

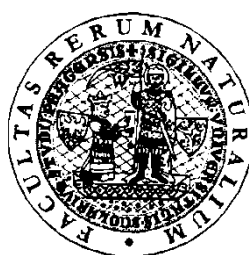
UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra fyzikální a makromolekulární chemie

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Fyzikální chemie



Martin Dvořák

SYSTÉMOVÉ PÍKY V ELEKTROMIGRAČNÍCH SYSTÉMECH
S KOMPLEXUJÍCÍMI ČINIDLY

System peaks in electromigration systems with complexing
agents

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Prof. RNDr. Bohuslav Gaš, CSc.

Praha 2012

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracoval samostatně a výhradně s použitím citovaných pramenů, literatury a dalších odborných zdrojů.

Beru na vědomí, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorského zákona v platném znění, zejména skutečnost, že Univerzita Karlova v Praze má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona.

V Praze dne

Podpis

Poděkování

Na tomto místě bych rád poděkoval svému vedoucímu prof. RNDr. Bohuslavu Gašovi, CSc. a Mgr. Janě Svobodové za jejich cenné rady, konzultace a připomínky při psaní této diplomové práce.

Abstrakt

Kapilární zónová elektroforéza (CZE) je široce používaná analytická metoda. Výhodou CZE je, že je velmi dobře popsána teoreticky a existuje několik simulačních programů, na jejichž základě je možno předvídat výsledky elektroforetické separace, případně detailně studovat děje, které elektroforetickou separaci doprovázejí. CZE ale není jen účinnou analytickou metodou, ale často se využívá i k určování fyzikálně-chemických parametrů látek, jako jsou komplexační konstanty a elektroforetické mobility komplexních sloučenin. Mezi metody nejčastěji používané k určení komplexačních parametrů patří metoda afinitní kapilární elektroforézy (ACE). Její alternativou je pak vakantní afinitní kapilární elektroforéza (VACE). Zatímco u metody ACE je konstanta stability stanovena na základě vyhodnocení závislosti efektivní pohyblivosti analytu na složení základního elektrolytu (BGE), v případě metody VACE jsou k tomuto účelu využity systémové píky.

Cílem této práce bylo posoudit správnost využití systémových píků v rámci metody VACE ke stanovení konstanty stability a porovnat různé přístupy jak správně interpretovat zakoncentrovávání komplexačního činidla v oblastech píků, a to jak pro metodu VACE, tak pro komplementární metodu ACE. Pro studium byly vybrány dva typy systémů. V prvním systému byl jako komplexační činidlo použit nenabitý cyklodextrin a jako analyt R-flurbiprofen, který byl při zvoleném pH BGE zcela disociován na jednomocné anionty. V druhém systému byl analytem neutrální S,S-hydrobenzoin a komplexační činidlo tvořil cyklodextrin PA- β -CD, který byl při zvoleném pH BGE zcela disociován na jednomocné kationty.

Nejprve byly metodami ACE a VACE změřeny efektivní pohyblivosti analytu v jednotlivých systémech pro různé koncentrace komplexačního činidla a stanoveny konstanty stability. Následně byly provedené experimenty nasimulovány v programu Simul 5 Complex, který byl vytvořen v naší laboratoři. Porovnáním simulací a experimentu byla posouzena správnost stanovených konstant stability. Bylo zjištěno, že ACE metoda dává správnou hodnotu konstanty stability pro všechny studované systémy. Metoda VACE se naopak ukázala pro většinu studovaných systémů jako nepoužitelná.

Příčinou selhání VACE metody je skutečnost, že závislost pohyblivosti systémových píků na koncentraci jednotlivých složek BGE je podstatně složitější než ta, která se běžně používá. Přesný teoretický popis této závislosti je komplikovaný a bude předmětem dalšího studia.

Klíčová slova: afinitní kapilární elektroforéza (ACE), vakantní afinitní kapilární elektroforéza (VACE), konstanta stability, systémový pík, Simul 5 Complex

Abstract

Capillary zone electrophoresis (CZE) is a widely used analytical method. CZE is described theoretically very well and there are many simulation programs, which enable one to predict results of electrophoretic separations, and alternatively to study phenomena taking place during the electrophoretic separation in detail. The CZE method is not only an analytical method, but is often used for determination of many physical parameters of compounds, such as stability constants or complex mobilities. Among methods most often used for determination of complexation parameters belongs the affinity capillary electrophoresis (ACE). Its alternative is the vacancy affinity capillary electrophoresis (VACE). Whereas by the ACE method the stability constant is determined from the dependence of the analyte effective electrophoretic mobility on the background electrolyte (BGE) composition, in the case of the VACE system peaks are used for this purpose.

In this work the legitimacy of using system peaks in the VACE method for determination of stability constants was investigated. Several approaches dealing with the concentrating of complexing agent in the peak area were compared, both for the ACE and the VACE method. Two different kinds of electrophoretic systems were studied. In the first one, neutral cyclodextrin was used as the complexing agent and R-flurbiprofen as the analyte. In the second system, neutral S,S-hydrobenzoin was used as the analyte and at the given pH completely dissociated cyclodextrin PA- β -CD as the complexing agent.

First, analyte effective electrophoretic mobilities in systems with different complexation agent concentrations were measured by both methods the ACE and the VACE and stability constants were determined. Then all wet experiments were simulated using the program Simul 5 Complex, which was created in our laboratory. By the comparison of simulations and wet experiments the accuracy of the determined stability constants was assessed. It was concluded that the ACE method provides accurate value of the stability constant in the case of all systems under consideration. On the other hand, the VACE method seems to be unusable for accurate determination of the stability constant in most systems.

The reason for this failure of the VACE method is the fact that the dependence of system peak mobilities on the BGE composition is substantially more complicated than the usually expected one. A precise theoretical description of this dependence is complicated, has not yet been found and will be the subject of next study.

Keywords: affinity capillary electrophoresis (ACE), vacancy affinity capillary electrophoresis (VACE), stability constant, system peak, Simul 5 Complex

Obsah

Seznam použitých zkratk	7
Seznam použitých symbolů	9
1 Úvod a cíl práce	13
2 Teoretická část	14
2.1 Kapilární elektroforéza.....	14
2.2 Systémové píky a lineární model elektromigrace	16
2.3 Metody stanovení konstant stability pomocí CE.....	17
2.4 Simulační programy pro CE.....	23
2.4.1 Simul 5 Complex	24
2.5 Disperzní jevy v CE.....	28
3 Experimentální část	31
3.1 Použité chemikálie.....	31
3.2 Instrumentace	31
3.3 Příprava roztoků a experimentální podmínky.....	32
3.4 Podmínky simulací.....	33
4 Výsledky	36
4.1 Stanovení efektivní pohyblivosti	36
4.2 Systém nenabítených cyklodextrin, nabítený analyt	37
4.2.1 Metoda ACE.....	37
4.2.2 Metoda VACE.....	41
4.2.3 Simulace pomocí programu Simul 5 Complex.....	46
4.2.4 Vliv koncentrace analytu na přesnost ACE a VACE metody	54
4.3 Další možnosti vyhodnocení	57
4.4 Systém nabítených cyklodextrin, nenabítený analyt – slabě komplexující	59
4.4.1 Experiment	59
4.4.2 Simulace	61
4.5 Systém nabítených cyklodextrin, nenabítený analyt – silně komplexující	64
5 Závěr	68
Literatura	70

Seznam použitých zkratek

A	analyt
AC	komplex analytu a komplexačního činidla
ACE	afinitní kapilární elektroforéza
β -CD	β -cyklodextrin
BGE	základní elektrolyt
C	komplexační činidlo
CD	cyklodextrin
CE	kapilární elektroforéza
CZE	kapilární zónová elektroforéza
DAD	detektor s diodovým polem
DM- β -CD	heptakis(2,6-di- <i>O</i> -methyl)- β -cyklodextrin
DMSO	dimethylsulfoxid
EMD	elektromigrační disperze
EOF	elektroosmotický tok
FA	frontální analýza
FACCE	kontinuální frontální analýza v kapilární elektroforéze
HD	Hummel-Dreyerova metoda
HVL	Haarhoffova-van der Lindeho funkce
R-FLU	R-flurbiprofen
S	substrát
S,S-HB	S,S-hydrobenzoin
PA- β -CD	6-monodeoxy-6-mono(3-hydroxy)propylamino- β -cyklodextrin chlorid
TM- β -CD	heptakis(2,3,6-tri- <i>O</i> -methyl)- β -cyklodextrin
Tricine	N-(2-hydroxy-1,1-bis(hydroxymethyl)ethyl)glycin
Tris	2-amino-2-hydroxymethyl-propan-1,3-diol

VACE vakantní afinitní kapilární elektroforéza
VP metoda vakantního píku

Seznam použitých symbolů

$[A]$	rovnovážná koncentrace analytu
$[AC]$	rovnovážná koncentrace komplexu analytu a komplexačního činidla
$[C]$	rovnovážná koncentrace komplexačního činidla
$[S]$	rovnovážná koncentrace substrátu
$[SC]$	rovnovážná koncentrace komplexu substrátu a komplexačního činidla
$[C]_{BGE}$	koncentrace komplexačního činidla v základním elektrolytu
$[A]_{tot}$	celková koncentrace analytu
$[C]_{tot}$	celková koncentrace komplexačního činidla
$[S]_{tot}$	celková koncentrace substrátu
a_0	plocha píku
a_1	střed gaussovské komponenty HVL funkce
a_2	standardní odchylka gaussovské komponenty HVL funkce
a_3	míra asymetrie píku
a_S	aktivita substrátu
a_C	aktivita komplexačního činidla
a_{SC}	aktivita komplexu substrátu a komplexačního činidla
c	molární koncentrace
c_{BGE}	koncentrace v základním elektrolytu
c_H	koncentrace hydroxoniových iontů
c_{inj}	dávkovaná koncentrace
$c_{i,z}$	koncentrace volné iontové formy i -té složky o nábojovém čísle z
c_L	celková koncentrace komplexačního činidla
$c_{L,l}$	koncentrace iontové formy komplexačního činidla o nábojovém čísle l
$c_{x,i,z,l}$	koncentrace komplexu iontové formy i -té složky o nábojovém čísle z a iontové formy komplexačního činidla o nábojovém čísle l

$c_{i,\max}$	koncentrace i -tého analytu v místě maxima svého píku
$D_{k,f}$	difúzní koeficient f -té formy k -té složky
E	intenzita elektrického pole
j	proudová hustota
j_{dif}	difúzní proudová hustota
$J_{k,f}$	molární látkový tok f -té formy k -té složky
K	termodynamická konstanta stability
K'	zdánlivá konstanta stability
K'_i	zdánlivá konstanta stability pro i -tý typ vazebného místa
$K_{i,z}$	rovnovážná konstanta acidobazické rovnováhy
$K_{L,z}$	rovnovážná konstanta acidobazické rovnováhy komplexačního činidla
$K_{x,i,z,l}$	rovnovážná konstanta stability komplexu iontové formy i -té složky o nábojovém čísle z a iontovou formou komplexačního činidla o nábojovém čísle l
K_{exp}	konstanta stability komplexu stanovená experimentálně
K_{sim}	konstanta stability komplexu stanovená ze simulací
L_{det}	délka kapiláry od místa dávkování k detektoru
$L_{i,z}$	kumulativní rovnovážná konstanta acidobazické rovnováhy
$L_{L,l}$	kumulativní rovnovážná konstanta acidobazické rovnováhy pro komplexační činidlo
L_{tot}	celková délka kapiláry
l_{det}	počáteční vzdálenost detektoru od začátku kapiláry
l_{inj}	vzdálenost místa dávkování od začátku kapiláry
n_i	nejzápornější možná hodnota nábojového čísla i -té složky
n_L	nejzápornější možná hodnota nábojového čísla komplexačního činidla
n_{vazb}	počet vazebných míst

p_i	nejkladnější možná hodnota nábojového čísla i -té složky
p_L	nejkladnější možná hodnota nábojového čísla komplexačního činidla
\bar{R}^2	korigovaný koeficient determinace regresní analýzy
S	relativní směrnice rychlosti
S_{EMD}	směrnice nelineární elektromigrační pohyblivosti
$t_{A,max}$	migrační čas maxima píku analytu
t_{EOF}	migrační čas markeru EOF
U	napětí vložené na kapiláru
v	migrační rychlost
v_{EOF}	rychlost elektroosmotického toku
z	nábojové číslo
$\alpha_{z,i}$	molární zlomek volné iontové formy i -té složky o nábojovém čísle z
$\alpha_{L,l}$	molární zlomek volné iontové formy komplexačního činidla o nábojovém čísle z
ε	permitivita
ζ	elektrokinetický potenciál
η	viskozita
κ	specifická vodivost
λ	molární zlomek nejzáporněji nabitě iontové formy volného komplexačního činidla
μ	elektroforetická pohyblivost
μ_A	elektroforetická pohyblivost analytu
$\mu_{A,eff}$	efektivní elektroforetická pohyblivost analytu
μ_{AC}	elektroforetická pohyblivost komplexu analytu a komplexačního činidla
μ_C	elektroforetická pohyblivost komplexačního činidla
$\mu_{C,eff}$	efektivní pohyblivost komplexačního činidla

μ_{eff}	efektivní elektroforetická pohyblivost
μ_{EOF}	pohyblivost elektroosmotického toku
μ_i^0	limitní elektroforetická pohyblivost i -tého iontu
$\mu_{i,\text{max}}$	pohyblivost zóny i -tého analytu vypočtená z času maxima píku
μ_{zd}	zdánlivá elektroforetická pohyblivost

1 Úvod a cíl práce

Studiu interakcí mezi biomolekulami je v současné době věnována velká pozornost, neboť znalost těchto interakcí je velmi potřebná v biochemickém a farmaceutickém výzkumu, zejména v oblasti chirálních separací a vývoji nových léčiv. Rovnováhu mezi analytem a komplexačním činidlem charakterizuje konstanta stability.

Existuje řada metod na stanovení konstanty stability, například UV-Vis spektrometrie, kalorimetrie, potenciometrie, chromatografické techniky, NMR a řada metod založených na kapilární elektroforéze, mezi něž patří také vakantní afinitní kapilární elektroforéza (VACE). Metoda VACE byla navržena zejména proto, že její experimentální uspořádání umožňuje zesílení signálu pozadí a navíc je použitelná i pro stanovení počtu vazebných míst. Byla napsána řada přehledových článků porovnávajících výhody a nevýhody jednotlivých elektroforetických metod. Dosud se však žádná práce podrobně nezabývala správností postupu vyhodnocování systémových píků v rámci metody VACE.

Při výzkumu základních aspektů kapilární elektroforézy se stále častěji uplatňují počítačové simulace a výpočty. Umožňují jednak snadné ověření experimentálních výsledků, ale také pochopení jevů spojených s elektroforetickou separací, a tak mohou předpovídat jejich chování. V nedávné době byl představen kompletní model elektromigrace pro systémy s komplexujícími složkami, který umožnil značný pokrok v pochopení vzniku a chování systémových píků a rovněž naznačil možné nedostatky metody VACE.

Cílem této práce bylo posoudit správnost využití systémových píků v kapilární elektroforéze v rámci metody VACE ke stanovení konstanty stability a porovnat různé přístupy jak správně uvážit zakoncentrovávání komplexačního činidla v oblastech píků, a to jak pro metodu VACE, tak pro komplementární metodu ACE využívající místo systémových píků píky analytu.

2 Teoretická část

2.1 Kapilární elektroforéza

Kapilární zónová elektroforéza (CZE) je separační metoda využívající elektroforetické migrace iontů v elektrickém poli. CZE našla uplatnění v mnoha oblastech, například ve výzkumu vlastností proteinů [1], separaci anorganických iontů [2] nebo chirálních separací [3]. Elektroforetická separace se provádí v křemenných kapilárách o vnějším průměru 375 μm , vnitřním průměru 25-100 μm a délce obvykle 30-100 cm. Hlavní výhodou kapilárních elektromigračních metod je nízká spotřeba vzorku při analýze, velká účinnost separace a krátká doba analýzy. Pro intenzitu elektrického pole v separační kapiláře platí vztah

$$E = \frac{U}{L_{\text{tot}}} \quad (1)$$

kde U je vložené napětí a L_{tot} je celková délka kapiláry. Ionty i -tého typu se v homogenním poli o elektrické intenzitě E pohybují konstantní elektroforetickou rychlostí v_i , která je přímo úměrná intenzitě E .

$$v_i = \text{sgn}(z_i) \mu_i E \quad (2)$$

Konstanta úměrnosti μ_i se nazývá aktuální elektroforetická pohyblivost i -tého iontu¹, z_i je nábojové číslo příslušného iontu. Aktuální elektroforetická pohyblivost iontu není absolutní konstantou, ale závisí na teplotě, viskozitě, iontové síle a pH základního elektrolytu (BGE). Tabelovanou fyzikální konstantou je pouze limitní elektroforetická pohyblivost iontu ve vodě μ_i^0 , což je elektroforetická pohyblivost iontu v nekonečně zředěném vodném roztoku při teplotě 25°C. Pokud některá složka existuje v roztoku ve více formách, mezi kterými se ustavuje rychlá dynamická rovnováha, je elektroforetická pohyblivost této složky popsána její efektivní elektroforetickou pohyblivostí

$$\mu_{\text{eff}} = \frac{\sum_f \frac{c_f}{c_{\text{tot}}} \text{sgn}(z_f) \mu_f}{z_{\text{eff}}} \quad (3)$$

¹ V této diplomové práci je používána konvence, v níž jsou elektroforetické pohyblivosti všech iontů kladná čísla. Kationty a anionty jsou rozlišeny hodnotou $\text{sgn}(z_i)$, kde z_i je nábojové číslo příslušného iontu.

kde c_{tot} je celková koncentrace dané složky, c_f jsou koncentrace její f -té formy, μ_f elektroforetická pohyblivost této formy a z_f její nábojové číslo. Číslo z_{eff} je definováno vztahem $z_{\text{eff}} = \text{sgn}\left(\sum_f \frac{c_f}{c_{\text{tot}}} \text{sgn}(z_f) \mu_f\right)$.

Kromě migrace iontů v elektrickém poli využívá kapilární elektroforéza ještě další transportní jev, a to elektroosmotický tok (EOF). Elektroosmotický tok je tok základního elektrolytu jako celku kapilárou, který v neupravené křemenné kapiláře má směr od anody ke katodě. Při kontaktu vnitřního povrchu křemenné kapiláry s vodným roztokem základního elektrolytu dochází k hydrolyze siloxanových skupin na skupiny silanolové, které následně disociují. U vnitřního povrchu kapiláry se tedy vytváří elektrická dvojrstva. Elektroosmotický tok vzniká v důsledku působení elektrického pole na difúzní část této dvojrstvy. Rychlostní profil kapaliny v kapiláře způsobený elektroosmotickým tokem je plochý a nepřispívá tedy k rozmývání separovaných zón. Pro rychlost elektroosmotického toku v_{EOF} platí vztah

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

kde ε je permitivita roztoku, η je viskozita roztoku a ζ je elektrokinetický potenciál charakterizující elektrickou dvojrstvu při vnitřním povrchu kapiláry. Pohyblivost elektroosmotického toku je definována jako

$$\mu_{\text{EOF}} = \frac{v_{\text{EOF}}}{E} \quad (5)$$

Veličina μ_{EOF} závisí na pH a iontové síle základního elektrolytu.

V důsledku existence elektroosmotického toku není efektivní elektroforetická pohyblivost (3) dané složky roztoku ta, která je ve skutečnosti pozorována. Pohyblivost vztahující se ke skutečné rychlosti pohybu dané složky v kapiláře se nazývá zdánlivá a je součtem efektivní pohyblivosti zvolené složky a pohyblivosti elektroosmotického toku

$$\mu_{\text{zd}} = \frac{z_{\text{eff}} \mu_{\text{eff}} + \mu_{\text{EOF}}}{\text{sgn}(z_{\text{eff}} \mu_{\text{eff}} + \mu_{\text{EOF}})} \quad (6)$$

2.2 Systémové píky a lineární model elektromigrace

Při elektroforéze se uplatňují zejména tyto čtyři fyzikální zákony: Ohmův zákon, chemická rovnováha, podmínka elektroneutality a zákon zachování hmoty v podobě rovnic kontinuity. Rovnice kontinuity představují soustavu parciálních diferenciálních rovnic, kterou není možné vyřešit analyticky. Štědrý a kol. představili v pracích [4,5,6] lineární model elektromigrace. Tento model vychází ze zlinearizované soustavy rovnic kontinuity zapsané v maticové podobě, která je řešena metodou nalezení vlastních čísel a vlastních vektorů příslušné matice. Lineární model elektromigrace předpovídá, že v systému tvořeném N složkami vznikne N elektromigračních zón. Každému analytu odpovídá jedna elektromigrační zóna, jejíž pohyblivost je rovna pohyblivosti daného analytu. Zbylé zóny nesou označení „systémové“, neboť jsou neoddělitelnou vlastností systému jako celku, a nikoli jen některé jeho složky. Lineární model elektromigrace je schopen vysvětlit původ těchto zón. V rámci téhož modelu bylo dále odvozeno, že elektroforetická pohyblivost systémové zóny je funkcí nábojových čísel, elektroforetických pohyblivostí a koncentrací složek základního elektrolytu a nezávisí na vlastnostech analytů. Z definice systémových zón je zřejmé, že tyto zóny jsou detekovány pouze tehdy, je-li detektor citlivý na některou složku základního elektrolytu. Další vlastnosti systémových zón jsou podrobně popsány v [7,8]. Systémové zóny jsou většinou vnímány jako rušivý jev. Možnost jejich využití v kapilární elektroforéze byla poprvé navržena v článcích [9,10].

Na lineárním modelu elektromigrace je založen program PeakMaster, který byl vyvinutý v naší laboratoři [11]. PeakMaster umožňuje rychlý výpočet elektroforetických pohyblivostí jednotlivých zón, mnohých fyzikálních parametrů BGE, jako je pH, specifická vodivost, iontová síla nebo pufrční kapacita, a některých veličin charakterizujících zóny analytů, například relativní směrnici rychlosti nebo molární odezvu vodivostní detekce. Novější verze PeakMasteru [12,13] v sobě zahrnuje i popis některých nelineárních efektů a dovoluje zobrazení tvaru systémových píků na výsledném elektroferogramu. Poslední verze PeakMasteru [14,15] umožňuje též studium systémů, v nichž se uplatňuje komplexační rovnováha, zatím však pouze takových systémů, jejichž BGE je tvořené dvěma složkami, komplexační činidlo je neutrální a analyt je v daném BGE zcela disociovaný.

