

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra analytické chemie

Elektromigrační a chromatografické metody analýzy
kvartérních amoniových sloučenin

DIPLOMOVÁ PRÁCE

(REŠERŠE)

Vedoucí diplomové práce: Doc. RNDr. Miroslav Polášek, CSc.

Vedoucí katedry: Prof. RNDr. Petr Solich, CSc.

Hradec Králové 2011

Jana Kunzová

Tuto diplomovou práci jsem vypracovala samostatně na základě informací získaných ze zdrojů uvedených v seznamu použité literatury. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Současně bych tímto chtěla poděkovat Doc. RNDr. Miroslavu Poláškov, CSc. a PharmDr. Pavlu Jáčovi za rady a doporučení, které přispěly ke vzniku této práce.

Jana Kunzová

Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Kandidát: Jana Kunzová

Školitel: Doc. RNDr. Miroslav Polášek, CSc.

Název diplomové práce: Elektromigrační a chromatografické metody analýzy
kvartérních amoniových sloučenin

Kvartérní amoniové sloučeniny jsou látky široce používané v různých oblastech života. Používají se jako tenzidy, pesticidy, herbicidy, léčiva, desinfekční látky nebo jako součást kosmetických přípravků. Jde o látky s velmi rozmanitou strukturou. Rozsáhlé používání těchto látek vedlo k rozvoji analytických metod zaměřených na jejich monitorování v potravinách, životním prostředí, odpadních vodách, biologických vzorcích apod.

Tato rešeršní práce je zaměřena na elektromigrační a chromatografické metody používané pro analýzu těchto látek. Současně práce umožňuje srovnání obou metod, jejich výhody a nevýhody. Informace byly čerpány z literatury publikované v letech 1995 – 2010. K vyhledávání literatury byly použity databáze ScienceDirect a PubMed.

Abstract

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Analytical Chemistry

Candidate: Jana Kunzová

Supervisor: Doc. RNDr. Miroslav Polášek, CSc.

Title of the diploma thesis: Electro-migration and chromatographic methods of analysis
of quaternary ammonium compounds

Quaternary ammonium compounds are widely used in different spheres of life. They are employed as surfactants, pesticides, herbicides, drugs, disinfectants or components of cosmetic products. These compounds have miscellaneous structures. Wide application of these compounds requires development of analytical methods for their monitoring in foods, environment, sewage water, biological samples etc.

This essay presents an overview of published electro-migration and chromatographic methods of analysis of quaternary ammonium compounds. Simultaneously this review allows to compare both methods, their advantages and disadvantages. Relevant information was obtained from literature published in the years 1995 – 2010. The literature search was realized through the ScienceDirect and PubMed databases.

Seznam použitých zkratek

ABDAC	alkylbenzyl dimethyl amoniové sloučeniny (alkylbenzyl dimethyl ammonium compounds)
ACN	acetonitril
AO	alkyldimethylamin N-oxid
APAO	alkylamidopropylamin N-oxid
APB	alkylamidopropylbetain
ATMAC	alkyltrimethylamonium chlorid
BAB	benzalkonium bromid
BAC	benzalkonium chlorid
BDMAC	dodecylbenzyl dimethylamonium chlorid
BGE	základní elektrolyt (Background Electrolyte)
Bt	alkylbetain
BTMAB	benzyltrimethylamonium bromid
BTMAC	benzyltrimethylamonium chlorid
C ⁴ D	bezkontaktní vodivostní detektor (Capacitively Coupled Contactless Conductivity Detector)
CD	cyklodextrin
CD	konduktometrická detekce
CE	kapilární elektroforéza (Capillary Electrophoresis)
CF-FAB	bombardování proudem rychlých atomů (Continuous Flow Fast Atom Bombardement)
CIETMA	2-(chloroethyl)trimethylamonium
CMC	kritická micelární koncentrace (Critical Micelle Concentration)
CPC	cetylpyridinium chlorid
CQ	chlormequat
CTAB, CTMA	cetyltrimethylamonium bromid
CTAC	cetyltrimethylamonium chlorid
DAC	diallylcaracurin
DAD	detektor diodového pole (Diode Array Detector)
DADMAC	dialkyldimethylamonium chlorid
DDAB	didodecyl dimethylamonium bromid

DF	difenzoquat
DQ	diquat
DQC	dequalinium chlorid
DTMA	dodecyltrimethylamonium chlorid
DVB	divinylbenzen
ELSD	Evaporative Light Scattering Detector
EOF	elektroosmotický tok (Electroosmotic Flow)
ESI	ionizace elektrosprejem
GC	plynová chromatografie (Gas Chromatography)
HDAS- β -CD	haptakis-(2,6-O-diacetyl-6-sulfo)- β -cyklodextrin
HFBA	heptafluoromáselná kyselina (heptafluorobutyric acid)
HILIC	Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography)
HP- γ -CD	2-hydroxypropyl- γ -cyklodextrin
CHES	2-[N-cyklohexyloamino]-ethylsírová kyselina
i. d.	vnitřní průměr (iner diameter)
ISP	ionsprej
ITP	izotachoforéza
IUV	nepřímá UV detekce (indirect UV)
LC	kapalinová chromatografie (Liquid Chromatography)
LIF	laserem indukovaná fluorescence
LLE	extrakce kapalina – kapalina (Liquid-Liquid Extraction)
LOD	limit detekce (Limit of Detection)
LPME	Hollow-Fiber Liquid-Phase Microextraction
MALDI	Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization
MEKC	micelární elektrokinetická kapilární chromatografie
MF	mobilní fáze
MIC	minimální inhibiční koncentrace
MQ	mepiquat
MS	hmotnostní spektrometrie (Mass Spectrometry)
MSA	methansulfonová kyselina
PAD	pulzní amperometrická detekce
PD	plasma desorption

PM	pancuronium
PP	1-(4-pyridyl)pyridinium
PQ	paraquat
PSSS	poly(sodium-4-styrenesulfát)
PVA	polyvinylalkohol
RI	refrakterní index
RP-HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie na reverzních fázích
RSD	relativní směrodatná odchylka (Relative Standard Deviation)
SDS	dodecylsírán sodný
SF	stacionární fáze
SPE	extrakce na pevné fázi (Solid Phase Extraction)
STMA	stearyltrimethylamonium chlorid
TBA	tetrabutylamonium
TDDBA	tetradecyldimethylbenzylamonium
TEA	tetraethylamonium
THA	tetrahexylamonium
THF	tetrahydrofuran
TLC	chromatografie na tenké vrstvě (Thin Layer Chromatography)
TMA	trimethylamonium
TPA	tetrapropylamonium
TTAB	tetradecyltrimethylamonium bromid
UPLC	Ultra Performance Liquid Chromatography
VM	vecuronium
WGA	Weland-Gumlich-aldehyd

Obsah

1	Cíl a popis zadání práce	9
2	Kvartérní amoniové soli.....	10
2.1	Charakteristika	10
3	Kapilární elektroforéza	13
3.1	Princip metody	13
3.1.1	Instrumentace.....	13
3.1.2	Separace	14
3.2	Separční přístupy v CE.....	20
3.2.1	Organická rozpouštědla	20
3.2.2	Cyklodextriny	24
3.2.3	Modifikace kapiláry.....	28
3.2.4	Vliv pH	28
3.2.5	Iontové kapaliny	29
3.3	Možnosti detekce	30
3.3.1	Přímá UV detekce.....	31
3.3.2	Nepřímá UV detekce	36
3.3.3	Elektrochemická detekce	38
3.3.4	Hmotnostní spektrometrie (MS).....	42
4	Kapalinová chromatografie.....	47
4.1	Princip metody	47
4.1.1	Instrumentace.....	47
4.1.2	Separace	50
4.2	Separční přístupy v HPLC.....	51
4.2.1	Separční módy.....	51
4.2.2	Stacionární fáze.....	56
4.2.3	Extrakce	59
4.3	Možnosti detekce	61
5	Závěrečné srovnání CE a HPLC	65
6	Shrnutí závěrů práce	67
7	Literatura.....	68

1 Cíl a popis zadání práce

Kvartérní amoniové sloučeniny jsou látky široce používané v různých oblastech života. Používají se jako průmyslové tenzidy, pesticidy, herbicidy, léčiva, desinfekční látky nebo jako součást kosmetických přípravků. Jde o látky s velmi rozmanitou strukturou, jež jsou charakteristické tím, že jejich molekula nese permanentní kladný náboj. Vzhledem k potenciální i prokázané biologické aktivitě těchto látek jsou neustále rozvíjeny analytické metody zaměřené na stanovení jejich obsahu v léčivých přípravcích a také k monitorování jejich přítomnosti v potravinách, životním prostředí, odpadních vodách, biologických vzorcích apod.

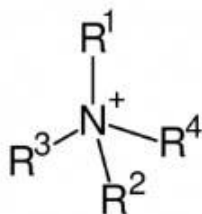
Cílem této diplomové práce je vytvořit komentovaný přehled elektromigračních a chromatografických metod používaných pro analýzu těchto látek v posledních patnácti letech na základě informací čerpaných z databází ScienceDirect a PubMed.

2 Kvartérní amoniové soli

2.1 Charakteristika

Jde o sloučeniny, které jsou velmi rozšířené v různých odvětvích průmyslu. V zemědělství se uplatňují jako herbicidy a pesticidy (mepiquat, paraquat, diquat, difenzoquat, chlormequat...). Díky svým antibakteriálním, antifugálním a antiseptickým účinkům (např. benzalkonium chlorid, cetylpyridinium bromid, tetraethylamonium bromid, didecyldimethylamonium chlorid...) jsou součástí desinfekčních prostředků, antiseptik (karbethodecinium bromid), kosmetických výrobků (pleťové vody) a farmaceutických produktů (oční nebo nosní kapky). Jako povrchově aktivní látky se uplatňují v pracích prostředcích, najdeme je také v avivážích, vlasových šamponech a kondicionérech, kde se využívá jejich antistatických účinků. Některé z nich jsou používány i jako léčiva - myorelaxancia (alcuronium, vecuronium, pancuronium, rocuronium...) nebo anticholinergika (otilonium bromid, ipratropium, mepenzolát...) [1, 2, 3].

Kvartérní amoniové sloučeniny jsou složeny z kvartérního amoniového kationtu a aniontu. Struktura těchto látek je velice různorodá. Charakteristická je přítomnost kvartérního dusíku, na kterém jsou navázány 4 uhlíkaté řetězce. Tyto řetězce mohou být i propojeny [3], viz obr. 1 [2]. Konkrétní příklady kvartérních amoniových solí a jejich struktura je zobrazena v tabulce 1.



Kde R^1 , R^2 , R^3 a R^4 jsou různě dlouhé uhlíkaté řetězce, které mezi sebou mohou být i propojeny

Obr. 1: Struktura kvartérního amoniového kationtu [2]

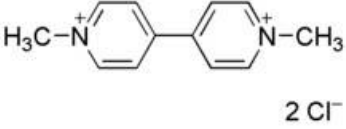

Přítomnost hydrofobních alkylových/arylových řetězců a hydrofilní části s nábojem ovlivňuje jejich chování ve vodných roztocích, kde vytváří od určité koncentrace micely. Tato vlastnost ovlivňuje jejich separaci.

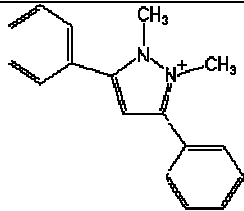
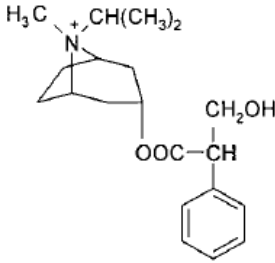
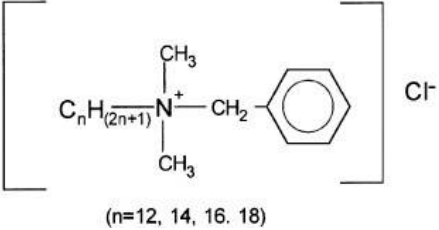
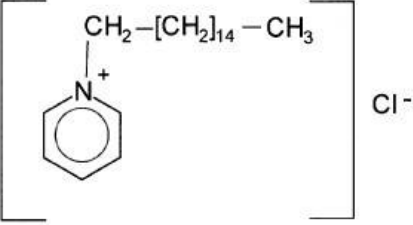
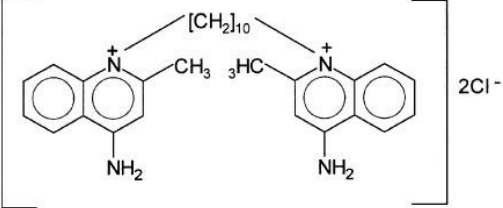
Díky tomu, že jsou tyto látky široce používány jak v běžném životě, tak v různých průmyslových odvětvích, je zapotřebí monitorovat jejich výskyt v životním prostředí, biologických vzorcích nebo potravinách. Jedním z důvodů monitorování je toxicita některých látek pro člověka nebo vodní organismy (cetyltrimethylamonium bromid, cetylpyridinium chlorid). To vedlo k rozvoji metod zaměřených na jejich analýzu [3].

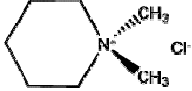
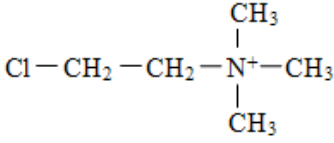
Existence permanentního kladného náboje na dusíku umožňuje stanovení těchto látek elektromigračními metodami. Používají se také chromatografické metody – vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC), plynová chromatografie (GC) nebo chromatografie na tenké vrstvě (TLC), přičemž využití plynové chromatografie je omezeno nedostatečnou těkavostí analytů (např. kationické tenzidy).

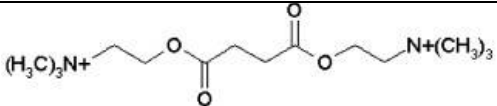
Dále bylo popsáno stanovení tohoto typu látek pomocí dvoufázové titrace [4], konduktometrie [5], potenciometrie nebo fotometrie [6]. Tato práce je zaměřena pouze na separační metody - kapilární elektroforézu a vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii.

Tabulka 1: Ukázka struktur vybraných kvartérních amoniových sloučenin

I. Aromatické kvartérní amoniové sloučeniny		
Struktura	Název	Citace
	Paraquat	[3]
	Diquat	[3]

	Difenzoquat	[3]
	Ipratropium	[3]
 <p style="text-align: center;">(n=12, 14, 16, 18)</p>	Benzalkonium chlorid (BAC)	[7]
	Cetylpyridinium chlorid	[7]
	Dequalinium chlorid	[7]

II. Alifatické a cyklické kvartérní amoniové sloučeniny		
Struktura	Název	Citace
	Mepiquat	[3]
	Chlormequat	[3]

	Suxamethonium	[8]
$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{R} - \text{N}^+ - \text{CH}_2 - \text{COO}^- \\ \\ \text{CH}_3 \\ \\ \text{R} = \text{C}_8 - \text{C}_{18} \end{array}$	Alkylbetain	[9]

3 Kapilární elektroforéza

3.1 Princip metody

Kapilární elektroforéza (CE) je elektromigrační separační technika, která umožňuje separaci nabitých částic v elektrickém poli. Patří mezi vysoce účinné a citlivé analytické separační metody. Účinnost metody dosahuje stovek tisíc až milionů teoretických pater a citlivost se pohybuje v rozmezí $10^{-15} - 10^{-21}$ mol analytu v nanolitrových objemech analyzovaného vzorku [10]. Díky těmto parametrům se tato metoda dostává do popředí a doplňuje tak chromatografii. Oproti HPLC je zde velmi malá spotřeba vzorků a chemikálií. Analýza je rychlá a vysoká separační účinnost dovoluje separaci homologů lišících se o jeden uhlík [11, 12].

3.1.1 Instrumentace

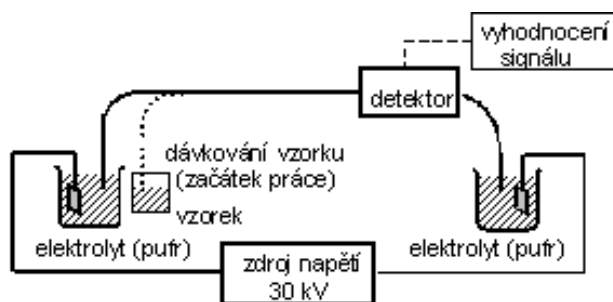
Separace probíhá nejčastěji v křemenné kapiláře. Její vnitřní průměr (i. d.) se pohybuje v rozmezí 50 – 100 μm , přičemž nejčastěji jsou použity kapiláry s i. d. 50 a 75 μm . Délka kapiláry se pak pohybuje v rozmezí 25 – 100 cm.

Kapilára je naplněna základním elektrolytem (Background Electrolyte BGE), ve kterém dochází k separaci částic. Konce kapiláry jsou společně s elektrodami z inertního materiálu (nejčastěji z platiny) ponořeny do zásobníků s puřem.

Dávkování vzorku (10 – 100 nl) může být realizováno několika způsoby a to:

- hydrodynamicky za použití tlaku (nejběžnější způsob) nebo na základě rozdílů hladin vzorku a pufru
- elektrokineticky, kdy působením nízkého napětí migrují molekuly analytu do kapiláry. Tento způsob je méně používaný. Problémem je odlišné složení vzorku před a po nadávkování, protože molekuly s vyšší pohyblivostí migrují do kapiláry více než molekuly o nižší pohyblivosti.

