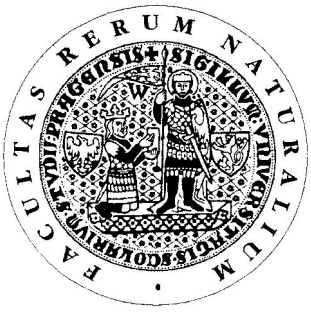
UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Lucie Maliňáková

STANOVENÍ DISOCIAČNÍCH KONSTANT A LIMITNÍCH MOBILIT VYBRANÝCH AMFOLYTŮ

Determination of Dissociation Constants and Limiting Mobilities of Some Ampholytes

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: Mgr. Martina Riesová

Praha 2011

Tato bakalářská práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru MSM0021620857.

Bakalářská práce byla vypracována na Katedře fyzikální a makromolekulární chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze pod vedením Mgr. Martiny Riesové.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci vypracovala 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 dne 22. srpna 2011

podpis

Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat vedoucí mé bakalářské práce Mgr. Martině Riesové za cenné rady, všestrannou a neocenitelnou pomoc, připomínky, metodické vedení práce a také trpělivost a ochotu. Dále bych chtěla poděkovat celé mojí rodině a příteli za velkou podporu.

Abstrakt

Kapilární zónová elektroforéza je jednoduchá a automatizovaná metoda, která umožňuje stanovit aciditní disociační konstanty a limitní iontové mobility analytů ze stejné série experimentů za malé spotřeby vzorku. Závislost efektivních mobilit 7 vybraných amfolytů na pH pufru byla experimentálně zjištěna v rozsahu pH 1,6 až 6,8. Sada jednoduchých pufrů s konstantní iontovou silou byla navržena pomocí programu PeakMaster. Analyzované amfolyty byly detekovány bezkontaktním vodivostním detektorem. Použitím dynamického potahování kapiláry se minimalizovala interakce analytů se silanolovými skupinami na vnitřní stěně kapiláry. Experimentálně zjištěné hodnoty efektivních mobilit byly proloženy (fitovány) vhodnou funkcí. Získanými parametry byly aktuální mobility a smíšené disociační konstanty odpovídající příslušné iontové síle. Pomocí rozšířeného Debye-Hückelova zákona s lineárním členem a Onsagerova zákona byly tyto hodnoty přepočítány na termodynamické disociační konstanty a limitní iontové mobility amfolytů.

Klíčová slova: kapilární zónová elektroforéza, disociační konstanta, limitní mobilita, amfolyty

Abstract

Capillary zone electrophoresis is a simple and automated method which enables simultaneous determination of the dissociation constants and limiting ionic mobilities of the analyte from one series of experiments. The small consumption of the sample is main advantage of this method. The dependence of the effective mobilities of 7 selected ampholytes on pH in the range of 1.6 to 6.8 was measured. A set of simple buffers with constant ionic strength and satisfactory buffering capacity was designed using computer program PeakMaster. The ampholytes were detected by contactless conductivity detector. Dynamic capillary coating was used to minimize interactions of analytes with silanol groups on the inner wall of the capillary. Experimentally obtained effective mobilities were fitted with the suitable function. Actual mobilities and the mixed dissociation constants corresponding to the actual ionic strength were parameters of the regression function. Thermodynamic dissociation constants and limiting ionic mobility of ampholytes were calculated using the extended Debye-Hückel law with the linear member and the Onsager law.

Key words: capillary zone electrophoresis, dissociation constant, limiting mobility, ampholytes

Obsah

Použité zkratky a symboly 8
1 Úvod 10
2 Teoretická část 12
2.1 Rešerše 12
2.2 Princip stanovení pK_a a limitních mobilit pro vybrané amfolyty 16
3 Cíle práce 20
4 Experimentální část 21
4.1 Vybrané amfolyty 21
4.2 Použité chemikálie, přístrojové vybavení 23
4.3 Příprava vzorků 25
4.4 Příprava pufrů 25
4.5 Potahování kapiláry 27
4.6 Experimentální podmínky 27
5 Zpracování a diskuse výsledků 28
6 Závěr 33
Použitá literatura 34
Přílohy 38

Použité zkratky a symboly

A	amfolyt	
A^-	aniontová forma amfolytu	
A^+	kationtová forma amfolytu	
a	aktivita i-tého druhu iontu	[-]
AAA	DL-2-aminoadipová kyselina	
AHIP	4-aminohippurová kyselina	
AIA	5-aminobenzen-1,3-dikarboxylová kyselina	
APAA	4-aminofenyloctová kyselina	
APBA	4-(4-aminofenyl)butanová kyselina	
$\boldsymbol{B_1}$	konstanta Onsagerovy rovnice, pro vodný roztok při 25°C má hodnotu 0,78171 $(mol/l)^{-1/2}$	
$\boldsymbol{B_2}$	konstanta Onsagerovy rovnice, pro vodný roztok při 25°C má hodnotu $3{,}138\times10^{-8}$ $m^2s^{-1}V^{-1}(mol/l)^{-1/2}$	
c	molární koncentrace i-tého druhu iontu	[mol/l]
$\boldsymbol{C}$	empirická konstanta rozšířeného Debey – Hückelova zákona s lineárním členem, její hodnota je 0,1 mol/l	
CCYS	S-karboxymetyl-L-cystein	
CZE	kapilární zónová elektroforéza	
DMSO	dimethylsulfoxid	
DS	dextran síran	
EOF	elektroosmotický tok	
GG	glycin-glutamová kyselina	
HVL funkce	Haarhoffova-van der Lindeho funkce	
I	iontová síla	[mol/l]
K_a	aciditní disociační konstanta	
kap.	kapitola	
l_{det}	délka kapiláry k detektoru	[m]
l_{tot}	celková délka kapiláry	[m]

M	mol/l	
$m_{A+(-)}$	aktuální iontová mobilita kationtové (aniontové) formy	$[m^2V^{-1}s^{-1}]$
m_{ef}	efektivní mobilita	$[m^2V^{-1}s^{-1}]$
MES	4-Morpholineethanesulfononová kyselina	
$m_{lim,+(-)}$	limitní iontová mobilita kationtové (aniontové) formy	$[m^2V^{-1}s^{-1}]$
Obr.	obrázek	
PB	Polybren – hexadimethrin bromid	
pH_{teor}	pH teoreticky vypočítané	
pH_{exp}	pH experimentálně změřené	
pK_a	záporný dekadický logaritmus pravé disociační konstanty	
pK_a^{mix}	záporný dekadický logaritmus smíšené disociační konstanty	
PM	PeakMaster	
s	směrodatná odchylka	
t	migrační čas analytu	[s]
t_{EOF}	migrační čas markeru EOF	[s]
Δt	rozdíl migračních časů analytu detektoru A a B	
Δt_{EOF}	rozdíl migračních časů EOF detektoru A a B	
Tab.	tabulka	
U	napětí	[V]
UV	ultrafialová oblast záření	
VIS	viditelná oblast záření	
z_i	nábojové číslo *i*-tého druhu iontu	
γ_i	aktivitní koeficient *i*-tého druhu iontu	

1 Úvod

Počátky elektromigračních metod se datují již do počátků 19. století, kdy první experimenty provedl roku 1808 německý doktor a vědec působící na Moskevské univerzitě Ferdinand Friedrich von Reuss v tzv. U trubicích. Objevil jev nazvaný elektroosmóza, tedy pohyb kapaliny porézním prostředím obsahujícím elektrolyt vlivem elektrického pole. Dalším významným milníkem je rok 1897, kdy německý fyzik Friedrich Kohlrausch odvodil rovnici dnes známou pod názvem Kohlauschova regulační funkce a položil tak základy teoretickému popisu elektromigrace.

První elektroforetická aparatura byla sestavena Tiseliem až roku 1937. Umožňovala dělení proteinů krevního séra podle jejich rozdílných rychlostí pohybu v elektrickém poli. O 11 let později za to získal Nobelovu cenu. Tiselius tak položil základy k využití elektroforetických metod v analytické chemii.

V průběhu druhé poloviny 20. století docházelo k postupnému vývoji, zdokonalování a dělení elektroforetických metod. Objevila se např. izoelektrická fokusace a izotachoforéza. První laboratorní zařízení pro kapilární elektroforézu bylo sestaveno roku 1967 švédským vědcem a profesorem S. Hjerténem. Elektroforetickou separaci proteinů, nukleových kyselin a anorganických iontů provedl v 3mm podélně rotujících trubicích. Roku 1981 zažila kapilární elektroforéza obrovský skok. J. W. Jorgenson a K. D. Lukacsová popsali separaci různých látek (aminokyselin, dipeptidů, aminů) ve velmi tenké křemenné kapiláře s vnitřním průměrem pouhých 75 μm. Separační účinnost tohoto provedení byla v porovnání s tehdy velmi rozšířenou a oblíbenou kapalinovou chromatografií nesrovnatelně vyšší. Tím započala nová éra kapilární elektroforézy. S rozvojem technologií byla dalším nevyhnutelným krokem automatizace většiny analytických metod, nevyjímaje kapilární elektroforézu. První plně automatizované komerční zařízení pro kapilární zónovou elektroforézu (CZE) bylo představeno roku 1989 společností Beckman Instruments.[1,2]

Kapilární zónová elektroforéza je jednoduchá, přesná a levná analytická metoda. Nejčastěji je využívána v oblasti potravinářství, medicíny, farmacie a

životního prostředí. Umožňuje rychlou a účinnou separaci a jednoduchou identifikaci sledovaných analytů. Provedením vhodně navržených sérií experimentů navíc umožňuje stanovení fyzikálně-chemických charakteristik analytů, např. disociačních konstant a limitních iontových mobilit.

Farmaceutické společnosti musí charakterizovat velké množství potenciálních léků a chemických prekurzorů v relativně krátkém čase, aby mohly vybrat ty, které jsou nejvíce vhodné pro další testování a vývoj. Potřeba rychlého patentování nových nadějných léků je pro takovéto společnosti zásadní. Soutěží mezi sebou o možnostech využití stejných či podobných sloučenin a jejich způsobu aplikace, což ospravedlňuje vzrůstající poptávku po rychlých a spolehlivých technikách umožňující fyzikálně-chemickou charakterizaci potenciálních léků.[3] Takovou technikou může být právě CZE.

Existují počítačové programy, např. PeakMaster (PM) a Simul, které jsou schopny předpovídat elektroforetické experimenty, chování použitých elektrolytů i analytů. Vstupními hodnotami pro takové výpočty jsou právě disociační konstanty a limitní iontové mobility daných látek. Znalost těchto hodnot nám tedy umožňuje nejenom odhalit fyzikálně-chemické vlastnosti látek, ale i využít zmíněných programů pro rychlou optimalizaci separačních podmínek bez nutnosti provádět zdlouhavé experimentální hledání nejvhodnějších systémů. Dále můžeme pomocí těchto programů nahlédnout i hlouběji do světa elektromigrace a objevit systémy, které by byly experimentálně nalezeny jen velmi obtížně. Příkladem takových systémů jsou základní elektrolyty vykazující oscilační chování.

