

**Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta
Katedra fyzikální a makromolekulární chemie**

**Charles University in Prague, Faculty of Science
Department of Physical and Macromolecular Chemistry**

Doktorský studijní program: Fyzikální chemie
Ph.D. study program: Physical Chemistry

Autoreferát dizertační práce
Summary of the Ph.D. Thesis



Studium komplexačních rovnováh kapilární zónovou elektroforézou

Study of complexation equilibria by capillary zone electrophoresis

Mgr. Martin Beneš

Školitel/Supervisor: Doc. RNDr. Iva Zusková, CSc.

Praha 2014

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, č. grantu 323611, KONTAKT LH11018 a CEEPUS CIII-RO-0010-08-1314-M-69316. Děkujeme firmě Cyclolab, Budapešť, Maďarsko, za darování cyklodextrinu PABCD.

Abstrakt

Kapilární zónová elektroforéza patří mezi hojně používané analytické metody vhodné k separaci chirálních analytů. Enantioselektivní prostředí je zajištěno přidavkem komplexačního činidla přímo do základního elektrolytu, což zajišťuje vysokou flexibilitu separačního systému – komplexační činidlo či jeho koncentrace mohou být snadno měněny. Interakce mezi analyty a komplexačním činidlem je charakterizována komplexačními rovnováhami, jejichž studium je předmětem této dizertační práce.

Jednou z hlavních výhod kapilární elektroforézy je existence jejího kompletního matematického modelu a simulačních programů umožňujících předpovídat výsledky elektroforetických separací. Žádný z dosavadních modelů však není použitelný pro komplexující systémy. V rámci této práce byl představen matematický model elektroforézy rozšířený o komplexační rovnováhy. Model byl implementován do dynamického simulátoru elektroforézy Simul 5 a jeho platnost byla experimentálně ověřena. Nová verze programu Simul 5 Complex je schopna předpovědět mobilitu, amplitudu i tvar píku analytu v prostředí obsahujícím komplexační činidlo. V dalším kroku byly komplexační rovnováhy začleněny také do linearizovaného modelu elektromigrace simulátoru PeakMaster 5.3 Complex. Ten je schopen během několika vteřin předpovědět tvar píku v závislosti na separačním prostředí. Může tedy pomoci vybrat vhodné experimentální podmínky vedoucí k úzkým a symetrickým píkům (potlačení elektromigrační disperze) a optimalizaci separačních podmínek za výrazné úspory experimentálního času a chemikálií. Současně byl PeakMaster 5.3 Complex využit k vysvětlení vlivu komplexace analytu s komplexačním činidlem na tvar píku analytu.

Komplexační činidlo přidané do základního elektrolytu může interagovat nejen s analyty, ale také se složkami pufru. Tato interakce může významně změnit vlastnosti základního elektrolytu jako pH, iontovou sílu či vodivost. Bylo prokázáno, že interakce komplexačního činidla se složkami pufru může také významně ovlivnit stanovení komplexačních parametrů. Komplexační parametry určené v takových systémech mohou být zcela nesprávné a tak poskytovat mylnou informaci o síle komplexace. Proto by měla být možnost interakce komplexačního činidla se složkami pufru prověřena před samotnými experimenty např. kontrolou pH po přidavku komplexačního činidla do základního elektrolytu.

Abstract

Capillary zone electrophoresis (CZE) is one of the most widely used analytical methods for separation of chiral analytes. In contrast to the other common chiral separation methods, chiral complexation agent is usually added directly to the background electrolyte to create enantioselective separation environment. Thus, the type and the concentration of chiral selector can be easily varied, which results in high flexibility of separation system. The detail understanding of electrophoretic separation systems with complexation involved is the main goal of this thesis.

One of the most important advantages of capillary electrophoresis is existence of its complete mathematical model, which was implemented in several simulation programs. They can provide detail insight into the separation process or predict the separation results. However, none of the available simulators is suitable for complexing separation systems, which limits its applicability for chiral separation systems. For this reason, in the scope of this thesis we introduce the complete mathematical model of electromigration for separation systems with complexation agents. The model was implemented in our dynamic simulator Simul 5 and was verified experimentally. The new version of Simul 5 Complex provides the overall picture about the electrophoretic separation with complexation agents and allowed us to demonstrate the development of unforeseen electromigration dispersion connected with complexation. This phenomena was further elucidated using our second simulator PeakMaster 5.3 Complex, whose linearized model of electromigration was extended by complexation equilibria. The new version of PeakMaster 5.3 predicts the extent of electromigration dispersion of analyte peaks depending on concentration of complexation agent. Thus, it can be used for optimization of separation conditions to obtain symmetrical and sharp analyte peaks. Complexation agent added to the background electrolyte can interact not only with analytes but also with buffer constituents. This interaction can significantly influence the buffer properties, such as pH, ionic strength or conductivity. We showed that the value of complexation constant determined in the interacting buffers environment can be totally wrong and may provide misleading information about the strength of complexation. Therefore, the interaction of buffer constituents with the complexation agent should always be considered and tested before the very experiments, *e.g.* by pH measurement after adding of complexation agent to the separation buffer.

Obsah

1. Teoretický úvod	5
2. Cíle práce	8
3. Výsledky a diskuse	9
3.1 Dynamická simulace elektroforetických systémů s komplexačními rovnováhami	9
3.2 PeakMaster 5.3 Complex: Elektromigrační disperze v systémech s neutrálním komplexačním činidlem a plně nabitým analytem.....	11
3.3 Komplexace složek pufru s neutrálním komplexačním činidlem: Vliv na určování konstant stability	13
Závěr	16
Literatura.....	18
1. Introduction.....	19
2. Objectives of the thesis	22
3. Results and discussion	23
3.1 Dynamic simulation of the effects of complex-formation equilibria in electrophoresis.....	23
3.2 PeakMaster 5.3 Complex: Electromigration dispersion in systems that contain a neutral complexation agent and fully charged analyte.....	25
3.3 Complexation of buffer constituents with neutral complexation agents: Impact on complexation constant determination	28
Conclusions.....	31
References.....	33
Přílohy.....	34
A. Seznam publikací	34
B. Seznam konferenčních příspěvků.....	36
C. Životopis.....	38

1. Teoretický úvod

Kapilární zónová elektroforéza (CZE) je analytická separační metoda založená na rozdílné rychlosti iontů v elektrickém poli. Mezi hlavní přednosti CZE patří nízká spotřeba použitých chemikálií (separačních pufrů i vzorků) a vysoká rychlost a účinnost separace. CZE je možno použít pro separaci široké řady látek od malých iontů až po makromolekuly. Významné uplatnění nachází také v případě chirálních separací. Pro separaci chirálních látek (např. enantiomerů) je třeba vytvořit enantioselektivní separační prostředí, například přidavkem vhodného komplexačního činidla do separačního pufru, které vytváří s jednotlivými chirálními analyty komplexy. Ty již elektroforeticky rozdělit lze. Jako chirální komplexační činidla (chirální selektory) se používají např. cyklodextriny, makrocyclická antibiotika, crown ethery, cyklofruktany, či chirální micely. Výhodou kapilární elektroforézy je možnost jednotlivé selektory lehce měnit, upravovat jejich koncentraci nebo pracovat s jejich kombinacemi.

Sílu interakce mezi analytem a komplexačním činidlem popisuje konstanta stability. V rámci kapilární elektroforézy bylo vyvinuto několik metod vhodných k určení konstant stability, jejichž popis lze najít v několika přehledových článcích [1] – [3]. Nejčastěji používanou metodou k určení konstanty stability v případě rychlého ustavení rovnováhy (zjednodušeně řečeno, pokud je ustavení komplexační rovnováhy rychlejší než separace) je metoda afinitní kapilární elektroforéza (ACE). Ta je založena na určení závislosti efektivní mobility analytu na zvyšující se koncentraci komplexačního činidla v základním elektrolytu (BGE). Efektivní mobilita analytu, $\mu_{A,eff}$, potom závisí na koncentraci komplexačního činidla v BGE podle vztahu

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

kde μ_A je mobilita volného analytu, μ_{AC} mobilita komplexu a $[C]$ je rovnovážná koncentrace komplexačního činidla. Rovnovážnou koncentraci komplexačního činidla je možné nahradit za analytickou při dostatečném nadbytku komplexačního činidla. Tato podmínka může být v CZE zajištěna proložením píku analytu Haarhoffovou-van der Lindeho (HVL) funkcí [4], kdy získáme migrační čas analytu při nekonečném zředění. Rovnici (1) lze ovšem k vyhodnocení experimentálních dat použít pouze tehdy, pokud se efektivní mobilita analytu mění jenom v důsledku komplexace. V praxi bývá efektivní mobilita analytu ovlivněna dalšími faktory, jako je měnící se iontová síla,

viskozita a teplota BGE. V takovém případě je třeba experimentální data před vyhodnocením vhodně korigovat nebo příslušné korekce zabudovat do regresní funkce [5]. Mnoho autorů tyto faktory vůbec nebere v úvahu. Takto určené konstanty stability jsou ale platné pouze v daných systémech a mohou sloužit jenom jako hrubý odhad síly interakce.

Nespornou výhodou kapilární elektroforézy je existence jejího uceleného matematického modelu. Vývoj těchto modelů a jejich implementace do počítačových simulačních programů probíhá již více než 30 let. V dnešní době, kdy je každá laboratoř zcela samozřejmě vybavena výkonnými počítači, přechází počítačová simulace do běžné laboratorní praxe. Hlavními výhodami simulací je i) detailní náhled do separačního procesu, který jej umožňuje pochopit a vysvětlit ii) možnost optimalizovat separační podmínky ještě před prováděním samotných experimentů a iii) využití k vzdělávacím účelům. Historický přehled včetně možných aplikací běžně dostupných simulačních programů lze najít v přehledových člancích Thormanna a kol.[6], [7].