Separace analytů je zahájena vložení vysokého stejnosměrného napětí (10 – 30 kV). Vysoká napětí lze aplikovat díky dobrému odvodu Joulova tepla kapilární stěnou. Detekce separovaných zón analytů probíhá online. Data jsou vyhodnocena počítačem ve formě elektroforeogramu, který vyjadřuje závislost intenzity signálu detektoru na čase [13]. Kvalitativním ukazatelem je poloha maximální hodnoty signálu a kvantita analytu je vyjádřena výškou nebo plochou píku. Celá instrumentace je zobrazena na obrázku 2. [13]



Obr. 2: Instrumentace CE [13]

3.1.2 Separace

Separace iontů je založena na jejich rozdílné pohyblivosti v elektrickém poli. Rychlost migrace nabitých částic závisí na **intenzitě elektrického pole** a na **elektroforetické pohyblivosti** daného iontu (viz vztah 1) [14]. Čím je intenzita elektrického pole vyšší, tím rychleji se ionty pohybují. Elektroforetická pohyblivost pak vychází z analytických vlastností iontu a BGE (viz vztah 2) [14]:

- Viskozity BGE (s rostoucí viskozitou klesá rychlost migrace)

- b) Hustoty náboje na povrchu částic (čím je částice menší a čím má větší náboj, tím vyšší je elektroforetická pohyblivost)

Dále lze elektroforetickou pohyblivost ovlivnit modifikací BGE jako je změna pH, přidavek organického rozpouštědla nebo komplexotvorného činidla.

$$v = \mu_e E \quad (1)$$

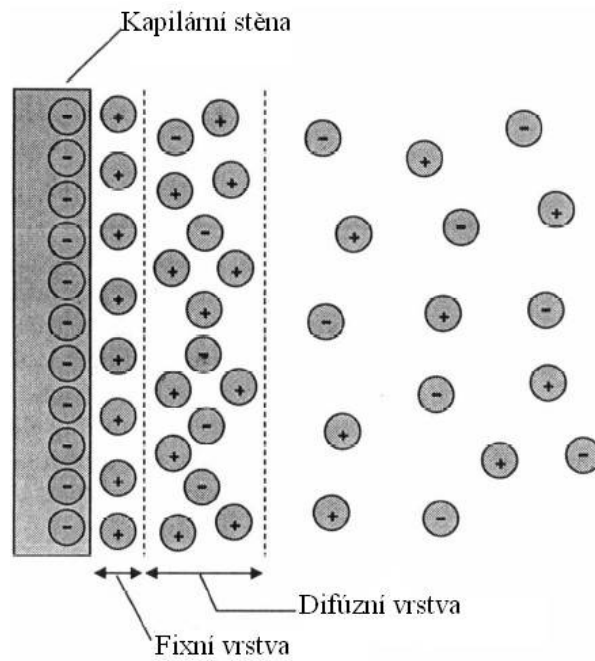
Kde v je rychlost migrace (ms^{-1}), μ_e je elektroforetická pohyblivost ($\text{m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$) a E je intenzita elektrického pole (Vm^{-1}).

$$\mu_e = \frac{q}{6\pi\eta r} \quad (2)$$

Kde μ_e je elektroforetická pohyblivost ($\text{m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$) při jednotkové intenzitě elektrického pole, q je náboj iontu, r je poloměr a η je viskozita.

3.1.2.1 Elektroosmotický tok

Hybnou silou, která umožňuje separovat anionty a kationty během jedné analýzy, je **elektroosmotický tok** (EOF). Podstatou tohoto jevu je skutečnost, že při pH základního elektrolytu vyšším než 2 dochází k ionizaci silanolových skupin křemenné kapiláry. Tím získává stěna záporný náboj a dochází tak k interakci s kladně nabitými ionty v elektrolytu. Kromě této fixní vrstvy tvořené adsorbovanými kationty je zde přítomna i difúzní vrstva tvořená kationty, které pochází ze středu kapiláry. Vzniká tak elektrická dvojvrstva – **Sternova dvojvrstva** (obr. 3 [14]). Mezi fixní a difúzní vrstvou se vytváří elektrokinetický potenciál – **zeta potenciál** ζ . Vztah mezi zeta potenciálem a pohyblivostí EOF vyjadřuje vztah 3 [13].



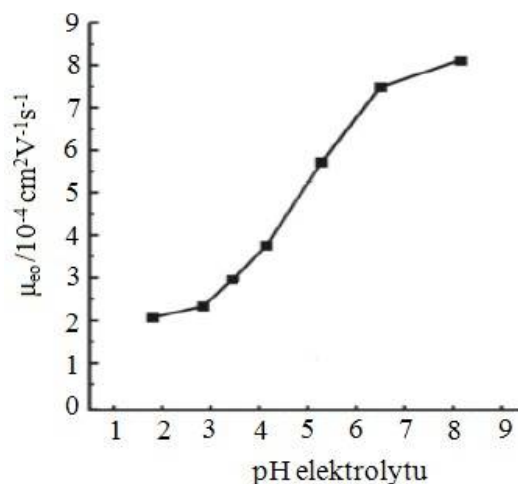
Obr. 3: Znárodnění Sternovy dvojvrstvy [14]

$$\mu_{eo} = \frac{\varepsilon \zeta}{4\pi \eta r} \quad (3)$$

Kde μ_{eo} je pohyblivost EOF, ε je permitivita BGE, η je viskozita BGE, r je poloměr kapiláry a ζ je zeta potenciál.

Síla EOF je ovlivněna následujícími faktory [14]:

- a) vliv pH BGE (je ovlivněn stupeň disociace silanolových skupin a tím i ζ potenciál, viz obr. 4 [15])
- b) teplota – má vliv na viskozitu BGE, s rostoucí teplotou roste rychlost EOF
- c) napětí
- d) koncentrace BGE – s rostoucí koncentrací klesá EOF

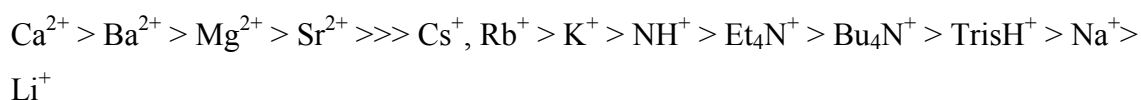


Obr. 4: Graf závislosti EOF na pH základního elektrolytu. Do pH 4 dochází jen k mírné disociaci silanolových skupin a síla EOF je tak nejnižší. Při pH 9 je ionizace nejvyšší a tím i síla EOF. Převzato a upraveno z [15].

Po vložení napětí je zahájena separace a kationty i anionty migrují ke katodě. Je to dáno vysokým stupněm hydratace kationtů, které svým pohybem zapříčiní tok (elektroosmotický tok) celého pufru ke katodě [10, 13, 14]. Pořadí migrujících analytů je tedy následující: kationty, neutrální látky unášené EOF a anionty.

Modifikací BGE a podmínek separace lze potlačit, zpomalit nebo otočit směr EOF. **Potlačení EOF** je docíleno separací při pH 2, nedochází totiž k ionizaci silanolových skupin. V rozmezí pH 2 – 3 je ale elektroosmotický tok špatně reprodukovatelný (relativní směrodatná odchylka RSD > 5%) a jeho hodnoty se liší mezi jednotlivými křemennými kapilárami [16].

Při analýze proteinů, ale i aniontů se může provést derivatizace vnitřní stěny kapiláry a tím změnit její náboj. Nevýhodou derivatizace je však zdlouhavost celého procesu, je možné pracovat jen v omezeném rozsahu pH a také je zde možnost nereprodukovatelnosti výsledků mezi kapilárami. Z tohoto důvodu se používají spíše dynamické potahy kapilár. Jako modifikátory se používají ionty kovů, alkylamoniové ionty, alkylaminy, kationické polymery nebo tenzidy. Tyto látky interagují se silanolovými skupinami a jsou s nimi v rovnováze. Následkem interakce je snížení zeta potenciálu a **zpomalení EOF**. Vliv iontů na velikost EOF klesá v řadě:



- Ionty kovů

Největší vliv mají tedy dvoumocné ionty kovů, přičemž nejpoužívanější jsou ionty Mg^{2+} , a to díky své dobré rozpustnosti v pufrch a výraznému zpomalení EOF hlavně při vyšším pH (např. při použití 2 mM Mg^{2+} , Tris pufru při pH 8 je $\mu_{\text{eo}} = 2 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$ a při použití 2 mM Mg^{2+} , amoniakálního pufru pH 10 je $\mu_{\text{eo}} = 1,5 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$). Nevýhoda použití iontů kovů je možnost precipitace s vysoce nabitými analyty nebo složkami pufru.

- Kationické polymery

Použitím kationických polymerů je dosaženo **otočení EOF**. Znamená to tedy, že ionty migrují od katody k anodě a to v opačném pořadí než bez přídavku modifikátorů (anionty, neutrální látky, kationty). Toho se využívá např. při separaci aniontů, kdy je dosaženo rychlejší analýzy.

Mezi používané polymery patří diethylaminoethyl dextran nebo polybren. Např. přídavkem 0,001% polybrenu do 5 mM chromátového pufru s 20 % acetonitrilem bylo dosaženo během 40 sekund separace 6 anorganických aniontů a účinnost dosahovala 1 500 000 teoretických pater. Přídavkem polymerů do pufru může docházet také k nežádoucím interakcím s některými analyty. Doba analýzy je tak prodloužena a píky jsou rozmyté [16].

Whitesides a spol. použili semipermanentní polymerní potah kapiláry, kde přebytek neadsorbovaných polymerů byl před zahájením analýzy vymyt. V tomto případě nejde o skutečný dynamický povlak, protože zde není ustálená rovnováha mezi silanolovými skupinami. Povlak je málo stabilní, a proto musí být po nějakém počtu analýz obnoven. Pro analýzu aniontů se proto tyto modifikátory používají omezeně [16].

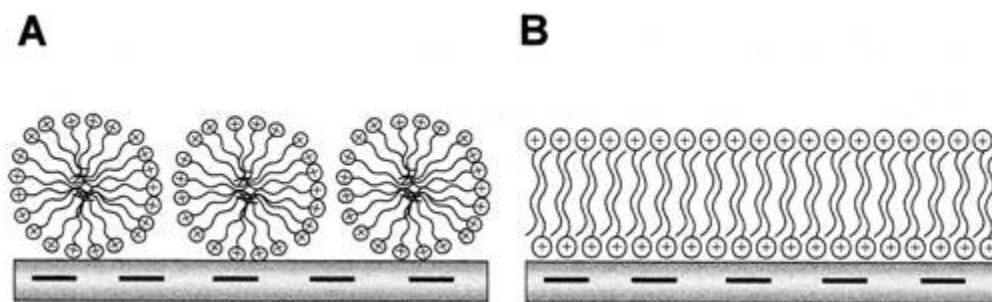
- Kationické tenzidy

Představitelem tohoto typu látek jsou **kvartérní amoniové soli**. Nejběžněji se jako modifikátory používají cetyltrimethylamonium bromid/chlorid (CTAB, CTAC) [17, 18], tetradecyltrimethylamonium bromid (TTAB) nebo didodecyldimethylamonium bromid (DDAB) [16]. Poprvé popsal použití tohoto typu látek Reijenga (1983), který použil CTAB v izotachofórze za účelem potlačení EOF [19]. Poprvé (1987) kdo pak použil kationické tenzidy (CTAB) k analýze aniontů byl Tsuda [16]. V případě CTAB mají již nízké koncentrace vliv na změnu EOF (k dosažení stabilního anodického proudu stačí 0,5 mM CTAB) [18,19].

Mechanismus, kterým dochází k otočení elektroosmotického toku v přítomnosti kvartérních amoniových solí, není dosud zcela objasněn. V přítomnosti nízkých koncentrací kationických tenzidů nedochází k vzájemným interakcím mezi tenzidy v roztoku, ani mezi tenzidy a povrchem kapiláry. Tyto interakce se projeví s rostoucí koncentrací povrchově aktivních látek (obr. 5). Díky klesající vzdálenosti mezi adsorbovanými tenzidy jsou umožněny hydrofobní interakce mezi jejich uhlíkatými řetězci [16]. V momentě, kdy začíná jejich adsorpce na kapilární stěnu, dosahuje koncentrace tenzidů $1/2$ až $1/3$ hodnoty kritické micelární koncentrace (CMC = koncentrace, při které se formují micely) daného roztoku. Adsorpce je možná až do obsazení všech volných silanolových skupin [19]. Formuje se tak monovrstva nebo dvouvrstva tenzidů (obr. 5), kapilární stěna získává pozitivní náboj a dochází k otočení EOF.

CMC je ovlivněna složením pufru (vliv elektrostatických interakcí mezi sousedními tenzidy a interakcí kationickou skupinou tenzidů a anionty pufru) a délkou řetězce tenzidů (s rostoucí délkou řetězce klesá CMC). Změny v CMC ovlivňují koncentraci povrchově aktivních látek nutnou pro otočení EOF [16].

Jestliže je koncentrace tenzidů větší než je kritická micelární koncentrace, dochází k agregaci volných tenzidů v roztoku a tvorbě micel. Tento jev je podstatou micelární elektrokinetické chromatografie (MEKC), kde se tato pseudostacionární fáze využívá při separaci neutrálních látek. Separované látky se rozdělují mezi hydrofobní micely a hydrofilní BGE [20].



Obr. 5: Znárodnění interakcí kationických tenzidů s kapilární stěnou. Při použití CTAB a TTAB dochází k tvorbě micelární monovrstvy (A) a v případě použití DDAB se formuje dvojvrstva (B) [9]

3.2 Separační přístupy v CE

Separace kvartérních amoniových sloučenin je založena na jejich struktuře. Stěžejní je přítomnost náboje na dusíku, a to v celém rozsahu pH, a dlouhých uhlíkatých řetězců. Ve vodných roztocích vytvářejí tyto látky micely, kde polární nabitě skupiny jsou orientovány vně a uhlíkaté řetězce dovnitř.

Přítomnost pozitivního náboje je současně problémem, protože dochází k interakci mezi analytem a negativně nabitými silanolovými skupinami kapilární stěny. To může být jeden z důvodů nedostatečné separační účinnosti metody a chvostování píků. Existuje ale hned několik způsobů, jak těmto interakcím předcházet. Především se to týká vlivu organických rozpouštědel, cyklodextrinů, modifikace kapilární stěny, použití iontových kapalin nebo úpravy pH.

3.2.1 Organická rozpouštědla

Přidávkem organického rozpouštědla se mění viskozita BGE a dochází také ke zlepšení rozpustnosti analytů s delšími alkylovými řetězci [6, 8]. Přítomnost organického rozpouštědla vede k poklesu zeta potenciálu a EOF. Prodloužením

migračních časů analytů je dosaženo lepšího rozlišení. Ke zlepšení separace dále přispívá skutečnost, že přítomnost organických rozpouštědel snižuje adsorpci kladně nabitých částic na stěnu kapiláry [6, 8].

Koncentrace organických rozpouštědel a analytů použitých pro analýzu jsou limitovány. Změny koncentrace ovlivňují jejich vzájemnou mísitelnost. Při vysokých koncentracích organických činidel dochází také k růstu šumu základní linie, nadměrnému prodloužení migračních časů a tím i celkové doby analýzy [6].

Organická rozpouštědla interagují se vzniklými micelami a dochází k jejich rozpadu. Například methanol, který má jen slabě hydrofobní charakter je absorbován do micelární vrstvy tvořené iontovými skupinami a vodou. Přítomnost methanolu zvyšuje hydrofobní interakce mezi uhlíkatými řetězci uvnitř micel a snižuje hustotu náboje na jejich povrchu. Methanol v BGE snižuje relativní permitivitu roztoku a klesá hodnota CMC. Poklesem polarity media jsou podpořeny repulze mezi iontovými skupinami. Tyto faktory vedou k narušení stability micel a jejich rozpadu. Analyty tak migrují samostatně a je zlepšena jejich separace [21].

Nejpoužívanější organická činidla v CE jsou acetonitril (ACN), aceton, methanol, tetrahydrofuran (THF), n-propanol nebo ethanol. Při výběru vhodného organického rozpouštědla musí být brán ohled na typ rozpouštědla a na jeho koncentraci. Tyto faktory ovlivňují rozlišení a dobu analýzy.

Přídavkem organického rozpouštědla byla zlepšena separace:

- **Suxamethonium chloridu** [8], což je široce používané myorelaxancium. Je pro něj typická chemická nestabilita a ve vodných roztocích dochází rychle k hydrolyze. Přítomnost dvou kvartérních amoniových skupin řadí suxamethonium mezi vysoce polární látky, výrazně se adsorbuje na skleněné povrchy a výsledkem analýzy jsou tak nesymetrické píky. Adsorpci látek na kapilární stěnu lze předejít použitím extrémně nízkého pH nebo vysokou teplotou, ale tyto způsoby nepřipadají v úvahu díky již zmíněné nestabilitě. Další možností je použití kapiláry potahované polyvinylalkoholem (PVA), která je ovšem dražší než běžně používané nepotahované kapiláry. Vhodným řešením je tedy přídavek organického rozpouštědla – zde acetonitril. K detekci nelze použít běžně používaný UV detektor díky absenci

chromoforu. V tomto případě byl použit bezkontaktní vodivostní detektor. Podmínky separace jsou uvedeny v tabulce 2. Za těchto podmínek trvala analýza 4 minuty. Koncentrace suxamethonia stanovená touto metodou byla porovnána s deklarovaným množstvím v přípravku. Obsah suxamethonia byl $\pm 5\%$ skutečného množství.

Toto uspořádání je možné použít pro stanovení suxamethonia ve farmaceutických přípravcích.

- **Alkylbenzyl dimethyl amoniových sloučenin (ABDAC).** Jde o látky tvořené z několika homologů ($C_{10} - C_{18}$). Mají výrazné baktericidní účinky, čehož se využívá ve farmacii, jsou např. součástí očních kapek. Jednotlivé homology se vyznačují odlišnými vlastnostmi, např. homolog C_{12} působí proti plísním a houbám, homolog C_{14} proti Gram-pozitivním bakteriím a homolog C_{16} proti Gram-negativním bakteriím [11]. Kapilární elektroforéza umožňuje separaci jednotlivých homologů. Problémem jsou homology s delším alkylovým řetězcem, kde není dosaženo dostatečného rozlišení.

So a Huie zkoumali vliv acetonitrilu a methanolu na zlepšení separace těchto homologů. Bez přídavku organického činidla jsou na elektroforeogramu zastoupeny pouze píky homologů C_{10} , C_{12} a deformovaný pík pro homolog C_{14} . Jestliže byl přidán acetonitril, tak s rostoucí koncentrací (0% - 40%) rostla také intenzita signálu, ale stále nebyly přítomny píky pro homology s delšími alkylovými řetězci (C_{16} , C_{18}). Přídavek methanolu vedl k podobným výsledkům, ale došlo k ovlivnění migračních časů všech analytů. Dalšího zlepšení bylo dosaženo přídavkem methanolu do analyzovaného roztoku. Pro dosažení separace všech 5 homologů byla tedy použita kombinace 40% acetonitrilu (v/v) v BGE a 60% methanolu přidaného do analyzovaného roztoku [22].

Hou a spol. vyvinuli metodu pro kvalitativní a kvantitativní analýzu těchto látek ve farmaceutických produktech. Zkoumali vliv methanolu, tetrahydrofuranu a acetonitrilu na separaci těchto homologů. Nejvhodnější byl opět 40% acetonitril (v/v) a čas analýzy byl 12 minut. Vyšší koncentrace vedly ke zrychlení migrace analytů a tím bylo zhoršeno rozlišení jednotlivých

píků. Ve srovnání s HPLC poskytuje CE lepší tvary píků, vyšší citlivost a separační účinnost [11].