Za účelem najít nové oscilující systémy byly zvoleny vybrané amfolyty. Jelikož u těchto látek nebyly doposud disociační konstanty a limitní iontové mobility známy, stalo se určení těchto konstant předmětem této práce.

2 Teoretická část

2.1 Rešerše

Hodnota disociační konstanty, obvykle vyjadřována jako aciditní disociační konstanta, K_a, či její záporný dekadický logaritmus, pK_a, je základní vlastností všech slabých kyselin a zásad. Je to důležitá vlastnost charakterizující tyto látky, protože fyzikálně-chemické vlastnosti ionizované a neutrální formy jsou zpravidla rozdílné. Ionizovaná forma je více rozpustná ve vodě, zatímco neutrální forma je více lipofilní a snadněji prochází biologickými membránami. Míra ionizace je jednou z řady hlavních vlastností používaných k odhadu absorpce, distribuce, metabolismu a vylučování látek biologickými systémy a životním prostředím. Tyto vlastnosti jsou rozhodující pro výzkum a vývoj nových lidských a veterinárních léků apod.[4]

Aciditní disociační konstantu sloučenin lze stanovit mnoha analytickými metodami. Každá metoda má své výhody, nevýhody i omezení. Výběr metody je tak závislý na látkách, jejichž disociační konstanty jsou stanovovány. Příkladem nejvíce užívaných metod jsou potenciometrická titrace, konduktometrie, spektrofotometrické metody (UV/VIS spektroskopie), NMR spektroskopie, kalorimetrie, fluorimetrická titrace[5], kapilární zónová elektroforéza a izotachoforéza. Nemalý význam mají i výpočetní programy pro odhady disociačních konstant[6].

Potenciometrická titrace je nejvíce vhodná pro ve vodě rozpustné sloučeniny, jiná rozpouštědla stanovení aciditní disociační konstanty značně komplikují. Další nevýhodou je výběr vhodných elektrod a potřeba vysoké čistoty vzorku. Potenciometrickým stanovením pK_a hodnot vybraných antibiotik a porovnáním dat s již známými hodnotami získanými jinými metodami se zabývá práce Qianga a Adamse[7]. Meloun a kol. pomocí potenciometrické titrace stanovili smíšené disociační konstanty vazokonstrikční látky Naphazolinu, která se používá například v očních kapkách, při různých iontových silách a teplotách 25 °C a 37 °C. Dále odhadli termodynamické disociační konstanty pro tyto teploty[8].

Konduktometrická metoda je málo spolehlivá pro stanovení velmi slabých elektrolytů.

Spektrofotometrické titrace jsou použitelné pro sloučeniny rozpustné ve vodě a sloučeniny o vysoké čistotě (nebo přinejmenším nesmí obsahovat interferující látky). Největší výhodou této metody je vysoká citlivost (> 10^{-6} M) pro sloučeniny s příznivým absorpčním koeficientem. V tomto případě musí vzorek také vlastnit chromofor/y blízko ionizovaných skupin tak, že neutrální a ionizované formy vykazují dostatečně odlišné spektrální vlastnosti pro jejich identifikaci ve směsi těchto dvou forem[4]. Přehled současných metod, zejména potenciometrických, konduktometrických a spektrofotometrických, pro stanovení disociačních konstant organických látek v roztoku lze najít v práci Zevatskiiho a kol.[9].

V případě stanovování pK_a izotachoforeticky jsme omezováni hodnotou pH vedoucího a koncového elektrolytu a jejich složením[10].

Vysoce rozšířenou metodou pro stanovení pK_a je kapilární elektroforéza, přesněji kapilární zónová elektroforéza. Nespornými výhodami této metody je automatizace a požadavek pouze malého množství vzorku a jiných reagencí. Spotřeba vzorku je tedy nepatrná. Také není nutné mít vysoce čistý vzorek, protože případné nečistoty jsou odděleny od analytu v průběhu separace. O porovnání potenciometrického a elektroforetického stanovení pK_a je více v práci Andrasiho a kol.[11]. Foulon a jeho spolupracovníci zanalyzovali 10 látek (slabých kyselin – benzoxa-, benzothio- a benzoseleno- derivátů zolinonu) pomocí kapilární elektroforézy a potvrdili hodnoty disociačních konstant získané potenciometrickou a UV spektrofotometrickou metodou[12].

Další velkou výhodou CZE je možnost společně s disociační konstantou stanovit i limitní mobility sledovaných analytů ze stejné série experimentů. Tohoto spojení se využívá často a lze proto najít řadu prací, které se tímto problémem zabývají. Některé práce se věnují přímo stanovení disociačních konstant amfolytů, zejména aminokyselin. Příkladem může být práce Yanga a Juana[13], ve které byly stanovovány pK_a konstanty 11 L-aminokyselin. Pro výpočet disociačních konstant z pH a odpovídajících efektivních mobilit vytvořili autoři program v programovacím jazyce C++. Získané hodnoty byly ve shodě s hodnotami pK_a uvedenými v literatuře. Kationické pK_a vybraných aminokyselin i limitní iontové mobility kladně nabitých forem byly stanoveny v práci Včelákové a kol.[14] a následně Zusková a kol.[15] provedli stejná stanovení při velmi nízkých hodnotách pH. Rychlou metodu pro určení pK_a 20

aminokyselin vyvinuli Henchoz a kol.[16]. Ke zkrácení času analýzy použili dávkování do kratšího konce kapiláry a velmi rychlého elektroosmotického toku (EOF). Ve všech třech uvedených pracích[14,15,16] byl použit bezkontaktní vodivostní detektor. V práci Plassona a Cotteta[17] byly určovány disociační konstanty peptidů s maximálním počtem 10 aminokyselinových zbytků při různých hodnotách iontové síly (10 a 100 mM) a teploty (15 – 60 °C). Pro každou skupinu peptidů byla hodnota pK_a určena jako funkce teploty, iontové síly a počtu aminokyselinových zbytků. Tato experimentální data a semiempirický model jsou použity k předpovědi pK_a hodnot jakéhokoliv oligopeptidu, který má neutrální postranní řetězec. Vstupními daty jsou pouze počet aminokyselinových zbytků a pK_a koncových aminokyselin v jejich volné formě. Disociační konstanty slabých amfolytických heterocyklických bází byly stanoveny v práci Kašičkovy skupiny[18].

Hodnoty pK_a cefalosporinů[19] a nových léčivých forem bazických[20] jsou stanoveny pomocí CZE jako metody nové a pomocí potenciometrické titrace jako metody srovnávací. Disociační konstanty chinolonů, antibakteriálních látek, jejichž aktivity závisí na míře protonizace, byly stanoveny v práci Barbosy a kol.[21]. Šlampová a kol. navrhli standardizovaný systém pufrů pro měření disociačních konstant slabých kyselin[22] a slabých zásad[23]. Systémy jsou navrženy tak, aby měly konstantní iontovou sílu. Pro slabé báze obsahují jako protiion pouze Cl^-, pro slabé kyseliny jen Na^+. Urychlením doby analýzy pomocí dynamického potažení stěn kapiláry se zabývá práce Geisera a kol.[24].

V nedávné době byla objevena nová a rychlá CZE metoda pro stanovení aciditních disociačních konstant slabých kyselin a zásad, které jsou schopny odštěpit pouze jeden proton. Je založena na užití vnitřního standardu, sloučeniny podobné povahy a hodnoty disociační konstanty jako má analyt. Na rozdíl od předešlých metod, kdy je nutné proměřit závislost efektivní mobility na pH v dostatečně širokém rozsahu pH, vyžaduje tato metoda pouze 2 měření. První měření je při pH, při kterém jsou analyt i vnitřní standard úplně ionizovány a druhé měření při jiném pH, kdy jsou oba ionizovány pouze částečně. Metoda není závislá na pH, a proto není potřeba znát přesné hodnoty pH pufrů. Hlavní výhodou této metody je, že užití vnitřního standardu kompenzuje systematické chyby. Průměrná doba analýzy je pouze 20 minut[25,3].

Při provádění experimentů v CZE je žádoucí redukovat nebo vyloučit interakci analytů se stěnou kapiláry, přizpůsobit velikost a směr EOF k získání rychlejší separace a zlepšit reprodukovatelnost výsledků. Toto všechno jsou důvody pro chemickou modifikaci vnitřní stěny kapiláry – potahování kapiláry, *coating*.

Často užívaná metoda je dynamické potahování kapiláry. Křemenná kapilára se promývá roztokem obsahujícím potahovací činidlo, což může být polymer nebo nízkomolekulární látka. Dochází k adsorpci činidla prostřednictvím volných silanolových skupin na stěnách křemenné kapiláry. Dlouhodobé používání kapiláry vymývá potahovací činidlo ze stěny kapiláry a separační účinnost i reprodukovatelnost se snižuje[26]. Dynamické potahování proto vyžaduje regeneraci.
Základní dělení polymerních potahovacích činidel[27]:

- neutrální polymery (např. polyvinylalkohol)
- záporně nabité polymery (např. dextran síran – DS)
- kladně nabité polymery (např. Polybrene – PB)

Volbou potahovacího činidla je ovlivněn směr a velikost EOF.

Potažení stěny kapiláry může být v jedné či více vrstvách – vícenásobné iontové polymerní vrstvy, které se postupným promýváním kapiláry nanášejí postupně jedna na druhou[28,29].

Přehled potahovacích metod a činidlech lze nalézt v souhrnných článcích různých autorů[30,31,32].

Amfolyty pro tuto práci byly vybrány pro jejich potenciální schopnost vytvořit elektroforetický systém, který by vykazoval oscilační chování. Toto oscilační chování, objevené nedávno Gašovou skupinou, je označováno jako elektromigrační oscilace. Jsou způsobeny komplexní hodnotou systémové mobility, což vede při průchodu proudu k chaotickému chovaní, projevujícímu se jako periodické změny koncentrací všech iontů v základním elektrolytu. Jako první byl objeven systém sestávající se z kyseliny sebakové a imidazolu[33]. Následně bylo nalezeno několik třísložkových systémů[34]. Žádný z oscilujících systémů zatím neobsahoval amfolyt.

2.2 Princip stanovení pK_a a limitních mobilit pro vybrané amfolyty

Při stanovování pK_a a limitních iontových mobilit vybraných amfolytů bylo postupováno podle práce Včelákové a kol.[12], kde je princip stanovení těchto konstant pro různé druhy aminokyselin důkladně zpracován. Pro přehlednost je zde tento postup nastíněn.

