2	5,0	-14,8	-13,6	7,0	8,3	-9,1	-11,9	-10,8
A3	4,8	-14,6	-13,2	7,0	7,8	-16,6	-11,8	-10,0
A4	5,0	-14,5	-12,7	6,9	7,7	-16,5	-9,3	-6,8
A5	4,7	-13,9	-12,2	6,7	7,9	-17,8	-8,7	-6,1
A6	4,4	-13,9	-11,4	6,6	7,6	-17,6	-1,2	4,9
E1	3,5	-14,0	-11,1	6,0	8,1	-21,7	-0,7	-7,5
E2	4,1	-14,3	-12,1	6,7	7,3	-23,1	-9,4	-9,4
E3	4,9	-13,6	-11,7	6,9	7,7	-23,0	-11,5	-9,1
C1	4,1	-25,2	-23,2	6,3	7,9	-25,7	-18,9	-10,5
C2	4,3	-24,0	-23,6	6,3	7,0	-16,0	-15,3	-7,4
C3	4,3	-23,3	-22,9	6,2	7,4	-16,2	-12,3	-7,4
C4	-2,4	-30,4	-29,6	~ 0	7,4	-19,2	-8,3	~ 0
					-10,3	-18,9	28,0	28,6

Kationické efektivní elektroforetické pohyblivosti určené metodou CZE v **BGE I** (0,5 M kyselina octová, pH 2,54) byly poměrně malé z důvodu kompenzace kladně nabitě amino skupiny *N*-acyl derivátů částečně záporným nábojem dvou až tří karboxylových skupin. V případě derivátu C4 se v důsledku přítomnosti čtyř atomů fluoru v postranním řetězci acylu stala karboxylová skupiny natolik silnou kyselinou, že byla i v tomto kyselém pH silně disociována, výsledný náboj tohoto derivátu byl záporný a analyt se pohyboval jako aniont, tedy za markerem EOF, a jeho pohyblivost byla také záporná.

V zásaditém prostředí při analýze metodou CZE v **BGE II** (100 mM TRIS; 50 mM kyselina octová, pH 8,2) se všechny analyty chovaly jako anionty. Deriváty A1–A6 a E1–E3 si byly z hlediska poměrů nábojů a velikosti strukturně podobné a z toho vyplývaly i podobné efektivní elektroforetické pohyblivosti. Analyty C1–C4 obsahovaly ve své struktuře acyl s další volnou karboxylovou skupinou (kromě dvou karboxylů samotné DAP), záporný náboj tohoto volného karboxylu se projevil zvýšenou anionickou pohyblivostí těchto. U C4 je vyšší anionická pohyblivost oproti ostatním strukturně podobným derivátům ještě patrnější.

Podobně je tomu i u metody MEKC v **BGE III** (20 mM TRIS; 5 mM kyselina fosforečná; 50 mM SDS, pH 8,64), kde deriváty A1–A6 a E1–E3 vykazovaly anionickou pohyblivost v rozmezí  $-11,1$  až  $-14,2 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ . Efektivní elektroforetické pohyblivosti u C1–C4 se v důsledku volné karboxylové skupiny pohybovaly od  $-22,9$  do  $-29,6 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ .

Pro **BGE IV** (200 mM kyselina iminodioctová, pH 2,28) a **BGE V** (100 mM kyselina fosforečná; 50 mM TRIS, pH 2,18) byly pozorovány podobné závislosti pohyblivosti analytů na jejich struktuře jako u BGE I, kromě toho oba tyto základní elektrolyty mají nižší pH než BGE I, což vede k většímu náboji analytů a k větším elektroforetickým pohyblivostem.

Metodou MEKC v kyselém **BGE VI** (500 mM kyselina octová; 60 mM SDS pH 2,54) docházelo v důsledku komplexace kladně nabitých analytů s výrazně záporně nabitými micelami dodecylsulfátu sodného k tvorbě záporně nabitého komplexu analyt-micela. Rozdíly v efektivních elektroforetických pohyblivostech mezi jednotlivými deriváty byly dány hydrofobicitou a vlastním nábojem analytu.

U **BGE VII** (100 mM TRIS; 50 mM kyselina octová; 5 mM CTAB, pH 8,2) a **BGE VIII** (100 mM TRIS; 50 mM kyselina octová; 10 mM CTAB, pH 8,2) byl

vzhledem k jejich pH výsledný náboj analytů záporný. Jinak je tomu opět jen u derivátu C4, u kterého se vytvořil komplex s CTAB natolik silný, že převládl výrazný kladný náboj nesený micelami CTAB. U BGE VIII došlo ke snížení absolutních hodnot pohyblivostí, což je způsobeno pevnějším komplexem záporně nabitých analytů s kladně nabitými micelami CTAB.