- **Alkylamoniových sloučenin** (dodecyl-, tetradecyl-, hexadecyl- a oktadecyltrimethylamonium bromid označovány jako alkyl-TMA). Z důvodu absence chromoforu byla k detekci použita nepřímá UV detekce (IUV). Jako chromofor byl do základního elektrolytu přidán benzyltrimethylamonium bromid (BTMAC). K dosažení lepšího separačního účinku byl zkoušen vliv acetonitrilu, acetonu, methanolu, propan-2-olu a THF. Acetonitril a aceton mají jen nepatrný vliv na EOF. Dochází sice ke zkrácení migračního času, ale rozlišení píků je nedostatečné. Propan-2-ol má podobný efekt. Methanol nepřipadá v úvahu, protože dochází ke zvyšování šumu základní linie. Vhodným řešením je použití 50% THF, píky jsou ostré a je dosaženo lepšího rozlišení. Díky dosaženým výsledkům je metoda použitelná pro stanovení tohoto typu látek v kosmetických přípravcích. Separační podmínky byly aplikovány na stanovení **cetrimonium bromidu** (C₁₄-TMA) v pleťovém mléce [6].

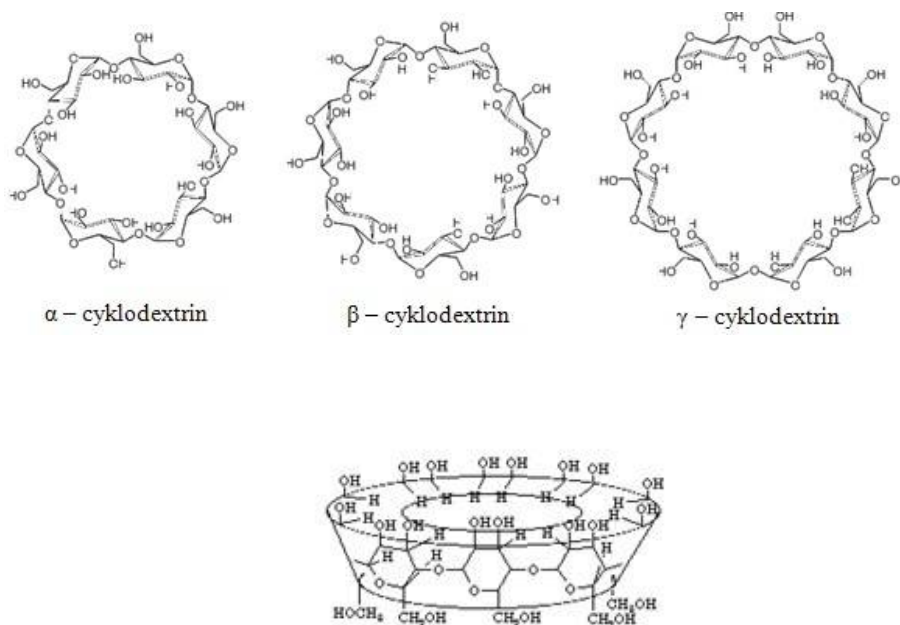
Tabulka 2: Přehled separačních podmínek při využití organických rozpouštědel ke zlepšení separace

Analyt	BGE	Detekce	LOD	Matrice	Citace
Suxamethonium chlorid	100 mM Tris-acetátový pufr, pH 4,2, ACN (90/10, v/v)	C ⁴ D	10 µg/ml	Léčiva (Lysthenon 2% a 5%, Succinolin 5%)	[8]
BAC	40 mM fosfátový pufr, pH 4, 40% ACN,	UV (200 nm)	-	Oční kapky	[11]
Cetrimonium bromid	20 mM fosfátový pufr, pH 4,4, 40% THF	IUV (chromofor 5 mM dodecylbenzyltrimethylamonium chlorid)	1,6x10 ⁻⁵ mol/l	Pleťové mléko	[6]
BAC	20 mM fosfátový pufr, pH 5, 40% ACN (v/v)	UV (210 nm)	-	Standard	[22]

3.2.2 Cyklodextriny

Cyklodextriny (CD) jsou cyklické sloučeniny tvořené z 5 a více opakujících se glukózových jednotek v „židličkové“ konformaci. Rozlišujeme několik typů cyklodextrinů lišících se počtem opakujících se glukózových jednotek. Nejčastěji používané cyklodextriny jsou α -CD (6 jednotek), β -CD (7 jednotek) a γ -CD (8 jednotek). Pro jejich strukturu (obr. 6) je charakteristická přítomnost hydrofobní kavity a hydrofilního povrchu s navázanými hydroxylovými skupinami. Jejich přítomnost ve vodných roztocích vede ke změně chování dalších molekul přítomných v roztoku [23, 24].

Díky své struktuře mají cyklodextriny uplatnění v různorodých oblastech. Vychází to hlavně z možných hydrofobních interakcí mezi kavitou a analytem. Mohou se používat ve farmaceutickém průmyslu jako nosiče pro léčiva, v potravinářském průmyslu pro výrobu potravin s nízkým obsahem cholesterolu a široké uplatnění mají v chemickém průmyslu při nejrůznějších syntézách [24].



Prostorové uspořádání cyklodextrinů [25]

Obr. 6: Struktura cyklodextrinů [26]

Cyklodextriny nacházejí uplatnění v separačních metodách při separaci racemických směsí, kde jsou používány jako chirální selektory. Bylo popsáno i využití cyklodextrinů pro vytvoření stacionárních fází v HPLC (vazba cyklodextrinů na silikagel) a GC (polyuretany obohacené cyklodextriny). V plynové chromatografii se čisté cyklodextriny nepoužívají, protože tyto kolony vykazují nízkou separační účinnost. Řešením je použití alkyl, acyl nebo tercbutylalkylsilylových derivátů cyklodextrinů [23].

Přídavkem CD do BGE dochází ke vzniku komplexů typu host-hostitel. Tyto komplexy vznikají na základě interakcí mezi hydrofobními řetězci kvartérních amoniových sloučenin a kavitou. Tvorba komplexu také závisí na délce uhlíkatých řetězců a koncentraci tenzidů.

Cyklodextriny zlepšují rozpustnost tenzidů a potlačují tvorbu micel. Současně je omezena adsorpce kvartérních amoniových solí na stěnu kapiláry a to má za následek zlepšení rozlišení a tvaru píku (nedochází k chvostování případně ke ztrátě píků na elektroforeogramu) [22].

Vlastnosti cyklodextrinů byly využity k separaci kvartérních amoniových iontů v těchto příkladech:

- So a Huie [22] využili cyklodextriny ke zlepšení separace homologů (C_{10} – C_{18}) **ABDAC**. Zaměřili se na kombinaci cyklodextrinů a organického rozpouštědla. Zvlášť byl zkoumán vliv α -CD/ β -CD bez a s organickým činidlem.

α -CD

V přítomnosti samotného cyklodextrinu (5 mM) jsou patrné pouze 3 píky, přičemž 3. pík je směsí homologů C_{14} – C_{18} . Do BGE byl přidán ACN a to v různých koncentracích (10%, 20% a 40%, v/v). Při obsahu 40% ACN v BGE poklesly interakce mezi cyklodextrinem a analytem.

Roli hraje také koncentrace cyklodextrinu. Je-li koncentrace 10 mM, ztrácí se rozlišení pro homology C_{16} a C_{18} . Pokles koncentrace na 2,5 mM vede zase ke ztrátě a chvostování píků.

Dalšího zlepšení separace bylo dosaženo přídavkem 60% (v/v) methanolu do vzorku. Zlepšil se tvar píků a nedochází k jejich ztrátě. Testován byl i vliv

methanolu v BGE, ale toto činidlo je nevhodné pro velmi nízké koncentrace analytů. Analýza prokázala, že α -CD je vhodný ke zlepšení separace homologů jak s krátkým tak s dlouhým alkylovým řetězcem.

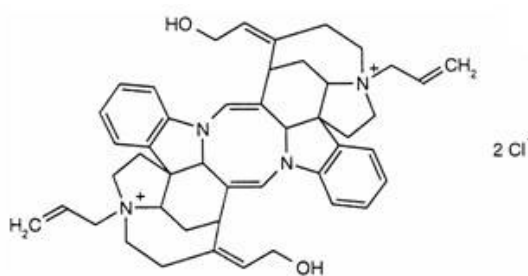
β -CD

Za stejných podmínek byl testován i β -CD. Vliv na separaci byl podobný jako u α -CD, ale u homologů s delšími alkylovými řetězci nebylo dosaženo takového zlepšení ve chvostování píků jako při použití α -CD.

- Separace směsi **muskarinových agonistů a antagonistů**. Pro zkoumanou skupinu látek je společná přítomnost heterocyklického kruhu, kde v poloze 5 je navázán substituent s kvartérním dusíkem. Tyto enantiomery není možné separovat pomocí HPLC, protože dochází k iontovým interakcím mezi nabitou kvartérní amoniovou skupinou a chirální fází. Nejčastějšími používanými cyklodextriny v CE pro chirální separace jsou β -CD a γ -CD. Substituenty v poloze 2 a 3 na isoxalovém, isoxalinovém a isoxalidinovém kruhu korelují s počtem glukózových jednotek tvořících cyklodextrin. Obecně je β -CD vhodný pro látky obsahující aromatický kruh a γ -CD je použit pro látky se dvěma aromatickými kruhy. Koncentrace použitého cyklodextrinu se odvíjí od afinity mezi analytem a kavitou. Jestliže je afinita vysoká (dochází k výraznému zpomalení analytu) není nutná vysoká koncentrace cyklodextrinu. K potlačení interakce mezi analytem a stěnou kapiláry a tím k dosažení lepšího rozlišení a účinnosti separace byla použita potahovaná kapilára (polyakryloylaminoethoxyethanol). Použití potahované kapiláry je také nezbytné k dosažení reprodukovatelnosti migračních časů a tím ke spolehlivé identifikaci enantiomerů [27].
- Stanovení nečistot v nervosvalovém blokátoru – **alcuroni** (struktura viz obr. 7). Alcuronium podléhá v mírně kyselém prostředí cyklizaci (reakce mezi hydroxy skupinou a dvojnou vazbou) a vzniká tak diallylcaracurin (DAC). Druhou nečistotou je allyl-Weland-Gumlich-aldehyd (WGA, (4*R*,17*R*)-4-allyl-17,18-epoxy-17-hydroxy-19,20-didehydrocuranium chlorid), který může vznikat během syntézy alcuronia. Množství těchto nečistot je limitováno

Evropským lékopisem (0,5%). Evropský lékopis používal pro stanovení těchto nečistot nejdříve tenkovrstvou chromatografií (2000), kde bylo dosaženo limitu detekce pro DAC nižšího než 0,5% a pro WGA nižší než 0,1%. V roce 2001 pak byla TLC nahrazena iontově párovou chromatografií, která dosahuje stejných limitů.

Díky tomu, že všechny tyto sloučeniny jsou nositelem kladného náboje, byly tyto nečistoty stanoveny pomocí CE. Při výběru podmínek musel být brán ohled na pH, aby nedocházelo k rozkladu alcuronia na DAC. Vzorek byl proto připraven v dimethylsulfoxidu a pH BGE bylo 5,5. Nejlepších výsledků bylo dosaženo při použití 12 mM heptakis-(2,6-di-O-methyl)- β -cyklodextrinu s negativním nábojem na jeho povrchu. Tato metoda byla aplikována na stanovení nečistot v komerčním farmaceutickém přípravku. Separační podmínky jsou uvedeny v tabulce 3. Současně byl sledován vliv teploty skladování na obsah nečistot. Při skladování vzorku při předepsané teplotě (2 – 8 °C) byl obsah nečistot menší než 1 %. Při skladování za vyšší teploty se objevují další neidentifikované nečistoty. LOD (Limit of Detection) pro DAC a WGA byl nižší než 0,1%. Podle dosažených výsledků je možné tuto metodu použít pro stanovení nečistot a pro testy stability tohoto přípravku [28].



Obr. 7: Struktura alcuronium chloridu [29]

Tabulka 3: Separační podmínky při použití cyklodextrinů

Analyt	BGE	Detekce	LOD	Matrice	Citace
Antagonisté muskarinu *	25 mM Tris-acetátový pufr, pH 4,2, α -, β - nebo γ -CD	UV-Vis ($\lambda=214\text{nm}$)	-	Synteticky připravené analyty	[27]
Alcuronium (nervosvalový blokátor)	50 mM diethanolamin, pH 9,2, ACN (19:1), HDAS- β -CD 46 mg/ml	UV (254 nm)	WGA 0,07 %	Alloferin	[28]

* antagonisté muskarinu: 2-fenyl-[(dimethylamino)methyl]-isoxazolidin-3-oxo-methiodid, 3-(1-hydroxybenzyl)-5-[(dimethylamino)methyl]-isoxazol methiodid, 2-benzyl-5-[(dimethylamino)methyl]-isoxazolidin-3-oxo-methiodid, 3-(1-hydroxy-1-cyklohexylbenzyl)-5-[(dimethylamino)methyl]-isoxasol methiodid, 3-(1-hydroxy-1-fenylbenzyl)-5-[(dimethylamino)methyl]- Δ -isoxazolin methiodid

Tris – tris(hydroxymethyl)aminomethan

HDAS- β -CD - heptakis-(2,6-O-diacetyl-6-sulfo)- β -cyklodextrin

ACN – acetonitril

3.2.3 Modifikace kapiláry

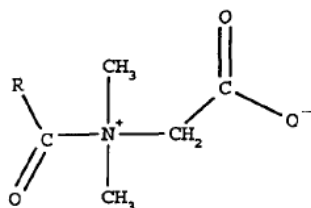
Další možnost jak snížit adsorpci kvartérních amoniových iontů na kapilární stěnu je modifikace kapiláry. Při použití PVA-potahované kapiláry bylo dosaženo zlepšení tvaru píků [8, 30]. Nevýhodou tohoto řešení je vysoká cena kapiláry a také to, že v některých případech dochází dokonce ke zhoršení separační účinnosti [22]. Tento typ kapiláry se s výhodou používá při separaci proteinů [8].

3.2.4 Vliv pH

Jde o nezanedbatelný faktor, který má svůj podíl na výsledku separace. Vlivem pH se mění stupeň ionizace silanolových skupin kapilární stěny. Je nutné vybrat takové pH, při kterém budou interakce mezi analytem a stěnou co nejmenší.

Hodnota pH ovlivňuje také chování analytů nesoucích druhou ionizovatelnou skupinu jako je tomu například u amfoterních tenzidů (obr. 8). U tohoto typu analytu je

nutné zvolit takové pH, při kterém bude druhá funkční skupina v neionizované formě. S klesajícím pH se zvyšuje elektroforetická pohyblivost amfoterních tenzidů [22].



Obr. 8: Struktura kokamidopropylbetainu – zástupce amfoterních tenzidů [31]

3.2.5 Iontové kapaliny

Pro kvalitní separaci analytů je stěžejní složení základního elektrolytu. Běžně používané elektrolyty jsou složeny z anorganických solí a organického modifikátoru, který zlepšuje rozpustnost některých složek. Elektrolyty o tomto složení mohou být škodlivé pro operátora (toxicita organických rozpouštědel, těkavost, hořlavost). Je možné je nahradit tzv. iontovými kapalinami [32].

Jde o kapaliny, které se díky svým vlastnostem využívají v „zelené“ chemii. Jsou netěkavé, nehořlavé, termostabilní, je pro ně typická elektrochemická stabilita. Téměř nulová tenze par zabraňuje úniku chemikálií do atmosféry. Výhodou je, že zůstávají ve formě kapalin i při teplotách v rozmezí 200 – 300 °C. Jsou složeny jen z kationtů a aniontů, přičemž počet kationtů a aniontů je vyrovnaný. Vysoká iontová pohyblivost zajišťuje výbornou vodivost [33].

V těchto kapalinách jsou rozpustné jak organické tak anorganické látky, protože se zde uplatňují iontové i hydrofobní interakce. Rozpustnost iontových kapalin ve vodě je ovlivněna aniontem. Jestliže je aniontem chlorid, bromid nebo trifluoracetát, jsou iontové kapaliny rozpustné ve vodě. Jestliže je aniontem např. hexafluorofosfát vznikají v přítomnosti vody dvě fáze [33], toho se využívá v extrakci kapalina – kapalina (LLE, liquid-liquid extraction) [34]. Většina iontových kapalin je dobře mísitelná s organickými činidly, jejichž dielektrická konstanta ϵ je vyšší než 6 [33].

Iontové kapaliny jsou obvykle složeny z organického kationtu obsahujícího atom dusíku nebo fosforu a z velkého anorganického nebo organického aniontu [33]. Mezi iontové kapaliny patří např. 1-ethyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborát, 1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborát nebo 1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorofosfát a další.

1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorofosfát byl použit jako BGE pro separaci paraquatu a diquatu. S rostoucí koncentrací iontové kapaliny se zvětšuje plocha píku. To platí až do koncentrace 50 mM. Nad tuto koncentraci je separace obtížná, protože roste viskozita prostředí a šum základní linie.

Rozpustnost iontové kapaliny byla zlepšena malým přídatkem ethanolu. Použitím vyšší koncentrace ethanolu se sice omezila adsorpce analytů na stěnu kapiláry, ale snížila se plocha píku. S ohledem na stabilitu analytů jen v kyselém nebo neutrálním prostředí bylo pH BGE upraveno na 5. V tomto případě nebylo dosaženo optimálních výsledků. Příčinou je nevhodně zvolený UV detektor, který neposkytuje dostatečnou citlivost. Řešením je použití jiného detektoru případně zakoncentrování vzorků před analýzou [32].

Kromě kapilární elektroforézy mají tyto kapaliny své uplatnění také v chromatografii. Mohou se používat jako netěkavá rozpouštědla v organických syntézách, jako katalyzátory reakcí (např. Friedel-Craftsova reakce, Diels – Alder reakce) [34] a mají využití v elektrochemii nebo ve spektroskopii [33].

3.3 Možnosti detekce

Detekční systémy používané v kapilární elektroforéze musí být dostatečně citlivé, což je dáno velmi malým vnitřním průměrem separační kapiláry [13]. Výběr vhodného detektoru vychází ze struktury analyzované látky a také z citlivosti samotného detektoru. Nejčastěji používaný je UV-Vis detektor, který je použit pro látky s chromoforem. Vysoce citlivým detektorem je detektor založený na laserem indukované fluorescenci (LIF), který lze aplikovat pouze na látky s fluoroforem. Analyty bez fluoroforu/chromoforu je možné před separací derivatizovat. Derivatizace je časově náročná a může tak představovat určitou nevýhodu. LIF detektor má tedy

využití jen pro omezenou skupinu analytů a další nevýhodou je jeho finanční náročnost [35].