2.3 Metody stanovení konstant stability pomocí CE

Nekovalentní interakce mezi molekulami jsou v přírodě velmi časté. Znalost konstant stability nekovalentně vázaných komplexů je důležitá zejména v oblasti vývoje nových léčiv, chirálních separací nebo v biochemii. Komplexační rovnováha $S + C \rightleftharpoons SC$ je charakterizována termodynamickou konstantou stability K

$$K = \frac{a_{SC}}{a_S a_C} \quad (7)$$

kde a_S , a_C , resp. a_{SC} je aktivita volného substrátu, aktivita volného komplexačního činidla, resp. aktivita komplexu substrátu a komplexačního činidla. Častokrát se však místo termodynamické konstanty stability určuje zdánlivá konstanta stability K' , v níž jsou aktivity nahrazeny rovnovážnými koncentracemi

$$K' = \frac{[SC]}{[S][C]} \quad (8)$$

a která tudíž závisí na iontové síle.

V současné době je známo šest metod využívajících kapilární elektroforézu ke stanovení konstanty stability: afinitní kapilární elektroforéza (ACE), vakantní afinitní kapilární elektroforéza (VACE), Hummel-Dreyerova metoda (HD), metoda vakantních píků (VP), frontální analýza (FA) a kontinuální frontální analýza v kapilární elektroforéze (FACCE). Jejich historický vývoj může být nalezen v několika přehledových článcích [16,17,18]. Souhrnný přehled těchto metod včetně jejich výhod a nevýhod je uveden v článcích Bushe a kol. [19,20]. Základní odlišnosti v jejich experimentálním uspořádání a v principu stanovení komplexační konstanty jsou shrnuty v tab. 1. Všechny uvedené metody jsou založeny na společném principu. Vždy je provedena série experimentů, při nichž se mění koncentrace jedné ze složek vstupujících do studované komplexační rovnováhy, zatímco koncentrace druhé složky je ve všech experimentech držena konstantní. V souladu s lineárním modelem elektromigrace popsaným v oddílu 2.2 se přidání substrátu a komplexačního činidla do systému projeví vznikem dvou nových elektromigračních zón, které jsou při použití vhodného detektoru zaznamenány na elektroferogramu jako dva nové píky. Každá z uvedených metod sleduje jisté parametry

těchto nových zón a vyhodnocením závislosti těchto parametrů na koncentraci substrátu, resp. komplexačního činidla v dané sérii experimentů je stanovena konstanta stability.

Tab. 1 Metody stanovení konstanty stability založené na kapilární elektroforéze. Převzato z [21].

metoda	vzorek	základní elektrolyt	princip stanovení K
ACE	S	pufr + C	změna efektivní pohyblivosti S
	C	pufr + S	změna efektivní pohyblivosti C
VACE	pufr	pufr + S + C	změna pohyblivosti vakantního píku S nebo C
HD	pufr + S	pufr + C	plocha negativního systémového píku
	pufr + C	pufr + S	
VP	pufr	pufr + S + C	plocha negativního systémového píku
FA FACCE	pufr + S + C	pufr	výška plata

Metody ACE, VACE, HD a VP předpokládají, že separace probíhá za stacionárních podmínek, kdy volné formy obou interagujících složek jsou v každém okamžiku v rovnováze s komplexem. Proto je použitelnost těchto metod omezena na systémy, ve kterých se komplexační rovnováha ustavuje za dobu mnohonásobně kratší než je typický migrační čas.

a) afinitní kapilární elektroforéza (ACE)

Afinitní kapilární elektroforéza je ze všech metod stanovení konstanty stability založených na kapilární elektroforéze tou nejčastěji používanou [22]. Základní elektrolyt je tvořen pufrům, v němž je rozpuštěno komplexační činidlo. Dávkovaný vzorek je tvořen stejným pufrům, v němž je rozpuštěn substrát. V kontextu tohoto experimentálního uspořádání, kdy je substrát obsažen pouze v dávkovaném vzorku, bude substrát dále označován termínem analyt. Koncentrace dávkovaného analytu je držena konstantní,

zatímco koncentrace komplexačního činidla v základním elektrolytu se mění. Na elektroferogramu je pozitivní pík analytu a negativní systémový pík komplexačního činidla. Pohyblivost tohoto systémového píku komplexačního činidla je nulová, pokud je komplexační činidlo nenabitě. Metoda ACE sleduje pohyblivost píku analytu. Vychází přitom z předpokladu, že pohyblivost tohoto píku je totožná s efektivní pohyblivostí analytu. Pohyblivost píku analytu lze vypočítat ze vztahu

$$\mu_{A,\text{eff}} = \frac{L_{\text{det}}}{E} \left| \frac{\text{sgn}(z_A)}{t_{A,\text{max}}} + \frac{1}{t_{\text{EOF}}} \right| \quad (9)$$

kde L_{det} je délka kapiláry od místa dávkování k detektoru, $t_{A,\text{max}}$ je migrační čas maxima píku analytu, z_A je nábojové číslo analytu a t_{EOF} je migrační čas markeru EOF. Za předpokladu, že analyt a komplexační činidlo vytváří komplex ve stechiometrickém poměru 1:1 a že charakteristická doba potřebná na ustavení komplexační rovnováhy je mnohem kratší než migrační čas, platí pro efektivní pohyblivost analytu vztah

$$\mu_{A,\text{eff}} = \frac{[\text{AC}]}{[\text{A}] + [\text{AC}]} \mu_{\text{AC}} + \frac{[\text{A}]}{[\text{A}] + [\text{AC}]} \mu_{\text{A}} \quad (10)$$

kde μ_{AC} je elektroforetická pohyblivost komplexu, μ_{A} je elektroforetická pohyblivost volného analytu. Vyjádříme-li z rovnice (8) (při záměně symbolů S a A) poměr $[\text{AC}]/[\text{A}]$, dostaneme po dosazení do (10) následující vztah

$$\mu_{A,\text{eff}} = \frac{\mu_{\text{A}} + \mu_{\text{AC}} K' [\text{C}]}{1 + K' [\text{C}]} \quad (11)$$

Rovnici (11) je možné přepsat několika způsoby na linearizovaný tvar [23]:

$$\frac{1}{\mu_{A,\text{eff}} - \mu_{\text{A}}} = \frac{1}{(\mu_{\text{AC}} - \mu_{\text{A}}) K' [\text{C}]} + \frac{1}{\mu_{\text{AC}} - \mu_{\text{A}}} \quad (12)$$

$$\frac{[\text{C}]}{\mu_{A,\text{eff}} - \mu_{\text{A}}} = \frac{[\text{C}]}{\mu_{\text{AC}} - \mu_{\text{A}}} + \frac{1}{(\mu_{\text{AC}} - \mu_{\text{A}}) K'} \quad (13)$$

$$\frac{\mu_{A,\text{eff}} - \mu_{\text{A}}}{[\text{C}]} = -K' (\mu_{A,\text{eff}} - \mu_{\text{A}}) + (\mu_{\text{AC}} - \mu_{\text{A}}) K' \quad (14)$$

Je-li analyt nenabitý, je jeho elektroforetická pohyblivost nulová a vztah (11) se zjednoduší na tvar

$$\mu_{A,\text{eff}} = \frac{\mu_{AC}K'[C]}{1 + K'[C]} \quad (15)$$

Zdánlivá konstanta stability komplexu K' a pohyblivosti μ_A , μ_{AC} se získají nelineární regresí dle vztahů (11), resp. (15) nebo lineární regresí dle některého z lineárních vztahů (12)-(14). Bylo zjištěno, že stanovení konstanty stability nelineární regresí poskytuje nejsprávnější a nejpřesnější hodnoty [23,24]. Koncentrace volného komplexačního činidla $[C]$ v místě píku se tradičně pokládá rovna celkové koncentraci komplexačního činidla v BGE, což však vnáší do měření určitou chybu [19].

V principu je možné zaměnit v metodě ACE roli substrátu a komplexačního činidla. V tomto případě je dávkováno komplexační činidlo, zatímco substrát je rozpuštěn v BGE. Jedním z rozhodujících faktorů pro volbu jednoho či druhého módu metody ACE je požadavek, aby elektroforetická pohyblivost složky přítomné v dávkovaném vzorku se co nejvíce lišila od pohyblivosti komplexu. Dalším důležitým faktorem je rozpustnost obou interagujících složek v BGE. Nevýhodou metody ACE je, že neumožňuje studium komplexů o jiné stechiometrii než 1:1.

b) Hummel-Dreyerova metoda (HD)

Experimentální uspořádání metody HD je stejné jako uspořádání metody ACE. Jediná odlišnost obou metod spočívá v tom, že v metodě HD je s využitím kalibrační křivky přepočtena plocha negativního systémového píku na koncentraci vázané formy té z interagujících složek, která je součástí BGE. Dle Busche a kol. [25] platí pro koncentraci volné formy komplexačního činidla $[C]$ následující vztah

$$\frac{[C]_{\text{tot}} - [C]}{[S]_{\text{tot}}} = \sum_{i=1}^k n_{\text{vazb}}^i \frac{K_i'[C]}{1 + K_i'[C]} \quad (16)$$

kde $[S]_{\text{tot}}$ je celková koncentrace substrátu, $[C]_{\text{tot}}$ je celková koncentrace komplexačního činidla, k je počet typů vazebných míst na substrátu (má-li substrát více vazebných míst), n_{vazb}^i je počet vazebných míst i -tého typu a K_i' jsou konstanty stability pro jednotlivé typy vazebných míst. Je-li součástí BGE komplexační činidlo, je stanovení konstanty stability provedeno nelineární regresní analýzou na základě vztahu (16). Koncentrace volné formy komplexačního činidla, která je potřebná při regresní analýze, se obvykle pokládá rovna jeho celkové koncentraci v BGE.

c) *vakantní afinitní kapilární elektroforéza (VACE)*

Metoda vakantní kapilární elektroforézy byla poprvé popsána v práci Busche a kol. [25]. Základní elektrolyt je tvořen pufrům, v němž je rozpuštěno jak komplexační činidlo, tak analyt². Výhodou je možnost zesílit signál pozadí v detektoru volbou koncentrace obou komplexujících složek v základním elektrolytu, a tím zlepšit citlivost detekce. Nevýhodou metody je naopak velká spotřeba analytu i komplexačního činidla. Jako vzorek je dávkován pouze samotný pufr. Koncentrace jedné z komplexujících složek je v základním elektrolytu držena konstantní, zatímco koncentrace druhé se mění. Na elektroferogramu v důsledku přítomnosti komplexačního činidla a analytu v základním elektrolytu vznikají dva negativní systémové píky. Elektroforetická pohyblivost jednoho systémového píku leží mezi pohyblivostí volného analytu a pohyblivostí komplexu (tento pík dále označuji jako pík „příslušející analytu“) a pohyblivost druhého systémového píku leží mezi pohyblivostí volného komplexačního činidla a pohyblivostí komplexu (tento pík dále označuji jako pík „příslušející komplexačnímu činidlu“). Podobně jako metoda ACE sleduje metoda VACE pohyblivost jednoho ze systémových píků a konstanta stability je získána vyhodnocením závislosti pohyblivosti vybraného systémového píku na koncentraci volného komplexačního činidla v místě píku.

V případě, že je sledována pohyblivost systémového píku, který přísluší analytu, je vyhodnocení metody VACE totožné s vyhodnocením metody ACE. Pohyblivost tohoto systémového píku je ztotožněna s efektivní pohyblivostí analytu a její závislost na koncentraci volného komplexačního činidla v místě píku je fitována vztahem (11), je-li analyt nabitý, resp. (15), je-li analyt nenabitý.

Měření pohyblivosti druhého systémového píku, který přísluší komplexačnímu činidlu, nabízí možnost studovat i systémy, ve kterých tvorba komplexu neprobíhá ve stechiometrickém poměru 1:1, ale na jednu molekulu analytu se váže více molekul komplexačního činidla, a určit kromě hodnoty konstanty stability také počet vazebných míst analytu n_{vazb} . Pohyblivost systémového píku příslušného komplexačnímu činidlu se v tomto případě ztotožňuje s efektivní pohyblivostí komplexačního činidla, pro kterou platí

² Zde by správně měl být použit termín substrát. Avšak pro zdůraznění, že se jedná o tutéž látku, která je v metodě ACE označována jako analyt, budou i v případě metody VACE inetragující složky označovány jako komplexační činidlo a analyt, nikoli komplexační činidlo a substrát.

$$\mu_{C,eff} = \frac{[AC]}{[C] + [AC]} \mu_{AC} + \frac{[C]}{[C] + [AC]} \mu_C \quad (17)$$

Vztah (17) je možné dále upravit na tvar

$$\mu_{C,eff} = \mu_{AC} + \frac{[C]}{[C]_{tot}} (\mu_C - \mu_{AC}) \quad (18)$$

kde bylo použito označení $[C]_{tot} = [C] + [AC]$ pro celkovou koncentraci komplexačního činidla. Pokud bychom postupovali přesně, bylo by třeba za $[C]_{tot}$ dosadit aktuální koncentraci komplexačního činidla v místě píku, která může být v důsledku zakoncentrovávání vyšší než koncentrace v BGE. Tato koncentrace je ale experimentálně nedostupná a je proto obvykle ztotožňována s celkovou koncentrací komplexujícího činidla. Vztah (16) je možné za předpokladu, že existuje pouze jeden typ vazebných míst, upravit na tvar

$$[C]_{tot} = \frac{n_{vazb} K' [C]}{1 + K' [C]} [A]_{tot} + [C] \quad (19)$$

Vyjádříme-li ze vztahu (19) koncentraci volného komplexačního činidla $[C]$ a dosadíme-li ji do (18), dostaneme konečný tvar závislosti $\mu_{C,eff}$ na $[C]_{tot}$. Hledané parametry této závislosti K' , μ_A , μ_{AC} a n_{vazb} je možné získat regresní analýzou. Hodnoty takto určených parametrů jsou ovšem obvykle zatíženy jistou chybou, která je způsobena ztotožněním celkové koncentrace komplexačního činidla v místě píku s jeho koncentrací v BGE.

d) metoda vakantního píku (VP)

Metoda VP má stejné experimentální uspořádání jako metoda VACE. Plocha negativního systémového píku příslušného komplexačnímu činidlu je na základě vnitřní kalibrace přepočtena na koncentraci volné formy komplexačního činidla $[C]$ v BGE. Celková koncentrace komplexačního činidla $[C]_{tot}$ v BGE a celková koncentrace substrátu $[S]_{tot}$ v BGE jsou známy. Konstantu stability je proto možné stanovit regresní analýzou s využitím vztahu (16).

e) *frontální analýza (FA), kontinuální frontální analýza (FACCE)*

Při metodě FA je separační kapilára naplněna pouze čistým pufrem. Dávkuje se velký objem vzorku, který je tvořen substrátem a komplexačním činidlem rozpuštěnými v pufru. Nutnou podmínkou použitelnosti FA je, aby se elektroforetická pohyblivost alespoň jedné z interagujících složek lišila od pohyblivosti komplexu a pohyblivost druhé složky byla naopak pohyblivosti komplexu co nejbližší. Je-li například pohyblivost komplexačního činidla větší než pohyblivost komplexu a substrátu, migruje v průběhu elektroforézy volná forma komplexačního činidla ven z dávkované zóny a vytváří "plato". Pomocí kalibrace je výška plata přepočtena na koncentraci volné formy komplexačního činidla v dávkovaném vzorku. Konstanta stability je stanovena regresní analýzou závislosti koncentrace volné formy komplexačního činidla na jeho celkové koncentraci v dávkovaném vzorku dle vztahu (16).

Metoda FA je použitelná jak pro systémy, v nichž se rovnováha ustavuje rychle, tak pro systémy s pomalou kinetikou. Metoda je zejména vhodná pro určování konstant stability v intervalu 10^3 - $10^8 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1}$ [26]. Mezi výhody metody FA patří její necitlivost vůči fluktuacím EOF nebo aplikovaného napětí v průběhu elektroforézy [27]. Metoda FACCE je analogická metodě FA, liší se pouze tím, že vzorek je dávkován kontinuálně v průběhu celé analýzy.

2.4 Simulační programy pro CE

Pokrok ve vývoji počítačů umožnil, aby se počítačové výpočty staly pevnou součástí výzkumu v oblasti kapilární elektroforézy. První pokusy o vytvoření programu umožňující dynamickou simulaci elektroforézy proběhly již v polovině sedmdesátých let 20. století. Historický vývoj simulačních programů pro elektroforézu a některé příklady využití simulačních programů jsou uvedeny v člancích Thormanna a kol. [28, 29]. Mezi hlavní výhody simulačních programů patří možnost optimalizace experimentálních podmínek před vlastním měřením a získání detailních informací o veškerých aspektech dějů probíhajících při elektroforéze, které jsou jinak experimentálně těžko dostupné. Matematické modely elektroforézy jsou založené na rovnicích popisujících acidobazické,

případně komplexační rovnováhy, rovnicích kontinuity, které představují zákon zachování hmoty, a podmínce elektroneutrality.

V současné době jsou nejčastěji využívány tyto tři simulační programy elektroforézy: SPRESSO [30], GENTRANS [31,32] a Simul 5 [33]. Všechny tyto programy jsou založeny na jednodimenzionálním modelu elektroforézy, který předpokládá, že koncentrace všech složek a všechny fyzikální parametry systému jsou v radiálním směru (kolmém k ose kapiláry) konstantní. Programy se liší především algoritmem, který používají k numerickému řešení rovnic kontinuity. GENTRANS a Simul 5 aproximují kapiláru uniformní mřížkou tvořenou body rovnoměrně rozdělenými podél celé délky simulovaného úseku kapiláry. SPRESSO používá adaptivní mřížku [34], která umožňuje v průběhu výpočtu koncentrovat body v místech velkého gradientu koncentrace některé složky, a tím v některých případech výpočet urychlit. GENTRANS navíc používá speciální algoritmy pro jednotlivé typy systémů. Simul 5 oproti ostatním programům nabízí uživatelsky příjemné grafické rozhraní, obsahuje také širokou databázi vstupních parametrů pro řadu analytů i složek pufrů. Umožňuje také korekci na iontovou sílu. Podrobné porovnání těchto tří hlavních simulačních programů z hlediska jejich použitelnosti a rychlosti lze najít v článku Moshera a kol.[35].

2.4.1 Simul 5 Complex

Včlenění komplexační rovnováhy do matematických modelů elektroforézy je vzhledem k nelinearitě rovnic popisujících komplexační rovnováhu dosti komplikované a dosud neexistuje zcela obecný model, který by v sobě zahrnul komplexační rovnováhy bez dodatečných zjednodušujících či omezujících předpokladů. První pokusy o zahrnutí komplexační rovnováhy do matematického modelu elektroforézy byly provedeny v roce 1992 [36]. Tento první model však byl použitelný pouze pro neutrální komplexační činidla. Další přibližný model byl použit v práci [19] zabývající se porovnáním metod na stanovení konstant stability pomocí CZE. Také Fang a kol. [37,38] a Righetti a kol. [39] použili simulační programy ke studiu metody ACE, ovšem opět pouze za značných zjednodušujících předpokladů. Nedávno byla komplexační rovnováha přidána do programu GENTRANS [40,41].

Naší skupinou byl publikován teoretický model elektromigrace pro systémy s komplexujícími složkami. Tento model byl implementován do programu Simul 5 [42,43].

Rozšířená verze programu nese název Simul 5 Complex. Umožňuje simulovat systémy tvořené libovolným počtem složek BGE a libovolným počtem analytů bez omezení na jejich acidobazické chování. Libovolný počet složek BGE, resp. analytů může komplexovat s jedním zvoleným komplexačním činidlem, přičemž program předpokládá pouze tvorbu komplexů se stechiometrií 1:1. Program Simul 5 Complex je volně ke stažení na <http://www.natur.cuni.cz/gas>.