Při syntéze derivátů DAP byla používána směs enantiomerů a diastereomerů kyseliny 2,6-diaminopimelové a vzniklé deriváty byly směsí dvou diastereomerních forem. Tyto formy se ve většině případů nelišily svými efektivními elektroforetickými pohyblivostmi, migrovaly ve směsné zóně a poskytovaly jeden pík. V některých případech však docházelo alespoň k částečnému rozdělení těchto forem a to metodou CZE v kyselém elektrolytu BGE V, metodou MEKC v BGE VI a BGE VII.

### 7.3 Separace derivátů DAP

Základní elektrolyty používané pro separaci derivátů DAP byly vybrány na základě zjištěných hodnot z předešlých analýz jednotlivých derivátů. Elektroforetické pohyblivosti derivátů se strukturálně podobným acylem, stanovené metodou CZE byly velmi podobné, což pro separaci není vhodné. Původní záměr provést separaci v režimu CZE i MEKC byl proto změněn a separace směsí derivátů DAP byly prováděny pouze metodou MEKC v kyselých i alkalických BGE s přidavkem anionického i kationického tensidu.

Rozdělení analytů do směsí bylo provedeno na základě podobnosti chemické struktury acylu (**tabulka 10**). Byly vytvořeny čtyři skupiny směsí: směs 1 byla vytvořena z látek A1, A2, A3 obsahujících alifatický acyl, směs 2 z analytů A4, A5, s alifatickým acylem a látky A6 obsahující aromatický acyl, směs 3 tvořily deriváty s acyly obsahujícími esterifikovanou karboxylovou skupinu a směs 4 se skládala z derivátů obsahujících v acylu volnou karboxylovou skupinu.

**Tabulka 10:** Rozdělení jednotlivých analytů do dílčích směsí.

Směs		Analyty		
1	A1	A2	A3	
2	A4	A5	A6	
3	E1	E2	E3	
4	C1	C2	C3	C4

Separace derivátů DAP byla uskutečněna v kyselém, zásaditém i izoelektrickém elektrolytu s přidavkem povrchově aktivního tenzidu k vytvoření micelární pseudofáze a v některých případech pro možnost zajištění lepší separační účinnosti a selektivity ještě s přidavkem organického modifikátoru.

Separace s přidavkem tenzidu byla provedena v několika základních elektrolytech:

s anionickým tenzidem (20-80 mM) SDS v:

- 20 mM TRIS; 5 mM kyselina fosforečná, pH 8,64
- 200 mM kyselina iminodioctová, pH 2,28
- 2 M kyselina octová, pH 2,18
- 500 mM kyselina octová, pH 2,54

