

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

---

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Analytická chemie



Martina Brandejsová

CHARAKTERIZACE NÍZKOMOLEKULÁRNÍCH  
SYNTETICKÝCH MARKERŮ IZOELEKTRICKÝCH BODŮ  
KAPILÁRNÍ ZÓNOVOU ELEKTROFORÉZOU A KAPILÁRNÍ  
IZOELEKTRICKOU FOKUSACÍ

Characterization of low-molecular-mass  
synthetic markers of isoelectric points by capillary zone  
electrophoresis and capillary isoelectric focusing

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Václav Kašička, CSc.

Doc. RNDr. Pavel Coufal, Ph.D.

Praha 2012

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

## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

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

V Praze dne

podpis

## Poděkování

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

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

Děkuji také mé rodině a přátelům za podporu během studia.

## Abstrakt

Vysokoučinné elektromigrační separační metody, kapilární zónová elektroforéza (CZE) a kapilární izoelektrická fokusace (CIEF), byly použity pro fyzikálně-chemickou charakterizaci nově syntetizovaných nízkomolekulárních markerů izoelektrických bodů. Amfoterní sloučeniny na bázi aminomethylnitrofenolů, jejich derivátů a jiných strukturně příbuzných látek byly analyzovány metodou CZE v sérii základních elektrolytů v širokém rozmezí pH 1,86 – 11,18. Ze změřené závislosti efektivních elektroforetických pohyblivostí analytů na pH (předem korigovaných na referenční teplotu 25°C) byly odečteny jejich izoelektrické body ( $pI$ ) a nelineární regresní analýzou byly u vybraných látek určeny acidobazické disociační konstanty jejich ionogenních skupin ( $pK_a$ ). Analyty s ostře definovanými izoelektrickými body byly následně analyzovány metodou CIEF, kterou byla prokázána použitelnost těchto analytů jako markerů izoelektrických bodů pro kalibraci pH gradientu v CIEF při určování  $pI$  amfoterních látek, zejména peptidů a bílkovin. Stanovené hodnoty  $pK_a$  ionogenních skupin vybraných sloučenin budou využity při vývoji nových markerů izoelektrických bodů s požadovanými hodnotami  $pI$ .

**Předmětová slova:** separační metody, kapilární elektromigrační metody

**Klíčová slova:** kapilární zónová elektroforéza, kapilární izoelektrická fokusace, markery izoelektrického bodu, acidobazická disociační konstanta

## Abstract

High-performance electromigration separation methods, capillary zone electrophoresis (CZE) and capillary isoelectric focusing (CIEF), have been applied to physico-chemical characterization of new synthetic low-molecular mass markers of isoelectric points. Amphoteric compounds on the basis of aminomethylnitrophenols, their derivatives and other structurally related substances were analyzed by CZE in a series of background electrolytes in a wide pH range, 1.86 – 11.18. From the measured pH dependencies of effective electrophoretic mobilities of analytes (beforehand corrected to reference temperature of 25 °C), their isoelectric points ( $pI$ ) were determined. In addition, using the non-linear regression analysis of the above dependencies, acid-base dissociation constants ( $pK_a$ ) of ionogenic groups of selected analytes were calculated. Subsequently, the analytes with sharply defined isoelectric points were analyzed by CIEF. CIEF confirmed applicability of these compounds as markers of isoelectric points for calibration of pH gradient in CIEF in the determination of  $pI$  of amphoteric compounds, especially peptides and proteins. The determined  $pK_a$  values of ionogenic groups in particular compounds will be utilized in the development of new  $pI$  markers with desired  $pI$  values.

**Subject words:** separation methods, capillary electromigration methods

**Key words:** capillary zone electrophoresis, capillary isoelectric focusing, markers of isoelectric points, acid-base dissociation constants

# Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod .....</b>	<b>12</b>
<b>2</b>	<b>Výzkumné cíle .....</b>	<b>13</b>
<b>3</b>	<b>Teoretická část .....</b>	<b>14</b>
3.1	Kapilární elektromigrační metody .....	14
3.1.1	Historie.....	14
3.1.2	Kapilární zónová elektroforéza (CZE).....	15
3.1.3	Kapilární izotachoforéza (CITP).....	16
3.1.4	Kapilární izoelektrická fokusace (CIEF) .....	16
3.1.5	Kapilární afinitní elektroforéza (CAE).....	17
3.1.6	Kapilární gelová elektroforéza (CGE) .....	18
3.1.7	Kapilární elektrokinetická chromatografie (CEKC).....	18
3.1.8	Kapilární elektrochromatografie (CEC) .....	19
3.2	Elektroforetická pohyblivost.....	19
3.3	Elektroosmotický tok (EOF).....	20
3.4	Disperzní jevy .....	21
3.4.1	Difúze .....	21
3.4.2	Jouleovo teplo.....	22
3.4.3	Elektromigrační disperze .....	23
3.4.4	Adsorpce na stěnu kapiláry.....	23
3.5	Separační účinnost a rozlišení .....	24
3.6	Detekce .....	25
3.6.1	Optická detekce .....	25
3.6.2	Elektrochemická detekce .....	26
3.6.3	Hmotnostně spektrometrická detekce.....	26
3.7	Acidobazická disociační konstanta .....	27
3.7.1	Stanovení pK <sub>a</sub> pomocí CZE .....	30
3.8	Izoelektrický bod (pI) .....	31

<b>4</b>	<b>Experimentální část.....</b>	<b>32</b>
4.1	Chemikálie.....	32
4.2	Analyzované látky.....	33
4.3	Přístrojové vybavení.....	36
4.3.1	Kapilární zónová elektroforéza .....	36
4.3.2	Dvojitá UV-detekce .....	37
4.3.3	Kapilární izoelektrická fokusace.....	40
<b>5</b>	<b>Výsledky a diskuse.....</b>	<b>41</b>
5.1	Stanovení efektivních elektroforetických pohyblivostí.....	41
5.2	Korekce efektivních elektroforetických pohyblivostí na referenční teplotu 25 °C .....	44
5.3	Stanovení acidobazických disociačních konstant.....	46
5.4	Stanovení izoelektrických bodů (pI) analyzovaných látek metodou CZE..	50
5.5	Analýza markerů izoelektrických bodů metodou CIEF .....	51
<b>6</b>	<b>Závěr.....</b>	<b>54</b>
<b>7</b>	<b>Použitá literatura .....</b>	<b>55</b>

## Seznam použitých zkratk

BGE	základní elektrolyt
CAE	kapilární afinitní elektroforéza
CAPS	kyselina 3-cyklohexylaminopropansulfonová
CE	kapilární elektroforéza
CEC	kapilární elektrochromatografie
CEKC	kapilární elektrokinetická chromatografie
CGE	kapilární gelová elektroforéza
CIEF	kapilární izoelektrická fokusace
CITP	kapilární izotachoforéza
CZE	kapilární zónová elektroforéza
DMSO	dimethylsulfoxid
EOF	elektroosmotický tok
HPCE	vysokoučinné kapilární elektromigrační metody
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
IDA	kyselina iminodioxová
LIF	laserem indukovaná fluorescence
MALDI	ionizace laserem za přítomnosti matrice
MEKC	kapilární micelární elektrokinetická chromatografie
MES	kyselina 2-N-morfolinoethansulfonová
MOPS	kyselina 3-N-morfolinopropansulfonová
MS	hmotnostní spektrometrie
NMR	nukleární magnetická rezonance
SDS	dodecylsulfát sodný
UV	ultrafialová oblast
UV-VIS	ultrafialová a viditelná oblast

## Seznam symbolů

$a_i$	aktivita látky $i$
$A_{206}$	absorbance při 206 nm
$A_{420}$	absorbance při 420 nm
$c$	molární koncentrace [ $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ]
$D$	difúzní koeficient [ $\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ ]
$d$	vzdálenost detektorů [m]
$E$	intenzita elektrického pole [ $\text{V}\cdot\text{m}^{-1}$ ]
$F_e$	elektrická síla [N]
$F_f$	frikční síla [N]
$H$	výškový ekvivalent teoretického patra
$I$	iontová síla [ $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ]
$K_a$	acidobazická disociační konstanta
$K_a^{mix}$	smíšená acidobazická disociační konstanta
$L$	délka kapiláry [m]
$L_{eff}$	efektivní délka kapiláry [m]
$L_{tot}$	celková délka kapiláry [m]
$m$	elektroforetická pohyblivost [ $\text{m}^2\cdot\text{V}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ ]
$m_{A+}$	elektroforetická pohyblivost kationické formy látky A [ $\text{m}^2\cdot\text{V}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ ]
$m_{A-}$	elektroforetická pohyblivost anionické formy látky A [ $\text{m}^2\cdot\text{V}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ ]
$m_{eff}$	efektivní elektroforetická pohyblivost [ $\text{m}^2\cdot\text{V}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ ]
$m_{eff,25}$	efektivní elektroforetická pohyblivost při 25 °C [ $\text{m}^2\cdot\text{V}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ ]
$m_{eof}$	elektroosmotická pohyblivost [ $\text{m}^2\cdot\text{V}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ ]
$\Delta m$	rozdíl pohyblivostí [ $\text{m}^2\cdot\text{V}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ ]
$\bar{m}$	průměrná pohyblivost [ $\text{m}^2\cdot\text{V}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ ]
$M_r$	relativní molekulová hmotnost
$n$	šum [V]

$N$	počet teoretických pater
$\bar{N}$	průměrný počet teoretických pater
$P$	rozptýlený elektrický výkon [ $\text{W}\cdot\text{m}^{-3}$ ]
$pI$	izoelektrický bod
$pK_a$	záporně vzatý dekadický logaritmus acidobazické disociační konstanty
$pK_a^{mix}$	záporně vzatý dekadický logaritmus smíšené acidobazické disociační konstanty
$q$	náboj [C]
$Q_J$	Jouleovo teplo [J]
$r$	poloměr iontu [m]
$R$	korelační koeficient
$R_{BGE}$	elektrický odpor základního elektrolytu při daném příkonu [ $\Omega$ ]
$R_{BGE,0}$	elektrický odpor základního elektrolytu při nízkém příkonu [ $\Omega$ ]
$R_D$	napěťová odezva detektoru [V]
$R_S$	rozlišení
$t$	čas [s]
$t_{eo}$	migrační čas markeru elektroosmotického toku [s]
$t_r$	migrační čas analytu [s]
$T$	teplota [ $^{\circ}\text{C}$ ]
$\Delta T$	přírůstek teploty [ $^{\circ}\text{C}$ ]
$T_i$	teplota uvnitř kapiláry [ $^{\circ}\text{C}$ ]
$T_o$	teplota okolí [ $^{\circ}\text{C}$ ]
$U$	separační napětí [V]
$w$	šířka píku
$w_{1/2}$	šířka píku v polovině výšky píku
$x_i$	molární zlomek složky $i$
$z_i$	nábojové číslo složky $i$

$\gamma_i$	aktivitní koeficient složky $i$
$\kappa$	měrná vodivost [ $\Omega^{-1}\cdot\text{m}^{-1}$ ]
$\eta$	viskozita prostředí [ $\text{N}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}$ ]
$\sigma^2$	rozptyl
$v$	migrační rychlost látky v elektrickém poli [ $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ ]
$v_{eof}$	rychlost elektroosmotického toku [ $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ ]

# 1 Úvod

Mezi vysoce účinné a velmi citlivé elektromigrační seprační metody patří kapilární zónová elektroforéza (CZE) a kapilární izoelektrická fokusace (CIEF). V CZE dochází k separaci látek na základě jejich rozdílných elektroforetických pohyblivostí. CZE se využívá nejen k analýze separovaných látek, ale i ke stanovení elektroforetických pohyblivostí, acidobazických disociačních konstant ( $pK_a$ ), konstant stability komplexů, izoelektrických bodů, relativních molekulových hmotností a dalších fyzikálně-chemických parametrů ionogenních látek. CIEF dělí amfoterní látky podle jejich izoelektrických bodů ( $pI$ ) ve směsi nosných amfolytů vytvářejících gradient pH.

Cílem této diplomové práce bylo stanovení izoelektrických bodů nízkomolekulárních syntetických amfoterních látek na bázi aminomethylnitrofenolů, jejich derivátů a jiných strukturálně příbuzných látek metodou CZE a ze získaných výsledků vyhodnotit, zda jsou tyto látky vhodné jako markery  $pI$  pro kalibraci pH gradientu v CIEF.

Dále byly u vybraných látek určeny acidobazické disociační konstanty ( $pK_a$ ) jejich ionogenních skupin. Acidobazické disociační konstanty jsou důležitými parametry pro další vývoj nových markerů  $pI$ , neboť z jejich hodnot lze usuzovat, jaké ionogenní skupiny jsou vhodné pro přípravu nových markerů izoelektrických bodů s požadovanými konkrétními hodnotami  $pI$ .

## 2 Výzkumné cíle

- Proměřit závislost efektivní elektroforetické pohyblivosti nízkomolekulárních syntetických markerů izoelektrických bodů ( $pI$ ) na pH kapilární zónovou elektroforézou (CZE).
- Ze změřené závislosti efektivní elektroforetické pohyblivosti nízkomolekulárních syntetických markerů izoelektrických bodů na pH určit jejich izoelektrické body a konstanty acidity ( $pK_a$ ) jejich ionogenních skupin.
- U vybraných markerů izoelektrických bodů ověřit možnost jejich praktického využití pro kalibraci pH gradientu v kapilární izoelektrické fokusaci (CIEF).

## 3 Teoretická část

### 3.1 Kapilární elektromigrační metody

Kapilární elektromigrační metody, označované též jako vysokoúčinné kapilární elektromigrační metody (HPCE), jsou pro svou separační účinnost, která dosahuje stovek tisíc až milionů teoretických pater, a citlivost na úrovni femtomol-zeptomol ( $10^{-15} - 10^{-21}$  mol) považovány za jedny z nejúčinnějších, nejcitlivějších a nejperspektivnějších analytických separačních metod.

Metody HPCE zahrnují všechny elektromigrační separační principy realizované v kapilárním instrumentálním uspořádání, tedy kapilární zónovou elektroforézu (CZE), izotachoforézu (CITP), izoelektrickou fokusaci (CIEF), afinitní elektroforézu (CAE), gelovou elektroforézu (CGE), elektrokinetickou chromatografii (CEKC) a elektrochromatografii (CEC) [1].

#### 3.1.1 Historie

Elektroforetické a elektroosmotické jevy byly objeveny již na počátku 19. století, tedy ještě dříve než chromatografie. Elektroforézu jako analytickou separační metodu zavedl Tiselius ve 30. a 40. letech 20. století. Tento švédský chemik zjistil, že proteiny umístěné v trubici naplněné puftrem vlivem elektrického pole migrují různou rychlostí na základě různých nábojů a velikostí jejich molekul a na tomto principu je lze oddělit. Za své objevné práce v separačních metodách získal roku 1948 Nobelovu cenu [2].