Matematické modely kapilární elektroforézy jsou založeny na rovnicích popisujících acidobazické/komplexační rovnováhy, na podmínce elektroneutality a rovnicích kontinuity. Rovnice kontinuity jsou nelineární parciální diferenciální rovnice vycházející ze zákona zachování hmoty a popisující distribuci koncentrací jednotlivých složek v čase a prostoru [8]. Soustava těchto rovnic nemá analytické řešení. Je však možné ji řešit numericky pomocí dynamických simulací.

V dnešní době jsou k dispozici především tři dynamické simulátory elektroforézy: GENTRANS [9] – [11], SIMUL 5 [12] a SPRESSO [13], [14].

Dynamické simulace elektromigrace poskytují kompletní obrázek elektromigrace, ale vyžadují delší simulační čas, vyšší výpočetní kapacitu a zkušeného uživatele. Uspořádání kapilární zónové elektroforézy však umožňuje rovnice popisující elektromigraci linearizovat. Linearizovaný model vychází z předpokladu, že se dávkuje tak malé množství analytu, že se složení BGE takřka nemění. A pokud jsou výchozí změny BGE malé, budou také změny v průběhu elektromigrace malé a přímo úměrné. Tento předpoklad vede k výraznému zjednodušení rovnic kontinuity a nalezení jejich analytického řešení.

Poppe a kol. [15], [16] jako první zlinearizovali rovnice popisující elektromigraci a ukázali, že jejich řešení vede k problematice matic a jejich vlastních čísel. Na tuto práci

navázali Štědrý a kol. [17], kteří sestavili tyto matice tak, že jejich vlastní čísla měla rozměr elektroforetických mobilit (*eigenmobilit*), přičemž některé z nich nepřísluší žádnému dávkovanému analytu – tzv. systémové *eigenmobility*.

Štědrý a kol. odvodili linearizovaný model elektromigrace nejprve pro silné elektrolyty [17], pro uni-univalentní slabé elektrolyty [18], a nakonec obecně, bez jakýchkoliv omezení týkajících se složení či valence jednotlivých složek [19]. Tento model byl zabudován do simulačního programu PeakMaster verze 5.2 [20]. V roce 2012 byl tento linearizovaný model rozšířen o nelineární člen migrace [21], [22].

Kvalita elektroforetické separace může být významně ovlivněna disperzními jevy. Disperze způsobuje rozšiřování a deformaci píků, což snižuje citlivost a účinnost separace. K celkové disperzi píků přispívá podélná difúze, vznik Joulova tepla (teplotní efekty v kapiláře), adsorpce na stěnu kapiláry, elektromigrační disperze, laminární tok... Tyto jevy jsou detailně popsány v několika přehledových člancích [23]-[25]. Mezi nejdůležitější z těchto faktorů patří elektromigrační disperze (EMD), která způsobuje deformaci ideálního gaussovského píku na typický trojúhelníkový tvar. U takto deformovaných píků nelze použít čas maxima pro výpočet mobility. Erny a kol [26], [27] ukázali, že k nalezení správné hodnoty migračního času je třeba trojúhelníkový pík proložit HVL funkcí [4].

EMD je známa a zkoumána již dlouhou dobu. Vliv EMD na tvar píku analytu se projeví, pokud rychlost migrace analytu závisí na jeho koncentraci v zóně. Xu a kol. [28] jako první upozornili na to, že EMD je ovlivněna jak vodivostí, tak pH základního elektrolytu. Gebauer a kol. [29], [30] představili základní popis EMD, který charakterizuje míru EMD pomocí jednoduchých diagramů. Později [31], [32] byla zavedena veličina *velocity slope*, která je kvantitativní charakteristikou tendence daného analytu v daném BGE podléhat EMD. Na tuto práci navázali Horká a kol. [33], kteří zavedli veličinu *relative velocity slope*, S_X :

$$S_X = \lim_{c_X \rightarrow 0} \frac{\kappa}{v_X} \frac{dv_X}{dc_X}, \quad (2)$$

kde κ je specifická vodivost BGE, v_X je rychlost analytu a c_X jeho koncentrace. Pokud je tato veličina kladná, pík má ve směru migrace ostrou náběžnou hranu a rozmytou sestupnou hranu – chvostující pík (*tailing*). V opačném případě pozorujeme pík frontující (*fronting*).

2. Cíle práce

Cíle této dizertační práce lze shrnout do následujících bodů:

1. Rozšířit dynamický simulační program Simul o komplexační rovnováhy a experimentálně ověřit platnost navrženého modelu (Publikace I a II).
2. Potvrdit funkčnost a platnost částečného linearizovaného modelu elektroforézy uvažujícího komplexaci analytu s neutrálním komplexačním činidlem implementovaného do programu PeakMaster 5.3 Complex. Využít tento model k vysvětlení vlivu komplexace na tvar píku analytu (Publikace III a IV).
3. Vyšetřit a popsat vliv interakce složek BGE s komplexačním činidlem na stanovení konstant stability (Publikace V a VI).

3. Výsledky a diskuse

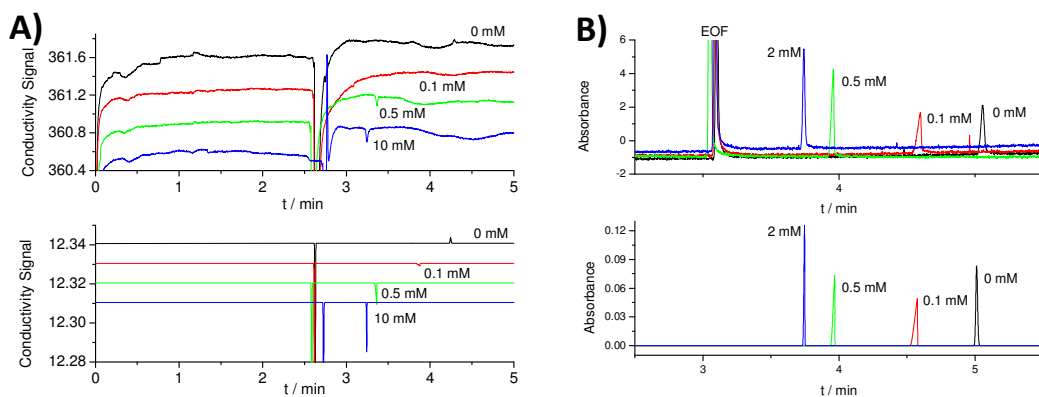
3.1 Dynamická simulace elektroforetických systémů s komplexačními rovnováhami

Matematických modelů elektroforézy zahrnujících komplexační rovnováhy nebylo publikováno mnoho a všechny prozatím publikované jsou založeny na více či méně významných zjednodušení. Z tohoto důvodu byl v rámci této dizertační práce rozšířen náš stávající model zabudovaný v programu SIMUL 5 [12] pro separační systémy s komplexujícími složkami.

Náš model je platný pro systémy, které obsahují jedno komplexační činidlo (ligand) o libovolné valenci a jakékoliv množství vícevalentních složek (kyselin, zásad, amfolytů). Předpokládáme, že komplexační činidlo může interagovat se všemi složkami prostředí, ovšem pouze v nejjednodušší, ale také nejčastější stechiometrii analyt:komplexační činidlo 1:1. Takový systém lze popsat na základě komplexačních/acidobazických rovnováh a podmínky elektroneutality. Matematický model elektromigrace je založen na jednorozměrných parciálních diferenciálních rovnicích kontinuity, které vyjadřují vývoj celkové koncentrace jednotlivých složek v čase a v prostoru. Látkový tok se v našem případě skládá ze tří složek – difúze, elektromigrace a elektroosmotického toku (EOF) s rychlostí v_{EOF} .

V prvním kroku jsme ukázali, že Simul 5 Complex je vhodným nástrojem pro simulaci všech běžných elektroforetických metod, které se používají k určování konstant stability. V následujícím kroku jsme platnost modelu ověřili na třech různých experimentálních systémech, které se lišily typem analytu, komplexačního činidla a silou interakce mezi analytem a komplexačním činidlem. Simulace jsme provedli při různých koncentracích komplexačního činidla, abychom mohli posoudit vliv komplexace na separaci. Simulace byly provedeny za stejných podmínek jako příslušné experimenty. Jak je vidět na Obr. 1, bylo dosaženo výborné shody mezi experimentálními a simulovanými píky co se týče jejich pozice, amplitudy i tvaru. Dále stojí za povšimnutí, že se s měnící se koncentrací komplexačního činidla v pufru výrazně mění také tvar píku analytu.

Elektromigrační disperze se projevuje, pokud rychlost analytu závisí na jeho koncentraci v zóně – obecně se předpokládá, že vzniká v důsledku změn vodivosti a pH



Obr. 1 Srovnání experimentálních (nahore) a simulovaných (dole) elektroferogramů – analyt R-flurbiprofen (koncentrace ve vzorku 0,3 mM), komplexační činidlo Mal-β-CD. A: vodivostní signál [34], B: UV-detekce. Jednotlivé křivky (píky) jsou označeny koncentrací komplexačního činidla v BGE. Pro lepší přehlednost byly experimentální a simulované křivky z vodivostního detektoru posunuty podél osy y.

v zóně analytu. Ovšem přidavek 0,1 mM neutrálního cyclodextrinu nemůže způsobit žádné výrazné změny vodivosti či pH v zóně analytu. Pík analytu by měl tedy mít stejný tvar jako v prostředí bez přídavku cyclodextrinu. Výrazná elektromigrační disperze pozorovaná v tomto systému proto musí být způsobena komplexací analytu s cyclodextrinem.

Efektivní mobilita analytu, $\mu_{A,eff}$, který se vyskytuje ve volné a komplexované formě, může být vyjádřena jako vážený průměr mobility volného analytu, μ_A , a komplexu μ_{AC} :

$$\mu_{A,eff} = \alpha\mu_{AC} + (1 - \alpha)\mu_A, \quad (3)$$

kde příslušnou váhou je stupeň komplexace analytu α . Stupeň komplexace analytu silně závisí na koncentraci analytu v zóně, díky čemuž se s koncentrací v zóně mění také jeho rychlost. Proto v tomto systému pozorujeme výraznou elektromigrační disperzi. Tento jev se projeví především v systémech se silnou komplexací.