Všechny námi vybrané amfolyty mají jednu amino skupinu a jednu či dvě karboxylové skupiny (viz Tab. 1, kap. 4.1). Lze je tedy řadit mezi aminokyseliny. Pro plánované výpočty v programu PeakMaster (PM) a pro posouzení, zda mohou dané aminokyseliny poskytnout oscilační chování jsou rozhodující pouze disociační konstanty pro formy A^+ a A^-, kde A označuje amfolyt. Rovnováhy lze zapsat takto:

$$\begin{aligned} A^+ &\leftrightarrow A^0 + H^+ \\ A^0 &\leftrightarrow A^- + H^+ \end{aligned} \qquad (1.1)$$

U aminokyselin, které mají dvě karboxylové skupiny a lze tedy získat i formu A^{2-}, je uvažována disociace pouze do stavu A^-. Z Tab. 2., kap. 4.1, kde jsou uvedeny odhady všech disociačních konstant vybraných látek, je patrné, že případnou disociaci do stavu A^{2-} je v kyselé oblasti pH možné zanedbat. Výjimkou je 5-aminobenzen-1,3-dikarboxylová kyselina (AIA), kde je hodnota $pK_{a,3}$ nízká a zanedbání deprotonizace aminové skupiny (a tím tedy formy A^{2-}) je jen hrubým přiblížením.

Termodynamické (K_a) a smíšené disociační konstanty (K_a^{mix}) obou rovnováh lze vyjádřit jako:

$$K_{a,1} = \frac{a_{A^0} \cdot a_{H^+}}{a_{A^+}} \quad \text{a} \quad K_{a,1}^{mix} = \frac{c_{A^0} \cdot a_{H^+}}{c_{A^+}} \qquad (1.2)$$

$$K_{a,2} = \frac{a_{A^-} \cdot a_{H^+}}{a_{A^0}} \quad \text{a} \quad K_{a,2}^{mix} = \frac{c_{A^-} \cdot a_{H^+}}{c_{A^0}}, \qquad (1.3)$$

kde $a_{A^-}, a_{A^+}, a_{A^0}$ jsou aktivity aniontové, kationtové a nedisociované formy amfolytu a a_{H^+} aktivita vodíkových iontů, $c_{A^0}, c_{A^+}, c_{A^-}$ jsou molární koncentrace nedisociované, kationtové a aniontové formy amfolytu a c_{H^+} je molární koncentrace vodíkových iontů.

Smíšené disociační konstanty se zavádějí proto, že se při jejich výpočtu využívá jednodušeji experimentálně dosažitelných veličin – molárních koncentrací místo aktivit jednotlivých iontů. Zůstává zde pouze aktivita vodíkových iontů, kterou snadno změříme jako její záporný dekadický logaritmus – pH.

Princip stanovení disociačních konstant a limitních iontových mobilit je postaven na měření závislosti efektivní pohyblivosti (m_{ef}) na pH při konstantní iontové síle. Efektivní mobilita látky je dána příspěvky jednotlivých iontových forem dané látky. Pro efektivní mobility amfolytu, jehož disociaci lze popsat rovnicemi (1.1) platí:

$$m_{ef} = \frac{m_{A^+} \cdot c_{A^+} + m_{A^-} \cdot c_{A^-}}{c} \tag{1.4}$$

kde m_{A^-}, m_{A^+} jsou aktuální kationtové/aniontové mobility, c_{A^+} a c_{A^-} jsou koncentrace kationtové a aniontové formy a c je celková koncentrace amfolytu.

Vyjádřením příslušných $pK_{a,1}^{mix}$ a $pK_{a,2}^{mix}$ pomocí koncentrací z rovnic (1.2) a (1.3) a jejich dosazením do rovnice (1.4) lze získat závislost efektivní mobility na pH:

$$m_{ef} = \frac{m_{A^+} \cdot 10^{(pK_{a,1}^{mix} - pH)} - m_{A^-} \cdot 10^{(pH - pK_{a,2}^{mix})}}{10^{(pK_{a,1}^{mix} - pH)} + 10^{(pH - pK_{a,2}^{mix})} + 1} \tag{1.5}$$

Tato funkce je použita pro proložení (fitování) experimentálně získaných dat a má 4 fitovací parametry – aktuální iontové mobility m_{A^-} a m_{A^+} a dvě smíšené disociační konstanty $pK_{a,1}^{mix}$ a $pK_{a,2}^{mix}$.

Limitní mobilitu dané iontové formy lze pak získat pomocí Onsagerova zákona:

$$m_{+} = m_{\mathrm{lim},+} - \left(m_{\mathrm{lim},+} \cdot \boldsymbol{B_1} \cdot \frac{q}{1+\sqrt{q}} + z_{+} \cdot \boldsymbol{B_2} \right) \cdot \frac{\sqrt{I}}{1+1,5\sqrt{I}}, \tag{1.6}$$

kde I je iontová síla pufru, $\boldsymbol{B_1}$ a $\boldsymbol{B_2}$ jsou konstanty a pro vodný roztok při teplotě 25°C mají hodnoty $B_1 = 0{,}78171\ (\mathrm{mol/l})^{-1/2}$ a $B_2 = 3{,}138\times10^{-8}\ \mathrm{m^2 s^{-1} V^{-1}}\ (\mathrm{mol/l})^{-1/2}$ a hodnota q pro symetrický elektrolyt je ½.

Po úpravě vztahu (1.6) lze tedy pro výpočet kationtové limitní iontové mobility ($m_{\mathrm{lim},+}$) získat vztah:

$$m_{\mathrm{lim},+} = \frac{m_{+} + \dfrac{z_{+} \cdot \boldsymbol{B_2} \cdot \sqrt{I}}{1+1,5 \cdot \sqrt{I}}}{1 - \left(\dfrac{\boldsymbol{B_1} \cdot q \cdot \sqrt{I}}{\left(1+1,5 \cdot \sqrt{I}\right) \cdot \left(1+\sqrt{q}\right)} \right)} \tag{1.7}$$

Obdobné vztahy platí i pro aniontovou formu.

Pro přepočet smíšené disociační konstanty na pravou disociační konstantu lze vyjít z následujícího vztahu:

$$\mathrm{K_{a,1}} = \frac{a_{\mathrm{A^0}} \cdot a_{\mathrm{H^+}}}{a_{\mathrm{A^+}}} = \frac{a_{\mathrm{H^+}} \cdot c_{\mathrm{A^0}} \cdot \gamma_{\mathrm{A^0}}}{c_{\mathrm{A^+}} \cdot \gamma_{\mathrm{A^+}}}, \tag{1.8}$$

kde $\gamma_{\mathrm{A^+}}$ a $\gamma_{\mathrm{A^0}}$ jsou aktivitní koeficienty kladné a nenabité formy.

Aktivitní koeficient nenabité formy je roven jedné. Porovnáním s rovnicí (1.2) lze tedy termodynamickou disociační konstantu vyjádřit:

$$\mathrm{K_{a,1}} = \frac{\mathrm{K_{a,1}^{mix}}}{\gamma_{\mathrm{A^+}}} \tag{1.9}$$

Obdobně lze získat pro $K_{a,2}$ vztah:

$$K_{a,2} = K_{a,2}^{mix} \cdot \gamma_{A^-} \tag{1.10}$$

kde γ_{A^-} je aktivitní koeficient aniontové formy.

Aktivitní koeficient γ_i vypočítáme pomocí rozšířeného Debey – Hückelova zákona s lineárním členem:

$$-\log \gamma_i = \frac{0,509 \cdot z_i^2 \cdot \sqrt{I}}{1+1,5\sqrt{I}} + \boldsymbol{C}I, \tag{1.11}$$

kde I je iontová síla pufru, z_i je nábojové číslo i-tého druhu iontu a $\boldsymbol{C}$ je empirická konstanta mající hodnotu 0,1 mol/l.

3 Cíle práce

Cíle mé práce byly následující:

1) V rešeršní části práce podat přehled o používání kapilární zónové elektroforézy jako metody pro stanovení disociačních konstant i limitních iontových mobilit analytů

2) Z literatury vybrat postup stanovení vhodný pro námi vybrané amfolyty

3) V programu Sparc online calculator získat odhady disociačních konstant námi vybraných amfolytů a zvolit pro měření vhodnou škálu pH.

4) V programu PeakMaster navrhnout sadu jednoduchých pufrů vhodných z hlediska pH, iontové síly a pufrační kapacity

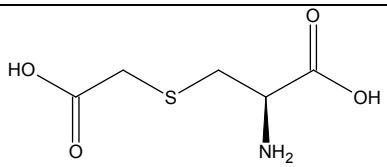
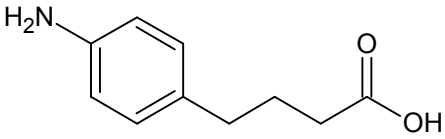
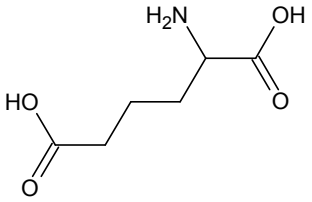
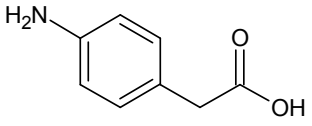
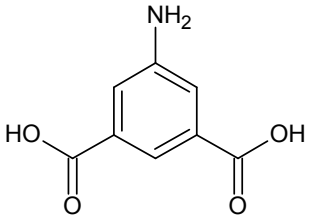
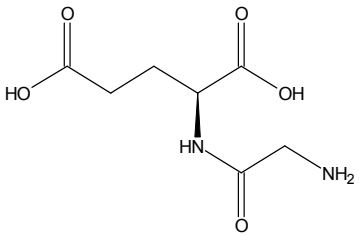
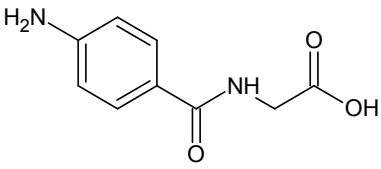
5) Naměřit a vyhodnotit příslušné série experimentů a ze závislostí efektivních mobilit analytů na pH získat hodnoty disociačních konstant a limitních iontových mobilit námi vybraných látek

4 Experimentální část

4.1 Vybrané amfolyty

V sortimentu firmy Sigma-Aldrich bylo vytipováno 7 amfolytů – aminokyselin (Tab. 1), které se, na základě odhadnutých pK_a pro kationtovou ($pK_{a,1}$) a aniontovou formu ($pK_{a,2}$) forem, jevily jako vhodné amfolyty pro pátrání po nových oscilujících systémech. U těchto vybraných látek byly stanoveny příslušné disociační konstanty a limitní iontové mobility. Odhadované hodnoty $pK_{a,1}$ a $pK_{a,2}$, tak jak byly vypočítány programem Sparc online calculator[35], jsou uvedeny v Tab. 2. Zde jsou vypsány i hodnoty $pK_{a,3}$ (tedy disociační konstanty forem A^{2-}) pro aminokyseliny se dvěma karboxylovými skupinami (CCYS, AAA, AIA, GG).