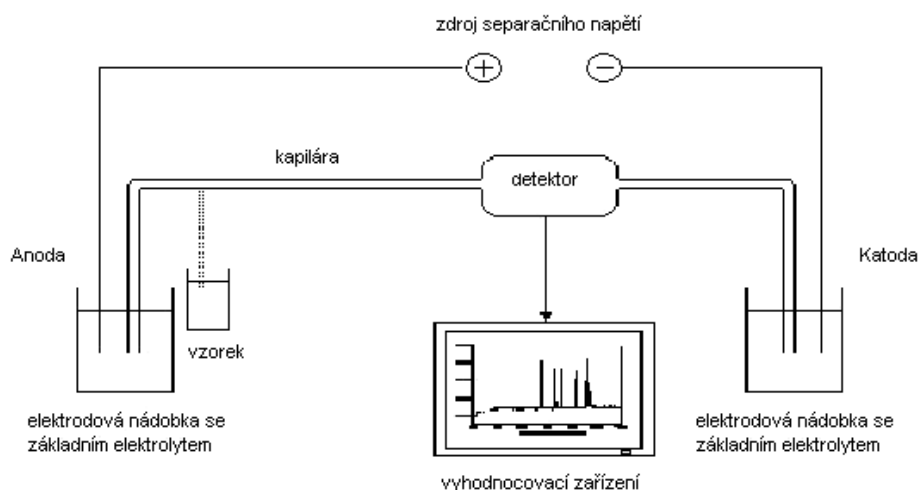
Od roku 1960 se používaly trubice s vnitřním průměrem 0,2 – 0,5 cm. Dalším chemikem, který se věnoval elektroforéze, byl Hjertén. Ten používal rotující trubice s vnitřním průměrem 0,1 – 0,3 cm. Rotace umožnila kvalitnější odvod Jouleova tepla, potlačení sedimentace a dosažení vyššího počtu teoretických pater [3]. Snižování vnitřního průměru kapilár pokračovalo dále. Zatímco Virtanen používal skleněné kapiláry [4], Mikkers a Everaerts jako první popsali užití tenké teflonové kapiláry o vnitřním průměru 200  $\mu\text{m}$  pro zónovou elektroforézu [5].

Roku 1981 Jorgeson a Lukacsová představili separaci různých iontů (aminokyselin, peptidů, aminů) zónovou elektroforézou ve velmi tenké křemenné kapiláře s vnitřním průměrem 75  $\mu\text{m}$  a o délce 100 cm [6].

### 3.1.2 Kapilární zónová elektroforéza (CZE)

Nejjednodušší elektromigrační technikou je zónová elektroforéza, při které se jednotlivé složky vzorku, lišící se svými pohyblivostmi, oddělují v homogenním prostředí základního (nosného) elektrolytu (BGE). Složení základního elektrolytu zůstává konstantní po celou dobu migrace a s časem se nemění. V kapilárním uspořádání se jedná o kapilární zónovou elektroforézu.

Separace se provádí nejčastěji v křemenné kapiláře naplněné základním elektrolytem, jejíž oba konce jsou ponořeny do elektrodových nádobek naplněných tímtož elektrolytem. Typicky se používají kapiláry s vnitřním průměrem 50 – 100  $\mu\text{m}$ , o délce 30 – 80 cm. Po nadávkování vzorku vstupním koncem kapiláry je k systému připojeno stejnosměrné elektrické pole (obr. 1).



**Obr. 1** Schéma přístroje pro kapilární elektromigrační metody.

Kapilární uspořádání umožňuje relativně účinný odvod Jouleova tepla, což dovoluje použití vysokých intenzit elektrického pole, až desítky kV/m. Jednotlivé složky vzorku se v kapiláře pohybují různými elektroforetickými rychlostmi směrem k detektoru a tím se od sebe oddělují. Celý objem roztoku v kapiláře je uváděn do pohybu elektroosmotickým tokem (EOF). V křemenných kapilárách s nemodifikovaným povrchem je tento tok orientován směrem ke katodě. Rychlost elektroosmotického toku je relativně vysoká, takže výsledná rychlost migrace kationtů i aniontů má stejný směr, což umožňuje analyzovat kationty i anionty v rámci jednoho experimentu [1, 7].

### 3.1.3 Kapilární izotachofórze (CITP)

Kapilární izotachofórze je elektroforéza, při které dochází k separaci v diskontinuálním systému elektrolytů [1, 8]. Vzorek je nadávkován mezi dva elektrolyty, vedoucí elektrolyt, obsahující ion s největší efektivní pohyblivostí (vedoucí ion), a koncový elektrolyt, obsahující ion s nejmenší efektivní pohyblivostí (koncový ion) [9]. Pohyblivosti iontů vzorku se nacházejí mezi hodnotami pohyblivosti vedoucího a koncového iontu. Protiion vedoucího elektrolytu je volen tak, aby měl pufrací kapacitu při daném pH separace, protiion koncového elektrolytu je do značné míry libovolný.

Působením stejnosměrného elektrického pole dochází k pohybu směšné zóny iontů vzorku k příslušným elektrodám a dochází k separaci. Po určitém čase dojde k vytvoření tzv. ustáleného stavu, ve kterém jednotlivé ionty vzorku putují stejnou rychlostí v bezprostředně sousedících zónách s velmi ostrými rozhraními [1, 8]. Díky samozaostřujícímu efektu izotachofórze odolávají rozhraní mezi zónami analytů vlivu difuze a zůstávají ostrá [10].

### 3.1.4 Kapilární izoelektrická fokusace (CIEF)

Při izoelektrické fokusaci dochází k dělení amfoterních látek v gradientu pH na základě jejich izoelektrických bodů ( $pI$ ). Amfolyty jsou látky, které obsahují jak kyselou, tak bazickou chemickou skupinu. Gradient pH je vytvořen působením elektrického pole na nosný elektrolyt, který je tvořen směsí amfolytů lišících se svými izoelektrickými body. Dělené látky v tomto prostředí migrují, dokud se nedostanou do části separačního

prostředí, kde pH odpovídá jejich  $pI$ . Zde se jejich migrace zastaví. Izoelektrický bod tedy odpovídá hodnotě pH, ve kterém má látka nulový efektivní náboj a vlivem elektrického pole se nepohybuje [11]. Pro stanovení hodnoty izoelektrického bodu se využívá standardních látek tzv. markerů  $pI$  [12, 13]. Díky pH gradientu se analyzované látky separují a fokusují do úzkých zón.

Po fokusaci (dosazení ustáleného stavu) je třeba zóny mobilizovat k detektoru. Mobilizace se uskutečňuje hydrodynamickým tokem vyvolaným přetlakem nebo podtlakem u jednoho ze dvou konců kapiláry, nebo elektroelucí. Elektroeluce je vyvolána změnou složení elektrodového roztoku u anody nebo katody. K přirozené mobilizaci zón dochází při CIEF v křemenných kapilárách s neupraveným povrchem, kde působí elektroosmotický tok [1]. CIEF je vhodná separační technika pro analýzu amfoterních látek jako jsou proteiny a peptidy [14, 15].

### 3.1.5 Kapilární afinitní elektroforéza (CAE)

Afinitní elektroforéza v kapilárním uspořádání je technikou, ve které se zaznamenávají elektroforetické migrace ovlivněné specifickými interakcemi látek s odpovídajícími afinitními ligandy. Interakce vznikají na povrchu potažené stěny kapiláry nebo látky interagují s ligandy v základním elektrolytu uvnitř kapiláry. To znamená, že pohyb molekul je zpomalován buď na základě jejich afinity k ligandům imobilizovaným na stěnu kapiláry, nebo je to následek jejich interakcí se složkou BGE. U kapilár potažených afinitními molekulami se migrační čas analytu s afinitou k této složce bude prodlužovat oproti času u nemodifikovaných kapilár [16 – 18].

CAE se ukázala jako užitečná a citlivá technika pro studium (bio)molekulárních nekovalentních interakcí a pro stanovení vazebných a disociačních konstant vytvořených komplexů [18]. Je využívána k posuzování rozsahu vzájemného působení mezi nesčítelným množstvím látek, včetně proteinů, DNA, sacharidů, antibiotik a ostatních biologicky aktivních látek [16].

### 3.1.6 Kapilární gelová elektroforéza (CGE)

Kapilární gelová elektroforéza je účinnou metodou pro separaci biologických makromolekul, jako jsou proteiny a nukleové kyseliny. Separační princip je stejný jako u plošné nebo trubičkové gelové elektroforézy. V tomto případě jsou kapiláry naplněny gelem, který představuje molekulové síto, a látky se v něm dělí na základě svých relativních molekulových hmotností. Síťový efekt způsobují kovalentně prokřížované polyakrylamidové gely, agarosové gely či roztoky lineárních polymerů [19, 20].

### 3.1.7 Kapilární elektrokinetická chromatografie (CEKC)

Při CEKC je separace založena na rozdílné distribuci analyzovaných látek mezi pseudofází a vodnou fází nosného elektrolytu, ve které je pseudofáze volně rozptýlena.

Nejčastějším módem CEKC je tzv. micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC). MEKC je separační technika kombinující princip micelární kapalinové chromatografie a kapilární zónové elektroforézy. Dalo by se říci, že se jedná o chromatografii s pohyblivou „stacionární micelární fází“ a s elektroosmoticky čerpanou mobilní fází [21]. K základnímu elektrolytu je přidána povrchově aktivní látka, která je schopná vytvářet sférické agregáty nazývané micely. Tyto amfifilní molekuly jsou tvořeny hydrofobními chvosty, které směřují do středu micely, a hydrofilními hlavami, které jsou na okraji micel. Nejčastěji používanou povrchově aktivní látkou bývá dodecylsulfát sodný (SDS). Povrch micely tedy nese negativní náboj a z toho důvodu jsou micely přitahovány k anodě, nicméně většina základního elektrolytu je unášena EOF ke katodě. Složky vzorku se dělí na základě rozdílných interakcí s micelami.

MEKC umožňuje separovat směsi nabitých i neutrálních látek, separaci nabitých látek s identickými elektroforetickými pohyblivostmi a různými hydrofobicitami a celou řadu látek s hydrofobním nebo hydrofilním charakterem [22].

### 3.1.8 Kapilární elektrochromatografie (CEC)

Kapilární elektrochromatografie kombinuje výhody vysokoúčinné kapalinové chromatografie a kapilární elektroforézy. Separace se provádí v kapilární koloně, která je naplněná stacionární fází nebo je stacionární fáze imobilizována na stěně kapiláry. Látky jsou unášeny kolonou pomocí mobilní fáze, jejíž pohyb je způsoben elektroosmotickým tokem, který vzniká díky vysoké intenzitě elektrického pole a povrchovému náboji na stěnách kapiláry i na částicích stacionární fáze. Tím se CEC liší od HPLC, kde je pohyb mobilní fáze realizován tlakovým gradientem.

Rychlost EOF není závislá na velikosti částic, tudíž mohou být použity menší částice pro nosič a delší kolony. Tyto faktory zvýší účinnost i rozlišovací schopnost CEC oproti kapilární HPLC [23 – 25].

## 3.2 Elektroforetická pohyblivost

Ústřední veličinou elektromigračních separačních metod je elektroforetická pohyblivost (mobilita),  $m$ , definovaná jako rychlost pohybu nabitých částic v kapalném prostředí ve stejnosměrném elektrickém poli o jednotkové intenzitě:

$$m = \frac{v}{E} \quad (m^2V^{-1}s^{-1}), \quad (1)$$

kde  $v$  je rychlost pohybu iontu v elektrickém poli a  $E$  je intenzita elektrického pole. Intenzita elektrického pole je dána podílem elektrického napětí,  $U$ , připojeného ke koncům kapiláry, a její délkou,  $L$ :

$$E = \frac{U}{L} \quad (Vm^{-1}) \quad (2)$$

Rovnoměrný pohyb iontu je výsledkem působení dvou sil – síly elektrického pole,  $F_e$ , a opačně orientované frikční síly,  $F_f$ :

$$F_e = -F_f \quad (3)$$

Síla elektrického pole je přímo úměrná součinu náboje daného iontu,  $q$ , a intenzity elektrického pole,  $E$ :

$$F_e = qE \quad (4)$$

Tento pohyb iontu je brzděn frikční silou,  $F_f$ , vyjádřenou Stokesovým zákonem:

$$F_f = -6\pi\eta r v \quad (5)$$

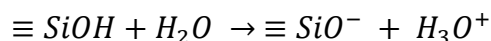
kde  $r$  je poloměr iontu,  $v$  je rychlost pohybu iontu a  $\eta$  je viskozita prostředí. Z rovnosti těchto sil lze odvodit vztah pro elektroforetickou pohyblivost:

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

Elektroforetické pohyblivosti kvalitativně charakterizují ionogenní látky pro dané prostředí a teplotu. Elektroforetická pohyblivost silných elektrolytů vztážená k dané iontové síle a teplotě se nazývá aktuální pohyblivost, elektroforetická pohyblivost iontů v nekonečném zředění se nazývá limitní pohyblivost. Limitní pohyblivosti při teplotě 25°C jsou tabelovány jako fyzikálně-chemické parametry iontů. V případě slabých elektrolytů je pohyblivost závislá na stupni jejich disociace a tudíž na pH prostředí. Pohyblivost slabých elektrolytů vztážená k danému pH, iontové síle a teplotě separačního prostředí se nazývá efektivní pohyblivost. Závislosti pohyblivosti na pH se v praxi často využívá při dělení slabých elektrolytů [1].

### 3.3 Elektroosmotický tok (EOF)

Dalším ze základních jevů, který se spolupodílí na separaci v CZE, je elektroosmotický tok, EOF. Vnitřní stěna křemenné kapiláry, která je nejčastěji používaným typem kapiláry v CZE, obsahuje ionizovatelné silanové skupiny  $\equiv\text{SiOH}$ . Ve vodném prostředí dochází k jejich disociaci:



a stěna kapiláry tak získává záporný náboj. Stěna pak přitahuje kladně nabitě ionty základního elektrolytu, které u stěny kapiláry vytvářejí stabilní elektrickou dvojvrstvu. Zatímco vrstva kationtů v těsném kontaktu se stěnou kapiláry je fixována (Sternova vrstva), kationty vzdálenější vytvářejí pohyblivou difúzní (Guyovu-Chapmanovu) vrstvu. Pokud je na kapiláru přivedeno stejnosměrné elektrické napětí, kationty difúzní vrstvy začnou migrovat ke katodě. Tento jev je známý jako elektroosmóza a tok jako elektroosmotický tok. Tok je tak silný, že unáší ke katodě i anionty. Neutrální částice se pohybují rychlostí elektroosmotického toku, nabitě částice se pohybují rychleji nebo pomaleji v závislosti na velikosti a směru jejich elektroforetické pohyblivosti [10, 26].

### 3.4 Disperzní jevy

Mnoho faktorů může způsobit rozmývání zón a tím snížit separační účinnost HPCE metod. Disperzní jevy jsou jevy, které narušují průběh migrace, jedná se zejména o podélnou difúzi, Jouleovo teplo, elektromigrační disperzi a adsorpci na stěnu kapiláry [27].