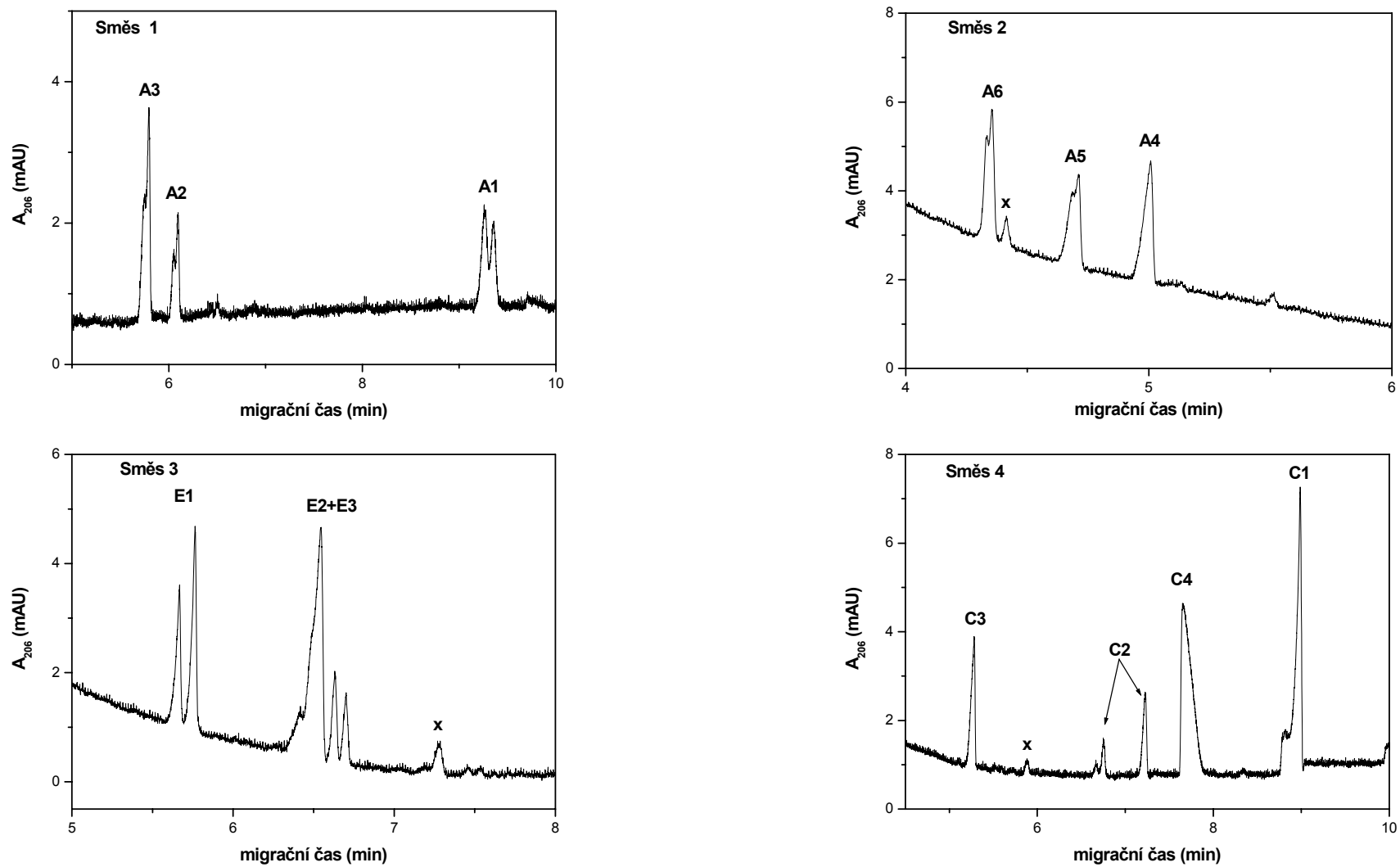
s kationickým tenzidem (5-10 mM) CTAB v:

- 100 mM TRIS; 50 mM kyselina octová, pH 8,20
- 500 mM kyselina octová, pH 2,54

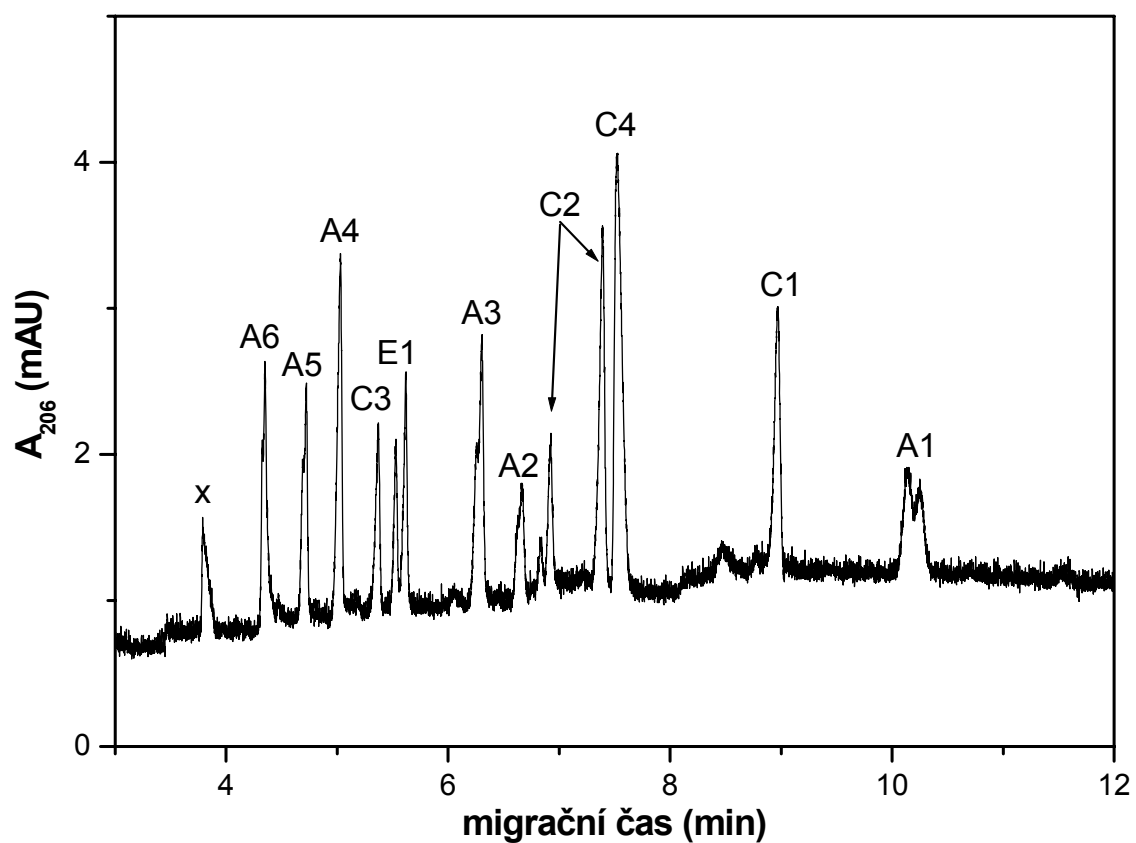
Nejlépejší separační podmínky byly nalezeny v 500 mM kyselině octové s přidavkem 60 mM SDS. Na **obrázku 9** je znázorněna separace, kde ve směsi 1; 2; a 4 došlo k úplné separaci všech látek, u směsi 3 je derivát E1 úplně oddělen a deriváty E2 s E3 se překrývají. Bylo zkoušeno i přidání organických modifikátorů, ale požadované separace dvou nerozdělených analytů stejně dosaženo nebylo. V 500 mM kyselině octové byla zkoušena i koncentrace SDS 40 a 80 mM, ale 60 mM SDS se zdála být optimální koncentrací pro tuto separaci. V tomto systému se nám u některých analytů také objevuje efekt dělení diastereoizomerů, který byl pozorován už u BGE V (100 mM kyselina

