

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Fyzikální chemie



Mgr. Ludmila Müllerová

Vliv interagující složky základního elektrolytu na elektroforetickou separaci

Influence of the interacting constituent of the background electrolyte
on electrophoretic separation

Dizertační práce

Školitel: Mgr. Pavel Dubský, Ph.D.

Praha, 2015

Předkládaná dizertační práce shrnuje výsledky získané během mého doktorského studia ve Skupině elektroforetických a chromatografických separačních metod (ECHMET) na Katedře fyzikální a makromolekulární chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze.

Práce byla financována v souvislosti s řešením projektů GA UK, čísla grantů 669412 a 510214, projektu GA ČR, číslo grantu 203-08-1428, a projektu CEEPUS CIII-RO-0010-08-1314.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou 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.

V Praze,

podpis

Poděkování

školiteli Pavle,
paní profesorko Evo,
pane profesore Bobe,
všechny odborné
všichni odborníci,
Vlasto,
tati,
mami,
milý šim šim

díky,

díky,

díky,

díky,

díky,

díky,

díky,

díky,

díky,

díky,

díky,

díky,

díky

moc!

Motto

„Jak říká náš Joe, cesty Páně jsou ještě neprozkoumaný...“

Enzo Barboni (překlad Jiří Lexa), Podivné dědictví

Klíčová slova

Kapilární elektroforéza, selektor, komplexační rovnováha, systémy se dvěma selektory, systémy s více selektory, efektivní mobilita, afinitní kapilární elektroforéza

Keywords

Capillary electrophoresis, selector, complexation equilibria, dual-selector systems, multi-selector systems, effective mobility, affinity capillary electrophoresis

Abstrakt

Kapilární elektroforéza je široce používanou separační metodou analytické chemie. Pokud je do základního elektrolytu přidána interagující látka, selektor, lze tuto metodu využít i pro separace enantiomerů nebo látek s velmi podobnými fyzikálně-chemickými vlastnostmi. V analytické praxi se často využívají také směsi selektorů, jednak záměrně připravené pro dosažení lepší separace, jednak proto, že komerčně dodávané derivatizované selektory mohou být ve skutečnosti směsmi látek lišícími se stupněm derivatizace a polohou substituentů. Matematický popis elektromigrace analytu v systémech s více selektory může usnadnit hledání optimálních separačních podmínek a zároveň poskytuje užitečný vhled do mechanismu separace v těchto z aplikačního hlediska velmi významných systémech.

V rámci této práce byl představen a experimentálně ověřen model elektromigrace analytu interagujícího se směsí dvou selektorů, který vychází z obecnějšího popisu systému s libovolným počtem selektorů. Tento model ukazuje, že směs, ve které se vzájemný poměr koncentrací selektorů nemění, lze pokládat za selektor jeden. V případě záměrné kombinace dvou selektorů lze pomocí tohoto popisu předpovědět, jak se budou separační schopnosti směsi měnit se změnou zastoupení obou selektorů, a zvolit nejvhodnější složení směsi i její celkovou koncentraci.

Dále byl představen model elektromigrace, který poprvé zahrnoval vedle interakce analytu s více selektory i možnost acidobazické disociace analytu. Model ukazuje, že závislost efektivní mobility na koncentraci selektoru, odvozená pro jedinou volnou formu analytu interagující s jediným selektorem, je obecně platná pro systémy se stechiometrií komplexace 1:1. Tento model také umožňuje na vzájemně provázané komplexační a acidobazické rovnováhy nahlížet odděleně a zvolit perspektivu vhodnou pro optimalizaci daného separačního systému. Závěry vyplývající z modelu byly experimentálně ověřeny na systému slabé jednosytné kyseliny jako analytu a dvou selektorů.

Pro určení komplexačních parametrů, se kterými pracují výše zmíněné elektromigrační modely, je klíčové stanovení správné efektivní mobility analytu. Z toho důvodu byla v rámci této práce navržena metoda umožňující měření efektivní mobility v systémech, kde může nabitý selektor interagovat s markerem elektroosmotického toku a tak výsledky měření znehodnotit. Dále byl navržen způsob, kterým lze určit správný migrační čas analytů podléhajících elektromigrační disperzi bez nutnosti nelineární regrese experimentálních dat.

Abstract

Capillary electrophoresis is a widely used separation method of analytical chemistry. Addition of a selector into the background electrolyte extends its applicability to separation of enantiomers or of compounds of similar physicochemical properties. In analytical practice, mixtures of selectors are also commonly used – either prepared intentionally to achieve better separation or because commercially available selectors may be mixtures of compounds differing in the degree of substitution and substituent positions. Mathematical description of these systems, which are highly relevant in analytical practice, can simplify search for optimal separation conditions. Also, it provides a useful insight into the separation mechanism.

In this work, a model of electromigration of an analyte interacting with a mixture of two selectors is proposed and experimentally verified. This model results from a more general description of systems with an arbitrary number of selectors. The model shows that a selector mixture can be treated as a single selector if the ratio of the respective selector concentrations is kept constant. When the mixture is prepared intentionally, this description predicts, how separation potential of the mixture changes with its composition. Thus it allows the optimal composition and total concentration of the selector mixture to be chosen.

Consequently, a generalized model of electromigration was proposed that for the first time considers analyte undergoing acid-base equilibria along with complexation with multiple selectors. The generalized model shows that the dependency of the effective mobility on the selector concentration, which was originally developed for the case of a single free form of an analyte interacting with a single selector, is generally applicable for systems with 1:1 complexation stoichiometry. The model also enables decoupling of the highly interconnected complexation and acid-base dissociation equilibria. Therefore, the most suitable perspective can be chosen for the particular system optimization. Assumptions resulting from the generalized model were experimentally verified on a system of a weak monoprotic acid as an analyte and two selectors.

Determination of complexation parameters serving as input for the above mentioned models requires measurement of correct effective mobilities of analytes. Therefore, this work proposes a method enabling measurement of unbiased effective mobilities in system in which a charged selector may interact with a neutral marker of the electroosmotic flow. A procedure is also proposed for determination of correct migration time of analyte peaks deformed by the electromigration dispersion without the need of nonlinear regression.

Obsah

Seznam použitých zkratk a symbolů	10
1 Úvod	15
1.1 Popis elektromigrace v komplexujících systémech	15
1.2 Stanovení správné efektivní mobility	25
Publikace I: <i>Twenty years of development of dual and multi-selector models in capillary electrophoresis: A review</i>	29
2 Cíle dizertační práce	43
3 Experimentální podmínky	44
4 Výsledky a diskuze	45
4.1 Použití M-souhrnného modelu pro definované směsi dvou selektorů	45
Publikace II: <i>Separation efficiency of dual-selector systems in capillary electrophoresis</i>	50
4.2 Generalizovaný model elektromigrace v interagujících systémech (M _A M _S model)	58
Publikace III: <i>Generalized model of electromigration with 1:1 (analyte : selector) complexation stoichiometry: Part I. Theory</i>	66
Publikace IV: <i>Generalized model of electromigration with 1:1 (analyte : selector) complexation stoichiometry: Part II. Application to dual systems and experimental verification</i>	72
4.3 Efektivní mobilita EOF markerů v BGE obsahujícím sulfatovaný β-CD stanovená dvoudetektorovou metodou	81
Publikace V: <i>Determination of effective mobilities of EOF markers in BGE containing sulfated β-cyclodextrin by a two-detector method</i>	83

4.4 Určení parametrů HVL funkce z geometrických charakteristik píku	93
Publikace VI: <i>Determination of the correct migration time and other parameters of the Haarhoff–van der Linde function from the peak geometry characteristics</i>	95
5 Závěr	103
Literatura	105
Přílohy	109
A. Seznam publikací	109
B. Seznam konferenčních příspěvků	110

Seznam použitých zkratk a symbolů

A- β -CD	6-monodeoxy-6-monoamino- β -cyclodextrin
ACE	afinitní kapilární elektroforéza (<i>affinity capillary electrophoresis</i>)
BGE	základní elektrolyt (<i>background electrolyte</i>)
β -CD	nativní β -cyclodextrin
CD	cyclodextrin
CE	kapilární elektroforéza (<i>capillary electrophoresis</i>)
DM- β -CD	heptakis(2,6-di-O-methyl)- β -cyclodextrin
EMD	elektromigrační disperze
EMO	elektromigračního pořadí analytů (<i>electromigration order</i>)
EOF	elektroosmotický tok (<i>electroosmotic flow</i>)
HVL	Haarhoffovou – van der Lindeho (funkce)
Malt- β -CD	6-O- α -maltosyl- β -cyclodextrin
M _{AMs}	(systém, model) s více volnými formami analytu a více selektory (<i>multi-free-analyte-form multi-selector</i>)
M _{ASs}	(systém, model) s více volnými formami analytu a jedním selektorem (<i>multi-free-analyte-form single-selector</i>)
S _{AMs}	(systém, model) s jednou volnou formou analytu a více selektory (<i>single-free-analyte-form multi-selector</i>)
S _{ASs}	(systém, model) s jednou volnou formou analytu a jedním selektorem (<i>single-free-analyte-form single-selector</i>)
S- β -CD	nedefinovaně sulfatovaný β -cyclodextrin
a_0	parametr HVL funkce odpovídající ploše píku
a_1	parametr HVL funkce odpovídající poloze píku

a_2	parametr HVL funkce odpovídající symetrickému rozšíření píku
a_3	parametr HVL funkce odpovídající asymetrické deformaci píku
α	frakce maximální výšky píku
c_S	analytická koncentrace selektoru
c_{Sj}	analytická koncentrace j -tého selektoru
c_{tot}	celková koncentrace selektorů v systému (součet analytických koncentrací všech přítomných selektorů)
c_{tot}^{Tr}	celková koncentrace selektoru, při které dochází k záměně elektromigračního pořadí analytů
$\Delta\mu_{AB,eff}$	rozdíl efektivních mobilit separovaných enantiomerů A a B
$\Delta\mu_{AB,eff,j}$	rozdíl efektivních mobilit separovaných enantiomerů způsobený interakcí s j -tým selektorem
$f_q^{-1}(q)$	závislost parametru a_3 příslušné HVL funkce na asymetrii píku
$HVL(t)$	funkční hodnota HVL funkce v čase t
χ_{Ai}	molární zlomek i -té volné formy analytu vzhledem k celkovému množství volného analytu
χ_{Sj}	molární zlomek j -tého selektoru ve směsi selektorů
i	číslovací index pro volné formy analytu
j	číslovací index pro selektory
$K'_{a,HA}$	koncentračně definovaná acidobazická disociační konstanta analytu
$K'_{a,HAS}$	koncentračně definovaná acidobazická disociační konstanta komplexu analytu se selektorem
$K'_{a,HASj}$	koncentračně definovaná acidobazická disociační konstanta komplexu analytu s j -tým selektorem
K'_{AiSj}	koncentračně definovaná komplexační konstanta interakce i -té volné formy analytu s j -tým selektorem
K'_{AiS}^M	M-souhrnná komplexační konstanta interakce i -té volné formy analytu se směsí selektorů

K'_{AS}	koncentračně definovaná komplexační konstanta interakce analytu se selektorem
K'_{A-S}	koncentračně definovaná komplexační konstanta interakce disociované formy analytu se selektorem
K'_{ASj}	koncentračně definovaná komplexační konstanta interakce analytu s j -tým selektorem
K'_{A-Sj}	koncentračně definovaná komplexační konstanta interakce disociované formy analytu s j -tým selektorem
K'^{pH}_{ASj}	pH-souhrnná komplexační konstanta interakce analytu přítomného ve více volných formách s j -tým selektorem
K'^M_{AS}	souhrnná komplexační konstanta interakce analytu se směsí selektorů (M-souhrnná komplexační konstanta)
K'^M_{A-S}	M-souhrnná komplexační konstanta interakce disociované formy analytu se směsí selektorů
K'^{MAMS}_{AS}	souhrnná komplexační konstanta interakce analytu přítomného v libovolném počtu volných forem se směsí selektorů ($M_A M_S$ -souhrnná komplexační konstanta)
K'^{pH}_{AS}	komplexační konstanta interakce analytu přítomného ve více volných formách se selektorem (pH-souhrnná komplexační konstanta)
K'_α	převodní parametr mezi asymetrií píku a šířkou píku v α -frakci jeho maximální výšky a parametrem a_1 příslušné HVL funkce
K'_{BSj}	koncentračně definovaná komplexační konstanta interakce analytu B s j -tým selektorem
K'_{HAS}	koncentračně definovaná komplexační konstanta interakce protonované formy analytu se selektorem
K'_{HASj}	koncentračně definovaná komplexační konstanta interakce protonované formy analytu s j -tým selektorem
K'^M_{HAS}	M-souhrnná komplexační konstanta interakce protonované formy analytu se směsí selektorů
K'^M_S	souhrnná komplexační konstanta interakce analytu A nebo B se směsí selektorů (M-souhrnná komplexační konstanta)
L	počet volných forem analytu v systému

L_α	převodní parametr mezi asymetrií píku a šířkou píku v α -frakci jeho maximální výšky a parametrem α_2 příslušné HVL funkce
μ_A	mobilita volné formy analytu
μ_{A^-}	mobilita volné disociované formy analytu
$\mu_{A,eff}$	efektivní mobilita analytu A
μ_{Ai}	mobilita i -té volné formy analytu
μ_A^{MAMS}	souhrnná mobilita volného analytu přítomného v libovolném počtu volných forem ($MAMS$ -souhrnná mobilita volného analytu)
μ_{AiSj}	mobilita komplexu i -té volné formy analytu s j -tým selektorem
μ_{AiS}^M	M-souhrnná mobilita komplexu i -té volné formy analytu se směsí selektorů
μ_A^{pH}	mobilita volného analytu při daném pH (pH-souhrnná mobilita volného analytu)
μ_{AS}	mobilita komplexu analytu se selektorem
μ_{A^-S}	mobilita komplexu disociované formy analytu se selektorem
μ_{ASj}	mobilita komplexu analytu s j -tým selektorem
μ_{ASj}^{pH}	pH-souhrnná mobilita komplexu analytu přítomného ve více volných formách s j -tým selektorem
μ_{AS}^M	souhrnná mobilita komplexu analytu se směsí selektorů (M-souhrnná mobilita komplexu)
μ_{AS}^{MAMS}	souhrnná mobilita komplexu analytu přítomného v libovolném počtu volných forem se směsí selektorů ($MAMS$ -souhrnná mobilita komplexu)
μ_{AS}^{pH}	souhrnná mobilita komplexu analytu přítomného ve více volných formách se selektorem (pH-souhrnná mobilita komplexu)
μ_B	mobilita volné formy analytu B
$\mu_{B,eff}$	efektivní mobilita analytu B
μ_{BS1}	mobilita komplexu analytu B s prvním selektorem
μ_{BS2}	mobilita komplexu analytu B se druhým selektorem
μ_f	mobilita volné formy chirálního analytu stejná pro oba enantiomery

μ_{HA}	mobilita volné protonované formy analytu
μ_{HAS}	mobilita komplexu protonované formy analytu se selektorem
$\mu_{S,j}$	mobilita komplexu chirálního analytu a j -tým selektorem stejná pro oba enantiomery
μ_S^M	souhrnná mobilita komplexu analytu A nebo B se směsí selektorů (M-souhrnná mobilita komplexu)
N	počet selektorů v systému
q	asymetrie píku
r	koeficient vyjadřující míru, s jakou první selektor přispívá k rozdílu mobilit enantiomerů v systému se dvěma selektory
s	koeficient vyjadřující míru, s jakou druhý selektor přispívá k rozdílu mobilit enantiomerů v systému se dvěma selektory
t	čas
t_M	čas odpovídající maximu píku
T_{USP}	faktor chvostování píku podle Amerického lékopisu (<i>U. S. Pharmacopeia tailing factor</i>)
$w_{0,05}$	šířka píku v 5 % jeho maximální výšky
$w_{0,5}$	šířka píku v polovině jeho maximální výšky
w_α	šířka píku v α -frakci jeho maximální výšky
w_β	šířka píku v β -frakci jeho maximální výšky
$w_{L0,05}$	levá pološířka píku v 5 % jeho maximální výšky
$w_{L\alpha}$	levá pološířka píku v α -frakci jeho maximální výšky
$w_{P\alpha}$	pravá pološířka píku v α -frakci jeho maximální výšky

1 Úvod

Kapilární elektroforéza (CE) je široce používanou separační metodou analytické chemie. Přídavek interagující látky (selektoru) do základního elektrolytu rozšiřuje pole využitelnosti CE například o separace neutrálních analytů, separace látek s velmi podobnými fyzikálně-chemickými vlastnostmi, a zejména o enantioselektivní separace. Velkou výhodou CE je možnost snadno měnit použitý selektor a jeho koncentraci. V analytické praxi se využívá široká škála chirálních selektorů: crown-ethery, makrocyclická antibiotika, proteiny, chirální micely, cyklofruktany a další [1, 2]. Nejčastěji používanými chirálními selektory v CE jsou cykloextriny (CD) [1-7], cyklické oligosacharidy skládající se nejběžněji ze šesti (α -cykloextrin), sedmi (β -cykloextrin) nebo osmi (γ -cykloextrin) glukopyranozových jednotek.