#### 3.4.1 Difúze

K rozmývání zón nevyhnutelně přispívá difúze, která je způsobena koncentračním gradientem. Ten vzniká při nadávkování vzorku na rozhraní zóny vzorku a základního elektrolytu a dochází tak k difúznímu toku hmoty kapilárou. Na počátku separace je zóna vzorku ostrá, v průběhu separace je vlivem difúze postupně rozmývána. Po určitém čase  $t$  má koncentrační profil tvar tzv. Gaussovy křivky. Tento profil je charakterizován rozptylem  $\sigma^2$ :

$$\sigma^2 = 2Dt \quad (7)$$

kde  $D$  je difúzní koeficient a  $t$  je čas [7].

### 3.4.2 Jouleovo teplo

Při průchodu elektrického proudu kapilárou dochází ke vzniku tzv. Jouleova tepla. Teplo vzniká v celém objemu elektrolytu působením elektrického proudu. Odvod tepla je umožněn přirozeně nebo chlazením přes stěnu kapiláry, tudíž teplota elektrolytu není homogenní. Jelikož je u stěny kapiláry teplota nižší, ve středu naopak vyšší, vzniká tak teplotní gradient s parabolickým profilem. Teplotní gradient způsobuje rozdílnou migrační rychlost iontů v blízkosti stěn a ve středu kapiláry a nehomogenitu dalších fyzikálně-chemických parametrů, jako jsou pH, hustota, viskozita a jiné. Navíc může mít nadměrné zvýšení teploty za následek poškození termolabilních látek, např. denaturaci bílkovin [7, 27, 28]. Teplotu v kapiláře je možné ovlivnit několika způsoby (tab. 1).

**Tab. 1** Metody pro snížení Jouleova tepla v kapiláře [29]

<b>Metoda</b>	<b>Efekt</b>
Snížení intenzity elektrického pole.	Pokles generovaného proudu. Snížení separační účinnosti, rychlosti a rozlišení.
Snížení vnitřního průměru kapiláry.	Významný pokles proudu. Pokles citlivosti. Může způsobit zvýšenou adsorpci vzorku na stěnu kapiláry.
Snížení iontové síly.	Pokles proudu. Může způsobit zvýšenou adsorpci vzorku na stěnu kapiláry. Zvýšení EOF.
Termostatování a odvod tepla z kapiláry.	Aktivní kontrola teploty.

### 3.4.3 Elektromigrační disperze

Rozdílné vodivosti roztoku vzorku a základního elektrolytu způsobují nesymetrické rozmývání zón. Tento jev ovlivňující separační proces je znám jako elektromigrační disperze. U silných elektrolytů platí, že pokud se analyt vyznačuje vyšší pohyblivostí než koion základního elektrolytu, podléhá přední rozhraní píku rozmytí, zatímco zadní rozhraní je zaostřeno. V opačném případě, kdy má analyzovaná látka nižší pohyblivost než základní elektrolyt, dochází k zaostření předního rozhraní píku a k rozmytí zadního rozhraní. V případě, že jsou hodnoty pohyblivosti analytu a koiontu základního elektrolytu blízké, pak elektromigrační disperze ovlivňuje rozmytí píku pouze minimálně.

Vlivy disperze na elektromigraci jsou tím výraznější, čím je vyšší koncentrace vzorku. Jestliže je vysoká (např. stejná jako koncentrace základního elektrolytu), je rozšíření zóny v důsledku elektromigrace větší než kvůli ostatním disperzním efektům.

Obecně platí, že elektromigrační disperze je srovnatelná s difuzí pouze v případě, když koncentrace vzorku v jeho zóně je více než 100 krát nižší než koncentrace základního elektrolytu [7, 30]

### 3.4.4 Adsorpce na stěnu kapiláry

Dalším faktorem, který negativně ovlivňuje separaci v CE, je adsorpce na stěnu kapiláry. Hlavní příčinou jsou iontové interakce mezi negativně nabitým povrchem kapiláry a opačně nabitými ionty v roztoku. Adsorpce je založena na iontových a hydrofobních interakcích. Vlivem adsorpce dochází k rozmývání zón a k ovlivnění rychlosti separačního procesu. Vysoké adsorpční účinky byly zaznamenány především u velkých peptidů a proteinů, jelikož tyto látky obsahují hydrofobní oblasti a řadu nabitých skupin.

Adsorpci je možné ovlivnit výběrem základního elektrolytu o vhodném pH, ve kterém ionty vzorku a nabitě skupiny stěny kapiláry nesou náboj stejného znaménka a z tohoto důvodu se elektricky odpuzují. Dále mohou být stěny kapiláry pokryty hydrofobními polymery nebo je kapilára modifikována roztokem alkylcelulózy či polyakrylamidu. Tato metoda značně snižuje rychlost elektroosmotického toku během separace [7, 29, 31]

### 3.5 Separační účinnost a rozlišení

Separační účinnost v CE je charakterizována obdobně jako u HPLC počtem teoretických pater  $N$ . Čím vyšší je počet teoretických pater, tím vyšší je separační účinnost. Počet teoretických pater může být stanoven přímo z elektroforegramu dle vztahu:

$$N = 5,54 \cdot \left( \frac{t}{w_{1/2}} \right)^2 \quad (8)$$

kde  $t$  představuje migrační čas a  $w_{1/2}$  je šířka píku v polovině jeho výšky. Tato rovnice odpovídá Gaussovskému tvaru píku, ovšem postrádá přesnost pro asymetrické píky.

Rozptyl koncentračního profilu zóny charakterizuje směrodatná odchylka,  $\sigma$ , s jejíž pomocí lze také vyjádřit počet teoretických pater,  $N$ ,

$$N = \left( \frac{l^2}{\sigma^2} \right) \quad (9)$$

kde  $l$  je délka kapiláry.

K charakterizaci separační účinnosti se často využívá výškový ekvivalent teoretického patra,  $H$ .

$$H = \frac{l}{N} \quad (10)$$

Vzájemná separace dvou analytů je definována pomocí rozlišení,  $R_s$ ,

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

kde  $t_1$  a  $t_2$  odpovídají migračním časům analytů a  $w_1$ ,  $w_2$  jsou šířky píků analytů při základně.

Mezi rozlišením a počtem teoretických pater platí vztah:

$$R_s = \frac{1}{4} \bar{N}^{\frac{1}{2}} \left( \frac{\Delta m}{\bar{m}} \right) \quad (12)$$

kde  $\bar{N}$  je průměrný počet teoretických pater,  $\Delta m$  je rozdíl pohyblivostí daných analytů,  $\bar{m}$  je průměrná elektroforetická pohyblivost [29, 32].

## 3.6 Detekce

### 3.6.1 Optická detekce

Mezi nejčastěji používané optické detektory v CZE patří UV-VIS absorpční detektor a fluorescenční detektor. Detektory musí být velmi citlivé, protože průměr kapiláry je malý.

UV-VIS absorpční detektor je levný, jednoduchý a univerzální detektor pro kapilární elektroforézu v případě látek obsahujících chromofory. Výhodou je, že detekce probíhá přímo přes detekční okénko – část kapiláry, kde je odstraněn polyimidový povlak. Měření absorbance však omezuje nízký průměr kapiláry (20 – 100  $\mu\text{m}$ ) [33]. Kromě toho, kruhový průřez kapiláry není konstrukčně vhodný jako detekční cela. Pro zvýšení citlivosti se používají cely navržené do tvaru Z, popřípadě U nebo bublinkové cely [34].

Fluorescenční detektor je oproti UV-VIS absorpčnímu detektoru citlivější. Dále je výrazně selektivní, jelikož látek vykazujících fluorescenci je mnohem méně než těch absorbujících světlo. Nicméně, právě relativně malé množství fluoreskujících látek může být nevýhodou tohoto detektoru. Proto je nutné látky, které nedostatečně fluoreskují, před měřením nejdříve derivatizovat [35].

Detektor na bázi laserem indukované fluorescence (LIF) je známý jako nejcitlivější detekční zařízení pro CE, CEC a další mikroanalytické techniky. Speciální konstrukce detekčních cel umožňuje dosažení detekčního limitu na úrovni attomol - zeptomol nebo

dokonce jedné molekuly. Nevýhodou LIF detekce je nutnost derivatizace analytů fluorescenčními značkami [36].

### 3.6.2 Elektrochemická detekce

Jako elektrochemická detekce se při kapilární elektroforéze používá ampérometrický a vodivostní detektor.

Při ampérometrické detekci je měřen proud, který vzniká při redoxních reakcích elektroaktivních látek na povrchu elektrody. Proud, který je měřen, je přímo úměrný počtu molů, které podlely redoxním reakcím. Pro ampérometrickou detekci je nezbytné, aby analyty byly elektroaktivní, kapiláry musí obsahovat snímací elektrody a přístroj musí být patřičně elektronicky upraven [37].

Vodivostní detekce je úspěšně používána v kapilárních elektromigračních metodách již po dlouhou dobu. Zejména v kapilární izotachoforéze je používána téměř od svého vzniku. Detekční cela vodivostního detektoru je součástí kapilární kolony. Principem detektoru je měření změny elektrické vodivosti roztoku za přítomnosti vzorku. Migrující složky vzorku procházejí celou obsahující dvě elektrody, tím se mění vodivost a měřený proud základního elektrolytu. Stejně jako ampérometrický detektor, tak i vodivostní detektor vyžaduje modifikaci kapilár a elektroniky systému [38].

### 3.6.3 Hmotnostně spektrometrická detekce

Přístroje pro CE mohou být připojeny k hmotnostnímu spektrometru (MS), který představuje citlivý, univerzální i selektivní detektor pro CE. MS detektor ve spojení s CE nejčastěji užívá dvou ionizačních technik: ionizace elektrosprejem (ESI) a ionizace laserem za přítomnosti matrice (MALDI) [39].

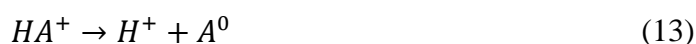
### 3.7 Acidobazická disociační konstanta

Acidobazická disociační konstanta neboli konstanta acidity, obvykle označována jako  $pK_a$ , charakterizuje slabé kyseliny a zásady. Vyjadřuje míru ionizace látky v závislosti na pH prostředí.

Fyzikálně-chemické vlastnosti neutrálních a ionizovaných forem látek jsou odlišné. Ionizované formy jsou obvykle více rozpustné ve vodě, zatímco neutrální formy jsou méně polární. Na základě stanovení hodnot  $pK_a$  je možné získat informace o absorpci, distribuci, metabolismu a vylučování látek z biologických systémů a prostředí [40].

Znalost hodnot  $pK_a$  látek je důležitá v mnoha specifických oblastech jako je například optimalizace elektroforetických, chromatografických nebo extrakčních procesů nebo vývoj léčivých látek [41].

Acidobazické rovnováhy pro sloučeninu obsahující jednu kyselou a jednu zásaditou skupinu mohou být vyjádřeny pomocí rovnic (13) a (14).



Termodynamické konstanty acidity,  $K_{a,1}$  a  $K_{a,2}$ , pro výše uvedené rovnováhy jsou definovány rovnicemi (15) a (16),

$$K_{a,1} = \frac{a_{H^+} \cdot a_{A^0}}{a_{HA^+}} = \frac{a_{H^+} \cdot c_{A^0} \cdot \gamma_{A^0}}{c_{HA^+} \cdot \gamma_{HA^+}} \quad (15)$$

$$K_{a,2} = \frac{a_{H^+} \cdot a_{A^-}}{a_{A^0}} = \frac{a_{H^+} \cdot c_{A^-} \cdot \gamma_{A^-}}{c_{A^0} \cdot \gamma_{A^0}} \quad (16)$$

kde  $a_i$  jsou aktivity zúčastněných iontových forem,  $c_i$  jsou koncentrace příslušných iontových forem a  $\gamma_i$  představují jejich aktivní koeficienty. Hodnoty aktivních

koeficientů příslušných iontových forem při teplotě 25°C lze získat pomocí Debye-Hückelovy teorie:

$$-\log \gamma_i = \frac{0,5085 \cdot z_i^2 \cdot \sqrt{I}}{1 + 0,3281 \cdot a \cdot \sqrt{I}} \quad (17)$$

Pro stanovení  $pK_a$  z experimentálně získaných dat pomocí kapilární zónové elektroforézy lze zavést tzv. smíšenou acidobazickou disociační konstantu,  $K_a^{mix}$ , vyjádřenou pomocí aktivit hydroxoniových kationtů,  $a_{H^+}$ , a molárních koncentrací složek  $HA^+$ ,  $A^0$  a  $A^-$ :

$$K_{a,1}^{mix} = \frac{a_{H^+} \cdot c_{A^0}}{c_{HA^+}} \quad (18)$$

$$K_{a,2}^{mix} = \frac{a_{H^+} \cdot c_{A^-}}{c_{A^0}} \quad (19)$$

Aktivita hydroxoniových kationtů se vypočítá přímo z pH použitého základního elektrolytu ( $pH = -\log a_{H^+}$ ) [41, 42].

Efektivní pohyblivost,  $m_{eff}$ , lze vyjádřit jako součet součinů iontových pohyblivostí,  $m_i$ , všech iontových forem a jejich molárních zlomků,  $x_i$ .

$$m_{eff} = \sum_i m_i \cdot x_i \quad (20)$$

Molární zlomek,  $x_i$ , složky  $i$  je definován dle rovnice:

$$x_i = \frac{c_i}{\sum_i c_i} \quad (21)$$

kde  $c_i$  je molární koncentrace složky  $i$ , suma  $c_i$  představuje součet molárních koncentrací všech forem analytu v roztoku.

Pohyblivost neutrální formy složky je nulová, kladně nabitého iontu je kladná a záporně nabitého iontu je záporná. Výraz (22) vyjadřuje efektivní pohyblivost,  $m_{eff}$ , pro látku obsahující jednu zásaditou a jednu kyselou skupinu.

$$m_{eff} = \frac{m_{HA^+} \cdot c_{HA^+} + m_{A^-} \cdot c_{A^-}}{c_{HA^+} + c_{A^0} + c_{A^-}} \quad (22)$$

Kombinací rovnic (18), (19) a (22) lze definovat efektivní pohyblivost jako veličinu závislou na pH [41, 43]:

$$m_{eff} = \frac{m_{HA^+} \cdot 10^{(pK_{a,1}^{mix} - pH)} \cdot m_{A^-} \cdot 10^{(pH - pK_{a,2}^{mix})}}{10^{(pK_{a,1}^{mix} - pH)} + 10^{(pH - pK_{a,2}^{mix})} + 1} \quad (23)$$

Získaná smíšená konstanta acidity může být přepočítána na termodynamickou konstantu acidity pomocí následujících vztahů:

$$K_{a,1} = K_{a,1}^{mix} \cdot \frac{\gamma_{A^0}}{\gamma_{HA^+}} \quad (24)$$

$$K_{a,2} = K_{a,2}^{mix} \cdot \frac{\gamma_{A^-}}{\gamma_{A^0}} \quad (25)$$

kde  $\gamma_i$  představuje aktivitní koeficient dané formy, který lze vypočítat podle Debye-Hückelovy teorie, rovnice (17). Pro přepočet smíšené disociační konstanty na termodynamickou disociační konstantu se užívá následujících rovnic [42]:

$$pK_{a,1} = pK_{a,1}^{mix} + \log \gamma_{HA^+} \quad (26)$$

$$pK_{a,2} = pK_{a,2}^{mix} - \log \gamma_{A^-} \quad (27)$$

### 3.7.1 Stanovení $pK_a$ pomocí CZE

Použití kapilární zónové elektroforézy pro stanovení fyzikálně-chemických parametrů, především  $pK_a$ , se ukázalo jako poměrně snadné, rychlé a přesné. Zásadní výhodou je minimální spotřeba analytu a možnost měřit současně  $pK_a$  více látek.