Pro zjednodušení výpočtu rovnovážných koncentrací jsou v matematickém modelu, na němž je založen program Simul 5 Complex, zavedeny kumulativní rovnovážné konstanty. Kumulativní konstanty $L_{i,z}$ pro všechny složky s výjimkou komplexačního činidla jsou definovány předpisem

$$L_{i,z} = \begin{cases} z < 0 & \prod_{\tilde{z}=z}^{-1} \frac{1}{K_{i,\tilde{z}}} \\ z = 0 & 1 \\ z > 0 & \prod_{\tilde{z}=1}^z K_{i,\tilde{z}} \end{cases} \quad (20)$$

$K_{i,z}$ jsou rovnovážné konstanty charakterizující acidobazické rovnováhy

$$K_{i,z} = \begin{cases} z < 0 & \frac{c_{i,z} c_H}{c_{i,z+1}} \\ z = 0 & 1 \\ z > 0 & \frac{c_{i,z-1} c_H}{c_{i,z}} \end{cases} \quad (21)$$

kde c_H je koncentrace hydroxoniových iontů a $c_{i,z}$ je koncentrace volné iontové formy i -té složky, jejíž nábojové číslo je z . Kumulativní konstanty pro komplexační činidlo jsou definovány předpisem

$$L_{L,l} = \begin{cases} \prod_{z=n_L}^{l-1} K_{L,z} & l < 0 \quad n_L < 0 \\ \prod_{z=n_L}^l K_{L,z} & l \geq 0 \quad n_L < 0 \\ \prod_{z=n_L}^l K_{L,z} & l > 0 \quad n_L \geq 0 \\ 1 & l = n_L \end{cases} \quad (22)$$

kde n_L je nejzápornější hodnota nábojového čísla, jaké může komplexační činidlo nabývat a $K_{L,z}$ je rovnovážná konstanta acidobazické rovnováhy, pro niž platí vztah (21) po záměně indexů $i \rightarrow L$. V práci [42] je ukázáno, že molární zlomek $\alpha_{z,i}$ volné iontové formy i -té složky, jejíž nábojové číslo je z , a molární zlomek $\alpha_{L,l}$ volné iontové formy komplexačního činidla, jejíž nábojové číslo je l , je možné vyjádřit jako funkci koncentrace hydroxoniových iontů a molárního zlomku λ nejzáporněji nabitě iontové formy volného komplexačního činidla

$$\alpha_{z,i} = \frac{\mathcal{A}_i}{1 + \mathcal{B}_i c_L \lambda} \quad (23)$$

$$\alpha_{L,l} = L_{L,l} c_H^{l-n_L} \lambda$$

kde c_L je celková koncentrace komplexačního činidla. Veličiny \mathcal{A}_i a \mathcal{B}_i vystupující v (23) jsou funkcí koncentrace c_H

$$\mathcal{A}_i = \frac{L_{i,z} c_H^z}{\sum_{\tilde{z}=n_i}^{p_i} L_{i,\tilde{z}} c_H^{\tilde{z}}} \quad (24)$$

$$\mathcal{B}_i = \sum_{z=n_i}^{p_i} \sum_{l=n_L}^{p_L} L_{L,l} c_H^{l-n_L} \mathcal{A}_i K_{x,i,z,l} \quad (25)$$

kde p_i , resp. n_i je nejkladnější, resp. nejzápornější hodnota nábojového čísla i -té složky, p_L a n_L mají tentýž význam pro komplexační činidlo. $K_{x,i,z,l}$ je rovnovážná konstanta popisující tvorbu komplexu iontové formy i -té složky o nábojovém čísle z s iontovou formou komplexačního činidla o nábojovém čísle l

$$K_{x,i,z,l} = \frac{c_{x,i,z,l}}{c_{i,z} c_{L,l}} \quad (26)$$

kde $c_{x,i,z,l}$ je koncentrace příslušného komplexu a $c_{L,l}$ je koncentrace iontové formy komplexačního činidla o nábojovém čísle l . Ze vztahů (23) a (26) je patrné, že pro určení rovnovážných koncentrací volných a v komplexu vázaných iontových forem všech složek stačí v případě, že známe celkové koncentrace jednotlivých složek, vypočítat c_H a λ . K tomu lze využít podmínky elektroneutality a bilanční rovnici pro komplexační činidlo, které tvoří soustavu dvou rovnic pro dvě neznámé c_H a λ . Tato soustava je v programu Simul 5 Complex řešena numerickou metodou Newtona a Raphsona.

Vývoj koncentrací s časem popisují rovnice kontinuity. Rovnice kontinuity zabudované v programu Simul 5 Complex v sobě zahrnují elektromigraci, difúzi a elektroosmotický tok

$$\frac{\partial c_k}{\partial t} = - \sum_f \left(\frac{\partial J_{k,f}}{\partial x} \right) \quad (27)$$

Index f probíhá přes všechny iontové formy (volné i vázané v komplexu) k -té složky systému a $J_{k,f}$ je odpovídající molární látkový tok

$$J_{k,f} = -D_{k,f} \frac{\partial c_{k,f}}{\partial x} + \frac{\text{sgn}(z_{k,f}) c_{k,f} \mu_{k,f}}{\kappa} (j - j_{\text{dif}}) + v_{\text{EOF}} c_{k,f} \quad (28)$$

kde $D_{k,f}$ a $\mu_{k,f}$ jsou difúzní koeficient a elektroforetická pohyblivost f -té formy k -té složky, j je proudová hustota, j_{dif} je difúzní proudová hustota, κ je specifická vodivost a v_{EOF} je rychlost elektroosmotického toku. Podrobný popis numerického řešení rovnic kontinuity je uveden v [42].

V práci [38] bylo ukázáno, že simulační programy mohou být užitečným nástrojem při studiu komplexačních interakcí metodami ACE, VACE, HD, VP a FA. K simulacím byl v této práci použit program SimDCCE, jehož algoritmus je založený na podobném principu jako Simul 5, ačkoliv oproti Simulu 5 je velmi zjednodušený. Fang a Chen navrhli postup stanovení konstanty stability, který je založený na využití simulačního programu [44]. Při tomto postupu je provedena řada simulací studovaného systému pro hodnoty konstanty stability a pohyblivosti komplexu z předem stanovených intervalů, a tak je získána závislost migračního času píku analytu na konstantě stability a pohyblivosti komplexu. Pro několik různých složení BGE je pak porovnávána tato závislost s experimentálně změřeným migračním časem, což umožňuje stanovit konstantu stability. V [44] bylo ukázáno, že přesnost tohoto postupu je srovnatelná s přesností obvykle používané nelineární regrese afinitní izotermy. Nicméně výpočetní metoda má oproti vyhodnocování nelineární regresi několik výhod. Je schopná postihnout změny pohyblivosti píků, k nimž dochází na počátku separace před ustavením rovnováhy, zatímco vyhodnocení založené na nelineární regresi předpokládá, že komplexační rovnováha se ustavuje ihned po nadávkování vzorku a že pohyblivost píků je po celou dobu separace konstantní. Další výhodou je, že stačí provést měření jen pro dvě až tři různá složení BGE, zatímco při vyhodnocování nelineární regresi by experimentální body měly pokrývat celou

afinitní izotermu. Program použitý v práci [44] je v porovnání se Simulem 5 značně zjednodušený a zjištěné hodnoty komplexačních konstant mají pouze orientační význam.

Simul 5 Complex vychází při simulacích z přesnějšího matematického modelu, ale výpočetní náročnost simulací neumožňuje, aby velké množství potřebných simulací mohlo být provedeno v přijatelném čase, proto metoda navržená v [44] není v současné době pro stanovení komplexačních konstant použitelná.

2.5 Disperzní jevy v CE

Disperzní jevy způsobují rozšiřování a deformaci píků pozorovaných na elektroferogramech kapilární elektroforézy, a proto mohou výrazně ovlivnit výsledek elektroforetické separace. Lze je rozdělit podle jejich příčiny do čtyř skupin: difúze, tepelné efekty způsobené Joulovým teplem, adsorpce na stěnu kapiláry a elektromigrační disperze (EMD). Disperzní jevy uplatňující se při elektroforetické separaci jsou podrobně popsány v člancích Gaše a kol. [45,46].

EMD je jednou z nejzávažnějších příčin deformace separovaných píků. Vzniká v důsledku závislosti migrační rychlosti analytu na jeho koncentraci. EMD obvykle souvisí se změnami pH a vodivosti v zóně analytu. Naše skupina prokázala, že může vznikat i v důsledku komplexace [43,47]. Asymetrie píku způsobená elektromigrační disperzí se obvykle charakterizuje pomocí relativní směrnice rychlosti (S), která byla zavedena v práci Horké a Šlaisa [48]. Kvantitativní vyjádření této veličiny pro pík i -tého analytu bylo odvozeno v článku Štědrého a kol. [4]

$$S_i = \lim_{c_i \rightarrow 0} \frac{\kappa}{v_i} \frac{dv_i}{dc_i} \quad (29)$$

kde κ je specifická vodivost v místě píku, c_i je koncentrace i -té složky a v_i je její migrační rychlost. V článku Hrušky a kol. [14] byla zavedena nová veličina S_{EMD} , nazvaná směrnice nelineární elektromigrační pohyblivosti, charakterizující míru elektromigrační disperze. Veličina $S_{EMD,i}$ je pro i -tý analyt definována vztahem

$$S_{EMD,i} = 2 \frac{\kappa}{j} \frac{dv_i}{dc_i} (0) \quad (30)$$

Výhodou $S_{\text{EMD},i}$ je, že může být snadno odhadnuta ze změřeného elektroferogramu s využitím následujícího vztahu

$$S_{\text{EMD},i} = \frac{\mu_{i,\text{max}} - \mu_{i,\text{eff}}}{c_{i,\text{max}}} \quad (31)$$

kde $\mu_{i,\text{max}}$ je pohyblivost zóny i -tého analytu vypočtená z času maxima píku, $\mu_{i,\text{eff}}$ je efektivní pohyblivost i -tého analytu vypočtená na základě fitování píku HVL funkcí (viz níže) a $c_{i,\text{max}}$ je koncentrace i -tého analytu v místě maxima píku.

Vhodným nastavením experimentálních podmínek je možné většinu disperzních jevů potlačit. Výjimkou je difúze a disperze způsobená komplexací. Vliv vzniku komplexu na asymetrii píku v uspořádání metody ACE je popsán v [15,47,49] a pro uspořádání metody VACE v [50]. Při výpočtu pohyblivosti píku v metodách ACE a VACE se jako migrační čas uvažuje tradičně čas maxima píku. V případě výrazné asymetrie píků však vyvstává otázka, jakou hodnotu migračního času použít pro výpočet pohyblivosti píku. Jednou z možností je využít výpočetní metody založené na simulacích [44]. Jiné řešení tohoto problému našli Le Saux a kol. [51], kteří ukázali, že správný postup spočívá v proložení trojúhelníkovitého píku HVL funkcí [52,53]

$$f(t) = \frac{\frac{a_0 a_2^2}{a_1 a_3} \left[\frac{1}{a_2 \sqrt{2\pi}} \exp\left(-\frac{(t - a_1)^2}{2a_2^2}\right) \right]}{\frac{1}{\exp\left(\frac{a_1 a_3}{a_2^2}\right) - 1} + \frac{1}{2} \left[1 + \operatorname{erf}\left(\frac{t - a_1}{a_2 \sqrt{2}}\right) \right]} \quad (32)$$

kde parametr a_0 má význam plochy píku, a_1 je střed a a_2 standardní odchylka gaussovské komponenty HVL funkce a a_3 charakterizuje míru asymetrie píku. Ve vztazích pro výpočet pohyblivosti je pak třeba nahradit čas maxima píku parametrem a_1 HVL funkce. Vztah (9) upravený na tvar

$$\mu_{A,\text{eff}} = \frac{L_{\text{det}}}{E} \left| \frac{\operatorname{sgn}(z_A)}{a_1} + \frac{1}{t_{\text{EOF}}} \right| \quad (33)$$

již dává správnou hodnotu pohyblivosti. Z vlastností HVL funkce vyplývá, že takto určená efektivní pohyblivost odpovídá efektivní pohyblivosti při nekonečném zředění analytu a nezávisí na koncentraci analytu. Při nekonečném zředění analytu se ovšem koncentrace volného komplexačního činidla limitně blíží jeho koncentraci v BGE, a proto je správné při

stanovování konstanty stability vynášet pohyblivosti vypočtené podle vztahu (33) proti koncentraci komplexačního činidla BGE. Tím byl současně odstraněn další z nedostatků metod ACE a VACE, totiž skutečnost, že pro správné vyhodnocení podle vztahů (11) a (15) je třeba znát koncentraci komplexačního činidla, resp. jeho volné formy v místě píku, ale tato koncentrace se obecně liší od koncentrace v BGE.

3 Experimentální část

3.1 Použité chemikálie

Všechny použité chemikálie byly analytického stupně čistoty. Jako analyty byly vybrány (R)-(-)-2-fluoro- α -methyl-4-bifenyloctová kyselina (R-flurbiprofen) a (S,S)-(-)-1,2-difénylethan-1,2-diol (S,S-hydrobenzoin). Jako základní elektrolyt byly zvoleny Tris/Tricine pufr a acetátový pufr. K přípravě těchto základních elektrolytů byly použity 2-amino-2-hydroxymethyl-propan-1,3-diol (Tris), N-(2-hydroxy-1,1-bis(hydroxymethyl)ethyl)glycin (Tricine), monohydrát hydroxidu lithného a kyselina octová (Lachema, Neratovice, Česká republika). Jako komplexační činidlo byly použity β -cyklodextrin (β -CD), heptakis(2,6-di-*O*-methyl)- β -cyklodextrin (DM- β -CD), heptakis(2,3,6-tri-*O*-methyl)- β -cyklodextrin (TM- β -CD) a 6-monodeoxy-6-mono(3-hydroxy)propylamino- β -cyklodextrin chlorid (PA- β -CD) (CycloLab Ltd., Budapest, Maďarsko). K určení elektroosmotického toku byl použit dimethylsulfoxid (DMSO). Voda použitá na přípravu všech roztoků byla deionizována pomocí systému Milli-Q (Millipore, Bedford, USA). Není-li uvedeno jinak, byly chemikálie zakoupeny od Sigmy Aldrich, Praha, Česká republika.

3.2 Instrumentace

Elektroforetické experimenty byly provedeny na přístroji pro kapilární elektroforézu ^{3D}CE (Agilent Technologies, Waldbronn, Německo), který byl ovládán pomocí programu ChemStation. Byla použita křemenná kapilára s vnějším průměrem 375 μ m a vnitřním průměrem 50 μ m (Polymicro Technologies, Phoenix, USA). Celková délka kapiláry byla 52,0 cm. Délka kapiláry od místa dávkování k detektoru byla 43,5 cm. Byla použita DAD detekce při vlnové délce 214 nm. K měření pH byl použit pH-metr PHM 220 (Radiometer, Copenhagen, Dánsko), který byl kalibrován standardními IUPAC pufrů pH 1,679, pH 7,000 a pH 10,012 (Lyon, Francie). Experimentální data byla zpracována a analyzována v programu Origin 8.1 (OriginLab, Northampton, USA).

3.3 Příprava roztoků a experimentální podmínky

Nová kapilára byla před měřením proplachována 0,1 M roztokem hydroxidu sodného (Agilent Technologies, Německo) po dobu 5 min a poté destilovanou vodou po dobu 10 min. Mezi jednotlivými měřeními byla kapilára proplachována základním elektrolytem po dobu 3 min. Při všech experimentech byla kapilára termostatována na teplotu 25 °C. Všechny roztoky použité při experimentech byly filtrovány pomocí syringe filtrů (Whatman, Clifton, USA) o velikosti pórů 0,45 μm .

a) Systém nenabitý cyklodextrin, nabitý analyt

Jako analyt byl vybrán R-flurbiprofen (R-FLU). Jako pufr byl použit 50 mM Tris a 50 mM Tricine o experimentálním pH 8,13 a iontové síle 25,76 mM. Tento pufr byl zvolený proto, že při daném pH je R-flurbiprofen již zcela disociovaný a stačí tedy uvažovat jen jednu komplexační rovnováhu. Neutrální cyklodextriny použité jako komplexační činidla byly vybrány tak, aby se konstanty stability jejich komplexu s R-flurbiprofenem výrazně lišily. Tři sady základních elektrolytů pro ACE experimenty a tři sady základních elektrolytů pro VACE experimenty byly připraveny přímým rozpuštěním cyklodextrinů β -CD, DM- β -CD a TM- β -CD v pufru. Složení základních elektrolytů je uvedeno v tab. 2.

Tab. 2: Systém nenabitý cyklodextrin, nabitý analyt - složení BGE.

metoda	cyklodextrin	BGE			
		$c_{\text{CD}} / \text{mM}$	$c_{\text{Tris}} / \text{mM}$	$c_{\text{Tricine}} / \text{mM}$	$c_{\text{R-FLU}} / \text{mM}$
ACE	β -CD	0,1 – 10	50	50	0
	DM- β -CD				
	TM- β -CD	0,1 – 40			
VACE	β -CD	0,1 – 10	50	50	0,3
	DM- β -CD				
	TM- β -CD	0,1 – 40			

Vzorek pro metodu ACE byl tvořen 0,3 mM R-FLU a 0,07 % (obj.) DMSO, který sloužil jako marker EOF. Obě složky byly rozpuštěny přímo v pufru. Vzorek byl dávkován

hydrodynamicky tlakem 10 mbar po dobu 3 s. V případě metody VACE byl jako vzorek dávkován pouze 0,07 % (obj.) DMSO rozpuštěný v pufru. Dávkování bylo opět hydrodynamické tlakem 10 mbar po dobu 3 s. V případě obou metod bylo aplikované napětí 20 kV. Každé měření bylo provedeno čtyřikrát.

b) Systém nabitý cyklodextrin, nenabitý analyt

Jako analyt byl vybrán S,S-hydrobenzoin (S,S-HB), který je v širokém rozmezí pH neutrální. Pufř byl tvořený kyselinou octovou a hydroxidem lithným v poměru 2:1 o experimentálním pH 4,67. Při tomto pH je zvolený cyklodextrin PA- β -CD zcela disociovaný na jednomocné kationty. Sada dvanácti základních elektrolytů pro VACE experimenty byla připravena přímým rozpuštěním PA- β -CD a S,S-HB v pufru. Koncentrace kyseliny octové a hydroxidu lithného byla volena tak, aby výsledný základní elektrolyt měl vždy iontovou sílu 40 mM. Měření metodou ACE nebyla pro tento systém v rámci této práce prováděna, ale jejich výsledky byly převzaty z prací Svobodové a kol. [43] a Beneše a kol. [54]. Složení základních elektrolytů je uvedeno v tab. 3. Pro úplnost je v tab. 3 uvedeno také složení základních elektrolytů pro metodu ACE převzaté z [43, 54].

Tab. 3: Systém nabitý cyklodextrin, nenabitý analyt – složení BGE.

metoda	cyklodextrin	BGE			
		$c_{\text{CD}} / \text{mM}$	$c_{\text{CH}_3\text{COOH}} / \text{mM}$	$c_{\text{LiOH}} / \text{mM}$	$c_{\text{S,S-HB}} / \text{mM}$
ACE	PA- β -CD	1 – 30	78 – 20	39 – 10	0
VACE					1

Vzorek pro metodu VACE byl tvořen 0,07 % (obj.) DMSO, který sloužil jako EOF marker, rozpuštěným přímo v pufru. Vzorek byl dávkován hydrodynamicky tlakem 10 mbar po dobu 6s. Každé měření bylo provedeno třikrát.

3.4 Podmínky simulací

Provedené experimenty byly nasimulovány v programu Simul 5 Complex. Experimentální podmínky byly v simulacích nastaveny stejné, jaké byly v reálném experimentu. Aby byl co nejvíce zkrácen výpočetní čas, byla jako délka kapiláry nastavena vzdálenost, kterou elektromigrační zóna s největší absolutní hodnotou elektroforetické

pohyblivosti urazí za svůj experimentální migrační čas. Současně bylo vložené napětí přepočteno tak, aby intenzita elektrického pole byla stejná jako v reálném experimentu. Elektroosmotický tok byl nahrazen pohybem detektoru rychlostí v_{EOF} směrem k místu dávkování. Jako konstanta stability komplexu byla v simulačním programu zadána hodnota experimentálně získaná metodou ACE. Počáteční parametry dávkované zóny byly nastaveny tak, aby odpovídaly zóně vzorku dávkované ve skutečném experimentu. Příklad nastavení parametrů simulace pro systém nenabíтый cyklodextrin, nabíтый analyt je uveden v tab. 4 a pro systém nabíтый cyklodextrin, nenabíтый analyt v tab. 5. Všechny simulace byly provedeny na počítači Intel® Core™ i7-960 Processor 3,40 GHz, simulační čas byl v řádu hodin.

Tab. 4 Parametry simulace v programu Simul 5 Complex pro vybrané experimenty. Systém nenabíтый cyklodextrin, nabíтый analyt. c_{inj} je koncentrace dané složky v dávkovaném vzorku, c_{BGE} je koncentrace dané složky v základním elektrolytu, L_{tot} je celková délka kapiláry, l_{det} je počáteční vzdálenost detektoru od začátku kapiláry a l_{inj} vzdálenost místa dávkování od začátku kapiláry.

metoda	$c_{\text{R-FLU}} /$ mM		$c_{\beta\text{-CD}} /$ mM		$\mu_{\text{EOF}} /$ $10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$	$U /$ V	$L_{\text{tot}} /$ mm	$l_{\text{det}} /$ mm	$l_{\text{inj}} /$ mm	šířka píku / mm	šířka hrany píku / mm
	c_{inj}	c_{BGE}	c_{inj}	c_{BGE}							
ACE	0,3	0	0	0,1	45,83	1192 3	310	725	290	0,4	0,2
	0,3	0	0	10	47,01	6154	160	575	140	0,4	0,2
VACE	0	0,3	0	0,1	48,28	1346 2	350	765	330	0,4	0,2
	0	0,3	0	10	46,71	5769	150	565	130	0,4	0,2

Tab. 5 Parametry simulace v programu Simul 5 Complex pro vybrané experimenty. Systém nabíтый cyklodextrin, nenabíтый analyt. c_{inj} je koncentrace dané složky v dávkovaném vzorku, c_{BGE} je koncentrace dané složky v základním elektrolytu, L_{tot} je celková délka kapiláry, l_{det} je počáteční vzdálenost detektoru od začátku kapiláry a l_{inj} vzdálenost místa dávkování od začátku kapiláry.

metoda	$c_{\text{S,S-HB}} /$ mM		$c_{\text{PA-}\beta\text{-CD}} /$ mM		$\mu_{\text{EOF}} /$ $10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$	$U /$ V	$L_{\text{tot}} /$ mm	$l_{\text{det}} /$ mm	$l_{\text{inj}} /$ mm	šířka píku / mm	šířka hrany píku / mm
	c_{inj}	c_{BGE}	c_{inj}	c_{BGE}							
VACE	0	1,0	0	3	14,58	2308	80	445	10	0,8	0,4
	0	1,0	0	20	13,82	4471	155	445	10	0,8	0,4

Pro posouzení vlivu velikosti konstanty stability na správnost metody VACE pro systém typu nabíтый komplexační činidlo, nenabíтый analyt byly dále provedeny simulace

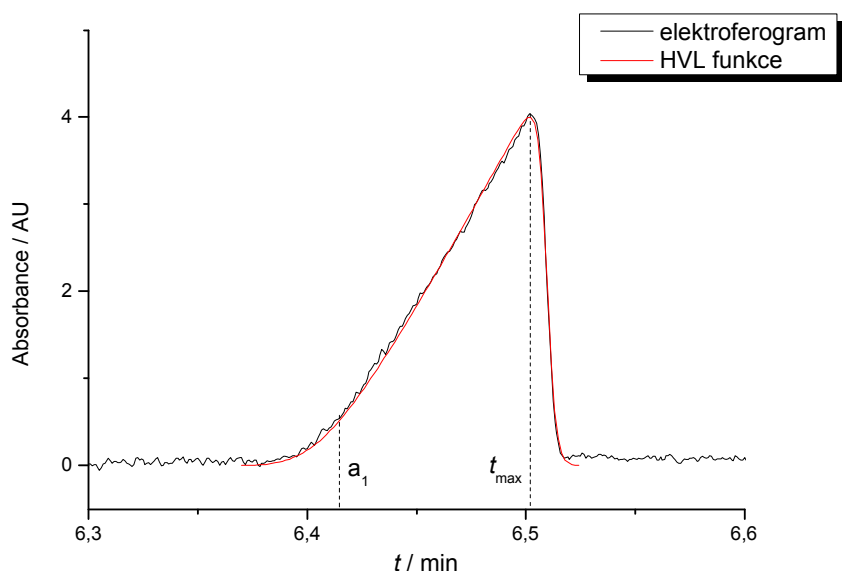
hypotetického systému s nabitým komplexačním činidlem a nenabitým analytem tvořícími silně vázaný komplex. Jako analyt byla zvolena neutrální látka, jako komplexační činidlo jednosytná silná báze o $pK_A = 14$ a jako BGE acetátový pufr tvořený kyselinou octovou a hydroxidem lithným v poměru 2:1, čemuž odpovídá $pH = 4,61$. Komplexační činidlo je tedy v BGE zcela disociováno. Pohyblivost volného komplexačního činidla byla zvolena stejná jako pohyblivost komplexu $\mu_{AC} = 20 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$. Komplexační činidlo vytváří s analytem komplex ve stechiometrickém poměru 1:1, konstanta stability tohoto komplexu byla zvolena $pK = 3,6$, tedy $K = 3981 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1}$. Parametry simulací byly nastaveny takto: $L_{\text{tot}} = 100 \text{ mm}$, $l_{\text{inj}} = 10 \text{ mm}$, $l_{\text{det}} = 90 \text{ mm}$ a $U = 3000 \text{ V}$. Podobně jako u předchozích systémů byla délka kapiláry volena co nejmenší, aby byl zkrácen výpočetní čas, zároveň však dostatečně dlouhá na to, aby se jednotlivé systémové píky od sebe zřetelně oddělily. Vložené napětí bylo zvoleno tak, aby odpovídající intenzita elektrického pole byla srovnatelná s intenzitou v dříve prováděných reálných experimentech. Elektroosmotický tok nebylo třeba uvažovat, neboť ten by se projevil pouze posunem všech migračních časů o konstantu.