Tabulka 1: Názvy, zkratky a vzorce vybraných amfolytů

Název	Zkratka	Vzorec
S-karboxymetyl-L-cystein	**CCYS**	
4-(4-aminofenyl)butanová kyselina	**APBA**	
DL-2-aminoadipová kyselina	**AAA**	
4-aminofenyloctová kyselina	**APAA**	
5-aminobenzen-1,3-dikarboxylová kyselina	**AIA**	
glycin-glutamová kyselina	**GG**	
4-aminohippurová kyselina	**AHIP**	

Tabulka 2: Hodnoty pK_a vzorků odhadnuté programem Sparc online calculator

	Odhad $pK_{a,1}$	Odhad $pK_{a,2}$	Odhad $pK_{a,3}$
CCYS	1,83	3,42	8,44
APBA	4,49	5,31	-
APAA	4,09	5,36	-
AAA	2,26	4,45	9,71
AIA	2,41	3,48	5,10
GG	3,20	4,68	8,07
AHIP	2,71	4,15	-

4.2 Použité chemikálie, přístrojové vybavení

Pro experimenty byly použity následující chemikálie v uvedené čistotě, přístrojové vybavení, počítačové programy a další pomůcky:

Přístrojové vybavení

Agilent ^{3D}CE Instrument - Agilent Technologies,Waldbronn, Německo
přístroj je vybaven vestavěným spektrofotometrickým UV/VIS detektorem s diodovým polem, umožňujícím měření v rozsahu vlnových délek 190 – 600 nm, a dvěma bezkontaktními vodivostními detektory zařazenými za sebou,
data byla zpracována programem ^{3D}CE ChemStatiton
pH - metr – PHM 240, Radiometr Analytical SAS, Villeurbanne Cedex, Francie
analytické váhy – Mettler AE 240, Greifensee, Švýcarsko
ultrazvuková lázeň – Ultrasonic LC 30, ELMA, Německo

Počítačové programy

^{3D}CE ChemStatiton, PeakMaster[36], Sparc online calculator[35], Origin 6.1, MS Excel

Chemikálie

Název, čistota	**Výrobce**
amfolyty:	
4-(4-aminofenyl)butanová kyselina, 95%	Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo
5-aminobenzen-1,3-dikarboxylová kyselina, 94%	
S-karboxymetyl-L-cystein	
DL-2-aminoadipová kyselina, ≥ 99%	
4-aminofenyloctová kyselina, 98%	
4-aminohippurová kyselina	
glycin-glutamová kyselina	
přípravu pufrů:	
MES, nízký obsah vlhkosti, ≥ 99%	
hydroxid lithný – monohydrát, ≥ 99%	
glycin, > 99%	
kyselina chloroctová, ≥ 99%	
kyselina octová, min 99.5%	Fluka Biochemika, Buchs, Švýcarsko
kyselina mravenčí, min 98%	Lachema, Brno, Česká republika
potahování kapiláry:	
Hydroxid sodný – Titrisol,0,1 mol/l	Merck, Darmstadt, Německo
hexadimethrin bromid (Polybren),	Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo
dextran síran, sodná sůl	Fluka Biochemika, Buchs, Švýcarsko
jiné:	
methanol Chromasol, min 99%	Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo
dimethylsulfoxid (DMSO), 99%	
deionizovaná voda	zařízení Ultrapur – Watrex, Praha, Česká republika

Ostatní pomůcky

diskové filtry Minisart – 0.45 μm, Sartorius Stedim Biotech, Cedex, Francie

stříkačky Injektuer Solo – 10 ml, B. Braun, Melsungen, Německo

4.3 Příprava vzorků

Všechny vzorky byly připraveny o koncentraci 10 mmol/l, pouze AHIP o koncentraci 40 mmol/l. Navážená množství byla rozpuštěna v 5 ml deionizované vody, pouze AIA a APAA byly rozpuštěny v 5 ml methanolu. Roztoky byly ponechány v ultrazvukové lázni cca 10 min, aby bylo zajištěno úplné rozpuštění a poté přefiltrovány přes filtr s póry o velikosti 0,45 μm do uzavíratelných plastových nádobek.

4.4 Příprava pufrů

Bylo připraveno 30 pufrů o pH v rozmezí přibližně 1,6 až 6,8, což zajišťovalo s ohledem na odhadnuté hodnoty disociačních konstant, dostatečnou škálu pH pro stanovení $pK_{a,1}$ a $pK_{a,2}$ a limitních iontových mobilit zkoumaných aminokyselin. Složení těchto pufrů bylo navrženo pomocí programu PeakMaster (PM)[36,37]. Pufry byly navrženy tak, aby byly co nejjednodušší a měly konstantní hodnotu iontové síly (30 mmol/l). Složení jednotlivých pufrů, jejich teoretické hodnoty pH (pH_{teor}), které byly vypočítány v PM a experimentálně zjištěné hodnoty pH (pH_{exp}) jsou uvedeny v Tab. 3.

Zásobní roztoky jednotlivých složek pufrů byly připraveny do 50ml nádob navážením či odpipetováním spočteného množství látek a jejich následného rozpuštění v deionizované vodě. Roztoky poté byly přefiltrovány. Výsledné pufry byly připraveny smícháním příslušných složek pufrů a doředěním roztoků deionizovanou vodou do 25ml nádob na požadovanou koncentraci.

Následně byly u všech pufrů změřeny hodnoty pH.

Tabulka 3: Složení pufrů a jejich pH

Číslo pufru	pH_{teor}	pH_{exp}	kyselina chloroctová	glycin	LiOH	kyselina mravenčí	kyselina octová	MES
			mM	mM	mM	mM	mM	mM
1	1,603	1,600	500	1	-	-	-	-
2	1,801	1,841	328	14,5	-	-	-	-
3	1,994	2,021	221	25,5	-	-	-	-
4	2,203	2,195	148	37,5	-	-	-	-
5	2,408	2,411	103,5	52	-	-	-	-
6	2,598	2,590	77,5	71	-	-	-	-
7	2,717	2,715	66	87	-	-	-	-
8	2,972	3,005	50	-	28,7	-	-	-
9	3,271	3,220	-	-	30	110	-	-
10	3,472	3,447	-	-	30	80	-	-
11	3,692	3,641	-	-	30	60	-	-
12	3,826	3,826	-	-	30	-	250	-
13	4,054	4,038	-	-	30	-	160	-
14	4,213	4,200	-	-	30	-	120	-
15	4,389	4,351	-	-	30	-	90	-
16	4,565	4,490	-	-	30	-	70	-
17	4,69	4,614	-	-	30	-	60	-
18	4,866	4,875	-	-	30	-	50	-
19	4,991	4,924	-	-	30	-	45	-
20	5,167	5,117	-	-	30	-	40	-
21	5,321	5,247	-	-	30	-	37	-
22	5,468	5,043	-	-	30	-	35	-
23	5,689	5,551	-	-	30	-	33	-
24	5,602	5,724	-	-	30	-	-	110
25	5,806	5,928	-	-	30	-	-	80
26	6,028	6,126	-	-	30	-	-	60
27	6,204	6,286	-	-	30	-	-	50
28	6,426	6,462	-	-	30	-	-	42
29	6,602	6,681	-	-	30	-	-	38
30	6,806	6,833	-	-	30	-	-	35

4.5 Potahování kapiláry

Abychom zabránili interakci analytu se silanolovými skupinami a zajistili dobrou reprodukovatelnost, potáhli jsme vnitřní stěnu kapiláry pomocí tzv. vícenásobné iontové polymerní vrstvy. V tomto případě bylo použito vrstev PB – DS – PB. Nejprve se tedy na stěny kapiláry připojil kationtový polymer, Polybren, na ni následně aniontový polymer dextran síran a na něj opět vrstva Polybrenu. Výsledný náboj stěny kapiláry je tedy opačný než v případě holé kapiláry, což způsobí obrácení směru elektroosmotického toku. Postup potahování kapiláry byl založen na proceduře popsané v článku[29].

Kapilára byla propláchnuta vodou po dobu 10 min. Silanolové skupiny na vnitřní stěně kapiláry byly aktivovány propláchnutím kapiláry 1M NaOH po dobu 50 minut. Poté 20 min vodou, 30 min 5%(hm.) Polybrenem, 30 min 3%(hm.) dextran síranem a poté opět 30 min 5%(hm.) Polybrenem při nízkém napětí (5 kV). Nakonec byla kapilára opět propláchnuta vodou po dobu 10 min.

4.6 Experimentální podmínky

Veškeré experimenty byly prováděny při teplotě 25 °C. Dávkování bylo hydrodynamické, tlakem 50 mbar po dobu 10 s. Napětí bylo udržováno konstantní na hodnotě 20 000 V. Přístroj byl vybaven UV-VIS absorpčním detektorem s diodovým polem (umožňuje snímat celá spektra) a dvěma bezkontaktními vodivostními detektory. Pro detekci vzorků a výpočet efektivních mobilit byly vybrány data z bezkontaktních vodivostních detektorů, protože obě detekční cely těchto detektorů se nacházejí v termostatované části kazety s kapilárou. Tím bylo zajištěno, že elektromigrace analytu v tomto prostoru nebyla ovlivněna změnou teploty. Vzdálenost mezi detektory A a B (l_{det}) byla změřena jako 1,459 cm. Celková délka kapiláry (l_{tot}) byla 49,8 cm.

Jako marker EOF, tedy látka, která je nenabitá a slouží k určení rychlosti EOF, byl použit DMSO.

Pro každý pufr byla provedena 3 měření s příslušným vzorkem. Vždy při změně pufru či vzorku byla kapilára propláchnuta vodou a příslušným pufrem.

5 Zpracování a diskuse výsledků

Kapilární zónová elektroforéza umožňuje stanovovat disociační konstanty a limitní mobility více analytů najednou, pokud se jejich migrační časy/mobility dostatečně liší, aby nedocházelo k jejich překrývání a umožňuje tak zkrátit celkový čas analýzy. V programu PM bylo tedy simulováno chování stanovovaných látek. (Výpočty bylo možné provést až po prvním pokusném experimentu, ze kterého byly odhadnuty limitní mobility.) Aminokyseliny CCYS a APBA vykazovaly při všech hodnotách pH dostatečně odlišné mobility a byly tedy analyzovány společně. Další vzorky bylo pro jejich podobné chování nutné proměřovat zvlášť.