3.2 PeakMaster 5.3 Complex: Elektromigrační disperze v systémech s neutrálním komplexačním činidlem a plně nabitým analytem

V rámci Publikace III byl představen matematický model zabudovaný do nové verze programu PeakMaster 5.3 Complex. Tento model popisuje systémy, které obsahují pouze dvě složky BGE, neutrální komplexační činidlo a plně nabitý analyt. Komplexaci předpokládáme pouze mezi komplexačním činidlem a analytem ve stechiometrii 1:1. Po zadání komplexačních charakteristik (konstanta stability, mobilita komplexu) program poskytuje dvě charakteristiky EMD: *nonlinear electromigration mobility slope of the analyte zone*, $S_{\text{EMD,A}}$, a *relative velocity slope*, S_X . $S_{\text{EMD,A}}$ lze snadno vypočítat z experimentálních či simulovaných elektroferogramů podle následujícího vztahu

$$S_{\text{EMD,A}} = \frac{\mu_{\text{MAX,A}} - \mu_{\text{A,eff}}}{c_A}, \quad (4)$$

kde $\mu_{\text{MAX,A}}$ je mobilita analytu určená z maxima píku, $\mu_{\text{A,eff}}$ je efektivní mobilita analytu určená pomocí HVL funkce a c_A je aktuální koncentrace analytu v zóně analytu. S_X potom můžeme získat jednoduchým přepočtem:

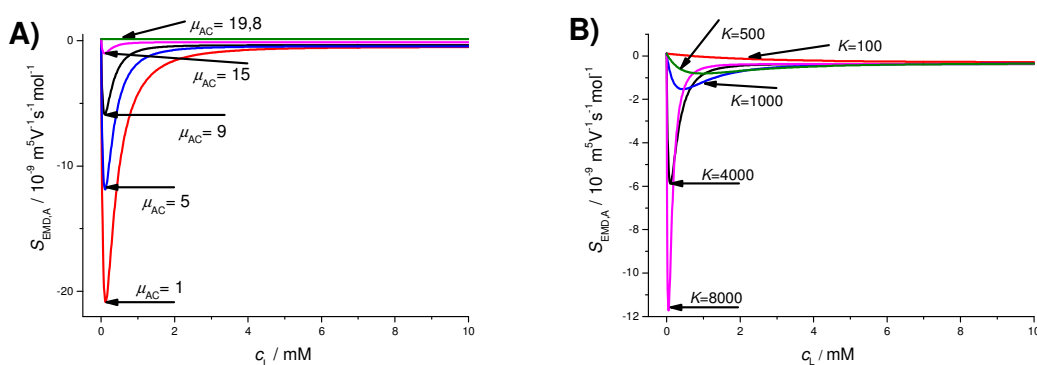
$$S_X = \frac{1}{2} \frac{S_{\text{EMD,A}} \kappa}{\mu_{\text{A,eff}}}, \quad (5)$$

kde κ je vodivost BGE. Kromě těchto hodnot PeakMaster 5.3 Complex vykresluje také závislost daných veličin na koncentraci komplexačního činidla v BGE.

Platnost představeného modelu jsme ověřovali jak pomocí experimentů, tak pomocí simulací programem Simul 5 Complex. Tři testované systémy se lišily v použitém neutrálním komplexačním činidle (tedy v síle komplexace). Experimenty a simulace se perfektně shodují, co se týče pozice i tvaru píků. Z experimentálních i simulovaných elektroferogramů jsme poté vypočítali hodnoty $S_{\text{EMD,A}}$ a S_X . Hodnoty předpovězené programem PeakMaster 5.3 Complex jsou ve výborné shodě s hodnotami simulovanými. Experimentální hodnoty se mírně odchylují, avšak dodržují stejný trend.

Na základě experimentálních a simulovaných dat jsme prokázali přímou souvislost mezi komplexací a elektromigrační disperzí. Na Obr. 2A je znázorněna závislost $S_{\text{EMD,A}}$ na koncentraci komplexačního činidla v BGE pro teoretické systémy se stejnou mobilitou volného analytu a konstantou stability ($\mu_A = 19,81 \times 10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$, $K = 4\,037 \text{ mol dm}^{-3})^{-1}$), ale pro pět různých mobilit komplexu analyt-komplexační činidlo. Tyto

závislosti procházejí výrazným minimem. Se zvyšujícím se rozdílem mobility volného analytu a komplexu je toto minimum výraznější a vede k výraznější EMD a deformovanějším píkům. Toto minimum však nastává při stejné koncentraci komplexačního činidla bez ohledu na rozdíl mobilit. Na Obr. 2B je znázorněna závislost $S_{\text{EMD},A}$ na koncentraci komplexačního činidla v BGE pro teoretické systémy se stejnou mobilitou volného analytu a mobilitou komplexu analyt-komplexační činidlo ($\mu_A = 19,81 \times 10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$, $\mu_{AC} = 8,82 \times 10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$), ale pro pět různých konstant stability. Jak je vidět, se zvyšující se konstantou stability je minimum v závislosti hlubší, ostřejší, nastává při nižší koncentraci komplexačního činidla BGE a při nižší koncentraci komplexačního činidla také dosahuje $S_{\text{EMD},A}$ limitní hodnoty. To znamená, že se zvyšující se konstantou stability je pozorovaná EMD výraznější, ale vliv komplexace na EMD přetrvává na užším intervalu koncentrací komplexačního činidla.



Obr. 2 Závislost $S_{\text{EMD},A}$ na koncentraci komplexačního činidla v BGE pro analyt R-flurbiprofen a různá teoretická komplexační činidla. (A) $\mu_{AC} = 1, 5, 9, 15$ a $19,8 \times 10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$, $K = 4\,000$ (mol dm^{-3}) $^{-1}$. Jednotlivé křivky jsou označeny hodnotou mobility komplexu analyt – komplexační činidlo. (B) $\mu_{AC} = 9 \times 10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$, $K = 100, 500, 1\,000, 4\,000$ a $8\,000$ (mol dm^{-3}) $^{-1}$. Jednotlivé křivky jsou označeny hodnotou komplexační konstanty.

Nová verze programu PeakMaster 5.3 Complex je schopna během několika vteřin předpovědět tvar píku analytu v systémech obsahující plně nabitý analyt a neutrální komplexační činidlo. Může tedy pomoci vybrat vhodné experimentální podmínky vedoucí k potlačení EMD a optimalizaci separačních podmínek.

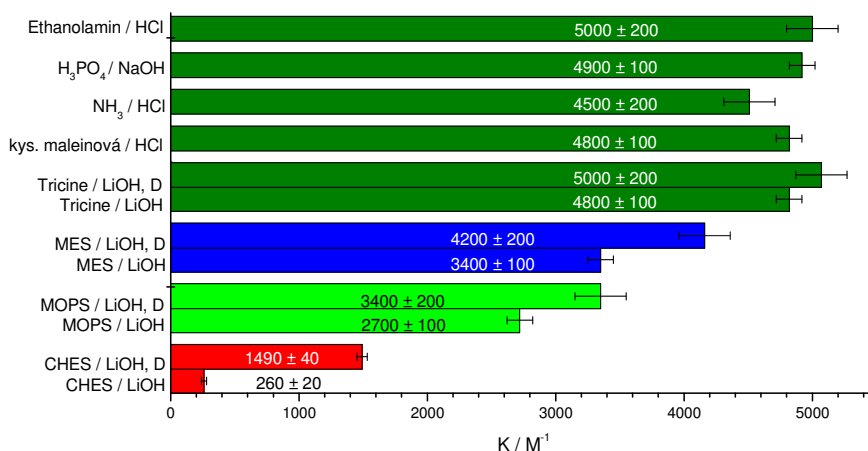
3.3 Komplexace složek pufru s neutrálním komplexačním činidlem: Vliv na určování konstant stability

Interakce analytu s komplexačními činidly je důkladně popsána. Ovšem komplexační činidlo může současně interagovat také se složkami separačního pufru. Tento typ interakce však ještě nebyl v literatuře detailně studován [35] – [38].

V Publikaci V jsme se zaměřili na popis interakce neutrálního komplexačního činidla se složkami separačního pufru a její důsledky na základní vlastnosti použitého pufru jako pH, iontovou sílu či vodivost. Praktickým důsledkům těchto interakcí se věnujeme v Publikaci VI. Prokázali jsme, že interakce komplexačního činidla se složkou pufru může mít za důsledek vznik nežádoucích systémových píků či zhoršení výsledků separace. Další z významných důsledků těchto interakcí je vliv na určování konstant stability – a to jak plně nabitých analytů (silných elektrolytů), tak analytů pouze částečně disociovaných (slabých elektrolytů).