Experimenty byly provedeny pro dvě různé koncentrace analytu, a to 0,3 mM a 0,05 mM. Koncentrace komplexačního činidla byly vybrány tak, aby pro případ koncentrace analytu 0,3 mM pokrývaly oblast od koncentrací srovnatelných s koncentrací analytu až po hodnoty, kdy je analyt komplexačním činidlem saturován. V závislosti na koncentraci komplexačního činidla byly koncentrace kyseliny octové a hydroxidu lithného v jednotlivých simulacích nastaveny tak, aby iontová síla BGE byla 40 mM.

4 Výsledky

4.1 Stanovení efektivní pohyblivosti

V systémech, v nichž byly jako komplexační činidlo použity cyklodextriny β -CD a DM- β -CD v koncentraci srovnatelné s koncentrací analytu, docházelo u obou metod ACE i VACE k deformaci píku analytu elektromigrační disperzí na trojúhelníkovitý tvar. Elektromigrační disperze je v tomto případě způsobena tvorbou komplexu mezi cyklodextrinem a analytem. Tento typ elektromigrační disperze byl poprvé popsán v práci Fanga a kol. [47] a vysvětlen na základě modelu elektromigrace v komplexujících systémech naší skupinou [43]. V případě systémů TM- β -CD, R-flurbiprofen a PA- β -CD, S,S-hydrobenzoin byl efekt elektromigrační disperze mnohem slabší, neboť konstanta stability vznikajícího komplexu je malá. Pro korekci dat na elektromigrační disperzi byly píky analytu proloženy HVL funkcí. Efektivní pohyblivost analytu byla vypočtena dle vztahu (33), kde za migrační čas je dosazen parametr a_1 HVL funkce, nikoli čas maxima píku. Proložení píku analytu HVL funkcí bylo použito i v těch případech, kdy pík analytu měl přibližně gaussovský tvar, a to pro metody ACE i VACE. Příklad proložení trojúhelníkovitého píku HVL funkcí je uveden na obr. 1.



Obr. 1 Příklad proložení trojúhelníkovitého píku HVL funkcí. Na obrázku je vyznačen čas maxima píku t_{\max} a čas odpovídající parametru a_1 HVL funkce.

4.2 Systém nenabitý cyklodextrin, nabitý analyt

Byla studována interakce neutrálních cyklodextrinů s R-flurbiprofenem. Ke studiu byly vybrány tři neutrální cyklodextriny β -CD, DM- β -CD a TM- β -CD, které se podstatně liší velikostí konstanty stability jejich komplexu s R-flurbiprofenem. Všechny zmíněné cyklodextriny přitom vytvářejí s R-flurbiprofenem komplex v poměru 1:1. Hodnoty všech pohyblivostí a konstant stability, které byly v rámci této práce pro tyto systémy stanoveny, odpovídají iontové síle 25,76 mM.

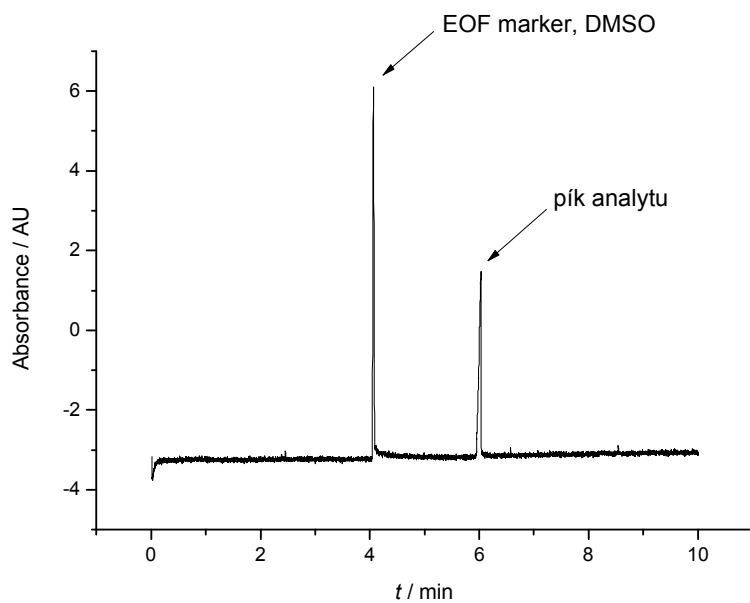
4.2.1 Metoda ACE

a) komplexující činidlo β -CD

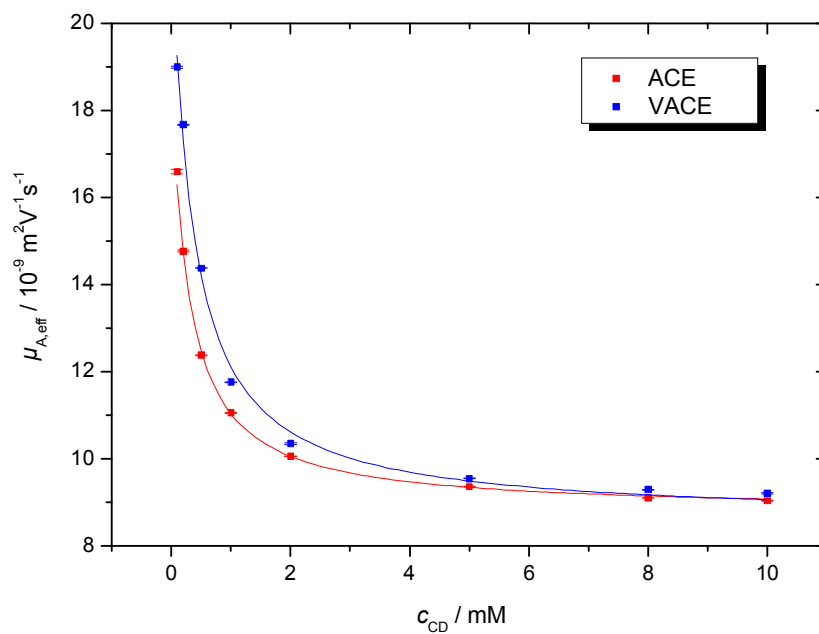
Nejprve byla provedena série ACE experimentů, kdy byl jako komplexační činidlo použit β -CD. R-flurbiprofen, který sloužil jako analyt, byl dávkován vždy v koncentraci 0,3 mM. Koncentrace β -CD v BGE byla postupně zvyšována z 0 mM až na hodnotu 10 mM. Tyto koncentrace β -CD byly zvoleny tak, aby pokrývaly oblast od koncentrací srovnatelných s koncentrací analytu až po hodnoty, kdy byl analyt cyklodextrinem saturován. Opačné uspořádání ACE metody, kdy by byl β -CD dávkován v konstantní koncentraci a R-flurbiprofen by byl součástí BGE, není možné pro studovaný systém použít z důvodu špatné rozpustnosti R-flurbiprofenu a malého rozdílu mezi mobilitou volného CD a mobilitou komplexu³. Na obr. 2 je uveden příklad elektroferogramu zaznamenaného DAD detektorem. V systému vznikají dva systémové píky s téměř nulovou pohyblivostí (na záznamu z DAD detektoru překryty markerem EOF) a jeden pík odpovídající analytu.

Postupem uvedeným v oddílu 4.1 byly stanoveny efektivní pohyblivosti R-flurbiprofenu, vyneseny do grafu v závislosti na celkové koncentraci β -CD v BGE a proloženy regresní funkcí (11), viz obr. 3. Efektivní pohyblivost R-flurbiprofenu byla vynášena proti celkové koncentraci β -CD v BGE, neboť efektivní pohyblivosti vypočtené podle postupu v oddílu 4.1 odpovídají nekonečnému zředění analytu.

³ Tento požadavek na uspořádání ACE metody platí nejen pro β -CD, ale i pro DM- β -CD a TM- β -CD.



Obr. 2 Elektroferogram zaznamenaný DAD detektorem (detekce při vlnové délce 214 nm), metoda ACE. Složení BGE: 50 mM Tris, 50 mM Tricine, 0,2 mM β -CD.



Obr. 3 Závislost efektivní pohyblivosti R-flurbiprofenu, změřené metodou ACE a VACE, na celkové koncentraci β -CD v základním elektrolytu. Obě závislosti byly proloženy regresní funkcí (11). Podmínky měření jsou popsány v oddílu 3.3.

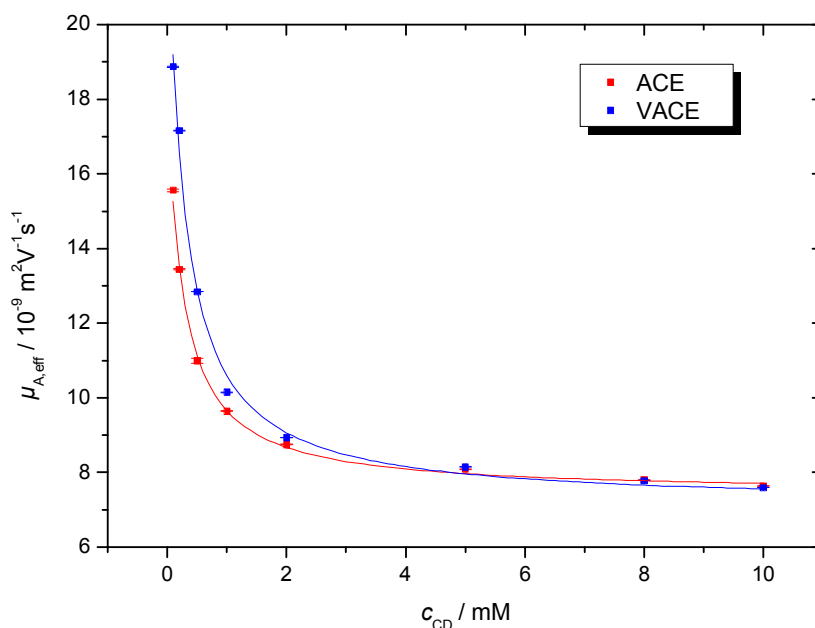
Experimentální body leží v rámci chyby na teoretické křivce. Regresní analýzou byla stanovena konstanta stability⁴ komplexu $K_{\beta\text{-CD}}^{\text{ACE}} = (4040 \pm 190) \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1}$, pohyblivost volného R-flurbiprofenu $\mu_{\text{A}} = (19,7 \pm 0,2) 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ a pohyblivost komplexu $\beta\text{-CD}$ s R-flurbiprofenem $\mu_{\text{AC}} = (8,82 \pm 0,04) 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Korigovaný koeficient determinace regresní analýzy byl $\bar{R}_{\text{ACE}}^2 = 0,99952$.

Při zpracování experimentálních dat nebyl uvažován vliv viskozity. Jelikož stejné zanedbání bylo provedeno i při vyhodnocení experimentálních dat z metody VACE, je odůvodněné předpokládat, že se neprojeví na výsledném porovnání obou metod. Vliv viskozity byl zanedbán i u všech dalších studovaných systémů.

b) komplexující činidlo DM- β -CD

Byla provedena obdobná série ACE experimentů jako v bodě a). Nyní byl jako komplexační činidlo použit DM- β -CD. Konstanta stability komplexu DM- β -CD s R-flurbiprofenem je o 20% větší než konstanta stability komplexu $\beta\text{-CD}$ s R-flurbiprofenem. Koncentrace DM- β -CD v BGE byly proto použity stejné jako v případě a). Závislost efektivní pohyblivosti R-flurbiprofenu na celkové koncentraci DM- β -CD v BGE je na obr. 4. Experimentální body leží v rámci chyby na teoretické křivce. Regresní analýzou byla stanovena konstanta stability $K_{\text{DM-}\beta\text{-CD}}^{\text{ACE}} = (4800 \pm 400) \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1}$, pohyblivost volného R-flurbiprofenu $\mu_{\text{A}} = (19,3 \pm 0,4) 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ a pohyblivost komplexu DM- β -CD s R-flurbiprofenem $\mu_{\text{AC}} = (7,54 \pm 0,07) 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Korigovaný koeficient determinace regresní analýzy byl $\bar{R}_{\text{ACE}}^2 = 0,99866$.

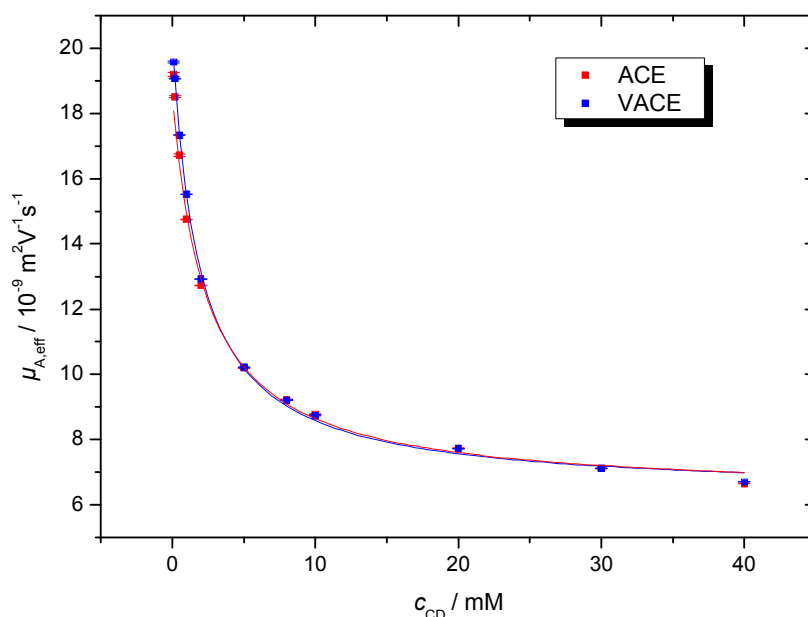
⁴ Hovoří-li se v kapitole 4 o konstantě stability, je vždy míněna zdánlivá konstanta stability. Nicméně z důvodu větší přehlednosti je vynechávána čárka u symbolů zdánlivých konstant stability a stejně tak je v textu vynecháván i přívlastek „zdánlivá“.



Obr. 4 Závislost efektivní pohyblivosti R-flurbiprofenu, změřené metodou ACE a VACE, na celkové koncentraci DM-β-CD v základním elektrolytu. Obě závislosti byly proloženy regresní funkcí (11). Podmínky měření jsou popsány v oddílu 3.3.

c) komplexující činidlo TM-β-CD

Byla provedena další série ACE experimentů, tentokrát byl jako komplexační činidlo použit TM-β-CD. Konstanta stability komplexu TM-β-CD s R-flurbiprofenem je přibližně $K \cong 500$, zatímco v systémech a) a b) byla $K \geq 4000$. Z tohoto důvodu bylo třeba měřit ve větším rozsahu koncentrací TM-β-CD v BGE 0 - 40 mM. Závislost efektivní pohyblivosti R-flurbiprofenu na celkové koncentraci TM-β-CD v BGE je uvedena na obr. 5. Experimentální body leží v rámci chyby na teoretické křivce s výjimkou bodu odpovídajícímu koncentraci TM-β-CD 40 mM, který leží pod teoretickou závislostí. Při této koncentraci se již výrazně projevuje vyšší viskozita BGE, v jejímž důsledku je stanovená efektivní pohyblivost analytu menší než její skutečná hodnota. Regresní analýzou byla stanovena konstanta stability $K_{TM-\beta-CD}^{ACE} = (552 \pm 46) \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1}$, pohyblivost volného R-flurbiprofenu $\mu_A = (19,7 \pm 0,2) 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ a pohyblivost komplexu TM-β-CD s R-flurbiprofenem $\mu_{AC} = (6,5 \pm 0,2) 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Korigovaný koeficient determinace regresní analýzy byl $\bar{R}_{ACE}^2 = 0,99701$.



Obr. 5 Závislost efektivní pohyblivosti R-flurbiprofenu, změřené metodou ACE a VACE, na celkové koncentraci TM- β -CD v základním elektrolytu. Obě závislosti byly proloženy regresní funkcí (11). Podmínky měření jsou popsány v oddílu 3.3.

4.2.2 Metoda VACE

Následně byly konstanty stability stanoveny pomocí metody VACE. Byla provedena série VACE experimentů, při nichž byla koncentrace analytu v BGE držena konstantní na hodnotě 0,3 mM, zatímco koncentrace cyklodextrinů se měnila. Koncentrace cyklodextrinů v BGE byly použity stejné jako u metody ACE, aby bylo možné obě metody snadno porovnat.

a) komplexující činidlo β -CD

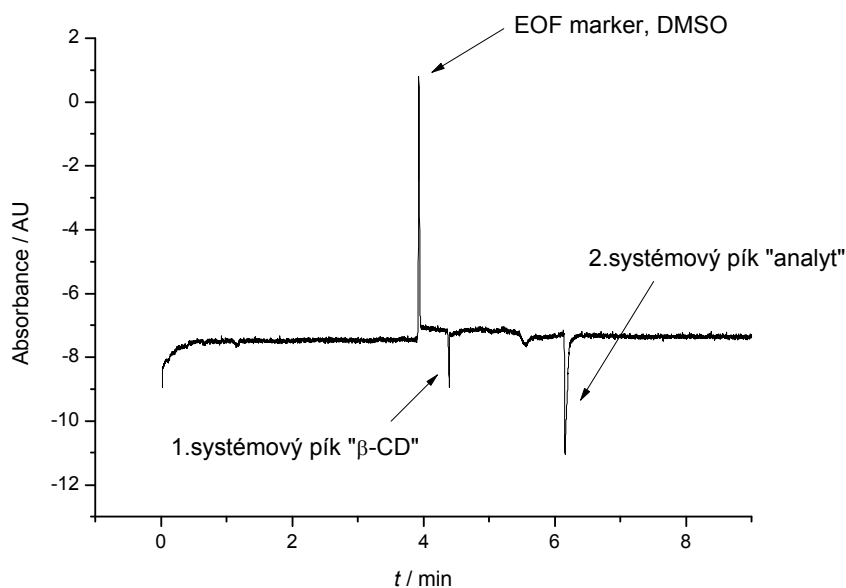
Příklad elektroferogramu zaznamenaného DAD detektorem je na obr. 6. V systému vznikají čtyři systémové píky. Dva systémové píky mají téměř nulovou pohyblivost, na obr. 6 jsou překryty píkem markeru EOF, další systémový pík přísluší systémovému píku cyklodextrinu a zbývající analytu⁵. Efektivní pohyblivosti analytu, které jsou v rámci

⁵ Elektroforetická pohyblivost jednoho systémového píku leží mezi pohyblivostí volného analytu a pohyblivostí komplexu (tento pík označují jako pík „příslušející analytu“) a pohyblivost druhého systémového píku leží mezi pohyblivostí volného komplexačního činidla a pohyblivostí komplexu (tento pík označují jako pík „příslušející komplexačnímu činidlu“)

metody VACE ztotožňované s pohyblivostí systémového píku příslušejícího analytu, byly stanoveny postupem uvedeným v oddílu 4.1, vyneseny do grafu v závislosti na celkové koncentraci β -CD v BGE a proloženy regresní funkcí (11), viz obr. 3. Byla určena konstanta stability komplexu $K_{\beta\text{-CD}}^{\text{VACE}} = (2930 \pm 460) \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1}$, pohyblivost volného R-flurbiprofenu $\mu_A = (22,4 \pm 0,7) \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ a pohyblivost komplexu β -CD s R-flurbiprofenem $\mu_{AC} = (8,6 \pm 0,2) \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Korigovaný koeficient determinace regresní analýzy byl $\bar{R}_{\text{VACE}}^2 = 0,99463$.

Oproti ACE metodě již není shoda mezi experimentálními body a teoretickou závislostí tak dobrá. Korigovaný koeficient determinace u metody ACE byl $\bar{R}_{\text{ACE}}^2 = 0,99952$, zatímco u metody VACE $\bar{R}_{\text{VACE}}^2 = 0,99463$. Při koncentraci β -CD větší než 1 mM neleží experimentální body na teoretické křivce ani v rámci chyby. Efektivní pohyblivost analytu získaná metodou VACE je vždy vyšší než ta získaná metodou ACE. Rozdíl mezi oběma metodami však velmi závisí na koncentraci β -CD v BGE. Při koncentraci β -CD 8 mM a 10 mM dávají obě metody podobné výsledky. Naopak při koncentracích menších než 1 mM se hodnoty efektivních pohyblivostí získané oběma metodami liší o více než $2 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

Střední hodnoty efektivní pohyblivosti R-flurbiprofenu stanovené jak metodou ACE, tak VACE jsou shrnuty v tab. 6. Hodnoty konstanty stability komplexu, jeho elektroforetické pohyblivosti a elektroforetická pohyblivost volného R-flurbiprofenu stanovené oběma metodami jsou porovnány v tab. 7. Z výsledků vyplývá, že komplexační parametry stanovené metodami ACE a VACE se značně odlišují a metoda VACE má podstatně vyšší chybu stanovení.