Byly získány vždy 2 elektroforeogramy pro 1 měření v každém pufru, z vodivostního detektoru A a detektoru B. Byly exportovány a zpracovány v programu Origin 6.1. Z každého elektroforeogramu byl odečten migrační čas píku EOF markeru ($t_{EOF,A}$ a $t_{EOF,B}$) jako čas vrcholu píku. Píky analytů byly na rozdíl od píku EOF markeru asymetrické. K získání migračních časů takovýchto píků bylo nutné píky proložit/fitovat tzv. HVL funkcí[38]. Po proložení píků analytů HVL funkcí v obou vodivostních záznamech byly tedy získány migrační časy analytů t_A a t_B. Z rozdílu migračních časů mezi oběma detektory pro EOF ($\Delta t_{EOF} = t_{EOF,A} - t_{EOF,B}$) i analyt ($\Delta t = t_A - t_B$) v daném pufru je možné při znalosti vzdálenosti mezi jednotlivými detektory (l_{det}), celkové délky kapiláry (l_{tot}) a z velikosti vkládaného napětí (U) vypočítat efektivní mobilitu analytu v daném pufru.

Zjištěné hodnoty byly poté dosazeny do vzorce pro výpočet efektivní mobility:

$$m_{ef} = \left(\frac{1}{\Delta t_{EOF}} - \frac{1}{\Delta t} \right) . \frac{l_{det} \cdot l_{tot}}{U} \qquad (2.1)$$

Tímto jsme pro každý pufr získaly 3 hodnoty efektivní mobility, ze kterých jsme vypočetli průměrnou efektivní mobilitu daného vzorku ($m_{ef,prům}$) při příslušném

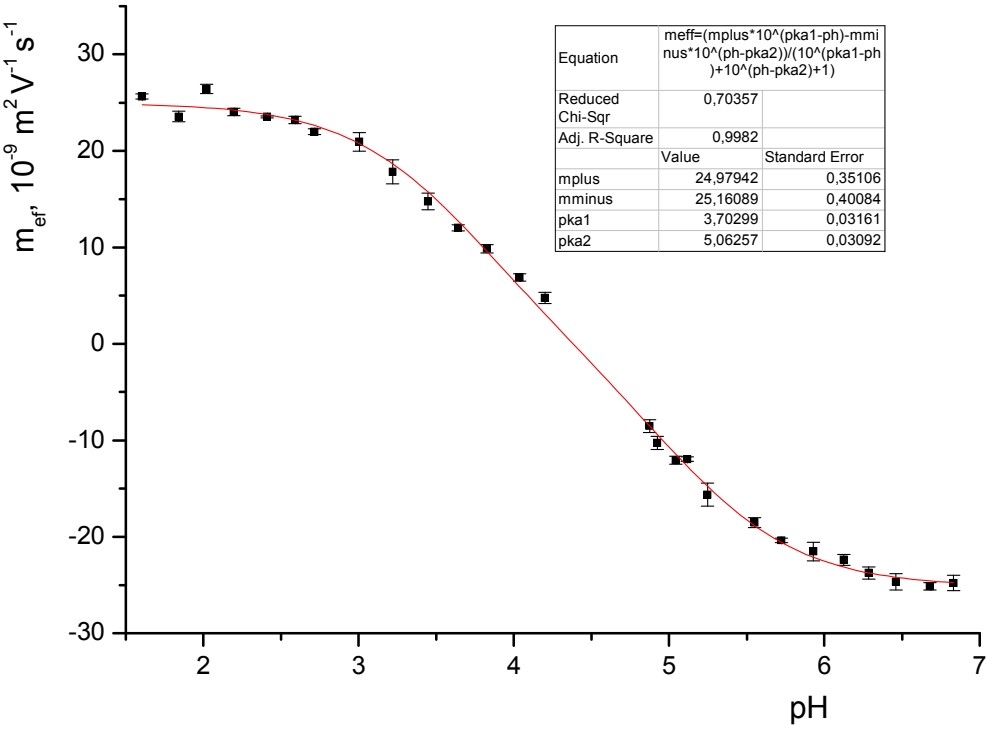
pH a její směrodatnou odchylku (*s*) v programu Excel pomocí funkce *smodch výběr*. Hodnoty pro analyt APAA jsou v Tab.4.

Tabulka 4: Experimentálně zjištěné efektivní mobility (m_{ef}) vzorku APAA a jejich směrodatné odchylky (*s*) při různém pH

pH	$m_{ef,prům}$ 10^{-9} $m^2V^{-1}s^{-1}$	*s* 10^{-9} $m^2V^{-1}s^{-1}$	pH	$m_{ef,prům}$ 10^{-9} $m^2V^{-1}s^{-1}$	*s* 10^{-9} $m^2V^{-1}s^{-1}$
1,603	25,63	0,26	4,490	-*	-
1,841	23,54	0,55	4,614	-*	-
2,021	26,40	0,47	4,875	-8,52	0,65
2,195	24,04	0,37	4,924	-10,28	0,67
2,411	23,53	0,09	5,117	-11,95	0,24
2,590	23,18	0,38	5,247	-15,6	1,2
2,715	21,99	0,28	5,043	-12,07	0,42
3,005	20,93	0,97	5,551	-18,52	0,51
3,220	17,8	1,3	5,724	-20,36	0,22
3,447	14,75	0,86	5,928	-21,53	0,98
3,641	12,03	0,32	6,126	-22,39	0,57
3,826	9,85	0,44	6,286	-23,73	0,63
4,038	6,89	0,37	6,462	-24,68	0,84
4,200	4,77	0,58	6,681	-25,13	0,39
4,351	-*	-	6,833	-24,78	0,79

* píky nebylo možné vyhodnotit, mobilita se blížila nulové hodnotě a píky analytu se překrývaly s nulovým systémovým píkem a píkem markeru EOF.

Z hodnot průměrných efektivních mobilit každého vzorku byly zpracovány grafy závislosti mobilit na pH . Tato data pak byla v programu Origin 6.1 proložena funkcí (1.5) a výsledkem fitování byly známé hodnoty parametrů $pK_{a,1}^{mix}$, $pK_{a,2}^{mix}$, m_{A^+} a m_{A^-}. Příklad takového zpracování pro APAA je na Obr. 1. Data pro ostatní amfolyty jsou uvedeny v přílohách A až F.



Obrázek 1: Bodový graf závislosti efektivních mobilit na pH analytu APAA a jeho proložení funkcí (1.5). Směrodatné odchylky efektivních mobilit jsou vyneseny jako chybové úsečky u jednotlivých bodů.

Aktuální iontové mobility m_{A^+} a m_{A^-} byly pak přepočítány na limitní iontové mobility $m_{\lim,+}$ a $m_{\lim,-}$ podle vztahu (1.7). Tyto hodnoty jsou pak pro všech 7 vzorků shrnuty v Tab. 5.

Tabulka 5: Výsledné limitní iontové mobility $m_{lim,+}$ a $m_{lim,-}$ vzorků. Hodnoty $m_{lim,+}$ a $m_{lim,-}$ jsou uvedeny v absolutních hodnotách

vzorek	$m_{lim,+}$ 10^{-9} m^{2}V^{-1}s^{-1}	$m_{lim,-}$ 10^{-9} m^{2}V^{-1}s^{-1}
CCYS	26,59 ± 1,61	28,80 ± 0,24
APBA	27,67 ± 0,26	27,05 ± 0,39
APAA	30,25 ± 0,35	30,43 ± 0,40
AAA	28,28 ± 0,98	27,47 ± 0,24
AIA	29,37 ± 1,84	43,37 ± 0,50
GG	25,45 ± 0,55	25,04 ± 0,35
AHIP	26,98 ± 0,88	27,72 ± 0,33

Iontová síla pufru velmi ovlivňuje chování analytů v tomto roztoku. Proto je důležitá znalost aktivitního koeficientu, který vypočítáme pomocí vzorce (1.11). Dosazením smíšených disociačních konstant $pK_{a,1}^{mix}$ do vzorce (1.9) a $pK_{a,2}^{mix}$ do (1.10) získáme pravé disociační konstanty $pK_{a,1}$ a $pK_{a,2}$.

Porovnání experimentálně stanovených pravých disociačních konstant a jejich odhadovaných hodnot z programu Sparc je v Tab. 6.

Tabulka 6: Pravé disociační konstanty vzorků odhadnuté a experimentálně zjištěné

vzorek	$pK_{a,1}$ experim.	$pK_{a,2}$ experim.	$pK_{a,1}$ odhad	$pK_{a,2}$ odhad
CCYS	1,89 ± 0,07	3,41 ± 0,03	1,83	3,41
APBA	4,32 ± 0,03	5,15 ± 0,04	4,49	5,31
APAA	3,63 ± 0,03	5,13 ± 0,03	4,09	5,36
AAA	2,21 ± 0,05	4,50 ± 0,02	2,26	4,45
AIA	2,22 ± 0,09	4,11 ± 0,03	2,41	3,48
GG	3,12 ± 0,06	4,54 ± 0,04	3,20	4,68
AHIP	2,67 ± 0,07	3,86 ± 0,50	2,71	4,15

Z Tab. 5 a Tab. 6 vyplývá, že metodou kapilární zonové elektroforézy byly stanoveny hodnoty termodynamických disociačních konstant s relativní chybou od 0,5 do 5 % a hodnoty limitních iontových mobilit s relativní chybou od 0,6 do 6 %. Z toho můžeme vyvodit, že CZE lze považovat za přesnou metodu pro stanovení těchto fyzikálně-chemických charakteristik.

Větší relativní chyby má hodnota $pK_{a,2}$ u vzorku AHIP (12,9 %). Příčinou může být málo experimentálních hodnot v oblasti pH 3 až 4 (viz Příloha F). V této oblasti nebylo možné hodnoty získat kvůli interakci píku analytu se systémovými píky. Navíc se v této oblasti nachází i jeden odlehlý bod, který také nebyl při fitování brán v úvahu (odlehlé body, které byly ze souboru vyloučenu jsou označeny v příslušných grafech červeně).