fosforečná; 50 mM TRIS, pH 2,18) při charakterizaci jednotlivých derivátů.

Tyto optimální podmínky byly použity i pro celkovou separaci směsi 11 derivátů DAP (**obrázek 10**). Vynechány byly analyty E2 a E3, které se nepodařilo rozdělit v žádném z námi použitých BGE. Celkové separace bylo dosaženo v relativně krátké době (11 min).



**Obrázek 9:** MEKC separace jednotlivých směsí derivátů DAP v 0,5 M kyselině octové s 60 mM SDS.  
 x - neidentifikované minoritní příměsi;  $A_{206}$ , absorbance při vlnové délce 206 nm; dávkování 10 mbar, 5 s  
 Složení BGE viz **tabulka 4** a označení analytů viz **tabulka 3**, ostatní experimentální podmínky viz kapitola 6.3.



**Obrázek 10:** Separace 11 derivátů DAP v 500 mM kyselině octové s 60 mM SDS.

x - neidentifikované minoritní příměsi;  $A_{206}$ , absorbance při vlnové délce 206 nm; dávkování 10 mbar, 5 s

Složení BGE viz **tabulka 4** a označení analytů viz kapitola **tabulka 3**, ostatní experimentální podmínky viz 6.3.



## 8 Závěr

Experimentálně získané výsledky v této diplomové práci dokazují, že kapilární zónová elektroforéza (CZE) a micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC) jsou vhodnými metodami pro analýzu a fyzikálně-chemickou charakterizaci aminokyselin a jejich derivátů.

Metodami CZE a MEKC byla provedena kvalitativní analýza stanovovaných analytů. Zahrnovala určení chemické čistoty nově syntetizovaných *N*-acyl derivátů kyseliny 2,6-diaminopimelové (DAP) pomocí relativních korigovaných ploch píků a stanovení meze detekce a meze stanovitelnosti UV-fotometrického detektoru, který byl součástí CE analyzátoru sestrojeného na ÚOCHB AV ČR.

Taktéž metodami CZE a MEKC byly *N*-acyl deriváty DAP charakterizovány efektivními elektroforetickými pohyblivostmi v několika základních elektrolytech v kyselé i alkalické oblasti pH. Změřené elektroforetické pohyblivosti byly korigovány na referenční teplotu 25 °C.