Obr. 6 Elektroferogram zaznamenaný DAD detektorem (detekce při vlnové délce 214 nm), metoda VACE. Složení BGE: 50 mM Tris, 50 mM Tricine, 0,2 mM β -CD.

Tab. 6 Střední hodnoty efektivní pohyblivosti R-flurbiprofenu v závislosti na koncentraci β -CD v BGE. Jako chyba je uváděna výběrová směrodatná odchylka.

$c_{\beta\text{-CD}} / \text{mM}$	ACE	VACE
	$\mu_{A,\text{eff}} / 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$\mu_{A,\text{eff}} / 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$
0,1	$16,59 \pm 0,05$	$19,00 \pm 0,02$
0,2	$14,76 \pm 0,02$	$17,67 \pm 0,01$
0,5	$12,382 \pm 0,009$	$14,379 \pm 0,003$
1,0	$11,053 \pm 0,005$	$11,761 \pm 0,005$
2,0	$10,057 \pm 0,003$	$10,35 \pm 0,02$
5,0	$9,361 \pm 0,003$	$9,544 \pm 0,006$
8,0	$9,103 \pm 0,006$	$9,294 \pm 0,007$
10	$9,036 \pm 0,006$	$9,204 \pm 0,01$

Tab. 7 Konstanta stability a elektroforetická pohyblivost komplexu R-flurbiprofenu s β -CD a elektroforetická pohyblivost volného R-flurbiprofenu stanovené metodami ACE a VACE.

	$K / \text{dm}^3 \text{ mol}^{-1}$	$\mu_{AC} / 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$\mu_A / 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$
ACE	4040 ± 190	$8,82 \pm 0,04$	$19,7 \pm 0,2$
VACE	2930 ± 460	$8,6 \pm 0,2$	$22,4 \pm 0,7$

Postup vyhodnocení elektroferogramů u následujících systémů b), c) byl stejný jako u systému a).

b) komplexující činidlo DM-β-CD

Závislost efektivní pohyblivosti R-flurbiprofenu na celkové koncentraci DM-β-CD v BGE proložená regresní funkcí (11) je na obr. 4. Byla určena konstanta stability komplexu $K_{DM-\beta-CD}^{VACE} = (3800 \pm 690) dm^3 mol^{-1}$, pohyblivost volného R-flurbiprofenu $\mu_A = (24 \pm 1) \cdot 10^{-9} m^2 V^{-1} s^{-1}$ a komplexu DM-β-CD s R-flurbiprofenem $\mu_{AC} = (7,1 \pm 0,3) \cdot 10^{-9} m^2 V^{-1} s^{-1}$. Korigovaný koeficient determinace regresní analýzy byl $\bar{R}_{VACE}^2 = 0,99273$.

Výsledky jsou zde kvalitativně stejné jako v případě a). Metoda ACE se opět shoduje s teoretickou závislostí lépe než metoda VACE. Korigovaný koeficient determinace u metody ACE byl $\bar{R}_{ACE}^2 = 0,99866$ a u metody VACE $\bar{R}_{VACE}^2 = 0,99273$.

Střední hodnoty efektivní pohyblivosti R-flurbiprofenu stanovené jak metodou ACE, tak VACE jsou shrnuty v tab. 8. Hodnoty konstanty stability komplexu, jeho elektroforetické pohyblivosti a elektroforetická pohyblivost volného R-flurbiprofenu stanovené oběma metodami jsou porovnány v tab. 9. Opět pozorujeme odlišné hodnoty komplexačních parametrů získaných oběma metodami a vyšší chybu stanovení v případě metody VACE.

Tab. 8 Střední hodnoty efektivní pohyblivosti R-flurbiprofenu v závislosti na koncentraci DM-β-CD v BGE. Jako chyba je uváděna výběrová směrodatná odchylka.

$c_{DM-\beta-CD} / mM$	ACE	VACE
	$\mu_{A,eff} / 10^{-9} m^2 V^{-1} s^{-1}$	$\mu_{A,eff} / 10^{-9} m^2 V^{-1} s^{-1}$
0,1	15,56 ± 0,04	18,87 ± 0,01
0,2	13,44 ± 0,02	17,16 ± 0,02
0,5	10,99 ± 0,07	12,843 ± 0,005
1,0	9,640 ± 0,004	10,145 ± 0,002
2,0	8,750 ± 0,009	8,930 ± 0,004
5,0	8,080 ± 0,009	8,15 ± 0,01
8,0	7,800 ± 0,003	7,780 ± 0,004
10	7,640 ± 0,004	7,592 ± 0,005

Tab. 9 Konstanta stability a elektroforetická pohyblivost komplexu R-flurbiprofenu s DM-β-CD a elektroforetická pohyblivost volného R-flurbiprofenu stanovené metodami ACE a VACE.

	$K / dm^3 mol^{-1}$	$\mu_{AC} / 10^{-9} m^2 V^{-1} s^{-1}$	$\mu_A / 10^{-9} m^2 V^{-1} s^{-1}$
ACE	4800 ± 400	7,54 ± 0,07	19,3 ± 0,4
VACE	3800 ± 690	7,1 ± 0,3	24 ± 1

c) komplexující činidlo TM-β-CD

Závislost efektivní pohyblivosti R-flurbiprofenu na celkové koncentraci TM-β-CD v BGE proložená regresní funkcí (11) je na obr. 5. Byla určena konstanta stability komplexu $K_{\text{TM-}\beta\text{-CD}}^{\text{VACE}} = (526 \pm 28) \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1}$, pohyblivost volného R-flurbiprofenu $\mu_{\text{A}} = (20,3 \pm 0,1) \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ a komplexu TM-β-CD s R-flurbiprofenem $\mu_{\text{AC}} = (6,4 \pm 0,1) \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Korigovaný koeficient determinace regresní analýzy byl $\bar{R}_{\text{VACE}}^2 = 0,99882$.

Přestože i v případě tohoto systému dává VACE metoda vyšší hodnoty efektivní pohyblivosti R-flurbiprofenu než metoda ACE, je rozdíl mezi oběma metodami mnohem menší než u systémů a) a b), a to v celém rozsahu koncentrací TM-β-CD od 0 mM až po 40 mM. Také shoda experimentálních bodů s teoretickou závislostí je v případě systému c) u obou metod srovnatelná. Korigovaný koeficient determinace u metody ACE byl $\bar{R}_{\text{ACE}}^2 = 0,99701$ a u metody VACE $\bar{R}_{\text{VACE}}^2 = 0,99882$.

Střední hodnoty efektivní pohyblivosti R-flurbiprofenu stanovené jak metodou ACE, tak VACE jsou shrnuty v tab. 10. Hodnoty konstanty stability komplexu, jeho elektroforetické pohyblivosti a elektroforetická pohyblivost volného R-flurbiprofenu stanovené oběma metodami jsou porovnány v tab. 11. U tohoto systému jsou hodnoty komplexačních parametrů, stejně jako chyba jejich odhadu pro obě metody srovnatelné.

Tab. 10 Střední hodnoty efektivní pohyblivosti R-flurbiprofenu v závislosti na koncentraci TM-β-CD v BGE. Jako chyba je uváděna výběrová směrodatná odchylka.

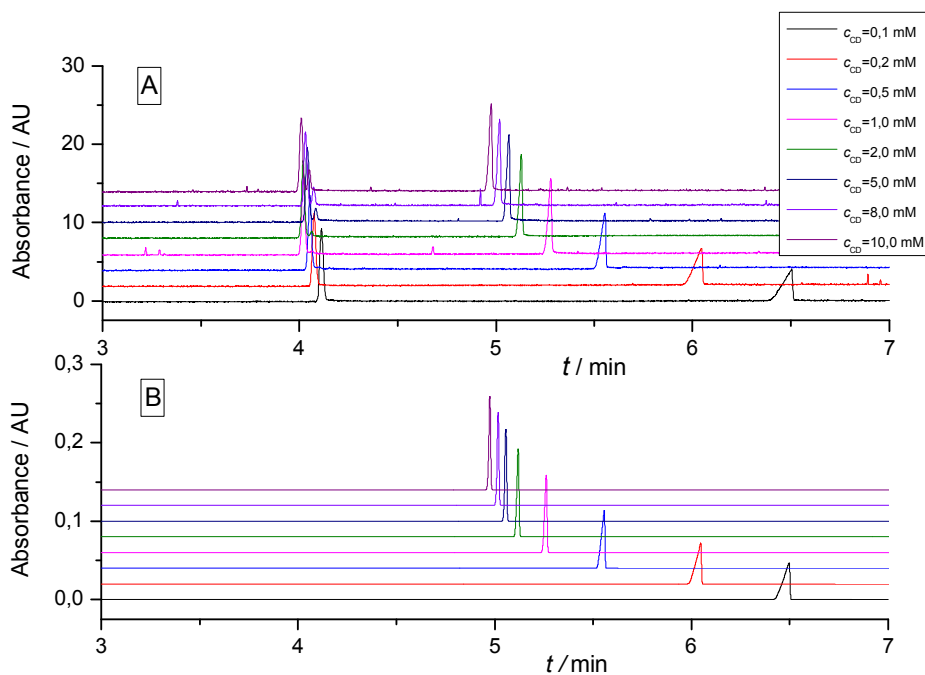
$c_{\text{TM-}\beta\text{-CD}} / \text{mM}$	ACE	VACE
	$\mu_{\text{A,eff}} / 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$\mu_{\text{A,eff}} / 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$
0,1	19,19 ± 0,06	19,57 ± 0,03
0,2	18,51 ± 0,03	19,06 ± 0,01
0,5	16,72 ± 0,04	17,33 ± 0,01
1,0	14,75 ± 0,01	15,52 ± 0,005
2,0	12,72 ± 0,01	12,927 ± 0,004
5,0	10,194 ± 0,007	10,221 ± 0,003
8,0	9,227 ± 0,009	9,207 ± 0,009
10	8,777 ± 0,005	8,735 ± 0,004
20	7,734 ± 0,008	7,726 ± 0,003
30	7,113 ± 0,008	7,127 ± 0,002
40	6,658 ± 0,009	6,706 ± 0,003

Tab. 11 Konstanta stability a elektroforetická pohyblivost komplexu R-flurbiprofenu s TM- β -CD a elektroforetická pohyblivost volného R-flurbiprofenu stanovené metodami ACE a VACE.

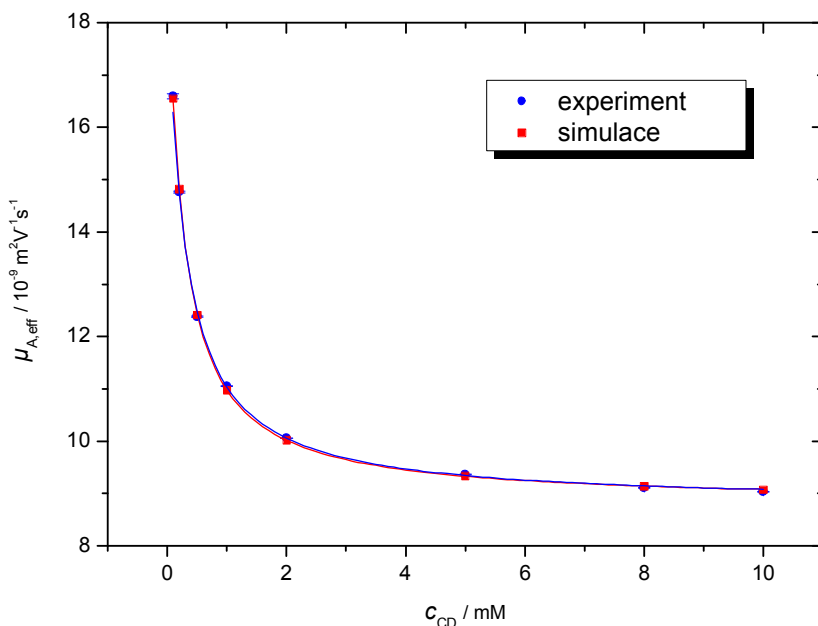
	$K / dm^3 mol^{-1}$	$\mu_{AC} / 10^{-9} m^2 V^{-1} s^{-1}$	$\mu_A / 10^{-9} m^2 V^{-1} s^{-1}$
ACE	552 ± 46	$6,5 \pm 0,2$	$19,7 \pm 0,2$
VACE	526 ± 28	$6,4 \pm 0,1$	$20,3 \pm 0,1$

4.2.3 Simulace pomocí programu Simul 5 Complex

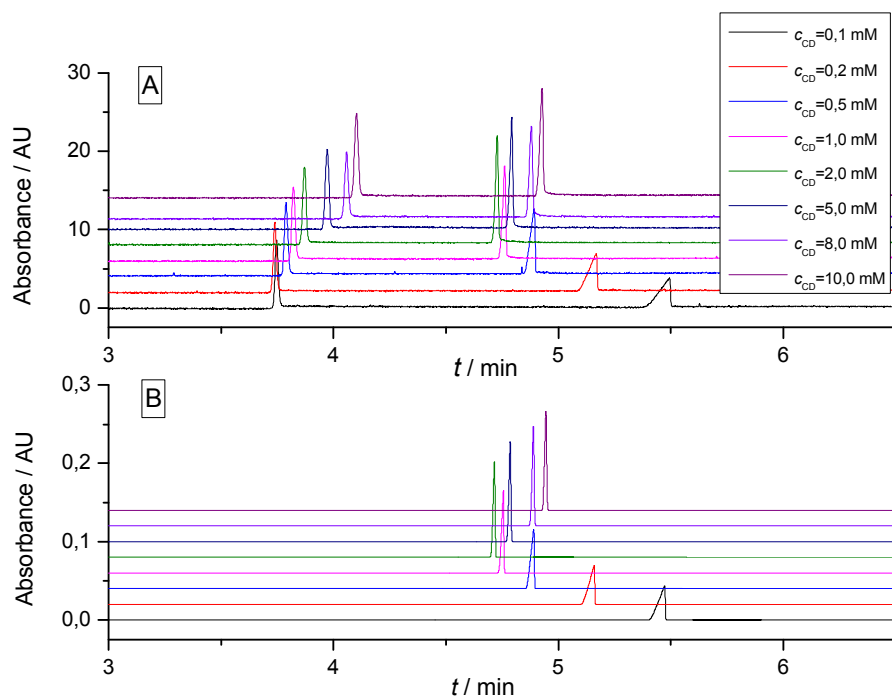
Rozhodnout, která z metod ACE a VACE dává správnou hodnotu konstanty stability, bylo možné s využitím programu Simul 5 Complex. Byl nasimulován vždy jeden run pro každý ACE experiment a každý VACE experiment. Srovnání experimentálních a nasimulovaných elektroferogramů je uvedené na obr. 7, 9, 11, 13, 15 a 17. Experimentální a nasimulované profily se velmi dobře shodují v polohách, výškách i v tvarech píků. Nasimulované elektroferogramy byly vyhodnoceny stejným postupem jako elektroferogramy experimentální. Píky byly opět prokládány HVL funkcí a byly vypočteny efektivní pohyblivosti analytu. V případě ACE metody se takto určené hodnoty efektivní pohyblivosti analytu shodují s hodnotami určenými experimentálně. Program Simul 5 Complex umí rovněž přímo spočítat efektivní pohyblivost analytu při nekonečném zředění. I takto získané hodnoty efektivní pohyblivosti analytu se shodují s experimentálními hodnotami. V případě VACE metody není shoda již tak dobrá. Možné vysvětlení horší shody u metody VACE bude podáno dále. Porovnání závislosti efektivní pohyblivosti analytu na celkové koncentraci cyklodextrinu v BGE zjištěné experimentálně a získané vyhodnocením simulací je uvedeno na obr. 8, 10, 12, 14, 16 a 18.



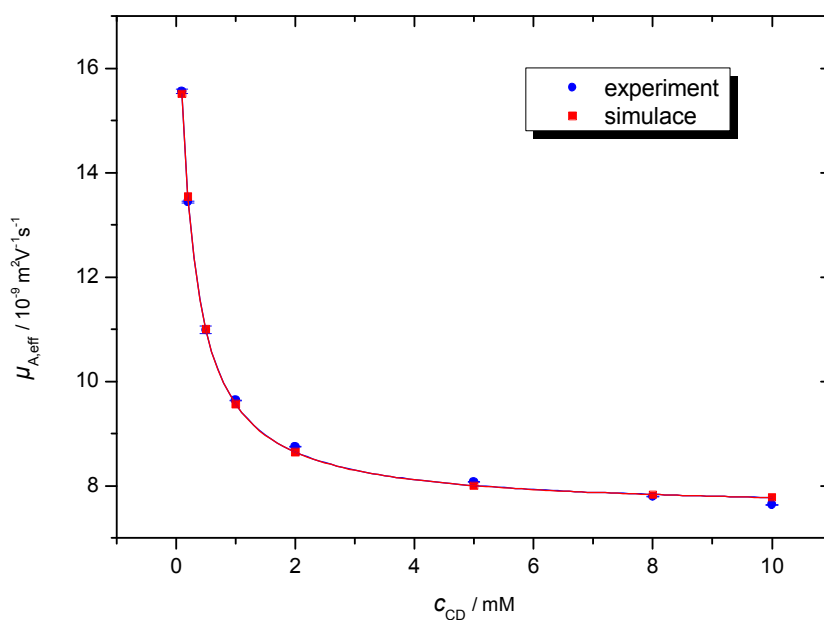
Obr. 7 Metoda ACE, srovnání experimentálních (A) a nasimulovaných (B) elektroferogramů pro systém: analyt R-flurbiprofen, komplexační činidlo β -CD. Z důvodu větší přehlednosti byly jednotlivé elektroferogramy posunuty podél y -ové osy. Hodnota absorbance na y -ové ose tedy představuje pouze relativní velikost signálu.



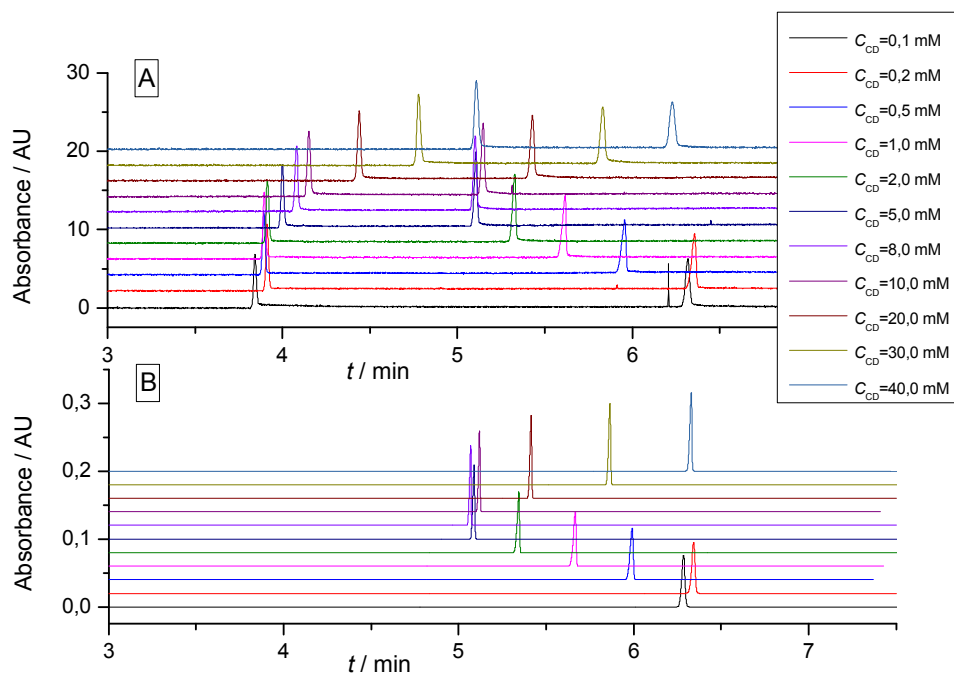
Obr. 8 Metoda ACE. Závislost efektivní pohyblivosti R-flurbiprofenu, stanovené z experimentu a ze simulací, na celkové koncentraci β -CD v BGE. Obě závislosti byly proloženy regresní funkcí (11). Podmínky měření jsou popsány v oddílu 3.3.



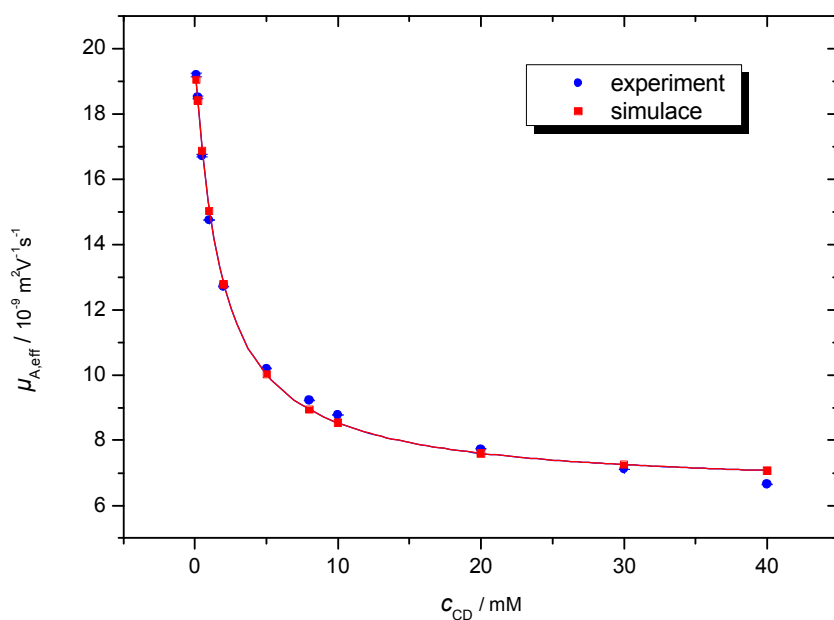
Obr. 9 Metoda ACE, srovnání experimentálních (A) a nasimulovaných (B) elektroferogramů pro systém: analyt R-flurbiprofen, komplexační činidlo DM-β-CD. Z důvodu větší přehlednosti byly jednotlivé elektroferogramy posunuty podél y-ové osy. Hodnota absorbance na y-ové ose tedy představuje pouze relativní velikost signálu.