Z uvedených hodnot limitních iontových mobilit je možné si povšimnout, že rozdíl v absolutních hodnotách pro formy A^- a A^+ není velký, což naplňuje představu, že u takto malých molekul změna náboje molekuly nevyvolá velkou změnu ve velikosti, přesněji v hydrodynamickém poloměru této molekuly. V této souvislosti byla neobvyklá hodnota aniontové limitní mobility pro AIA, která převyšovala hodnotu kationtové limitní mobility o přibližně $14\times10^{-9}m^2V^{-1}s^{-1}$ (Tab.5). Vysvětlení poskytuje nízká hodnota disociační konstanty $pK_{a,3}$ (pro rovnováhu $A^- \leftrightarrow A^{2-} + H^+$, viz Tab. 2), která dle odhadů leží dokonce již v oblasti pH zvolené pro prováděné experimenty ($pK_{a,3}$ = 5,1). V souladu s naším předpokladem je tedy pro AIA nevhodný model nastíněný v kap. 2.2 a pro správné stanovení všech disociačních konstant a limitních iontových mobilit této látky by bylo potřeba data prokládat jinou funkcí, takovou, která v dané oblasti pH uvažuje i přítomnost amfolytu ve formě A^{2-}.

Získané hodnoty disociačních konstant jsme porovnali pouze s hodnotami odhadnutými pomocí Sparc online calculatoru[35]. Žádné jiné literární údaje jsme nezjistili. Z Tab. 6 je patrné, že tento program poskytuje spolehlivé odhady disociačních konstant.

6 Závěr

1) V rešeršní části byl podán přehled o používání kapilární zónové elektroforézy jako metody pro stanovení disociačních konstant i limitních iontových mobilit analytů. Byly zde uvedeny práce, které touto metodou uvedené fyzikálně-chemické parametry stanovují pro různé druhy látek a nebo porovnávají CZE s ostatními metodami, které lze na stanovení disociačních konstant použít.

2) Z literatury byl vybrán postup, který popisoval stanovení limitních iontových mobilit a disociačních konstant aminokyselin a byl proto vhodný i pro analýzu námi vybraných látek.

3) S pomocí Sparc online calculatoru byly odhadnuty disociační konstanty námi vybraných amfolytů a byl zvolen vhodný rozsah pH pufrů, ve kterém bude nutné proměřit analyty.

4) V programu PeakMaster byla tato sada pufrů navržena tak, aby pufry byly co nejjednodušší, měly konstantní iontovou sílu, vhodné pH a dostačující pufrační kapacitu. Bylo navrženo 30 pufrů k pokrytí pH v rozsahu přibližně 1,6 – 6,8 o iontové síle 30 mM.

5) Byly naměřeny a vyhodnoceny příslušné série experimentů. Z každého měření (při daném pH) byla zjištěna efektivní mobilita analytu. Tyto hodnoty byly následně vyneseny proti hodnotám pH a byly proloženy regresní funkcí popisující závislost těchto dvou veličin. Z regresních parametrů, kterými byly aktuální iontové mobility a smíšené disociační konstanty při dané iontové síle, byly vypočítány limitní iontové mobility a termodynamické disociační konstanty pro sedm námi vybraných látek.

Použitá literatura

[1] Pazourek J.: Moderní elektroforetické analytické metody, (přednášky pro magisterské studium)

[2] Gaš B.: Kapilární elektroforéza, Separační analytická metoda pro věk mikročipů, Vesmír 80 (červenec 2001), 370-373

[3] Cabot J. M., Fuguet E., Rafols C., Rosés M.: Fast high-throughput metod for determination of acidity constans by capillary electrophoresis. II. Acidic internal standards, Journal of Chromatography A 1217 (2010), 8340-8345

[4] Poole S. K., Patel S., Dehring K., Workman H., Poole C. F.: Determination of acid dissociation constans by capillary electrophoresis, Journal of Chromatography A 1037 (2004), 445-454

[5] Vázquez J. L., Berlanga M., Merino S., Domenech O., Vinas M., Montero M. T., Hernández-Borrell J.: Determination by fluorimetric titration of the ionization constants of ciprofloxacin in solution and in the presence of liposomes, Photochemistry and Photobiology 73(1) (2001), 14–19

[6] Dearden J. C., Cronin M. T. D., Lappin D. C.: A comparison of commercially available software for the prediction of pKa, Journal of Pharmacy and Pharmacology 59(1) (2007), A7, meeting abstract: 16

[7] Qiang Z., Adams C.: Potentiometric determination of acid dissociation constants (pKa) for human and veterinary antibiotics, Water Research 38 (2004), 2874–2890

[8] Meloun M., Ferenčíková Z., Netolická L., Vrána A.: The thermodynamic dissociation constant of naphazoline by the regression analysis of potentiometric data, Central European Journal of Chemistry 9(1) (2011), 66-74

[9] Zevatskii Yu. E., Samoilov D. V., Mchedlov-Petrosyan N. O.: Conthemporary methods for the experimental determination of dissociation constants of organic acids in solutions, Russian Journal of General Chemistry 79(9) (2009), 1859–1889

[10] Budilová J.: Separace a prekoncentrace peptidů a proteinů

elektroforetickými metodami (Izoelektrická fokusace bez nosiče, = CAF-IEF, dvourozměrná CE, frakcionace), disertační práce, Masarykova univerzita v Brně, 2011

[11] Andrasi M., Buglyo P., Zekany L., Gaspar A.: A comparative study of capillary zone electrophoresis and pH-potentiometry for determination of dissociation constants, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 44 (2007), 1040–1047

[12] Foulon C., Duhal N., Lacroix-Callens B., Vaccher C., Bonte J. P., Goossens J. F.: Determination of p*K*a values of benzoxa-, benzothia- and benzoselena-zolinone derivatives by capillary electrophoresis. Comparison with potentiometric titration and spectrometric data, European Journal of Pharmaceutical Sciences 31 (2007), 165–171

[13] Yang L., Juan Z.: Determination of dissociation constans of amino acids by capillary zone electrophoresis, Electrophoresis 20 (1999), 2877-2883

[14] Včeláková K., Zusková I., Kenndler E., Gaš B.: Determination of cationic mobilities and pKa values of 22 amino acids by capillary zone electrophoresis, Electrophoresis 25 (2004), 309-317

[15] Zusková I., Novotná A., Včeláková K., Gaš B.: Determination of limiting mobilities and dissociation constans of 21 amino acids by capillary zone electrophoresis at very low pH, Journal of Chromatography B 841 (2006), 129-134

[16] Henchoz Y., Schappler J., Geiser L., Prat J., Carrupt P.-A., Veuthey J.-L.: Rapid determination of pKa values of 20 amino acids by CZE with UV and capacitively coupled contactless conductivity detections, Analytical and Bioanalytical Chemistry 389 (2007), 1869-1878

[17] Plasson R., Cottet H.: Determination and modeling of peptide pKa by capillary zone electrophoresis, Analytical Chemistry 78 (2006), 5394-5402

[18] Ehala S., Grishina A. A., Sheshenev A. E., Lyapkalo I. M., Kašička V.: Determination of acid–base dissociation constants of very weak zwitterionic heterocyclic bases by capillary zone electrophoresis, Journal of Chromatography A 1217 (2010), 8048–8053

[19] Mrestani Y., Neubert R., Munk A., Wiese M.: Determination of dissociation constants of cephalosporins by capillary zone electrophoresis, Journal of Chromatography A 803 (1998), 273–278

[20] Caliaro G. A., Herbots C. A.: Determination of p*K*a values of basic new drug substances by CE, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 26 (2001), 427–434

[21] Barbosa J., Barrón D., Jiménez-Lozano E.: Electrophoretic behaviour of quinolones in capillary electrophoresis. Effect of pH and evaluation of ionization constants, Journal of Chromatography A 839 (1999), 183–192

[22] Šlampová A., Křivánková L., Gebauer P., Boček P.: Standard systems for measurement of pKs and ionic mobilities. 1. Univalent weak acids, Journal of Chromatography A 1213 (2008), 25-30

[23] Šlampová A., Křivánková L., Gebauer P., Boček P.: Standard systems for measurement of pKs and ionic mobilities. 2. Univalent weak bases, Journal of Chromatography A 1216 (2009), 3637-3641

[24] Geiser L., Henchoz Y., Galland A., Carrupt P.-A., Veuthey J.-L.: Determination of pKa values by capillary zone electrophoresis with a dynamic coating procedure, Journal of Separation Science 28 (2005), 2374-2380

[25] Fuguet E., Rafols C., Bosch E., Rosés M.: Fast high-throughput metod for determination of acidity constans by capillary electrophoresis. I. Monoprotic weak acids and bases, Journal of Chromatogpraphy A 1216 (2009), 3646-3651

[26] Horvath J.: Dolník V.: Polymer wall coatings for capillary electrophoresis, Electrophoresis 22 (2001), 644-655

[27] Robb Ch. S.: Applications of physically adsorbed polymer coatings in capillary electrophoresis, Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies 30 (2007), 729-759

[28] Katayama H., Ishihama Y., Asakawa N.: Stable capillary coating with successive multiple ionic polymer layers, Analytical Chemistry 70 (1998), 2254-2260

[29] Katayama H., Ishihama Y., Asakawa N.: Stable cationic capillary coating with successive multiple ionic polymer layers for capillary electrophoresis, Analytical Chemistry 70 (1998), 5272-5277

[30] Chiari M., Cretich M., Damin F., Ceriotti L., Consonni R.: New adsorbed coatings for capillary electrophoresis, Electrophoresis 21 (2000), 909-916

[31] Lucy Ch. A., MacDonald A. M., Gulcev M. D.: Non-covalent capillary coatings for protein separations in capillary electrophresis, Journal of chromatography A 1184 (2008), 81-105

[32] Zhang J., Horváth C.: Capillary electrophoresis of proteins in dextran-coated columns, Electrophoresis 24 (2003), 115-120

[33] Hruška V., Jaroš M., Gaš B.: Oscillating electrolytes, Electrophoresis 27 (2006), 513-518

[34] Riesová M., Hruška V., Kenndler E., Gaš B.: Electromigration oscillations occurring in ternary electrolyte systems with complex eigenmobilities, as predicted by theory and ascertained by capillary electrophoresis, The Journal of Physical Chemistry B 113 (2009), 12439-12446

[35] http://archemcalc.com/sparc/test

[36] http://web.natur.cuni.cz/~gas/

[37] Gaš B., Jaroš M., Hruška V., Zusková I., Štědrý M.: PeakMaster – A Freeware Simulator of Capillary Zone Electrophoresis, LG-GC Europe 18(5) (2005), 282-288

[38] Haarhoff P.C., Van der Linde H.J.: Concentration dependence of elution curves in non-ideal gas chromatography, Analytical Chemistry 38(4) (1966), 573-582