Současně s využíváním selektorů v CE se rozvíjel také matematický popis takových systémů. Důvodem k sestavování matematických modelů elektromigrace byla a je možnost předpovědět výsledek separace na základě fyzikálně-chemických parametrů systému, což může významně usnadnit hledání optimálních podmínek pro konkrétní separaci. Stejně důležité ale je, že modely umožňují lépe pochopit mechanismy, které k separaci vedou.

1.1 Popis elektromigrace v komplexujících systémech

Systemy s jednou formou volného analytu a jedním selektorem ($S_A S_S$ systémy)

Pravděpodobně první matematický popis elektromigrace v komplexujícím systému byl představen už v roce 1969 [8, 9]. Nicméně jako nejstarší vztah popisující efektivní mobilitu* analytu podléhajícího komplexaci se selektorem, se většinou uvádí model publikovaný Wrenem a Rowem roku 1992 [10].

Pokud se analyt vyskytuje ve více formách, mezi kterými se ustavuje rychlá rovnováha (ve srovnání s elektroforetickou migrací), lze efektivní mobilitu tohoto analytu obecně

* Přesnějším výrazem by byla „elektroforetická mobilita“, protože termín „mobilita“ má obecnější význam. Jelikož se však tato dizertační práce zabývá pouze elektroforézou a nehrozí zmatení pojmů, bude přívlastek „elektroforetická“ vynecháván.

vyjádřit jako vážený průměr mobilit jeho jednotlivých forem, přičemž vahou je molární zlomek příslušné formy analytu vzhledem k jeho celkové (analytické) koncentraci. V případě popsaném v modelu Wrena a Rowa je jedinou takovou rovnováhou interakce analytu A se selektorem S charakterizovaná komplexační konstantou K'_{AS} :



Konstanta K'_{AS} je definována pomocí rovnovážných koncentrací (nejedná se o termodynamickou konstantu, která by byla definována pomocí aktivit; K'_{AS} závisí nejen na teplotě, ale i na iontové síle). Analyt je tedy přítomen ve dvou formách: volné nekomplexované formě A s mobilitou μ_A a ve formě komplexu AS s mobilitou μ_{AS} a jeho efektivní mobilitu $\mu_{A,eff}$ lze vyjádřit vztahem:

$$\mu_{A,eff} = \frac{\mu_A + \mu_{AS}K'_{AS}[S]}{1 + K'_{AS}[S]} \quad (2)$$

Pro praktické užití je třeba zavést aproximaci, že rovnovážná koncentrace volného selektoru [S] je rovna analytické koncentraci selektoru c_S (zanedbá se úbytek volného selektoru způsobený interakcí s analytem):

$$[S] = c_S \quad (3)$$

Dosažením podmínky (3) do rovnice (2) získáme závislost efektivní mobility analytu na koncentraci selektoru v základním elektrolytu (BGE, *background electrolyte*) publikovanou Wrenem a Rowem [10]:

$$\mu_{A,eff} = \frac{\mu_A + \mu_{AS}K'_{AS}c_S}{1 + K'_{AS}c_S} \quad (4)$$

Vztah (4) je platný pouze za následujících podmínek:

- (i) Teplota je konstantní, což je obecně „kategorickým imperativem“ ve fyzikální chemii. S teplotou se mění jak rovnovážné konstanty, tak mobility všech částic v roztoku. Instrumentace pro CE umožňuje termostatovat většinu délky kapiláry, a proto lze tento požadavek zpravidla pokládat za splněný.
- (ii) Iontová síla je konstantní. Komplexační konstanta K'_{AS} je definovaná pomocí koncentrací a je tedy platná pouze pro danou hodnotu iontové síly BGE. Mobility μ_A a μ_{AS} jsou rovněž závislé na iontové síle a za konstantní parametry v rovnici (4) je lze pokládat pouze pokud se při změně koncentrace selektoru iontová síla zachová konstantní. Tato podmínka je splněna v případě neutrálních selektorů, pokud nedochází k jejich významné interakci s některou složkou základního elektrolytu [11]. V případě nabitých selektorů je nutné zvýšení koncentrace selektoru kompenzovat snížením koncentrace složek základního elektrolytu [12, 13] nebo zavést do rovnice (4) příslušnou korekci [12].
- (iii) Je možné zavést aproximaci (3) – úbytek volného selektoru způsobený komplexací s analytem je zanedbatelný. Tato podmínka je vždy splněna na okraji píku analytu. V případě, že uvnitř zóny analytu dochází v důsledku komplexace k významnému úbytku selektoru, není důsledkem posun píku jako celku, ale jeho deformace do trojúhelníkového tvaru [14, 15]. Proložení takového píku Haarhoff – van der Lindeho (HVL) funkcí [16, 17] poskytuje migrační čas odpovídající nekonečnému zředění analytu [18], při kterém je podmínka (3) automaticky splněna (viz též kapitolu 1.2).
- (iv) Viskozita BGE je konstantní. Při vysokých koncentracích selektoru je mobilita analytu ovlivněna nejen komplexací, ale i změnou viskozity BGE. V literatuře je však popsáno několik způsobů, jak při matematickém zpracování tento efekt korigovat [12, 19, 20].
- (v) Dochází pouze ke komplexaci o stechiometrii 1:1 (analyt : selektor). Tato stechiometrie samozřejmě není jediná možná, nicméně je všeobecně pokládána za nejrelevantnější, zejména pokud jde o interakci s cyklodextriny [21, 22].

Všechny matematické popisy elektromigrace v komplexujících systémech, o kterých bude tato dizertační práce dále pojednávat, vycházejí z modelu (4) a výše zmíněné podmínky platnosti se tím pádem vztahují i na ně.

Na základě rovnice (4) byla odvozena řada dalších modelů popisujících S_{AS} (*single-free-analyte-form single-selector*) systémy [19, 23-27]. Jejich cílem bylo pomocí efektivních

mobilit separovaných analytů vyjádřit parametry kvantifikující úspěšnost separace: rozdíl efektivních mobilit [10, 19], relativní rozdíl mobilit (rozdíl mobilit dělený jejich průměrem) [28], selektivitu (poměr mobilit) [28], rozlišení [23, 24] nebo počet teoretických pater [27]. Některé z modelů zavádějí další aproximaci, a sice že při chirální separaci je mobilita vzniklého komplexu μ_{AS} stejná pro oba enantiomery [10, 19, 23, 24]. Tento předpoklad lze pokládat za oprávněný v případě interakce s jediným definovaným selektorem, jelikož oba takové komplexy mají stejný náboj a podobnou strukturu. Přestože velká část S_{AS}S modelů se zaměřovala na chirální separace, vztah (4) lze samozřejmě použít i pro optimalizaci nechirálních separací, při kterých se využívá komplexace se selektorem [26, 29].

Popis systémů s více formami volného analytu a jedním selektorem

(M_{AS}S systémy)

Nevýhodou modelu (4) (a S_{AS}S modelů na něj navazujících) bylo, že braly v úvahu pouze jednu formu volného analytu. Látkami separovanými kapilární elektroforézou jsou ale často slabé kyseliny, báze nebo amfolyty podléhající elektrolytické disociaci. Obě přítomné formy (například disociovaná a protonovaná u slabé kyseliny) pak mohou interagovat se selektorem s různými komplexačními konstantami za vzniku komplexů o různých mobilitách. Tím pádem pH základního elektrolytu, kterým je řízen stupeň disociace analytu, může mít velký vliv na výsledek separace.

Popisem M_{AS}S (*multi-free-analyte-form single-selector*) systémů se dlouhodobě zabývala skupina profesora Vigha [30-33]. Pro efektivní mobilitu slabé jednosytné kyseliny [30] byl odvozen následující vztah:

$$\mu_{A,eff} = \frac{\mu_{A^-} + K'_{A-S}\mu_{A-S}c_S + \frac{[H_3O^+]}{K'_{a,HA}}(\mu_{HA} + K'_{HAS}\mu_{HAS}c_S)}{1 + K'_{A-S}\mu_{A-S}c_S + \frac{[H_3O^+]}{K'_{a,HA}}(1 + K'_{HAS}c_S)} \quad (5)$$

kde μ_{A^-} , μ_{A-S} a K'_{A-S} jsou mobilita volného disociovaného analytu, mobilita jeho komplexu se selektorem a příslušná komplexační konstanta; μ_{HA} , μ_{HAS} a K'_{HAS} jsou mobilita volného protonovaného analytu, mobilita jeho komplexu se selektorem a příslušná komplexační

konstanta, $[H_3O^+]$ je koncentrace oxoniového kationtu v BGE a $K'_{a,HA}$ je disociační konstanta analytu definovaná pomocí koncentrací:

$$K'_{a,HA} = \frac{[H_3O^+][A^-]}{[HA]} \quad (6)$$

Obdobný vztah byl odvozen i pro slabé jednosytné báze [31]. Modely popisující M_ASs systémy byly publikovány i dalšími skupinami [34-38].

Lelièvre *et al.* [34] ukázali, že při konstantním pH lze závislost efektivní mobility slabé jednosytné kyseliny na koncentraci selektoru popsat funkcí formálně shodnou se vztahem (4):

$$\mu_{A,eff} = \frac{\mu_A^{pH} + \mu_{AS}^{pH} K'_{AS}{}^{pH} c_S}{1 + K'_{AS}{}^{pH} c_S} \quad (7)$$

kde μ_A^{pH} , μ_{AS}^{pH} a $K'_{AS}{}^{pH}$ jsou mobilita volného analytu, mobilita komplexu a komplexační konstanta při daném pH:

$$\mu_A^{pH} = \frac{K'_{a,HA} \mu_{A^-} + [H_3O^+] \mu_{HA}}{K'_{a,HA} + [H_3O^+]} \quad (8)$$

$$\mu_{AS}^{pH} = \frac{K'_{a,HAS} \mu_{A^-S} + [H_3O^+]}{K'_{a,HAS} + [H_3O^+]} \quad (9)$$

$$K'_{AS}{}^{pH} = K'_{HAS} \frac{K'_{a,HAS} + [H_3O^+]}{K'_{a,HA} + [H_3O^+]} \quad (10)$$

$K'_{a,HAS}$ je (koncentračně definovaná) acidobazická disociační konstanta komplexu analytu se selektorem. Její hodnota je jednoznačně dána disociační konstantou analytu $K'_{a,HA}$ a komplexačními konstantami jeho disociované a nedisociované formy K'_{A^-S} a K'_{HAS} :

$$K'_{a,HAS} = K'_{a,HA} \frac{K'_{A^-S}}{K'_{HAS}} \quad (11)$$

Parametry μ_A^{pH} , μ_{AS}^{pH} a $K'_{AS}{}^{pH}$ byly později [37] vyjádřeny i pro dvojsytnou kyselinu. Tyto parametry jsou závislé na hodnotě pH (a iontové síle) BGE. Lelièvreův model (dále bude označován jako pH-souhrnný model) tedy umožňuje optimalizovat koncentraci selektoru v BGE, ale nikoli pH, které musí zůstat konstantní. Na druhou stranu model teoreticky potvrzuje, že optimalizační postupy vyvinuté pro SASs systémy lze použít i v případě MASs systémů, pokud se pH BGE nemění.

V případě chirálních separací je důležitou výjimkou z předešlého tvrzení předpoklad stejné mobility pro komplexy obou enantiomerů se selektorem: Jak je zjevné z rovnic (9) a (11), parametr μ_{AS}^{pH} nezávisí jen na mobilitách komplexů fyzicky přítomných v roztoku (o nichž lze předpokládat, že se příliš neliší pro oba enantiomery v daném disociovaném respektive protonovaném stavu), ale závisí i na hodnotách komplexačních konstant (o nichž lze naopak předpokládat, že se pro oba enantiomery liší – protože jinak by při stejné mobilitě komplexů interakce se selektorem nevedla k separaci). To odpovídá experimentálním výsledkům Moffadela *et al.* [37], kteří při popisu chirální separace pomocí pH-souhrnného modelu pozorovali, že pH-souhrnné mobility komplexů se pro dvojici enantiomerů lišily.

Systémy s jednou formou volného analytu a více selektory

(SAMs systémy)

V analytické praxi se často používají směsi selektorů. Je to jednak proto, že komerčně vyráběné derivatizované cyklodextriny jsou ve skutečnosti mnohdy směsí selektorů lišících se jak stupněm substituce, tak polohou substituentů [39-41]. Někdy jsou ale směsi selektorů připravovány záměrně za účelem dosažení lepší separace [2, 5, 7, 42, 43]. Publikované teoretické popisy SAMs (*single-free-analyte-form multi-selector*) systémů v CE byly shrnuty v přehledovém článku, který je zařazen na konci této kapitoly (*Publikace I*).

První matematický model elektromigrace analytu v BGE se dvěma selektory byl publikován v roce 1994 [44] a byl přirozeným rozšířením modelu (4) o interakci s dalším selektorem:

$$\mu_{A,eff} = \frac{\mu_A + \mu_{AS1}K'_{AS1}c_{S1} + \mu_{AS2}K'_{AS2}c_{S2}}{1 + K'_{AS1}c_{S1} + K'_{AS2}c_{S2}} \quad (12)$$

kde c_{S1} a c_{S2} jsou koncentrace prvního a druhého selektoru, K'_{AS1} a K'_{AS2} jsou komplexační konstanty analytu s prvním a druhým selektorem a μ_{AS1} a μ_{AS2} jsou mobility komplexů analytu s prvním a druhým selektorem.

V následujících dvaceti letech byla publikována řada prací zabývajících se teoretickým popisem SAM_S systémů (jsou podrobně rozebrány v *Publikaci I*). Velká část z nich vycházela z modelu (12) [44-51]. Tyto modely obsahují dvě nezávislé proměnné – koncentrace dvou selektorů v BGE. Hledání optimálních podmínek je tím pádem náročnější ve srovnání s SAS_S modely. Například pro grafické znázornění závislosti optimalizovaného parametru (relativní rozdíl mobilit [47], selektivita [47], rozlišení [45]) je nutné vykreslit třídímní graf, případně studovat závislost toliko na koncentraci jednoho selektoru při konstantní koncentraci selektoru druhého [45-48]. Proto autoři často využívali matematický popis SAM_S systémů pouze ke kvalitativnímu vysvětlení pozorovaných experimentálních výsledků, jako například záměny migračního pořadí analytů [44, 46, 52-54]. Mezi pětadesáti pracemi, ve kterých byl k separaci použit BGE obsahující dva cyklodextriny, jenom ve třech byly optimální koncentrace selektorů vybrány na základě výpočtů a pomocí elektromigračního modelu [45, 49, 50].