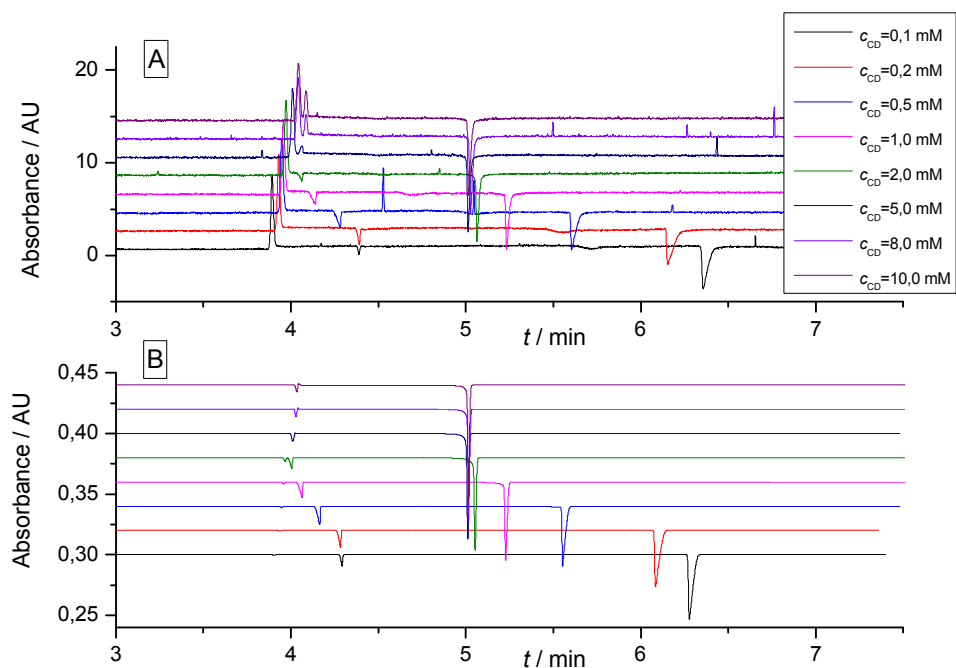
Obr. 10 Metoda ACE. Závislost efektivní pohyblivosti R-flurbiprofenu, stanovené z experimentu a ze simulací, na celkové koncentraci DM-β-CD v BGE. Obě závislosti byly proloženy regresní funkcí (11). Podmínky měření jsou popsány v oddílu 3.3.



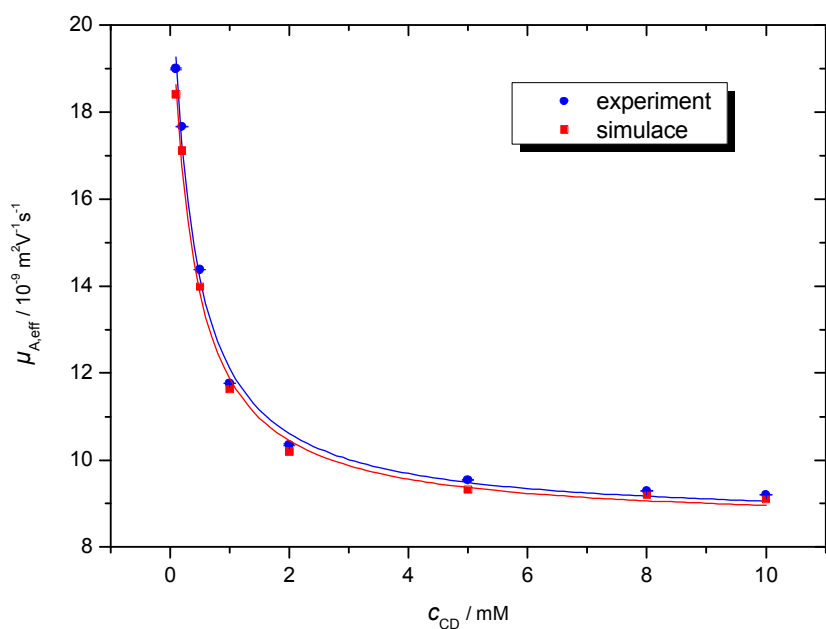
Obr. 11 Metoda ACE, srovnání experimentálních (A) a nasimulovaných (B) elektroferogramů pro systém: analyt R-flurbiprofen, komplexační činidlo TM-β-CD. Z důvodu větší přehlednosti byly jednotlivé elektroferogramy posunuty podél y-ové osy. Hodnota absorbance na y-ové ose tedy představuje pouze relativní velikost signálu.



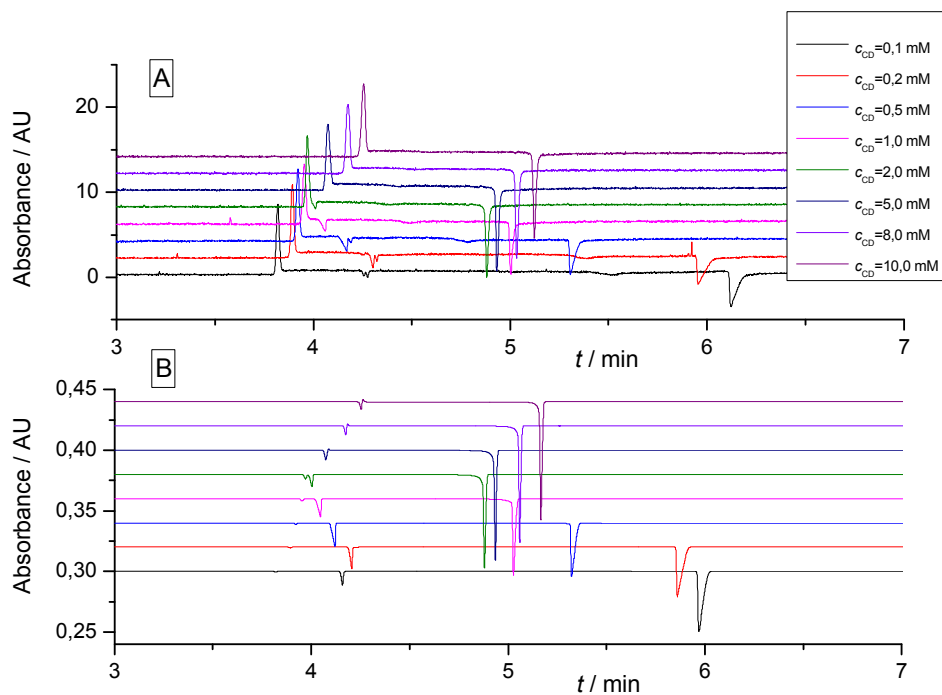
Obr. 12 Metoda ACE. Závislost efektivní pohyblivosti R-flurbiprofenu, stanovené z experimentu a ze simulace, na celkové koncentraci TM-β-CD v BGE. Obě závislosti byly proloženy regresní funkcí (11). Podmínky měření jsou popsány v oddílu 3.3.



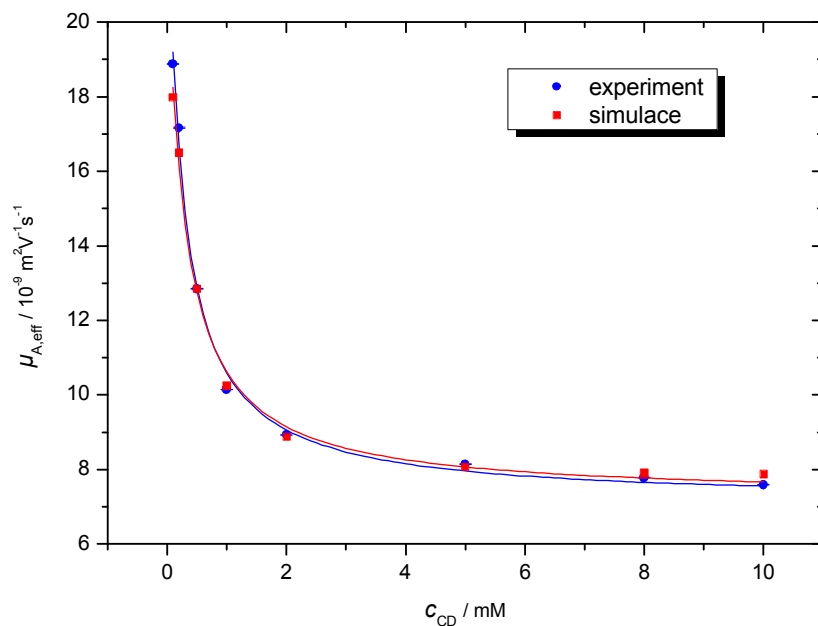
Obr. 13 Metoda VACE, srovnání experimentálních (A) a nasimulovaných (B) elektroferogramů pro systém: analyt R-flurbiprofen, komplexační činidlo β -CD. Z důvodu větší přehlednosti byly jednotlivé elektroferogramy posunuty podél y-ové osy. Hodnota absorbance na y-ové ose tedy představuje pouze relativní velikost signálu.



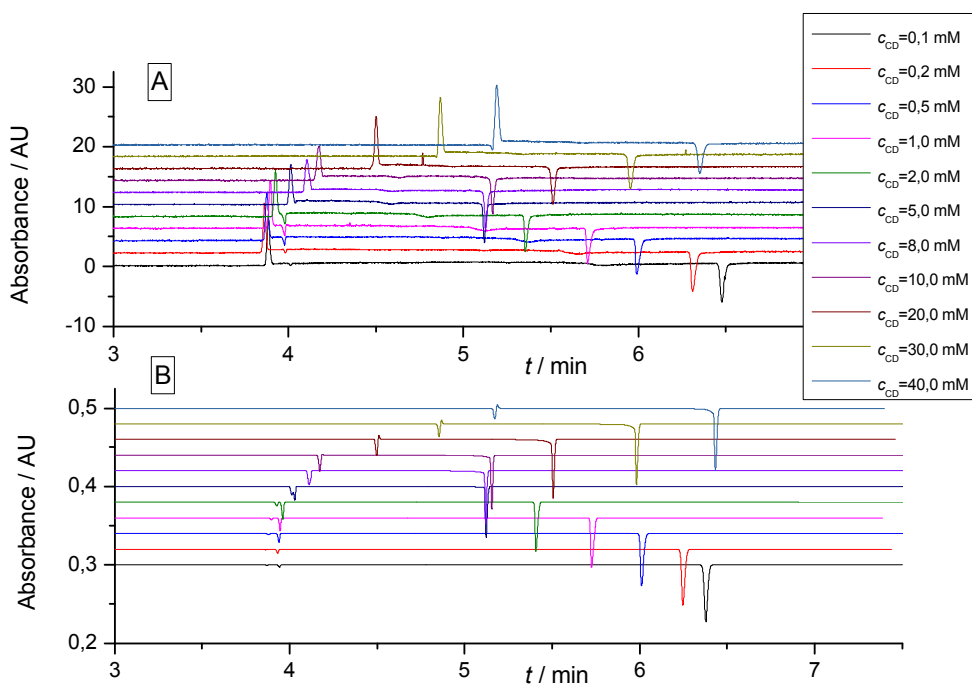
Obr. 14 Metoda VACE. Závislost efektivní pohyblivosti R-flurbiprofenu, stanovené z experimentu a ze simulací, na celkové koncentraci β -CD v BGE. Obě závislosti byly proloženy regresní funkcí (11). Podmínky měření jsou popsány v oddílu 3.3.



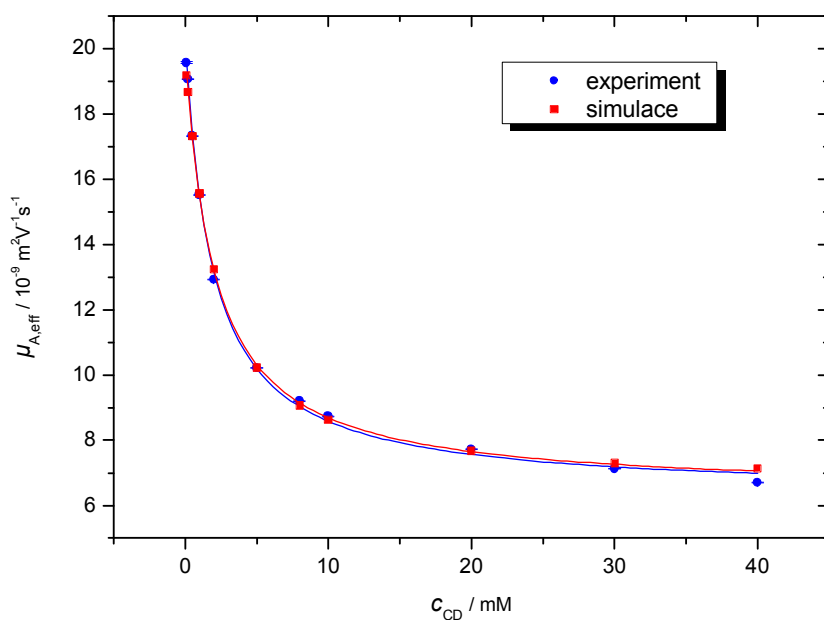
Obr. 15 Metoda VACE, srovnání experimentálních (A) a nasimulovaných (B) elektroferogramů pro systém: analyt R-flurbiprofen, komplexační činidlo DM- β -CD. Z důvodu větší přehlednosti byly jednotlivé elektroferogramy posunuty podél y-ové osy. Hodnota absorbance na y-ové ose tedy představuje pouze relativní velikost signálu.



Obr. 16 Metoda VACE. Závislost efektivní pohyblivosti R-flurbiprofenu, stanovené z experimentu a ze simulací, na celkové koncentraci DM- β -CD v BGE. Obě závislosti byly proloženy regresní funkcí (11). Podmínky měření jsou popsány v oddílu 3.3.



Obr. 17 Metoda VACE, srovnání experimentálních (A) a nasimulovaných (B) elektroferogramů pro systém: analyt R-flurbiprofen, komplexační činidlo TM- β -CD. Z důvodu větší přehlednosti byly jednotlivé elektroferogramy posunuty podél y-ové osy. Hodnota absorbance na y-ové ose tedy představuje pouze relativní velikost signálu.



Obr. 18 Metoda VACE. Závislost efektivní pohyblivosti R-flurbiprofenu, stanovené z experimentu a ze simulací, na celkové koncentraci TM- β -CD v BGE. Obě závislosti byly proloženy regresní funkcí (11). Podmínky měření jsou popsány v oddílu 3.3.

V tab. 12-14 jsou shrnuty konstanty stability získané vyhodnocením experimentálních i nasimulovaných elektroferogramů.

Tab. 12 Konstanty stability, systém β -CD, R-flurbiprofen.

	$K_{\text{exp}} / \text{dm}^3 \text{mol}^{-1}$	$K_{\text{sim}} / \text{dm}^3 \text{mol}^{-1}$
ACE	4040 ± 190	4024 ± 18
VACE	2930 ± 460	2890 ± 400

Tab. 13 Konstanty stability, systém DM- β -CD, R-flurbiprofen.

	$K_{\text{exp}} / \text{dm}^3 \text{mol}^{-1}$	$K_{\text{sim}} / \text{dm}^3 \text{mol}^{-1}$
ACE	4800 ± 400	4825 ± 20
VACE	3800 ± 690	3360 ± 580

Tab. 14 Konstanty stability, systém TM- β -CD, R-flurbiprofen.

	$K_{\text{exp}} / \text{dm}^3 \text{mol}^{-1}$	$K_{\text{sim}} / \text{dm}^3 \text{mol}^{-1}$
ACE	552 ± 46	$552,5 \pm 0,6$
VACE	526 ± 28	489 ± 12

V rámci chyby se hodnoty konstanty stability získané z experimentů a ze simulací shodují. Tato shoda je lepší v případě ACE metody, než v případě metody VACE. Jak plyne z lineárního modelu elektromigrace (viz oddíl 2.2) je pohyblivost systémového píku funkcí elektroforetických pohyblivostí a koncentrací všech složek BGE. Systémové píky ve VACE metodě jsou proto mnohem citlivější na změnu složení BGE než pík analytu v metodě ACE. Případné nepřesnosti při přípravě roztoků se tak více projeví v metodě VACE a shoda se simulacemi je v jejím případě menší.

Správná metoda na stanovení konstanty stability by měla poskytnout stejnou hodnotu konstanty stability, jaká byla zadána jako parametr v simulacích. Jelikož v simulacích byla jako vstupní parametr zadána konstanta stability získaná experimentálně metodou ACE, je z hodnot uvedených v tab. 12-14 zřejmé, že výsledky získané ACE metodou jsou správné. Naopak postup používaný při vyhodnocování elektroferogramů VACE metody správný není. VACE metoda dává obecně efektivní pohyblivosti vyšší než ACE metoda, přičemž největší rozdíl je v oblasti nízkých koncentrací cyklodextrinu 0,1 – 2 mM. V této oblasti koncentrací má však posun v hodnotě efektivní pohyblivosti analytu největší vliv na výsledek regresní analýzy, a tedy na určení konstanty stability. Rozdíl mezi efektivními pohyblivostmi R-flurbiprofenu stanovenými metodami ACE a VACE se

s rostoucí stabilitou vznikajícího komplexu zvětšuje. Jak bude ukázáno v další podkapitole, závisí rozdíl mezi oběma metodami také na zvolené koncentraci analytu. Vztah (11) použitý při vyhodnocení metody VACE na rozdíl od lineárního modelu elektromigrace předpokládá, že pohyblivost systémového píku závisí jen na koncentraci volného komplexačního činidla. Je proto zřejmé, že vztah (11) není schopen korektně popsat závislost pohyblivosti systémového píku na koncentraci komplexačního činidla. Přesný tvar této závislosti není bohužel vzhledem ke složitosti maticových rovnic plynoucí z lineárního modelu elektromigrace možné vyjádřit v analytickém tvaru.

4.2.4 Vliv koncentrace analytu na přesnost ACE a VACE metody

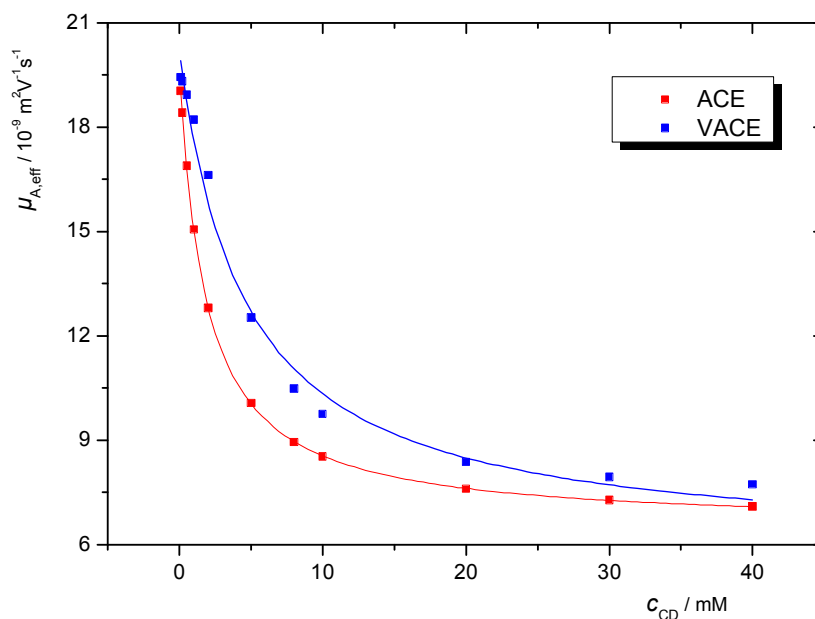
Aby byl prozkoumán také vliv koncentrace analytu na výsledek stanovení konstanty stability metodami ACE a VACE, byly simulace některých experimentů provedeny při dalších koncentracích R-flurbiprofenu. Simulace byly provedeny v systémech s cyklodextriny TM- β -CD a DM- β -CD, tj. v systémech s největší a nejmenší hodnotou konstanty stability komplexu, při koncentraci R-flurbiprofenu 3 mM a pro DM- β -CD i při koncentraci R-flurbiprofenu 0,03 mM. Tyto výsledky jsou nedostupné experimentálně: koncentrace 3 mM nelze dosáhnout z důvodu špatné rozpustnosti R-flurbiprofenu, koncentrace 0,03 mM je naopak příliš nízká, aby mohly být systémové píky detekovány. Simulace tak nabízí jedinou a unikátní možnost detailně studovat chování takovýchto systémů.

S výjimkou výše zmíněné koncentrace analytu zůstaly parametry simulací nezměněny. Elektroferogramy byly vyhodnoceny stejným postupem jako v pododdílu 4.2.3. Na obr. 19-21 jsou porovnány závislosti efektivní pohyblivosti R-flurbiprofenu na celkové koncentraci cyklodextrinu v BGE získané vyhodnocením simulací metod ACE a VACE pro výše popsané systémy. Všechny závislosti jsou proloženy teoretickým vztahem (11). Konstanty stability získané vyhodnocením těchto simulací jsou uvedeny v tab. 15.