V případě interakce složek pufru s komplexačním pufrům se část komplexačního činidla spotřebuje a rovnovážná koncentrace volného komplexačního činidla se může zásadně lišit od koncentrace analytické. Situace je o to složitější, že nabitá a nenabitá forma složek pufru může interagovat s komplexačním činidlem jinak silně. Pro demonstraci tohoto jevu jsme určili konstantu stability R-flurbiprofenu (plně nabitý za aktuálních experimentálních podmínek) s neutrálním β -cyklodextrinem (β -CD) v několika různých pufrech. Jak je vidět na Obr. 3, komplexační konstanty určené v pufrech obsahujících ethanolamin, kyselinu fosforečnou, amoniak, kyselinu maleinovou nebo tricin (N-(2-hydroxy-1,1-bis(hydroxymethyl)ethyl)glycin) jsou takřka stejné (v rámci experimentální chyby). To znamená, že tyto složky pufrů s β -CD neinteragují takřka vůbec (případně interagují stejně silně). Avšak komplexační konstanty určené v běžně používaných pufrech obsahujících 2-(N-morfolin)ethansulfonovou kyselinu (MES), 3-morfolinpropan-1-sulfonovou kyselinu (MOPS) a N-cyklohexyl-2-aminoethan sulfonovou kyselinu (CHES) jsou významně nižší. Následně jsme stanovili komplexační konstanty ve stejných pufrech, pouze pětkrát zředěných (D). Jak je zřejmé z Obr. 3, v pufrech MES, MOPS a CHES se hodnota komplexační konstanty významně změnila. V případě interagujících pufrů určená komplexační konstanta tedy nezáleží pouze na použitém analytu a komplexačním činidle, ale také na typu a koncentraci pufru. Takto určené zdánlivé konstanty stability jsou platné pouze pro daný systém, jsou

nižší než konstanty termodynamické a mohou poskytovat zcela mylnou informaci o síle interakce.



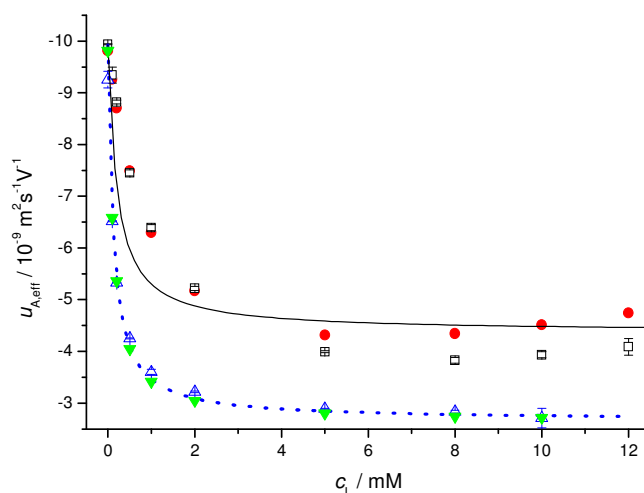
Obr. 3 Komplexační konstanty[†] R-flurbiprofenu s β -CD určené v různých pufrech. Pufr označený písmenem D je 5x zředěný. Přesné složení pufrů a experimentální podmínky jsou uvedeny v *Table 1* v Publikaci VI.

Významně složitější situace nastává při určování konstanty stability nabitě a nenabitě formy analytu (slabý elektrolyt). Konstanta stability nenabitě formy se určuje při hodnotě pH, kdy je analyt pouze částečně disociován ($\text{pH} \doteq \text{pK}_\text{A}$). Velmi důležité je v průběhu experimentů držet konstantní experimentální podmínky, především pH. Ovšem interakce složek pufru s komplexačním činidlem může významně pH pufru změnit a tím stanovení konstanty stability neutrální formy analytu znemožnit.

K potvrzení této domněnky jsme provedli dvě sady ACE experimentů s R-flurbiprofenem a β -CD v pufrech tvořených kyselinou octovou nebo kyselinou benzoovou a hydroxidem lithným. pH obou pufrů bylo 3,98, R-flurbiprofen je v nich tedy částečně disociovaný ($\text{pK}_\text{A} = 4,16$). Pomocí nezávislých experimentů jsme ukázali, že kyselina octová s β -CD nijak významně neinteraguje, zatímco kyselina benzoová interaguje silně. Jak je vidět na Obr. 3, data získaná v pufru s kyselinou benzoovou vůbec nevykazují očekávaný hyperbolický trend a nelze je proložit regresní funkcí. Na Obr. 3 jsou zároveň vidět data získaná simulací obou těchto systémů v programu Simul 5 Complex. V případě pufru obsahujícím kyselinu benzoovou je zohledněna komplexace jak analytu, tak kyseliny benzoové s β -CD (příslušné komplexační

[†]Komplexační parametry použité v tomto oddílu práce jsou korigovány na iontovou sílu, jedná se o parametry termodynamické. Pro přehlednost je uvádíme s jednotkou (mol dm^{-3})⁻¹.

parametry kyseliny benzoové s β -CD byly stanoveny pomocí nezávislých ACE experimentů). Je zřejmé, že experimentální a simulovaná data jsou v dobré shodě, což dokonale podporuje naši hypotézu, že interakce komplexačního činidla se složkami pufru je jediným důvodem výše popsaného chování.



Obr. 4 Závislost efektivní mobility částečně disociovaného R-flurbiprofenu na koncentraci β -CD. ● a □ představují experimentální a simulované body v pufru s kyselinou benzoovou. ▲ a ▼ představují experimentální a simulované body v acetátovém pufru. Křivky odpovídají regresní analýze.

Je tedy možno shrnout, že komplexační konstanty určené metodou ACE v pufrech, které interagují s komplexačním činidlem, mohou být zcela nesprávné, poskytovat naprosto mylnou informaci o síle komplexace nebo stanovení úplně znemožnit. Proto by měla být možnost interakce komplexačního činidla se složkami pufru prověřena před samotnými experimenty.

Závěr

Předkládaná dizertační práce byla zaměřena na matematický popis komplexačních systémů v kapilární elektroforéze a možnosti predikce výsledků enantioseparací.

Byl odvozen kompletní teoretický model kapilární elektroforézy s komplexačními rovnováhami. Tento model byl implementován do dynamického simulátoru Simul 5 Complex, který umožňuje simulovat všechny běžně používané metody k určení konstant stability i výsledky enantioseparací. Platnost tohoto modelu a simulátoru byla ověřena pomocí experimentů ve třech různých enantioselektivních systémech. Simulované a experimentální elektroferogramy byly ve výborné shodě, co se týče amplitudy, polohy i tvaru píků analytu (jak z UV, tak vodivostní detekce). Simul 5 Complex je tedy vhodným nástrojem k predikci výsledků enantioseparace a optimalizaci separačního systému.

Zároveň byl odvozen model elektromigrační disperze pro systémy obsahující neutrální komplexační činidlo a plně nabitý analyt. Tento model byl implementován do simulačního programu PeakMaster 5.3 Complex. Nově odvozený model byl ověřen jak experimentálně, tak pomocí simulací v programu Simul 5 Complex. Ke kvantitativnímu popisu deformace píku elektromigrační disperzí byly zvoleny veličiny S_X , *relative velocity slope*, a $S_{EMD,A}$, *the nonlinear mobility slope of the analyte zone*. Předpovězené hodnoty byly v dobré shodě s hodnotami vypočítanými z experimentálních a simulovaných elektroferogramů. Současně byl PeakMaster 5.3 Complex použit k vysvětlení vlivu charakteru interakce mezi analytem a komplexačním činidlem na tvar píku. PeakMaster 5.3 Complex tak byl ukázán jako vhodný nástroj k optimalizaci separačních podmínek vedoucí k eliminaci EMD.

Třetí část práce je věnována stanovení konstant stability v systémech, ve kterých složky základního pufru interagují s komplexačním činidlem. Taková interakce může změnit vlastnosti základního elektrolytu jako pH, vodivost či iontovou sílu. Bylo ukázáno, že konstanty stability určené v takových systémech mohou poskytovat zcela mylnou informaci o síle interakce mezi analytem a komplexačním činidlem. Takto určené komplexační parametry závisí nejen na analytu a komplexačním činidle ale také na výběru pufru a dokonce i jeho koncentraci. Stanovení konstanty stability neutrální a nabitě formy slabého elektrolytu může být interakcí složek základního elektrolytu s komplexačním činidlem zcela znemožněno. Studované systémy byly nasimulovány

pomoci dynamického simulátoru Simul 5 Complex. Výborná shoda experimentálních a simulovaných dat potvrdila, že interakce komplexačního činidla se složkami základního elektrolytu je jedinou příčinou výše popsaného chování.