Stanovení disociační konstanty je založeno na měření efektivní pohyblivosti analytu v řadě základních elektrolytů o různém pH. Jelikož pohyblivost ionizovaných analytů je funkcí pH základního elektrolytu, mohou být hodnoty pohyblivostí analytů vyneseny proti hodnotám pH elektrolytů. Získaná křivka, ze které se stanoví  $pK_a$ , je analogická titrační křivce [44 – 46].

Ze získané závislosti je možné stanovit hodnotu  $pK_a$  několika způsoby:

- graficky v inflexním bodě sigmoidní křivky
- lineární regresní analýzou
- nelineární regresní analýzou

Pokud látka obsahuje několik ionogenních skupin, křivka závislosti  $m_{eff}$  na pH má více inflexních bodů. Pak se pro přesné určení  $pK_a$  používá nelineární regrese [46].

Při použití CZE pro stanovení  $pK_a$  vznikají komplikace při měření v silně kyselém prostředí. Doba analýzy se prodlužuje, jelikož se snižuje rychlost elektroosmotického toku. Tento problém lze řešit několika způsoby, mezi které patří pokrytí kapiláry vhodnými polymery, dávkování z kratšího konce kapiláry [47] nebo použití tlaku [48].

Pro stanovení hodnoty  $pK_a$  se používají i další techniky jako např. potenciometrická titrace, UV spektrometrie a NMR titrace [49].

### 3.8 Izoelektrický bod ( $pI$ )

Jedním z důležitých parametrů pro identifikaci a charakterizaci amfoterních látek je hodnota jejich izoelektrického bodu. Izoelektrický bod proteinu odpovídá hodnotě pH roztoku, ve kterém je efektivní náboj daného proteinu nulový. Může být definován jako pH pufru, ve kterém působením elektrického pole nedochází k migraci analytu [50].

Hodnoty  $pI$  proteinů bývají konvenčně stanovovány pomocí experimentálních metod souvisejících s elektrofokusací a chromatofokusací. V obou metodách se využívá pH gradientu pro stanovení pH, ve kterém proteiny nenesou náboj. Při stanovení  $pI$  pomocí kapilární zónové elektroforézy je stupňovitý gradient pH vytvořen řadou vhodných pufrů v požadovaném rozmezí hodnot pH. CZE se projevila jako vhodná alternativa pro stanovení  $pI$  amfoterních látek, jelikož má schopnost rychle analyzovat a separovat nabitě částice s minimálními požadavky na množství vzorku [51]. Nicméně, analýza proteinů v nižším pH, než je jejich hodnota  $pI$ , je v neupravených kapilárách obtížná, vzhledem k nespecifické adsorpci proteinů na stěnu křemenné kapiláry. Tento problém může být vyřešen například modifikací stěny křemenné kapiláry nebo modifikací BGE pomocí aditiv [50].

Pro stanovení  $pI$  se dále používá kapilární izoelektrická fokusace (CIEF). Separace látek probíhá v gradientu pH (v rámci jednoho experimentu), který je vytvořen pomocí amfoterních nosných elektrolytů. Během měření se látky separují a fokusují do úzkých zón, které odpovídají hodnotám jejich  $pI$ . Izoelektrický bod fokusované zóny se stanoví použitím vhodné standardní látky tzv. markeru  $pI$  [15, 52].

Nízkomolekulární látky, které byly použity jako markery  $pI$ , jsou např. syntetické oligopeptidy [52], fluorescenční amfolyty jako methylester fluoresceinu [53], amfolytická barviva na bázi aminomethylnitrofenolů [54] a aminomethylsulfonftaleinů [55].

## 4 Experimentální část

### 4.1 Chemikálie

Všechny použité chemikálie dosahovaly stupně čistoty p.a. Jejich přehled je uveden v tab. 2. Složení základních elektrolytů v rozmezí pH 1,86 – 11,18 je v tab. 3.

**Tab. 2** Použité chemikálie, jejich vzorce, případně zkratky a dodavatelé

Název	Vzorec /zkratka	Dodavatel
kyselina fosforečná	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	Lachema (Brno, ČR)
kyselina mravenčí	HCOOH	
kyselina octová	CH <sub>3</sub> COOH	
hydroxid sodný	NaOH	
dimethylsulfoxid	DMSO	
chlorid draselný	KCl	
tetraboritan sodný	Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub>	
arginin	Arg	
N-(tris-hydroxymehtyl)methylglycin	tricin	Merck (Darmstadt, Německo)
kyselina iminodioctová	IDA	
kyselina 2-N-morfolinoethansulfonová	MES	Serva (Heidelberg, Německo)
kyselina 3-N-morfolinopropansulfonová	MOPS	
kyselina 3-cyklohexylaminopropansulfonová	CAPS	
Pharmalyte 3 - 10	--	GE Healthcare (Piscataway, NJ, USA)
Beckman-Coulter gel (PN 477 497)	--	Beckman (Fullerton, CA, USA)

**Tab. 3** Složení základních elektrolytů (BGE) a vložené separační napětí U

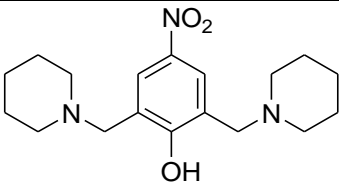
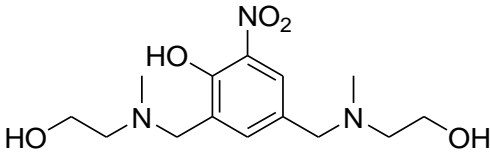
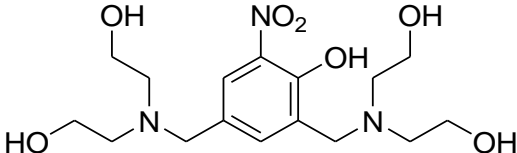
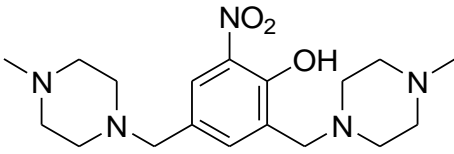
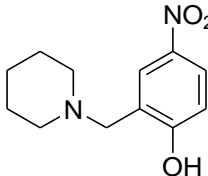
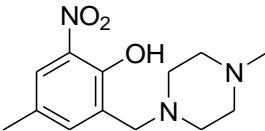
Číslo BGE	pH	Kyselina	c <sub>kyseliny</sub> [mM]	c <sub>NaOH</sub> [mM]	U [kV]
I	1,86	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	64,00	10,50	6,09
II	2,28	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	40,50	19,00	8,41
III	2,73	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	31,50	23,00	9,95
IV	3,19	HCOOH	100,00	24,00	10,28
V	3,61	HCOOH	56,00	25,00	10,55
VI	4,17	HCOOH	35,00	25,00	10,78
VII	4,64	CH <sub>3</sub> COOH	56,00	25,00	11,26
VIII	5,22	CH <sub>3</sub> COOH	35,00	25,00	11,50
IX	5,67	MES	92,00	25,00	12,22
X	6,14	MES	46,00	25,00	12,23
XI	6,63	MES	32,00	25,00	12,36
XII	7,14	MOPS	52,00	25,00	12,36
XIII	7,64	MOPS	34,00	25,00	12,32
XIV	8,14	tricin	49,00	25,00	12,50
XV	8,65	tricin	33,00	25,00	12,32
XVI	9,11	Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub>	54,00	25,00	12,06
XVII	9,65	Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub>	34,00	25,00	12,06
XVIII	10,16	CAPS	68,00	25,00	12,00
XIX	10,68	CAPS	38,00	25,00	11,92
XX	11,18	CAPS	27,00	25,00	11,55

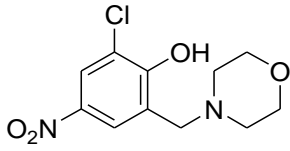
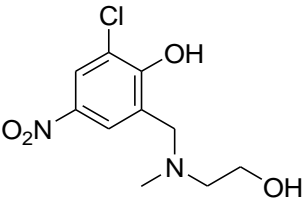
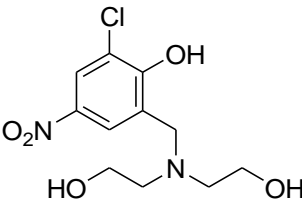
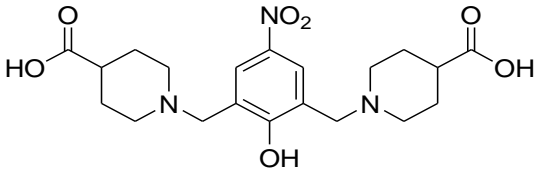
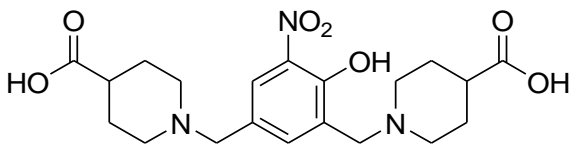
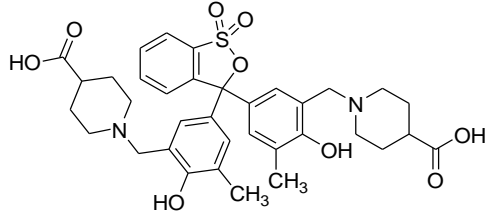
## 4.2 Analyzované látky

Všechny analyzované látky byly syntetizovány Dušanem Kovalem v Ústavu organické chemie a biochemie Akademie věd České republiky (ÚOCHB AV ČR). Struktury analytů, jejich názvy, identifikační čísla a předpokládané hodnoty jejich pI jsou zobrazeny v tab. 4.

Všechny látky byly rozpuštěny v deionizované vodě, jejich koncentrace se pohybovaly v rozmezí 1,0 – 2,0 mg/ml. Efektivní elektroforetické pohyblivosti analytů byly postupně změřeny v 16 – 20 základních elektrolytech.

**Tab. 4** Analyzované látky, jejich struktury a předpokládané hodnoty  $pI$  ( $pI_{pr}$ )

Identifikační číslo	Struktura a název	$pI_{pr}$
1	 <p>4-nitro-2,6-bis((piperidin-1-yl)methyl)fenol</p>	10,4
2	 <p>2,4-bis((N-hydroxyethyl-N-methyl)aminomethyl)-6-nitrofenol</p>	9,3
3	 <p>2,4-bis(di-(2-hydroxyethyl)aminomethyl)-6-nitrofenol</p>	8,5
4	 <p>2,4-bis((4-methylpiperazin-1-yl)-6-nitrofenol</p>	8,4
5	 <p>4-nitro-2-((piperidin-1-yl)methyl)fenol</p>	7 - 8
6	 <p>4-methyl-2-((4-methylpiperazin-1-yl)methyl)-6-nitrofenol</p>	7,8
7	neznámá struktura	cca 7

8	 <p>2-chloro-6-(morfolinomethyl)-4-nitrofenol</p>	5,3
9	 <p>2-chloro-6-((N-hydroxyethyl-N-methyl)aminomethyl)-4-nitrofenol</p>	5,2
10	 <p>2-chloro-6-((N,N-di(hydroxyethyl)aminomethyl)-4-nitrofenol</p>	5,0
11	 <p>2,6-bis((4-carboxypiperidin-1-yl)methyl)-4-nitrofenol</p>	5,0
12	 <p>2,4-bis((4-carboxypiperidin-1-yl)methyl)-6-nitrofenol</p>	4,5
13	 <p>3', 3''-bis[(N-4-carboxypiperidino)methyl]-5', 5''-dimethyl-fenolsulfonftalein</p>	4,1

## 4.3 Přístrojové vybavení

### 4.3.1 Kapilární zónová elektroforéza

Měření kapilární zónovou elektroforézou byla provedena na CE analyzátoru domácí výroby ÚOCHB AV ČR [56]. Přístroj byl manuálně obsluhován. Sběr dat a jejich zpracování bylo provedeno pomocí chromatografické stanice Clarity (DataApex, Praha, ČR). Analyty byly detekovány UV-absorpčním fotometrickým detektorem při vlnové délce 206 nm. Zdrojem záření byla bezelektrodová vysokofrekvenčně buzená jódová výbojka (LKB-Pharmacia, Uppsala, Švédsko) a detektorem záření byla UV-senzitivní křemíková fotodioda s vestavěným předzesilovačem (Hamamatsu Photonics Deutschland, Herrsching, Německo). Pro separaci analyzovaných látek byla použita křemenná kapilára s vnějším polyimidovým povlakem dodaná firmou Polymicro Technologies (Phoenix, AR, USA) o vnitřním průměru 50  $\mu\text{m}$  a vnějším průměru 375  $\mu\text{m}$ . Kapilára se dvěma detekčními okny byla stočena do smyčky, aby procházela UV-detektorem ve dvou místech. Celková délka kapiláry činila 46 cm, délka od počátku k prvnímu detekčnímu okénku byla 20 cm, délka mezi okénky 15 cm a délka od druhého detekčního okénku ke konci kapiláry činila 11 cm.

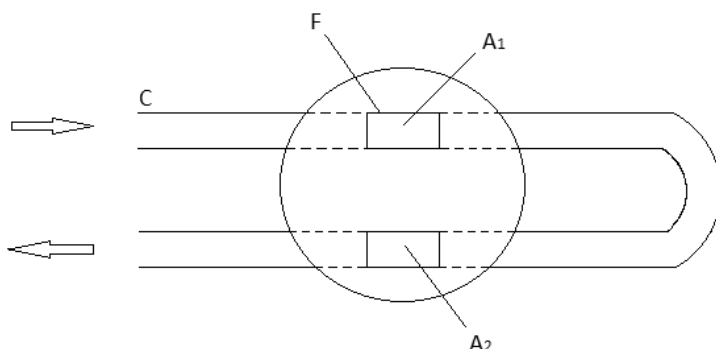
Vždy na začátku měření byla kapilára promývána dle následujícího postupu:

- deionizovaná voda (2 min, 1 000 mbar)
- 1 M NaOH (2 min, 1 000 mbar)
- deionizovaná destilovaná voda (2 min, 1 000 mbar)
- základní elektrolyt (2 min, 1 000 mbar)

Prostředí v kapiláře bylo ustáleno vložení napětí 10 kV po dobu 15 min. Mezi jednotlivými měřeními byla kapilára promývána základním elektrolytem (1 min, 1 000 mbar). Vzorky byly dávkovány hydrodynamicky (5 – 10 s, 10 mbar). Měření bylo prováděno při příkonu 0,12 W. Jako marker elektroosmotického toku byl použit 1% v/v DMSO. V kyselých elektrolytech (1,9 – 2,6) se výrazně zpomalila rychlost elektroosmotického toku, proto byl použit urychlovací tlak 50 mbar po dobu 6 min. Kapilára byla uchovávána naplněna deionizovanou vodou.