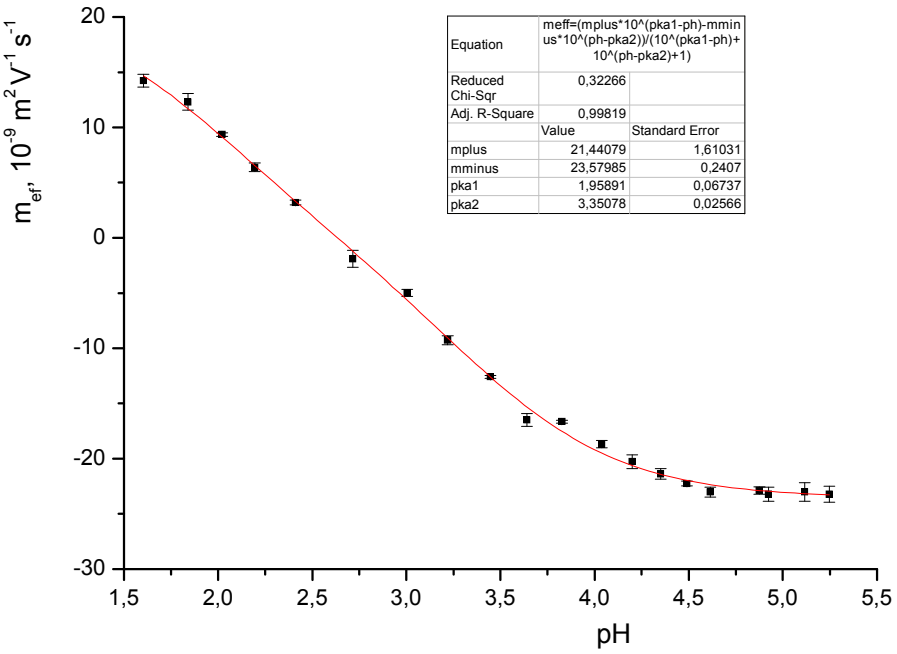
Přílohy

A. CCYS

Experimentálně zjištěné efektivní mobility (m_{ef}) vzorku CCYS a jejich směrodatné odchylky (s) při různém pH

pH	$m_{ef,prům}$ 10^{-9} $m^2V^{-1}s^{-1}$	s 10^{-9} $m^2V^{-1}s^{-1}$	pH	$m_{ef,prům}$ 10^{-9} m^2 V^{-1} s^{-1}	s 10^{-9} $m^2V^{-1}s^{-1}$
1,603	14,23	0,58	4,490	-22,25	0,21
1,841	12,31	0,75	4,614	-23,02	0,45
2,021	9,36	0,16	4,875	-22,89	0,33
2,195	6,39	0,39	4,924	-23,22	0,64
2,411	3,20	0,21	5,117	-23,01	0,82
2,590	-*	-	5,247	-23,22	0,72
2,715	-1,90	0,78	5,043	-**	-
3,005	-4,92	0,32	5,551	-	-
3,220	-9,27	0,40	5,724	-	-
3,447	-12,58	0,13	5,928	-	-
3,641	-16,49	0,58	6,126	-	-
3,826	-16,66	0,12	6,286	-	-
4,038	-18,69	0,34	6,462	-	-
4,200	-20,28	0,62	6,681	-	-
4,351	-21,39	0,48	6,833	-	-

* nevyhodnotitelné – splynutí s píkem markeruEOF
** dále neděláno – bylo získáno již dostatečné množství hodnot m_{ef} v této oblasti pro plnohodnotné stanovení



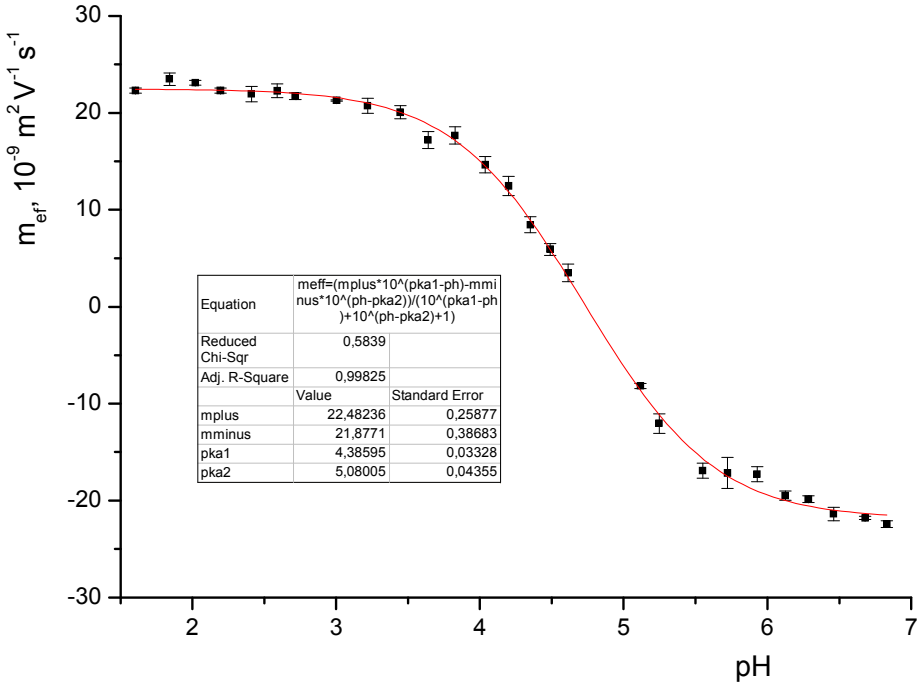
Bodový graf závislosti efektivních mobilit na pH analytu CCYS a jeho proložení funkcí (1.5)

B. APBA

Experimentálně zjištěné efektivní mobility (m_{ef}) vzorku APBA a jejich směrodatné odchylky (s) při různém pH

pH	$m_{ef,prům}$ 10^{-9} $m^2V^{-1}s^{-1}$	s 10^{-9} $m^2V^{-1}s^{-1}$	pH	$m_{ef,prům}$ 10^{-9} m^2 V^{-1} s^{-1}	s 10^{-9} $m^2V^{-1}s^{-1}$
1,603	22,29	0,26	4,490	5,91	0,64
1,841	23,49	0,66	4,614	3,49	0,92
2,021	23,11	0,24	4,875	-*	-
2,195	22,29	0,27	4,924	-*	-
2,411	21,94	0,80	5,117	-8,19	0,28
2,590	22,28	0,74	5,247	-12,0	1,0
2,715	21,72	0,33	5,043	-*	-
3,005	21,275	0,073	5,551	-16,93	0,79
3,220	20,73	0,77	5,724	-17,16	1,58
3,447	20,07	0,69	5,928	-17,29	0,77
3,641	17,21	0,89	6,126	-19,51	0,46
3,826	17,67	0,89	6,286	-19,87	0,34
4,038	14,64	0,84	6,462	-21,38	0,70
4,200	12,46	0,99	6,681	-21,80	0,15
4,351	8,47	0,82	6,833	-22,45	0,35

* nevyhodnotitelné – splynutí se systémovými píky



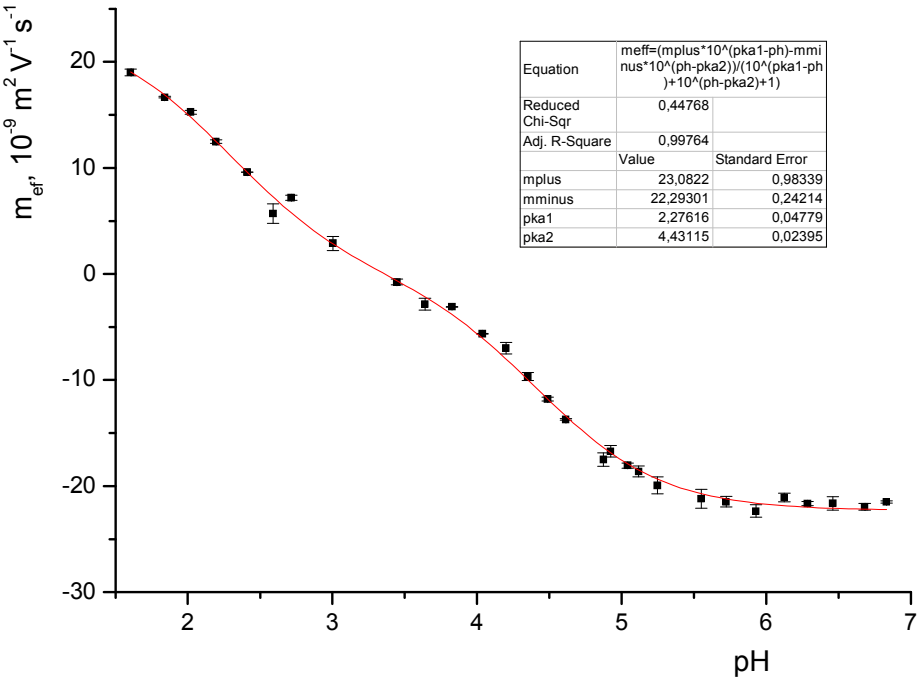
Bodový graf závislosti efektivních mobilit na pH analytu APBA a jeho proložení funkcí (1.5)

C. AAA

Experimentálně zjištěné efektivní mobility (m_{ef}) vzorku AAA a jejich směrodatné odchylky (s) při různém pH

pH	$m_{ef,prům}$ 10^{-9} $m^2V^{-1}s^{-1}$	s 10^{-9} $m^2V^{-1}s^{-1}$	pH	$m_{ef,prům}$ 10^{-9} m^2 V^{-1} s^{-1}	s 10^{-9} $m^2V^{-1}s^{-1}$
1,603	19,01	0,32	4,490	-11,801	0,19
1,841	16,664	0,088	4,614	-13,713	0,089
2,021	15,26	0,18	4,875	-17,49	0,65
2,195	12,48	0,19	4,924	-16,74	0,55
2,411	9,59	0,00	5,117	-18,61	0,52
2,590	5,69	0,92	5,247	-19,93	0,79
2,715	7,19	0,25	5,043	-18,061	0,25
3,005	2,88	0,67	5,551	-21,19	0,88
3,220	-*	-	5,724	-21,48	0,51
3,447	-0,76	0,27	5,928	-22,35	0,58
3,641	-2,84	0,56	6,126	-21,08	0,41
3,826	-3,094	0,019	6,286	-21,66	0,20
4,038	-5,638	0,037	6,462	-21,64	0,62
4,200	-6,99	0,56	6,681	-21,95	0,33
4,351	-9,67	0,39	6,833	-21,503	0,091