Alternativním přístupem používaným pro chirální separace pomocí dvou selektorů je vyjádřit rozdíl efektivních mobilit separovaných enantiomerů A a B, $\Delta\mu_{AB,eff}$, jako vážený průměr rozdílů efektivních mobilit generovaných interakcí s jedním a s druhým selektorem, $\Delta\mu_{AB,eff,1}$ a $\Delta\mu_{AB,eff,2}$ [50, 54, 55]:

$$\Delta\mu_{AB,eff} = r \cdot \Delta\mu_{AB,eff,1} + s \cdot \Delta\mu_{AB,eff,2} \quad (13)$$

Rozdíl mobilit generovaný j -tým selektorem, $\Delta\mu_{AB,eff,j}$, je odvozen z rovnice (4) se zavedením předpokladu, že mobilita komplexu je stejná pro oba enantiomery:

$$\Delta\mu_{AB,eff,j} = \frac{(\mu_{S,j} - \mu_f)(K'_{BSj} - K'_{ASj})c_{Sj}}{1 + (K'_{BSj} + K'_{ASj})c_{Sj} + K'_{BSj}K'_{ASj}c_{Sj}^2} \quad (14)$$

kde $\mu_f = \mu_A = \mu_B$ je mobilita volného analytu (stejná pro oba enantiomery), $\mu_{S,j} = \mu_{ASj} = \mu_{BSj}$ je mobilita komplexu analytu se sektorem, K'_{ASj} a K'_{BSj} jsou komplexační konstanty prvního a druhého enantiomeru se selektorem a c_{Sj} je koncentrace selektoru. Koeficienty r a s v rovnici (13) nejsou přesně specifikovány, ale při používání tohoto modelu se obecně předpokládá, že se jedná o kladná čísla závislá na parametrech komplexace a koncentracích obou selektorů. Vztah (13) tedy není možné použít pro výpočet optimálních koncentrací obou selektorů. Je ale v praxi hojně využíván ke kvalitativnímu posouzení, jaké selektory je vhodné zkombinovat, aby přidání obou selektorů do BGE přineslo lepší separaci ve srovnání se situací, kdy je přidán pouze jeden z nich [56-59]. Za předpokladu, že r a s jsou kladná čísla, musí být členy $\Delta\mu_{AB,eff,1}$ a $\Delta\mu_{AB,eff,2}$ buďto oba kladné, nebo oba záporné, aby kombinace selektorů separaci nezhoršovala. Z toho vyplývá, že pokud mají selektory opačný vliv na mobilitu enantiomerů (*mobility effect*) – komplexace s jedním selektorem pohyb enantiomerů zrychluje, komplexace se druhým zpomaluje, pak musí mít i opačný rozpoznávací vzorec (*recognition pattern*) – enantiomer, který interaguje silněji s jedním selektorem, interaguje se druhým slaběji. Naopak, pokud mají oba selektory souhlasný vliv na mobilitu enantiomerů – komplexace s oběma selektory pohyb enantiomerů buďto zrychluje, nebo zpomaluje, musí mít také souhlasný rozpoznávací vzorec – oba selektory komplexují silněji se stejným enantiomerem. Nicméně v pozdějších publikacích [43, 50] došli autoři modelu k závěru, že ve druhém z výše uvedených případů nebude sice smísení selektorů separaci výrazně zhoršovat, ale ani ji nezlepší a je výhodnější použít pouze jeden (ten „selektivnější“) z obou selektorů.

Nicméně, jak je uvedeno v *Publikaci I*, ve skutečnosti mohou parametry r a s v rovnici (13) nabývat jak kladných, tak záporných hodnot a výše zmíněné závěry tedy nejsou obecně platné. To je názorně demonstrováno na hypotetickém (nicméně reálně možném) systému chirálního analytu a dvou selektorů: V tomto případě mají oba selektory souhlasný vliv na mobilitu (interakce s oběma pohyb enantiomerů zpomaluje) a opačný rozpoznávací vzorec – podle výše uvedených pravidel odvozených z rovnice (13) by smísení takových dvou selektorů mělo separaci pouze zhoršovat. Bylo ale ukázáno (*Publikace I*, Figure 2), že směs těchto dvou selektorů může generovat větší rozdíl efektivních mobilit enantiomerů i větší selektivitu (poměr efektivních mobilit) ve srovnání s optimální koncentrací jednoho nebo druhého selektoru použitého samostatně.

Rozšířením modelu (4) (respektive (12)) získali Peng *et al.* [60] vztah popisující efektivní mobilitu analytu v SAMs systému s libovolným počtem selektorů, N , (každý tvoří s analytem komplex o stechiometrii 1 : 1):

$$\mu_{A,eff} = \frac{\mu_A + \mu_{AS1}K'_{AS1}c_{S1} + \mu_{AS2}K'_{AS2}c_{S2} + \dots + \mu_{ASN}K'_{ASN}c_{SN}}{1 + K'_{AS1}c_{S1} + K'_{AS2}c_{S2} + \dots + K'_{ASN}c_{SN}} \quad (15)$$

Zjevnou nevýhodou modelu (15) je jeho N -dimenzionalita, která by značně komplikovala jeho použití k optimalizaci separace v praxi. Karanack *et al.* [61] později ukázali, jak lze tento model výrazně zjednodušit. Koncentraci každého ze selektorů v systému lze vyjádřit jako:

$$c_{Sj} = \chi_{Sj}c_{tot} \quad (16)$$

kde χ_{Sj} je molární zlomek j -tého selektoru ve směsi a c_{tot} je celková koncentrace selektorů (součet koncentrací všech přítomných selektorů). Dosazením z rovnice (16) do rovnice (15) a následnou úpravou vznikne vztah:

$$\mu_{A,eff} = \frac{\mu_A + (\mu_{AS1}K'_{AS1}\chi_{S1} + \mu_{AS2}K'_{AS2}\chi_{S2} + \dots + \mu_{ASN}K'_{ASN}\chi_{SN})c_{tot}}{1 + (K'_{AS1}\chi_{S1} + K'_{AS2}\chi_{S2} + \dots + K'_{ASN}\chi_{SN})c_{tot}} \quad (17)$$

V případě, že složení směsi (vzájemný poměr koncentrací selektorů vyjádřený molárními zlomky χ_{Sj}) je konstantní, pak zavedením následující substituce:

$$K_{AS}^M = K'_{AS1}\chi_{S1} + K'_{AS2}\chi_{S2} + \dots + K'_{ASN}\chi_{SN} = \sum_{j=1}^N K'_{ASj}\chi_{Sj} \quad (18)$$

$$\mu_{AS}^M = \frac{\mu_{AS1}K'_{AS1}\chi_{S1} + \mu_{AS2}K'_{AS2}\chi_{S2} + \dots + \mu_{ASN}K'_{ASN}\chi_{SN}}{K'_{AS1}\chi_{S1} + K'_{AS2}\chi_{S2} + \dots + K'_{ASN}\chi_{SN}} = \frac{\sum_{j=1}^N \mu_{ASj}K'_{ASj}\chi_{Sj}}{K_{AS}^M} \quad (19)$$

lze získat výsledný výraz pro efektivní mobilitu analytu interagujícího se směsí selektorů:

$$\mu_{A,eff} = \frac{\mu_A + \mu_{AS}^M K_{AS}^M c_{tot}}{1 + K_{AS}^M c_{tot}} \quad (20)$$

Rovnice (20) je formálně shodná s výrazem (4) popisujícím systém, kde analyt interaguje pouze s jedním selektorem. Pokud je složení směsi selektorů konstantní, lze na směs selektorů pohlížet jako na selektor jediný, jehož interakce s analytem je charakterizována M-souhrnnou (*M-overall*) komplexační konstantou K'_{AS}^M a M-souhrnnou mobilitou komplexu μ_{AS}^M . Tyto parametry lze pro danou směs změřit experimentálně metodou afinitní kapilární elektroforézy (ACE, *affinity capillary electrophoresis*) [20, 62] a následně je použit k hledání optimální celkové koncentrace selektoru – a to bez ohledu na fakt, že konkrétní složení směsi (χ_{Sj}) a komplexační parametry pro její jednotlivé složky nejsou známy.

Karanack *et al.* ve své práci [61] používali k separaci směs dvou derivatizovaných cyklodextrinů, z nichž každý byl ve skutečnosti sám směsí selektorů lišících se stupněm substituce a polohou substituentů. Modelem (18) – (20) demonstrovali, že pro popis takového systému může být použit vztah (12) (odvozený původně pro směs dvou „čistých“ selektorů) a dále se souhrnným modelem (18) – (20) nepracovali. Pravděpodobně z toho důvodu model zapadl, dokud nebyl nezávisle znovu odvozen a publikován naší skupinou [63, 64].

Z modelu (18) – (20) (dále bude označován jako M-souhrnný model) vyplývá, že optimalizační strategie odvozené pro S_{AS} systémy lze použít pro optimalizaci celkové koncentrace směsi selektorů v S_{AM} systémech – ovšem opět s toutéž důležitou výjimkou jako v případě pH-souhrnného popisu (7) – (10): V případě chirálních separací nelze *a priori* předpokládat, že M-souhrnná mobilita komplexu μ_{AS}^M bude stejná pro oba enantiomery. Tento parametr nelze chápat jako mobilitu nějaké částice fyzicky přítomné v roztoku, ale jednoduše jako parametr μ_{AS}^M závislosti (20), tedy mobilitu, ke které se limitně blíží efektivní mobilita analytu se vzrůstající celkovou koncentrací směsi selektorů. Z rovnice (19) vyplývá, že hodnota tohoto parametru závisí jak na mobilitách jednotlivých komplexů μ_{ASj} , tak na komplexačních konstantách a složení směsi. I pokud budou pro každý jednotlivý selektor j mobility komplexu stejné pro oba enantiomery, ale ty budou různé pro různé selektory, pak se budou výsledné μ_{AS}^M u obou enantiomerů lišit (pokud se alespoň pro jeden selektor budou lišit komplexační konstanty obou enantiomerů). Tímto mechanismem je možné vysvětlit velkou separační schopnost nedefinovaně sulfatovaných cyklodextrinů [64], která je velmi významná v analytické praxi.

M-souhrnný model poskytl užitečný vhled do mechanismu separace se směsmi selektorů, jako jsou komerčně dodávané derivatizované cyklodextriny, u kterých uživatel

nezná přesné složení směsi. Využití tohoto přístupu také pro popis záměrně připravovaných směsí dvou selektorů, stejně jako experimentální ověření, je ukázáno v *Publikaci II*.

Na rozdíl od systémů s jedním selektorem, pro které existují M_{AS}s modely zmiňované výše, publikované modely elektromigrace v systémech s více selektory dosud nezahrnovaly možnou acidobazickou disociaci analytu. Takové rozšíření modelu (18) - (20) na M_{AM}s (*multi-free-analyte-form multi-selector*) systémy, kde více volných forem analytu interaguje s více selektory je představeno v *Publikacích III a IV*.

1.2 Stanovení správné efektivní mobility

Všechny elektromigrační modely rozebírané v předešlé kapitole pracují s parametry komplexace – komplexačními konstantami a mobilitami komplexu. Ty je nutné stanovit experimentálně, zpravidla proložením závislosti efektivních mobilit daného analytu na koncentraci selektoru vhodnou funkcí (ACE metoda [20, 62]). Určení správné efektivní mobility analytu je proto klíčové pro stanovení komplexačních parametrů a jejich následnou využitelnost v různých optimalizačních strategiích.

Tato dizertační práce se detailněji věnuje dvěma úskalím, se kterými se experimentátor při stanovování správné efektivní mobility může potýkat:

- (i) stanovení mobility elektroosmotického toku v základních elektrolytech obsahujících nabitou interagující složku;
- (ii) určení migračního času u píků deformovaných elektromigrační disperzí.

Elektroosmotický tok a jeho stanovení

Elektroosmotický tok (EOF, *electroosmotic flow*) v elektroforéze je způsoben nábojem na vnitřní stěně kapiláry (ten vzniká například disociací silanolových skupin na povrchu nemodifikované křemenné kapiláry) a projevuje se pohybem celého obsahu kapiláry směrem k jedné z elektrod [65]. Rychlost analytu vůči kapiláře a detektoru je tak dána součtem jeho pohybu skrz roztok způsobeného elektromigrací, a pohybu roztoku jako celku způsobeného elektroosmotickým tokem. Pro určení efektivní mobility analytu (rychlosti pohybu skrz roztok vztahované na jednotkovou intenzitu elektrického pole) je tedy třeba správně stanovit mobilitu EOF a tu odečíst od celkové, zjevné mobility analytu. V literatuře je popsána řada

způsobů stanovení mobility EOF, které jsou shrnuty například v přehledovém článku Wanga *et al.* [66].

Nejčastější je použití neutrálního markeru (značkovače), který nemá vlastní elektroforetickou mobilitu, pohybuje se pouze působením EOF, a z jeho píku zaznamenaného detektorem je pak rychlost EOF stanovena. V případě komplexujících systémů s nabitými selektory ale tato metoda může selhat, protože selektor může vedle analytu interagovat i s EOF markerem – ten pak díky této interakci získává nenulovou efektivní mobilitu, která se navíc (obdobně jako u analytu) s koncentrací selektoru mění. Stanovené efektivní mobility analytu jsou pak zatíženy systematickou chybou.

Fuguet *et al.* [67] porovnávali, nakolik různé EOF markery interagují či neinteragují s nabitými micelami v BGE a které markery jsou tedy vhodné ke stanovení mobility EOF v micelární elektrokinetické chromatografii. Takové srovnání pro nabitě cyklodextriny (zejména cyklodextriny nedefinovaně sulfatované, které patří k nejoblíbenějším selektorům v CE [4, 68, 69, 70]) nebylo k dispozici.

V roce 1997 vyvinuli Williams a Vigh [71] metodu pro stanovení efektivní mobility v BGE obsahujících interagující složku. Zóna neutrálního EOF markeru byla obklopena širokými zónami BGE bez interagující složky, zóna analytu se pak nacházela v zóně BGE, který nabitou interagující složku obsahoval. Analytem mohla být, a často byla, látka běžně sloužící jako EOF marker. Metoda umožňovala odhalit její případnou „mobilizaci“ interakcí s nabitou interagující složkou BGE – s nabitým selektorem. Konkrétně se jednalo o definované (*single-isomer*) sulfatované cyklodextriny [72-74]. Metoda byla založena na určení vzdálenosti mezi EOF markerem a analytem před a po krátké aplikaci napětí. Její velkou nevýhodou nicméně bylo, že UV detektor musel být umístěn přibližně uprostřed délky kapiláry, což v komerčních přístrojích zpravidla není možné.

V *Publikaci V* je představena metoda stanovení efektivní mobility v BGE s nabitou interagující složkou, kterou lze použít v komerčně dostupném přístroji pro CE bez potřeby dodatečných úprav. Pomocí této metody byla porovnána vhodnost čtyř často používaných EOF markerů pro využití v BGE obsahujícím nedefinovaně sulfatovaný β -cyklodextrin (směs selektorů o různém stupni derivatizace a poloze substituentů) hojně používaný v analytické praxi.