Jako univerzální detektory se používají elektrochemické detektory, založené na amperometrii, potenciometrii a konduktometrii, refraktometrický detektor a hmotnostní spektrometrie (MS detektor). Citlivost jednotlivých detekčních technik vyjádřenou jako limit detekce LOD zobrazuje tabulka 4.

Tabulka 4: Přehled citlivosti detektorů používaných v CE [35, 36]

Detekce	LOD (mol/l)
Přímá UV	$10^{-6} - 10^{-5}$ (10^{-6} pro prodlouženou optickou dráhu)
Nepřímá UV	$10^{-6} - 10^{-5}$
LIF	$10^{-10} - 10^{-11}$ (po chemické derivatizaci až 10^{-13})
Nepřímá LIF	$10^{-6} - 10^{-5}$
Amperometrie	$10^{-8} - 10^{-6}$
Potenciometrie	$10^{-8} - 10^{-7}$
Konduktometrie	$10^{-8} - 10^{-7}$
MS detekce	$10^{-9} - 10^{-5}$

V následujících podkapitolách jsou probrány detektory používané k detekci kvartérních amoniových sloučenin a jejich aplikace v konkrétních případech.

3.3.1 Přímá UV detekce

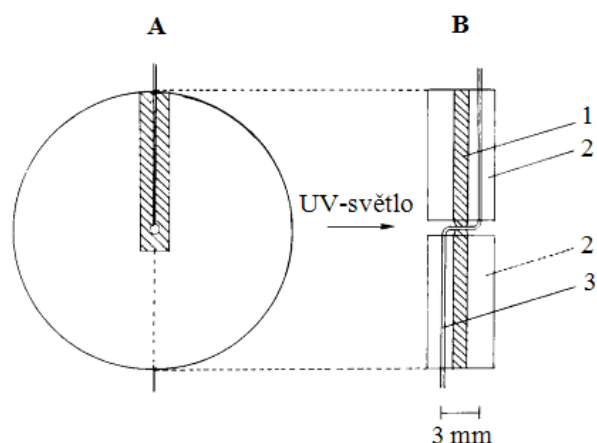
Tento způsob detekce je založen na schopnosti analytu absorbovat UV záření. Absorpce je možná jen tehdy, jsou-li v molekule analytu přítomny π -vazby. Látky bez chromoforu poskytují pouze slabý signál.

K dosažení vyšší citlivosti se mohou použít prekoncentrační metody. Výhodné je spojení CE s izotachoforézou. U izotachoforézy je použit vedoucí a koncový elektrolyt.

Vedoucí elektrolyt obsahuje ionty s vyšší elektroforetickou pohyblivostí, než mají analyzované ionty a koncový elektrolyt obsahuje ionty s nižší pohyblivostí, než analyzované ionty. Po aplikaci stejnosměrného napětí jsou analyty separovány na základě své elektroforetické pohyblivosti (od nejvyšší u vedoucího elektrolytu po nejnižší u koncového elektrolytu) v úzkých zakoncentrovaných zónách. Uplatňuje se zde samozaostřující efekt. Platí, že s rostoucí elektroforetickou pohyblivostí klesá elektrický potenciál. Jestliže analyzované ionty difundují do zóny s ionty o vyšší pohyblivosti, jsou zpomaleny působením potenciálu o nižší intenzitě a dostávají se tak zpět do své zóny. Naopak jestliže analyt difunduje do zóny s nižší pohyblivostí je působením potenciálu o vyšší intenzitě urychlen zpět do své zóny. Během jedné analýzy je možné separovat pouze anionty nebo kationty [13, 20].

Další možností jak zvýšit citlivost je použití modifikované detekční cely. Tyto cely mají oproti původní cele zvětšený objem nebo prodlouženou optickou dráhu [34]:

- **Z – detekční průtoková cela** (obr. 9) – v místě, kde prochází kapilára detekčním oknem, je změněn její tvar do písmene Z. Kapilára je společně s hliníkovou podložkou uzavřena mezi plastové desky. Délka optické dráhy je dána tloušťkou hliníkové podložky a ohybem kapiláry. Pro podložku o šířce 1 mm činí délka optické dráhy 3 mm. Délka optické dráhy by neměla přesahovat délku zóny analytu. Ohyb kapiláry neovlivňuje elektroforetický děj. Prodloužení délky optické dráhy zlepšuje několikanásobně poměr signál šum (S/N) v porovnání s on-column detekcí (viz tabulka 5). Je tak dosaženo vyšší citlivosti. Např. Chervet a spol. použili Z-celu pro separaci směsi nukleotidů, nukleosidů a peptidů, kdy bylo dosaženo 6 násobného zvýšení poměru signál šum [37, 38]. Použitím Z-cely se zvyšuje citlivost systému vůči chemickým nečistotám, proto je nutné opakované promývání kapiláry vodou k odstranění zbytků kyselin a zásad. Je tak zlepšena základní linie [37]. Změnou tvaru kapiláry je dosaženo vyšší citlivosti, avšak s rostoucí délkou optické dráhy klesá rozlišení [35].



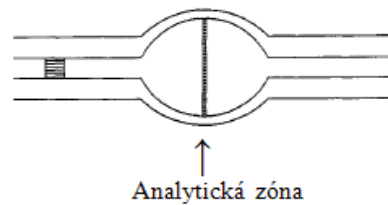
Obr. 9: Znázornění 3mm detekční Z-cely. Část A znázorňuje pohled zepředu, část B znázorňuje řez, kde 1 – hliníková podložka s otvorem o vnitřním průměru 300 μm , 2 - umělohmotné desky, 3 – kapilára s vnitřním průměrem 50 nebo 75 μm a vnější průměr 280 μm [36].

Tabulka 5: Porovnání Z-detekční cely a on-column detekce

	On-column detekční cely		Z-detekční cely	
	50 μm i. d.	75 μm i. d.	50 μm i. d.	75 μm i. d.
Vnitřní průměr kapiláry				
Statický šum (mAU)	0,041	0,040	0,057	0,062
Dynamický šum (mAU)	0,067	0,062	0,125	0,105
Signál (mAU)	4,1	6,6	29,0	67,0
Signál/Šum	62	106	232	638

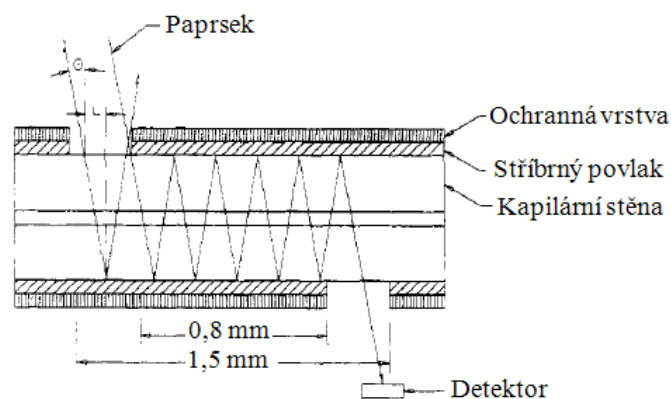
Separáční napětí bylo 11 kV. Signál byl měřen pro 2'-deoxyguanosin při vlnové délce 254 nm

- **Bubble – cell** (obr. 10) – v místě detekce je kapilára rozšířená do tvaru bubliny. Je tak docíleno většího objemu detekční cely. V místě rozšíření dochází k poklesu odporu a elektrického pole. Po vstupu zóny analytu do detekční cely klesá rychlost migrace, vzniká úzká zóna, která se šíří radiálně. Průměr bubliny je limitován. Jestliže je průměr více než 15x větší než vnitřní průměr kapiláry dochází ke značnému rozmývání píků [39].



Obr. 10: Znárodnění bubble-cell [39]

- Multireflection flow cell** (obr. 11) – na rozdíl od výše zmiňovaných cel tato detekční cela nemá upravený vnitřní objem ani změněnou geometrii. Cela je připravena z běžně používané separační kapiláry. Z kapiláry je odstraněn polyimidový potah. Pomocí oxidačně redoxních reakcí (reakce $\text{Ag}(\text{NH}_3)_2$ a glukózy) se vytvoří na povrchu kapiláry stříbrný potah, který slouží jako zrcadlo. Aby nedocházelo k poškození vrstvy, je kapilára natřena ochrannou barvou. Pro vstup a výstup paprsku jsou zde dva otvory umístěné na protilehlých stěnách kapiláry. Vzdálenost mezi otvory je 1,5 mm. Takto připravená detekční cela se připevní na separační kapiláru. Paprsek se po vstupu do detekční cely odráží od stříbrného potahu a tím je prodloužena optická dráha a zlepšena citlivost detekce. Citlivost tedy záleží na počtu odrazů paprsku v detekční cele. Důležitým faktorem je úhel odrazu paprsku. Je žádoucí, aby tento úhel byl co nejmenší [40].



Obr. 11: Multireflection flow cell tvořená z křemenné kapiláry (75 μm i. d.) a objemu 6,6 nl (pro vzdálenost mezi otvory 1,5 mm)

Přímá UV detekce byla kromě již výše zmíněných případů (stanovení BAC v očních kapkách – viz tabulka 2; stanovení nečistot v alcuroniu a detekce muskarinových antagonistů – viz tabulka 3) použita jako detekce pro:

- stanovení **benzalkonium chloridu (BAC)**, **cetylpyridinium chloridu (CPC)** a **dequalinium chloridu (DQC)** v pastilkách používaných při zánětech v dutině ústní a krku, kde se uplatňují jejich antimikrobiální vlastnosti. Použití UV detekce je vhodné díky přítomnosti benzenového jádra ve struktuře těchto látek. V tomto případě byl použit detektor diodového pole (DAD).

Bylo popsáno množství prací zaměřených na stanovení BAC, zatímco prací zaměřených na stanovení CPC a DQC je málo. Současné stanovení těchto látek v pastilkách bylo provedeno pomocí HPLC za použití kyanopropylové stacionární fáze. Ale bohužel, nebylo dosaženo dostatečného rozlišení homologů BAC. Kromě celkové koncentrace BAC je důležité stanovit i zastoupení jednotlivých homologů. Z tohoto důvodu byla použita kapilární elektroforéza (separační podmínky viz tabulka 6). Ke zlepšení rozlišení homologů BAC a zlepšení tvaru píku CPC byl do základního elektrolytu přidán acetonitril. Aby bylo dosaženo dostatečného rozlišení DQC od nečistot v matrici byl použit dodecylsírán sodný jako ion-párové činidlo. Pro stanovení těchto látek je tedy výhodnější použít CE než HPLC [7].

- stanovení **BAC** v desinfekčních prostředcích používaných ve zdravotnictví a v dětských čistících ubrouscích. K dosažení lepšího rozlišení homologů byl do BGE přidán 40% ACN. Současně byl zkoumán vliv přídavku methanolu do vzorku. S rostoucí koncentrací methanolu se zlepšuje rozlišení homologů. Při dosažení 70 - 80% methanolu (v/v) je dosaženo úplného rozpadu micel ve vzorku [41].

Tabulka 6: Separační podmínky analýz s použitím přímé a nepřímé UV detekce

Analyt	BGE	Detekce	LOD	Matrice	Citace
BAC, CPC, DQC	50 mM fosfátový pufr, pH 3, 50% ACN	DAD (210, 254 a 230 nm)	-	Pastilky	[7]
BAC	20 mM fosfátový pufr, pH 5,2, 40% ACN	DAD (200 nm)	-	Desinfekce, dětské čisticí ubrousky	[41]
Chlormequat (CQ), mepiquat (MQ)	10 mM PP, pH 2,5 10% methanol	IUV (chromofor PP; 205 nm)	CQ 2,8 µg/ml MQ 2,5 µg/ml	Odpadní voda	[42]
ATMAC DADMAC	10 mM fosfátový pufr, 57,5% THF, 3 mM SDS, pH 4,3	IUV (chromofor C ₁₀ -BDMAC; 214 nm)	-	Kondicionéry šampony	[45]
Amfoterní tenzidy	20 mM kyselina fosforečná, pH 2, 50% ACN, 5 mM BTMAC	DAD (214 nm)	10–50 µg/ml*	Detergenty	[9]

*Hodnoty LOD získané u standardu

PP – 1-(4-pyridyl)pyridinium chlorid hydrochlorid

ATMAC - alkyltrimethylamonium chlorid

DADMAC - dialkyldimethylamonium chlorid

C₁₀-BDMAC – dodecylbenzyl dimethylamonium chlorid

BTMAC - benzyltrimethylamonium chlorid

3.3.2 Nepřímá UV detekce

Nepřímá UV detekce (indirect UV, IUV) představuje vhodnou metodu detekce pro analyty, které nejsou schopny absorbovat UV záření. Není zde nutná derivatizace analytů. Do základního elektrolytu se přidá co-iont absorbující v UV oblasti. Pufr při průchodu detekční celou poskytuje intenzivní signál, který je snížen v okamžiku průchodu analytů. Na elektroforeogramu se přítomnost analytu projeví jako záporný pík [35].

Pro analýzu je nutné zvolit takový chromofor, který má v elektrickém poli podobnou pohyblivost jako stanovované analyty. V opačném případě dochází

k chvostování píků. Tvar píku a citlivost tedy závisí na mobilitě analytu a základního elektrolytu. Chromofor by měl být vybrán také podle toho, aby maximální absorpce UV záření byla při vlnové délce, při které je absorpce analytu minimální [42]. Nevýhodou této metody je, že přítomnost chromoforu v BGE zvyšuje šum pozadí a snižuje se tak citlivost [43].

Citlivost nepřímé a přímé UV detekce je srovnatelná (10^{-6} – 10^{-5} M). IUV detekce je vhodná pro detekci malých iontů, karbohydrátů, lanthanoidů, karboxylových kyselin nebo alkylsulfátů [35]. Jako chromofory se používají 1-(4-pyridyl)pyridinium chlorid hydrochlorid, dodecylbenzyltrimethylamonium, C_{12} -, C_{14} - nebo C_{16} -benzyltrimethylamonium, naftalén monosulfát, adenosinmonofosfát, benzylamin, efedrin, tetrazoliumviolet, chinin, imidazol nebo kreatin [3, 42, 44].

IUV detekce byla použita jako detekční systém v těchto případech:

- Současné **stanovení herbicidů s chromoforem** (paraquat, diquat, difenzoquat) a **bez chromoforu** (mepiquat, chlormequat). Tyto látky jsou široce používány v zemědělství. Je nutné monitorovat hladinu těchto látek v životním prostředí. Byly vyvinuty metody pro monitorování obsahu těchto látek v zemědělských plodinách, odpadních vodách (limitující množství diquatu v pitné vodě je pouze 20 $\mu\text{g/l}$ - platí pro USA) ale i v krvi (paraquat a diquat jsou velmi toxické a jsou často příčinou náhodných otrav). V tomto případě (separační podmínky viz tabulka 6) byla metoda aplikována na stanovení mepiquatu a chlormequatu v odpadní vodě, do které byly přidány analyty (25 $\mu\text{g/ml}$). Ke zlepšení limitu detekce a minimalizování vlivu matrice je nezbytné vzorky před analýzou přečistit [42].
- Analýza **alkyltrimethyl- a dialkyldimethylamonium chloridu** (ATMAC a DADMAC). Tyto kvartérní amoniové sloučeniny jsou hojně používány ve farmaceutickém průmyslu a v kosmetice (kondicionéry, šampóny – antistatické účinky, hebkost). Bylo provedeno stanovení těchto látek v 5 různých vlasových kondicionérech a v 5 změkčovačích vody. Vzorky byly naředěny 90% methanolem. Ke zlepšení rozlišení píků bylo použito 3 mM SDS jako ion-párové činidlo. Limit kvantifikace pro tyto látky se pohyboval v rozmezí 0,05 – 0,5 $\mu\text{g/ml}$. Výsledky dosažené za těchto podmínek ukazují,

že kapilární elektroforéza je dostatečně citlivá a spolehlivá pro stanovení kvartérních amoniových tenzidů neobsahujících chromofor v kondicionérech a změkčovadlech vody [45].

- Stanovení **amfoterních tenzidů** v detergentech. Amfoterní tenzidy jsou široce používány v domácnostech a v kosmetice. Jsou pěňivé, nedráždí oči a pokožku. Mezi hlavní zástupce amfoterních tenzidů patří alkyldimethylamin N-oxid (AO), alkylamidopropylamin N-oxid (APAO), alkylbetain (Bt) a alkylamidopropylbetain (APB). Hydrofobní alkylový řetězec je tvořen 8 – 18 uhlíky. Jejich rozšířené používání v různých přípravcích si žádá vývoj metod pro kontrolu kvality.

Bylo popsáno stanovení směsi tenzidů za použití iontovýmenné chromatografie a chromatografie na reverzních fázích. Za použití těchto metod je ale náročné separovat směs neiontových a anionických tenzidů a aditiv během jedné analýzy. Pro separaci amfoterních tenzidů byla použita CE analýza v kombinaci s IUV detekcí, kde jako chromofor v BGE byl použit benzyldimethylamonium chlorid (BTMAC) – podmínky separace viz tabulka 6. Metoda byla aplikována na stanovení těchto látek v šamponech a v prostředcích na mytí nádobí. Nebyl zde zaznamenán pík matrice na rozdíl od HPLC. Metoda je dostatečně selektivní pro amfoterní tenzidy a je možné ji aplikovat pro rutinní stanovení v reálných vzorcích [9].

3.3.3 Elektrochemická detekce

Do této skupiny patří detektory založené na potenciometrii, amperometrii a konduktometrii. Tento systém je díky použití mikroelektrod o velikosti několika mikrometrů velmi vhodný pro CE [46]. Malé rozměry elektrod umožňují měřit malý proud (nA až pA). Další výhodou detektoru je jeho finanční nenáročnost v porovnání s LIF nebo hmotnostním spektrometrem (MS). Je možné jej použít také pro uspořádání CE na čipu [46]. Tento typ detektoru může nahradit IUV detekci. Nevýhodou systému je jeho omezená dostupnost na trhu v porovnání s UV detektory [3].

Problémem také může být v rozdílech napětí používaným pro CE a tyto detektory. V případě CE je aplikováno vysoké separační napětí (5 – 30 kV), zatímco elektrochemické detektory pracují při napětí 1 V nebo nižší. Elektrochemická detekce může být realizována jako „off-column“ nebo jako „end-column“. V případě „**off – column**“ detekce je měrná elektroda umístěna na konci kapiláry, nebo v jeho blízkosti. Před dosažením detektoru klesá v kapiláře elektrický proud a napětí. U „**end – column**“ detekce je měrná elektroda vložena do reservoáru s BGE a je použita kapilára s velmi malým vnitřním průměrem. Předpokladem je, že malý i.d. kapiláry dává vznik tak vysokému elektrickému odporu, že dojde k poklesu použitého separačního napětí [46].