### 4.3.2 Dvojitá UV-detekce

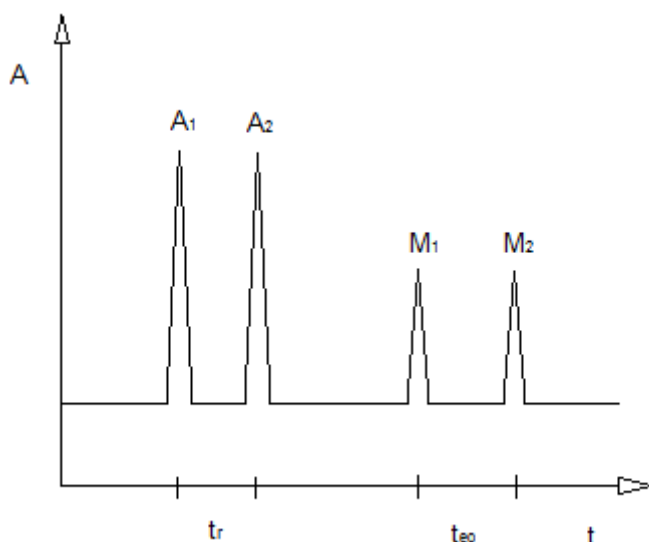
Přístroj pro kapilární zónovou elektroforézu byl vybaven UV detektorem, ve kterém dochází k absorpci UV záření na dvou místech kapiláry. Kapilára je stočena do smyčky a umístěna tak, že dvě okna jsou umístěna přesně nad dvěma štěrbinami detektoru. Stočení kapiláry je znázorněno na obr. 2.



**Obr. 2** Smyčka kapiláry: A<sub>1</sub> – první detekční okénko, A<sub>2</sub> – druhé detekční okénko, C – kapilára, F – odstraněný povlak na kapiláře.

Principem měření pohyblivosti pomocí dvojitě UV detekce je měření migračních časů v části kapiláry mezi dvěma detektory [57]. Uvažujeme-li směs nabitě složky A, a nenabitě složky (markeru EOF) M, pak na elektroforegramu (obr. 3) sledujeme: pík A<sub>1</sub> představuje průchod složky A prvním detekčním okénkem, pík A<sub>2</sub> pak představuje průchod látky A druhým okénkem. Podobně píky M<sub>1</sub> a M<sub>2</sub> znázorňují první a druhý průchod složky M dvěma detekčními okénky.

Měření s dvojitou UV-detekcí umožňuje odstranit nepřesnosti ve stanovení pohyblivosti vzniklé postupným nástupem napětí a proudu, a ustavováním teploty.



**Obr. 3** Schéma elektroforegramu pro separaci nabitě a neutrální složky, získané pomocí dvojité UV detekce: A – absorbance,  $t$  – čas,  $A_1$ ,  $A_2$  – průchod nabitě složky prvním a druhým detekčním okénkem,  $M_1$ ,  $M_2$  – průchod nenabitě složky prvním a druhým detekčním okénkem,  $t_r$  a  $t_{eo}$  – časové intervaly mezi průchody nabitě a nenabitě složky detekčními okénky.

Z časového intervalu  $t_r$  a  $t_{eo}$  a ze známé vzdálenosti detektorů  $d$ , lze určit migrační rychlost nabitých částic,  $v_m$ , a rychlost elektroosmotického toku,  $v_{eo}$  :

$$v_m = \frac{d}{t_r} \quad (28)$$

$$v_{eo} = \frac{d}{t_{eo}} \quad (29)$$

Jako rozdíl migrační rychlosti,  $v_m$ , a rychlosti elektroosmotického toku,  $v_{eo}$ , lze vypočítat elektroforetickou rychlost,  $v_{ep}$ :

$$v_{ep} = v_m - v_{eo} = \frac{d(t_{eo} - t_r)}{t_r \cdot t_{eo}} \quad (30)$$

Efektivní elektroforetická pohyblivost,  $m_{eff}$ , je definována jako elektroforetická rychlost vztážená na jednotkovou intenzitu elektrického pole,  $E$ :

$$m_{eff} = \frac{v_{ep}}{E} = \frac{v_{ep} \cdot l}{U} \quad (31)$$

kde  $U$  je vložené separační napětí a  $l$  je celková délka kapiláry.

Kombinací rovnic (30) a (31) lze získat vztah pro výpočet efektivní pohyblivosti,  $m_{eff}$ , z parametrů použité kapiláry, napětí a z experimentálně získaných migračních časů:

$$m_{eff} = \frac{l \cdot d \cdot (t_{eo} - t_r)}{U \cdot t_{eo} \cdot t_r} \quad (32)$$

### 4.3.3 Kapilární izoelektrická fokusace

Měření pomocí kapilární izoelektrické fokusace bylo prováděno na komerčním CE analyzátoru P/ACE MDQ (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA). Tento přístroj je plně automatický. Řízení, sběr dat a zpracování bylo provedeno pomocí softwaru P/ACE MDQ System, verze 32 Karat (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA). Byla použita křemenná kapilára pokrytá z vnější strany polyimidem, dodaná firmou Polymicro Technologies (Phoenix, AR, USA). Vnitřní průměr kapiláry byl 50  $\mu\text{m}$ , vnější průměr činil 375  $\mu\text{m}$ . Celková délka kapiláry činila 30 cm, z toho efektivní délka byla 20 cm. Vnitřní povrch kapiláry byl potažen poly-(*N,N*-bis(2-hydroxyethyl)akrylamidem [58].

Komerční CE analyzátor umožňuje aktivní chlazení kapiláry pomocí chladícího média, jehož teplota byla 25 °C.

Detekce byla prováděna UV-detektorem s fotodiodovým polem při vlnové délce 420 nm. Jako elektrodové roztoky byly použity 200 mM  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (anolyt) a 300 mM NaOH (katolyt).

Fokusační směs byla připravena z následujících chemikálií:

- 11  $\mu\text{l}$  38 % Pharmalyte 3 – 10
- 25  $\mu\text{l}$  500 mM arginin
- 8  $\mu\text{l}$  100 mM kyselina iminodioctová
- 138  $\mu\text{l}$  Beckman-Coulter gel

Zásobní roztoky jednotlivých markerů byly připraveny o koncentraci 4 mg/ml ve vodě. Měření pomocí CIEF bylo provedeno dle následujícího postupu:

- promytí vodou (1 min, 2 000 mbar)
- naplnění celé kapiláry fokusační směsí (2 min, 2 000 mbar)
- fokusace (6 min, 25 kV)
- mobilizace: napětí 25 kV a přetlak 30 mbar na anodické straně
- promytí vodou (2 min, 4 000 mbar)

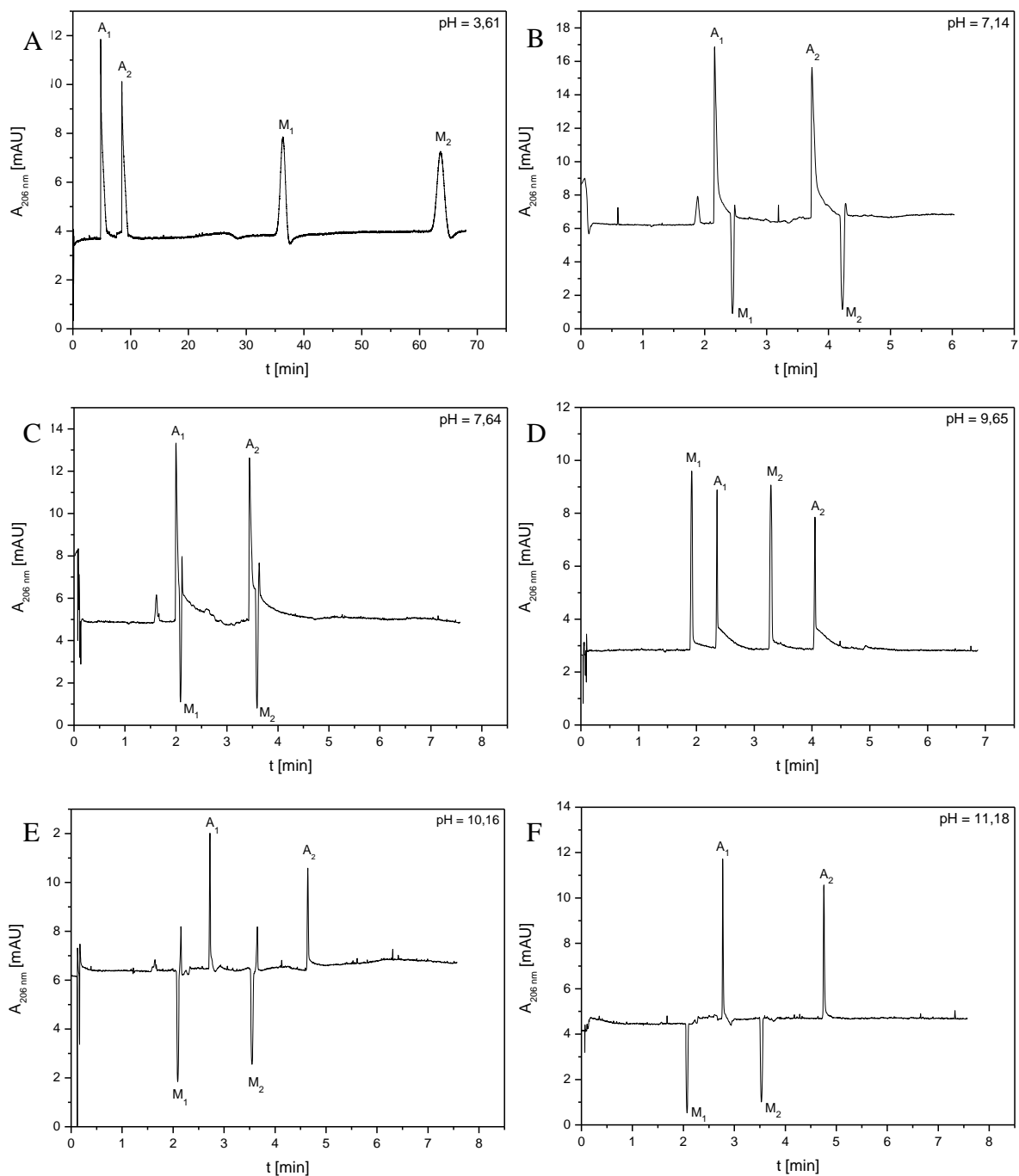
## 5 Výsledky a diskuse

### 5.1 Stanovení efektivních elektroforetických pohyblivostí

Efektivní elektroforetická pohyblivost ( $m_{eff}$ ) všech analyzovaných látek byla stanovena z jejich migračního času a z migračního času EOF markeru (DMSO, H<sub>2</sub>O) v jednotlivých základních elektrolytech (BGE). Podle potřeby byly pohyblivosti proměřeny v 16 – 20 BGE. Pro výpočet  $m_{eff}$  byl použit vztah (32). Všechny získané hodnoty  $m_{eff}$  byly pře počítány na referenční teplotu 25 °C (kap. 5.2). Výsledky jsou uvedeny v tab. 5.

Příklady CZE analýzy pro látku 4-methyl-2-((4-methylpiperazin-1-yl)methyl)-6-nitrofenol (látka **6**) jsou uvedeny na obr. 4. Jedná se o vybrané elektroforegramy znázorňující chování analyzované látky v šesti vybraných BGE o různém pH. Píky označené A<sub>1</sub> a A<sub>2</sub> představují průchod analytu prvním a druhým detekčním okénkem, píky M<sub>1</sub> a M<sub>2</sub> jsou přiřazeny průchodu markeru EOF prvním a následně druhým detekčním okénkem.

Látka **6** obsahuje tři ionogenní skupiny, dvě bazické skupiny piperazinu a jednu kyselou skupinu fenolovou. Na obr. 4 A je možné pozorovat, že migrační čas analytu při pH = 3,61 je menší než migrační čas markeru EOF (DMSO), analyt se chová jako kationt. V kyselém prostředí BGE je potlačena disociace fenolové skupiny a látka je tedy nabitá do stupně +2. Se zvyšujícím se pH dochází k disociaci fenolové skupiny a náboj analytu se snižuje na stupeň +1. Při pH = 7,14 a pH = 7,64 (obr. 4 B, C) se migrační čas analytu blíží migračnímu času markeru elektroosmotického toku. Jelikož efektivní elektroforetická pohyblivost markeru EOF je nulová – marker je unášen pouze elektroosmotickým tokem, blíží se pohyblivost látky **6** nulové hodnotě. Z toho vyplývá, že efektivní náboj analytu se také blíží nule a analyt se bude nacházet v prostředí, jehož pH je blízké jeho izoelektrickému bodu. Při zásaditém pH elektrolytu – pH = 9,65, pH = 10,16, pH = 11,18 (obr. 4 D, E, F) se prodlužuje migrační čas analytu, který se v tomto prostředí chová jako anion. V zásaditém prostředí BGE dochází k deprotonizaci bazických skupin piperazinu a látka je nabitá do stupně -1.



**Obř. 4** Elektroforegramy látky **6** v řesti základních elektrolytech o řezném pH:

A – pH = 3,61, B – pH = 7,14, C – pH = 7,64, D – pH = 9,65, E – pH = 10,16, F – pH = 11,18,  $A_1$  a  $A_2$  – řůchod analytu řvním a druhým detekčním okénkem,  $M_1$  a  $M_2$  – řůchod markeru EOF řvním a druhým detekčním okénkem,  $A_{206 \text{ nm}}$  – absorbance řři 206 nm,  $t$  – migrační řas. Sloření základních elektrolytů je uvedeno v tab. 3 a experimentální podmínky CZE analýz jsou popsány v kap. 4.3.1.