Elektromigrační disperze a parametry HVL funkce

Pokud v zóně analytu závisí pohyblivost analytu na jeho vlastní koncentraci, pak dochází k deformaci tvaru jeho píku z Gaussovského na trojúhelníkový (za předpokladu, že původně byl vzorek dávkován jako velmi úzká zóna). Tento jev se nazývá elektromigrační disperze (EMD) a může k němu docházet z následujících příčin:

- (i) změna vodivosti (a tedy i intenzity pole) ve srovnání s BGE v důsledku přítomnosti analytu [75];
- (ii) nedostatečná pufrací kapacita BGE (a tedy změna zastoupení jednotlivých disociačních stavů analytu se změnou jeho koncentrace v zóně) [75];
- (iii) významný úbytek volného selektoru v zóně analytu v důsledku komplexace (a tedy nárůst frakce volného analytu s rostoucí celkovou koncentrací analytu) [14, 15].

Z linearizovaného modelu elektromigrace s malou nelineární poruchou bylo odvozeno, že tvar píku deformovaného EMD dobře vystihuje HVL funkce [16, 17, 18]:

$$HVL(t) = \frac{\frac{a_0}{a_2 a_3 \sqrt{2\pi}} \exp\left(-\frac{1}{2} \left(\frac{t - a_1}{a_2}\right)^2\right)}{\frac{1}{\exp(a_3) - 1} + \frac{1}{2} \left(1 + \operatorname{erf}\left(\frac{t - a_1}{\sqrt{2} a_2}\right)\right)} \quad (21)$$

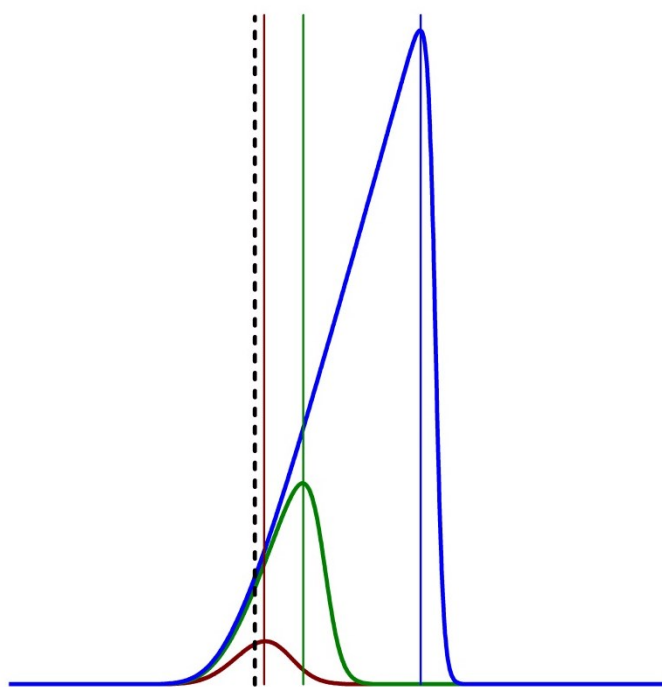
kde t je čas, parametr a_0 odpovídá ploše píku, a_1 jeho poloze vyplývající z efektivní mobility analytu při jeho nekonečném zředění, a_2 popisuje difuzní (symetrické) rozšíření píku a a_3 charakterizuje nesymetrickou deformaci píku*. Na Obrázku 1 je ukázáno, jak se u píku deformovaného EMD mění poloha jeho maxima s celkovou koncentrací analytu, zatímco parametr a_1 se nemění. Právě z parametru a_1 je tedy vhodné stanovovat efektivní mobilitu analytu, která je následně využita například k určení komplexačních parametrů.

V případě Gaussovského píku jsou známy vztahy mezi jeho geometrickými vlastnostmi (poloha maxima, šířka v polovině výšky) a parametry příslušné Gaussovy funkce (střední hodnota, rozptyl). Pro HVL pík ale dosud takové vztahy nebyly odvozeny. Jediným způsobem, jak pro daný pík analytu stanovit parametry odpovídající HVL funkce, byl export

* V literatuře se užívají dva různé způsoby parametrizace HVL funkce, které se ovšem liší pouze v definici parametru a_3 . V této práci je používán způsob uvedený v práci Hrušky *et al.* [18].

experimentálních dat a jejich proložení HVL funkcí pomocí vhodného softwaru pro nelineární regresi – což vyžaduje vymezení rozsahu dat pro analýzu, odečtení základní linie a především prvotní odhad parametrů HVL funkce, které jsou následně softwarem optimalizovány. Odhad parametrů je klíčový pro úspěšné vyhodnocení experimentálních dat a vyžaduje jistou míru zkušenosti.

Vztahy mezi „viditelnými“ charakteristikami píku – geometrickými vlastnostmi HVL funkce, a jejími parametry, které umožňují výpočet těchto parametrů bez použití nelineární regrese, jsou odvozeny v *Publikaci VI*.



Obrázek 1: Změna tvaru píku deformovaného elektromigrační disperzí s rostoucí koncentrací analytu; plnými svislými čarami jsou vyznačena maxima píků, svislá přerušovaná čára značí polohu parametru a_1 příslušné HVL funkce – hodnota tohoto parametru se s koncentrací analytu nemění a je tedy stejná pro všechny tři zobrazené píky.

Publikace I

Twenty years of development of dual and multi-selector models in capillary electrophoresis: A review

L. Müllerová, P. Dubský, B. Gaš

Electrophoresis 2014, 35, 2688-2700.

2 Cíle dizertační práce

Cílem této práce bylo především rozšířit poznatky o elektromigraci v systémech s více selektory:

- (i) Experimentálně ověřit využitelnost M-souhrnného modelu pro popis a predikci vlastností separačních systémů připravených smísením dvou definovaných cyklodextrinů a demonstrovat výhody tohoto přístupu (*Publikace II*).
- (ii) Rozšířit M-souhrnný model o možnost acidobazické disociace analytu a experimentálně demonstrovat platnost rozšířeného modelu na systému slabé jednosytné kyseliny jako analytu a dvou definovaných cyklodextrinů jako selektorů (*Publikace III a IV*).

Další cíle pak souvisely se stanovením správné efektivní mobility analytu:

- (i) Navrhnout metodu pro stanovení efektivní mobility v systému s interagující složkou BGE použitelnou v komerčně dostupném přístroji pro CE a s její pomocí posoudit vhodnost populárních EOF markerů pro použití v BGE s nedefinovaně sulfatovaným cyklodextrinem (*Publikace V*).
- (ii) Odvodit vztahy mezi geometrickými charakteristikami elektroforetického píku deformovaného elektromigrační disperzí a parametry HVL funkce popisující tento pík, především migračním časem odpovídajícím efektivní mobilitě analytu při jeho nekonečném zředění (*Publikace VI*).

3 Experimentální podmínky

Elektroforetické experimenty byly prováděny na přístroji Agilent ^{3D}CE pro kapilární elektroforézu (Agilent Technologies, Waldbronn, Německo). Přístroj je vybaven vestavěným UV/Vis detektorem s diodovým polem a bezkontaktním vodivostním detektorem vyvinutým v naší laboratoři [76]. K ovládání přístroje a sběru dat sloužil software ChemStation (Agilent Technologies). K měření pH sloužil PHM 240 pH/ION metr (Radiometer analytical, Kodaň, Dánsko).

Byly používány křemenné kapiláry z vnější strany pokryté polyimidovým potahem. Použité chemikálie byly vysoké čistoty, voda byla deionizována systémem Rowapur a Ultrapur (Watrex, San Francisco, USA).

Ke zpracování a vyhodnocení dat sloužily programy Origin 8.1 (OriginLab Corporation, Northampton, USA) a Microsoft Office Excel.

Detailní experimentální podmínky jsou vždy popsány v příslušné publikaci, a proto zde nejsou podrobně uváděny.

4 Výsledky a diskuze

4.1 Použití M-souhrnného modelu pro definované směsi dvou selektorů

Podle M-souhrnného modelu (18) – (20) lze směs selektorů o konstantním složení (konstantním poměru molárních koncentrací jednotlivých selektorů ve směsi) pokládat za selektor jeden. Model také ukazuje, jak jsou komplexační parametry tohoto „souhrnného“ selektoru provázány s komplexačními parametry jednotlivých složek směsi. V případě, že jsou do BGE záměrně přidávány dva různé selektory za účelem dosažení lepší separace, pak je složení směsi známo a komplexační parametry směsi mohou být předpovězeny na základě komplexačních parametrů obou čistých selektorů pomocí M-souhrnného modelu.

Pro směs toliko dvou selektorů přecházejí vztahy (18) a (19) do následujících tvarů:

$$K'_{AS}^M = K'_{AS1}\chi_{S1} + K'_{AS2}\chi_{S2} = K'_{AS1}\chi_{S1} + K'_{AS2}(1 - \chi_{S1}) \quad (22)$$

$$\mu_{AS}^M = \frac{\mu_{AS1}K'_{AS1}\chi_{S1} + \mu_{AS2}K'_{AS2}\chi_{S2}}{K'_{AS}^M} = \frac{\mu_{AS1}K'_{AS1}\chi_{S1} + \mu_{AS2}K'_{AS2}(1 - \chi_{S1})}{K'_{AS}^M} \quad (23)$$

kde χ_{S1} a $\chi_{S2} = (1 - \chi_{S1})$ jsou molární zlomky prvního a druhého selektoru ve směsi. Efektivní mobilita analytu pro konkrétní složení směsi a celkovou koncentraci selektoru je pak dána vztahem (20). Pokud je stejným způsobem vyjádřena i efektivní mobilita druhého analytu, lze pomocí M-souhrnného modelu zkoumat, jak se mění separační potenciál směsi se změnou jejího složení, případně zvolit optimální χ_{S1} a c_{tot} pro danou separaci.

V *Publikaci II* byl tento přístup experimentálně ověřen. Jako modelové analyty byly zvoleny ibuprofen a flurbiprofen. Přestože se jedná o chirální látky, v tomto případě nebyla prováděna chirální separace (při zvoleném pH není interakce s CD enantioselektivní), ale ibuprofen byl brán jako první analyt a flurbiprofen jako analyt druhý. Dále jsou při daném pH oba tyto analyty plně disociovány s vlastní mobilitou $\mu_A \neq 0$ a neúčastní se žádné acidobazické rovnováhy (jedná se tedy o $S_A M_S$ systém). V práci byla zkoumána jejich elektromigrace v systémech se dvěma různými dvojicemi selektorů: heptakis(2,6-di-O-methyl)- β -cyclodextrinu (DM- β -CD) s 6-O- α -maltosyl- β -cyclodextrinem (Malt- β -CD) tvořily první dvojici cyclodextrinů a DM- β -CD s nativním β -cyclodextrinem (β -CD) dvojicí druhou.

Nejprve byly metodou ACE stanoveny komplexační parametry K'_{AS} a μ_{AS} obou analytů s jednotlivými selektory (v $S_A S_S$ systémech). Následně byly experimentálně změřeny M-

souhrnné komplexační parametry K'_{AS}^M a μ_{AS}^M pro různá složení směsi (reprezentovaná frakcí prvního selektoru χ_{S1}) a pro obě zkoumané dvojice selektorů. Pro experimentální stanovení těchto souhrnných komplexačních parametrů byla opět použita metoda ACE – se směsí dvou selektorů o konstantním χ_{S1} se zacházelo jako s jedním selektorem. Takto změřené M-souhrnné parametry byly porovnány s parametry vypočtenými pomocí rovnic (22) a (23) z parametrů jednotlivých selektorů (*Publikace II*, Table 2). Shoda mezi změřenými a spočtenými parametry byla velmi dobrá, pozorované rozdíly mezi nimi byly, podle dlouhodobých zkušeností naší výzkumné skupiny, srovnatelné s přesností ACE metody.

Za zmínku také stojí porovnání kvality fitu, jmenovitě chyb parametrů stanovených ACE metodou, v $S_{AS}S$ a $S_{AM}S$ systémech. Závislost efektivní mobility na (celkové) koncentraci selektoru je v obou případech prokládána stejnou funkcí. Pokud by chyby stanovení byly v systémech se dvěma selektory významně vyšší ve srovnání se $S_{AS}S$ systémy, zpochybňovalo by to závěr M-souhrnného modelu, že směs selektorů o konstantním složení lze pokládat za selektor jediný. Výsledky ale ukazují (*Publikace II*, Table 1 a Table 2), že chyby stanovení se nijak neliší, bez ohledu na to, zda byla metoda ACE aplikována na $S_{AS}S$ nebo $S_{AM}S$ systém, což správnost M-souhrnného modelu potvrzuje.

Schopnost M-souhrnného modelu předpovídat kvalitu separace je demonstrována graficky (*Publikace II*, Fig. 4A a 4B) – v tomto případě byl jako parametr kvantifikující kvalitu separace použit poměr efektivních mobilit separovaných analytů neboli selektivita. Selektivity ve směsi selektorů předpovězené pomocí M-souhrnného modelu z komplexačních parametrů obou čistých selektorů (plné čáry) jsou v dobré shodě se selektivitami změřenými experimentálně (symboly). Přestože některé experimentální body se s predikcí neshodují zcela přesně, tvar závislosti a důležité charakteristiky daného separačního systému (přítomnost a přibližná poloha maxima, záměna migračního pořadí) jsou předpovězeny správně.

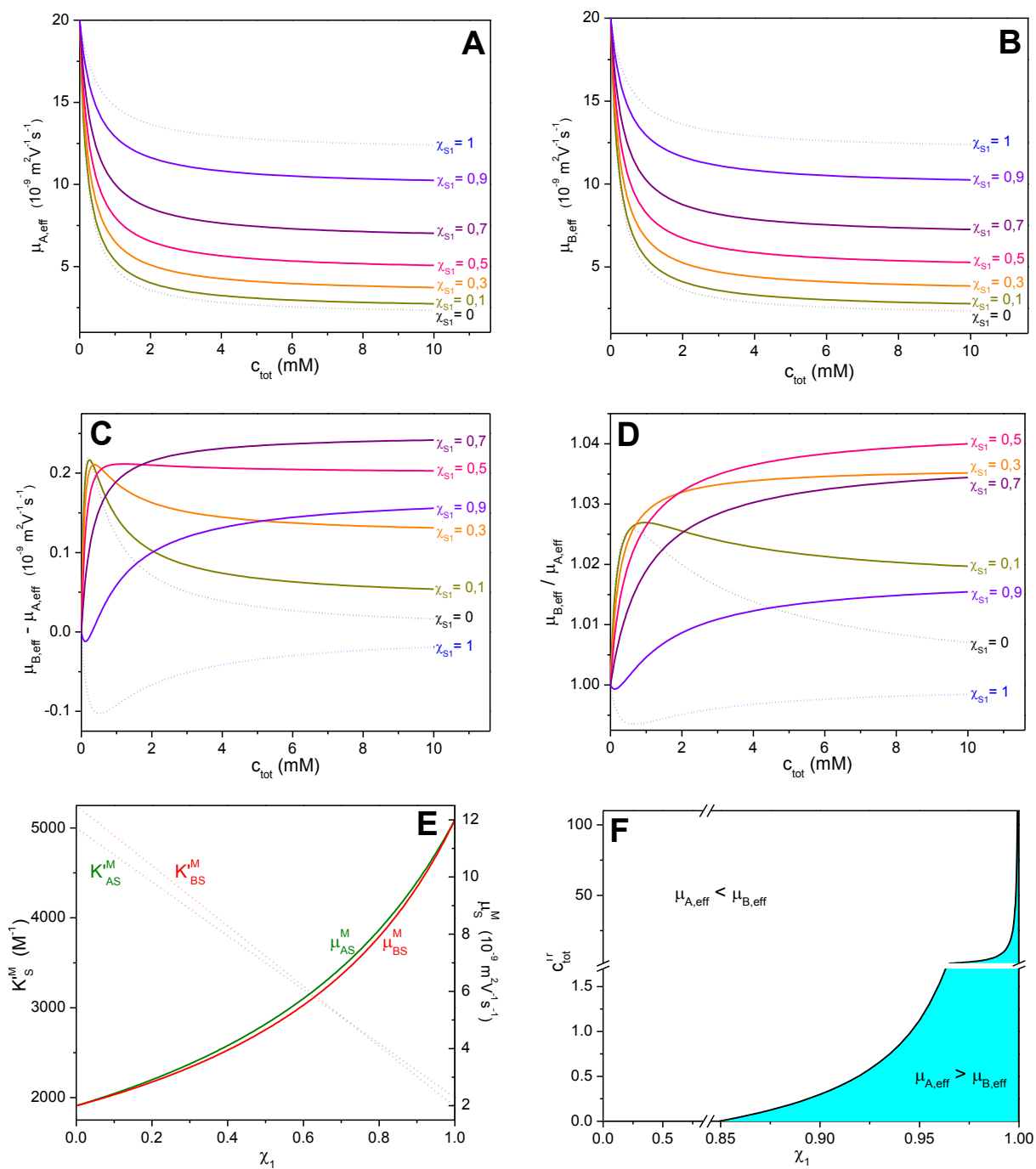
Má-li být M-souhrnný model použit k optimalizaci separačního systému se dvěma selektory, je třeba optimalizovat dvě nezávisle proměnné: celkovou koncentraci selektoru c_{tot} a molární frakci prvního selektoru ve směsi χ_{S1} (frakce druhého selektoru je jednoznačně určena vztahem $\chi_{S2} = 1 - \chi_{S1}$). To je obdobná situace jako v případě původního modelu elektromigrace v systému se dvěma selektory (12), kde jsou nezávislými proměnnými koncentrace obou selektorů c_{S1} a c_{S2} . Nicméně, přechod od c_{S1} a c_{S2} v původním modelu k c_{tot} a χ_{S1} v M-souhrnném modelu přináší významné výhody.