Literatura

- [1] Rundlett K. L., Armstrong D. W., *Electrophoresis* **2001**, 22, 1419-1427
- [2] Tanaka Y., Terabe S., *Journal of Chromatography B* **2002**, 768, 81-92
- [3] Jiang C. X., Armstrong D. W., *Electrophoresis* **2010**, 31, 17-27
- [4] Haahrhoff P. H., Van der Linde H. J., *Analytical Chemistry* **1966**, 38, 573-582
- [5] Uselova-Vcelakova K., Zuskova I., Gas B., *Electrophoresis* **2007**, 28, 2145-2152
- [6] Thormann W., Caslavská J., Breadmore M. C., Mosher R. A., *Electrophoresis* **2009**, 30, S16-S26
- [7] Thormann W., Breadmore M. C., Caslavská J., Mosher R. A., *Electrophoresis* **2010**, 31, 726-754
- [8] Gas B., *Electrophoresis* **2009**, 30, S7-S15
- [9] Thormann W., Zhang C. X., Caslavská J., Gebauer P., Mosher R. A., *Analytical Chemistry* **1998**, 70, 549-562
- [10] Mao Q., Pawliszyn J., Thormann W., *Analytical Chemistry* **2000**, 72, 5493-5502
- [11] Breadmore M. C., Mosher R. A., Thormann W., *Analytical Chemistry* **2006**, 78, 538-546
- [12] Hruska V., Jaros M., Gas B., *Electrophoresis* **2006**, 27, 984-991
- [13] Bercovici M., Lele S. K., Santiago J. G., *Journal of Chromatography A* **2009**, 1216, 1008-1018
- [14] Bercovici M., Lele S. K., Santiago J. G., *Journal of Chromatography A* **2010**, 1217, 588-599
- [15] Poppe H., *Journal of Chromatography* **1990**, 506, 45-60
- [16] Poppe H., *Analytical Chemistry* **1992**, 64, 1908-1919
- [17] Stedry M., Jaros M., Gas B., *Journal of Chromatography A* **2002**, 960, 187-198
- [18] Stedry M., Jaros M., Vcelakova K., Gas B., *Electrophoresis* **2003**, 24, 536-547
- [19] Stedry M., Jaros M., Hruska V., Gas B., *Electrophoresis* **2004**, 25, 3071-3079
- [20] Jaros M., Hruska V., Stedry M., Zuskova I., Gas B., *Electrophoresis* **2004**, 25, 3080-3085
- [21] Hruska V., Riesova M., Gas B., *Electrophoresis* **2012**, 33, 923-930
- [22] Riesova M., Hruska V., Gas V., *Electrophoresis* **2012**, 33, 931-937
- [23] Gas B., Stedry M., Kenndler E., *Electrophoresis* **1997**, 18, 2123-2133
- [24] Gas B., Kenndler E., *Electrophoresis* **2000**, 21, 3888-3897
- [25] Gas B., Kenndler E., *Electrophoresis* **2002**, 23, 3817-3826
- [26] Erny G. L., Bergstrom E. T., Goodall D. M., *Analytical Chemistry* **2001**, 73, 4862-4872
- [27] Erny G. L., Bergstrom E. T., Goodall D. M., *Journal of Chromatography A* **2002**, 959, 229-239
- [28] Xu X., Kok W. T., Poppe H., *Journal of Chromatography A* **1996**, 741, 211-227
- [29] Gebauer P., Bocek P., *Analytical Chemistry* **1997**, 69, 1557-1563
- [30] Gebauer P., Caslavská J., Thormann W., Bocek P., *Journal of Chromatography A* **1997**, 772, 63-71
- [31] Gebauer P., Borecka P., Bocek P., *Analytical Chemistry* **1998**, 70, 3397-3406
- [32] Gebauer P., Desiderio C., Fanali S., Bocek P., *Electrophoresis* **1998**, 19, 701-706
- [33] Horka M., Slais K., *Electrophoresis* **2000**, 21, 2814-2827
- [34] Gas B., Zuska J., Coufal P., van der Goor T., *Electrophoresis* **2002**, 23, 3520-3527
- [35] Rawjee Y. Y., Williams R. L., Vigh G., *Analytical Chemistry* **1994**, 66, 3777-3781
- [36] Chen Y. R., Ju D. D., Her G. R., *Journal of High Resolution Chromatography* **2000**, 23, 409-412
- [37] Fang L., Yin X. B., Wang E., *Analytical Letters* **2007**, 40, 3457-3471
- [38] Evans C. E., Stalcup A. M., *Chirality* **2003**, 15, 709-723

1. Introduction

Capillary zone electrophoresis (CZE) is one of the most widely used separation techniques in analytical laboratories. Separation is based on the different velocity of analyte ions in electric field. The most important advantages of CZE are high efficiency of separation, short time of analysis and low consumption of buffers and analytes. CZE is suitable for separation of wide range of analytes – from small ions to macromolecules. If the chiral complexation agent is added to the background electrolyte, CZE can be used for separation of chiral substances – especially enantiomers. Various chiral selectors suitable for CZE are available on the market *e.g.* cyclodextrins, macrocyclic antibiotics, crownethers, cyclofructans or chiral micels. Simultaneously, not only the type but also the concentration of chiral selector can be easily varied in CZE separation.

Stability constants characterize binding interaction between an analyte and complexation agent. Several methods for determination of stability constants by CZE have been established and used. They are summarized in several review papers [1] - [3]. Affinity capillary electrophoresis (ACE) is the most frequently used method for fast equilibria (roughly said, when the process of complexation is much faster than the separation process). In ACE, typically, series of experiments with increasing concentration of the complexation agent in BGE are performed. The effective mobility of the analyte, $\mu_{A,eff}$, depends on the concentration of complexation agent in BGE by the following equation:

$$\mu_{A,eff} = \frac{\mu_A + \mu_{AC}K'[C]}{1 + K'[C]}, \quad (6)$$

where μ_A is mobility of free analyte, μ_{AC} mobility of complex and $[C]$ is equilibrium concentration of complexation agent. If the concentration of complexation agent is much higher than the concentration of complex, the equilibrium concentration of complexation agent can be approximated by the analytical one. This can be ensured by fitting of analyte peaks by Haarhof van der Linde function (HVL) [4], which provides migration time of analyte at its infinite dilution.

Eq. 1 can serve as the suitable nonlinear regression function for fitting of experimental data only in the case that the effective mobility of the analyte is influenced entirely by complexation with complexation agent used. However, the effective mobility of analyte

can be influenced by other factors especially by the change of viscosity, temperature and ionic strength of BGE. In such case, the experimental data have to be either properly corrected or the appropriate corrections have to be implemented in the Eq. 1 [5]. Although the stability constants determined without appropriate corrections cannot be considered as the thermodynamic ones and can be used only as rough estimation of the strength of interaction, they are often published in the literature.

One of the most important advantages of capillary electrophoresis is existence of its complete mathematical model, which was implemented in several simulation programs providing the deep insight into the process of electromigration. The development of various models of electromigration in computer programs has been in progress for more than 30 years. Nowadays due to the increasing computational power computer simulations play significant role in common laboratory practice. The advantages of dynamic simulations are i) gaining insight into the separation process and its understanding ii) possibility to optimize separation conditions and iii) its use for educational purposes. The historical overview, basic properties and applicability of available dynamic simulators can be found in several review papers [6], [7].

Mathematical models that describe the electromigration separation systems are based on complexation/acid-base equilibria, the electroneutrality condition and the continuity equations. The continuity equations are nonlinear partial differential equations that have no analytical solution but can be solved in time and space numerically by dynamic simulations [8].

There are three most widely used dynamic simulators of electrophoresis available: GENTRANS [9]-[11], SIMUL 5 [12] and SPRESSO [13], [14].

The dynamic simulations offer deep insight into the process of electrophoretic separation, however, the numeric simulation is often time demanding and requires experienced users. Because of the special experimental setup of capillary zone electrophoresis its governing equations can be solved by linearization. The amount of analytes is relatively small in comparison to the amount of the BGE so even if sample is injected the BGE composition remains almost unchanged. If the input changes are small, the output changes get also small and linearly proportional. Such approach enables significant simplification of the continuity equations and finding of the analytical solution.

Poppe et al [15], [16] shown as first that the linearized model of electromigration can be treated as the eigenproblem of the matrix. Štědrý et al. transformed the matrix in such a way that its eigenvalues have the dimension of electrophoretic mobility, and called them eigenmobilities.

Štědrý et al. derived linearized model of electromigration first for strong electrolytes [17], then for uni-univalent weak electrolytes [18], and finally, generally for any separation systems without any restrictions [19]. This mathematical model was implemented into simulation program PeakMaster 5.2 [20]. In 2012 the theoretical model of electromigration was extended by a nonlinear term of electromigration, which allows to predict the shape of system peaks, and new version PeakMaster 5.3 was presented [21], [22].

The quality of an electrophoretic separation can be easily ruined by excessive peak broadening. The summary of the most common causes of peak broadening (*e.g.* longitudinal diffusion, Joule heating, electromigration dispersion, wall adsorption, laminar flow, *etc.*) can be found in several review papers [23]-[25]. One of the most important and severe ones is electromigration dispersion (EMD), which leads to characteristic triangular peak shapes. Erny et al. [26], [27] showed that the triangular analyte peak can be fitted by Haarhoff van der Linde (HVL) [4] function to eliminate the effect of electromigration dispersion on migration time. This way the real position of analyte peak at its infinite dilution can be determined.

EMD has been intensively studied for a long time. Generally, EMD can be observed if the velocity of the analyte depends on its concentration in the sample zone. Xu et al. [28] found that both the pH and conductivity of the BGE influence the extent of EMD. Gebauer et al. [29], [30] introduced fundamental characterization of EMD based on simple diagrams. The tendency of an analyte to undergo EMD was later characterized by its velocity slope [31], [32]. In 2005, Horka et al. [33] introduced the relative velocity slope, S_X :

$$S_X = \lim_{c_X \rightarrow 0} \frac{\kappa}{v_X} \frac{dv_X}{dc_X}, \quad (7)$$

where κ is specific conductivity of BGE, v_X is velocity of analyte and c_X is concentration of analyte. The authors also showed that for S_X less than zero the zones are fronting, for more than zero are tailing.

2. Objectives of the thesis

The thesis has three major objectives:

1. Establishing of the dynamic simulation program Simul 5 for systems with complexation agent and experimental verification of the model.
2. Verification of new linearized model of electromigration dispersion in systems that contain a neutral complexation agent and fully charged analyte implemented into program Peakmaster 5.3 Complex. Discussion of impact of complexation on the analyte peak shape.
3. Elucidation of impact of complexation of buffer constituents with complexation agent on the complexation constant determination.

3. Results and discussion

3.1 Dynamic simulation of the effects of complex-formation equilibria in electrophoresis

The complexation equilibria in CZE are widely discussed. However, almost all presented models of electromigration with complexation equilibria apply some simplifications and a complete model of electromigration in systems that contain a complexing ligand has not been published yet. Thus, we extended mathematical model of electromigration implemented in Simul 5 [12] for systems with complexation equilibria.

The model is applicable for any numbers of multivalent constituents (acids, bases, ampholytes) and one multivalent complexing agent (ligand). The ligand is allowed to form complexes with all other constituents, regardless whether analytes or BGE constituents. The model considers the most common complexation stoichiometry 1:1. Such system can be described by complexation/acid-base equilibria and the electroneutrality condition. Mathematical model of electromigration is based on the set of one-dimensional continuity equations, which express the development of the total concentrations of the constituents in time and space. In our case, the mass flux density consists of the diffusion flux, the electromigration flux and the electroosmotic flow (EOF) with velocity v_{EOF} .