**Tab. 5** Efektivní elektroforetické pohyblivosti analytů korigované na referenční teplotu 25 °C ( $m_{eff,25}$ )

Analyt	$m_{eff,25} [10^9 \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}]^*$												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
<b>I</b>	26,34	32,70	--	37,90	--	34,25	--	19,53	--	--	18,15	26,14	--
<b>II</b>	24,23	32,82	29,92	37,11	--	33,53	--	18,73	--	--	17,81	25,19	--
<b>III</b>	21,02	32,00	28,77	35,20	--	31,33	--	15,98	--	--	16,72	22,39	--
<b>IV</b>	18,36	29,95	27,12	34,67	20,08	29,14	20,16	11,66	10,53	7,35	14,51	19,43	9,01
<b>V</b>	17,81	28,24	23,25	33,27	19,55	24,77	20,00	7,08	5,90	3,97	10,54	12,08	6,20
<b>VI</b>	16,85	23,52	19,02	30,85	18,94	20,99	20,22	2,49	2,04	1,27	3,26	1,66	2,35
<b>VII</b>	17,25	21,04	17,74	30,21	19,08	20,82	19,42	1,09	0,68	0,44	0,00	-4,88	-4,16
<b>VIII</b>	16,92	18,49	15,92	27,99	15,10	18,11	16,11	0,00	0,00	0,00	-3,13	-10,36	-7,66
<b>IX</b>	16,12	16,39	14,41	23,18	10,25	17,79	11,89	-0,83	-0,68	-0,49	-7,36	-13,12	-10,62
<b>X</b>	15,90	16,56	14,26	19,35	5,00	15,34	6,38	-1,13	-0,70	-0,47	-12,06	-13,46	-13,19
<b>XI</b>	15,65	16,09	13,43	15,62	1,73	12,02	2,37	-1,78	-0,72	-0,37	-16,68	-14,70	-14,55
<b>XII</b>	15,57	15,34	10,90	8,64	0,00	6,06	-1,42	-3,50	-0,77	-0,36	-17,04	-13,62	-18,26
<b>XIII</b>	15,14	12,94	6,66	4,86	-0,52	2,28	-4,28	-6,73	-0,76	-1,16	-18,15	-14,39	-18,49
<b>XIV</b>	14,43	8,39	2,52	-1,36	-0,47	-0,45	-8,22	-11,44	-0,85	-1,94	-18,15	-14,71	-19,84
<b>XV</b>	14,34	5,15	-0,88	-2,17	-0,52	-3,23	-12,53	-15,77	-2,05	-4,30	-18,97	-16,73	-19,87
<b>XVI</b>	13,12	0,55	-3,93	-6,29	-1,30	-7,83	-16,65	-17,73	-4,92	-9,95	-19,56	-20,08	-20,92
<b>XVII</b>	10,63	-2,26	-7,08	-9,93	-1,50	-12,16	-17,87	-18,63	-9,76	-14,27	-21,36	-23,59	-22,12
<b>XVIII</b>	4,38	-6,06	-9,86	-11,72	-4,65	-14,40	-16,96	-18,05	-13,81	-16,20	-23,50	-24,57	-23,64
<b>XIX</b>	-1,18	-10,87	-13,24	-13,01	-9,68	-15,88	-17,89	-18,51	-17,89	-18,30	-28,08	-29,17	-25,98
<b>XX</b>	-5,15	-13,65	-14,47	-13,53	-15,02	-16,50	-18,21	-19,40	-18,91	-18,68	-31,94	-30,21	-29,37

\* Průměrné hodnoty ze tří měření, jejich relativní směrodatná odchylka (RSD) se pohybovala v rozmezí 1 – 2 %.

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

Všechna měření byla provedena při aktuální laboratorní teplotě, neboť přístroj domácí výroby ÚOCHB AV ČR, na kterém bylo prováděno měření, není vybaven aktivním chlazením kapiláry. Okolní teplota v laboratoři se pohybovala v rozmezí 22,5 – 26,5 °C. Tvorba Jouleova tepla také přispívá ke zvýšení teploty, a proto bylo nutné efektivní elektroforetické pohyblivosti přepočítat na referenční teplotu 25 °C.

Byl proměřen elektrický proud 20 mM vodného roztoku chloridu draselného o známé elektrické vodivosti při širokém rozmezí napětí 1 – 20 kV. Měření probíhalo při stejných podmínkách jako CE analýzy, jen s tím rozdílem, že kapilára byla naplněna roztokem KCl. Odpor roztoku,  $R_{BGE}$ , byl vypočítán jako podíl vloženého napětí a naměřeného proudu. Odpor tohoto elektrolytu se od 20 do 30 °C snižuje přibližně o 2 % na stupeň Celsia.

Ze změn elektrického odporu,  $R_{BGE}$ , při určitém příkonu vkládaném na kapiláru byl vypočítán přírůstek teploty,  $\Delta T$ . Tento přírůstek je definován jako rozdíl teploty uvnitř kapiláry  $T_i$  a okolní teploty  $T_o$  a lze ho vypočítat ze vztahu:

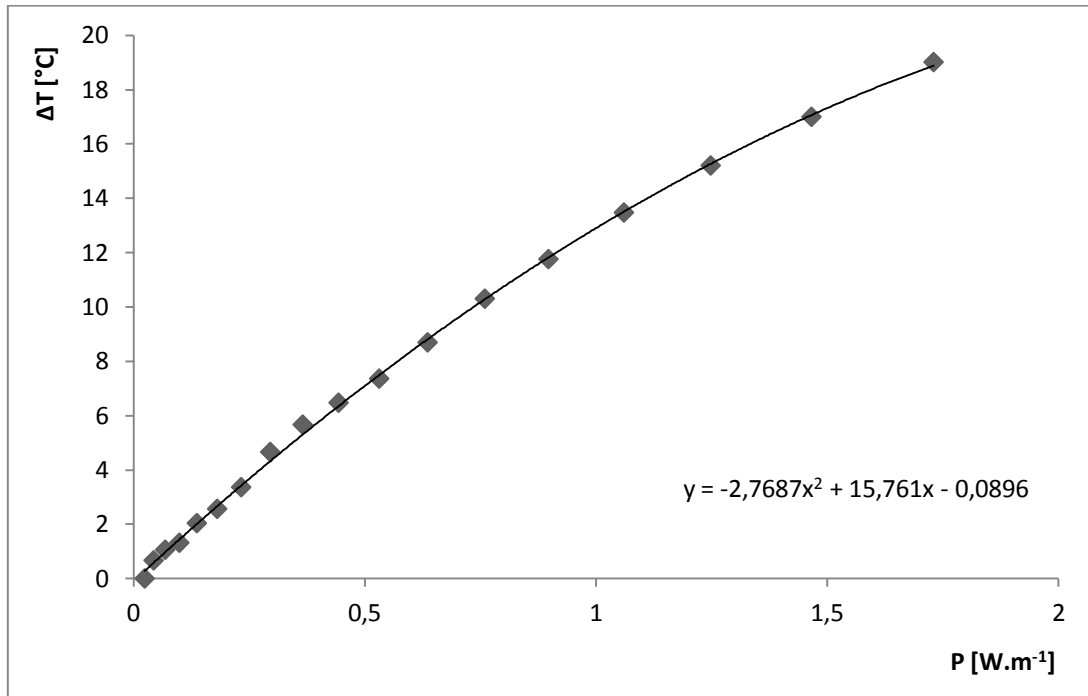
$$\Delta T = T_i - T_o = \frac{R_{BGE,0} - R_{BGE}}{0,020 \cdot R_{BGE,0}} \quad (33)$$

kde  $R_{BGE,0}$  je odpor při nízkém příkonu, kdy je zvýšení teploty zanedbatelné,  $R_{BGE}$  je odpor při daném příkonu.

Závislost přírůstku teploty,  $\Delta T$ , na elektrickém příkonu,  $P$ , vloženém na kapiláru, byla znázorněna graficky (obr. 5). Z rovnice závislosti byl po dosazení elektrického příkonu vypočítán přírůstek teploty. Tato hodnota byla dále využita pro výpočet efektivních elektroforetických pohyblivostí,  $m_{eff,25}$ , které jsou vztaženy na referenční teplotu 25 °C.

$$m_{eff,25} = m_{eff,T_i} [1 - 0,020(T_o + \Delta T - 25)] \quad (34)$$

Ve výše uvedeném vztahu je  $m_{eff,25}$  efektivní elektroforetická pohyblivost při 25 °C,  $m_{eff,T_i}$  je efektivní elektroforetická pohyblivost při aktuální teplotě uvnitř kapiláry,  $T_i$ , a  $T_0$  je aktuální teplota okolí během měření.



**Obr. 5** Křivka závislosti vzrůstu teploty uvnitř kapiláry,  $\Delta T$ , na elektrickém příkonu,  $P$ , vkládaném na kapiláru vztáženém na jednotku délky kapiláry.

## 5.3 Stanovení acidobazických disociačních konstant

Pro výpočet acidobazických disociačních konstant ( $pK_a$ ) byla použita nelineární regresní analýza závislosti efektivní elektroforetické pohyblivosti na pH. Zpracování výsledků bylo provedeno pomocí programu Origin 6.1. Hodnoty  $pK_a$  byly získány proložení závislosti  $m_{eff}$  na pH (obr. 6) nelineární regresní funkcí podle příslušných rovnic. U látek s jednou kyselou a jednou bazickou ionogenní skupinou (**5**, **7**, **8**, **9**, **10**) byl použit následující vztah:

$$m_{eff,A} = \frac{m_{A,+} \cdot 10^{(pK_{a,1}^{mix}-pH)} + m_{A,-} \cdot 10^{(pH-pK_{a,2}^{mix})}}{10^{(pK_{a,1}^{mix}-pH)} + 10^{(pH-pK_{a,2}^{mix})} + 1} \quad (35)$$

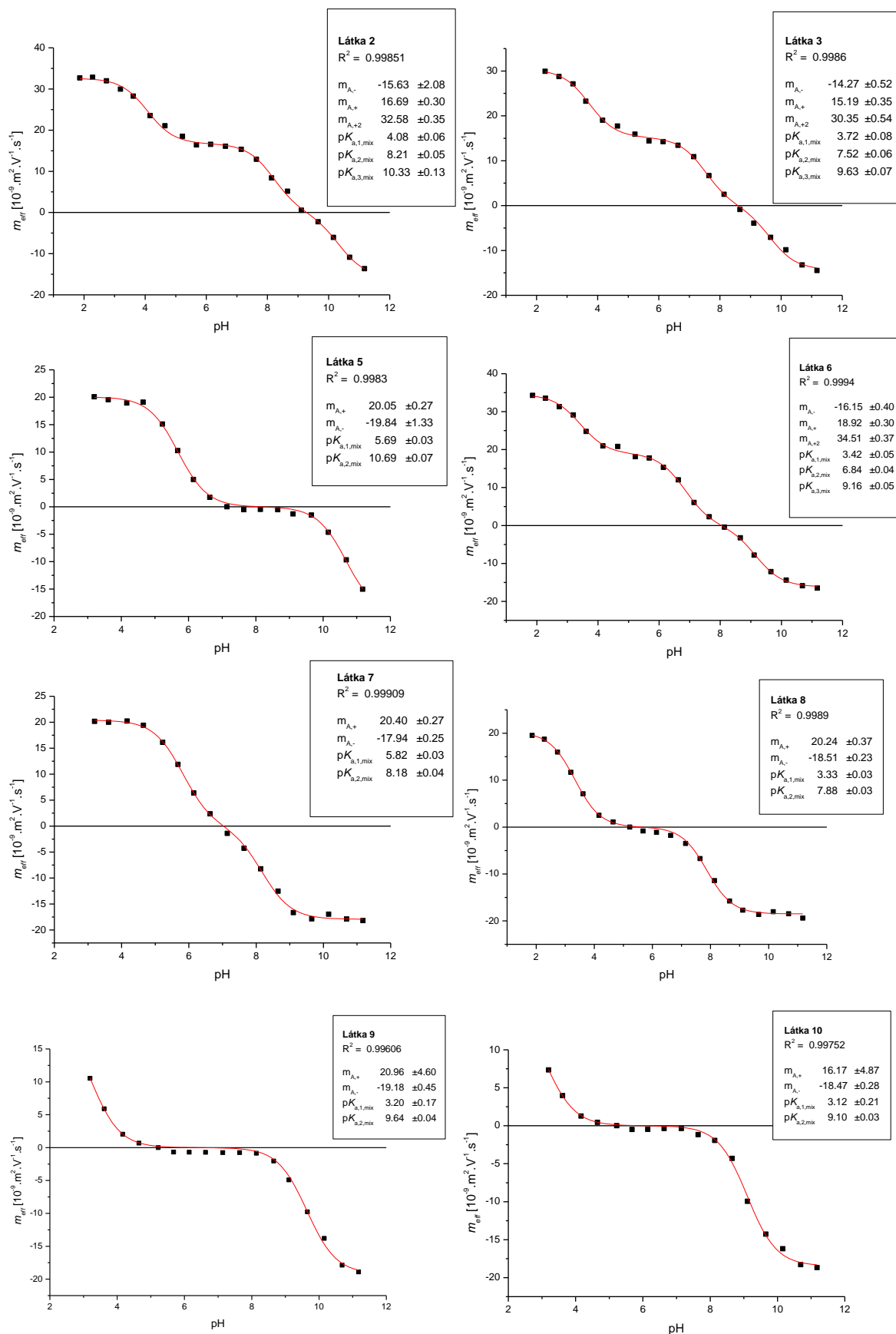
kde  $m_{A,+}$  je elektroforetická pohyblivost kationické formy látky A,  $m_{A,-}$  je elektroforetická pohyblivost anionické formy látky A,  $pK_{a,1}^{mix}$  a  $pK_{a,2}^{mix}$  jsou smíšené disociační konstanty pro kyselou a bazickou ionogenní skupinu.

V případě látek, které obsahovaly dvě bazické a jednu kyselou skupinu (**1**, **2**, **3**, **6**) byla pro výpočet příslušných acidobazických konstant použita rovnice (36):

$$m_{eff,A} = \frac{m_{A,+2} \cdot 10^{(pK_{a,1}^{mix}+pK_{a,2}^{mix}-2pH)} + m_{A,+} \cdot 10^{(pK_{a,2}^{mix}-pH)} + m_{A,-} \cdot 10^{(pH-pK_{a,3}^{mix})}}{10^{(pK_{a,1}^{mix}+pK_{a,2}^{mix}-2pH)} + 10^{(pK_{a,2}^{mix}-pH)} + 10^{(pH-pK_{a,3}^{mix})} + 1} \quad (36)$$

Ve výše uvedeném vztahu  $m_{A,+2}$  představuje aktuální elektroforetickou pohyblivost kationické formy látky A s nábojem +2,  $pK_{a,1}^{mix}$  je smíšená disociační konstanta pro kyselou ionogenní skupinu,  $pK_{a,2}^{mix}$  a  $pK_{a,3}^{mix}$  jsou smíšené disociační konstanty odpovídající bazickým skupinám.

U zbylých látek (**4**, **11**, **12**, **13**), které obsahovaly více ionogenních skupin, nebyly konstanty acidity počítány, neboť nebylo možné přesně rozlišit jejich disociaci do jednotlivých stupňů.



**Obr. 6** Závislosti efektivních elektroforetických pohyblivostí na pH a výsledky jejich nelineární regresní analýzy pro látky 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10.

Ze závislostí elektroforetických pohyblivostí na pH (obr. 6) bylo posouzeno, zda je daná látka vhodná pro použití jako marker  $pI$  pro kapilární izoelektrickou fokusaci. U látek **2**, **3**, **6** a **7** jsou křivky v okolí jejich izoelektrických bodů strmé a hodnota  $pI$  je snadno odečitatelná. Struktura látky **7** sice není přesně známa, ale ze získané závislosti efektivní elektroforetické pohyblivosti na pH lze usuzovat, že obsahuje jednu bazickou a jednu kyselou ionogenní skupinu. Naopak u látek **5**, **9** a **10** se elektroforetická pohyblivost nachází v oblasti kolem nuly v širším intervalu pH, tuto oblast lze nazvat jako izoelektrické pásmo. Je proto problematické určit zcela přesné diskrétní hodnoty jejich  $pI$ . Tyto látky se projeví jako nevhodné pro použití jako markery  $pI$ .