Především koncentrace selektorů c_{S1} a c_{S2} mohou obě v principu růst do nekonečna a je náročné představit si chování systému při všech jejich možných kombinacích. Na druhou stranu M-souhrnný model ukazuje, že chování směsi selektorů je závislé na poměru jejich koncentrací, respektive na frakci χ_{S1} , která může nabývat pouze hodnot od nuly do jedné. V rámci takto dobře definovaného rozsahu složení směsi lze studovat vlastnosti systému – to bylo jednak ukázáno na experimentálních výsledcích v *Publikaci II*, a dále je demonstrováno na Obrázku 2 pro hypotetický (nicméně reálně možný) systém.

Z modelu (18) – (20) vyplývá, že M-souhrnná komplexační konstanta může nabývat pouze hodnot mezi hodnotami komplexačních konstant prvního a druhého selektoru (*Publikace II*, Fig. 3A; Obrázek 2E, přerušované čáry). Totéž platí i pro M-souhrnnou mobilitu komplexu, která se ale na rozdíl od komplexační konstanty nemění s χ_{S1} lineárně (*Publikace II*, Fig. 3B; Obrázek 2E, plné čáry). Stejně tak i efektivní mobilita jednoho analytu při dané celkové koncentraci selektoru se bude vždy nacházet v rozmezí daném efektivními mobilitami tohoto analytu v BGE obsahujícím ekvivalentní koncentraci prvního respektive druhého selektoru (Obrázek 2A a 2B). Nicméně toto už neplatí pro rozdíl efektivních mobilit dvou analytů (Obrázek 2C), nebo jejich poměr (*Publikace II*, Fig. 4; Obrázek 2D) – jinak by směs dvou selektorů nikdy nemohla zlepšovat separaci ve srovnání s jednotlivými selektory. Tento efekt je možné pozorovat v případě dvojice selektorů DM- β -CD a β -CD při vyšších koncentracích c_{tot} (*Publikace II*, Fig. 4A). V případě hypotetického systému na Obrázku 2 pak směs poskytuje jak větší rozdíl mezi mobilitami analytů (Obrázek 2C, $\chi_{S1} = 0,7$) tak i lepší selektivitu (Obrázek 2D, $\chi_{S1} = 0,3; 0,5$ a $0,7$) ve srovnání s optimální koncentrací obou čistých selektorů. Tyto grafy ilustrují, jak se průběh závislosti selektivity na celkové koncentraci mění s měnícím se složením směsi – a že změny tvarů těchto závislostí mohou být značně „neintuitivní“.

Dalším jevem, na němž lze demonstrovat vhodnost M-souhrnného modelu pro popis separačního systému se dvěma selektory je záměna elektromigračního pořadí analytů (EMO, *electromigration order*). Zda a při jaké koncentraci selektoru dojde k záměně EMO analytů A a B, lze zjistit nalezením takové koncentrace c_{tot} , která pro dané složení směsi (χ_{S1}) splňuje podmínku $\mu_{A,eff} = \mu_{B,eff}$. Za efektivní mobility obou analytů $\mu_{A,eff}$ a $\mu_{B,eff}$ lze dosadit ze vztahu (20), což vede ke kvadratické rovnici, jejímž řešením jsou koncentrace, při kterých k záměně EMO dochází – ty pak lze vynést jako funkci složení směsi χ_{S1} (*Publikace II*, Fig. 2; Obrázek 2F). Stejným způsobem lze graficky pracovat s dalšími charakteristikami systému, jako je například koncentrace odpovídající maximálnímu rozdílu mobilit.

M-souhrnný model je vhodným nástrojem pro popis separačních systémů se dvěma selektory. Zejména umožňuje snadno identifikovat, zda smísení dvou konkrétních selektorů může vést ke zlepšení separace a pokud ano, lze jej využít k nalezení optimálního složení a celkové koncentrace směsi selektorů vzhledem k podílu (nebo rozdílu) efektivních mobilit analytů nebo například i z hlediska jejich migračního pořadí. Výhodou tohoto modelu také je, že se nejedná o rozšíření jednoduššího modelu o přítomnost druhého selektoru, ale spíše o speciální případ obecného modelu popisujícího komplexaci s libovolným počtem selektorů. Model tak nabízí užitečný vhled do mechanismů, které se v SAMs systémech podílejí na separaci.



Obrázek 2: Grafická analýza vlastností hypotetického separačního systému pomocí M-souhrnného modelu. Závislost efektivní mobility prvního (A) a druhého (B) analytu, rozdílu efektivních mobilit (C) a poměru efektivních mobilit (D) na celkové koncentraci selektoru v systémech s jednotlivými čistými selektory (přerušované čáry, c_{tot} odkazuje na koncentraci čistého selektoru) a se směsmi těchto selektorů (plné čáry), složení směsi (frakce prvního selektoru, χ_{S1}) uvedeno v grafech; (E) závislost M-souhrnných komplexačních konstant (přerušované čáry) a M-souhrnných mobilit komplexů (plné čáry) na složení směsi; (F) závislost koncentrace c_{tot}^{Tr} , při které dochází k záměně EMO, na složení směsi. Mobility volných analytů $\mu_A = \mu_B = 20 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$; mobility komplexů s prvním selektorem a se druhým selektorem $\mu_{AS1} = \mu_{BS1} = 12 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $\mu_{AS2} = \mu_{BS2} = 2 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$; konstanty komplexace analytů s prvním selektorem $K'_{AS1} = 1900 \text{ M}^{-1}$, $K'_{BS1} = 2000 \text{ M}^{-1}$ a se druhým selektorem $K'_{BS2} = 5250 \text{ M}^{-1}$, $K'_{AS2} = 5000 \text{ M}^{-1}$.

Publikace II

Separation efficiency of dual-selector systems in capillary electrophoresis

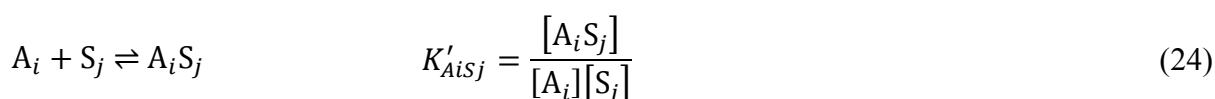
L. Müllerová, P. Dubský, B. Gaš

Journal of Chromatography A 2014, 1330, 82-88.

4.2 Generalizovaný model elektromigrace v interagujících systémech (M_AM_S model)

V minulosti se mnoho autorů zabývalo popisem systémů, ve kterých analyt interaguje s více než jedním selektorem (jak je shrnuto v *Publikaci I*). Nicméně žádný z těchto modelů (včetně M-souhrnného modelu probíraného v předešlé kapitole) nezahrnoval další možné rovnováhy, kterých se analyt může účastnit vedle komplexace – především rovnováhy acidobazické. Na druhé straně elektromigrace analytů, které jsou slabými jednosytnými kyselinami nebo bázemi a interagují s jedním selektorem, byla zevrubně popsána například skupinou profesora Vigha [30-33].

V *Publikaci III* je představen generalizovaný model elektromigrace v interagujících systémech se stechiometrií interakce 1:1 (analyt : selektor). Tento model vychází z M-souhrnného modelu a popisuje efektivní mobilitu analytu, který je přítomný v libovolném počtu L volných (nekomplexovaných) forem, mezi kterými se ustavuje rychlá rovnováha. Tyto rovnováhy nejsou pro potřeby modelu specifikovány, ale z praktického hlediska jsou významné zejména rovnováhy acidobazické a jednotlivými volnými formami analytu se pak míní jednotlivé disociační stavy slabé kyseliny, báze nebo amfolytu. Pro každou volnou formu analytu lze definovat molární zlomek χ_{A_i} jako poměr její molární koncentrace ku celkové molární koncentraci volného analytu. Každá z těchto volných forem analytu interaguje s každým z N přítomných selektorů. Všechny vznikající komplexy mají stechiometrii 1:1 a interakci i -té volné formy analytu s j -tým selektorem charakterizuje komplexační konstanta $K'_{A_i S_j}$:



Pro každý selektor lze definovat molární zlomek χ_{S_j} jako poměr koncentrace tohoto selektoru ku celkové koncentraci všech přítomných selektorů c_{tot} (stejně jako v M-souhrnném modelu). Komplexace sice ovlivňuje celkovou koncentraci volného analytu, ale už ne jeho distribuci mezi jednotlivé volné formy, proto hodnoty χ_{A_i} nezávisí ani na koncentracích přidaných

selektorů, ani na hodnotách komplexačních konstant. Efektivní mobilitu analytu v takovém systému popisuje rovnice:

$$\mu_{A,eff} = \frac{\sum_{i=1}^L \chi_{Ai} \mu_{Ai} + \sum_{i=1}^L (\chi_{Ai} \cdot \sum_{j=1}^N K'_{Aisj} \mu_{Aisj} \chi_{Sj}) \cdot c_{tot}}{1 + \sum_{i=1}^L (\chi_{Ai} \cdot \sum_{j=1}^N K'_{Aisj} \chi_{Sj}) \cdot c_{tot}} \quad (25)$$

kde μ_{Ai} je mobilita i -té formy volného analytu a μ_{Aisj} mobilita komplexu mezi i -tou formou volného analytu a j -tým selektorem.

Pokud je složení směsi selektorů konstantní (nemění se vzájemné poměry koncentrací jednotlivých selektorů, $\chi_{Sj} = konst.$ pro všechna j) a jsou konstantní i podmínky, na kterých závisí distribuce volného analytu mezi jeho jednotlivé formy ($\chi_{Ai} = konst.$ pro všechna i ; v případě, že mezi jednotlivými volnými formami analytu se ustavují acidobazické rovnováhy, je takovou podmínkou konstantní pH základního elektrolytu – přesněji koncentrace oxoniových iontů $[H_3O^+]$), pak je jedinou nezávisle proměnnou v rovnici (25) celková koncentrace selektorů a rovnice přechází na tvar:

$$\mu_{A,eff} = \frac{\mu_A^{MAMS} + K_{AS}'^{MAMS} \mu_{AS}^{MAMS} c_{tot}}{1 + K_{AS}'^{MAMS} c_{tot}} \quad (26)$$

kde

$$\mu_A^{MAMS} = \sum_{i=1}^L \chi_{Ai} \mu_{Ai} \quad (27)$$

$$K_{AS}'^{MAMS} = \sum_{i=1}^L \chi_{Ai} \sum_{j=1}^N K'_{Aisj} \chi_{Sj} \quad (28)$$

$$\mu_{AS}^{MAMS} = \frac{\sum_{i=1}^L \chi_{Ai} \sum_{j=1}^N K'_{Aisj} \mu_{Aisj} \chi_{Sj}}{K_{AS}'^{MAMS}} \quad (29)$$

Rovnice (26) je (stejně jako rovnice (20) v M-souhrnném modelu) formálně shodná s původním vztahem (4) pro mobilitu analytu, který je přítomný pouze v jedné volné formě a interaguje pouze s jedním selektorem. Z toho vyplývá, že v tomto případě (konstantní χ_{Ai} a χ_{Sj}) lze libovolný M_{AMs} systém (splňující podmínky (i)-(v) uvedené v kapitole 1.1) pokládat za S_{ASs} systém: závislost efektivní mobility analytu na celkové koncentraci selektoru má známý hyperbolický tvar. To ukazuje jednak, že pro hledání optimální celkové koncentrace směsi je možné využít optimalizační postupy odvozené pro S_{ASs} systémy (s výjimkou předpokladu shodné mobility komplexů při separaci dvojice enantiomerů), jednak univerzální použitelnost hyperbolické závislosti (4) pro elektroforetické systémy se stechiometrií komplexace 1:1.

Stojí za zmínku, že M_{AMs} model zůstává aplikovatelný i v případě, kdy acidobazické disociaci podléhá selektor. V takovém případě se definují molární frakce χ_{Sj} pro jednotlivé formy selektoru a je třeba zajistit, aby tyto nezávisely na celkové koncentraci selektoru c_{tot} . Toho lze dosáhnout dostatečnou pufrací kapacitou BGE nebo změnou koncentrací jeho nekomplexujících složek, aby se kompenzovala změna pH a iontové síly způsobená přidávkem selektoru (obdobný způsob se používá k zajištění konstantní iontové síly v systémech s plně nabitými selektory [12]).

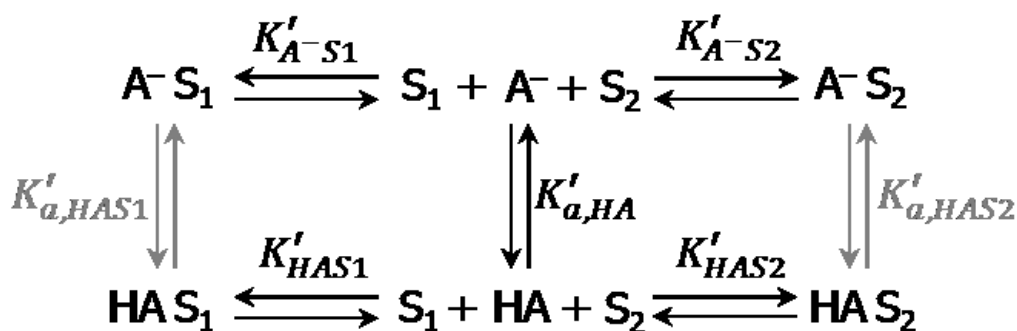
Řadu dříve publikovaných elektromigračních modelů popisujících systémy se stechiometrií komplexace 1:1 lze chápat jako speciální případy generalizovaného M_{AMs} modelu (25) nebo jeho souhrnné formy (26) – (29):

- (i) Pokud je přítomna pouze jedna volná forma analytu a ta interaguje pouze s jedním selektorem ($L = 1; N = 1$), přechází rovnice (25) na původní vztah Wrena a Rowa (4).
- (ii) V případě že analyt je slabá jednosytná kyselina nebo báze, která interaguje s jedním selektorem ($L = 2; N = 1$), a závislost molárních frakcí obou volných forem analytu na $[H_3O^+]$ se vyjádří explicitně, přechází rovnice (25) na vztah publikovaný skupinou profesora Vigha pro slabé kyseliny (5), respektive pro slabé báze [31].
- (iii) Pro systém uvedený v bodě (ii) přechází souhrnná forma M_{AMs} modelu (26) – (29) na pH-souhrnný model Lelièvre *et al.* (7) – (10). Obdobně pro dvojsytnou kyselinu ($L = 3; N = 1$) na model Moffadela *et al.* [37].
- (iv) Pokud je přítomna pouze jedna volná forma analytu a ta interaguje s více selektory ($L = 1; N > 1$), přechází model (26) – (29) na M-souhrnný model (18) – (20), který je pro případ dvou selektorů podrobněji rozebrán v předešlé kapitole.