In the first step, we showed that Simul 5 Complex can be used for the simulation of several experimental setups that were applied for the determination of complexation parameters. In the next step, Simul 5 Complex was verified experimentally. Three separation systems differing in the type of complexation agent and analyte and the magnitude of the complexation constant were selected for verification. The experiments and simulations were performed at various concentrations of the complexation agent in order to discuss the influence of complexation on separation. The simulations were performed at exactly the same conditions as the experiments. The simulation and experimental electrophoregrams show very good agreement in the position, shape and amplitude of the analyte peaks, see Fig. 1. Obviously, the shape of the analyte peak changes significantly with complexation agent concentration.

Electromigration dispersion occurs, if the velocity of the analyte in its own zone significantly depends on its concentration. Usually, EMD is function of the conductivity and pH of the BGE. However, this cannot explain distortion of analyte peak in our

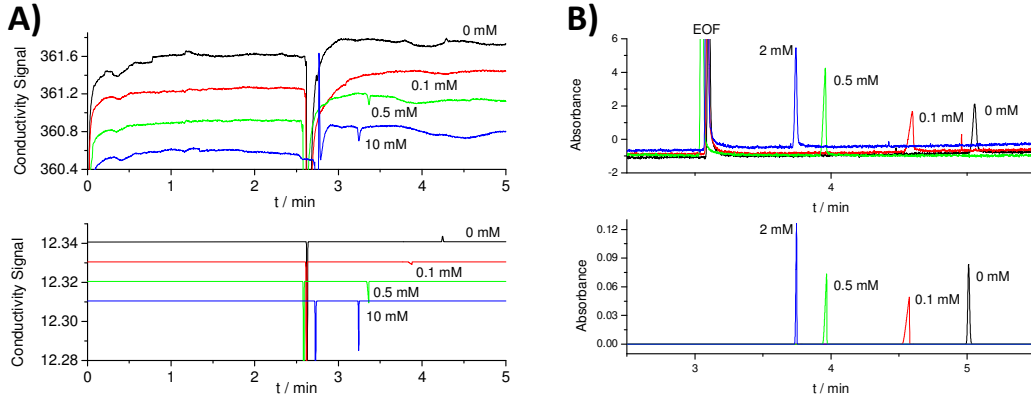


Figure 1: The comparison of the experimental (upper) and simulated (lower) profiles for the analyte R-flurbiprofen and the chiral selector MAL- β -CD. (A) Conductivity [34], (B) UV detection. The curves/analyte peaks are marked by the corresponding concentrations of the chiral selector. The experimental and simulated conductivity signals were shifted along the y-axis for better visibility, thus the y-axis is only a relative measure of the conductivity signal.

system. Addition of 0,1mM neutral complexation agent in BGE cannot change pH or conductivity in the analyte zone, importantly. The shape of analyte peak should be the same as in the system without complexation agent. Observed EMD must be a consequence of complexation of analyte with complexation agent.

The effective mobility of analyte, $\mu_{A,eff}$, in the systems where complexation occurs depends on the fraction of the complexed analyte, α , as follows:

$$\mu_{A,eff} = \alpha\mu_{AC} + (1-\alpha)\mu_A, \quad (8)$$

where μ_A is the mobility of the free analyte and μ_{AC} is the mobility of the complex. At low concentrations of complexation agent the fraction of the complexed analyte depends on the concentration of the analyte. Therefore, the velocity of the analyte is not constant in the sample zone and electromigration dispersion must occur. Stronger electromigration dispersion is naturally caused by stronger complexation.

3.2 PeakMaster 5.3 Complex: Electromigration dispersion in systems that contain a neutral complexation agent and fully charged analyte

New mathematical model of electromigration dispersion for separation systems that contain two buffer constituents, one neutral complexation agent and fully charged analyte was derived and implemented in new version of PeakMaster 5.3 Complex. Only the complexation between analyte and complexation agent in stoichiometry 1:1 is considered. PeakMaster 5.3 Complex provides two quantitative characteristics of EMD: nonlinear electromigration mobility slope of the analyte, $S_{\text{EMD,A}}$, and relative velocity slope, S_X . $S_{\text{EMD,A}}$, which can be calculated from the experimental or simulated data as

$$S_{\text{EMD,A}} = \frac{\mu_{\text{MAX,A}} - \mu_{\text{A,eff}}}{c_A}, \quad (9)$$

where $\mu_{\text{MAX,A}}$ is the mobility of an analyte determined from the peak maximum, $\mu_{\text{A,eff}}$ is the effective mobility of the analyte determined from the peak center at infinitely low analyte concentration (determined by fitting the peak with HVL function) and c_A is the actual analyte concentration in sample zone. S_X can be calculated from $S_{\text{EMD,A}}$:

$$S_X = \frac{1}{2} \frac{S_{\text{EMD,A}} \kappa}{\mu_{\text{A,eff}}}, \quad (10)$$

where κ is the conductivity of the BGE. PeakMaster 5.3 Complex is also able to plot the dependence of $S_{\text{EMD,A}}$ and S_X on the complexation agent concentration in the BGE.

The mathematical model was verified by both experiments and simulations, which were performed by dynamic simulator Simul 5 Complex. Three separation systems differing in the complexation agent (different values of complexation constants and mobilities of the complexes) were chosen for verification. Experiments and simulations are in perfect agreement in the positions and shapes of the analyte peaks. The nonlinear electromigration mobility slope values were calculated from experimental and simulated data. The $S_{\text{EMD,A}}$ and S_X values obtained by PeakMaster 5.3 Complex agree very well with those calculated from simulated electropherograms. The values determined from the experimental electropherograms slightly differ but they follow the same trend.

By means of PeakMaster 5.3 Complex we were able to show that complexation of the analyte with the complexation agent has to play the major role in the development of EMD. The $S_{\text{EMD,A}}$ values are plotted in Fig. 2A as a function of the concentration of the

neutral complexation agent using the same complexation constant and mobility value of free (non-complexed) analyte ($\mu_A = 19,81 \times 10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$, $K = 4\,037 \text{ mol dm}^{-3})^{-1}$), but five different mobilities of the complex. All depicted dependences show clear minimum, the minima become sharper and lead to increased EMD and worsened peak shapes as the magnitude of the difference between μ_A and μ_{AC} increases. However, the minima occur at the same complexation agent concentration irrespectively of the magnitude of the difference between mobilities. The dependence of $S_{\text{EMD},A}$ on the complexation agent concentration for the same complex mobility and free analyte mobility values ($\mu_A = 19,81 \times 10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$, $\mu_{AC} = 8,82 \times 10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$), but five different complexation constants is shown in Fig. 2B. Again, the $S_{\text{EMD},A}$ values go through a minimum as the complexation agent concentration is increased. However, as the complexation constant increased, the minima occur at lower complexation agent concentration and become sharper. This means that EMD is increased and peak shape worsened as complexation constant becomes higher, but the complexation induced distortion persists over a narrower complexation agent concentration range.

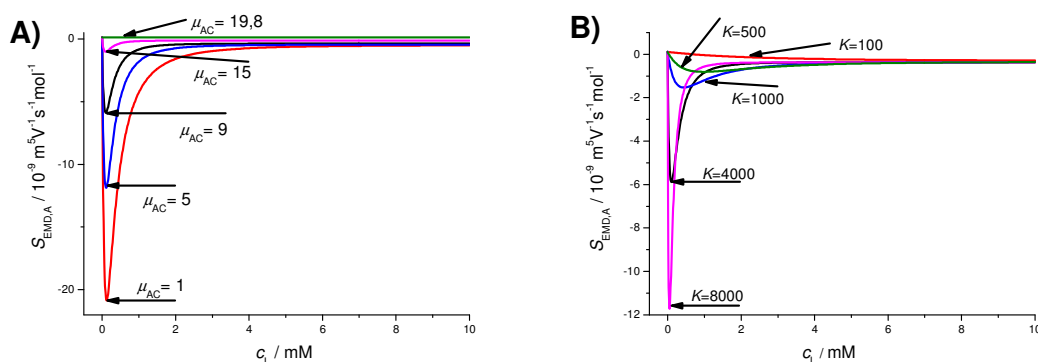


Figure 2: $S_{\text{EMD},A}$ as a function of the cyclodextrin concentration in the BGE for R-flurbiprofen as the analyte and different theoretical complexing agents. (A) Complexation parameters: $\mu_{AC} = 1, 5, 9, 15$, and $19.8 \times 10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$, $K = 4037 \text{ (mol dm}^{-3})^{-1}$. The curves are marked by the mobility of the complex. (B) Complexation parameters: $\mu_{AC} = 8.82 \times 10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$, $K = 100, 500, 1000, 4000$, and $8000 \text{ (mol dm}^{-3})^{-1}$. The curves are marked by the value of complexation constant.

The new version of PeakMaster 5.3 Complex is able to predict the shape of the analyte peak in systems containing fully charged analyte and neutral complexation agent in the range of seconds. Thus, it is a powerful tool for eliminating EMD to obtain symmetrical and sharp peaks, and can be used for optimization of the conditions of enantiomer separations.

3.3 Complexation of buffer constituents with neutral complexation agents: Impact on complexation constant determination

The complexation of analyte with complexation agents is described in detail in the literature. However, possible changes of the BGE properties due to the complexation of buffer constituents with the complexation agent are mentioned rarely [35]-[38].

We showed that the complexation of buffer constituents with the complexation agent present in the BGE can significantly influence the buffer properties as pH, ionic strength or conductivity. Then, we elucidated the practical impact of this interaction on electrophoretic results. We demonstrated that the development of system peaks in interacting buffers systems significantly differs from the behavior known from noncomplexing systems and that the use of interacting buffers can totally ruin the results of electrophoretic separation. Simultaneously, we discussed the impact of the complexation of buffer constituents with complexation agent on complexation constant determination.