Pro separaci strukturně velmi podobných *N*-acyl derivátů DAP metodou MEKC byl hledán vhodný základní elektrolyt. Separace byly provedeny v kyselých i alkalických základních elektrolytech, a to s přidavkem jak anionického tenzidu dodecylsulfátu sodného (SDS), tak i kationického tenzidu cetyltrimethylamoniumbromidu (CTAB). Nejlepší podmínky separace *N*-acyl derivátů DAP byly nalezeny v kyselém základním elektrolytu (500 mM kyselina octová, pH 2,54) s přidavkem anionického tenzidu SDS o koncentraci 60 mM.

## Použitá literatura

- [1] Landers, J. P. *Handbook of Capillary and Microchip Electrophoresis and Associated Microtechnics*. Boca Raton, CRC Press 2008
- [2] Tiselius, A.: A new apparatus for electrophoretic analysis of colloidal mixtures. *Transactions of the Faraday Society* **33**: 524-531 (1937).
- [3] Hjerten, S.: Free Zone Electrophoresis - Preliminary Note. *Arkiv for Kemi* **13**:1-2, 151-152 (1958).
- [4] Hjerten, S.: Free zone electrophoresis. *Chromatographic Reviews* **9**:2, 122-219 (1967).
- [5] Virtanen, R.: Zone Electrophoresis in A Narrow-Bore Tube Employing Potentiometric Detection - Theoretical and Experimental Study. *Acta Polytechnica Scandinavica-Chemical Technology Series* 123, 1-67 (1974).
- [6] Jorgenson, J. W.; Lukacs, K. D.: Zone electrophoresis in open-tubular glass-capillaries. *Analytical Chemistry* **53**:8, 1298-1302 (1981).
- [7] Jorgenson, J. W.; Lukacs, K. D.: Capillary zone electrophoresis. *Science* **222**:4621, 266-272 (1983).
- [8] Everaerts, F. M.; Beckers, J. L.; Verheggen, T. P. E. M.: *Isotachophoresis - Theory, Instrumentation and Applications*. Amsterdam, Elsevier 1976.
- [9] Hjerten, S.; Zhu, M.-D.: Adaptation of the equipment for high-performance electrophoresis to isoelectric focusing. *Journal of Chromatography* **346**: 265-270 (1985).
- [10] Terabe, S.; Otsuka, K.; Ichikawa, K.; Tsuchiya, A.; Ando, T.: Electrokinetic separations with micellar solutions and open- tubular capillaries. *Analytical Chemistry* **56**:1, 111-113 (1984).
- [11] Terabe, S.; Otsuka, K.; Ando, T.: Electrokinetic chromatography with micellar solution and open- tubular capillary. *Analytical Chemistry* **57**:4, 834-841 (1985).
- [12] Jorgenson, J. W.; Lukacs, K. D.: High-resolution separations based on electrophoresis and electroosmosis. *Journal of Chromatography* **218**:1-3, 209-216 (1981).
- [13] Tsuda, T.; Nomura, K.; Nakagawa, G.: Open-tubular microcapillary liquid-chromatography with electroosmosis flow using a uv detector. *Journal of Chromatography* **248**:2, 241-247 (1982).
- [14] Stevenson, R.: A critical review of the development of HPCE instrumentation. *Journal of Capillary Electrophoresis* **1**:2, 169-174 (1994).
- [15] Kašička, V.: Theoretical bases and separation principles of capillary electromigration methods. *Chemické Listy* **91**:5, 320-329 (1997).