- Potenciometrie

Detekce je založena na změně napětí mezi měrnou (indikační) a srovnávací (referenční) elektrodou. Změna napětí je vyvolána přítomností analytu a je přímo úměrná logaritmu jeho koncentrace ve vzorku. Je dosaženo velmi rychlé odpovědi detektoru a nedochází tak k deformaci tvaru píku. Jde o univerzální typ detektoru. V případě, že jsou použity iontově selektivní elektrody, je detektor selektivní. Potenciometrické detektory dosahují extrémní citlivosti. Jsou schopné detekovat malá množství iontů v malém objemu vzorku. Nevýhodou je omezená životnost senzoru a zdlouhavá manipulace se senzorem před jeho použitím v systému [35].

- Amperometrie

Detekce je založena na redoxních reakcích. Mezi analytem a pracovní elektrodou dochází k přenosu elektronů a na pracovní elektrodě tak vzniká elektrický proud. Hodnota generovaného proudu je přímo úměrná koncentraci analytu ve vzorku. Nevýhodou této detekce je skutečnost, že postupně dochází k zanášení indikační elektrody adsorbovaným analytem nebo produkty jeho elektrolýzy, následkem je pokles přenosu elektronů a vznik interferencí. Řešením je výběr vhodného materiálu elektrody nebo využití pulzní amperometrické detekce (PAD). U PAD dochází nejdříve k detekci, následně je elektroda očištěna a reaktivována [35].

Amperometrickou detekci je možné použít jen pro analyty, které jsou snadno oxidovatelné na indikační elektrodě. Jde pouze o omezenou skupinu analytů jako jsou katecholaminy, pyrokatechol nebo vitamin B₆. Další nevýhodou je, že amperometrické a potenciometrické detektory nejsou běžně komerčně dostupné [36].

- Konduktometrie

Detekce je založena na změně elektrické vodivosti roztoku mezi elektrodami při průchodu analytů detektorem. Tato změna je přímo úměrná koncentraci analytů. Konduktometrický detektor umožňuje detekci anorganických iontů a některých organických iontů [43]. Jde o univerzální detektor. Tento typ detektoru může být použit ve třech různých módech:

1) měrná elektroda je v přímém kontaktu s analyty

Za použití on – column módu, jsou dva platinové drátky vloženy skrz stěnu kapiláry do BGE. Na tyto elektrody se vloží napětí a při průchodu zóny analytu je zaznamenána změna vodivosti. Za použití end – column módu se měří změna vodivosti mezi měrnou elektrodou umístěnou blízko výstupu kapiláry a elektrodou umístěnou za tímto výstupem. V obou případech je elektroda v přímém kontaktu s BGE [43]. Jestliže je BGE nekompatibilní s elektrodou je naměřený signál nestabilní. Řešením může být použití bezkontaktního vodivostního detektoru [3].

2) bezkontaktní vodivostní detektor (C⁴D, capacitively coupled contactless conductivity detector)

Tento typ detektoru je tvořen ze dvou kovových trubiček – elektrod (o délce 0,2 – 2 cm a i.d. 0,4 mm, vzdálenost mezi elektrodami je 0,2 – 2 mm), skrz které prochází separační kapilára. Na jednu z elektrod jsou vloženy oscilace o frekvenci 75 – 300 kHz [8]. Při průchodu analytu jsou zaznamenány změny ve vodivosti. Tyto změny jsou detekovány v prostoru mezi elektrodami. Výhodou tohoto systému je, že se elektrody mohou libovolně posunovat po kapiláře. Limit detekce pro anorganické ionty je u tohoto systému 4 ppb pro Li⁺ a NH₄⁺ a 10 ppb pro Cl⁻ [43].

3) potlačení vodivosti BGE

Součástí systému je tlumič (supresor), který je tvořen z iontově výměnné membrány ponořené do regeneračního roztoku. Jako regenerační roztok se používá buď zředěná kyselina sírová (pro anorganické ionty) nebo kyselina boritá (pro organické ionty). V případě analýzy aniontů dochází v membráně k výměně kationtů a při analýze kationtů pak výměně aniontů [47]. V tlumiči jsou z analyzovaných iontů vytvořeny kyseliny (např. boritan sodný – kyselina boritá) [43].

Příklady použití konduktometrické detekce:

- Stanovení **pancuronium** (PM) a **vecuronium** (VM) bromidu ve farmaceutických injekčních přípravcích. Pancuronium a vecuronium patří mezi nervosvalové blokátory používané v anesteziologii. Mohou být také zneužívány např. pro sebevražedné účely. Tato zpráva popisuje vůbec první analýzu pancuroniumu a vecuroniumu pomocí kapilární elektroforézy (separační podmínky viz tabulka 7). Výsledky dosažené spojením CE/C⁴D ukazují možnost použití pro kontrolu kvality ve farmaceutických přípravcích. Citlivost metody však není dostatečná pro použití ve forenzní analýze [48].
- Bezkontaktní vodivostní detektor byl také použit pro detekci **suxamethonium** chloridu stanovovaného ve farmaceutických produktech. Příklad je zmíněn již v kapitole 2.2.1 Organická rozpouštědla a separační podmínky jsou uvedeny v tabulce 2 [8].
- Analýza **tetramethylamoniových solí** (TMA⁺) jako jsou např. 2-(chloroethyl)trimethylamonium (CIETMA⁺), tetraethylamonium (TEA⁺), tetrapropylamonium (TPA⁺) a tetrabutylamonium (TBA⁺). Separační účinnost byla zlepšena přidávkou aniontového polymeru poly(sodium-4-styrensulfát) (PSSS) do základního elektrolytu (viz tabulka 7). Analyty interagují s polymerem a je tak snížena jejich elektroforetická pohyblivost. S rostoucí koncentrací polymeru v BGE se mobilita analytu snižuje, je tak dosaženo vyššího rozlišení [49].

- Detekce analyzované **směsi aniontů** ($C_6SO_3^-$, $C_8SO_3^-$, $C_{10}SO_3^-$, $C_{12}SO_3^-$) a **kationtů** (CIETMA⁺, TBA⁺, TEA⁺ a tetrahexylamonium bromid THA⁺). Pro současné stanovení kationtů i aniontů byl použit jednoduchý základní elektrolyt – fluorid sodný [50].

Tabulka 7: Separační podmínky analýz s použitím konduktometrické detekce

Analyt	BGE	Detekce	LOD	Citace
Pancuronium (PM) Vecuronium (VM)	50 mM borátový pufr, pH 9,5; 12 mg/ml HP- γ -CD	C ⁴ D	7 μ g/ml (PM) 6 μ g/ml (VM)	[48]
Kationické kvartérní amoniové soli	50 mM CHES, 20 mM LiOH, pH 9,2, 0,03% Triton X-100, 0,03 – 0,08 % PSSS	CD	-	[49]
Směs kationtů a aniontů	20 mM NaF, 1 mM TEA, 10% methanol	ICD	6 mg/l	[50]

HP- γ -CD – 2-hydroxypropyl- γ -cyklodextrin

CHES – 2-[N-cyklohexylamino]-ethylsírová kyselina

TEA – triethanolamin

3.3.4 Hmotnostní spektrometrie (MS)

Tento systém je schopen identifikovat neznámé látky na základě poměru jejich hmotnosti a náboje (m/z) a současně poskytuje informaci o jejich struktuře [51].

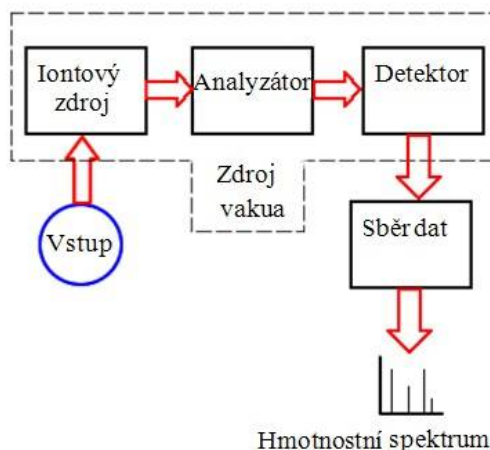
S výhodou se používá jako detekční technika pro separační metody jako jsou kapalinová a plynová chromatografie nebo kapilární elektroforéza. Je to univerzální destruktivní detektor.

Přístroj (obr. 12) je složen z několika částí:

- Iontový zdroj – zajišťuje převedení analytů na ionty, může být umístěn jak ve vakuu tak mimo něj. Nejčastěji používané iontové zdroje pro online ionizaci jsou elektroprej (ESI), ionsprej (ISP) a bombardování rychlými atomy (continuous flow fast atom bombardment CF-FAB). K off-line ionizaci se

využívají MALDI (matrix-assisted laser desorption ionization) a PD (plasma desorption).

- Analyzátor – umožňuje separaci iontů dle m/z
- Detektor – ionty dopadající na detektor jsou převedeny na signál



Obr. 12: Schéma hmotnostního spektrometru [52]

Výsledkem je hmotnostní spektrum, což je závislost intenzity píku na poměru hmotnosti a náboje m/z . Nejintenzivnějšímu signálu je přidělena hodnota 100 %. Analyty bez náboje nejsou zaznamenány.

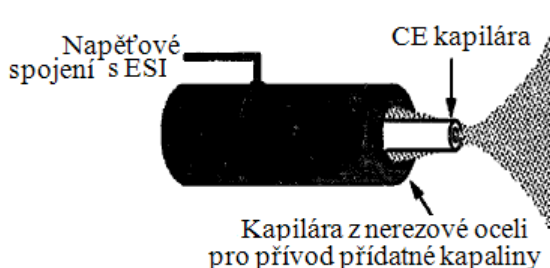
CE-MS představuje spojení vysoké separační účinnosti CE a identifikační a detekční schopnosti MS. Použití CE-MS bylo poprvé popsáno v roce 1987 Smithem. Pro spojení CE a MS je nutné vhodné rozhraní, které zajistí přenos separovaných analytů do MS detektoru bez ztráty separační účinnosti. Rozhraní vychází z LC-MS. Problémem je rozdíl mezi průtokovou rychlostí v CE (0 – 100 nl/min.) a mezi průtokem, se kterým pracuje LC-MS ($\mu\text{l}/\text{min.}$). Řešením je přívod přídavné kapaliny, která by měla mít vysoký obsah organických rozpouštědel, aby bylo dosaženo snadného a rychlého odpaření během ionizace, současně ale musí být dostatečně vodivá.

Dalším rozdílem od klasické CE je, že katodický konec kapiláry není vložen do reservoáru s pufrem, ale je součástí MS rozhraní. Je proto nutné zajistit uzavření elektrického obvodu mezi pufrem a katodou [53, 54].

Rozhraní používaná v CE-MS:

- **Sheath flow**

Kapilára je prodloužena až k iontovému zdroji (obr. 13). Na katodickém konci je nanesen povlak z nerezové oceli, který zajišťuje uzavření elektrického obvodu mezi kapilárou a pufrem. Je zde přiváděna přídatná kapalina, která kompenzuje nízký průtok CE. Nevýhodou představuje nutnost přídavku iontových nebo neutrálních látek obsažených v přídatné kapalině, které soutěží s analyty o nabití iontovým zdrojem. Není tak dosaženo maximální citlivosti. Složení přídatné kapaliny ovlivňuje migrační čas analytů. Sheath flow rozhraní je zobrazeno na obrázku 13 [53]. Toto rozhraní se používá v kombinaci s elektrosprejem (ESI), ionsprejem (ISP) nebo continuous-flow fast atom bombardment (CF-FAB) iontovými zdroji.



Obr. 13: Sheath flow rozhraní

- **Sheathless**

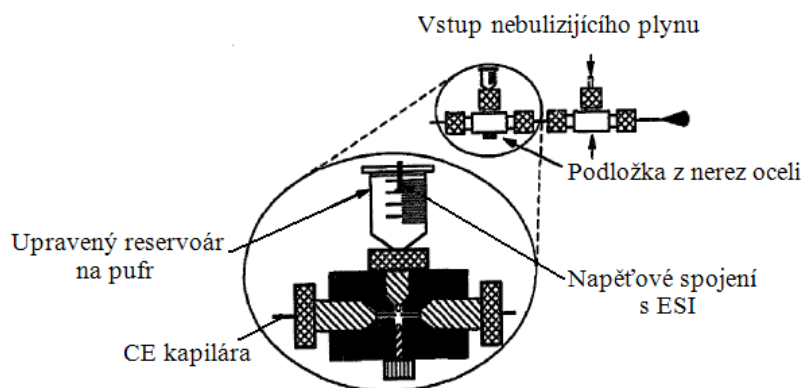
CE kapilára je prodloužená a zúžená do špice. Je dosaženo stabilního sprejování ESI. K uzavření elektrického obvodu je kapilára potažena zlatým povlakem. Místo přídatné kapaliny je zde použit přídatný plyn (SF_6), který potlačuje tvorbu koronárního výboje na sprejovací špici. Sheathless rozhraní je často použito ve spojení s ESI. Alternativou tohoto rozhraní může být použití zlaté elektrody ve formě drátu, který spojuje ESI jehlu a CE kapiláru, čímž je uzavřen elektrický obvod. Sheathless rozhraní (obr. 14) je vhodné pro analýzu vodných roztoků proteinů.



Obr. 14: Sheathless rozhraní

- **Liquid junction**

Toto rozhraní (obr. 15) je používáno pro ionizaci ionsprejem (ISP). Konec kapiláry a ISP jehly jsou umístěny proti sobě ve vzdálenosti 10 – 25 μm ve středu podložky z nerezové oceli. Na horní části je rezervoár s upravující (make-up) kapalinou a spodní část podložky je určena k upravení vzdálenosti mezi jehlou a kapilárním koncem. Spojení ionspreje a liquid junction je vhodné pro analýzu směsi pesticidů, azobarviv, některých tenzidů nebo zbytků léčiv v moči.



Obr. 15: Liquid junction

Pro CE-MS musí být vybrán vhodný pufr. Složení pufru ovlivňuje ionizaci. Pufr musí být dostatečně těkavý, aby bylo zabráněno zanesení MS použitím málo těkavých solí. Nejčastěji používané pufrы jsou acetát amonný, trifluoroctová kyselina nebo kyselina mravenčí. Méně často používané pufrы jsou Tris, Trisma nebo fosfát [54].

Spojení CE-MS není vhodné pro rutinní použití. Hlavně z důvodu nízké koncentrační citlivosti CE. Proto je vhodné používat online koncentrační metody, např.

spojení s izotachoforézou (např. ITP-CE-ESI-MS) nebo chromatografií, případně použit MS s citlivějšími analyzátory jako jsou např. analyzátor doby letu (time of flight, TOF), iontová past (ion trap IT) nebo iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací (Fourier transform ion cyclotron resonance FT-ICR). Dalším problémem je značné kolísání dosažených migračních časů analytů v závislosti na změně teploty [53].

CE-MS je vhodná technika pro analýzu vzorků životního prostředí, pro biochemické a biologické vzorky nebo farmakokinetické studie [53].

Technika CE-MS byla použita (viz tabulka 8) pro analýzu kvartérních amoniových solí a to konkrétně:

- Separace herbicidů **paraquatu** a **diquatu**. Spojení CE-MS poskytuje dostatečnou citlivost a spolehlivost v identifikaci látek. Separace byla provedena během 7 – 10 minut. Pro stanovení migračního času analytů byla použita UV detekce a jako marker EOF byl použit fenol. Fenol je snadno dostupný v čisté formě, je snadno detekovatelný pomocí UV detekce a není ionizován při pH použitém při separaci (pH 3,9). Nejmenší množství paraquatu a diquatu stanovené za těchto podmínek bylo 200 µg/l. Použitím prekoncentračních technik lze tento limit ještě snížit [55].
- Stanovení **BAC** a jeho homologů v očních kapkách. Zde byla poprvé pro stanovení těchto látek použita kombinace CE-MS. Byla provedena detekce pomocí MS a MS/MS a výsledky byly porovnány. Metoda CE-MS/MS poskytuje výsledky srovnatelné s LC-MS/MS, bylo zde dosaženo LOD = 0,5 mg/l. CE-MS/MS je možné použít pro stanovení BAC ve farmaceutických přípravcích [56].

Tabulka 8: Separační podmínky pro CE-MS analýzu

Analyt	BGE	Detekce	LOD	Citace
Paraquat diquat	5 mM acetátový pufr, pH 3,9, 50% methanol	MS (ESI)	200 µg/l	[55]
BAC	50 mM acetátový pufr, pH 4,5 80% ACN	MS/IT (ESI)	0,8 – 1,3 mg/l	[56]

4 Kapalinová chromatografie

4.1 Princip metody

Kapalinová chromatografie (LC) se řadí mezi chromatografické separační metody. Separace analytů probíhá v kolonách a je založena na neustálém ustalování rovnováhy rozdělování separovaných látek mezi nepohyblivou stacionární fází a pohyblivou mobilní fází. Mobilní fáze, v tomto případě kapalina, unáší analyty kolonou, které interagují se stacionární fází a jsou jí na určitou dobu zadržovány. Tato doba závisí na síle interakcí, tedy na afinitě analytů ke stacionární fází, ale do značné míry je ovlivněna také složením mobilní fáze.

Klasická kapalinová chromatografie dala základ vysoce účinné kapalinové chromatografii (High Performance Liquid Chromatography HPLC). Vysoké účinnosti je dosaženo použitím sorbentu o malé velikosti částic (běžně 3 až 10 µm). Malá velikost částic klade vysoký odpor protékající mobilní fází, je proto nutné pracovat za vysokého tlaku. Kapalinová chromatografie je vhodná pro separaci netěkavých, termolabilních nebo polárních analytů [57].

4.1.1 Instrumentace

Kapalinový chromatograf (obr. 16) je složen z následujících částí:

- Zásobník mobilní fáze
Mobilní fáze je čerpána ze zásobních skleněných lahví přes teflonové hadičky

procházející skrz plastový uzávěr [58].

- **Odplyňovač**

U HPLC jsou kladeny vysoké požadavky na čistotu rozpouštědel. Prachové částice nebo jiné mechanické nečistoty neprojdou kolonou, zvyšují tak tlak v systému a zároveň snižují separační účinnost. Přípravená mobilní fáze je před použitím filtrována. Před vstupem do HPLC systému je pak odplyněna a to – zahřátím, probubláním inertním plynem (He, Ar), vakuovou odplyňovací filtrací nebo sonifikací [58, 59].