V M_{AMs} systémech se ustavuje řada navzájem propojených rovnowah, které mají vliv na výslednou efektivní mobilitu analytu. Na Obrázku 3 jsou tyto rovnováhy znázorněny pro nejjednodušší M_{AMs} systém: slabou jednosytnou kyselinu interagující se dvěma selektory. Výhodou M_{AMs} modelu je, že umožňuje nahlížet na M_{AMs} systémy z různých perspektiv. Jak už bylo uvedeno, lze na tento komplikovaný systém nahlížet jako na systém, kde jediná forma volného analytu interaguje s jediným selektorem, a popsat jej pomocí S_{ASs} modelu. Obdobně je také možné popsat (a optimalizovat) tento systém pomocí M_{ASs} modelů například Lelièvre *et al.* [34] nebo Vigha *et al.* [30-33] (pH-explicitní přístup), nebo pomocí S_{AMs} modelů například duálního modelu Lurie *et al.* [44] nebo M-souhrnného modelu (18) – (20) (M-explicitní přístup).

Při pH-explicitním přístupu je složení směsi selektorů konstantní ($\chi_{Sj} = konst.$ pro všechna j). Výsledky sumací podle jednotlivých selektorů jsou tedy také konstantní a rovnici (25) lze zapsat:

$$\mu_{A,eff} = \frac{\sum_{i=1}^L \chi_{Ai} \mu_{Ai} + \sum_{i=1}^L \chi_{Ai} K'_{AiS}{}^M \mu_{AiS}{}^M \cdot c_{tot}}{1 + \sum_{i=1}^L \chi_{Ai} K'_{AiS}{}^M \cdot c_{tot}} \quad (30)$$



Obrázek 3: Nejjednodušší M_{AMs} systém – slabá kyselina (disociovaná, A^- , a protonovaná, HA , forma) interaguje se dvěma selektory (S_1 a S_2); $K'_{A^-S_1}$, $K'_{A^-S_2}$, K'_{HAS1} a K'_{HAS2} jsou komplexační konstanty disociované formy s prvním a druhým selektorem a protonované formy s prvním a druhým selektorem, $K'_{a,HA}$ je acidobazická disociační konstanta volného analytu, $K'_{a,HAS1}$ a $K'_{a,HAS2}$ jsou acidobazické disociační konstanty obou vzniklých komplexů (jejich hodnota je dána rovnicí (11) a není tedy nutné je experimentálně stanovit); pro větší přehlednost nejsou ve schématu uvedeny oxoniové kationty.

kde

$$K'_{AiS}{}^M = \sum_{j=1}^N K'_{AiSj} \chi_{Sj} \quad (31)$$

$$\mu_{AiS}{}^M = \frac{\sum_{j=1}^N K'_{AiSj} \mu_{AiSj} \chi_{Sj}}{K'_{AiS}{}^M} \quad (32)$$

Komplexační konstanta $K'_{AiS}{}^M$ a mobilita komplexu $\mu_{AiS}{}^M$ jsou M-souhrnné komplexační parametry charakterizující interakci i -té formy volného analytu s danou směsí selektorů, se kterou tedy lze zacházet jako se selektorem jediným. Tyto parametry lze například stanovit experimentálně při takovém pH základního elektrolytu, kdy je analyt přítomen pouze v této formě. Dále lze v rovnici (30) explicitně vyjádřit závislost molárních frakcí jednotlivých volných forem analytu na $[H_3O^+]$ a optimalizovat separaci vzhledem k pH a celkové koncentraci směsi selektorů, přičemž se systémem se zachází, jako by v něm byl přítomen pouze jeden selektor. Pro nejjednodušší $M_{\Delta}M_S$ systém je tento pohled schematicky znázorněn na Obrázku 4.

Při M-explicitním přístupu jsou podmínky řídící distribuci volného analytu mezi jeho jednotlivé formy udržovány konstantní ($\chi_{Ai} = konst.$ pro všechna i). Konkrétně pro analyt podléhající acidobazické disociaci musí být konstantní pH základního elektrolytu. Po přeorganizování sumací v rovnici (25):

$$\mu_{A,eff} = \frac{\sum_{i=1}^L \chi_{Ai} \mu_{Ai} + \sum_{j=1}^N (\chi_{Sj} \cdot \sum_{i=1}^L \chi_{Ai} K'_{AiSj} \mu_{AiSj}) \cdot c_{tot}}{1 + \sum_{j=1}^N (\chi_{Sj} \cdot \sum_{i=1}^L \chi_{Ai} K'_{AiSj}) \cdot c_{tot}} \quad (33)$$

lze $M_{\Delta}M_S$ model zapsat jako:

$$\mu_{A,eff} = \frac{\mu_A^{pH} + \sum_{j=1}^N \chi_{Sj} K'_{ASj}{}^{pH} \mu_{ASj}{}^{pH} \cdot c_{tot}}{1 + \sum_{j=1}^N \chi_{Sj} K'_{ASj}{}^{pH} \cdot c_{tot}} \quad (34)$$

kde

$$\mu_A^{pH} = \sum_{i=1}^L \chi_{Ai} \mu_{Ai} \quad (35)$$

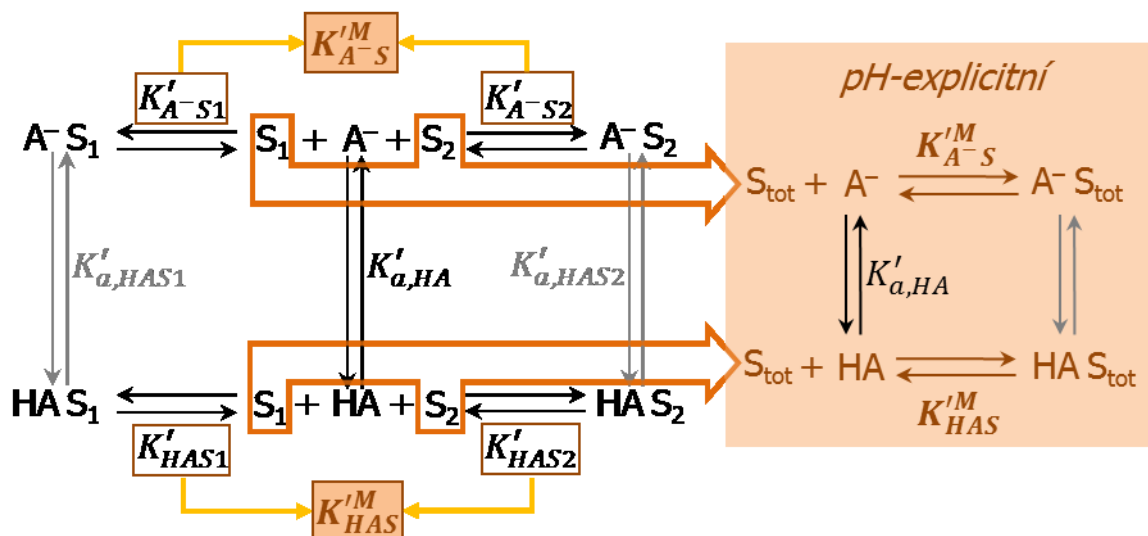
$$K_{ASj}^{pH} = \sum_{i=1}^L \chi_{Ai} K_{AiSj}' \quad (36)$$

$$\mu_{ASj}^{pH} = \frac{\sum_{i=1}^L \chi_{Ai} K_{AiSj}' \mu_{AiSj}}{K_{ASj}^{pH}} \quad (37)$$

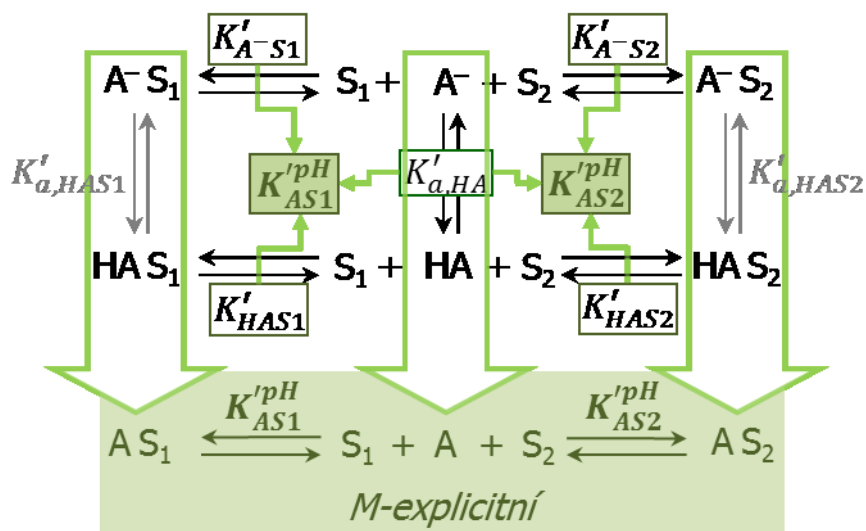
Komplexační konstanta K_{ASj}^{pH} a mobilita komplexu μ_{ASj}^{pH} pak charakterizují interakci (částečně disociovaného/protonovaného) analytu s j -tým selektorem. Ty lze stanovit experimentálně z měření v BGE, který obsahuje konkrétní selektor, a následně je použit jako vstupní parametry například M-souhrnného modelu popsaného v předešlé kapitole a optimalizovat separaci vzhledem ke složení a celkové koncentraci směsi selektorů, přičemž se systémem se zachází tak, jako kdyby v něm byla přítomna pouze jedna forma volného analytu. Schematicky je tento přístup znázorněn pro nejjednodušší M_{AM_S} systém na Obrázku 5.

Experimentálně byly jak pH-explicitní, tak M-explicitní přístup ověřeny v *Publikaci IV* na modelovém systému *R*-flurbiprofenu jako analytu (slabá jednosytná kyselina) a jednomocného kladně nabitého 6-monodeoxy-6-monoamino- β -cyclodextrinu (A - β -CD) spolu s nativním β -CD jako selektory.

pH-explicitní přístup: Pro dvě různá složení směsi byly experimentálně stanoveny K_{AiS}^M a μ_{AiS}^M disociované a nedisociované formy z měření při takovém pH BGE, kde je *R*-flurbiprofen téměř zcela disociován (pH 6,28) respektive téměř zcela protonován (pH 2,02). Na základě těchto parametrů byly předpovězeny efektivní mobility analytu v těchto směsích při pH 4,01 pomocí modelu Williamse a Vigha (5). Tento model byl původně odvozen pro částečně disociovaný analyt interagující pouze s jedním selektorem ($L = 2$, $N = 1$). Nicméně díky pH-explicitnímu přístupu M_{AM_S} modelu (Obrázek 4) jej lze aplikovat i pro tuto situaci, kdy částečně disociovaný analyt interaguje se směsí selektorů ($L = 2$, $N = 2$). Dobrá shoda předpovědi s mobilitami experimentálně změřenými (*Publikace IV*, Table 3A, Fig. 1) správnost tohoto přístupu potvrzuje.



Obrázek 4: Nejjednodušší $M_A M_S$ systém z pH-explicitní perspektivy – na systém se nahlíží, jako by obě volné formy analytu interagovaly pouze s jedním selektorem (S_{tot}), interakci charakterizují M-souhrnné komplexační konstanty $K'^M_{A^-S}$ a K'^M_{HAS} pro disociovanou a protonovanou formu analytu (význam dalších symbolů je uveden u Obrázku 3; pro větší přehlednost nejsou ve schématu uvedeny oxoniové kationty).



Obrázek 5: Nejjednodušší $M_A M_S$ systém z M-explicitní perspektivy – na systém se nahlíží, jako by s oběma selektory interagovala jen jedna volná forma analytu, jejíž interakce s jednotlivými selektory charakterizují pH-souhrnné komplexační konstanty K'^{pH}_{AS1} a K'^{pH}_{AS2} (význam dalších symbolů je uveden u Obrázku 3; pro větší přehlednost nejsou ve schématu uvedeny oxoniové kationty).

M-explicitní přístup: Při pH 4,01, kdy je analyt pouze částečně disociován a tedy přítomen v obou svých formách, byly změřeny K_{ASj}^{pH} a μ_{ASj}^{pH} pro oba selektory. Na základě těchto parametrů byly pomocí M-souhrnného modelu (20) – (23) předpovězeny efektivní mobility *R*-flurbiprofenu ve směsích těchto dvou selektorů o čtyřech různých složeních (čtyřech různých χ_{S1}) při tomto pH. Jejich shoda s mobilitami experimentálně stanovenými byla velmi dobrá (*Publikace IV*, Table 3B, Fig. 1). Podobně jako v předchozím případě se tak prokázalo, že model (20) původně platný pro interakci jediné formy analytu se směsí selektorů ($L = 1, N > 1$) může být díky M-explicitnímu přístupu M_{AMs} modelu (Obrázek 5) využit i v případě, kdy se selektory interagují dvě volné formy analytu ($L = 2, N = 2$).

V *Publikaci IV* je dále ukázáno, že pokud je závislost efektivní mobility analytu na celkové koncentraci selektoru (při konstantním pH a případně složení směsi) prokládána hyperbolickou funkcí (26), pak kvalita proložení (vyjádřená parametrem R^2) se neliší bez ohledu na to, zda se jedná o S_{ASs} , M_{ASs} , S_{AMs} nebo M_{AMs} systém (*Publikace IV*, Table 2). To je zcela v souladu s M_{AMs} modelem a potvrzuje výše zmíněnou univerzální aplikovatelnost tohoto vztahu na systémy se stechiometrií komplexace 1:1.

M-explicitní a pH-explicitní přístup lze chápat jako svým způsobem „ortogonální“, jak je schematicky naznačeno na vloženém obrázku (*Publikace IV*, Fig. 1). Ve skutečnosti byly tyto přístupy někdy mimoděk používány už v minulosti (například stanovování pH-souhrnných komplexačních parametrů se selektory, které byly ve skutečnosti směsmi selektorů [37]). Generalizovaný model elektromigrace v interagujících systémech se stechiometrií interakce 1:1 představený v *Publikacích III a IV* ale poprvé poskytuje teoretický základ pro zacházení s M_{AMs} systémy. Model ukazuje, že provázané komplexační a acidobazické rovnováhy, jichž se analyt účastní, od sebe lze separovat a pracovat s nimi odděleně. Experimentátor může zvolit takový způsob optimalizace, který je nejvýhodnější pro konkrétní separaci, a tento model mu poskytuje informace o tom, za jakých podmínek lze kterou optimalizační strategii využít.

Publikace III

**Generalized model of electromigration
with 1:1 (analyte:selector) complexation stoichiometry:
Part I. Theory**

P. Dubský, L. Müllerová, Martin Dvořák, B. Gaš

Journal of Chromatography A 2015, 1384, 142-146.