- [16] Pacáková, V.; Coufal, P.; Štulík, K.; Gaš, B.: The importance of capillary electrophoresis, capillary electrochromatography, and ion chromatography in separations of inorganic ions. *Electrophoresis* **24**:12-13, 1883-1891 (2003).
- [17] Tanyanyiwa, J.; Abad-Villar, E. M.; Hauser, P. C.: Contactless conductivity detection of selected organic ions in on-chip electrophoresis. *Electrophoresis* **25**:6, 903-908 (2004).
- [18] Ramautar, R.; Somsen, G. W.; de Jong, G. J.: Direct sample injection for capillary electrophoretic determination of organic acids in cerebrospinal fluid. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **387**:1, 293-301 (2007).
- [19] Coufal, P.; Zuska, J.; van de Goor, T.; Smith, V.; Gas, B.: Separation of twenty underivatized essential amino acids by capillary zone electrophoresis with contactless conductivity detection. *Electrophoresis* **24**:4, 671-677 (2003).
- [20] Kašička, V.: Recent developments in CE and CEC of peptides. *Electrophoresis* **29**:1, 179-206 (2008).
- [21] Poinot, V.; Gavard, P.; Feurer, B.; Couderc, F.: Recent advances in amino acid analysis by CE. *Electrophoresis* **31**:1, 105-121 (2010).
- [22] Kašička, V.: Recent advances in CE and CEC of peptides (2007-2009). *Electrophoresis* **31**:1, 122-146 (2010).
- [23] Dolnik, V.: Capillary electrophoresis of proteins 2005-2007. *Electrophoresis* **29**:1, 143-156 (2008).
- [24] El Rassi, Z.: Electrophoretic and electrochromatographic separation of proteins in capillaries: An update covering 2007-2009. *Electrophoresis* **31**:1, 174-191 (2010).
- [25] Volpi, N.; Maccari, F.; Linhardt, R. J.: Capillary electrophoresis of complex natural polysaccharides. *Electrophoresis* **29**:15, 3095-3106 (2008).
- [26] Hert, D. G.; Fredlake, C. P.; Barron, A. E.: Advantages and limitations of next-generation sequencing technologies: A comparison of electrophoresis and non-electrophoresis methods. *Electrophoresis* **29**:23, 4618-4626 (2008).
- [27] Forster, R. E.; Hert, D. G.; Chiesl, T. N.; Fredlake, C. P.; Barron, A. E.: DNA migration mechanism analyses for applications in capillary and microchip electrophoresis. *Electrophoresis* **30**:12, 2014-2024 (2009).
- [28] Godde, R.; Akkad, D. A.; Arning, L.; Dekomien, G.; Herchenbach, J.; Kunstmann, E.; Meins, M.; Wiczorek, S.; Epplen, J. T.; Hoffjan, S.: Electrophoresis of DNA in human genetic diagnostics - state-of-the-art, alternatives and future prospects. *Electrophoresis* **27**:5-6, 939-946 (2006).
- [29] Fonslow, B. R.; Yates, J. R.: Capillary electrophoresis applied to proteomic analysis. *Journal of Separation Science* **32**:8, 1175-1188 (2009).
- [30] Herrero, M.; Ibanez, E.; Cifuentes, A.: Capillary electrophoresis-electrospray-

- mass spectrometry in peptide analysis and peptidomics. *Electrophoresis* **29**:10, 2148-2160 (2008).
- [31] Kraly, J. R.; Holcomb, R. E.; Guan, Q.; Henry, C. S.: Review: Microfluidic applications in metabolomics and metabolic profiling. *Analytica Chimica Acta* **653**:1, 23-35 (2009).
- [32] Ramautar, R.; Somsen, G. W.; de Jong, G. J.: CE-MS in metabolomics. *Electrophoresis* **30**:1, 276-291 (2009).
- [33] Issaq, H. J.; Abbott, E.; Veenstra, T. D.: Utility of separation science in metabolomic studies. *Journal of Separation Science* **31**:11, 1936-1947 (2008).
- [34] Rodriguez, M. A.; Armstrong, D. W.: Separation and analysis of colloidal/nano-particles including microorganisms by capillary electrophoresis: a fundamental review. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **800**:1-2, 7-25 (2004).
- [35] Simonet, B. M.; Ríos, A.; Valcárcel, M.: Capillary Electrophoresis Separation of Microorganisms. In *Capillary Electrophoresis: Methods and Protocols*; Schmitt-Kopplin, P. (ed.). Munchen, Germany: Humana Press, 2008, p. 569-590.
- [36] Petr, J.; Rýparová, O.; Ranc, V.; Hinnerová, P.; Znaleziona, J.; Kowalska, M.; Knob, R.; Maier, V.; Frébort, I.; Lemr, K.; Ševčík, J.: Assessment of CE for the identification of microorganisms. *Electrophoresis* **30**:3, 444-449 (2009).
- [37] Whiting, C. E.; Arriaga, E. A.: CE-LIF analysis of mitochondria using uncoated and dynamically coated capillaries. *Electrophoresis* **27**:22, 4523-4531 (2006).
- [38] Chen, Y.; Xiong, G.; Arriaga, E. A.: CE analysis of the acidic organelles of a single cell. *Electrophoresis* **28**:14, 2406-2415 (2007).
- [39] Johnson, R. D.; Navratil, M.; Poe, B. G.; Xiong, G. H.; Olson, K. J.; Ahmadzadeh, H.; Andreyev, D.; Duffy, C. F.; Arriaga, E. A.: Analysis of mitochondria isolated from single cells. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **387**:1, 107-118 (2007).
- [40] *High-Performance Capillary Electrophoresis: Theory, Techniques, and Applications*. New York, John Wiley&Sons Inc. 1998.
- [41] Chankvetadze, B.: *Capillary Electrophoresis in Chiral Analysis*. New York, John Wiley & Sons 1997.
- [42] Kvasničková, L.; Glatz, Z.; Kahle, V.: Capillary electrochromatography. *Chemické Listy* **97**:2, 86-92 (2003).
- [43] Boček, P.: Analytical capillary electrophoresis. In *Advanced Instrumental Methods of Chemical Analysis*. Churáček, J. (ed.). Praha: Academia, 1993, p. 97-141.