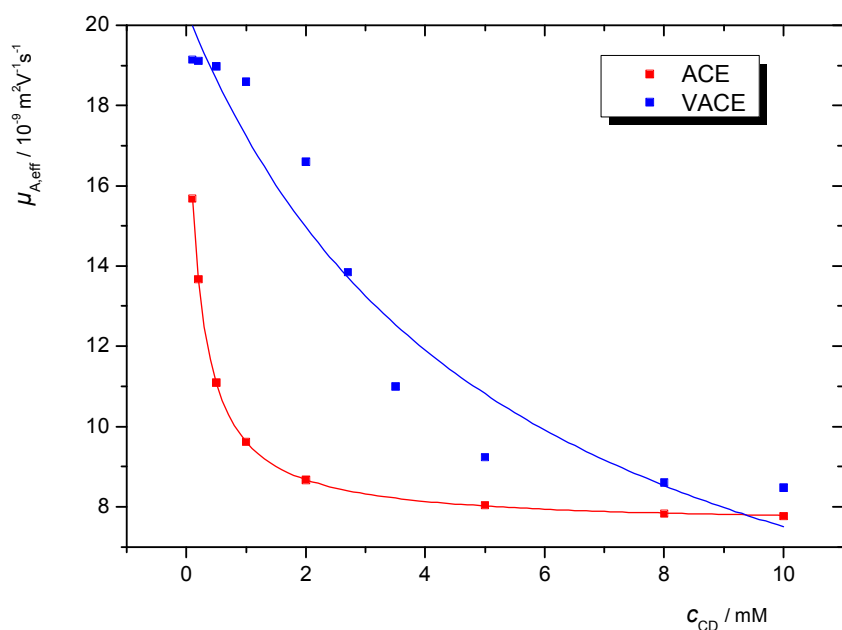
Metoda ACE dává sice pro oba cyklodextriny při koncentraci analytu 3 mM horší výsledek než při koncentraci analytu 0,3 mM, nicméně relativní odchylka od správné hodnoty je menší než 1%. Metoda VACE pro koncentraci analytu 3 mM zcela selhává. Efektivní pohyblivosti R-flurbiprofenu neleží na teoretické závislosti (11). U systému s DM- β -CD jsou odchylky od teoretické závislosti (11) pochopitelně mnohem výraznější, jelikož konstanta stability vznikajícího komplexu je více jak osmkrát větší než u systému

s TM- β -CD. V případě koncentrace R-flurbiprofenu 0,03mM byly pro DM- β -CD získány oběma metodami hodnoty konstanty stability blízké vstupní hodnotě.

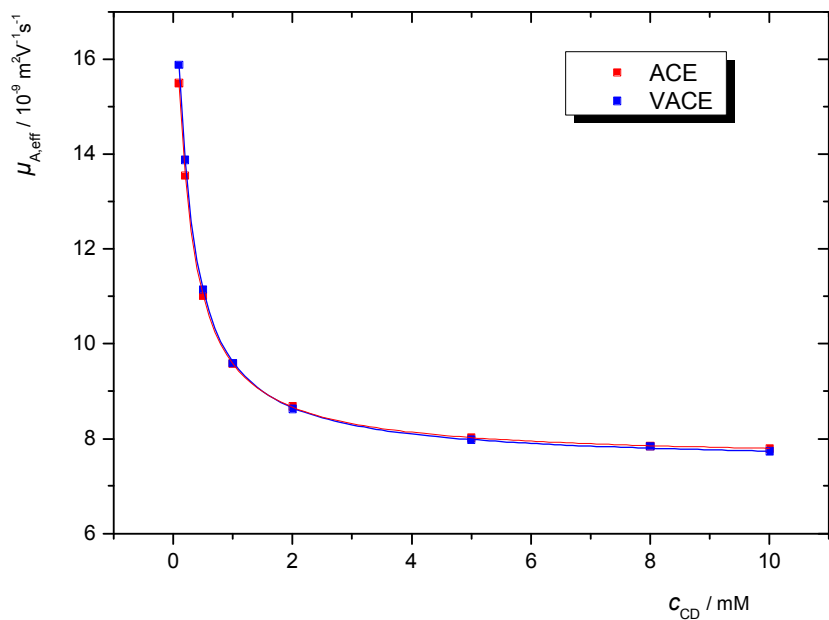
Je tedy možno konstatovat, že tato metoda VACE může vést k zcela zavádějícím výsledkům, jelikož hodnota konstanty stability stanovená touto metodou výrazně závisí na koncentraci analytu v systému.



Obr. 19 Závislost efektivní pohyblivosti R-flurbiprofenu, získané vyhodnocením simulací metody ACE a VACE, na celkové koncentraci TM- β -CD v základním elektrolytu. Koncentrace R-flurbiprofenu, který sloužil jako analyt, byla 3 mM. Obě závislosti byly proloženy regresní funkcí (11).



Obr. 20 Závislost efektivní pohyblivosti R-flurbiprofenu, získané vyhodnocením simulací metody ACE a VACE, na celkové koncentraci DM- β -CD v základním elektrolytu. Koncentrace R-flurbiprofenu, který sloužil jako analyt, byla 3 mM. Obě závislosti byly proloženy regresní funkcí (11).



Obr. 21 Závislost efektivní pohyblivosti R-flurbiprofenu, získané vyhodnocením simulací metody ACE a VACE, na celkové koncentraci DM- β -CD v základním elektrolytu. Koncentrace R-flurbiprofenu, který sloužil jako analyt, byla 0,03 mM. Obě závislosti byly proloženy regresní funkcí (11).

Tab. 15 Vliv koncentrace analytu na hodnotu konstanty stability stanovené metodami ACE a VACE, hodnoty konstant stability získané ze simulací.

c_A / mM		$K / \text{dm}^3 \text{mol}^{-1}$	
		DM- β -CD	TM- β -CD
0,03	ACE	4790 ± 50	—
	VACE	4830 ± 120	—
0,3	ACE	4830 ± 20	$552,5 \pm 0,6$
	VACE	3360 ± 580	489 ± 12
3,0	ACE	4780 ± 50	549 ± 3
	VACE	190 ± 100	220 ± 40
vstupní hodnota v simulacích		4801	552

4.3 Další možnosti vyhodnocení

V práci [25] je navržen postup zpracování závislosti efektivní pohyblivosti analytu na koncentraci cyklodextrinu v BGE, který nevyužívá prokládání píků HVL funkcí. Jako elektromigrační čas píku analytu je brán čas maxima píku. Z tohoto času je vypočtena efektivní pohyblivost analytu a vynesena proti celkové koncentraci cyklodextrinu. Proložení této závislosti vztahem (11) je získán odhad konstanty stability K_0 . Správná hodnota konstanty stability by byla získána, kdyby efektivní pohyblivosti byly vynášeny proti koncentraci volného cyklodextrinu, neboť ta vystupuje ve vztahu (11). Pro koncentraci volného cyklodextrinu platí

$$[C] = -\frac{1}{2}([A]_{\text{tot}} - [C]_{\text{tot}}) - \frac{1}{2K} + \sqrt{\left\{ \frac{K([A]_{\text{tot}} - [C]_{\text{tot}}) + 1}{2K} \right\}^2 + \frac{[C]_{\text{tot}}}{K}} \quad (34)$$

Výrazu (34) lze využít ke stanovení konstanty stability iterační metodou.

Všechny experimenty provedené pro systémy nenabitě komplexační činidlo, nabitý analyt byly nyní vyhodnoceny tímto alternativním postupem. Byly vyzkoušeny tři varianty iterační metody.

metoda A

Koncentrace volného cyklodextrinu byla vypočtena ze vztahu (34), kde za K bylo dosazeno K_0 , za $[A]_{\text{tot}}$ byla dosazena hodnota 0,3 mM a za $[C]_{\text{tot}}$ byla dosazena koncentrace komplexačního činidla v BGE, $[C]_{\text{tot}} = [C]_{\text{BGE}}$. Efektivní pohyblivosti analytu byly vyneseny proti vypočtené koncentraci $[C]$ a získaná závislost byla proložena vztahem (11). Tímto postupem byla získána nová hodnota konstanty stability K_1 , která byla opět dosazena do vztahu (34), a tak byla vypočtena nová hodnota $[C]$. Postup byl opakován, dokud se konstanta stability lišila od své předchozí hodnoty o více než 1%.

Varianty B, C se od varianty A liší jen ve volbě hodnot $[A]_{\text{tot}}$ a $[C]_{\text{tot}}$.

metoda B

Jak hodnota $[A]_{\text{tot}}$, tak hodnota $[C]_{\text{tot}}$ byly odečtené z elektroferogramu získaného pomocí programu Simul 5 Complex přímo v místě píku.

metoda C

Za $[A]_{\text{tot}}$ byla dosazena hodnota odečtená z elektroferogramu v programu Simul 5 Complex v místě píku a za $[C]_{\text{tot}}$ bylo dosazeno $[C]_{\text{tot}} = [C]_{\text{BGE}}$.

Konstanty stability určené iterační metodou jsou shrnuty v tab. 16.

Tab. 16 Konstanty stability určené iterační metodou, $K / \text{dm}^3 \text{mol}^{-1}$.

metoda	β -CD		DM- β -CD		TM- β -CD	
	ACE	VACE	ACE	VACE	ACE	VACE
A	5230 \pm 470	3830 \pm 180	6310 \pm 680	4500 \pm 250	585 \pm 6	536 \pm 3
B	4017 \pm 26	3790 \pm 210	4787 \pm 38	4450 \pm 270	545,8 \pm 0,8	532 \pm 5
C	4334 \pm 25	3610 \pm 200	5205 \pm 52	4250 \pm 260	552,8 \pm 0,7	528 \pm 5

Z tab. 16 je vidět, že tyto alternativní postupy dávají horší výsledky než postup použitý v pododdílech 4.2.1 a 4.2.2. Případná konvergence konstanty stability ke správné hodnotě je jen otázkou štěstí a náhody, ne pravidlem. Jak již bylo diskutováno v práci [51], jediný správný postup vyhodnocení elektroferogramu je tedy ten, který je založený na prokládání píků HVL funkcí.

4.4 Systém nabitý cyklodextrin, nenabitý analyt – slabě komplexující

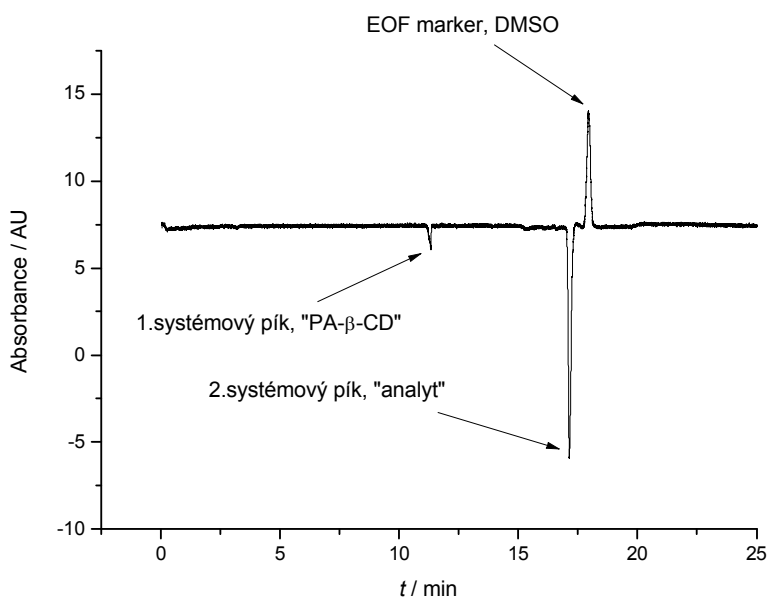
Dále byl studován systém, v němž byl jako komplexační činidlo použit cyklodextrin PA- β -CD a jako analyt S,S-hydrobenzoin. Tyto látky byly vybrány proto, že vytvářejí komplex v poměru 1:1, S,S-hydrobenzoin je ve velké oblasti pH neutrální a PA- β -CD je jednosytná slabá kyselina. Vhodnou volbou pH tak můžeme dosáhnout jeho úplné disociace na kationty s nábojovým číslem +1. Konstanta stability komplexu PA- β -CD s S,S-HB je $K \approx 160$. Podle výsledků studia předchozích systémů by bylo vhodnější, kdyby byla konstanta stability komplexu větší, neboť pak lze očekávat větší rozdíl mezi ACE a VACE metodou. Bohužel nám není znám jiný přesně definovaný kationtový jednomocný cyklodextrin, případně jiný vhodný analyt, který by vytvářel komplex s větší konstantou stability, a přitom ve stechiometrickém poměru 1:1.

4.4.1 Experiment

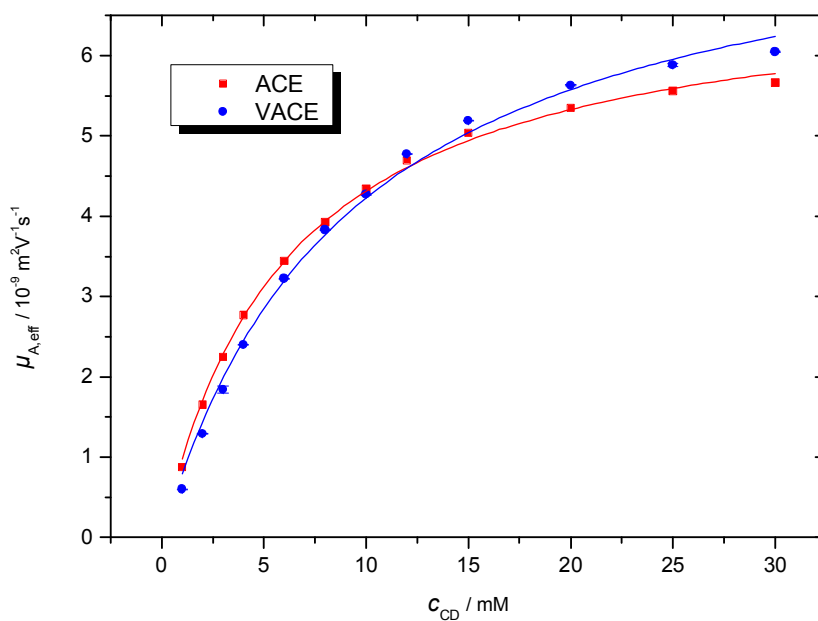
Systém PA- β -CD, S,S-HB byl již dříve studován ACE metodou [43, 54]. V této diplomové práci byla proto provedena pouze série VACE experimentů. V práci Beneše a kol. [54] byla koncentrace dávkovaného S,S-HB zvolena 0,3 mM. Aby byly píky lépe detekovatelné, byla v metodě VACE koncentrace S,S-HB zvýšena na 1 mM. Koncentrace PA- β -CD byly zvoleny tak, aby pokrývaly oblast od hodnot srovnatelných s koncentrací analytu do hodnot, kdy je analyt cyklodextrinem saturován. Protože konstanta stability a elektroforetické pohyblivosti závisí na iontové síle, byla ve všech experimentech udržována konstantní iontová síla 40 mM. Příklad elektroferogramu VACE experimentu zaznamenaný DAD detektorem je uveden na obr. 19. V systému vznikají dva systémové píky s téměř nulovou pohyblivostí (na obr. 19 překryty píkem markeru EOF), dále jeden systémový pík příslušející analytu a jeden systémový pík příslušející PA- β -CD.

Postupem uvedeným v oddílu 4.1 byly stanoveny efektivní pohyblivosti S,S-HB, vyneseny do grafu v závislosti na celkové koncentraci PA- β -CD v BGE a proloženy regresní funkcí (15), viz obr. 20. Regresní analýzou byla stanovena konstanta stability komplexu $K_{\text{PA-}\beta\text{-CD}}^{\text{VACE}} = (105 \pm 8) \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1}$. Efektivní pohyblivosti stanovené ACE metodou, převzaté z [54], byly vyneseny do grafu proti celkové koncentraci PA- β -CD v BGE a též proloženy regresní funkcí (15), viz obr. 20. Regresní analýzou byla stanovena konstanta stability komplexu $K_{\text{PA-}\beta\text{-CD}}^{\text{ACE}} = (163 \pm 5) \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1}$. V případě ACE metody se

experimentální body shodují s teoretickou závislostí mnohem lépe než v případě metody VACE.



Obr. 19 Záznam z DAD detektoru, metoda VACE. Složení BGE: 78 mM CH₃COOH, 39 mM LiOH, 1 mM PA-β-CD.



Obr. 20 Závislost efektivní pohyblivosti S,S-HB, změřené metodou ACE a VACE, na celkové koncentraci PA-β-CD v BGE. Obě závislosti byly proloženy regresní funkcí (15). Podmínky měření jsou popsány v oddílu 3.3.

Střední hodnoty efektivní pohyblivosti S,S-hydrobenzoinu stanovené jak metodou ACE, tak VACE jsou shrnuty v tab. 17. Hodnoty konstanty stability komplexu a jeho elektroforetické pohyblivosti stanovené oběma metodami jsou porovnány v tab. 18. Je zřejmé, že i v tomto systému s nízkou hodnotou konstanty stability dávají metody ACE a VACE odlišné výsledky.

Tab. 17 Střední hodnoty efektivní pohyblivosti S,S-HB v závislosti na koncentraci PA- β -CD v BGE. Jako chyba metody VACE je uváděna výběrová směrodatná odchylka.

$c_{\text{PA-}\beta\text{-CD}} / \text{mM}$	ACE	VACE
	$\mu_{\text{A,eff}} / 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$\mu_{\text{A,eff}} / 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$
1	0,87	$0,599 \pm 0,002$
2	1,65	$1,292 \pm 0,003$
3	2,25	$1,84 \pm 0,04$
4	2,77	$2,400 \pm 0,004$
6	3,44	$3,224 \pm 0,004$
8	3,93	$3,831 \pm 0,008$
10	4,34	$4,27 \pm 0,01$
12	4,69	$4,775 \pm 0,002$
15	5,04	$5,188 \pm 0,006$
20	5,35	$5,630 \pm 0,008$
25	5,56	$5,88 \pm 0,02$
30	5,66	$6,045 \pm 0,009$

Tab. 18 Konstanta stability a elektroforetická pohyblivost komplexu S,S-hydrobenzoinu s PA- β -CD stanovené metodami ACE a VACE.

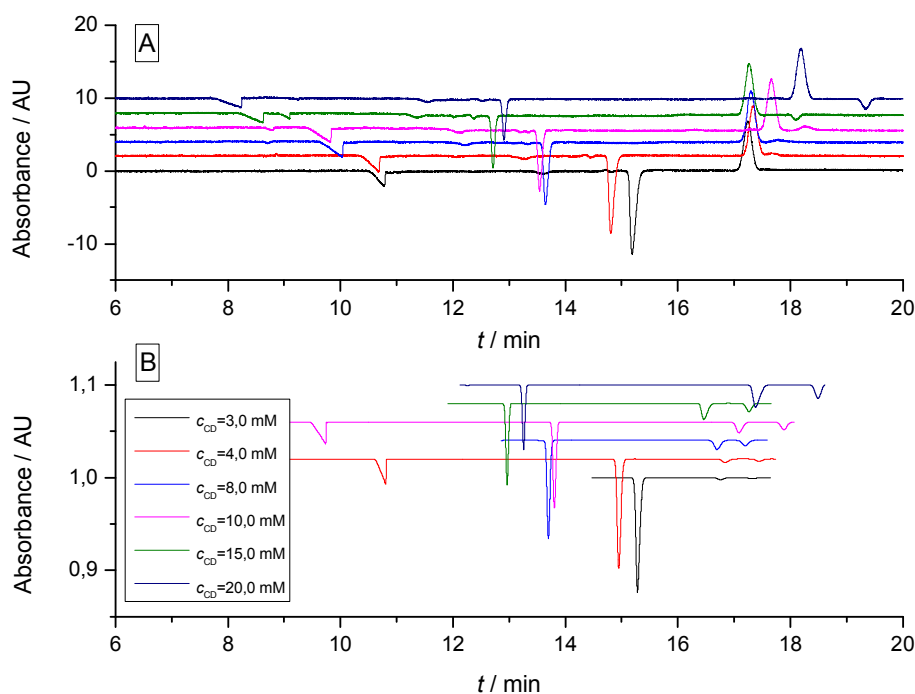
	$K / \text{dm}^3 \text{ mol}^{-1}$	$\mu_{\text{AC}} / 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$
ACE	163 ± 5	$7,0 \pm 0,1$
VACE	105 ± 8	$8,2 \pm 0,3$

4.4.2 Simulace

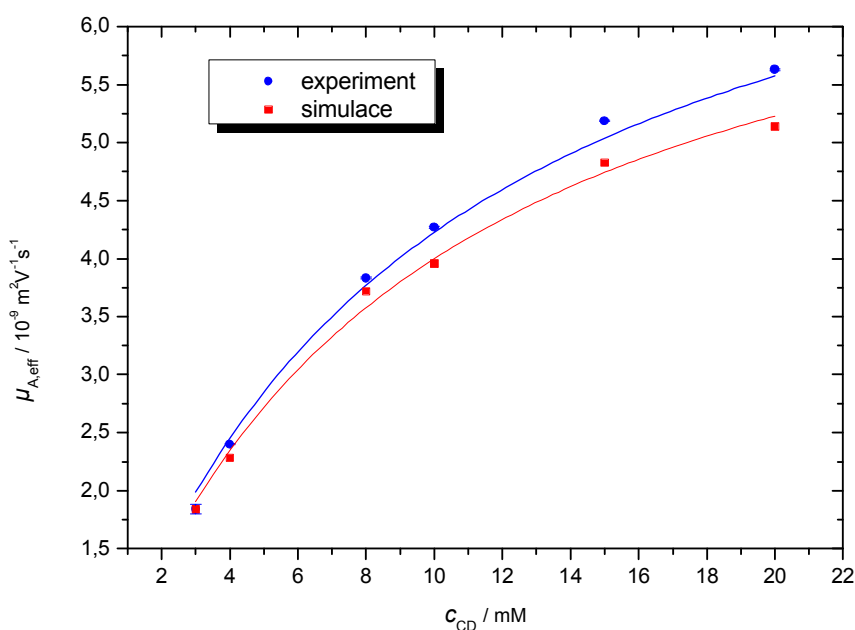
Pro ověření výsledků VACE metody byly VACE experimenty nasimulovány v programu Simul 5 Complex. Vzhledem k malým hodnotám efektivní pohyblivosti analytu se výpočetní čas simulací pohyboval v řádu jednoho týdne. Z tohoto důvodu byly nasimulovány VACE experimenty pouze pro vybrané koncentrace PA- β -CD a pouze v případě dvou koncentrací, 4 mM a 10 mM, byl nasimulován celý elektroferogram. U ostatních koncentrací byla simulována pouze část separace tak, aby bylo možno určit

dostatečně přesně efektivní pohyblivost příslušného systémového píku. V simulacích byla jako vstupní hodnota zadána konstanta stability získaná experimentálně metodou ACE.