- **Čerpadlo**

Přívod mobilní fáze zajišťuje čerpadlo, kterým je možno docílit průtoku v rozmezí mikrolitrů až jednotek mililitrů za minutu. Čerpadla mohou být membránová nebo pístová a jsou nejčastěji vyrobena z nerezové oceli, plastu nebo keramiky. Na čerpadlo jsou kladeny vysoké požadavky a to díky vysokým tlakům v systému (cca 40 MPa). Pulzování mobilní fáze je menší než 1% [57].

- **Směšovací zařízení**

Separace analytů může být dosaženo použitím mobilní fáze o stále stejném složení (izokratická eluce), nebo může být použito směšovací zařízení k plynulé nebo skokové změně složení MF během analýzy (gradientová eluce). [57].

- **Dávkovač vzorku**

K nástřiku vzorku se používají dávkovací ventily nebo automatické dávkovače (autosamplery). Při použití dávkovacího ventilu je dávkován vnitřní objem ventilu, nebo je možné začlenit do systému dávkovací smyčku a dávkovat objem této smyčky (0,2 – 2000 μ l). Při použití autosamplery je vzorek nadávkován injekční stříkačkou z vialky uzavřené septem. Injekční stříkačka se může pohybovat od jedné vialky ke druhé, nebo se mohou pohybovat vialky se vzorky a injekční stříkačka je na stálém místě [61]. Běžně se dávkuje 2 – 20 μ l vzorku [60].

- Předkolona

Předkolony jsou umístěny těsně před analytickou kolonou. Zachycují balastní látky, které by mohly kolonu poškodit a prodlužují tak její životnost. Náplň předkolon musí být stejná jako u separační kolony [58].

- Kolona

Kolony použité pro separaci jsou z nerezové oceli. Rutinně používané analytické kolony mají délku 10, 15 nebo 25 cm a vnitřní průměr 4 - 6 mm. Pro rychlé analýzy se používají kolony kratší, které dosahují délky jen 3 cm.

Kolony mohou být náplňové nebo monolitické [57].

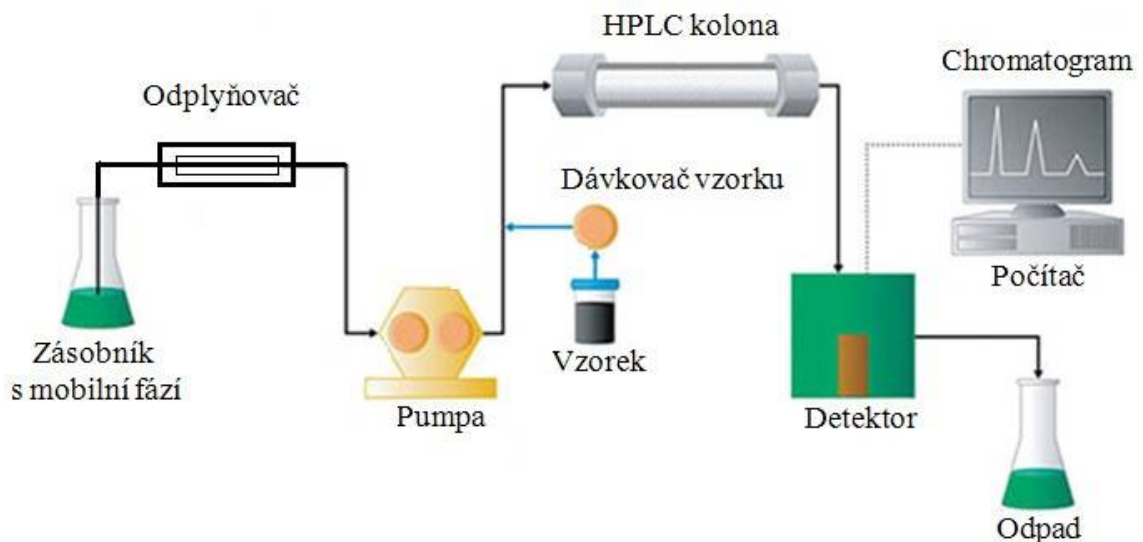
Pomocí frit je v koloně uzavřena stacionární fáze. Nejčastěji jde o částice silikagelu (normální fáze) o velikosti 3 – 10 μm . Silikagel může být

modifikován navázáním alkylových řetězců např. C_8 nebo C_{18} (reverzní fáze).

Jako stacionární fáze mohou být dále použity částice oxidu hlinitého, chemicky vázané stacionární fáze (kyanopropyl, aminopropyl, diol...), monolity nebo

oxid zirkoničitý atd. [61]. Výběr stacionární fáze se odvíjí od povahy

separovaných látek.



Obr. 16: Instrumentace HPLC (převzato a upraveno z [58, 62])

4.1.2 Separace

Výběr MF a SF se odvíjí od povahy analyzovaných látek. Separace analytů je založena na vzájemných interakcích mezi analytem, stacionární fází a mobilní fází. Při separaci se mohou uplatňovat hydrofobní interakce (van der Waalsovy síly), interakce dipól-dipól (chirální separace), H-vazby nebo elektrostatické interakce.

Separované analyty jsou eluovány v zónách, které jsou zaznamenány na chromatogramu ve formě píku. Doba od nástřiku vzorku po dosažení maxima píku se označuje jako **retenční (eluční) čas** a objem, který za tuto dobu proteče kolonou je **retenční (eluční) objem** [61]. Plocha píku odpovídá množství analytu ve vzorku (kvantitativní analýza) a retenční čas slouží k identifikaci neznámé látky (kvalitativní analýza).

Separční účinnost kolony je vyjádřena **počtem teoretických pater** N . Teoretické patro je část kolony, ve které dochází k ustanovení rovnováhy mezi mobilní a stacionární fází. Délka této části kolony je vyjádřena **výškovým ekvivalentem teoretického patra** H . Obecně platí, že čím je počet teoretických pater vyšší a čím je výškový ekvivalent teoretického patra nižší, tím je vyšší separční účinnost kolony (vztah 4) [57].

$$N = L/H \quad (4)$$

Kde H je výškový ekvivalent teoretického patra, N je počet teoretických pater a L je délka kolony.

Separční účinnost kolony je možné ovlivnit použitým sorbentem. S klesající velikostí částic sorbentu roste separční účinnost. Toho využívá UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography), kde se používají částice menší než 2 μm . Použitím menších částic se v systému zvyšuje tlak, který u UPLC dosahuje až 100 MPa.

4.2 Separační přístupy v HPLC

Následující část je zaměřena na přístupy, které se aplikují při separaci kvartérních amoniových sloučenin. Jde především o používané stacionární fáze, separační módy, detektory a úpravy vzorků zvyšující citlivost.

4.2.1 Separační módy

Ion-párová chromatografie

Použití ion-párové chromatografie je založeno na přidavku ion-párového činidla (protiiontu), které interaguje s kvartérními amoniovými kationty. Vzniká tak nepolární komplex, který vykazuje vyšší retenci na nepolární stacionární fázi než původní analyt. Je tak dosaženo lepšího tvaru píku a rozlišení analyzovaných látek. Přídavkem činidla se téměř neovlivní separace neutrálních látek. Obecně platí, že jestliže je analyzovanou látkou kyselina, pak se jako ion-párové činidlo volí kvartérní amoniové soli např. tetrabutylamoniumfosfát nebo cetyltrimethylamoniumsulfát. Pro bazické analyty se přidávají sodné soli silných organických kyselin např. pentan-, hexan-, heptan-, oktan- a dodekansulfonáty [61]. Ion-párová chromatografie byla aplikována pro stanovení (viz tabulka 9):

- **C₁₂-, C₁₄- a C₁₆-trimethylamonium chloridu** za použití reverzní stacionární fáze (styren-divinylbenzen). K detekci byl použit konduktometrický detektor s mikromembránovým supresorem. Metoda je rychlá, jednoduchá, spolehlivá a je možné ji použít pro rutinní stanovení těchto látek v hematologických lyzačních roztocích, kde se tyto látky používají k lýze erytrocytů. K dosažení optimálního výsledků lyzačních roztoků je důležitý vzájemný poměr těchto solí [63].
- **benzyl dimethyldodecylamonium bromidu** (benzalkonium bromid - BAB) v komerčních desinfekčních prostředcích. Obsah této látky je nutné monitorovat, protože látka může být toxická pro člověka, jestliže je překročeno povolené množství (např. v Číně je max. povolená hodnota 0,2 % BAB v přípravcích na

ruce a pleť). Opět byla použita reverzní stacionární fáze s použitím C₁₈ alkylových řetězců [64].

- **herbicidů** (paraquat, diquat, difenzoquat, mepiquat, chlormequat) v pitné vodě s přídavkem těchto herbicidů. K detekci byl použit MS detektor. Pro dosažení kompatibility s tímto detektorem je nutné používat vhodná dostatečně těkavá ion-párová činidla, jako jsou například heptafluoromáselná kyselina (HFBA), pentafluoropropionová kyselina nebo trifluorooctová kyselina. Použitím extrakce na tuhé fázi (SPE) je dosaženo vysokého limitu detekce a metoda je tak vhodná pro stanovení herbicidů v pitné vodě [65].
- **léčiv** (atrakurium, bretylium, edrofonium, ipratropium, mivakurium, neostigmin, pancuronium a rokuronium) a herbicidů (difenzoquat, diquat a paraquat) v plné krvi. Do vzorků plné krve (naředěna fosfátovým pufrům - 1 ml krve : 4 ml pufru) byly přidány standardy rozpuštěné v methanolu. Krev se promíchala a zcentrifugovala. K extrakci analytů z krve byla použita SPE extrakce se sorbentem na bázi katexu. Analyty byly eluovány roztokem HCl/methanol (70:30), následně byla organická fáze odpařena a vzorky rozpuštěny v 1 ml mobilní fáze. Metoda LC/MS/MS byla aplikována na stanovení paraquatu v tělních tekutinách pacienta po náhodné smrtelné otravě herbicidem [66].
- stanovení **desinfekčních látek** jako kontaminantů v mléce. Konkrétně šlo o směs C₁₂-, C₁₄- a C₁₆-dimethylbenzylamonium chloridu. Mléko (22 vzorků) bylo získáno z farem. Ke stanovení těchto látek je nutné nejdříve odstranit z mléka tuk (zde komerčně odstředěné mléko s konečným obsahem 2% tuku), z důvodu kompetice ion-párového činidla a tuku o vazbu na dusík kvartérních amoniových solí, což dává falešně nízké hodnoty analytů ve vzorku. Analýza prokázala přítomnost těchto kontaminant pouze v jednom vzorku [67].

Tabulka 9: Příklady použití ion-párové chromatografie

Analyt	SF	MF	Ionpárové činidlo	Detekce	LOD	Citace
Alkyltrimethylamonium chlorid	DVB	A: MSA/ACN v H ₂ O (50:50) B:MSA/ACN v H ₂ O (80:20)	MSA	CD	-	[63]
Benzalkonium bromid	C ₁₈	ACN : 4 mM oktansulfonát sodný – 0,02 mM octan sodný (80:20), pH 5,2	Oktan-sulfonát sodný	UV (262 nm)	1,6 mg/L	[64]
Herbicity	C ₈	A: 15 mM HFBA (pH 3,3) B: ACN (gradientová eluce)	HFBA	MS/Q (ESI x APCI)	ESI: 0,05 – 4,7 µg/l APCI: 0,05 – 1,8 µg/l	[65]
Léčiva a herbicity	C ₁₈	A: 15 mM HFBA-20 mM mravenčan amonný, pH 3,30 B:100% methanol	HFBA	MS/MS (ESI)	3,6 – 20,4 ng/ml*	[66]
Alkyldimethylbenzyl-amonium chlorid	C ₁₈	95% ACN, 5% 1M chloristan sodný, pH 2,4	Pentan-sulfonát sodný	DAD (217 nm)	-	[67]
Herbicity	C ₈	A: 15 mM HFBA, pH 3,3 B:ACN (gradientová eluce)	HFBA	MS/Q (ESI)	-	[80]
Paraquat, diquat	C ₈	A: HFBA B:ACN, methanol (75:25)	HFBA	MS/MS (ESI)	4 µg/kg	[82]

DVB – divinylbenzen

CD – konduktometrická detekce

ACN – acetonitril

*hodnoty LOD pro standardy

MSA – methansulfonová kyselina

HFBA – heptafluoromáselná kyselina

DAD – detektor diodového pole

Iontově výměnná chromatografie

Podstatou separace je výměna iontů mezi stacionární fází a mobilní fází. Stacionární fázi představují ionexy. Jde o látky makromolekulární povahy s navázanými bazickými nebo kyselými funkčními skupinami. Na základě toho je také dělíme na katexy a anexy. V případě kvartérních amoniových solí se používají katexy. Dochází tedy k výměně kationtů vázaných na kyselých funkčních skupinách stacionární fáze za kationty v mobilní fázi (analyty). Podstatou separace je rozdílná afinita analytů k ionexu, přičemž silněji se váží ionty s větším nábojem a objemem. Iontově výměnná chromatografie byla použita pro:

- Stanovení **chlormequatu** v hruškách. Chlormequat se používá jako účinný regulátor růstu obilovin a jiných zemědělských plodin. Vliv chlormequatu na lidské zdraví není dostatečně prozkoumán. Hrušky byly rozmixovány a analyty se uvolnily okyselením vzorku kyselinou chlorovodíkovou. Po centrifugaci se supernatant zfiltraval. Do takto připravených vzorků byl přidán standard chlormequatu. Metoda je nenáročná na přípravu vzorku, rychlá a finančně nenáročná. Je možné ji použít pro rutinní stanovení zbytků chlormequatu v hruškách [68].
- Stanovení **alkylbetainu** a **kokamidopropylbetainu** v kosmetických čistících přípravcích. Tyto produkty obsahují směs neiontových, amfoterních a anionických tenzidů. Kvalita šamponů je ovlivněna především přítomností amfoterních tenzidů. Je tedy nutné vyvinout dostatečně účinnou metodu, která oddělí amfoterní tenzidy od ostatních. Zde byla použita stacionární fáze na bázi katexu, která nezachycuje neiontové a anionické tenzidy. Při velmi nízkém pH mobilní fáze nesou cílové analyty kladný náboj a je tak umožněna jejich retence. Metoda je rychlá, robustní, přesná a je vhodná pro rutinní stanovení těchto látek v kosmetických produktech [31].

Kokamidopropylbetain je syntetický tenzid připravený z kokosového oleje a dimethylaminopropylaminu. Struktura vychází z betainů, které se přirozeně vyskytují v organismu. Betainy jsou ve vysoké koncentraci přítomné v cytoplasmě a uplatňují se při ochraně buněčných membrán před působením vysoké teploty a anorganických iontů. Jde tedy o velmi významné látky. Bylo

popsáno stanovení betainů v biologických vzorcích pomocí HPLC s UV detekcí [69], stanovení obsahu betainu v korálech a v zévě obrovské pomocí HPLC-MS s využitím pentafluorofenylpropylové stacionární fáze [70] nebo může být k jejich charakterizaci použita kombinace MS/MS [71].

Tabulka 10: Příklady použití iontově výměnné chromatografie a HILIC

Analyt	SF	MF	Detekce	LOD	Citace
Chlormequat	IonPac CS12A	20 mM kys. sírová, 4% ACN	MS (ESI)	0,5 mg/kg	[68]
Alkylbetain kokamidopropylbetain	Nucleosil 100-5 SA	70% ACN, 30% 0,05 M hydroxid litný, pH 1,6	DAD (210 nm)	-	[31]
Chlormequat mepiquat	Atlantis HILIC	A: ACN B: 50 mM kys. mravenčí, mravenčan amonný, pH 3,75 (gradientová eluce)	MS/MS (ESI)	0,2 – 1,5 pg (CQ) 0,3 – 2,5 pg (MQ)	[72]

HILIC (Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography)

Jde o kapalinovou chromatografii, která představuje rozhraní mezi separací na normálních a reverzních fázích. Stacionární fáze má podobné vlastnosti jako u normálních fází - je polární, jde o modifikovaný silikagel, na který je navázán nejčastěji aminopropyl, diol, zwitterionty nebo kyanopropyl. Mobilní fáze je vodná, nebo je tvořena pufrem s vysokým obsahem organického činidla [61]. Nejčastěji jde o směs acetonitrilu a vody. Voda přítomná v mobilní fázi (cca 0,5 – 1%) vytváří na povrchu stacionární fáze vrstvu, kde dochází k separaci analytů. Při separaci se uplatňuje rozdělování mezi dvě kapaliny a současně adsorpce. Analyty se chovají podobně jako při separaci na normálních fázích, tzn., že polární látky jsou zadržovány na koloně více než látky méně polární. Z kolony jsou analyty eluovány zvýšením obsahu vody

v mobilní fázi. Pořadí eluce analytů odpovídá jejich rostoucí hydrofilnosti (opačné pořadí než u reverzní fáze).

Obecně lze HILIC použít pro analýzu karbohydrátů, aminokyselin, peptidů a dalších polárních, iontových nebo neiontových látek.

Při použití této metody k separaci kvartérních amoniových iontů není nutné přidávat do mobilní fáze ion-párové činidlo, které je ve většině případů nekompatibilní s MS. To bylo s výhodou aplikováno pro stanovení **mepiquatu** a **chlormequatu** (tabulka 10) v nejrůznějších potravinách – káva, chleba, dětská výživa, zelenina, ovoce, džus, pivo... Vzorby byly homogenizovány a extrahovány směsí methanol: mravenčan amonný (1:4) a centrifugovány. Následovala SPE (C₁₈) extrakce. Separace je do značné míry ovlivněna iontovou silou roztoku a použitým pH. S rostoucí iontovou silou (koncentrací pufru) jsou píky užší a zlepšuje se jejich symetrie. Při spojení s MS je ale nutné se vysokých koncentrací vyvarovat, aby nedošlo k zanesení iontového zdroje.

Při pH > 4,25 roste retenční čas analytu a píky jsou široké. Pokles separační účinnosti je zapříčiněn interakcí analytu s ionizovanými silanolovými skupinami. Metoda byla vyvinuta jako náhrada ion-párové chromatografie, která je nejvíce používaná pro analýzu tohoto typu látek [72].