Hodnoty smíšených acidobazických disociačních konstant ionogenních skupin vybraných analyzovaných látek byly následně přepočítány podle vztahů odvozených v pracích [41, 42] na termodynamické disociační konstanty a jsou uvedeny v tab. 6. Pro přepočet konstant analytů, které obsahovaly jednu bazickou a jednu kyselou ionogenní skupinu, byly použity vztahy (37) a (38):

$$pK_{a,1} = pK_{a,1}^{mix} + \log\gamma_{\pm} \quad (37)$$

$$pK_{a,2} = pK_{a,2}^{mix} - \log\gamma_{\pm} \quad (38)$$

V případě analytů obsahujících tři ionogenní skupiny (dvě bazické, jednu kyselou), byly termodynamické konstanty získány ze vztahů (39), (40) a (41):

$$pK_{a,1} = pK_{a,1}^{mix} + 3\log\gamma_{\pm} \quad (39)$$

$$pK_{a,2} = pK_{a,2}^{mix} + \log\gamma_{\pm} \quad (40)$$

$$pK_{a,3} = pK_{a,3}^{mix} - \log\gamma_{\pm} \quad (41)$$

Pro fenolovou skupinu se hodnoty  $pK_{a,1}$  pohybovaly v rozmezí 3,06 – 5,76, u bazických skupin se hodnoty  $pK_{a,2}$  a  $pK_{a,3}$  nacházely v intervalu 6,78 – 10,75.

**Tab. 6** Termodynamické acidobazické disociační konstanty ( $pK_a$ ) inogenních skupin vybraných analyzovaných látek a aktuální pohyblivosti ( $m_A$ ) jejich iontových forem.

Látka	$pK_{a,1}$	$pK_{a,2}$	$pK_{a,3}$	$m_{A,+2}$	$m_{A,+}$	$m_{A,-}$
<b>2</b>	3,89 ± 0,06	8,15 ± 0,05	10,39 ± 0,13	32,58 ± 0,35	16,69 ± 0,30	-15,63 ± 2,08
<b>3</b>	3,53 ± 0,08	7,46 ± 0,06	9,69 ± 0,07	30,35 ± 0,54	15,19 ± 0,35	-14,27 ± 0,52
<b>5</b>	5,63 ± 0,03	10,75 ± 0,07	--	--	20,05 ± 0,27	-19,84 ± 1,33
<b>6</b>	3,23 ± 0,05	6,78 ± 0,04	9,22 ± 0,05	34,51 ± 0,37	18,92 ± 0,30	-16,15 ± 0,40
<b>7</b>	5,76 ± 0,03	8,24 ± 0,04	--	--	20,40 ± 0,27	-17,94 ± 0,25
<b>8</b>	3,27 ± 0,03	7,94 ± 0,03	--	--	20,24 ± 0,37	-18,51 ± 0,23
<b>9</b>	3,13 ± 0,17	9,70 ± 0,04	--	--	20,96 ± 4,60	-19,18 ± 0,45
<b>10</b>	3,06 ± 0,21	9,16 ± 0,03	--	--	16,17 ± 4,87	-18,47 ± 0,28

Ze srovnání  $pK_a$  hodnot analyzovaných látek uvedených v tab. 6 a jejich struktur v tab. 4 vyplynuly následující závislosti mezi strukturou a acidobazickými vlastnostmi těchto látek:

- Náhrada methylu 2-hydroxyethylem ve struktuře terciárních aminů u látek **2** a **3**, a **9** a **10** vede k mírně zvýšené kyselosti fenolové skupiny, slabší bazicitě derivatizovaných aminoskupin a nižšímu  $pI$  u sloučenin **3** a **10** ve srovnání se sloučeninami **2** a **9**.
- Přítomnost jednosytné báze piperidinu u látky **5** resp. dvojsytné báze N-methylpiperazinu u látky **6** je příčinou výrazně silnější kyselosti a slabší bazicity látky **6** oproti látce **5**. Významně odlišný charakter substituentů u těchto látek způsobil, že  $pK_a$  jejich fenolových skupin se liší o více než dva řády ( $pK_{a,1} = 3,23$  u látky **6** resp. 5,63 u látky **5**) a  $pK_{a,2}$  jejich bazických skupin dokonce až o čtyři řády ( $pK_{a,2} = 6,78$  u látky **6** resp. 10,75 u látky **5**). V důsledku velké vzdálenosti více než pěti jednotek pH mezi  $pK_{a,1}$  fenolové skupiny a  $pK_{a,2}$  piperidinylové skupiny látky

**5** tato látka vykazuje široké izoelektrické pásmo, nemá ostře definovaný izoelektrický bod a není vhodná jako marker *pI*.

- Skupina derivátů 2-chloro-nitrofenolů, tj. látek **8**, **9** a **10** se vyznačuje přibližně stejnou silou kyselosti fenolové skupiny s  $pK_{a,1}$  v rozmezí 3,06 – 3,27 a zvyšující se bazicitou s přibližně řádovými rozdíly v  $pK_a$  v pořadí substituentů morfolinomethyl látky **8** ( $pK_a$  7,94), (N,N-di(hydroxyethyl))aminomethyl látky **10** ( $pK_a$  9,16) a (N-hydroxyethyl-N-methyl)-aminomethyl látky **9** ( $pK_a$  9,70). Všechny tři látky mají blízké izoelektrické body v rozmezí 5,3 – 5,0.
- Kyselost fenolové skupiny u látek **2** a **3** ( $pK_{a,1}$  3,89 resp. 3,53) s dvěma bazickými skupinami terciárních aminů byla mírně slabší než u látek **8**, **9** a **10** obsahujících pouze jednu bazickou skupinu ( $pK_{a,1}$  3,27; 3,13 a 3,06).

## 5.4 Stanovení izoelektrických bodů (*pI*) analyzovaných látek metodou CZE

Změřené migrační časy analytů a markerů elektroosmotického toku pomocí CZE byly použity pro výpočet efektivních elektroforetických pohyblivostí (kap. 5.1). Ze závislosti efektivních elektroforetických pohyblivostí na pH byly hodnoty izoelektrických bodů odečteny jako hodnoty pH, ve kterých je efektivní elektroforetická pohyblivost analytu rovna nule. Stanovené hodnoty *pI* jsou uvedeny v tab. 7. Hodnoty *pI* získané metodou CZE byly ve většině případů shodné či blízké hodnotám předpokládaným.

Pro kvalitu amfolytu jako markeru izoelektrického bodu je důležitou charakteristikou strmost závislosti jeho efektivní elektroforetické pohyblivosti na pH v okolí jeho izoelektrického bodu, tj. podíl  $\Delta m_{eff}/\Delta pH$ . Čím je hodnota tohoto podílu větší, tím lépe a rychleji se bude daný analyt fokusovat v CIEF do své zóny a bude lépe sloužit jako marker *pI*. Hodnoty  $\Delta m_{eff}/\Delta pH$  jsou uvedeny v tab. 7.

U látek **5**, **9** a **10** je z nízkých hodnot strmostí křivek závislosti jejich pohyblivosti na pH (0,19 – 0,66) zřejmé, že tyto látky nejsou vhodné pro použití jako markery *pI*.

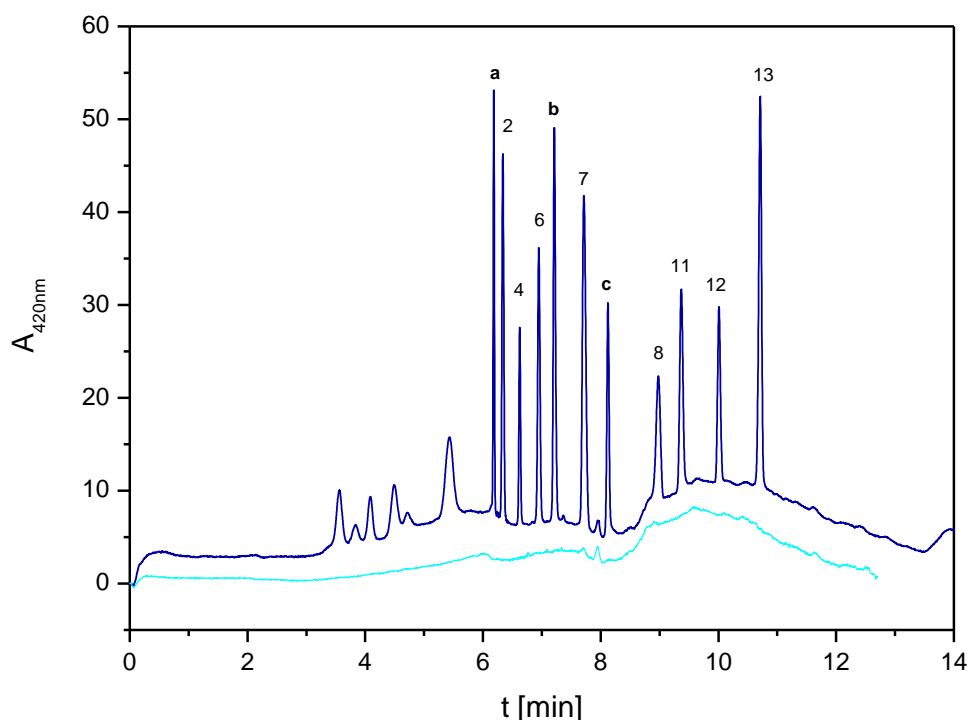
**Tab. 7** Předpokládané ( $pI_{pr}$ ) a metodou CZE experimentálně stanovené ( $pI_{CZE}$ ) izoelektrické body, strmosti závislosti efektivních pohyblivostí na pH ( $\Delta m_{eff}/\Delta pH$ ) a použitelnost analyzovaných látek jako markerů pI v CIEF ( $CIEF_{appl}$ )

Látka	$pI_{pr}$	$pI_{CZE}$	$\Delta m_{eff}/\Delta pH$	$CIEF_{appl}$
1	10,40	10,60	10,45	ne
2	9,30	9,30	7,40	ano
3	8,50	8,70	6,66	ne
4	8,40	8,40	7,61	ano
5	7,00 – 8,00	7,50 – 8,50	0,662	ne
6	7,80	8,05	5,45	ano
7	7,00	7,00	7,40	ano
8	5,30	5,30	1,86	ano
9	5,20	5,00 – 8,00	0,29	ne
10	5,00	5,00 – 7,00	0,19	ne
11	5,00	4,60	6,05	ano
12	4,50	4,20	13,54	ano
13	4,10	3,80	11,84	ano

## 5.5 Analýza markerů izoelektrických bodů metodou CIEF

V CIEF se analyzované amfoterní látky fokusují v místě, kde pH odpovídá jejich izoelektrickému bodu. Pomocí CIEF byla analyzována směs vybraných nově navržených syntetických markerů izoelektrických bodů během jednoho experimentu (obr. 7). Všechny látky se v gradientu pH vytvořeném směsí amfolytů Pharmalyte 3 – 10 velmi dobře fokusovaly, čímž byla potvrzena vhodnost navržených struktur pro funkci markerů pI a možnost jejich využití pro kalibraci pH gradientu v CIEF. Pro pokrytí celého gradientu pH markery pI byly do testované směsi nových markerů zahrnuty i tři dříve vyvinuté markery pI (látky označené **a**, **b**, **c**). Světle modrá stopa na obr. 7 představuje CIEF směsi amfolytů bez analyzovaných markerů. Široké píky s migračními časy do šesté minuty jsou tzv.

fokusační píky. Na obrázku 7 je patrné poměrně rovnoměrné pokrytí celého gradientu pH nově syntetizovanými markery.

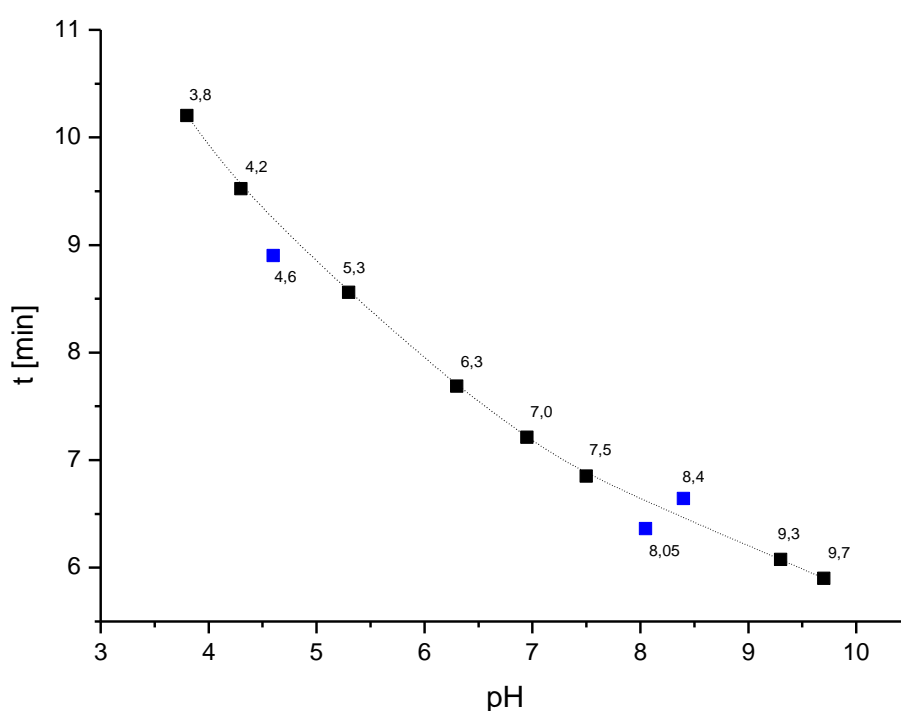


**Obr. 7** Záznam z kapilární izoelektrické fokusace: směs analyzovaných markerů *pI* (**2, 4, 6, 7, 8, 11, 12, 13**), dříve vyvinuté markery (**a, b, c**), světle modrá stopa – směs amfolytů bez markerů, píky do šesté minuty – fokusační píky,  $A_{420\text{nm}}$  – absorbance při vlnové délce 420 nm,  $t$  – mobilizační migrační čas.

Látka **1** se nefokusovala, její *pI* bylo mimo rozsah pH použitých nosných amfolytů. Látky **5, 9** a **10** nebyly měřeny pomocí CIEF, jelikož se projevíly jako nevhodné pro použití jako markery *pI*. Hodnoty jejich efektivních pohyblivostí se pohybovaly kolem nuly v poměrně širokém intervalu pH. Křivky látek **5, 9** a **10** nebyly v okolí jejich izoelektrického bodu strmé, tj. nebylo možné přesně určit diskrétní hodnoty *pI*. Pomocí CIEF byla ověřena možnost použití nově syntetizovaných látek pro kalibraci pH gradientu. Kalibrační křivka pH gradientu v kapiláře je ukázána na obr. 8. Modře označené body nezapadají do hladkého průběhu křivky, což mohlo být způsobeno potenciálními interakcemi s nosnými amfolyty nebo rozdíly v *pI* určených metodou CZE ve stupňovitém gradientu pH při diskrétních hodnotách pH základních elektrolytů a *pI* stanovených

metodou CIEF v kontinuálním pH gradientu nosných amfolytů. Je známo, že hodnoty  $pI$  jsou ovlivněny složením základních elektrolytů v CZE resp. konkrétní směsí amfolytů v CIEF. Zdrojem nelinearity zobrazené kalibrační křivky by mohla být známá slabší pufrací kapacita nosných amfolytů v bazické oblasti, proměnlivá viskozita během mobilizace a proměnlivá zbytková elektroosmóza během mobilizace.