Srovnání experimentálních a nasimulovaných elektroferogramů je uvedené na obr. 21. Experimentální a nasimulované profily se velmi dobře shodují v polohách, výškách i v tvarech píků. Nasimulované elektroferogramy byly vyhodnoceny stejným postupem jako elektroferogramy experimentální. Píky byly opět proloženy HVL funkcí a následně byly vypočteny efektivní pohyblivosti analytu. Hodnoty takto určených efektivních pohyblivostí analytu jsou blízké experimentálním hodnotám. Porovnání závislosti efektivní pohyblivosti analytu na celkové koncentraci PA- β -CD v BGE zjištěné experimentálně a získané vyhodnocením simulací jsou uvedeny na obr. 22.



Obr. 21 Metoda VACE, srovnání experimentálních a nasimulovaných elektroferogramů pro systém analyt S,S-HB, komplexační činidlo PA- β -CD. Z důvodu větší přehlednosti byly jednotlivé elektroferogramy posunuty podél y -ové osy. Hodnota absorbance na y -ové ose tedy představuje pouze relativní velikost signálu.



Obr. 22 Metoda VACE. Závislost efektivní pohyblivosti S,S-hydrobenzoinu na celkové koncentraci PA-β-CD v základním elektrolytu. Obě závislosti byly proloženy regresní funkcí (15). Podmínky měření jsou popsány v oddílu 3.3.

V tab. 19 jsou shrnuty hodnoty konstant stability získané vyhodnocením experimentálních i nasimulovaných elektroferogramů.

Tab. 19 Konstanty stability. Systém PA-β-CD, S,S-hydrobenzoin.

	$K_{\text{exp}} / \text{dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$	$K_{\text{sim}} / \text{dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$
ACE	163 ± 5	—
VACE	105 ± 8	112 ± 10

Přestože komplexace je v tomto systému velmi slabá, neshodují se $K_{\text{exp}}^{\text{ACE}}$ a $K_{\text{sim}}^{\text{VACE}}$ ani v rámci svých chyb. V systémech nenabitý analyt, nabitě komplexační činidlo není tedy VACE metoda použitelná ani při malých hodnotách komplexační konstanty. Příčinou může být to, že se v sérii VACE experimentů mění složení BGE z důvodu zachování konstantní iontové síly, což může výrazně ovlivnit chování systémových píků.

4.5 Systém nabitý cyklodextrin, nenabitý analyt – silně komplexující

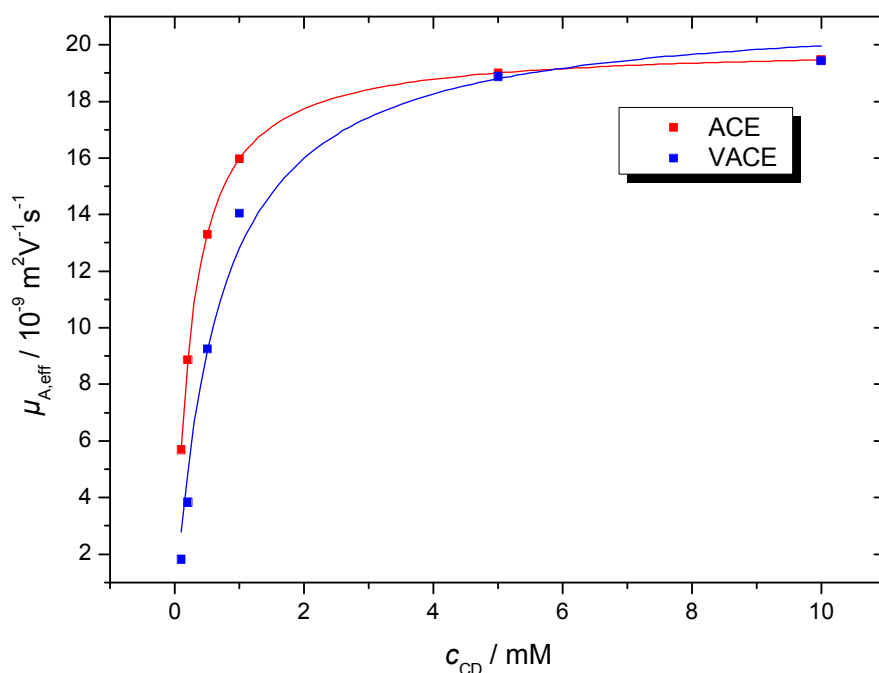
Studium předchozího systému s analytem S,S-HB a komplexačním činidlem PA- β -CD naznačilo, že i v systému tvořeném nenabitým analytem a nabitým komplexačním činidlem budou ACE a VACE metoda dávat odlišné výsledky. Nicméně hodnota konstanty stability $K \approx 160$ je příliš malá na to, aby se rozdíly mezi oběma metodami průkazně projevily. Protože v současné době není dostupný kationtový jednomocný cyklodextrin, který by vytvářel komplex s větší konstantou stability, a přitom ve stechiometrickém poměru 1:1, byl navržen vhodný modelový systém s větší hodnotou konstanty, ve kterém byla provedena obdobná sada simulací jako v reálných systémech. Konstanta stability komplexu $K = 3981 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1}$ a jeho elektroforetická pohyblivost $\mu_{AC} = 20 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ byly zvoleny blízké experimentálním hodnotám pro systém R-flurbiprofen, β -CD. Podmínky simulací jsou podrobně popsány v oddílu 3.4. Postup vyhodnocení elektroferogramů se nijak nelišil od postupu v oddílu 4.4. V tab. 20 jsou uvedeny efektivní pohyblivosti analytu stanovené jak metodou ACE, tak metodou VACE v závislosti na celkové koncentraci komplexačního činidla (značené CD) v BGE pro dvě koncentrace analytu.

Tab. 20 Efektivní pohyblivosti analytu stanovené metodou ACE a VACE v závislosti na koncentraci komplexačního činidla (značené CD).

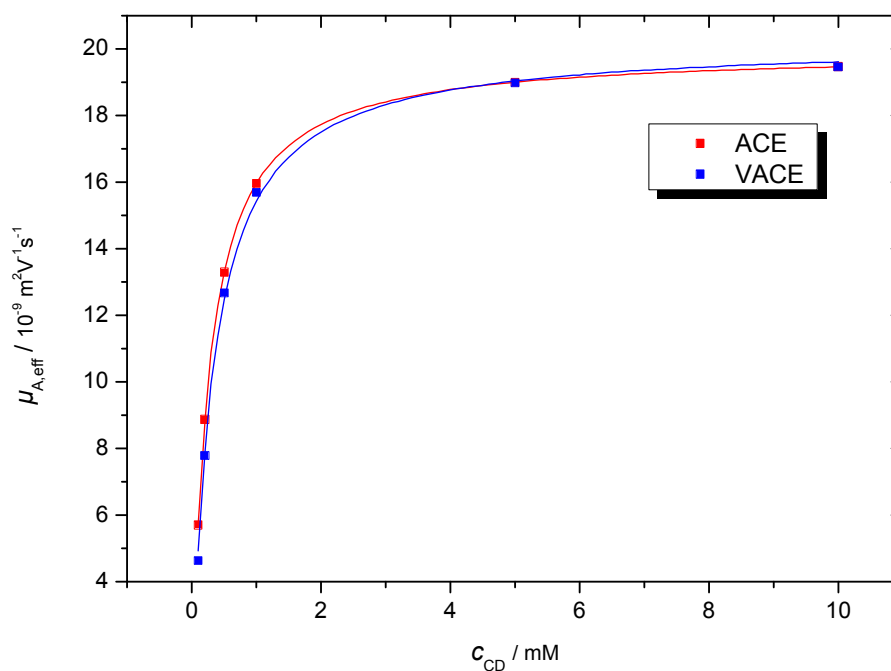
c_{CD} / mM	$c_A = 0,3 \text{ mM}$		$c_A = 0,05 \text{ mM}$	
	ACE	VACE	ACE	VACE
$\mu_{A, \text{eff}} / 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$				
0,1	5,70	1,82	5,70	4,63
0,2	8,87	3,83	8,87	7,78
0,5	13,30	9,26	13,30	12,67
1,0	15,98	14,05	15,96	15,69
5,0	19,00	18,89	19,00	18,98
10,0	19,47	19,44	19,47	19,46

Z hodnot uvedených v tab. 20 je vidět, že efektivní pohyblivost analytu stanovená metodou ACE vůbec nezávisí na koncentraci analytu, ale jen na koncentraci komplexačního činidla. Tato skutečnost není překvapující a je zcela v souladu s teoretickou závislostí (15). Naopak efektivní pohyblivost analytu stanovená metodou VACE je jiná pro koncentraci analytu 0,3 mM a pro koncentraci analytu 0,05 mM. Tento

rozdíl je dalším důkazem toho, že pohyblivost systémového píku, který v metodě VACE odpovídá analytu, není pouze funkcí koncentrace komplexačního činidla, jak je předpokládáno ve vztahu (15), ale závisí na koncentracích více složek BGE. Na obr. 23 je vynesena závislost efektivní pohyblivosti analytu na celkové koncentraci komplexačního činidla v BGE jak pro metodu ACE, tak pro VACE, a to pro koncentraci analytu 0,3 mM. Na obr. 24 je vynesena tatáž závislost pro koncentraci analytu 0,05 mM.



Obr. 23 Závislost efektivní pohyblivosti analytu, změřené metodou ACE a VACE, na celkové koncentraci CD v BGE. Obě závislosti byly proloženy regresní funkcí (15). Koncentrace analytu byla 0,3 mM.



Obr. 24 Závislost efektivní pohyblivosti analytu, změřené metodou ACE a VACE, na celkové koncentraci CD v BGE. Obě závislosti byly proloženy regresní funkcí (15). Koncentrace analytu byla 0,05 mM.

Regresní analýzou určené hodnoty konstanty stability jsou uvedené v tab. 21.

Tab. 21 Hodnoty konstanty stability a elektroforetické pohyblivosti komplexu stanovené metodami ACE a VACE na základě provedených simulací. Simulace byly provedeny pro koncentrace analytu $c_A=0,3$ mM a $c_A=0,05$ mM. V simulacích byla jako vstupní hodnota zadána konstanta stability $K_{\text{sim}}=3981 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1}$.

	ACE		VACE	
	$c_A = 0,3 \text{ mM}$	$c_A = 0,05 \text{ mM}$	$c_A = 0,3 \text{ mM}$	$c_A = 0,05 \text{ mM}$
$K / \text{dm}^3 \text{ mol}^{-1}$	4001 ± 5	4003 ± 2	1510 ± 240	3220 ± 120
$\mu_{AC} / 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$19,956 \pm 0,006$	$19,948 \pm 0,003$	$21,3 \pm 0,9$	$20,2 \pm 0,2$

Z tab. 21 je zřejmé, že metoda ACE dává pro obě koncentrace analytu hodnotu konstanty stability, která je blízká správné hodnotě K_{sim} . Konstanta stability získaná metodou VACE je pro obě koncentrace analytu menší než správná hodnota K_{sim} . Pro koncentraci analytu 0,3 mM je tento rozdíl dokonce podstatně větší než u systému β -CD,

R-flurbiprofen, kde měla konstanta stability komplexu β -CD s R-flurbiprofenem podobnou hodnotu $4040 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1}$, viz tab. 12 (str. 52). Stejně jako v systémech nenabitě komplexační činidlo, nabitý analyt se změřená závislost efektivní pohyblivosti analytu na koncentraci komplexačního činidla příliš neshoduje s teoretickou závislostí. Proto byly VACE metodou určeny konstanty stability s mnohem větší chybou než metodou ACE. Pro koncentraci analytu 0,3 mM je $\bar{R}_{ACE}^2 = 1$, $\bar{R}_{VACE}^2 = 0,98212$ a pro koncentraci analytu 0,05 mM je $\bar{R}_{ACE}^2 = 1$, $\bar{R}_{VACE}^2 = 0,99836$. Jak se konstanta stability určená VACE metodou liší od správné hodnoty, závisí na koncentraci analytu. Horší výsledek poskytuje VACE metoda v případě vyšší koncentrace analytu.

5 Závěr

V této práci byly studovány dvě odlišné metody stanovení konstanty stability komplexů pomocí kapilární elektroforézy, metody ACE a VACE. Hlavní pozornost byla věnována posouzení správnosti konstant stability získaných těmito metodami.

Pro studium byly vybrány dva typy systémů. V prvním systému byl jako komplexační činidlo použit nenabitý cyklodextrin (β -CD, DM- β -CD a TM- β -CD) a jako analyt R-flurbiprofen, který byl při zvoleném pH BGE zcela disociován na jednomocné anionty. V druhém systému byl analytem neutrální S,S-hydrobenzoin a komplexační činidlo tvořil cyklodextrin PA- β -CD, který byl při zvoleném pH BGE zcela disociován na jednomocné kationty.

Nejprve byly metodami ACE a VACE stanoveny efektivní pohyblivosti analytu v jednotlivých systémech pro různé koncentrace komplexačního činidla v BGE. Vyhodnocením závislosti efektivní pohyblivosti analytu na celkové koncentraci komplexačního činidla v BGE byly stanoveny konstanty stability komplexů. Následně byly provedené experimenty nasimulovány v programu Simul 5 Complex. Nasimulované elektroferogramy se velmi dobře shodovaly s elektroferogramy experimentálními v polohách píků, jejich výškách i tvarech. Byla tak potvrzena schopnost programu Simul 5 Complex předpovídat výsledky elektroforetické separace jak pro metodu ACE, tak pro metodu VACE. Byly též porovnány různé metody určení efektivní pohyblivosti ze zaznamenaného elektroferogramu a bylo ověřeno, že jediný správný postup je ten navržený v práci [51], který spočívá v proložení píku HVL funkcí a výpočtu efektivní pohyblivosti z odpovídajícího parametru HVL funkce.

Nasimulované elektroferogramy byly vyhodnoceny stejným postupem jako elektroferogramy experimentální. Správnost konstant stability stanovených metodami ACE a VACE byla posuzována podle jejich shody s hodnotou konstanty, která byla zadána jako vstupní parametr v simulacích. Bylo zjištěno, že ACE metoda dává správnou hodnotu konstanty stability pro všechny studované systémy. VACE metoda se naopak ukázala jako nepoužitelná pro silně komplexující systémy, kdy se konstanta stability určená VACE metodou liší od své správné hodnoty o téměř 30%. V systému s nenabitým analytem a nabitým komplexačním činidlem dává VACE metoda nesprávné výsledky i při malé hodnotě konstanty stability vznikajícího komplexu.

Dále byly provedeny simulace metod ACE a VACE pro několik dalších systémů lišících se velikostí konstanty stability vznikajícího komplexu či zvolenou koncentrací analytu. Z výsledků těchto simulací plyne, že konstanta stability stanovená metodou VACE závisí na koncentraci analytu. Naopak konstanta stability stanovená metodou ACE na koncentraci analytu nezávisí.

Příčinou nesprávných výsledků metody VACE je skutečnost, že teoretické vztahy (12) a (14) nejsou schopny správně popsat chování systémových píků. Z lineárního modelu elektromigrace vyplývá, že závislost pohyblivosti systémových píků na koncentraci jednotlivých složek BGE je složitější než ta, která je předpokládána ve vztazích (12) a (14). Analytické řešení tohoto problému však dosud nebylo nalezeno.

Literatura

- [1] Patrick, J. S., Lagu, A.L.: *Electrophoresis* **22**, 4179 (2001)
- [2] Pacáková, V., Coufal, P., Štulík, K., Gaš, B.: *Electrophoresis* **24**, 1883 (2003)
- [3] Chankvetadze, B., *Capillary Electrophoresis in Chiral Analysis*, Chichester, John Wiley & Sons, 1997
- [4] Štědrý, M., Jaroš, M., Gaš, B.: *J. Chromatogr. A* **960**, 187 (2002)
- [5] Štědrý, M., Jaroš, M., Včeláková, K., Gaš, B.: *Electrophoresis* **24**, 536 (2003)
- [6] Štědrý, M., Jaroš, M., Hruška, V., Gaš, B.: *Electrophoresis* **25**, 3071 (2004)
- [7] Gaš, B., Kenndler, E.: *Electrophoresis* 2004, **25**, 3901 (2004)
- [8] Gaš, B., Hruška, V., Dittmann, M., Bek, F., Witt, K.: *J. Sep. Sci.* **30**, 1435 (2007)
- [9] Gebauer, P., Boček, P.: *J. Chromatogr. A* **772**, 73 (1997)
- [10] Desiderio, C., Fanali, S., Gebauer, P., Boček, P.: *J. Chromatogr. A* **772**, 81 (1997)
- [11] Jaroš, M., Hruška, V., Štědrý, M., Zusková, I., Gaš, B.: *Electrophoresis* **25**, 3080 (2004)
- [12] Hruška, V., Riesová, M., Gaš, B.: *Electrophoresis* **33**, 923 (2012)
- [13] Riesová, M., Hruška, V., Gaš, B.: *Electrophoresis* **33**, 931 (2012)
- [14] Hruška, V., Svobodová, J., Beneš, M., Gaš, B.: *J. Chromatogr. A* 2012, <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2012.06.086>
- [15] Beneš, M., Svobodová, J., Hruška, V., Dvořák, M., Zusková, I., Gaš, B.: *J. Chromatogr. A* 2012, <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2012.06.053>
- [16] Rundlett, K. L., Armstrong, D. W.: *Electrophoresis* **18**, 2194 (1997)
- [17] Armstrong, D. W., Rundlett, K. L.: *Electrophoresis* **22**, 1419 (2001)
- [18] Armstrong, D. W., Jiang, Ch.: *Electrophoresis* **31**, 17 (2010)
- [19] Busch, M. H. A., Kraak, J. C., Poppe, H.: *J. Chromatogr. A* **777**, 329 (1997)
- [20] Busch, M. H. A., Carels, L. B., Boelens, H. F. M., Kraak, J. C., Poppe, H.: *J. Chromatogr. A* **777**, 311 (1997)
- [21] Tanaka, Y., Terabe, S.: *J. Chromatogr. B* **768**, 81 (2002)
- [22] Schou, C., Heegaard, N. H. H.: *Electrophoresis* **27**, 44 (2006)
- [23] Bowser, M. T., Chen, D. D. Y.: *J. Phys. Chem. A* **102**, 8063 (1998)
- [24] Bowser, M. T., Chen, D. D. Y.: *J. Phys. Chem. A* **103**, 197 (1999)
- [25] Busch, M. H. A., Boelens, H. F. M., Kraak, J. C., Poppe, H.: *J. Chromatogr. A* **775**, 313 (1997)

-
- [26] McDonnell, P. A., Caldwell, G. W., Masucci, J. A.: *Electrophoresis* **19**, 448 (1998)
- [27] Ostergaard, J., Heegaard, N. H. H.: *Electrophoresis* **27**, 2590 (2006)
- [28] Thormann, W., Caslavská, J., Breadmore, M. C., Mosher, R. A.: *Electrophoresis* **30**, S16 (2009)
- [29] Thormann, W., Breadmore, M. C., Caslavská, J., Mosher, R. A.: *Electrophoresis* **31**, 726 (2010)
- [30] Bercovici, M., Lele, S. K., Santiago, J. G.: *J. Chromatogr. A* **1216**, 1008 (2009)
- [31] Mosher, R. A., Dewey, D., Thormann, W., Saville, D. A., Bier M.: *Anal. Chem.* **61**, 362 (1989)
- [32] Thormann, W., Zhang, C. X., Caslavská, J., Gebauer, P., Mosher, R. A.: *Anal. Chem.* **70**, 549 (1998)
- [33] Hruška, V., Jaroš, M., Gaš, B.: *Electrophoresis* **27**, 984 (2006)
- [34] Bercovici, M., Lele, S. K., Santiago, J. G.: *J. Chromatogr. A* **1217**, 588 (2010)
- [35] Mosher, R. A., Breadmore, M. C., Thormann, W.: *Electrophoresis* **32**, 532 (2011)
- [36] Dubrovčáková, E., Gaš, B., Vacík, J., Smolková-Keulemansová, E.: *J. Chromatogr.* **623**, 337 (1992)
- [37] Fang, N., Chen, D. D. Y.: *Anal. Chem.* **77**, 840 (2005)
- [38] Fang, N., Sun, Y., Zheng, J., Chen, D. D. Y.: *Electrophoresis* **28**, 3214 (2007)
- [39] Righetti, P. G., Andreev, V. P., Pliss, N. S.: *Electrophoresis* **23**, 889 (2002)
- [40] Breadmore, M. C., Quirino, J. P., Thormann, W.: *Electrophoresis* **30**, 570 (2009)
- [41] Breadmore, M. C., Kwan, H. Y., Časlavská, J., Thormann, W.: *Electrophoresis* **33**, 958 (2012)
- [42] Hruška, V., Beneš, M., Svobodová, J., Zusková, I., Gaš, B.: *Electrophoresis* **33**, 938 (2012)
- [43] Svobodová, J., Beneš, M., Hruška, V., Ušelová, K., Gaš, B.: *Electrophoresis* **33**, 948 (2012)
- [44] Fang, N., Chen, D. D. Y.: *Anal. Chem.* **77**, 2415 (2005)
- [45] Gaš, B., Štědrý, M., Kenndler, E.: *Electrophoresis*, **18**, 2123 (1997)
- [46] Gaš, B., Kenndler, E.: *Electrophoresis* **21**, 3888 (2000)
- [47] Fang, N., Ting, E., Chen, D. D. Y.: *Anal. Chem.* **76**, 1708 (2004)
- [48] Horká, M., Šlais, K.: *Electrophoresis* **21**, 2814 (2000)
- [49] Fang, N., Chen, D. D. Y.: *Anal. Chem.* **78**, 1832 (2006)

-
- [50] Sun, Y., Fang, N., Chen, D. D. Y.: *Electrophoresis* **29**, 3333 (2008)
- [51] Le Saux, T., Varenne, A., Gareil, P.: *Electrophoresis* **26**, 3094 (2005)
- [52] Haarhoff, P. H., Van der Linde, H. J.: *Anal. Chem.* **38**, 573 (1966)
- [53] Erny, G. L., Bergström, E. T., Goodall, D. M.: *J. Chromatogr. A* **959**, 229 (2002)
- [54] Beneš, M., Zusková, I., Svobodová, J., Gaš, B.: *Electrophoresis* **33**, 1032 (2012)