4.2.2 Stacionární fáze

A) Reverzní fáze (RP-HPLC)

Stacionární fází je modifikovaný silikagel s navázanými různě dlouhými alkylovými řetězci. Mobilní fáze je složena z polárních rozpouštědel, je tak šetrnější k životnímu prostředí oproti provedení na normálních fázích a také méně nebezpečná pro operátora. Separace je založena na hydrofobních interakcích mezi alkylovými řetězci stacionární fáze a analytů. V menší míře se mohou uplatňovat také iontové interakce mezi nabitým dusíkem a ionizovanými silanolovými skupinami. RP-HPLC byla použita např. pro separaci:

- **Lidokainu** (2-(diethylamino)-N-(2,6-dimethylfenyl)-acetamid) a **cetrimonium bromidu**. Kombinace těchto látek se využívá k léčbě faryngeální iritace. Lidokain je velmi polární látka, která je silně zadržována na koloně, což se projevuje chvostováním píků. Retence je snížena použitím MF o nízkém pH,

kdy klesá stupeň ionizace silanolových skupin, nebo přidavkem modifikačních činidel s opačným nábojem než má analyt. Vhodným řešením je použití RP-HPLC, která umožňuje současné stanovení lidokainu a cetrimonium bromidu a nedochází k interferencím způsobeným barvivy a zlepšovači chuti ve farmaceutických přípravcích. Metoda je rychlá a vhodná pro rutinní stanovení těchto látek v lécích. Práce v nízké oblasti pH umožňuje kompletní ionizaci lidokainu, čímž je dosaženo ostrých a úzkých píků [73].

- **BAC** v očních kapkách s azitromycinem. Ve vyšších koncentracích může být BAC pro člověka toxický (např. poškození nosní sliznice). Vliv na lidské oko není dosud znám, z bezpečnostních důvodů se v očních kapkách nepoužívají koncentrace vyšší než 0,008%. Metoda pro monitorování koncentrace BAC musí být proto dostatečně citlivá k detekci velmi nízkých koncentrací. K dosažení optimálního účinku očních kapek je nutné udržet koncentraci azitromycinu v oku odpovídající koncentraci nutné k inhibici růstu 90 % mikroorganismů (MIC₉₀). Využívá se poměrně viskózních roztoků. Vyšší viskozita vzorku působí problémy při filtraci a přímý nástřik viskózního roztoku také není možný kvůli možnosti poškození kolony. Byly zde srovnány dva způsoby přípravy vzorku, a to extrakce (liquid-liquid extrakce – LLE, methanol:ethylacetát 1:1) a deproteinizace (precipitace polymeru přidavkem methanolu). Obě procedury dávají uspokojivé výsledky, ale deproteinizace je rychlejší. Použité HPLC podmínky (viz tabulka 11) jsou vhodné pro monitorování hladin BAC v očních kapkách s obsahem viskózních činidel [74].
- **BAC** v komerčně dostupných prostředcích. Byl zde zkoušen vliv délky alkylových řetězců SF (C₄ x C₈). Retenční časy homologů byly v obou případech velmi blízké (rozdíl v časech byl přibližně 1 minuta). Platí, že s rostoucí délkou řetězce SF roste retenční čas (hydrofobní interakce). K analýze byla vybrána krátká (5 cm) butylová kolona. Použité podmínky dovolují odseparování degradačních produktů BAC vznikajících za stresových podmínek (oxidace, světlo, zahřívání, kyselé nebo bazické prostředí), což umožňuje přesné stanovení obsahu jednotlivých homologů přítomných v produktu [75].

Tabulka 11: Příklady separací na reverzních fázích

Analyt	SF	MF	Detekce	LOD	Citace
Lidokain, cetrimonium bromid	C ₁₈	ACN:voda (28:72), pH 2	UV (208 nm)	1 µg/ml (CB) 5 µg/ml (Lid.)	[73]
BAC	C ₁₈	MeOH:NaH ₂ PO ₄ (16:5)	UV (208 nm)	0,10 µg/ml	[74]
BAC	C ₄	A: ACN, 20 mM chlorid draselný (40:60) B:ACN	UV (214 nm)	0,25 µg/ml (C ₁₀) 0,5 µg/ml (C ₁₂) 0,5 µg/ml (C ₁₄ a C ₁₆)	[75]
Trospium	C ₁₈	Acetát amonný, ACN (20:80)	MS/MS (ESI)	-	[81]

B) Polymerní stacionární fáze

U reverzních fází s navázanými alkylovými řetězci jsou stále přítomny volné silanolové skupiny, které mohou zasahovat do separace analytů. Interakcím může předcházet end-capping (volné silanolové skupiny jsou zablokovány vazbou menších molekul jako např. trimethylchlorsilan), použití ion-párového činidla (většinou nekompatibilní s MS) nebo změna stacionární fáze. Jako stacionární fáze se mohou použít kopolymery styrenu a divinylbenzenu. Vykazují velmi dobré vlastnosti – odolnost v širokém rozmezí pH a vysokému obsahu organické složky v mobilní fázi. Tato SF byla použita pro stanovení léčiv (antrenyl, methylbenactyzin, mepenzolát, pipenzolát, clidinium, neostigmin, valethamat, isopropamid, propanthelin) v krevní plazmě. Extrakce analytu byla realizována přidávkem perchloroctové kyseliny jako ion-párového činidla. S analytem ale byly extrahovány i mastné kyseliny, které způsobují interference. U této aplikace je ještě nutné vyřešit problémy s extrakcí vzorku [76].

C) Kyanopropylová stacionární fáze

Pro stanovení kvartérních amoniových sloučenin se kromě již zmíněných reverzních fází s navázanými alkylovými řetězci používají kyanopropylové stacionární fáze. Retenční čas separovaných analytů je do značné míry ovlivněn stářím kolony. Např. na nové koloně je retenční čas BAC kratší než na koloně starší. Rozdíl časů může být až 7 minut [75]. Představuje to tedy určitou nevýhodu pro testy kontroly kvality. Kyanopropylová stacionární fáze byla použita pro separaci **BAC ve farmaceutických**

přípravcích (nosní sprej) s obsahem steroidních hormonů nebo proteinů [77].

Dále byla tato SF použita pro stanovení **BAC v krvi** u náhodných otrav herbicidy.

Sérum bylo naředěno vodou a následovala off-line SPE extrakce (C₁₈). K eluci analytů se použil roztok methanolu a ethylacetátu (1:1). Určení celkového množství BAC je vypočítáno z množství homologu C₁₂. Nevýhodou této metody je, že jestliže je požit neznámý vzorek, není možné určit celkovou hladinu BAC, protože množství C₁₂ v BAC je regulováno každou zemí zvlášť [78].

Kyanopropylová stacionární fáze byla také testována pro stanovení těchto látek (BAC) v očních kapkách. Bohužel přítomnost sulfamidu narušuje separaci těchto látek, což se projeví změnou tvaru píku. V tomto případě byla kyanopropylová SF nahrazena RP-C₁₈ kolonou [79].

Tabulka 12: Příklady použití kyanopropylové a pryskyřicové SF

Analyt	SF	MF	Detekce	LOD	Citace
BAC	CN	ACN, 0,075 M acetátový pufr (55:45) pH 5,	UV (262 nm)	-	[77]
BAC	CN	ACN, acetát sodný (48:52) pH5	UV (254 nm)	20 ng	[78]
Oxyfenonium bromid (antrenyl)	Pryskyřice (PRP-1)	ACN, 0,05 M acetát amonný	MS-MS (TSP)	1 ng/ml	[76]

TSP – termosprej

PRP-1 – polymerní reverzní fáze

CN – kyanopropylová SF

4.2.3 Extrakce

Ke zlepšení limitu detekce a minimalizování vlivu matrice se používají extrakční metody, které umožňují přechod analytu z jedné fáze do druhé. V případě HPLC je velmi rozšířená **extrakce na tuhé fázi** (solid-phase extraction – **SPE**). Princip spočívá v použití extrakčních kolonek s pevným sorbentem (modifikovaný silikagel), na kterém dochází k zachycení analytu. Balastní látky jsou z kolonky vymyty a zachycené analyty jsou z kolon eluovány použitím vhodného elučního činidla či rozpouštědla.

Extrakce může být provedena on-line nebo off-line. Použitím on-line extrakce je sníženo riziko kontaminace vzorku a je dosaženo i nižšího limitu detekce než u off-line provedení. On-line SPE-LC-MS byla použita pro analýzu herbicidů (chlormequat CQ, mepiquat MQ, diquat DQ, paraquat PQ, difenzoquat DF) v pitné vodě. Pro extrakci byly použity extrakční disky s C₁₈. Porovnání limitů detekce dosažených s on-line a off-line SPE znázorňuje tabulka 13 [80].

Tabulka 13: Srovnání limitů detekce dosažených za použití on-line a off-line SPE a bez extrakce [80]

Analyt	LOD (ng/ml)		
	On-line SPE-LC-ESI-MS	Off-line SPE-LC-ESI-MS	LC-ESI-MS bez SPE
CQ	20	100	900
MQ	10	100	400
DQ	50	900	6000
PQ	60	4700	11000
DF	5	50	100

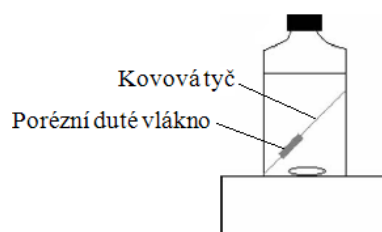
SPE byla také použita pro úpravu vzorků před LC-MS stanovením trospia v plazmě (podmínky separace viz tabulka 11). Směs 200 µl plazmy s přídavkem 200 µl 1% kyseliny fosforečné byla mechanicky protřepána, nanesena na SPE kolonku (HLB – hydrophilic-lipophilic balance) a následovala LC-MS analýza. Použitím SPE extrakce se minimalizuje vliv matrice a je prodloužena i životnost chromatografické kolony. Metoda je dostatečně citlivá (0,05 ng/ml) a přesná a je možné ji použít pro farmakokinetické studie [81].

Extrakce z kapaliny do kapaliny (liquid-liquid extrakce **LLE**) je založena na rozdělování analytu mezi dvě nemísitelné kapaliny. LLE byla použita pro extrakci herbicidů (paraquat a diquat) z olivového oleje. Extrakční směs tvoří n-hexan/10 mM HFBA. Po centrifugaci byla vodná složka použita pro LC-ESI-MS analýzu [82].

Modifikací LLE je tzv. **hollow-fiber liquid-phase microextraction (LPME)**. Princip extrakce spočívá v použití porézního dutého vlákna napuštěného vhodným organickým činidlem. Extrakce analytů je usnadněna přídavkem karboxylových kyselin, které umožňují tvorbu neutrálních iontových párů a usnadňují tak přechod do organické složky imobilizované v pórech vlákna. Analyty jsou z pórů eluovány methanolem a

použity pro LC-MS analýzu. LPME byla použita pro extrakci dikokodimethylamonium chloridu z odpadní vody.

K extrakci bylo použito 2cm duté vlákno o vnitřním průměru 600 μm . Vlákno bylo ošetřeno acetonem a navlečeno na kovovou tyč cca 4 cm od jejího spodního konce (obr. 17). Soustava je ponořena do roztoku s analytem. Extrakce (17 hodin) byla usnadněna mícháním roztoku magnetickým míchadlem. Po extrakci jsou analyty eluovány z pórů ponořením vlákna do methanolu a jsou připraveny pro LC-MS analýzu. LPME je vhodná pro analyty s vysokou teplotou varu, u nichž nehrozí odpařování analytů během extrakce, a pro roztoky s nižší viskozitou, které rychle difundují do organické imobilizované vrstvy [83].



Obr. 17: Schéma LPME

4.3 Možnosti detekce

Detektory používané v HPLC by měly být málo citlivé vůči složení mobilní fáze a současně dostatečně citlivé pro analyty. Nejpoužívanějším detektorem je stejně jako u CE **UV-Vis detektor**. Je vhodný pouze pro analyty s chromoforem. Pro dosažení co největší citlivosti detektoru je nutná dostatečně dlouhá optická dráha průtokové kvyety, kterou prochází paprsek [57]. UV detektor byl použit v těchto případech [64, 67, 73, 74, 75, 77, 78].

V případech, kdy není možné použít UV detektor, je alternativou **konduktometrický detektor (CD)**. Citlivost detektoru je možné zvýšit použitím supresoru (tlumiče), který snižuje vodivost mobilní fáze před vstupem do detektoru [84]. Tento způsob detekce je omezen pouze na nabitě látky.

Konduktometrický detektor byl použit k detekci následujících analytů: dodecyltrimethylamonium chlorid, cetyltrimethylamonium bromid, tetradecyldimethylbenzylamonium, stearyltrimethylamonium chlorid. K separaci těchto látek byla použita stacionární fáze na bázi hydrofilního organického polymeru. V tomto případě šlo o polyvinylalkohol. U této stacionární fáze se na retenci analytů podílejí adsorpční a rozdělovací separační mechanismy. S použitím supresoru a vhodného složení mobilní fáze bylo dosaženo mnohem vyšší citlivosti v porovnání s dříve publikovanými metodami využívající konduktometrický detektor v HPLC analýze kationických tenzidů [85].

Univerzálními detektory, které umožňují detekci jak nabitých tak nenabitých látek jsou refraktometrický detektor, ELSD (evaporative light scattering detector) a MS detektor.

Refraktometrický detektor (RI) je založen na měření rozdílných indexů lomu světla v mobilní fázi a v eluátu s analyty. Detektor je sice univerzální, snadno se používá, ale vykazuje poměrně nízkou citlivost (10^{-7} g/ml). Je nemožné jej také použít při gradientové eluci [57].

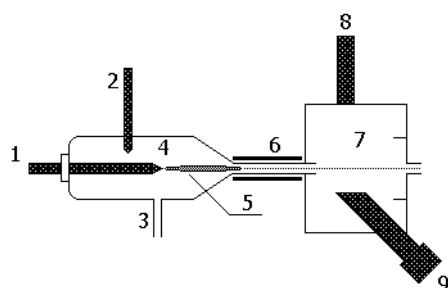
Refraktometrický detektor byl použit k detekci **kationických** (cetrimonium chlorid) a **neiontových tenzidů** (1-tetra-, 1-hexa-, 1-okta- a 1-eikosadekanol) obsažených v kosmetických přípravcích, konkrétně ve vlasových kondicionérech (podmínky separace viz tabulka 14). Cetrimonium chlorid je díky svým vlastnostem hojně využíván jako součást těchto přípravků. Interaguje s negativně nabitými aminokyselinami keratinu ve vlasech, čímž zabraňuje tvorbě statického náboje. Dále zabraňuje růstu bakterií a umožňuje odstranit tuky, oleje a nečistoty z vlasů.

Bylo testováno 9 různých přípravků s obsahem alespoň dvou testovaných látek. Vzorby byly homogenizovány, smíchány s methanolem (1 : 9) a před samotnou analýzou byly zfiltrány. Použitá mobilní fáze je velmi polární, je tedy nutné přidat ion-párové činidlo, aby nedocházelo k eluci cetrimonia v mrtvém elučním objemu. Metoda je vhodná pro kontrolu kvality kosmetických přípravků [86].

ELSD (obr. 18) dosahuje vyšší citlivosti v porovnání s refraktometrickým detektorem a je možné jej kombinovat s gradientovou elucí. Separační podmínky použité u ELSD je možné aplikovat také pro LC-ESI-MS analýzu. Oba detektory

vyžadují dostatečně tekavou MF. Nejčastěji se používá acetát amonný, mravenčan amonný nebo acetátový pufr. Oproti MS je tento detektor levnější a jsou zde nižší nároky na obsluhu.

Po vstupu mobilní fáze do ELSD dojde k jejímu zmlžení pomocí inertního plynu (dusík). Přebytečná mobilní fáze je ze zmlžené frakce odpařena v evaporační komůrce. Analyty pak vstupují do optické komůrky, kde je měřena intenzita částicemi rozptýleného světla [61].



- | | |
|-------------------------|----------------------|
| 1 vstup mobilní fáze | 6 evaporační komůrka |
| 2 zdroj inertního plynu | 7 optická komůrka |
| 3 odpad eluentu | 8 zdroj světla |
| 4 zmlžovač | 9 fotodetektor |
| 5 zmlčená směs | |

Obr. 18: Schéma ELSD [61]

Citlivost detektoru je ovlivněna velikostí a uniformností detekovaných kapek aerosolu. Velikost částic závisí na průtokové rychlosti mobilní fáze, její hustotě a viskozitě [61].

ELSD byl použit pro detekci **směsi** standardů **tenzidů** (lauryl pyridinium chlorid, lauryl benzyldimethylamonium chlorid, decylsulfát, dodecylsulfát, 10-, 11-, 12-, 13-benzensulfonát, Triton X-100) rozpuštěných v acetátu amonném s přidavkem acetonu. K separaci zde byla poprvé použita Acclaim Surfactant kolona, která dovoluje současnou separaci kationtů, aniontů a neiontových tenzidů. Na povrchu stacionární fáze jsou navázány hydrofobní alkylové řetězce, terciární aminoskupiny a polární amidoskupiny. Na separaci analytů se tak uplatňují hydrofobní interakce, dipól-dipól interakce a výměna aniontů.

Zásadní vliv na separaci zde má iontová síla MF a použité pH. S rostoucí koncentrací aniontu (acetátu) se snižuje retenční čas anionických tenzidů díky kompetici acetátu a analytu o vazbu na kvartérní aminoskupinu. Retence kationtových tenzidů se naopak zvyšuje, protože vytvářejí iontové páry s acetátem a při separaci se tak uplatňují hydrofobní interakce. S rostoucím pH mobilní fáze se snižuje ionizace kvartérních aminů na SF a klesá tak retence aniontů. U kationtových tenzidů se naopak retence zvyšuje. Spojení Acclaim Surfactant kolony a ELSD umožňuje separaci a detekci směsi různých tenzidů současně [84].

MS detektor byl charakterizován již u kapilární elektroforézy. Jak již bylo zmíněno, umožňuje současnou detekci a identifikaci analytů a vykazuje vysokou citlivost. Tento typ detektoru je velmi často používán pro detekci tenzidů [65, 66, 68, 72, 76, 80, 81, 82]. Překážkou pro rutinní použití pro detekci těchto látek jsou vysoké pořizovací náklady a nákladný provoz.