* nevyhodnotitelné – splynutí s píkem markeru EOF



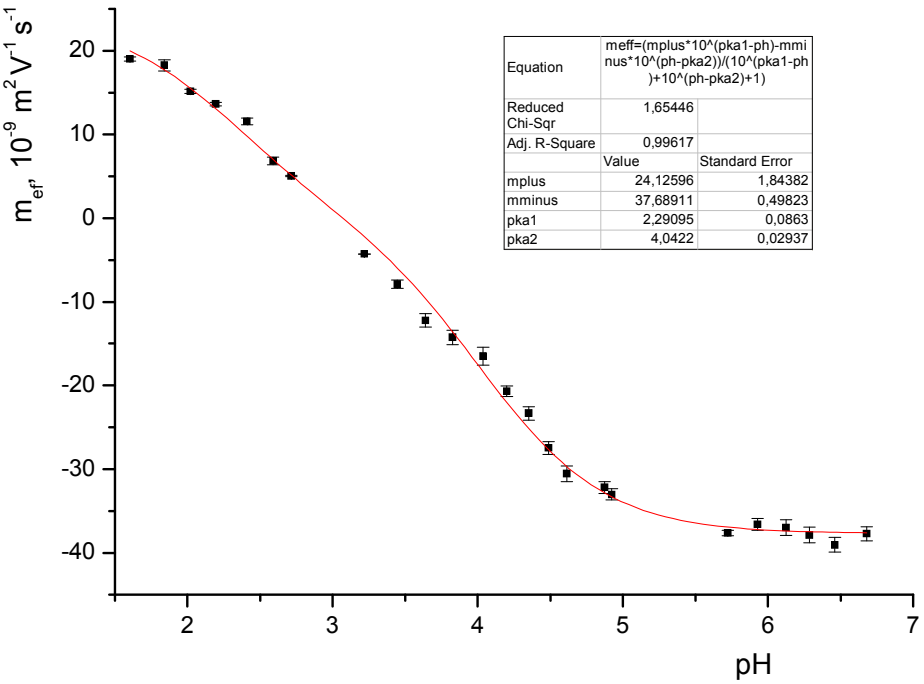
Bodový graf závislosti efektivních mobilit na pH analytu AAA a jeho proložení funkcí (1.5)

D. AIA

Experimentálně zjištěné efektivní mobility (m_{ef}) vzorku AIA a jejich směrodatné odchylky (s) při různém pH

pH	$m_{ef,prům}$ 10^{-9} $m^2V^{-1}s^{-1}$	s 10^{-9} $m^2V^{-1}s^{-1}$	pH	$m_{ef,prům}$ 10^{-9} $m^2V^{-1}s^{-1}$	s 10^{-9} $m^2V^{-1}s^{-1}$
1,603	19,03	0,25	4,490	-27,46	0,76
1,841	18,27	0,68	4,614	-30,54	0,92
2,021	15,16	0,25	4,875	-32,17	0,72
2,195	13,62	0,24	4,924	-33,02	0,68
2,411	11,56	0,41	5,117	-*	-
2,590	6,83	0,45	5,247	-*	-
2,715	5,026	0,097	5,043	-*	-
3,005	-*	-	5,551	-*	-
3,220	-4,27	0,00	5,724	-37,62	0,33
3,447	-7,87	0,49	5,928	-36,59	0,71
3,641	-12,22	0,78	6,126	-36,96	0,94
3,826	-14,25	0,88	6,286	-37,87	0,93
4,038	-16,5	1,1	6,462	-39,04	0,89
4,200	-20,69	0,59	6,681	-37,72	0,86
4,351	-23,32	0,79	6,833	*	-

* nevyhodnotitelné – příliš velká elektromigrační disperze, pík nelze vyhodnotit



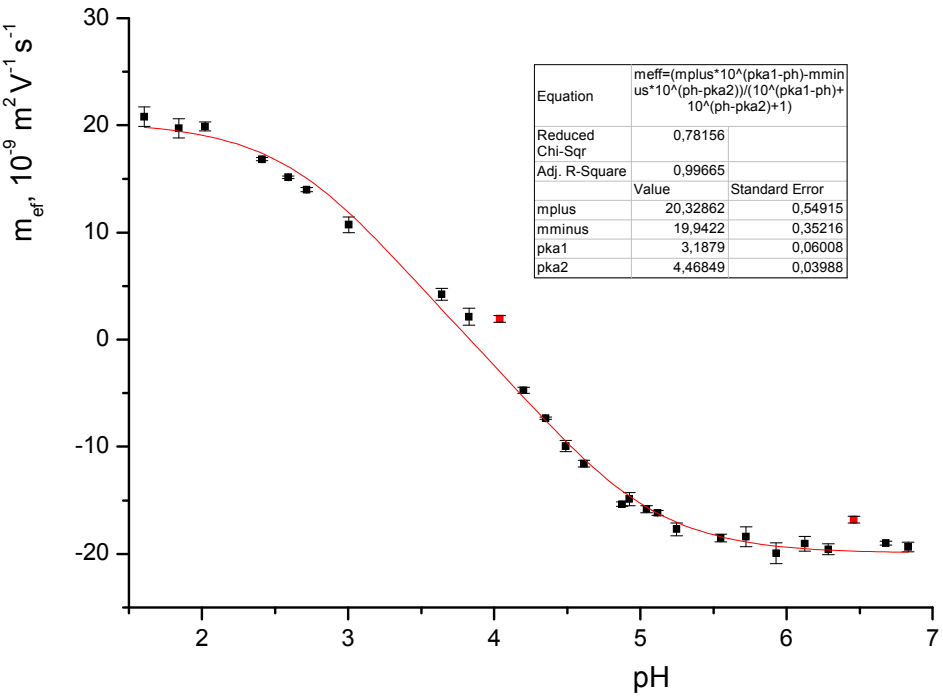
Bodový graf závislosti efektivních mobilit na pH analytu AIA a jeho proložení funkcí (1.5)

E. GG

Experimentálně zjištěné efektivní mobility (m_{ef}) vzorku GG a jejich směrodatné odchylky (s) při různém pH

pH	$m_{ef,prům}$ 10^{-9} $m^2V^{-1}s^{-1}$	s 10^{-9} $m^2V^{-1}s^{-1}$	pH	$m_{ef,prům}$ 10^{-9} m^2 V^{-1} s^{-1}	s 10^{-9} $m^2V^{-1}s^{-1}$
1,603	20,79	0,92	4,490	-9,94	0,52
1,841	19,71	0,90	4,614	-11,59	0,31
2,021	19,89	0,42	4,875	-15,35	0,21
2,195	-*	-	4,924	-14,88	0,61
2,411	16,84	0,14	5,117	-16,18	0,23
2,590	15,14	0,13	5,247	-17,70	0,59
2,715	13,99	0,19	5,043	-15,83	0,33
3,005	10,72	0,73	5,551	-18,52	0,36
3,220	-*	-	5,724	-18,41	0,94
3,447	-*	-	5,928	-19,95	0,98
3,641	4,22	0,55	6,126	-19,05	0,68
3,826	2,14	0,79	6,286	-19,58	0,49
4,038	1,92	0,32	6,462	-16,81	0,31
4,200	-4,72	0,29	6,681	-18,99	0,18
4,351	-7,33	0,11	6,833	-19,36	0,45

* nevyhodnotitelné – interakce píků analytu s píky nečistot



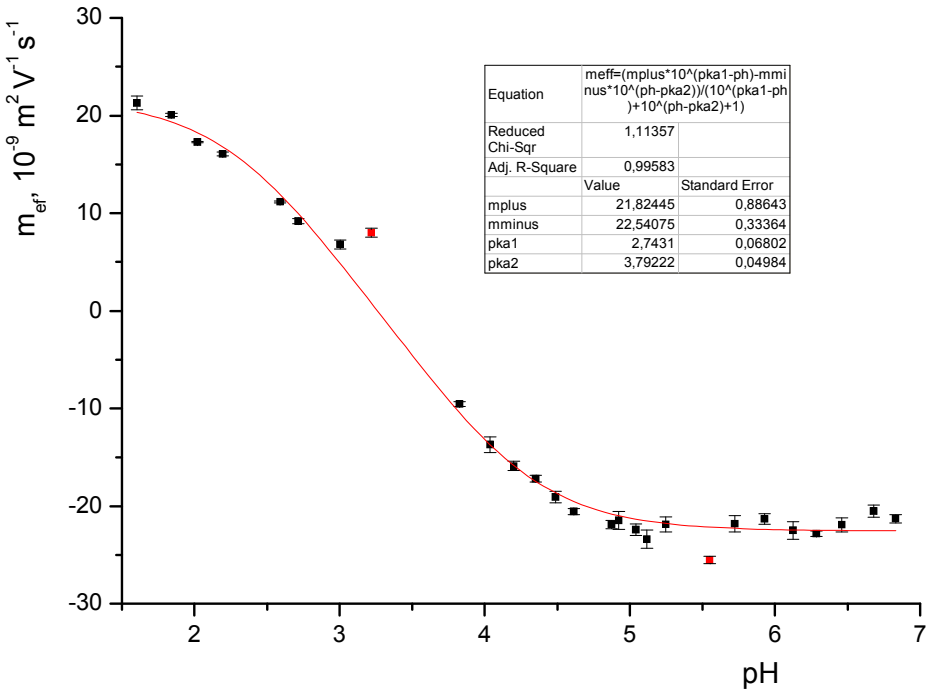
Bodový graf závislosti efektivních mobilit na pH analytu GG a jeho proložení funkcí (1.5), červené body značí odlehlé výsledky, které nebyly brány při fitování v úvahu

F. AHIP

Experimentálně zjištěné efektivní mobility (m_{ef}) vzorku AHIP a jejich směrodatné odchylky (s) při různém pH

pH	$m_{ef,prům}$ 10^{-9} $m^2V^{-1}s^{-1}$	s 10^{-9} $m^2V^{-1}s^{-1}$	pH	$m_{ef,prům}$ 10^{-9} m^2 V^{-1} s^{-1}	s 10^{-9} $m^2V^{-1}s^{-1}$
1,603	21,28	0,70	4,490	-19,07	0,59
1,841	20,06	0,15	4,614	-20,55	0,30
2,021	17,281	0,064	4,875	-21,88	0,42
2,195	16,06	0,19	4,924	-21,47	0,92
2,411	-*	-	5,117	-23,38	0,94
2,590	11,17	0,10	5,247	-21,88	0,76
2,715	9,17	0,28	5,043	-22,42	0,60
3,005	6,79	0,45	5,551	-25,52	0,38
3,220	8,01	0,45	5,724	-21,81	0,85
3,447	-*	-	5,928	-21,32	0,52
3,641	-*	-	6,126	-22,49	0,90
3,826	-9,54	0,23	6,286	-22,84	0,28
4,038	-13,71	0,79	6,462	-21,93	0,73
4,200	-15,89	0,48	6,681	-20,52	0,63
4,351	-17,19	0,34	6,833	-21,29	0,43

* nevyhodnotitelné – interakce se systémovými píky



Bodový graf závislosti efektivních mobilit na pH analytu GG a jeho proložení funkcí (1.5), červené body značí odlehlé výsledky, které nebyly brány při fitování v úvahu