Publikace IV

**Generalized model of electromigration
with 1:1 (analyte:selector) complexation stoichiometry:
Part II. Application to dual systems and experimental verification**

L. Müllerová, P. Dubský, B. Gaš

Journal of Chromatography A 2015, 1384, 147-154.

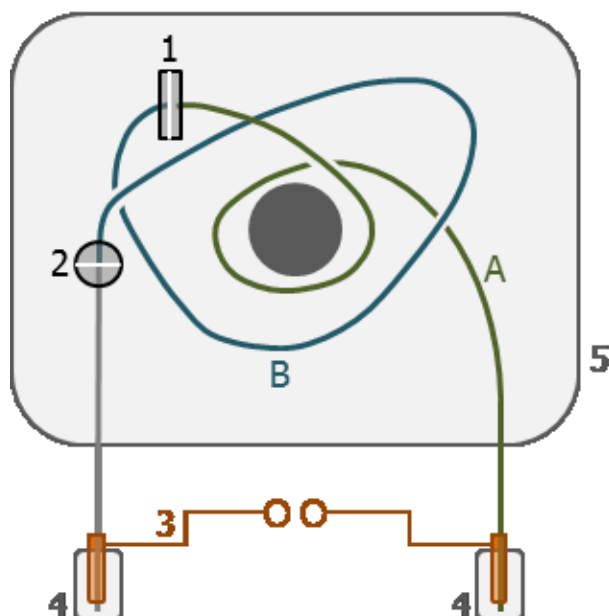
4.3 Efektivní mobilita EOF markerů v BGE obsahujícím sulfatovaný β -CD stanovená dvoudetektorovou metodou

Pro stanovení komplexačních parametrů, které jsou vstupními parametry elektromigračních modelů probíraných v kapitolách 4.1 a 4.2, metodou ACE je třeba změřit efektivní mobility analytu v BGE o několika různých koncentracích selektorů. V případě, že selektor je nabitý, může být stanovení efektivní mobility analytu komplikováno interakcí EOF markeru se selektorem.

Jak bylo řečeno v úvodní kapitole 1.2, vhodná metoda pro stanovení efektivní mobility analytů v základních elektrolytech, jejichž některá nabitá složka (typicky selektor) může interagovat s markerem elektroosmotického toku, byla vyvinuta ve skupině profesora Vigha už v roce 1997 [71]. Nicméně pro fungování této metody je nezbytné umístění UV absorpčního detektoru přibližně uprostřed kapiláry, zatímco v komerčních přístrojích je vzdálenost mezi tímto detektorem a výstupním koncem kapiláry konstrukčně pevně daná a poměrně krátká (8,5 cm v případě instrumentace Agilent Technologies používané v této práci).

Proto byla v *Publikaci V* navržena nová metoda založená na stejném principu, ale proveditelná v komerční instrumentaci. I námi navržená metoda je založena na stanovení vzdálenosti mezi zónou markeru umístěnou v neinteragujícím BGE a zónou vzorku nacházející se v BGE obsahujícím interagující složku. Metoda využívá dva detektory: UV absorpční detektor s diodovým polem umístěný u výstupního konce kapiláry a bezkontaktní vodivostní detektor původně vyvinutý v naší skupině [76], který je ovšem nyní běžně komerčně dostupný u výrobce přístroje, firmy Agilent Technologies. Konstrukce kazety, do které se umísťuje kapilára, umožňuje situovat mezi oba detektory další smyčku kapiláry, takže vzdálenost mezi oběma detektory je přibližně stejná, jako mezi vstupem do kapiláry a prvním (vodivostním) detektorem, jak je ukázáno na Obrázku 6.

Průběh měření dvoudetektorovou metodou je schematicky znázorněn v *Publikaci V* (Figure 1), podrobný popis jednotlivých fází metody i způsob vyhodnocení výsledků je uveden v sekci 3.1 této publikace.



Obrázek 6: Navinutí kapiláry pro měření dvoudetektorovou metodou; 1 – vodivostní detektor; 2 – UV absorpční detektor; 3 – elektrody připojené ke zdroji vysokého napětí; 4 – vialky s BGE; 5 – kazeta pro umístění kapiláry; A – úsek kapiláry od vstupu k vodivostnímu detektoru; B – úsek kapiláry od vodivostního detektoru k UV absorpčnímu detektoru.

Dvoudetektorová metoda byla v *Publikaci V* využita ke stanovení efektivní mobility čtyř často používaných EOF markerů – dimethyl sulfoxidu, mesityl oxidu, nitromethanu a thiomocoviny – v BGE obsahujícím nedefinovaně sulfatovaný β -CD (S- β -CD) v koncentraci 60 g/l (odpovídá přibližně 30 mM). Stanovené mobility jsou uvedené v *Publikaci V* (Table 2).

Nejvyšší efektivní mobilita způsobená interakcí se S- β -CD byla pozorována u thiomocoviny ($-3,0 \cdot 10^{-9} \text{m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$), což ukazuje, že tato látka není vhodným markerem pro BGE se sulfatovaným cyklodextrinem. Nejnižší (v absolutní hodnotě), ale dvoudetektorovou metodou stále měřitelné, efektivní mobility byly zjištěny pro dimethyl sulfoxid a nitromethan ($-1,5 \cdot 10^{-9} \text{m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$). Lze tedy konstatovat, že tyto látky jsou ze zvoleného setu nejméně nevhodné jako EOF markery, nicméně i ty se S- β -CD slabě interagují.

Získané výsledky byly dále ověřeny měřeními pomocí CE v klasickém uspořádání. Tak samozřejmě nebylo možné změřit absolutní hodnotu efektivní mobility daného EOF markeru. Nicméně když byly ve vzorku nadávkovány markery dva, bylo možné stanovit rozdíl jejich efektivních mobilit (rozdíl není ovlivněn mobilitou elektroosmotického toku). Tento rozdíl pak byl porovnán s rozdílem efektivních mobilit stanovených dvoudetektorovou metodou a výsledky byly v rámci experimentální chyby shodné (*Publikace V*, Table 3), což potvrzuje spolehlivost výsledků dvoudetektorové metody.

Publikace V

**Determination of effective mobilities of EOF markers
in BGE containing sulfated β -cyclodextrin
by a two-detector method**

L. Müllerová, P. Dubský, J. Svobodová, B. Gaš

Electrophoresis 2013, 34, 768-776.

4.4 Určení parametrů HVL funkce z geometrických charakteristik píku

HVL funkce (21) je vhodným popisem tvaru píku deformovaného elektromigrační disperzí. V kontextu této dizertační práce je významný především její parametr a_1 , který má význam migračního času odpovídajícího efektivní mobilitě analytu při jeho nekonečném zředění. Hodnotu tohoto parametru je tedy třeba určit pro daný EMD deformovaný pík analytu, aby bylo možné z daného elektroforetického experimentu správně vyhodnotit efektivní mobilitu analytu – která pak slouží například ke stanovení komplexačních parametrů metodou ACE.

Tvar EMD deformovaného píku lze také popsat pomocí určitých geometrických charakteristik, které může například automaticky odečítat software pro sběr elektroforetických dat. Těmito charakteristikami jsou:

- (i) čas odpovídající maximu píku, t_M ;
- (ii) šířka píku v určité frakci jeho maximální výšky w_α , $\alpha \in (0; 1)$ (například $w_{0,5}$ – šířka v polovině výšky);
- (iii) asymetrie píku q . Ta může být definována například jako poměr šířek píku ve dvou různých frakcích jeho maximální výšky w_β/w_α , či jako poměr pravé a levé pološířky v určité frakci maximální výšky píku $w_{P\alpha}/w_{L\alpha}$. ChemStation software dodávaný spolu s CE přístroji firmy Agilent Technologies používá faktor chvostování píku podle Amerického lékopisu (*U. S. Pharmacopeia tailing factor*), $T_{USP} = w_{0,05}/(2 \cdot w_{L0,05})$, poměr šířky píku v 5 % výšky ku dvounásobku levé pološířky v 5 % výšky.

Nicméně vztah mezi těmito „viditelnými“ geometrickými charakteristikami píku na jedné straně a na straně druhé parametry odpovídající HVL funkce (21), které mají fyzikální význam, není přímočarý. Proto bylo dosud nutné určit parametry HVL funkce nelineární regresí, což vyžadovalo export experimentálního elektroferogramu do vhodného softwaru (například Origin).

Jak je detailně odvozeno v *Publikaci VI*, asymetrie píku q závisí z parametrů HVL funkce pouze na parametru a_3 , $q = f_q(a_3)$. Lze tedy definovat závislost parametru a_3 na geometrické charakteristice asymetrie píku q :

$$a_3 = f_q^{-1}(q) \tag{38}$$

Dále lze odvodit vztah mezi parametry a_1 (migrační čas odpovídající efektivní mobilitě) a a_2 (symetrické rozšíření píku) a geometrickými charakteristikami t_M a w_α :

$$a_1 = t_M - w_\alpha \cdot K_\alpha(a_3) \equiv t_M - w_\alpha \cdot K_\alpha(q) \quad (39)$$

$$a_2 = w_\alpha \cdot L_\alpha(a_3) \equiv w_\alpha \cdot L_\alpha(q) \quad (40)$$

Hodnoty převodních parametrů K_α a L_α pro zvolené α závisí opět pouze na parametru a_3 a tedy skrze rovnici (38) na geometrické charakteristice asymetrie píku q .

Bohužel, závislost žádného z parametrů a_3 , K_α a L_α na geometrické charakteristice q nelze vyjádřit analytickým výrazem. Nicméně pro zvolenou hodnotu α a daný způsob vyjádření asymetrie píku q lze závislost těchto parametrů na hodnotě q určit numericky. To bylo v *Publikaci VI* provedeno pro $\alpha = 0,5$ a $q = T_{USP}$, protože $w_{0,5}$ a T_{USP} jsou geometrické charakteristiky píku odečítané automaticky softwarem ChemStation. Získané závislosti jsou uvedeny v *Publikaci VI* (Figure 1). Tyto závislosti byly zaneseny do souboru MS Excel (lze stáhnout ze stránek naší výzkumné skupiny [77]), který na jejich základě přepočítá geometrické charakteristiky t_M , $w_{0,5}$ a T_{USP} poskytnuté softwarem ChemStation na parametry příslušné HVL funkce a_1 , a_2 a a_3 .

Správnost takto určených parametrů byla v *Publikaci VI* ověřena jejich porovnáním s výsledky fitování píků pomocí programu Origin 8.1 a to jednak pro píky simulované v programu Simul 5 Complex [78], jednak pro reálný elektroferogram (*Publikace VI*, Table 1, Table 2, Figure 3). Shoda byla velmi dobrá. V případě reálného elektroferogramu byla chyba srovnatelná s frekvencí, s jakou jsou experimentální data přístrojem zaznamenávána.

Parametry HVL funkce spočtené výše uvedeným způsobem lze použít přímo – například parametr a_1 pro výpočet efektivní mobility analytu při jeho nekonečném zředění, nebo mohou sloužit jako velmi přesný počáteční odhad pro nelineární regresi.

Publikace VI

Determination of the correct migration time and other parameters of the Haarhoff–van der Linde function from the peak geometry characteristics

P. Dubský, M. Dvořák, L. Müllerová, B. Gaš

Electrophoresis 2015, 36, 655-661.

5 Závěr

Předkládaná dizertační práce byla zaměřena na matematický popis komplexujících systémů kapilární elektroforézy, ve kterých analyt interaguje se dvěma či více selektory, případně se vedle komplexací účastní ještě acidobazických rovnováh. Dále se práce zabývala stanovením správné efektivní mobility analytu v komplexujících systémech.

Pro popis systémů, kde plně nabitý analyt interaguje se záměrně připravenou směsí dvou selektorů, byl použit souhrnně-komplexační model. Tento model ukazuje, že pokud se nemění složení směsi (reprezentované molární frakcí prvního selektoru ve směsi), lze se směsí zacházet jako s jedním selektorem. Parametry komplexace analytu s tímto „souhrnným“ selektorem lze pro dané složení směsi pomocí tohoto modelu spočítat z parametrů charakterizujících komplexaci analytu s každým čistým selektorem zvlášť. Ze souhrnných komplexačních parametrů lze následně předpovědět závislost efektivní mobility analytu na celkové koncentraci směsi selektorů. Tento model poskytuje užitečný vhled do mechanismu separace díky tomu, že molární frakce prvního selektoru ve směsi může nabývat pouze hodnot od nuly do jedné, zatímco závislost efektivní mobility analytu, případně vhodného parametru charakterizujícího úspěšnost separace, jako je rozdíl nebo poměr mobilit separovaných analytů, sleduje tvar odpovídající komplexaci s jediným selektorem. Experimentálně byl tento koncept ověřen na modelovém systému dvou plně nabitých analytů a dvou různých dvojic neutrálních selektorů. Byla pozorována velmi dobrá shoda mezi předpovězenými a změřenými souhrnnými komplexačními parametry pro jednotlivé směsi a potvrdila se i schopnost modelu předpovídat závislost poměru mobilit analytů (selektivity) na celkové koncentraci směsi selektorů.

Analyty, kterými jsou často slabé kyseliny, báze nebo amfolyty, se mohou v systému vyskytovat ve více volných formách, mezi kterými se ustavují acidobazické rovnováhy. Každá z těchto forem pak může vytvářet komplexy s přítomnými selektory. Zahrnutím těchto rovnováh do souhrnně-komplexačního modelu byl vytvořen generalizovaný model elektromigrace v komplexujících systémech se stechiometrií komplexace 1:1. Tento model vůbec poprvé popisuje systémy, ve kterých více volných forem analytu interaguje s více selektory. Důležitou vlastností tohoto modelu je, že umožňuje nahlížet na tyto velmi složité systémy různými způsoby, ukazuje za jakých podmínek a jakým způsobem lze vzájemně provázané acidobazické a komplexační rovnováhy od sebe oddělit a pracovat s nimi

samostatně. Platnost modelu byla experimentálně ověřena na nejjednodušším možném, nicméně z praktického hlediska velmi významném, systému s více volnými formami analytu a s více selektory: slabou jednosytnou kyselinou jako analytem a dvěma cyklodextriny, z nichž jeden byl neutrální a jeden kladně nabitý. Pro dva různé způsoby předpovědi efektivní mobility analytu v takovém systému, které generalizovaný model umožňuje, byla pozorována shoda mezi predikcí a experimentem. Výsledky dále potvrdily, že v souladu s generalizovaným modelem je závislost elektivní mobility analytu na celkové koncentraci selektoru, původně odvozená pro jedinou formu volného analytu interagující s jediným selektorem, univerzálně použitelná pro systémy se stechiometrií komplexace 1:1 bez ohledu na to, zda jedna nebo více volných forem analytu interaguje s jedním nebo více selektory.

Ve druhé části této práce byla představena dvoudetektorová metoda umožňující stanovit správnou efektivní mobilitu analytu v systému, kde může nabitá interagující složka základního elektrolytu, například nabitý selektor, interagovat s markerem elektroosmotického toku. Stanovení správné efektivní mobility je klíčové pro určení komplexačních parametrů, se kterými pracují výše zmiňované elektromigrační modely. Pomocí navržené metody byla posouzena vhodnost čtyř populárních EOF markerů pro použití v základním elektrolytu obsahujícím jeden z nejčastěji používaných selektorů, nedefinovaně sulfatovaný β -cyklodextrin. Jako nejméně nevhodné markery se ukázaly dimethyl sulfoxid a nitromethan (nicméně i ty se selektorem slabě interagují).