Jako vhodné látky pro použití jako markery  $pI$  byly vyhodnoceny analyty **2, 4, 6, 7, 8, 11, 12, 13**. Analyty budou předmětem dalších charakterizací pomocí metod NMR a MS.



**Obr. 8** Kalibrační křivka pH gradientu v CIEF získaná z experimentu prezentovaného na obr. 7: modře označené body – hodnoty nebyly zahrnuty do kalibrační křivky, hodnoty 6,3; 7,5 a 9,7 odpovídají dříve vyvinutým markerům  $pI$ ,  $t$  – mobilizační čas.

## 6 Závěr

V této diplomové práci byly charakterizovány nově syntetizované markery  $pI$  na bázi aminomethylnitrofenolů, jejich derivátů a jiných strukturně příbuzných látek metodami kapilární zónové elektroforézy (CZE) a kapilární izoelektrické fokusace (CIEF).

Pomocí CZE byla proměřena efektivní elektroforetická pohyblivost analyzovaných látek v sérii základních elektrolytů v širokém intervalu  $pH = 1,86 - 11,18$ . Ze získaných pohyblivostí (předem korigovaných na referenční teplotu  $25^{\circ}C$ ) byla vynesena jejich závislost na  $pH$ , z které byly odečteny hodnoty izoelektrických bodů. Pro určení acidobazických disociačních konstant ionogenních skupin vybraných látek (**2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10**) byla použita nelineární regresní analýza výše uvedené závislosti  $pH$  na efektivních elektroforetických pohyblivostech. Výsledné konstanty acidity mohou být využity při vývoji nových markerů izoelektrických bodů s požadovanými hodnotami  $pI$ . CZE se ukázala jako vhodná a jednoduchá metoda pro stanovení izoelektrických bodů a acidobazických disociačních konstant.

Dále byly látky, které se projeví jako vhodné pro použití jako markery  $pI$  (**2, 4, 6, 7, 8, 11, 12, 13**), analyzovány metodou kapilární izoelektrické fokusace, která prokázala vhodnost navržených amfoterních látek jako markerů izoelektrických bodů a jejich použitelnost pro kalibraci  $pH$  gradientu v CIEF.

## 7 Použitá literatura

- [1] Kašička, V.: Teoretické základy a separační principy kapilárních elektromigračních metod. *Chemické Listy* **91**, 320-329 (1997).
- [2] Vesterberg, O.: History of electrophoretic methods. *Journal of Chromatography* **480**, 3-19 (1989).
- [3] Hjertén, S.: Free zone electrophoresis. *Chromatography Revue* **9**, 122-219 (1967).
- [4] Virtanen, R.: Zone Electrophoresis in A Narrow-Bore Tube Employing Potentiometric Detection - Theoretical and Experimental Study. *Acta Polytechnica Scandinavica-Chemical Technology Series* **123**, 1-67 (1979).
- [5] Mikkers, F. E. P.; Everaerts, F. M.; Verheggen, T. P. E. M.: High-performace zone electrophoresis. *Journal of Chromatography* **169**, 11-20 (1979).
- [6] Jorgenson, J. W.; Lukacs, K. D.: Zone electrophoresis in open-tubular glass-capillaries. *Analytical Chemistry* **53**, 1298-1302 (1981).
- [7] Foret, F.; Křivánková, L.; Boček, P.: Capillary Zone Electrophoresis. Weinheim, Verlag Chemie 1993, p. 7-186.
- [8] Petr J.; Maier V.; Horáková J.; Ševčík J.; Stránský Z.: Capillary isotachophoresis from the student point of view - images and the reality. *Journal of Separation Science* **29**, 2705-2715 (2006).
- [9] Křivánková, L.; Pantůčková, P.; Boček, P.: Isotachophoresis in zone electrophoresis. *Journal of Chromatography A* **838**, 55-70 (1999).
- [10] Gaš, B.: Kapilární elektroforéza. *Vesmír* **80**, 370-372 (2001).
- [11] Righetti, P. G.: Determination of the isoelectric point of proteins by capillary isoelectric focusing. *Journal of Chromatography A* **1037**, 491-499 (2004).
- [12] Wu, J.; Huang, T.: Peak identification in capillary isoelectric focusing using the concept of relative peak position as determined by two isoelectric point markers. *Electrophoresis* **27**, 3584-3590 (2006).

- [13] Shimura, K.; Zhi, W.; Matsumoto, H.; Kasai, K.: Accuracy in the Determination of Isoelectric Points of Some Proteins and a Peptide by Capillary Isoelectric Focusing: Utility of Synthetic Peptides as Isoelectric Point Markers. *Analytical Chemistry* **72**, 4747- 4757 (2000).
- [14] Horká, M.; Willimann, T.; Blum, M.; Nording, P.; Friedl, Z.; Šlais, K.: Capillary isoelectric focusing with UV-induced fluorescence detection. *Journal of Chromatography A* **916**, 65-71 (2001).
- [15] Vlčková, M.; Kalman, F.; Schwarz, M. A.: Pharmaceutical application of isoelectric focusing on microchip with imaged UV detection. *Journal of Chromatography A* **1181**, 145-152 (2008).
- [16] Liu, X.; Dahdouh, F.; Salgado, M.; Gomez, F. A.: Recent Advances in Affinity Capillary Electrophoresis (2007). *Journal of Pharmaceutical Science* **98**, 394-410 (2009).
- [17] Kinoshita, M.; Kazuaki, K.: Analysis of the interaction between hyaluronan and hyaluronan-binding proteins by capillary affinity electrophoresis: significance of hyaluronan molecular size on binding reaction. *Journal of Chromatography B* **816**, 289-295 (2005).
- [18] Ehala, S.; Kašička, V.; Makrlík, E.: Determination of stability constants of valinomycin complexes with ammonium and alkali metal ions by capillary affinity electrophoresis. *Electrophoresis* **29**, 652-657 (2008).
- [19] Rill, R. L.; Liu, Y.; Winkle, D. H.; Locke, B. R.: Pluronic copolymer liquid crystals: unique, replaceable media for capillary gel electrophoresis. *Journal of Chromatography A* **817**, 287-295 (1998).
- [20] Mikšík, I.; Sedláková, P.; Mikulíková, K.; Eckhardt, A.; Cserhati, T.; Horváth, T.: Matrices for capillary gel electrophoresis - a brief overview of uncommon gels. *Biomedical Chromatography* **20**, 458-465 (2006).
- [21] Terabe, S.; Otsuka, K.; Ando, T.: Electrokinetic Chromatography with Micellar Solution and Open-Tubular Capillary. *Analytical Chemistry* **57**, 834-841 (1985)

- [22] Silva, M.: Micellar electrokinetic chromatography. *Electrophoresis* **32**, 149-165 (2011).
- [23] Keith, D.; Myers, P.: Theory of capillary electrochromatography. *Journal of Chromatography A* **916**, 3-23 (2001).
- [24] Dittmann, M.; Rozing, M. G. P.: Capillary Electrochromatography (CEC): methodology and Applications. *Biomedical Chromatography* **12**, 136-137 (1998).
- [25] Rathore, A. S.: Theory of electroosmotic flow, retention and separation efficiency in capillary electrochromatography. *Electrophoresis* **23**, 3827-3846 (2002).
- [26] Kvasničková, L.; Glatz, Z.; Kahle, V.: Kapilární elektrochromatografie. *Chemické listy* **97**, 86-92 (2003).
- [27] Xuan, X.; Li, D.: Joule heating effects on peak broadening in capillary zone electrophoresis. *Journal of Micromechanics and Microengineering* **14**, 1171-1180 (2004).
- [28] Rathore, A. S.; Reynolds, K. J.; Colón, L. A.: Joule heating in packed capillaries used in capillary electrochromatography. *Electrophoresis* **23**, 2918-2928 (2002).
- [29] Chankvetadze, B.: Basic of Capillary Electrophoresis. In: *Capillary Electrophoresis in Chiral Analysis*. Chankvetadze, B.(ed.). New York, John Wiley & Sons 1997, p. 5-72.
- [30] Erny, G. L.; Bergström, E. T.; Goodall, D. M.: Electromigration dispersion in capillary zone electrophoresis Experimental validation of use of the Haarhoff-Van der Linde function. *Journal of Chromatography A* **959**, 229-239 (2002).
- [31] Jong, S.; Krylov, S. N.: Pressure-Based Approach for the Analysis of Protein Adsorption in Capillary Electrophoresis. *Analytical Chemistry* **84**, 453-458 (2012).
- [32] Boček, P.: Analytical capillary electrophoresis. In: *In Advanced Instrumental Methods of Chemical Analysis*. Churacek, J. (ed.). Praha, Academia 1993, p. 97-141.
- [33] Tagliaro, F.; Manetto, G.; Crivellente, F.; Smith, F. P.: A brief introduction to capillary electrophoresis. *Forensic Science International* **92**, 75-88 (1998).

- [34] Kašička, V.: Recent advances in CE and CEC of peptides (2007-2009). *Electrophoresis* **31**, 122-146 (2010).
- [35] Swinney, K.; Bornhop, D. J.: Detection in capillary electrophoresis. *Electrophoresis* **21**, 1239-1250 (2000).
- [36] Kašička, V.: Recent developments in capillary electrophoresis and capillary electrochromatography of peptides. *Electrophoresis* **27**, 142-175 (2006).
- [37] Kubáň, P.; Hauser, P. C.: Fundamentals of electrochemical detection techniques for CE and MCE. *Electrophoresis* **30**, 3305-3314 (2009).
- [38] Jaroš, M.; Soga, T.; Goor, T.; Gaš, B.: Conductivity detection in capillary zone electrophoresis: Inspection by PeakMaster. *Electrophoresis* **26**, 1948-1953 (2005).
- [39] Kašička, V.: Recent developments in CE and CEC of peptides (2009-2011). *Electrophoresis* **33**, 48-73 (2012).
- [40] Poole, S.K.; Patel, S.; Dehring, K.; Workman, H.; Poole, C. F.: Determination of acid dissociation constants by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A* **1037**, 445-454 (2004).
- [41] Koval, D.; Kašička, V.; Jiráček, J.; Collinsová, M.: Determination of pKa values of diastereomers of phosphinic pseudopeptides by CZE. *Electrophoresis* **27**, 4648-4657 (2006).
- [42] Šolínová, V.; Kašička, V.; Koval, D.; Česnek, M.; Holý, A.: Determination of acid-base dissociation constants of amino- and guanidinopurine nucleotide analogs and related compounds by capillary zone electrophoresis. *Electrophoresis* **27**, 1006-1019 (2006).
- [43] Ehala, S.; Míšek, J.; Stará, I. G.; Kašička, V.: Determination of acid-base dissociation constants of azahelicenes by capillary zone electrophoresis. *Journal of Separation Science* **31**, 2686-2693 (2008).

- [44] Zusková, I.; Novotná, A.; Včeláková, K.; Gaš, B.: Determination of limiting mobilities and dissociation constants of 21 amino acids by capillary zone electrophoresis at very low pH. *Journal of Chromatography B* **841**, 129-134 (2006).
- [45] Örnskov, E.; Linusson, A.; Folestad, S.: Determination of dissociation constants of labile drug compounds by capillary electrophoresis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **33**, 379-391 (2003).
- [46] Foulon, C.; Danel, C.; Vaccher, C.; Yous, S.; Bonte, J. P.; Goossenes, J. F.: Determination of ionization constants of N-imidazole derivatives, aromatase inhibitors, using capillary electrophoresis and influence of substituents on pKa shifts. *Journal of chromatography A* **1035**, 131-136 (2004).
- [47] Henchoz, Y.; Schappler, J.; Geiser, L.; Prat, J.; Carrupt, P. A.; Veuthey, J. L.: Rapid determination of pKa values of 20 amino acids by CZE with UV and capacitively coupled contactless conductivity detections. *Analytical Bioanalytical Chemistry* **389**, 1869-1878 (2007).
- [48] Koval, D.; Kašička, V.; Jiráček, J.; Collinsová, M.: Physicochemical characterization of phosphinic pseudopeptides by capillary zone electrophoresis in highly acidic background electrolytes. *Electrophoresis* **24**, 774-781 (2003).
- [49] Szakács, Z.; Noszál, B.: Determination of dissociation constants of folic acid, methotrexate, and other photolabile pteridines by pressure-assisted capillary electrophoresis. *Elektrophoresis* **27**, 3399-3409 (2006).
- [50] Yao, Y. J.; Khoo, K. S.; Chung, M. C. M.; Li, S. F. Y.: Determination of isoelectric points of acidic and basic proteins by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A* **680**, 431-435 (1994).
- [51] Klepárník, K.; Šlais, K.; Boček, P.: Determination of the Isoelectric Points of Low and High Molecular Mass Ampholytes by Capillary Electrophoresis. *Electrophoresis* **14**, 475-479 (1993).

- [52] Shimura, K.; Wang, Z.; Matsumoto, H.; Kasai, K.: Synthetic oligopeptides as isoelectric point markers for capillary isoelectric focusing with ultraviolet absorption detection. *Electrophoresis* **21**, 603-610 (2000).
- [53] Šlais, K.; Horká, M.; Nováčková, J.; Friedl, Z.: Fluorescein-based pI markers for capillary isoelectric focusing with laser-induced fluorescence detection. *Electrophoresis* **23**, 1682-1688 (2002).
- [54] Šlais K.; Friedl Z.: Low - molecular - mass pI markers for isoelectric focusing. *Journal of Chromatography A* **661**, 249-256 (1994).
- [55] Šlais, K.; Friedl, Z.: Ampholytic dyes for spectroscopic determination of pH in electrofocusing. *Journal of Chromatography A* **695**, 113-122 (1995).
- [56] Kašička, V.; Prusík, Z.; Sázelová, P.; Brynda, E.; Stejskal, J.: Capillary zone electrophoresis with electroosmotic flow controlled by external radial electric field. *Electrophoresis* **20**, 2484-2492 (1999).
- [57] Kašička, V.; Prusík, Z.; Mudra, P.; Štěpánek, J.: Capillary electrophoresis device with double UV detection and its application to the determination of effective mobilities of peptides. *Journal of Chromatography A* **709**, 31-38 (1995).
- [58] Koval, D.; Kasicka, V.; Cottet, H.: Analysis of glycated hemoglobin A1c by capillary electrophoresis and capillary isoelectric focusing. *Analytical Biochemistry* **413**, 8-15 (2011).