- [44] Foret, F.; Křivánková, L.; Boček, P.: *Capillary Zone Electrophoresis*. Weinheim, Verlag Chemie 1993.
- [45] Heiger, D. N.: *High Performance Capillary Electrophoresis*. Waldbronn, Hewlett-Packard Company 1992.
- [46] Altria, K. D.: Overview of capillary electrophoresis and capillary electrochromatography. *Journal of Chromatography A* **856**:1-2, 443-463 (1999).
- [47] Lunn, G.; Hellwig, L. C.: *Handbook of Derivatization Reactions for HPLC*. New York, Wiley-Interscience 1998.
- [48] Zhang, J. Z.; Chen, D. Y.; Wu, S.; Harke, H. R.; Dovichi, N. J.: High-Sensitivity Laser-Induced Fluorescence Detection for Capillary Electrophoresis. *Clinical Chemistry* **37**:9, 1492-1496 (1991).
- [49] Scriba, G. K. E.; Psurek, A.: Separation of peptides by capillary electrophoresis. In *Capillary Electrophoresis*. Schmitt-Kopplin, P. (ed.). Totowa, NJ: Humana Press Inc., 2008, p. 483-506.
- [50] Moini, M.: Capillary electrophoresis mass spectrometry and its application to the analysis of biological mixtures. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **373**:6, 466-480 (2002).
- [51] Wang, J.; Chen, G.; Chatrathi, M. P.; Musameh, M.: Capillary electrophoresis microchip with a carbon nanotube-modified electrochemical detector. *Analytical Chemistry* **76**:2, 298-302 (2004).
- [52] Wallingford, R. A.; Ewing, A. G.: Amperometric detection of catechols in capillary zone electrophoresis with normal and micellar solutions. *Analytical Chemistry* **60**: 258-263 (1988).
- [53] Foret, F.; Deml, M.; Kahle, V.; Boček, P.: Online fiber optic UV detection cell and conductivity cell for capillary zone electrophoresis. *Electrophoresis* **7**:9, 430-432 (1986).
- [54] Waldhier, M. C.; Gruber, M. A.; Dettmer, K.; Oefner, P. J.: Capillary electrophoresis and column chromatography in biomedical chiral amino acid analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **394**:3, 695-706 (2009).
- [55] Perez-Ruiz, T.; Martinez-Lozano, C.; Galera, R.: Development and validation of a capillary electrophoresis method with laser-induced fluorescence detection for the determination of captopril in human urine and pharmaceutical preparations. *Electrophoresis* **27**:12, 2310-2316 (2006).
- [56] Kubacák, P.; Mikus, P.; Valásková, I.; Havránek, E.: Simultaneous determination of essential basic amino acids in pharmaceuticals by capillary isotachopheresis. *Archiv der Pharmazie* **339**:2, 96-99 (2006).