Dále byl navržen způsob, kterým lze z geometrických charakteristik elektroforetického píku deformovaného elektromigrační disperzí určit parametr odpovídající HVL funkce, který má význam migračního času analytu při jeho nekonečném zředění, a to bez potřeby nelineární regrese. To značně usnadní vyhodnocení správných migračních časů a potažmo i efektivních mobilit a komplexačních parametrů v komplexujících systémech, ve kterých dochází k elektromigrační disperzi zón analytů, například z důvodu významného úbytku selektoru v zóně analytu v důsledku silné komplexace.

Literatura

- [1] Van Eeckhaut A., Michotte Y., *Electrophoresis* 2006, 27, 2880-2895.
- [2] Guebitz G., Schmid M. G., *J. Chromatogr. A* 2008, 1204, 140-156.
- [3] Schmitt U., Branch S. K., Holzgrabe U., *J. Sep. Sci.* 2002, 25, 959-974.
- [4] Juvancz Z., Bodane Kendrovics R., Ivanyi R., Szente L., *Electrophoresis* 2008, 29, 1701-1712.
- [5] Scriba G. K. E., *J. Sep. Sci.* 2008, 31, 1991-2011.
- [6] Cucinotta V., Contino A., Giuffrida A., Maccarrone G., Messina M., *J. Chromatogr. A* 2010, 1217, 953-967.
- [7] Lu H., Chen G., *Anal. Methods* 2011, 3, 488-508.
- [8] Stepanova N. D., Stepanov A. V., *Zh. Prikl. Khim.* 1969, 42, 1670-1673.
- [9] Chankvetadze B., *TrAC, Trends Anal. Chem.* 1999, 18, 485-498.
- [10] Wren S. A. C.; Rowe R. C., *J. Chromatogr.* 1992, 603, 235-241.
- [11] Riesova M., Svobodova J., Tosner Z., Benes M., Tesarova E., Gas B., *Anal. Chem.* 2013, 85, 8518-8525.
- [12] Benes M., Zuskova I., Svobodova J., Gas B., *Electrophoresis* 2012, 33, 1032-1039.
- [13] Mullerova L., Dubsy P., Gas B., *J. Chromatogr. A* 2015, 1384, 147-154.
- [14] Hruska V., Svobodova J., Benes M., Gas B., *J. Chromatogr. A* 2012, 1267, 102-108.
- [15] Benes M., Svobodova J., Hruska V., Dvorak M., Zuskova I., Gas B., *J. Chromatogr. A* 2012, 1267, 109-115.
- [16] Haarhoff P. C., van der Linde H. J., *Anal. Chem.* 1966, 38, 573-582.
- [17] Erny G. L., Bergstroem E. T., Goodall D. M., Grieb S., *Anal. Chem.* 2001, 73, 4862-4872.
- [18] Hruska V., Riesova M., Gas B., *Electrophoresis* 2012, 33, 923-930.
- [19] Penn S. G., Goodall D. M., Loran J. S., *J. Chromatogr.* 1993, 636, 149-152.
- [20] Uselova-Vcelakova K., Zuskova I., Gas B., *Electrophoresis* 2007, 28, 2145-2152.
- [21] Scriba G. K. E., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2001, 27, 373-399.
- [22] Jac P., Scriba G. K. E., *J. Sep. Sci.* 2013, 36, 52-74.
- [23] Wren S. A. C., *J. Chromatogr.* 1993, 636, 57-62.

- [24] Penn S. G., Bergstrom E. T., Goodall D. M., Loran J. S., *Anal. Chem.* 1994, 66, 2866-2873.
- [25] Wren S. A. C., *Electrophoresis* 1995, 16, 2127-2131.
- [26] Britz-McKibbin P., Chen D. D. Y., *J. Chromatogr. A* 1997, 781, 23-34.
- [27] Seals T. H., Sheng C., Davis J. M., *Electrophoresis* 2001, 22, 1957-1973.
- [28] Chankvetadze B., *J. Chromatogr. A* 1997, 792, 269-295.
- [29] Rogan M. M., Altria K. D., Goodall D. M., *Electrophoresis* 1994, 15, 808-817.
- [30] Rawjee Y. Y., Staerk D. U., Vigh G., *J. Chromatogr.* 1993, 635, 291-306.
- [31] Rawjee Y. Y., Williams R. L., Vigh G., *J. Chromatogr. A* 1993, 652, 233-245.
- [32] Williams B. A., Vigh G., *J. Chromatogr. A* 1997, 777, 295-309.
- [33] Zhu W., Vigh G., *Electrophoresis* 2000, 21, 2016-2024.
- [34] Lelievre F., Gareil P., Jardy A., *Anal. Chem.* 1997, 69, 385-392.
- [35] Rizzi A. M., Kremser L., *Electrophoresis* 1999, 20, 2715-2722.
- [36] Yang W.-C., Yu A.-M., Yu X.-D., Chen H.-Y., *Electrophoresis* 2001, 22, 2025-2031.
- [37] Mofaddel N., Krajian H., Villemin D., Desbene P. L., *Talanta* 2009, 78, 631-637.
- [38] Hammitzsch-Wiedemann M., Scriba G. K. E., *Anal. Chem.* 2009, 81, 8765-8773.
- [39] Chen F.-T. A., Shen G., Evangelista R. A., *J. Chromatogr. A* 2001, 924, 523-532.
- [40] Chankvetadze B., Blaschke G., *J. Chromatogr. A* 2001, 906, 309-363.
- [41] Schmitt U., Ertan M., Holzgrabe U., *Electrophoresis* 2004, 25, 2801-2807.
- [42] Lurie I. S., *J. Chromatogr. A* 1997, 792, 297-307.
- [43] Fillet M., Hubert P., Crommen J., *J. Chromatogr. A* 2000, 875, 123-134.
- [44] Lurie I. S., Klein R. F. X., Dal Cason T. A., LeBelle M. J., Brenneisen R., Weinberger R. E., *Anal. Chem.* 1994, 66, 4019-4026.
- [45] Surapaneni S., Ruterbories K., Lindstrom T., *J. Chromatogr. A* 1997, 761, 249-257.
- [46] Zhu X., Ding Y., Lin B., Jakob A., Koppenhoefer B., *J. Chromatogr. A* 2000, 888, 241-250.
- [47] Abushoffa A. M., Fillet M., Servais A.-C., Hubert P., Crommen J., *Electrophoresis* 2003, 24, 343-350.
- [48] Nhujak T., Sastravaha C., Palanuvej C., Petsom A., *Electrophoresis* 2005, 26, 3814-3823.
- [49] Schaeper J. P., Fox S. B., Sepaniak M. J., *J. Chromatogr. Sci.* 2001, 39, 411-419.

- [50] Abushoffa A. M., Fillet M., Marini R. D., Hubert P., Crommen J., *J. Sep. Sci.* 2003, 26, 536-542.
- [51] Abushoffa A. M., Fillet M., Hubert P., Crommen J., *J. Chromatogr. A* 2002, 948, 321-329.
- [52] Sepaniak M. J., Copper C. L., Whitaker K. W., Anigbogu V. C., *Anal. Chem.* 1995, 67, 2037-2041.
- [53] Szolar O. H. J., Brown R. S., Luong J. H. T., *Anal. Chem.* 1995, 67, 3004-3010.
- [54] Matthijs N., Van Hemelryck S., Maftouh M., Luc Massart D., Vander Heyden Y., *Anal. Chim. Acta* 2004, 525, 247-263.
- [55] Fillet M., Chankvetadze B., Crommen J., Blaschke G., *Electrophoresis* 1999, 20, 2691-2697.
- [56] Chankvetadze B., Burjanadze N., Crommen J., Blaschke G., *Chromatographia* 2001, 53, S296-S301.
- [57] Nemeth K., Varga E., Ivanyi R., Szeman J., Visy J., Jicsinszky L., Szente L., Forro E., Fueleop F., Peter A., Simonyi M., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2010, 53, 382-388.
- [58] Beni S., Sohajda T., Neumajer G., Ivanyi R., Szente L., Noszal B., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2010, 51, 842-852.
- [59] Tabi T., Magyar K., Szoeko E., *Electrophoresis* 2003, 24, 2665-2673.
- [60] Peng X., Bowser M. T., Britz-McKibbin P., Bebault G. M., Morris J. R., Chen D. D. Y., *Electrophoresis* 1997, 18, 706-716.
- [61] Kranack A. R., Bowser M. T., Britz-McKibbin P., Chen D. D. Y., *Electrophoresis* 1998, 19, 388-396.
- [62] Jiang C., Armstrong D. W., *Electrophoresis* 2010, 31, 17-27.
- [63] Dubsky P., Svobodova J., Gas B., *J. Chromatogr. B* 2008, 875, 30-34.
- [64] Dubsky P., Svobodova J., Tesarova E., Gas B., *Electrophoresis* 2010, 31, 1435-1441.
- [65] Riekkola M.-L., Joensuu J. A., Smith R. M., *Pure Appl. Chem.* 2004, 76, 443-451.
- [66] Wang W., Zhou F., Zhao L., Zhang J.-R., Zhu J.-J., *J. Chromatogr. A* 2007, 1170, 1-8.
- [67] Fuguet E., Rafols C., Bosch E., Roses M., *Electrophoresis* 2002, 23, 56-66.
- [68] Evans C. E., Stalcup A. M., *Chirality* 2003, 15, 709-723.
- [69] Kitagawa F., Otsuka K., *J. Chromatogr. B* 2011, 879, 3078-3095.
- [70] Matthijs N., Perrin C., Maftouh M., Massart D. L., Vander Heyden Y., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2001, 27, 515-529.
- [71] Williams B. A., Vigh G., *Anal. Chem.* 1997, 69, 4445-4451.

- [72] Cai H., Nguyen T. V., Vigh G., *Anal. Chem.* 1998, 70, 580-589.
- [73] Li S., Vigh G., *Electrophoresis* 2003, 24, 2487-2498.
- [74] Tutu E., Vigh G., *Electrophoresis* 2011, 32, 2655-2662.
- [75] Xu X., Kok W. T., Poppe H., *J. Chromatogr. A* 1996, 742, 211-227.
- [76] Gas B., Zuska J., Coufal P., van de Goor T., *Electrophoresis* 2002, 23, 3520-3527.
- [77] echmet.natur.cuni.cz [staženo 25. 5. 2015].
- [78] Svobodova J., Benes M., Dubsky P., Vigh G., Gas B., *Electrophoresis* 2012, 33, 3012-3020.

Přílohy

A. Seznam publikací

1. Determination of effective mobilities of EOF markers in BGE containing sulfated β -cyclodextrin by a two-detector method
L. Müllerová, P. Dubský, J. Svobodová, B. Gaš
Electrophoresis 2013, *34*, 768-776.
2. Separation efficiency of dual-selector systems in capillary electrophoresis
L. Müllerová, P. Dubský, B. Gaš
Journal of Chromatography A 2014, *1330*, 82-88.
3. Twenty years of development of dual and multi-selector models in capillary electrophoresis: A review
L. Müllerová, P. Dubský, B. Gaš
Electrophoresis 2014, *35*, 2688-2700.
4. Generalized model of electromigration with 1:1 (analyte:selector) complexation stoichiometry: Part I. Theory
P. Dubský, **L. Müllerová**, Martin Dvořák, B. Gaš
Journal of Chromatography A 2015, *1384*, 142-146.
5. Generalized model of electromigration with 1:1 (analyte:selector) complexation stoichiometry: Part II. Application to dual systems and experimental verification
L. Müllerová, P. Dubský, B. Gaš
Journal of Chromatography A 2015, *1384*, 147-154.
6. Determination of the correct migration time and other parameters of the Haarhoff-van der Linde function from the peak geometry characteristics
P. Dubský, M. Dvořák, **L. Müllerová**, B. Gaš
Electrophoresis 2015, *36*, 655-661.

B. Seznam konferenčních příspěvků

Přednášky

1. Effective mobilities of EOF markers in interacting BGE determined by a new two-detector method
L. Müllerová, P. Dubský, J. Svobodová, B. Gaš
12th International Symposium and Summer School on Bioanalysis, červenec 2012, Cluj-Napoca, Rumunsko
2. Properties of Dual-Cyclodextrin Separation Systems: Experimental Verification of Proposed Model
L. Müllerová, P. Dubský, B. Gaš
13th International Symposium and Summer School on Bioanalysis, červenec 2013, Debrecen, Maďarsko
3. Overall complexation: a useful description of dual-cyclodextrin separation systems in capillary electrophoresis
L. Müllerová, P. Dubský, B. Gaš
9th International Students Conference 'Modern Analytical Chemistry', září 2013, Praha, Česká republika
4. Interaction of a partly dissociated analyte with a dual selector system
L. Müllerová, P. Dubský, B. Gaš
Advances in Chromatography and Electrophoresis & Chiranal 2014, únor 2014, Olomouc, Česká republika
5. Can docking software predict chiral separation selectivity in HPLC?
L. Müllerová, T. Dzimbova
14th International Symposium and Summer School on Bioanalysis, červen/červenec 2014, Smolenice, Slovensko

Plakátová sdělení

1. Ion pairing of selected cations with dodecylsulfate micelles in electrophoretic systems
L. Müllerová, J. Lokajová, M. Riesová, B. Gaš
Advances in Chromatography and Electrophoresis & Chiral, únor 2010, Olomouc, Česká republika
2. Interactions of selected cations with dodecylsulfate micelles in electrophoretic systems
L. Müllerová, J. Lokajová, M. Riesová, B. Gaš
International Symposium on Microscale BioSeparation MSB, březen 2010, Praha, Česká republika
3. Determination of Alkaline Cation Mobility in Background Electrolytes Containing Micelles
L. Müllerová, P. Dubský, J. Svobodová, B. Gaš
HPLC 2011 – 36th International Symposium on High-Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, červen 2011, Budapešť, Maďarsko
4. Determination of effective mobilities of four popular EOF markers in BGE containing highly sulfated β -cyclodextrin
L. Müllerová, P. Dubský, J. Svobodová, B. Gaš
Advances in Chromatography and Electrophoresis & Chiral, červen 2012, Olomouc Česká republika
5. Two Detector Method for Determination of Accurate Effective Mobilities in Interacting BGE
L. Müllerová, P. Dubský, J. Svobodová, B. Gaš
ITP 2012 – 19th International Symposium, Exhibit & Workshops on Electro- and Liquid Phase-separation Techniques, září/říjen 2012, Baltimore, MD, USA
6. Separation by a Dual Mixture of Cyclodextrins Described by Overall Complexation Parameters
L. Müllerová, P. Dubský, B. Gaš
HPLC 2013 – 39th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, červen 2013, Amsterdam, Nizozemsko

7. An Electromigration Model of Partly Dissociated Analyte Interacting with a Dual Selector System – Simpler than Expected
L. Müllerová, P. Dubský, B. Gaš
ITP & LACE 2014 – 21st International Symposium on Electro- and Liquid Phase-Separation Techniques & 20th Latin-American Symposium on Biotechnology, Biomedical, Biopharmaceutical, and Industrial Applications of Capillary Electrophoresis and Microchip Technology, říjen 2014, Natal, RN, Brazílie

Jiné

1. PeakMaster for beginners (workshop)
L. Müllerová, M. Riesová
10th International Students Conference ‘Modern Analytical Chemistry’, září 2014, Praha, Česká republika
2. Computer Optimization of Electrolytes for Capillary Electrophoresis (Pre-Symposium Course)
L. Müllerová, M. Riesová, B. Gaš
ITP & LACE 2014 – 21st International Symposium on Electro- and Liquid Phase-Separation Techniques & 20th Latin-American Symposium on Biotechnology, Biomedical, Biopharmaceutical, and Industrial Applications of Capillary Electrophoresis and Microchip Technology, říjen 2014, Natal, RN, Brazílie