If a buffer constituent interacts with the complexation agent, part of the complexation agent concentration is consumed by this type of interaction, and thus its equilibrium concentration definitely differs from the analytical one even at the infinite dilution of analyte. The situation is even more complicated because the dissociated and nondissociated form of the buffering constituent can interact with the complexation agent to different extents. The complexation constant of R-Flurbiprofen determined in different buffers demonstrates the influence of the interaction of buffer constituents with the complexation agent on complexation constant determination. The results are depicted in Fig. 3. Clearly, the complexation constants obtained in ethanolamine, ammonium, maleic, phosphoric and Tricine buffers are the same, in the range of experimental error. This result confirms that the interaction of these buffers with b-CD is either the same or most likely negligible. However, complexation constants determined in 2-(N-morpholin)ethanesulfonic acid (MES), 3-morpholinopropane-1-sulfonic acid (MOPS) and N-cyklohexyl-2-aminoethane sulfonic acid (CHES) are significantly lower. In the next step, we repeated the ACE measurements in five times diluted buffers. It is obvious from Fig. 3 that the complexation constant determined in Tricine buffer did not change with the change of concentration of buffer, while in the case of MES, MOPS and CHES buffers the complexation constant of R-Flurbiprofen increased significantly with buffer dilution. It means that the complexation constants determined

in the interacting buffers depend not only on the type of analyte and complexation agent but also on the type and concentration of the buffer used. Thus complexation constants determined in interacting buffers cannot be considered as thermodynamic ones and are valid only for this particular separation system.

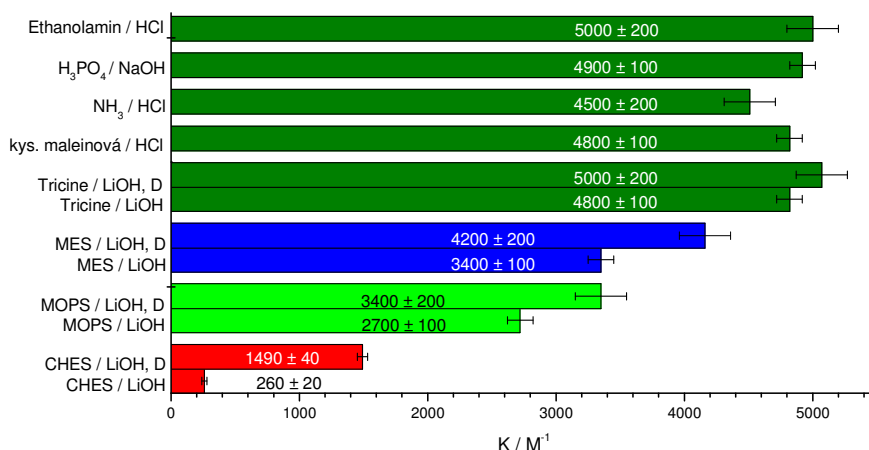


Figure 3: Complexation constants of R-FLU with β -CD determined in various buffers. Exact compositions and experimental conditions of used buffers are summarized in *Table 1* in Paper VI. D: diluted buffer.

An even more complicated situation arises in the case of determining the complexation constant of weak electrolyte analytes, where both complexation constants of a neutral and charged form of the analyte are desired. Complexation constant of the neutral form is observed at pH, where the analyte is only partially dissociated. It is important to note that this method relies on the constant separation conditions, particularly on a constant pH value. However, the pH of the interacting buffer can significantly change with the concentration of complexation agent. It means that the method may completely malfunction in interacting buffers.

To confirm this statement we performed two sets of ACE experiments with R-Flurbiprofen complexing with β -CD in acetic acid/LiOH and in benzoic acid/LiOH buffer (both pH 3.98). At the given pH, R-Flurbiprofen is partially dissociated ($pK_A = 4.16$). While the acetic acid buffer does not interact substantially with β -CD, benzoic acid complexes quite strongly. Obtained dependencies of the effective mobility of R-Flurbiprofen on the concentration of complexation agent are shown in Fig. 3. In acetic acid the mobility dependence showed expected theoretical trends and could be fitted by

corresponding theoretical function, the data obtained in benzoic buffer did not follow the expected hyperbolic trend and could not be fitted with sufficient precision. Comparison of the simulated and experimental data is shown in Fig. 3. Very good agreement of the experimental and simulated curves was obtained that proves that interaction of the buffer with the complexation agent is the only reason for the deviation of the data.

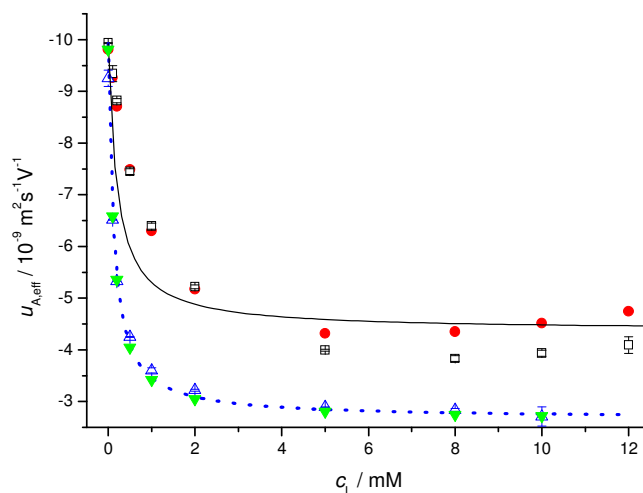


Figure 4: Dependence of effective mobility of R-Flurbiprofen on concentration of β -CD. \bullet and \square are experimental and simulated data, respectively, in a 24 mM benzoic acid/9.9 mM LiOH buffer. \triangle and ∇ are experimental and simulated data, respectively, for a 61 mM acetic acid/9.9 mM LiOH buffer, both pH 3.98 and IS 10 mM. Black solid and blue dotted lines are the fitted curves.

To conclude, the complexation constants determined in interacting buffers may be incorrect and provide confusing information about the strength of the interaction of analytes with complexation agents. Thus, the potential complexation of the buffer constituents with the complexation agent should be examined independently prior to ACE measurements.

Conclusions

This thesis focuses on complete mathematical description of electrophoretic separation in separation systems with complexation involved and utilization of theoretical models for prediction of enantiomer separation results.

The complete mathematical model of electrophoresis with complexation equilibria was introduced. This model was implemented into the dynamic simulator of electrophoresis – Simul 5 Complex, which was verified using three different enantioselective systems. The simulated UV and conductivity electropherograms were in very good agreement with those obtained experimentally as regards positions, shapes and amplitudes of the analyte peaks. Simul 5 Complex was shown as a useful tool for prediction of enantiomer separation and optimization of separation conditions.

In the next step, the complete mathematical model of electromigration dispersion in systems with neutral complex forming agent and a fully charged analyte was derived and implemented into the simulator PeakMaster 5.3 Complex. The newly introduced model was verified by both experiments and simulations, which were performed by dynamic simulator Simul 5 Complex. Characteristics of EMD (S_X , relative velocity slope, and $S_{EMD,A}$, the nonlinear mobility slope of the analyte zone) calculated from experimental and simulated electropherograms were in very good agreement with those predicted by the mathematical model. This model allowed us to explain the influence of complexation on EMD development. The new version of PeakMaster 5.3 was shown to be powerful tool for optimization of the conditions of enantiomer separations in the way to eliminate EMD and obtain symmetrical and sharp peaks.

Finally, the impact of complexation of buffer constituents with the used complexation agent was observed and its impact on determination of complexation constants was elucidated. This type interaction can change the fundamental properties of BGE as pH, conductivity or ionic strength and can have severe practical consequences. Complexation parameters determined in the “interacting” buffers can provide totally confusing information about the strength of complexation and cannot be regarded as thermodynamic ones as the values of stability constants determined in interacting buffers depend not only on the analyte and complexation agent but also on the type and concentration of buffer constituents. All studied systems were simultaneously simulated by Simul 5 Complex. The good agreement of simulated and experimental data proved

that interaction of the buffer constituent with the complexation agent is the only reason for the data deviation. Thus, the potential complexation of the buffer constituents with the complexation agent should be examined independently prior to ACE measurements.