- [57] Jaworska, M.; Szulinska, Z.; Wilk, M.: Development of a capillary electrophoretic method for the analysis of amino acids containing tablets. *Journal of Chromatography A* **993**:1-2, 165-172 (2003).
- [58] Zhang, L.; Liu, Y. H.; Chen, G. N.: Simultaneous determination of allantoin, choline and L-arginine in Rhizoma Dioscoreae by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A* **1043**:2, 317-321 (2004).
- [59] Sekar, R.; Azhaguvel, S.: Indirect photometric assay determination of gabapentin in bulk drug and capsules by capillary electrophoresis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **36**:3, 663-667 (2004).
- [60] Fabre, H.; Perrin, C.; Bosc, N.: Determination of homotaurine as impurity in calcium acamprosate by capillary zone electrophoresis. *Journal of Chromatography A* **853**:1-2, 421-430 (1999).
- [61] Jaworska, M.; Szulinska, G.; Wilk, M.; Tautt, J.: Capillary electrophoretic separation of N-acetylcysteine and its impurities as a method for quality control of pharmaceuticals. *Journal of Chromatography A* **853**:1-2, 479-485 (1999).
- [62] Mayboroda, O. A.; Neuss, C.; Pelzing, M.; Zurek, G.; Derks, R.; Meulenbelt, I.; Kloppenburg, M.; Slagboom, E. P.; Deelder, A. M.: Amino acid profiling in urine by capillary zone electrophoresis - mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1159**:1-2, 149-153 (2007).
- [63] Zunic, G.; Spasic, S.: Capillary electrophoresis method optimized with a factorial design for the determination of glutathione and amino acid status using human capillary blood. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **873**:1, 70-76 (2008).
- [64] Tůma, P.; Samcová, E.; Andělová, K.: Determination of free amino acids and related compounds in amniotic fluid by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **839**:1-2, 12-18 (2006).
- [65] Pobozy, E.; Czarkowska, W.; Trojanowicz, M.: Determination of amino acids in saliva using capillary electrophoresis with fluorimetric detection. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* **67**:1, 37-47 (2006).
- [66] Wang, C. L.; Zhao, S. L.; Yuan, H. Y.; Xiao, D.: Determination of excitatory amino acids in biological fluids by capillary electrophoresis with optical fiber light-emitting diode induced fluorescence detection. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **833**:2, 129-134 (2006).
- [67] Deng, Y. H.; Wang, H.; Zhang, H. S.: Determination of amino acid neurotransmitters in human cerebrospinal fluid and saliva by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *Journal of Separation Science* **31**:16-17, 3088-3097 (2008).

- [68] Klinker, C. C.; Bowser, M. T.: 4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole as a fluorogenic labeling reagent for the in vivo analysis of amino acid neurotransmitters using online microdialysis-capillary electrophoresis. *Analytical Chemistry* **79**:22, 8747-8754 (2007).
- [69] Shama, N.; Bai, S. W.; Chung, B. C.; Jung, B. H.: Quantitative analysis of 17 amino acids in the connective tissue of patients with pelvic organ prolapse using capillary electrophoresis-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **865**:1-2, 18-24 (2008).
- [70] Shi, B. X.; Huang, W. H.; Cheng, J. K.: Analysis of amino acids in human vascular endothelial (ECV-304) cells by microchip electrophoresis with fluorescence detection. *Journal of Separation Science* **31**:6-7, 1144-1150 (2008).
- [71] Hsieh, M. M.; Chen, S. M.: Determination of amino acids in tea leaves and beverages using capillary electrophoresis with light-emitting diode-induced fluorescence detection. *Talanta* **73**:2, 326-331 (2007).
- [72] Kubec, R.; Dadáková, E.: Quantitative determination of S-alk(en)ylcysteine-S-oxides by micellar electrokinetic capillary chromatography. *Journal of Chromatography A* **1212**:1-2, 154-157 (2008).
- [73] Trapp, G.; Sydow, K.; Dulay, M. T.; Chou, T.; Cooke, J. P.; Zare, R. N.: Capillary electrophoretic and micellar electrokinetic separations of asymmetric dimethyl-L-arginine and structurally related amino acids: Quantitation in human plasma. *Journal of Separation Science* **27**:17-18, 1483-1490 (2004).
- [74] Vaněk, V.; Pícha, J.; Buděšínský, M.; Šanda, M.; Jiráček, J.; Holz, R. C.; Hlaváček, J.: Synthesis of *N*-Succinyl-L,L-Diaminopimelic Acid Mimetics Via Selective Protection. *Protein and Peptide Letters* **17**:3, 405-409 (2010).
- [75] Cox, R. J.; Sutherland, A.; Vederas, J. C.: Bacterial diaminopimelate metabolism as a target for antibiotic design. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **8**:5, 843-871 (2000).
- [76] Born, T. L.; Blanchard, J. S.: Structure/function studies on enzymes in the diaminopimelate pathway of bacterial cell wall biosynthesis. *Current Opinion in Chemical Biology* **3**:5, 607-613 (1999).
- [77] Kašička, V.; Prusík, Z.; Sázelová, P.; Brynda, E.; Stejskal, J.: Capillary zone electrophoresis with electroosmotic flow controlled by external radial electric field. *Electrophoresis* **20**:12, 2484-2492 (1999).
- [78] Ehala, S.; Dybal, J.; Makrlík, E.; Kasicka, V.: Application of capillary affinity electrophoresis and density functional theory to the investigation of valinomycin-lithium complex. *Journal of Chromatography A* **1216**:17, 3660-3665 (2009).