Tabulka 14: Separační podmínky pro analýzu tenzidů za použití různých detektorů

Analyty	SF	MF	Detekce	LOD	Citace
Cetrimonium chlorid	C ₁₈	0,1 M chloristan draselný, methanol:voda (95:5), pH 2,8	RI	10,4 mg/kg	[86]
DTMA, CTMA, TDDBA a STMA	PVA	ACN/voda (27%), 0,4 mM 4,4'-bipyridyl, 0,8 mM HCl	CD	0,03-0,05 μM	[85]
Kationické, anionické a neiontové tenzidy	Acclaim Surfactant kolona	A:ACN B: 0,1 M acetát amonný, pH 5,4	ELSD	-	[84]

DTMA-dodecyltrimethylamonium chlorid
 CTMA- cetyltrimethylamonium bromid
 TDDBA – tetradecyldimethylbenzylamonium
 STMA – stearyltrimethylamonium chlorid
 PVA – polyvinylalkohol

5 Závěrečné srovnání CE a HPLC

Kapilární elektroforéza je alternativní metodou k HPLC. Výhodou jsou obvykle kratší časy analýzy a menší spotřeba rozpouštědel. Nevýhodou je nižší přesnost oproti HPLC jak bylo prokázáno v následujících příkladech srovnávajících CE a HPLC.

- CE a HPLC byly použity pro separaci **BAC**. Obě techniky poskytují dostatečné rozlišení všech homologů (C_{12} , C_{14} a C_{16}). Citlivost za použití UV detektoru byla také srovnatelná. Nižší citlivost CE je zapříčiněna krátkou optickou dráhou detektoru, malým vnitřním objemem kapiláry a malým objemem dávkovaného vzorku, který činí jen 12,5 nl oproti HPLC, kde je objem vzorku 20 μ l. Výrazné rozdíly jsou v době analýzy. Zatímco při použití HPLC trvá analýza 25 minut, při použití CE je analýza ukončena po 5 minutách.

Přesnost metod byla stanovena na základě výsledků získaných po 5 nástřících provedených v rámci jednoho dne (intra-day) a na základě výsledků dosažených po opakování nástřiků v průběhu 5 dní. Výsledky jsou zobrazeny v tabulce 15 vyjádřené ve formě relativní směrodatné odchylky (RSD). Nižší přesnost CE je dána změnou vlastností kapiláry během analýzy. Přesnost může být zlepšena regenerací kapiláry po každých pěti nástřících [87].

Tabulka 15: Přesnost CE a HPLC [87]

Analyt	Den 1.	Den 2.	Den 3.	Den 4.	Den 5.	Interday
	HPLC					
C_{12}	2.38*	2.26	2.78	1.74	3.85	0.50
C_{14}	3.31	2.77	5.91	2.92	3.86	1.16
C_{16}	4.87	3.73	2.99	2.53	3.34	1.62
BAC	2.59	1.97	0.99	3.30	1.13	0.93
	HPCE					
C_{12}	11.06	12.46	3.37	8.10	8.30	3.57
C_{14}	0.96	1.82	4.02	5.19	9.37	19.86
C_{16}	6.63	6.47	6.55	9.20	—	9.01
BAC	4.67	2.30	3.40	5.90	—	21.01

* RSD %

- Vývoj CE metody pro stanovení **denatonium benzoátu** v Bitrexu. Denatonium se používá jako denaturační činidlo, které se přidává např. do rostlinných olejů nebo do ethanolu. Bylo popsáno několik metod stanovení denatonie pomocí HPLC. Vždy ale bylo nutné při zpracování vzorku použít vhodnou prekoncentrační metodu, čímž se zvyšovala celková doba analýzy. Výsledky CE analýzy byly srovnány s HPLC. Pomocí CE bylo v přípravku stanoveno 20,5 mg/l a s použitím HPLC 20,2 mg/l denatonium benzoátu. Hodnota RSD (3 nástřiky) pro CE byla 1,9% a pro HPLC 1,3% [12].
- CE a HPLC byly porovnány při stanovení **benzalkonium bromidu** (benzyl dimethyldodecylamonium bromid). Opět obě metody vyhovují. U kapilární elektroforézy je nižší spotřeba rozpouštědel, je zde dosaženo vyšší separační účinnosti než u HPLC a celkový čas analýzy byl 5,08 minut. HPLC zase poskytuje vyšší přesnost, ale doba analýzy je 9,18 minut [64].

Tabulka 16: Separační podmínky pro analýzy srovnávající CE a HPLC

CE			HPLC				Citace
BGE	Detekce	LOD	MF	SF	Detekce	LOD	
30% ACN, 70% 0,05 mM fosfátový pufr, pH 3,06	UV (214 nm)	5 µg/ml	60% ACN, 40% 0,1 mM acetát sodný, pH 5	CN	UV (254 nm)	2 µg/ml	[87]
0,025 M Tris- fosfátový pufr, pH 7	UV (214 nm)	-	55% methanol, 45% 0,05 M fosforečnan sodný, pH 6,5	CN	UV (210 nm)	-	[12]
50% ACN, 50 mM NaH ₂ PO ₄ , pH 2,24	UV (214 nm)	0,2 µg/ml	ACN : 4 mM oktansulfonát sodný – 0,02 mM octan sodný (80:20), pH 5,2	C ₁₈	UV (262 nm)	1,6 µg/ml	[64]

Tris – Tris(hydroxymethyl)aminomethan

6 Shrnutí závěrů práce

Jak ukazuje analýza odborných prací publikovaných v posledních 15 letech, elektromigrační a chromatografické metody jsou vhodnými separačními metodami pro stanovení kvartérních amoniových sloučenin. Tyto metody byly v řadě případů zavedeny jako rutinní metody pro stanovení těchto látek v nejrozmanitějších matricích, jako jsou např. biologické vzorky, léčiva, kosmetické přípravky, odpadní vody apod. Díky správně zvoleným separačním podmínkám v kombinaci s vhodným detektorem lze stanovit velmi nízké koncentrace těchto sloučenin v analyzovaném materiálu.

7 Literatura

1. Otilonium bromide
http://en.wikipedia.org/wiki/Otilonium_bromide (navštíveno 25. 3. 2011)
2. Kvartérní amoniové sloučeniny
http://cs.wikipedia.org/wiki/Kvart%C3%A9rn%C3%AD_amoniov%C3%A9_slou%C4%8Deniny (navštíveno 26. 3. 2011)
3. BUCHBERGER, W., SCHÖFTNER, R., *Electrophoresis* 24 (2003) 2111 – 2118
4. HERRERO-MARTÍNEZ, J. M., SIMÓ-ALFONSO, E. F., MONGAY-FERNÁNDEZ, C., RAMIS-RAMOS, G., *J. Chromatogr. A* 895 (2000) 227 – 235
5. SHAMSI, S. A., DANIELSON, N. D., *Anal. Chem.* 67 (1995) 4210 – 4216
6. HEINIG, K., VOGT, C., WERNER, G., *J. Chromatogr. A* 781 (1997) 17 – 22
7. TAYLOR, R. B., TOASAKSIRI, S., REID, R. G., *J. Chromatogr. A* 798 (1998) 335 – 343
8. NUSSBAUMER, S., FLEURY-SOUVERAIN, S., RUDAZ, S., BONNABRY, P., VEUTHEY, J. – L., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 49 (2009) 333 – 337
9. KOIKE, R., KITAGAWA, F., OTSUKA, K., *J. Chromatogr. A* 1139 (2007) 136 – 142
10. KAŠIČKA, V., *Chem. Listy* 91 (1997) 320 – 329
11. HOU, Y. – H., WU, CH. – Y., DING, W. – H., *J. Chromatogr. A* 976 (2002) 207 – 213

12. PRANAITYTE, B., DAUNORAVIČIUS, Z., PADARAUSKAS, A.,
Chromatographia 60 (2004) 353 – 357
13. KLOUDA, P., Moderní analytické metody, 2. upravené a doplněné vydání,
Nakladatelství Pavel Klouda, Ostrava 2003, (132 stran), str. 33 – 40
14. FRAZIER, R. A., AMES, J. M., NURSTEN, H. E., Capillary Electrophoresis for
Food Analysis: Method Development, The Royal Society of Chemistry,
Cambridge 2000 (128 stran)
<http://www.rsc.org/ebooks/archive/free/BK9780854044924/BK9780854044924-00001.pdf> (navštíveno 27. 3. 2011)
15. PAZOUREK, J. – Moderní elektroforetické analytické metody
http://faf.vfu.cz/export/sites/faf/struktura-fakulty/sekce_ustavy/ustav_chemickych_leciv/vyuka/analyticka-chemie/elforeza.pdf (navštíveno 25. 3. 2011)
16. MELANSON, J. E., BARYLA, N. E., LUCY, CH. A., Trends Analyt. Chem. 20
(2001) 365 – 374
17. VARGHESE, J., COLE, R. B., J. Chromatogr. A 652 (1993) 369 - 376
18. BECKERS, J. L., BOČEK, P., Electrophoresis 23 (2002) 1947 – 1952
19. LUCY, CH. A., UNDERHILL, R. S., Anal. Chem. 68 (1996) 300 – 305
20. JÁČ, P., POLÁŠEK, M., POSPÍŠILOVÁ, M., J. Pharm. Biomed. Anal. 40 (2006),
805 – 814
21. LIN, CH., CHIOU, W., LIN, W., J. Chromatogr. A 723 (1996) 189 – 195
22. SO, T. S. K., HUIE, C. W., J. Chromatogr. A 872 (2000) 269 – 278

23. ŠPÁNIK, I., KRUPČÍK, J., Chem. Listy 94 (2000) 10 – 14
24. Cyclodextrin,
<http://en.wikipedia.org/wiki/Cyclodextrin> (navštíveno 24. 3. 2011)
25. Biopolymers II – Polysaccharides
http://www.biologie.uni-hamburg.de/b-online/library/newton/Chy251_253/Lectures/BiopolymersII/BiopolymersII.html
(navštíveno 27. 3. 2011)
26. Cyclodextrine
http://www.chemie.uni-kl.de/forschung/oc/kubik/index.php?lan=de&act=0lecoc9&sub_act=wir&sub_sub_act=cdx
(navštíveno 22. 3. 2011)
27. FELLI, CH., CARREA, G., CHIARI, M., de AMICI, M., de MICHELI, C., J. Chromatogr. A 741 (1996) 287 – 294
28. WEDIG, M., NOVATCHEV, N., WORCH, T., LAUG, S., HOLZGRABE, U., J. Pharm. Biomed. Anal. 28 (2002) 983 – 990
29. Monographs: Pharmaceutical substances: Alcuronii chloridum - Alcuronium chloride
<http://apps.who.int/phint/en/p/docf/> (navštíveno 27. 3. 2011)
30. ZHANG, B., KRULL, I. S., COHEN, A., SMISEK, D. L., KLOSS, A., WANG, B., BOURQUE, A. J., J. Chromatogr. A 1034 (2004) 213 – 220
31. TEGELER, A., RUESS, W., GMAHL, E., J. Chromatogr. A 715 (1995) 195 – 198
32. ZHOU, Q., MAO, J., XIAO, J., XIE, G., J. Sep. Sci. 33 (2010) 1288 – 1293
33. BERTHOD, A., CARDA-BROCH, S., Uses of Ionic Liquids in Analytical Chemistry

<http://www.mariecurie.org/annals/volume3/berthod.pdf> (navštíveno 25. 3. 2011)

34. STALCUP, A. M., CABOVSKA, B., *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 27 (2004) 1443 – 1459
35. SWINNEY, K., BORNHOP, D. J., *Electrophoresis* 21 (2000) 1239 – 1250
36. LI, S. F. Y., *Capillary electrophoresis: principles, practice and applications.* Amsterdam: Elsevier, 1993, 582 stran., str. 150
37. CHERVET, J. P., van SOEST, R. E. J., URSEM, M., *J. Chromatogr.* 543 (1991) 439-449
38. MAINKA, A., BÄCHMANN, K., *J. Chromatogr. A* 767 (1997) 241-247
39. XUE, Y., YEUNG, E. S., *Anal. Chem.* 66 (1994) 3357-3580
40. WANG, T., AIKEN, J. H., HUIE, C. W., HARTWICK, R. A., *Anal. Chem.* 63 (1991) 1372 – 1376
41. ORJALES, A. V., CAROU, M. I. T., BLANCO, M. C. P., MAHIA, R. L., LORENZO, S. M., RODRIGUEZ, D. P., *Chromatographia* 51 (2000) 77 – 82
42. GALCERAN, M. T., CARNEIRO, M. C., DIEZ, M., PUIGNOU, L., *J. Chromatogr. A* 782 (1997) 289 – 295
43. ZEMANN, A. J., *Trends Anal. Chem.* 20 (2001) 346 – 354
44. SHAMSI, S. A., DANIELSON, N. D., *J. Chromatogr. A* 739 (1996) 405 – 412
45. LIU, H. – Y., DING, W. – H., *J. Chromatogr. A* 1025 (2004) 303 – 312
46. BALDWIN, R. P., *Electrophoresis* 21 (2000) 4017 – 4028

47. DASGUPTA, P. K., BAO, L., Anal. Chem. 65 (1993) 1003-1011
48. PETRŮ, K., JÁČ, P., LUŽOVÁ, V., KUNEŠ, J., POLÁŠEK, M., Electrophoresis 2010 – přijato
49. MUSIAL, B. A., MARTIN, M. N., DANIELSON, N. D., J. Sep. Sci. 25 (2002) 311 – 318
50. GALLAGHER, P. A., DANIELSON, N. D., J. Chromatogr. A 781 (1997) 533 – 540
51. KLOUDA, P., Moderní analytické metody, 2. upravené a doplněné vydání., Nakladatelství Pavel Klouda, Ostrava 2003, 132 stran, str. 50 – 52
52. Mass Spectrometry
<http://www.hull.ac.uk/chemistry/masspec3/principles%20of%20ms.html>
(navštíveno 27. 3. 2011)
53. CAI, J., HENION, J., J. Chromatogr. A 703 (1995) 667-692
54. NIESSEN, W. M. S., TJADEN, U. R., van der GREEF, J., J. Chromatogr. 636 (1993), 3 – 19
55. SONG, X., BUDDE, W. L., J. Am. Soc. Mass. Spectrom. 7 (1996) 981 – 986
56. PARA, B. V., NÚÑEZ, O., MOYANO, E., GALCERAN, M. T., Electrophoresis 27 (2006) 2225 – 2232
57. KLOUDA, P., Moderní analytické metody, 2. upravené a doplněné vydání., Nakladatelství Pavel Klouda, Ostrava 2003, 132 stran, str. 10 – 31
58. CVAČKA, J. – Instrumentace pro vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii (2010)

- <http://web.natur.cuni.cz/~analchem/bosakova/hplc2.pdf> (navštíveno 26. 3. 2011)
59. Chromatografické metody – základní rozdělení a instrumentace
<http://biomikro.vscht.cz/isolacebmm/prednaska3.pdf> (navštíveno 20. 3. 2011)
60. CVAČKA, J. – Praxe HPLC
<http://web.natur.cuni.cz/~analchem/bosakova/hplc4.pdf> (navštíveno 21. 3. 2011)
61. Teorie HPLC
<http://www.hplc.cz/> (navštíveno 25. 3. 2011)
62. LAMBERTSON, C. – Simulation Addresses Band-Broadening in HPLC Systems
http://www.comsol.com/stories/waters_corp_hplc_systems/full/
(navštíveno 27. 3. 2011)
63. GIOVANNELLI, D., ABBALLE, F., J. Chromatogr. A 1085 (2005) 86–90
64. DING, X., MOUB, S., ZHAO, S., J. Chromatogr. A 1039 (2004) 209–213
65. CASTRO, R., MOYANO, E., GALCERAN, M. T., J. Chromatogr. A 830 (1999) 145–154
66. ARIFFIN, M. M., ANDERSON, R. A., J. Chromatogr. B 842 (2006) 91–97
67. VALLADAO, M., SANDINE, W. E., J. Dairy Sci. 77 (1994) 1509-1514
68. PEETERS, M. CH., DEFLOOR, I., COOSEMANS, J., DELCOUR, J. A., OOMS, L., DELIEVER, R., de VOS, D., J. Chromatogr. A 920 (2001) 255 – 259
69. MAR, M. – H. H., RIDKY, T. W., GARNER, S. C., ZEISEL, S. H., J. Nutr. Biochem. 6 (1995) 392-398
70. LI, CH., HILL, R. W., JONES, A. D., J. Chromatogr. B 878 (2010) 1809–1816

71. WOOD, K. V., BONHAM, C. C., MILES, D., ROTHWELL, A. P., PEEL, G., WOOD, B. C., RHODES, D., *Phytochemistry* 59 (2002) 759 – 765
72. ESPARZA, X., MOYANO, E., GALCERAN, M. T., *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 4402–4406
73. MALENOVIC, A., MEDENICA, M., IVANOVIC, D., JANCIC, B., MARKOVIC, S., *II Farmaco* 60 (2005) 157–161
74. SHEN, Y., XU, S. – J., WANG, S-CH., TU, J. – S., *J. Zhejiang Univ. Sci. B* 10 (2009) – 877 – 882
75. LIU, F., XIAO, K. P., RUSTUM, A. M., *J. AOAC Int.* 92 (2009) 1644 – 1651
76. van der HOEVEN, R. A. M., REEUWIJK, H. J. E. M., TJADEN, U. R., van der GREEF, J., *J. Chromatogr. A* 741 (1996) 75 – 84
77. DUDKIEWICZ-WILCZYŃSKA, J., TAUTT, J., ROMAN, I., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 34 (2004) 909 – 920
78. XUE, Y., HIEDA, Y., KIMURA, K., NISHIYAMA, T., ADACHI, T., *Leg. Med.* 4 (2002) 232–238
79. LABRANCHE, L. – P., DUMONT, S. N., LEVESQUE, S., CARRIER, A., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 43 (2007) 989–993
80. CASTRO, R., MOYANO, E., GALCERAN, M. T., *J. Chromatogr. A* 869 (2000) 441 – 449
81. HOTHATHA, K. K., BHARATHI, D. V., KUMAR, S. S., REDDY, Y. N., et al., *J. Chromatogr. B* 878 (2010) 981 – 986

82. ARAMENDÍA, M. A., BORAU, V., LAFONT, F., MARINAS, A., ET AL., *Food Chem.* 97 (2006) 181–188
83. HULTGREN, S., LARSSON, N., NILSSON, B. F., JÖNSSON, J. Å., *Anal. Bioanal. Chem.* 393 (2009) 929–937
84. LIU, X., POHL, CH. A., WEISS, J., *J. Chromatogr. A* 1118 (2006) 29–34
85. SHIBUKAWA, M., ETO, R., KIRA, A., MIURA, F., et al., *J. Chromatogr. A* 830 (1999) 321 – 328
86. TEROL, A., GÓMEZ-MINGOT, M., MAESTRE, S. E., PRATS, S., LUIS TODOLÍ, J., PAREDES, E., *Int. J. Cosmet. Sci.* 32 (2010) 65 – 72
87. PRINCE, S. J., McLAURY, H. – J., ALLEN, L. V., McLAURY, P., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 19 (1999) 877 – 882