References

- [1] Rundlett K. L., Armstrong D. W., *Electrophoresis* **2001**, 22, 1419-1427
- [2] Tanaka Y., Terabe S., *Journal of Chromatography B* **2002**, 768, 81-92
- [3] Jiang C. X., Armstrong D. W., *Electrophoresis* **2010**, 31, 17-27
- [4] Haahrhoff P. H., Van der Linde H. J., *Analytical Chemistry* **1966**, 38, 573-582
- [5] Uselova-Vcelakova K., Zuskova I., Gas B., *Electrophoresis* **2007**, 28, 2145-2152
- [6] Thormann W., Caslavská J., Breadmore M. C., Mosher R. A., *Electrophoresis* **2009**, 30, S16-S26
- [7] Thormann W., Breadmore M. C., Caslavská J., Mosher R. A., *Electrophoresis* **2010**, 31, 726-754
- [8] Gas B., *Electrophoresis* **2009**, 30, S7-S15
- [9] Thormann W., Zhang C. X., Caslavská J., Gebauer P., Mosher R. A., *Analytical Chemistry* **1998**, 70, 549-562
- [10] Mao Q., Pawliszyn J., Thormann W., *Analytical Chemistry* **2000**, 72, 5493-5502
- [11] Breadmore M. C., Mosher R. A., Thormann W., *Analytical Chemistry* **2006**, 78, 538-546
- [12] Hruska V., Jaros M., Gas B., *Electrophoresis* **2006**, 27, 984-991
- [13] Bercovici M., Lele S. K., Santiago J. G., *Journal of Chromatography A* **2009**, 1216, 1008-1018
- [14] Bercovici M., Lele S. K., Santiago J. G., *Journal of Chromatography A* **2010**, 1217, 588-599
- [15] Poppe H., *Journal of Chromatography* **1990**, 506, 45-60
- [16] Poppe H., *Analytical Chemistry* **1992**, 64, 1908-1919
- [17] Stedry M., Jaros M., Gas B., *Journal of Chromatography A* **2002**, 960, 187-198
- [18] Stedry M., Jaros M., Vcelakova K., Gas B., *Electrophoresis* **2003**, 24, 536-547
- [19] Stedry M., Jaros M., Hruska V., Gas B., *Electrophoresis* **2004**, 25, 3071-3079
- [20] Jaros M., Hruska V., Stedry M., Zuskova I., Gas B., *Electrophoresis* **2004**, 25, 3080-3085
- [21] Hruska V., Riesova M., Gas B., *Electrophoresis* **2012**, 33, 923-930
- [22] Riesova M., Hruska V., Gas V., *Electrophoresis* **2012**, 33, 931-937
- [23] Gas B., Stedry M., Kenndler E., *Electrophoresis* **1997**, 18, 2123-2133
- [24] Gas B., Kenndler E., *Electrophoresis* **2000**, 21, 3888-3897
- [25] Gas B., Kenndler E., *Electrophoresis* **2002**, 23, 3817-3826
- [26] Erny G. L., Bergstrom E. T., Goodall D. M., *Analytical Chemistry* **2001**, 73, 4862-4872
- [27] Erny G. L., Bergstrom E. T., Goodall D. M., *Journal of Chromatography A* **2002**, 959, 229-239
- [28] Xu X., Kok W. T., Poppe H., *Journal of Chromatography A* **1996**, 741, 211-227
- [29] Gebauer P., Bocek P., *Analytical Chemistry* **1997**, 69, 1557-1563
- [30] Gebauer P., Caslavská J., Thormann W., Bocek P., *Journal of Chromatography A* **1997**, 772, 63-71
- [31] Gebauer P., Borecka P., Bocek P., *Analytical Chemistry* **1998**, 70, 3397-3406
- [32] Gebauer P., Desiderio C., Fanali S., Bocek P., *Electrophoresis* **1998**, 19, 701-706
- [33] Horka M., Slais K., *Electrophoresis* **2000**, 21, 2814-2827
- [34] Gas B., Zuska J., Coufal P., van der Goor T., *Electrophoresis* **2002**, 23, 3520-3527
- [35] Rawjee Y. Y., Williams R. L., Vigh G., *Analytical Chemistry* **1994**, 66, 3777-3781
- [36] Chen Y. R., Ju D. D., Her G. R., *Journal of High Resolution Chromatography* **2000**, 23, 409-412
- [37] Fang L., Yin X. B., Wang E., *Analytical Letters* **2007**, 40, 3457-3471
- [38] Evans C. E., Stalcup A. M., *Chirality* **2003**, 15, 709-723

Přílohy

A. Seznam publikací

1. Methods for determination of all binding parameters in systems with simultaneous borate and cyclodextrin complexation

J. Svobodová, P. Dubský, E. Tesařová, **M. Beneš**, B. Gaš

Journal of Chromatography A 2011, 1218, 7211-7218

2. Determination of stability constants of complexes of neutral analytes with charged cyclodextrins by capillary zone electrophoresis

M. Beneš, I. Zusková, J. Svobodová, B. Gaš

Electrophoresis 2012, 33, 1032-1039

Publikace I:

3. Simulation of the effects of complex-formation equilibria in electrophoresis: I. Mathematical model

V. Hruška, **M. Beneš**, J. Svobodová, I. Zusková, B. Gaš

Electrophoresis 2012, 33, 938-947

Publikace II:

4. Simulation of the effects of complex-formation equilibria in electrophoresis: II. Experimental verification

J. Svobodová, **M. Beneš**, V. Hruška, K. Ušelová, B. Gaš

Electrophoresis 2012, 33, 948-957

5. Simulation of the effects of complex formation equilibria in electrophoresis: III. Simultaneous effects of chiral selector concentration and background electrolyte pH

J. Svobodová, **M. Beneš**, P. Dubský, G. Vigh, B. Gaš

Electrophoresis, 2012, 33, 3012-3020

Publikace III:

6. A nonlinear electrophoretic model for PeakMaster: Part III. Electromigration dispersion in systems that contain a neutral complex-forming agent and a fully charged analyte. Theory

V. Hruška, J. Svobodová, **M. Beneš**, B. Gaš

Journal of Chromatography A, 2012, 1267, 102-108

Publikace IV:

7. A nonlinear electrophoretic model for PeakMaster: Part IV. Electromigration dispersion in systems that contain a neutral complex-forming agent and a fully charged analyte. Experimental verification

M. Beneš, J. Svobodová, V. Hruška, M. Dvořák, I. Zusková, B. Gaš

Journal of Chromatography A, 2012, 1267, 109-115

8. Applicability and limitations of affinity capillary electrophoresis and vacancy affinity capillary electrophoresis methods for determination of complexation constants

M. Dvořák, J. Svobodová, **M. Beneš**, B. Gaš

Electrophoresis, 2013, 34, 761-767

Publikace V:

9. Complexation of Buffer Constituents with Neutral Complexation Agents: Part I. Impact on Common Buffer Properties

M. Riesová, J. Svobodová, Z. Tošner, **M. Beneš**, E. Tesařová, B. Gaš

Analytical Chemistry, 2013, 85, 8518-8525

Publikace VI:

10. Complexation of Buffer Constituents with Neutral Complexation Agents: Part II. Practical Impact in Capillary Zone Electrophoresis

M. Beneš, M. Riesová, J. Svobodová, E. Tesařová, P. Dubský, B. Gaš

Analytical Chemistry, 2013, 85, 8526-8534

B. Seznam konferenčních příspěvků

Přednášky

1. Simul 5 – Let's Simulate Chiral Separations

M. Beneš, J. Svobodová, V. Hruška, I. Zusková, B. Gaš

11th International Symposium and Summer School on Bioanalysis, září 2011, Graz, Rakousko

2. Electrophoretical Systems with Complexation Agents: Prediction of Electromigration Dispersion

M. Beneš, V. Hruška, J. Svobodová, I. Zusková, B. Gaš

12th Symposium and Summer School on Bioanalysis, červenec 2012, Cluj Napoca, Rumunsko

3. Prediction of Electromigration Dispersion in Electrophoretical Systems with Neutral Complexation Agents

M. Beneš, V. Hruška, J. Svobodová, I. Zusková, B. Gaš

CECE 2012, 9th International Interdisciplinary Meeting on Bioanalysis, listopad 2012, Brno, Česká republika.

4. Complexation with Buffer Constituents: Impact on Determination of Stability Constants

M. Beneš, M. Riesová, J. Svobodová, I. Zusková, B. Gaš

13th Symposium and Summer School on Bioanalysis, červenec 2012, Debrecen, Maďarsko

Postery

1. Determination of Stability Constants of Charged Cyclodextrin Complexes by Capillary Electrophoresis

M. Beneš, J. Svobodová, I. Zusková, B. Gaš

10th Symposium and Summer School on Bioanalysis, červenec 2010, Záhřeb, Chorvatsko

2. Simul 5 – Complexation Equilibria in Simulations of Electrophoresis

M. Beneš, J. Svobodová, V. Hruška, I. Zusková, B. Gaš

Nordic Separation Science Society 6th Conference, srpen 2011, Riga, Lotyšsko

3. Factors Influencing Determination of Stability Constants of Charged Cyclodextrin Complexes by Capillary Electrophoresis

M. Beneš, J. Svobodová, I. Zusková, B. Gaš

ITP 2011, 18th International Symposium on Electro- and Liquid Phase-separation Techniques, srpen 2011, Tbilisi, Gruzie

4. Methods for Determination of All Binding Parameters in Systems with Simultaneous Borate and Cyclodextrin Complexation

M. Beneš, J. Svobodová, P. Dubský, E. Tesařová, B. Gaš

11th International Symposium and Summer School of Bioanalysis, září 2011, Graz, Rakousko

5. Stability Constants of Charged Cyclodextrins with Neutral Analytes – Determination by CE

M. Beneš, J. Svobodová, I. Zusková, B. Gaš

CECE, 8th International Interdisciplinary Meeting on Bioanalysis, listopad 2011, Brno, Česká republika:

6. Prediction of Electromigration Dispersion in Electrophoretical Systems with Complexation Agents

M. Beneš, V. Hruška, J. Svobodová, I. Zusková, B. Gaš

24th International Symposium on Chirality, červen 2012, Fort Worth, TX, USA

7. Complexation of the Buffer Constituents with Complexation Agents Impact on Determination of Stability Constants

M. Beneš, M. Riesová, J. Svobodová, I. Zusková, E. Tesařová, B. Gaš

ITP 2013 - 20th International Symposium on Electro- and Liquid Phase- Separation Techniques, říjen 2013, Tenerife, Kanárské ostrovy (Španělsko)

C. Životopis

Martin Beneš

Narozen: 13. 6. 1986

Katedra fyzikální a makromolekulární chemie
Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze
Hlavova 8, Praha 2, 128 43
Česká republika
email: martinxb1@seznam.cz

Vzdělání

- 2010 – doktorské studium: Fyzikální chemie
Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze, Česká republika
téma Ph.D. studia: Studium komplexačních rovnováh kapilární zónovou elektroforézou
- 2008 – 2010 magisterské studium: Učitelství chemie a matematiky pro střední školu
Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze, Česká republika
Diplomová práce: Stanovení konstant stability komplexů s nabitými cyklodextriny kapilární zónovou elektroforézou
- 2005 – 2008 bakalářské studium: Chemie a matematika se zaměřením na vzdělávání
Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze, Česká republika
Bakalářská práce: Závislost pohyblivosti nabitých cyklodextrinů na iontové síle

Účast na projektech:

Stanovení konstant stability kapilární elektroforézou a jejich využití pro optimalizaci separací

Hlavní řešitel: Martin Beneš, projekt Grantové agentury Univerzity Karlovy v Praze, číslo projektu: GA UK 323611

Účast na dalších dvou projektech Grantové agentury Univerzity Karlovy v Praze, čísla projektů: GA UK 669412, GA UK 101309

Pedagogická činnost na vysoké škole:

Cvičení z Fyzikální chemie Ib/IIb

Poznámky:

