

Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta

Katedra fyzikální a makromolekulární chemie

Doktorský studijní program: Fyzikální chemie

Autoreferát disertační práce



Vliv interagující složky základního elektrolytu
na elektroforetickou separaci

Ludmila Müllerová

Školitel: Mgr. Pavel Dubský, Ph.D.

Praha, 2015

Abstrakt

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

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

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

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

Předkládaná dizertační práce shrnuje výsledky získané během mého doktorského studia ve Skupině elektroforetických a chromatografických separačních metod (ECHMET) na Katedře fyzikální a makromolekulární chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze. Práce byla financována v souvislosti s řešením projektů GA UK, čísla grantů 669412 a 510214, projektu GA ČR, číslo grantu 203-08-1428, a projektu CEEPUS CIII-RO-0010-08-1314.

Seznam zkratk a symbolů

ACE	afinitní kapilární elektroforéza (<i>affinity capillary electrophoresis</i>)
BGE	základní elektrolyt (<i>background electrolyte</i>)
CE	kapilární elektroforéza (<i>capillary electrophoresis</i>)
EMD	elektromigrační disperze
EOF	elektroosmotický tok (<i>electroosmotic flow</i>)
HVL	Haarhoffovou – van der Lindeho (funkce)
M_{AM_S}	(systém, model) s více volnými formami analytu a více selektory (<i>multi-free-analyte-form multi-selector</i>)
M_{AS_S}	(systém, model) s více volnými formami analytu a jedním selektorem (<i>multi-free-analyte-form single-selector</i>)
S_{AM_S}	(systém, model) s jednou volnou formou analytu a více selektory (<i>single-free-analyte-form multi-selector</i>)
S_{AS_S}	(systém, model) s jednou volnou formou analytu a jedním selektorem (<i>single-free-analyte-form single-selector</i>)
c_S	koncentrace selektoru
K'_{AS}	koncentračně definovaná komplexační konstanta interakce analytu se selektorem
μ_A	mobilita volného analytu
$\mu_{A,eff}$	efektivní mobilita analytu
μ_{AS}	mobilita komplexu analytu se selektorem

Obsah

1. Úvod	5
Popis elektromigrace v komplexujících systémech	5
Stanovení správné efektivní mobility	7
2. Cíle práce	10
3. Materiál a metodika	11
4. Výsledky a diskuse	11
Použití M-souhrnného modelu pro definované směsi dvou selektorů	11
Generalizovaný model elektromigrace v interagujících systémech ($M_A M_S$ model)	13
Efektivní mobilita EOF markerů v BGE obsahujícím sulfatovaný β -cyklodextrin stanovená dvoudetektorovou metodou	16
Určení parametrů HVL funkce z geometrických charakteristik píku	17
5. Závěry	18
6. Použitá literatura	20
7. Přílohy	22
A Seznam publikací	22
B Účast na konferencích	23
C Životopis	24

1. Úvod

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

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

Popis elektromigrace v komplexujících systémech

Pokud se analyt vyskytuje ve více formách, mezi kterými se ustavuje rychlá rovnováha (rychlá ve srovnání s elektroforetickou migrací), lze efektivní mobilitu tohoto analytu obecně vyjádřit jako vážený průměr mobilit jeho jednotlivých forem, přičemž vahou je molární zlomek příslušné formy analytu vzhledem k jeho celkové (analytické) koncentraci. Pro systém, kde jedinou takovou rovnováhou je interakce analytu se selektorem, popsali Wren a Rowe [8] závislost efektivní mobility analytu, $\mu_{A,eff}$, na koncentraci selektoru, c_S :

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

kde K'_{AS} je komplexační konstanta (definovaná pomocí koncentrací) charakterizující interakci analytu se selektorem, μ_A je mobilita volného analytu a μ_{AS} mobilita vzniklého komplexu analyt-selektor. Model je platný za podmínky konstantní teploty, konstantní iontové síly BGE a pokud v systému dochází pouze ke komplexaci o stechiometrii 1:1 (analyt : selektor). Tato

stechiometrie samozřejmě není jediná možná, nicméně je všeobecně pokládána za nejrelevantnější, zejména pokud jde o interakci s cyklodextriny [9, 10].

Na základě modelu Wrena a Rowa (1) byla odvozena řada dalších modelů popisujících $S_A S_S$ (*single-free-analyte-form single-selector*) systémy [11-16]. Jejich cílem většinou bylo pomocí efektivních mobilit separovaných analytů vyjádřit parametry kvantifikující úspěšnost separace. Přestože velká část $S_A S_S$ modelů se zaměřovala na chirální separace, vztah (1) lze samozřejmě použít i pro optimalizaci „nechirálních“ separací, při kterých se využívá komplexace se selektorem [16, 17].

Nevýhodou výše zmiňovaných $S_A S_S$ modelů bylo, že braly do úvahy pouze jednu formu volného analytu. Látkami separovanými kapilární elektroforézou jsou ale často slabé kyseliny, báze nebo amfolyty podléhající acidobazické disociaci. Jednotlivé volné formy analytu (například disociovaná a protonovaná u slabé kyseliny) pak mohou interagovat se selektorem s různými komplexačními konstantami za vzniku komplexů o různých mobilitách. Z toho důvodu může mít pH základního elektrolytu, kterým je řízen stupeň disociace analytu, velký vliv na výsledek separace.

Popisem těchto $M_A S_S$ (*multi-free-analyte-form single-selector*) systémů se dlouhodobě zabývala například skupina profesora Vigha [18-21], kde byla popsána závislost efektivní mobility slabé jednosytné kyseliny [18] a báze [19] na koncentraci selektoru a na pH BGE (v modelu tedy vystupovaly dvě nezávisle proměnné). Lelièvre *et al.* [22] později ukázali, že při konstantním pH lze závislost efektivní mobility slabé jednosytné kyseliny na koncentraci selektoru popsat funkcí formálně shodnou s rovnicí (1), přičemž příslušné parametry (mobilita volného analytu, komplexační konstanta a mobilita komplexu) byly závislé na hodnotě pH (nadále budou označovány jako pH-souhrnné parametry).

V analytické praxi se rovněž často používají směsi selektorů. Je to jednak proto, že komerčně vyráběné derivatizované cyklodextriny jsou ve skutečnosti mnohdy směsí selektorů lišících se jak stupněm substituce, tak polohou substituentů [23-25]. Někdy jsou ale směsi selektorů připravovány záměrně za účelem dosažení lepší separace [2-4, 26, 27]. První matematický model elektromigrace analytu v BGE se dvěma selektory byl publikován v roce 1994 [28] a byl přirozeným rozšířením modelu Wrena a Rowa (1) o interakci s dalším selektorem. Tento i další publikované teoretické popisy $S_A M_S$ (*single-free-analyte-form multi-selector*) systémů v CE byly shrnuty v přehledovém článku, který je součástí předkládané dizertační práce

(*Publikace I*). Tyto modely většinou pracovaly se dvěma proměnnými – koncentracemi dvou selektorů v BGE. Nicméně autoři často využívali matematický popis $S_A M_S$ systémů pouze ke kvalitativnímu vysvětlení pozorovaných experimentálních výsledků, jako například záměny migračního pořadí analytů [28-32].

Peng *et al.* [33] odvodili vztah popisující efektivní mobilitu analytu v $S_A M_S$ systému s libovolným počtem selektorů, z nichž každý může tvořit s analytem komplex o stechiometrii 1:1. Problémem tohoto modelu byla jeho N -dimenzionalita, která značně komplikovala jeho použití v praxi. Karanack *et al.* [34] později ukázali, že pokud jsou molární zlomky všech selektorů ve směsi konstantní, lze na směs selektorů pohlížet jako na selektor jediný (závislost efektivní mobility analytu na celkové koncentraci selektorů přechází na tvar formálně totožný se vztahem (1)). Interakci analytu se směsí selektorů pak lze charakterizovat M -souhrnnou komplexační konstantou a M -souhrnnou mobilitou komplexu. Tento model (dále bude označován jako M -souhrnný model) nicméně v literatuře zcela zapadl, dokud nebyl nezávisle odvozen a publikován naší skupinou [35, 36].

M -souhrnný model umožnil lépe pochopit mechanismus separace se směsmi selektorů, jako jsou komerčně dodávané derivatizované cyklodextriny, u kterých uživatel nezná přesné složení směsi (vyplyvá z něj například možné vysvětlení velké separační schopnosti nedefinovaně sulfatovaných cyklodextrinů [36]). Využití tohoto přístupu také pro popis záměrně připravovaných (definovaných) směsí dvou selektorů je ukázáno v *Publikaci II*. Dále byl tento model v *Publikacích III* a *IV* rozšířen, aby zahrnoval i možnou acidobazickou disociaci analytu.

Stanovení správné efektivní mobility

Modely elektromigrace analytu v komplexujících systémech pracují s parametry komplexace – komplexačními konstantami a mobilitami komplexu. Ty je nutné stanovit experimentálně, zpravidla proložením závislosti efektivních mobilit daného analytu na koncentraci selektoru vhodnou funkcí (afinitní kapilární elektroforéza, *affinity capillary electrophoresis*, ACE [37, 38]). Určení správné efektivní mobility analytu je proto klíčové pro stanovení komplexačních parametrů a jejich následnou využitelnost v různých optimalizačních strategiích.

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

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

Elektroosmotický tok (EOF, *electroosmotic flow*) v elektroforéze je způsoben nábojem na vnitřní stěně kapiláry a projevuje se pohybem celého obsahu kapiláry směrem k jedné z elektrod [39]. Pro určení efektivní mobility analytu je třeba správně stanovit mobilitu EOF a tu odečíst od celkové, zjevné mobility analytu. V literatuře je popsána řada způsobů stanovení mobility EOF, které jsou shrnuty například v přehledovém článku Wanga *et al.* [40].

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

V roce 1997 vyvinuli Williams a Vigh [41] metodu pro stanovení efektivní mobility v BGE obsahujících interagující složku. Podmínkou metody nicméně bylo umístění UV detektoru přibližně uprostřed délky kapiláry, což v komerčních přístrojích není možné. V *Publikaci V* je představena metoda stanovení efektivní mobility v BGE s nabitou interagující složkou, kterou lze použít v komerčně dostupném přístroji pro CE bez potřeby dodatečných úprav.

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

- (i) změna vodivosti (a tedy i intenzity pole) ve srovnání s BGE v důsledku přítomnosti analytu [42];
- (ii) nedostatečná pufrační kapacita BGE (a tedy změna zastoupení jednotlivých disociačních stavů analytu se změnou jeho koncentrace v zóně) [42];

(iii) významný úbytek volného selektoru v zóně analytu v důsledku komplexace (a tedy nárůst frakce volného analytu s rostoucí celkovou koncentrací analytu) [43, 44].

U takto deformovaného píku jeho maximum neodpovídá migračnímu času vyplývajícímu z efektivní mobility analytu, protože poloha maxima pak závisí na dávkovaném množství analytu. Bylo teoreticky odvozeno, že tvar píku deformovaného EMD dobře vystihuje Haarhoff – van der Lindeho (HVL) funkce [45-47]. Jeden z parametrů HVL funkce odpovídá migračnímu času analytu při jeho nekonečném zředění a je tedy vhodné jej použít ke stanovení efektivní mobility analytu, která může následně sloužit například k určení komplexačních parametrů.

Nicméně dosud byl jediným způsobem, jak pro daný pík stanovit parametry odpovídající HVL funkce, export experimentálních dat a jejich vyhodnocení pomocí vhodného softwaru pro nelineární regresi. V *Publikaci VI* byly poprvé odvozeny vztahy mezi geometrickými charakteristikami EMD deformovaného píku a parametry příslušné HVL funkce, které umožňují výpočet těchto parametrů bez použití nelineární regrese.

2. Cíle práce

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

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

Další cíle pak souvisely se stanovením správné efektivní mobility analytu:

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

3. Materiál a metodika

Elektroforetické experimenty byly prováděny na přístroji Agilent ^{3D}CE pro kapilární elektroforézu (Agilent Technologies, Waldbronn, Německo). Přístroj je vybaven vestavěným UV/Vis detektorem s diodovým polem a bezkontaktním vodivostním detektorem vyvinutým v naší laboratoři [48]. K ovládání přístroje a sběru dat sloužil software ChemStation (Agilent Technologies). K měření pH sloužil PHM 240 pH/ION metr (Radiometer analytical, Kodaň, Dánsko).

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

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

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

4. Výsledky a diskuse

Použití M-souhrnného modelu pro definované směsi dvou selektorů

Podle M-souhrnného modelu lze směs selektorů o konstantním složení (konstantním poměru molárních koncentrací jednotlivých selektorů ve směsi) pokládat za selektor jeden [35, 36]. Model také ukazuje, jak jsou komplexační parametry tohoto „souhrnného“ selektoru provázány s komplexačními parametry jednotlivých složek směsi. V případě, že jsou do BGE záměrně přidávány dva různé selektory za účelem dosažení lepší separace, pak je složení směsi známo a komplexační parametry směsi mohou být M-souhrnným modelem předpovězeny na základě komplexačních parametrů analytů s oběma čistými selektory. Pomocí tohoto modelu pak lze zkoumat, jak se mění separační potenciál směsi se změnou jejího složení, případně zvolit pro danou separaci optimální poměr obou selektorů a jejich celkovou koncentraci.

V *Publikaci II* byl tento přístup experimentálně ověřen. Jako modelové analyty byly zvoleny ibuprofen a flurbiprofen. Přestože se jedná o chirální látky, nebyla v tomto případě prováděna chirální separace (při zvoleném pH není interakce s cyklodextrinem enantioselektivní), ale ibuprofen byl brán jako první analyt a flurbiprofen jako analyt druhý. Oba analyty byly při zvoleném pH (8,2) plně disociovány. V práci byla zkoumána jejich

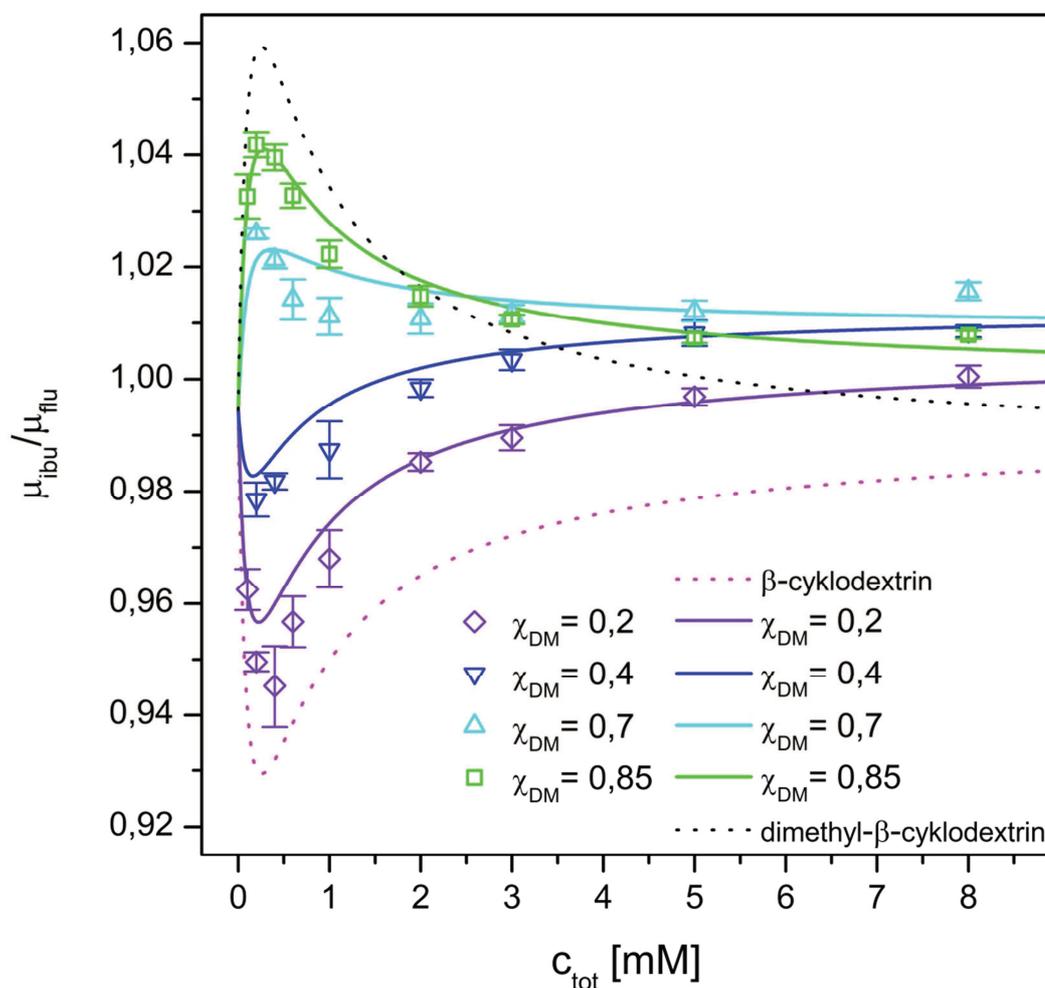
elektromigrace v systémech se dvěma různými dvojicemi neutrálních selektorů (dimethyl- β -cyclodextrin a maltosyl- β -cyclodextrin, dimethyl- β -cyclodextrin a nativní β -cyclodextrin).

Má-li být M-souhrnný model použit k optimalizaci separačního systému se dvěma selektory, je třeba optimalizovat dvě nezávisle proměnné: celkovou koncentraci selektorů a molární frakci prvního selektoru ve směsi (frakce druhého selektoru jednoznačně určena frakcí prvního selektoru). Ve srovnání se situací, kdy nezávisle proměnnými jsou koncentrace prvního a druhého selektoru, přináší tento přístup významné výhody. Především koncentrace selektorů mohou obě v principu růst do nekonečna a je náročné představit si chování systému při všech jejich možných kombinacích. Na druhou stranu M-souhrnný model ukazuje, že chování směsi selektorů je závislé na poměru jejich koncentrací, respektive na frakci prvního selektoru, která může nabývat pouze hodnot od nuly do jedné. V rámci takto dobře definovaného rozsahu složení směsi lze dobře studovat vlastnosti systému. To je v *Publikaci II* demonstrováno pro:

- (i) tvar závislosti vhodného parametru kvantifikujícího kvalitu separace (v tomto případě byla zvolena selektivita – poměr efektivních mobilit separovaných analytů) na celkové koncentraci selektorů;
- (ii) hodnoty souhrnných komplexačních parametrů;
- (iii) elektromigrační pořadí analytů a jeho případnou záměnu.

Shoda mezi predikcí M-souhrnného modelu a experimentem je pro bod (i) ukázána na Obrázku 1. Přestože některé experimentální body se s predikcí neshodují zcela přesně, tvar závislosti a důležité charakteristiky daného separačního systému (přítomnost a přibližná poloha maxima, záměna migračního pořadí) jsou předpovězeny správně. Obrázek také ilustruje, jak se průběh závislosti selektivity na celkové koncentraci mění s měnícím se složením směsi – a že změny tvaru těchto závislostí mohou být značně „neintuitivní“.

M-souhrnný model umožňuje snadno identifikovat, zda smísení dvou konkrétních selektorů může vést ke zlepšení separace a pokud ano, lze jej využít k nalezení optimálního složení a celkové koncentrace směsi selektorů a to například i z hlediska migračního pořadí analytů. Výhodou tohoto modelu také je, že se nejedná o rozšíření jednoduššího modelu o přítomnost druhého selektoru, ale spíše o speciální případ obecného modelu popisujícího komplexaci s libovolným počtem selektorů.



Obrázek 1: Závislost poměru efektivních mobilit ibuprofenu a flurbiprofenu na (celkové) koncentraci selektoru ve dvou systémech s jedním selektorem (dimethyl- β -cyclodextrin a nativní β -cyclodextrin, přerušované čáry) a ve směsi těchto dvou selektorů předpovězená pomocí M-souhrnného modelu (plné čáry) a změřená experimentálně (body); χ_{DM} – frakce dimethyl- β -cyclodextrinu ve směsi selektorů; převzato z *Publikace II*.

Generalizovaný model elektromigrace v interagujících systémech ($M_A M_S$ model)

V minulosti se mnoho autorů zabývalo popisem systémů, ve kterých analyt interaguje s více než jedním selektorem (jak je shrnuto v *Publikaci I*). Nicméně žádný z těchto modelů (včetně M-souhrnného modelu probíraného v předešlé kapitole) nezahrnoval další možné rovnováhy, kterých se analyt může účastnit vedle komplexace – především rovnováhy acidobazické. Ty byly brány v úvahu pouze v modelech zahrnujících komplexaci toliko s jedním selektorem.

V *Publikaci III* je představen generalizovaný model elektromigrace v interagujících systémech se stechiometrií interakce 1:1 (analyt : selektor). Tento model vychází z M-souhrnného modelu a popisuje efektivní mobilitu analytu, který je přítomný v libovolném

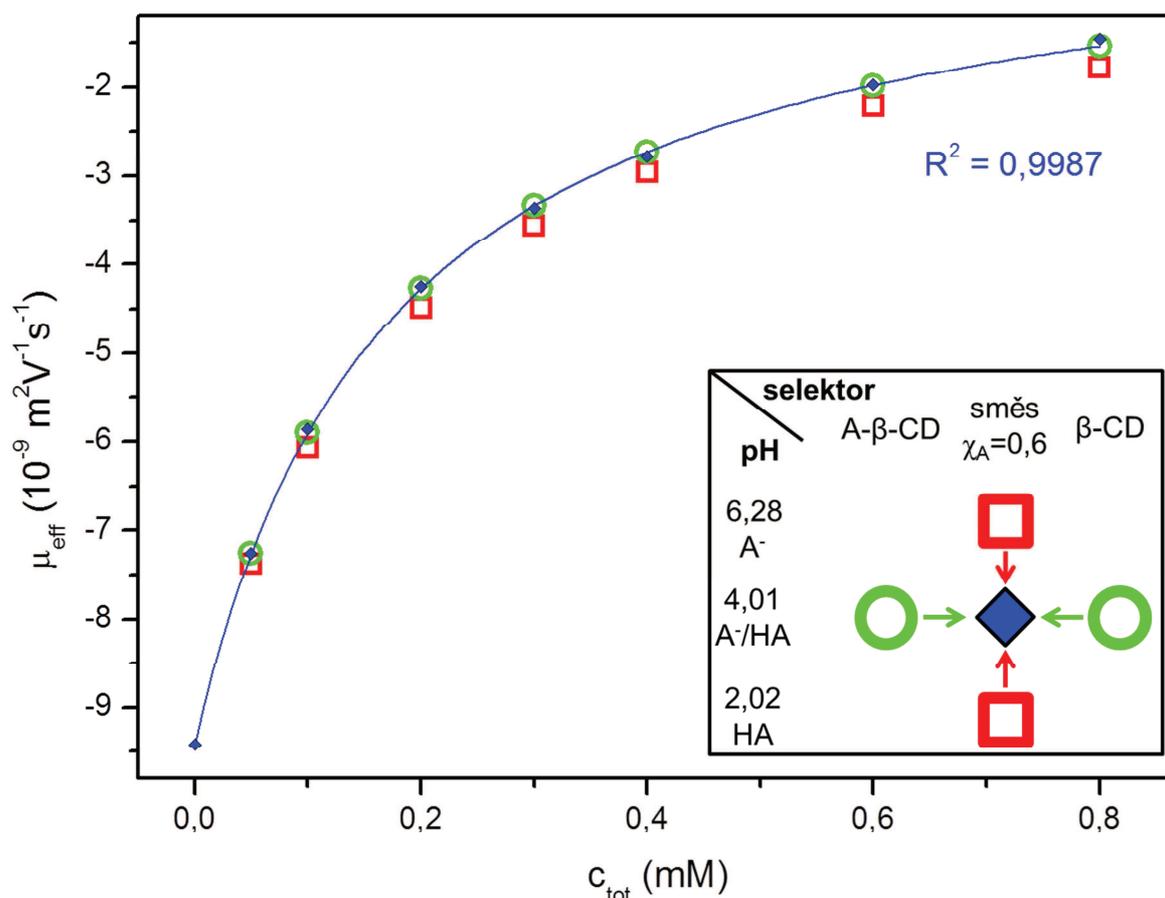
počtu volných (nekomplexovaných) forem, mezi kterými se ustavuje rychlá rovnováha. Tyto rovnováhy nejsou pro potřeby modelu specifikovány, ale z praktického hlediska jsou významné především rovnováhy acidobazické a jednotlivými volnými formami analytu se pak míní jednotlivé disociační stavy slabé kyseliny, báze nebo amfolytu. Každá z těchto volných forem analytu interaguje s každým z libovolného počtu přítomných selektorů. Všechny vznikající komplexy mají stechiometrii 1:1.

V takovém $M_A M_S$ (*multi-free-analyte-form multi-selector*) systému se ustavuje řada navzájem propojených rovnováh, které mají vliv na výslednou efektivní mobilitu analytu. Výhodou $M_A M_S$ modelu představeného v rámci předkládané dizertační práce je, že umožňuje nahlížet na $M_A M_S$ systémy z různých perspektiv.

Pokud je složení směsi selektorů konstantní (nemění se vzájemné poměry koncentrací jednotlivých selektorů) a jsou konstantní i podmínky, na kterých závisí distribuce volného analytu mezi jeho jednotlivé formy (v případě, že mezi jednotlivými volnými formami analytu se ustavují rovnováhy acidobazické, je takovou podmínkou konstantní pH základního elektrolytu), pak lze na $M_A M_S$ systém nahlížet jako na $S_A S_S$ systém: závislost efektivní mobility analytu na celkové koncentraci selektoru má známý hyperbolický tvar odvozený pro případ jediné volné formy analytu interagující s jediným selektorem (1). To ukazuje univerzální použitelnost tohoto vztahu pro elektroforetické systémy se stechiometrií komplexace 1:1. Tento závěr $M_A M_S$ modelu byl experimentálně demonstrován v *Publikaci IV: Závislost efektivní mobility analytu na celkové koncentraci selektoru (při konstantním pH a případně složení směsi) byla prokládána funkcí (1). Kvalita proložení (vyjádřená parametrem R^2) se nelišila bez ohledu na to, zda se jednalo o $S_A S_S$, $M_A S_S$, $S_A M_S$ nebo $M_A M_S$ systém (pro $M_A M_S$ systém viz Obrázek 2).*

$M_A M_S$ model dále ukazuje, že systém s více selektory a více volnými formami analytu lze popsat (a optimalizovat) pomocí modelů odvozených pro případ:

- (i) kdy více volných forem analytu interaguje se selektorem jediným, například modely Vigha *et al.* [18-21] (pH-explicitní přístup);
- (ii) kdy jediná volná forma analytu interaguje s více selektory, například duální model Lurie *et al.* [28] nebo M-souhrnný model publikovaný naší skupinou [35, 49] (M-explicitní přístup).



Obrázek 2: Závislost efektivní mobility R-flurbiprogenu na celkové koncentraci směsi monoamino-β-cyclodextrinu (A-β-CD) a nativního β-cyklodextrinu (β-CD) při pH 4,01; frakce prvního selektoru ve směsi $\chi_A = 0,6$; kosočtverce – experimentální efektivní mobility, čára – proložení experimentálních dat funkcí (1), čtverce – efektivní mobility vypočtené pomocí pH-explicitního přístupu, kroužky - efektivní mobility vypočtené pomocí M-explicitního přístupu; převzato z *Publikace IV*.

Experimentálně byly tyto dva přístupy ověřeny v *Publikaci IV* na modelovém systému R-flurbiprofenu jako analytu (slabá jednosytná kyselina), a dvou selektorů – jednomocně kladně nabitého monoamino-β-cyclodextrinu a nativního β-cyklodextrinu. Efektivní mobility analytu předpovězené jak pomocí pH-explicitního tak M-explicitního přístupu byly ve shodě s mobilitami experimentálními, jak je ukázáno na Obrázku 2.

M-explicitní a pH-explicitní přístup lze chápat jako svým způsobem „ortogonální“ (jak naznačuje schéma vložené do Obrázku 2). Ve skutečnosti byly tyto přístupy někdy mimoděk používány už v minulosti (například stanovování pH-souhrnných komplexačních parametrů se selektory, které byly ve skutečnosti směsmi selektorů [50]). Model elektromigrace v interagujících systémech se stechiometrií interakce 1:1 představený v *Publikacích III a IV* ale poprvé poskytuje teoretický základ pro zacházení s $M_A M_S$ systémy. Model ukazuje, že provázané komplexační a acidobazické rovnováhy, jichž se analyt účastní, od sebe lze

separovat a pracovat s nimi odděleně. Experimentátor může zvolit takový způsob optimalizace, který je nejvýhodnější pro konkrétní separaci, a tento model mu poskytuje informace o tom, za jakých podmínek lze kterou optimalizační strategii využít.

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

Pro stanovení komplexačních parametrů (které jsou vstupními parametry elektromigračních modelů probíraných výše) pomocí metody ACE je třeba změřit efektivní mobility analytu v BGE o několika různých koncentracích selektoru. V případě, že selektor je nabitý, může být stanovení efektivní mobility analytu komplikováno interakcí EOF markeru se selektorem.

V *Publikaci V* byla navržena dvoudetektorová metoda založená na stejném principu, jako metoda vyvinutá ve skupině profesora Vigha [41], ale proveditelná v komerční instrumentaci. I námi navržená metoda je založena na stanovení vzdálenosti mezi zónou markeru umístěnou v neinteragujícím BGE a zónou vzorku nacházející se v BGE obsahujícím interagující složku (například nabitý selektor) před a po krátké aplikaci napětí. Metoda využívá dva detektory: UV absorpční detektor s diodovým polem umístěný u výstupního konce kapiláry (v případě instrumentace Agilent Technologies používané v této práci je tato vzdálenost konstrukčně pevně daná a měří 8,5 cm) a bezkontaktní vodivostní detektor původně vyvinutý v naší skupině [48], který je ovšem nyní běžně komerčně dostupný u výrobce přístroje (Agilent Technologies).

Dvoudetektorová metoda byla v *Publikaci V* využita ke stanovení efektivní mobility čtyř často používaných EOF markerů – dimethyl sulfoxidu, mesityl oxidu, nitromethanu a thiomocoviny – v BGE obsahujícím nedefinovaně sulfatovaný β -cyklodextrin v koncentraci 60 g/l (odpovídá přibližně 30 mM). Nejnižší (v absolutní hodnotě), ale dvoudetektorovou metodou stále měřitelné, efektivní mobility byly zjištěny pro dimethyl sulfoxid a nitromethan ($-1,5 \cdot 10^{-9} \text{m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$ pro obě látky). Lze tedy konstatovat, že tyto látky jsou ze zvoleného setu nejméně nevhodné jako EOF markery, nicméně i ty s tímto selektorem slabě interagují.

Určení parametrů HVL funkce z geometrických charakteristik píku

V případě, že je elektroforetický pík deformován elektromigrační disperzí, je vhodným popisem jeho tvaru HVL funkce. V kontextu předkládané dizertační práce je podstatný především ten její parametr, který má význam migračního času odpovídajícího efektivní mobilitě analytu při jeho nekonečném zředění. Hodnotu tohoto parametru je tedy třeba určit pro daný EMD deformovaný pík analytu, aby bylo možné správně vyhodnotit efektivní mobilitu analytu – která pak slouží například ke stanovení komplexačních parametrů metodou ACE.

Tvar EMD deformovaného píku lze také popsat pomocí určitých geometrických charakteristik, které může například automaticky odečítat software pro sběr elektroforetických dat. Těmito charakteristikami jsou čas odpovídající maximu píku, šířka píku v určité frakci jeho maximální výšky a asymetrie píku (ta může být kvantifikována například jako poměr pravé a levé pološířky píku v určité frakci maximální výšky, ChemStation software dodávaný spolu s přístroji Agilent Technologies používá faktor chvostování píku podle Amerického lékopisu, *U. S. Pharmacopeia tailing factor*, definovaný jako poměr šířky píku v 5 % výšky ku dvojnásobku levé pološířky píku v 5 % výšky). Nicméně vztah mezi těmito „viditelnými“ geometrickými charakteristikami píku na jedné straně a na straně druhé parametry odpovídající HVL funkce (které mají fyzikální význam) není přímočarý. Proto bylo dosud nutné určovat parametry HVL funkce nelineární regresí, což vyžadovalo export experimentálního elektroferogramu do vhodného softwaru (například Origin).

V *Publikaci VI* jsou odvozeny vztahy mezi geometrickými charakteristikami píku a parametry HVL funkce. V těchto vztazích vystupuje sada tří převodních koeficientů, jejichž hodnota závisí pouze na asymetrii píku. Bohužel, tyto závislosti nelze vyjádřit analytickým výrazem, nicméně pro konkrétní způsob vyjádření šířky a asymetrie píku je lze určit numericky. To bylo v *Publikaci VI* provedeno pro ty geometrické charakteristiky píku, které automaticky odečítá software ChemStation.

Tyto závislosti byly zaneseny do souboru MS Excel (lze stáhnout ze stránek naší výzkumné skupiny [51]), který na jejich základě přepočítá geometrické charakteristiky poskytnuté softwarem ChemStation na parametry příslušné HVL funkce. Správnost takto určených parametrů byla ověřena jejich porovnáním s výsledky fitování píků pomocí programu Origin 8.1. Pro reálný elektroferogram byla chyba navrženého výpočtu srovnatelná s frekvencí, s jakou jsou experimentální data přístrojem zaznamenávána.

5. Závěry

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

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

Analyty, kterými jsou často slabé kyseliny, báze nebo amfolyty, se mohou v systému vyskytovat ve více volných formách, mezi kterými se ustavují acidobazické rovnováhy. Každá z těchto forem pak může vytvářet komplexy s přítomnými selektory. Zahrnutím těchto rovnovah do souhrnně-komplexačního modelu byl vytvořen generalizovaný model elektromigrace v komplexujících systémech se stechiometrií komplexace 1:1. Tento model vůbec poprvé popisuje systémy, ve kterých více volných forem analytu interaguje s více selektory. Důležitou vlastností tohoto modelu je, že umožňuje nahlížet na tyto velmi složité systémy různými způsoby, ukazuje za jakých podmínek a jakým způsobem lze vzájemně provázané acidobazické a komplexační rovnováhy od sebe oddělit a pracovat s nimi samostatně. Platnost modelu byla experimentálně ověřena na nejjednodušším možném, nicméně z praktického hlediska velmi významném, systému s více volnými formami analytu a s více selektory: slabou jednosytnou kyselinou jako analytem a dvěma cyklodextriny, z nichž

jeden byl neutrální a jeden kladně nabitý. Pro dva různé způsoby předpovědi efektivní mobility analytu v takovém systému, které generalizovaný model umožňuje, byla pozorována shoda mezi predikcí a experimentem. Výsledky dále potvrdily, že v souladu s generalizovaným modelem je závislost efektivní mobility analytu na celkové koncentraci selektoru, původně odvozená pro jedinou formu volného analytu interagující s jediným selektorem, univerzálně použitelná pro systémy se stechiometrií komplexace 1:1 bez ohledu na to, zda jedna nebo více volných forem analytu interaguje s jedním nebo více selektory.

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

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

6. Použitá literatura

- [1] Van Eeckhaut A., Michotte Y., *Electrophoresis* 2006, 27, 2880-2895.
- [2] Guebitz G., Schmid M. G., *J. Chromatogr. A* 2008, 1204, 140-156.
- [3] Scriba G. K. E., *J. Sep. Sci.* 2008, 31, 1991-2011.
- [4] Lu H., Chen G., *Anal. Methods* 2011, 3, 488-508.
- [5] Schmitt U., Branch S. K., Holzgrabe U., *J. Sep. Sci.* 2002, 25, 959-974.
- [6] Juvancz Z., Bodane Kendrovics R., Ivanyi R., Szenté L., *Electrophoresis* 2008, 29, 1701-1712.
- [7] Cucinotta V., Contino A., Giuffrida A., Maccarrone G., Messina M., *J. Chromatogr. A* 2010, 1217, 953-967.
- [8] Wren S. A. C.; Rowe R. C., *J. Chromatogr.* 1992, 603, 235-241.
- [9] Scriba G. K. E., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2001, 27, 373-399.
- [10] Jac P., Scriba G. K. E., *J. Sep. Sci.* 2013, 36, 52-74.
- [11] Penn S. G., Goodall D. M., Loran J. S., *J. Chromatogr.* 1993, 636, 149-152.
- [12] Wren S. A. C., *J. Chromatogr.* 1993, 636, 57-62.
- [13] Penn S. G., Bergstrom E. T., Goodall D. M., Loran J. S., *Anal. Chem.* 1994, 66, 2866-2873.
- [14] Wren S. A. C., *Electrophoresis* 1995, 16, 2127-2131.
- [15] Seals T. H., Sheng C., Davis J. M., *Electrophoresis* 2001, 22, 1957-1973.
- [16] Britz-McKibbin P., Chen D. D. Y., *J. Chromatogr. A* 1997, 781, 23-34.
- [17] Rogan M. M., Altria K. D., Goodall D. M., *Electrophoresis* 1994, 15, 808-817.
- [18] Rawjee Y. Y., Staerk D. U., Vigh G., *J. Chromatogr.* 1993, 635, 291-306.
- [19] Rawjee Y. Y., Williams R. L., Vigh G., *J. Chromatogr. A* 1993, 652, 233-245.
- [20] Williams B. A., Vigh G., *J. Chromatogr. A* 1997, 777, 295-309.
- [21] Zhu W., Vigh G., *Electrophoresis* 2000, 21, 2016-2024.
- [22] Lelievre F., Gareil P., Jardy A., *Anal. Chem.* 1997, 69, 385-392.
- [23] Chen F.-T. A., Shen G., Evangelista R. A., *J. Chromatogr. A* 2001, 924, 523-532.
- [24] Chankvetadze B., Blaschke G., *J. Chromatogr. A* 2001, 906, 309-363.
- [25] Schmitt U., Ertan M., Holzgrabe U., *Electrophoresis* 2004, 25, 2801-2807.
- [26] Lurie I. S., *J. Chromatogr. A* 1997, 792, 297-307.
- [27] Fillet M., Hubert P., Crommen J., *J. Chromatogr. A* 2000, 875, 123-134.
- [28] Lurie I. S., Klein R. F. X., Dal Cason T. A., LeBelle M. J., Brenneisen R., Weinberger R. E., *Anal. Chem.* 1994, 66, 4019-4026.
- [29] Zhu X., Ding Y., Lin B., Jakob A., Koppenhoefer B., *J. Chromatogr. A* 2000, 888, 241-250.
- [30] Sepaniak M. J., Copper C. L., Whitaker K. W., Anigbogu V. C., *Anal. Chem.* 1995, 67, 2037-2041.
- [31] Szolar O. H. J., Brown R. S., Luong J. H. T., *Anal. Chem.* 1995, 67, 3004-3010.
- [32] Matthijs N., Van Hemelryck S., Maftouh M., Luc Massart D., Vander Heyden Y., *Anal. Chim. Acta* 2004, 525, 247-263.
- [33] Peng X., Bowser M. T., Britz-McKibbin P., Bebault G. M., Morris J. R., Chen D. D. Y., *Electrophoresis* 1997, 18, 706-716.

- [34] Kranack A. R., Bowser M. T., Britz-McKibbin P., Chen D. D. Y., *Electrophoresis* 1998, *19*, 388-396.
- [35] Dubsky P., Svobodova J., Gas B., *J. Chromatogr. B* 2008, *875*, 30-34.
- [36] Dubsky P., Svobodova J., Tesarova E., Gas B., *Electrophoresis* 2010, *31*, 1435-1441.
- [37] Uselova-Vcelakova K., Zuskova I., Gas B., *Electrophoresis* 2007, *28*, 2145-2152.
- [38] Jiang C., Armstrong D. W., *Electrophoresis* 2010, *31*, 17-27.
- [39] Riekkola M.-L., Joensuu J. A., Smith R. M., *Pure Appl. Chem.* 2004, *76*, 443-451.
- [40] Wang W., Zhou F., Zhao L., Zhang J.-R., Zhu J.-J., *J. Chromatogr. A* 2007, *1170*, 1-8.
- [41] Williams B. A., Vigh G., *Anal. Chem.* 1997, *69*, 4445-4451.
- [42] Xu X., Kok W. T., Poppe H., *J. Chromatogr. A* 1996, *742*, 211-227.
- [43] Hruska V., Svobodova J., Benes M., Gas B., *J. Chromatogr. A* 2012, *1267*, 102-108.
- [44] Benes M., Svobodova J., Hruska V., Dvorak M., Zuskova I., Gas B., *J. Chromatogr. A* 2012, *1267*, 109-115.
- [45] Haarhoff P. C., van der Linde H. J., *Anal. Chem.* 1966, *38*, 573-582.
- [46] Erny G. L., Bergstroem E. T., Goodall D. M., Grieb S., *Anal. Chem.* 2001, *73*, 4862-4872.
- [47] Hruska V., Riesova M., Gas B., *Electrophoresis* 2012, *33*, 923-930.
- [48] Gas B., Zuska J., Coufal P., van de Goor T., *Electrophoresis* 2002, *23*, 3520-3527.
- [49] Mullerova L., Dubsky P., Gas B., *Journal of Chromatography A* 2014, *1330*, 82-88.
- [50] Mofaddel N., Krajian H., Villemin D., Desbene P. L., *Talanta* 2009, *78*, 631-637.
- [51] echmet.natur.cuni.cz [staženo 25. 5. 2015].

7. Přílohy

A Seznam publikací

Publikace I

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

L. Müllerová, P. Dubský, B. Gaš

Electrophoresis 2014, *35*, 2688-2700.

Publikace II

Separation efficiency of dual-selector systems in capillary electrophoresis

L. Müllerová, P. Dubský, B. Gaš

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

Publikace III

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

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

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

Publikace IV

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

L. Müllerová, P. Dubský, B. Gaš

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

Publikace V

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

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

Electrophoresis 2013, *34*, 768-776.

Publikace VI

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

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

Electrophoresis 2015, *36*, 655-661.

B Účast na konferencích

Přednášky

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

Plakátová sdělení

2010 – 2014 Sedm plakátových sdělení na mezinárodních konferencích.

Jiné

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

C Životopis

Jméno: **Ludmila Müllerová**
Narozena: 19. 8. 1986 v Praze
Adresa: Mánesova 85, 120 00 Praha 2

Vzdělání

- 2011 – Doktorské studium, studijní obor Fyzikální chemie
Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze
Téma práce: *Vliv interagující složky základního elektrolytu na elektroforetickou separaci*
- 2009 – 2011 Magisterské studium, studijní obor Fyzikální chemie
Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze
Téma práce: *Stanovení elektroforetické mobility alkalických kationtů v micelárních systémech*, diplom Summa Cum Laude
- 2006 – 2009 Bakalářské studium, studijní obor Chemie v přírodních vědách
Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze
Téma práce: *Iontové párování vybraných kationtů s micelou v systémech kapilární elektroforézy*, diplom Summa Cum Laude

Stáže

- duben 2014 Neofit Rilski South-West University – Blagoevgrad, Faculty of Natural Sciences, Department of Chemistry, Prof. Tamara Pajpanova
- říjen 2011 University of Warsaw, Faculty of Chemistry, Department of Inorganic and Analytical Chemistry, Prof. Marek Trojanowicz

Účast na projektech

- 2012 – 2014 Hlavní řešitelka projektu GA UK *Optimalizace chirálních separací v kapilární zónové elektroforéze s pomocí počítačových simulací*
- 2014 – 2015 Hlavní řešitelka projektu GA UK *Počítačové modelování ostrých koncentračních rozhraní v elektroforéze s praktickým zaměřením na metody isoelektrické fokusace a frakcionace proteinů*
- 2009 – 2015 Členka řešitelského kolektivu ve dvou dalších projektech GA UK, členka řešitelského kolektivu projektu GA ČR

Výuka na Přírodovědecké fakultě Univerzity Karlovy v Praze

- Základní praktikum z fyzikální chemie
- Pokročilé praktikum z fyzikální chemie (úloha Kapilární zónová elektroforéza)

Jazyková zkouška

2013 FCE (Cambridge ESOL examinations), B2

Neodborná publikační činnost

2013 Povídka *Případ nečteného psaní* v antologii *Legendy: Prokleté knihovny* (M. Bronec (ed.). 2013. Praha: Straky na vrbě. ISBN 978-80-87364-40-6)

2005 – 2014 Osm povídek ve sbornících *Drakobijci a Žoldnéři fantasie* (Praha: Straky na vrbě)

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

Ph.D. study program: Physical Chemistry

Summary of the Ph.D. Thesis



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

Ludmila Müllerová

Supervisor: Mgr. Pavel Dubský, Ph.D.

Praha, 2015

Abstract

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

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

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

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

This thesis summarizes results obtained during my Ph.D. studies in the Group of Electrophoretic and Chromatographic Separation Methods (ECHMET) at the Department of Physical and Macromolecular Chemistry, Faculty of Science of the Charles University in Prague. The work was financially supported by the Grant Agency of the Charles University in Prague, project numbers 669412 and 510214, the Czech Science Foundation, project number 203-08-1428, and the CEEPUS project CIII-RO-0010-08-1314.

Abbreviations and symbols

ACE	affinity capillary electrophoresis
BGE	background electrolyte
CE	capillary electrophoresis
EMD	electromigration dispersion
EOF	electroosmotic flow
HVL	Haarhoffovu – van der Linde (function)
$M_A M_S$	multi-free-analyte-form multi-selector (system, model)
$M_A S_S$	multi-free-analyte-form single-selector (system, model)
$S_A M_S$	single-free-analyte-form multi-selector (system, model)
$S_A S_S$	single-free-analyte-form single-selector (system, model)
c_S	concentration of selector
K'_{AS}	concentration-defined constant of complexation between the analyte and the selector
μ_A	mobility of the free (uncomplexed) analyte
$\mu_{A,eff}$	effective mobility of the analyte
μ_{AS}	mobility of complex of the analyte and the selector

Table of contents

1. Introduction.....	5
Theoretical description of complexation in electromigration systems.....	5
Determination of unbiased effective mobility	7
2. Aims of the study	10
3. Material and methods.....	11
4. Results and discussion.....	11
Description of dual-selector separation systems by the M-overall model.....	11
Generalized model of electromigration in systems with 1:1 complexation ($M_A M_S$ model) .	13
Effective mobility of EOF markers in BGE containing randomly sulfated β -cyclodextrin determined by two-detector method.....	16
Determination of HVL function parameters from geometric characteristics of an electrophoretic peak.....	17
5. Conclusions	18
6. References	20
7. Appendices.....	22
A List of publications	22
B Conference contributions	23
C Curriculum vitae.....	24

1. Introduction

Capillary electrophoresis (CE) is a widely used separation method of analytical chemistry. Addition of a selector into the background electrolyte (BGE) extends its applicability to separation of neutral compounds, compounds of similar physicochemical properties and especially chiral analytes. One of the advantages of CE is that in this method it is easy to change the used selector or its concentration. A broad range of chiral selectors is used in analytical practice: crown-ethers, macrocyclic antibiotics, proteins, chiral micelles, cyclodextrins or others [1, 2]. However, the most popular chiral selectors in CE are cyclodextrins [1-4], cyclic oligosaccharides usually composed of six (α -cyclodextrin), seven (β -cyclodextrin) or eight (γ -cyclodextrin) glucopyranose units.

Along with increasing usage of selectors in CE, mathematical models describing such systems have been also developed. Models can simplify optimization of separation conditions as they enable prediction of separation performance based on physicochemical characteristics of the system. No less important is the fact that they allow better understanding the separation mechanism.

Theoretical description of complexation in electromigration systems

When various forms of the analyte are present in CE and equilibria between these forms is established much faster compared to the electromigration movement, the effective mobility of the analyte is obtained as a weighted average of mobilities of these respective forms, while the weights are the molar fractions of the forms compared to the total (analytical) concentration of the analyte. When a single free form of the analyte (*e.g.* a fully dissociated acid) interacts with a single selector, the only such equilibria is the complexation. In 1992, Wren and Rowe [8] described dependence of analyte's effective mobility, $\mu_{A,eff}$, on concentration of the present selector, c_S , in such a system:

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

where K'_{AS} is a (concentration defined) complexation constant characterizing the interaction of the analyte with the selector, μ_A is a mobility of the free (uncomplexed) analyte and μ_{AS} is a mobility of the formed complex. This model is valid when temperature and ionic strength of the BGE are constant and when stoichiometry of the complexation is exclusively 1:1

(analyte : selector). Though this is not the only stoichiometry possible, it is generally regarded as the most relevant one especially for cyclodextrins [9, 10].

Based on the model by Wren and Rowe (1), other models were developed describing the single-free-analyte single-selector ($S_A S_S$) systems [11-15]. Most of them focused on expressing parameters that quantify efficacy of the separation utilizing the predicted effective mobilities. Even though majority of the $S_A S_S$ models dealt with enantioselective separations, the model (1) can be used for optimization of non-chiral separations as well [16, 17].

The $S_A S_S$ models took into account only one free form of the analyte. However, in practice the analytes are often weak acid, bases or ampholytes that can be present in various dissociated / protonated forms. Consequently, these forms can differ in the parameters of their interaction with the selector. Therefore, pH of the BGE (which governs the acid-base dissociation of the analytes) can have a great influence on the separation.

Theoretical description of such multi-free-analyte-form single-selector ($M_A S_S$) systems was extensively studied *e.g.* by the group of Vigh [18-21]. They described the dependency of the effective mobility of a weak monoprotic acid [18] or base [19] on the selector concentration and pH of the BGE. Therefore the model included two independent variables. Later on, Lelièvre *et al.* [22] demonstrated that at constant pH, a prescription formally identical with formula (1) can be used to describe the dependence of the effective mobility of a partly dissociated weak monoprotic acid on the concentration of a selector. In such a case the parameters of the dependency (complexation constant, mobilities of the free analyte and of the complex) are valid only for a particular pH value (these parameters will be referred to as pH-overall parameters).

In the analytical practice, mixtures of selectors are also often used. It is because some of the commercially available derivatized selectors are actually mixtures of compounds differing in the degree of substitution and positions of substituents [23-25]. However, selector mixtures are also prepared intentionally to achieve better separation [2-4, 26, 27]. The first theoretical description of electromigration of an analyte interacting with two selectors was published in 1994 [28]. The authors extended the model by Wren and Rowe (1) to include complexation with a second selector. This and other published descriptions of single-free-analyte-form multi-selector ($S_A M_S$) systems were summarized in a review which is a part of this thesis (*Publication I*). These models usually worked with two independent variables – concentrations of the two respective selectors. However, in many cases the mathematical

description served only for qualitative explanation of the observed results, *e.g.* reversal of the electromigration order [28-32].

Peng *et al.* [33] expressed the effective mobility of an analyte interacting with an arbitrary number of selectors (with the stoichiometry of the interaction being exclusively 1:1 analyte : selector). However, the obvious difficulty of this model was its N -dimensionality which complicated its application in practice. Karanack *et al.* [34] later showed that when ratios of molar concentrations of all the present selectors are kept constant, the dependence of analyte's effective mobility on the total selector concentration is formally identical with the relation (1). Therefore, in such a case, the mixture of selectors can be treated as a single selector. Interaction of an analyte with this "overall" selector is characterized by an overall complexation constant and an overall mobility of the ostensible complex. However, this model (will be referred to as the M-overall model and the respective overall parameters of complexation as the M-overall parameters) was forgotten until it was independently re-developed in our research group [35, 36].

The M-overall model offered valuable insight into the mechanism of separation induced by a mixture of selectors of unknown yet constant composition (*e.g.* possible explanation of the high separation power of randomly sulfated cyclodextrins [36]). Utilization of this model for inspection and optimization of intentionally prepared selector mixtures (of therefore known composition) was demonstrated in *Publication II*. In *Publications III* and *IV*, this model was extended to include also acid-base dissociation of the analyte.

Determination of unbiased effective mobility

The various theoretical descriptions of selector-assisted CE (and optimization strategies based on them) need the parameters of complexation – complexation constants and mobilities of complexes – as their input. These parameters can be determined experimentally *e.g.* by the affinity capillary electrophoresis (ACE) [37, 38]: the dependency of analyte's effective mobility on selector concentration is fitted by a suitable function. Therefore, it is crucial to determine correct effective mobilities of the analytes.

This thesis addressed two issues connected with determining the effective mobility:

- (i) Measurement of the effective mobility of the electroosmotic flow in BGEs containing a charged interacting constituent (*e.g.* charged selector).

- (ii) Determination of correct migration time of an electrophoretic peak which is deformed by the electromigration dispersion.

The electroosmotic flow (EOF) is induced by net charge of the inner wall of the capillary and causes movement of the bulk solution in the capillary towards one of the electrodes [39]. In order to determine analyte's effective mobility, the effective mobility of the EOF must be measured and subtracted from the apparent mobility of the analyte.

Various methods of EOF mobility determination can be found in the literature [40]. The simplest and most popular one is utilization of a marker – a neutral compound injected with the sample which moves only by the EOF and therefore can serve to measure the EOF mobility. However, when the BGE contains a charged selector, this selector can interact not only with the analyte, but also with the EOF marker. Due to this interaction, the marker gains a nonzero effective mobility which depends on the concentration of the selector. This results in determination of biased effective mobilities of the analyte.

In 1997, Williams and Vigh [41] developed a method for measurement of correct analyte's mobility in BGE containing an interacting agent. However, the method required situating the UV absorption detector approximately in the middle of the capillary. In most commercially available instruments such setup is impossible. Therefore, in *Publication V* is presented a method based on the same principle but applicable in commercial instrumentation.

In the analyte zone, the velocity of analyte's electromigration may depend on analyte's concentration. In such a case, the shape of the analyte is deformed from Gaussian to triangular shape (supposed that the analyte was originally injected as a narrow zone). This triangulation phenomenon is called electromigration dispersion (EMD) and can be induced by:

- (i) Change in conductivity (and therefore also in the electric field intensity) compared to the surrounding BGE [42].
- (ii) Insufficient buffering capacity of the BGE (which causes that ratio of amounts of various analyte's dissociation forms changes with changing the analyte concentration) [42].
- (iii) Significant decrease of concentration of the free selector due to complexation with the analyte (and therefore increase of fraction of the free form of the analyte with increasing analyte's concentration) [43, 44].

In the case of the triangulated peak, the maximum of the peak does not give the migration time that corresponds to the effective mobility of the analyte (the maximum position changes with the amount of the analyte injected). As resulted from the linearized model of electromigration with a small nonlinear disturbance, the EMD deformed peak is well described by the Haarhoff – van der Linde (HVL) function [45-47]. Physical meaning of one parameter of this function is the migration time resulting from the effective mobility of the analyte at infinitely low analyte concentration. Therefore this parameter should serve for the determination of the effective mobility.

However, up till now it was necessary to export and analyze experimental data by means of a nonlinear regression in order to determine the HVL function parameters for an electrophoretic peak. In *Publication VI*, relations between geometric characteristics of an EMD-deformed peak and the parameters of the corresponding HVL function were presented for the first time. These relations enable determination of the HVL function parameters without the nonlinear regression.

2. Aims of the study

The main aim of this dissertation thesis was to further describe electromigration in systems in which analytes interact with mixture of selectors, namely:

- (i) Experimentally verify the capability of the M-overall model to predict the separation efficacy of dual-selector systems (composed of two defined cyclodextrins) and demonstrate the advantages of this approach (*Publication II*).
- (ii) Incorporate possible acid-base dissociation equilibria of the analyte into the M-overall model and demonstrate the validity of the extended model experimentally on a system of a weak monoprotic acid as an analyte and two defined cyclodextrins as selectors (*Publications III and IV*).

Other aims of the study were connected to the determination of the correct effective mobility of analyte:

- (i) Develop a method for the determination of the effective mobility in a system containing a charged interacting agent which would be applicable in commercially available CE instrumentation and use this method to qualify suitability of popular EOF markers for the EOF determination in a BGE containing randomly sulfated cyclodextrin.
- (ii) Derive relations between the geometric characteristics of an electrophoretic peak deformed by the electromigration dispersion and the parameters of the HVL function describing this peak.

3. Material and methods

All the CE experiments were performed using an Agilent ^{3D}CE capillary electrophoresis instrument operated by ChemStation software (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). The instrument was equipped with a built-in photometric diode array UV detector and a contactless conductivity detector developed in our laboratory [48]. A pH meter (PHM 240 pH/ION Meter, Radiometer analytical) was employed for pH measurements.

Fused-silica capillaries with the outer wall covered by a polyimide coating were used. All chemicals were of high-grade purity. The water was purified by the Rowapur and Ultrapur water purification system (Watrex, SanFrancisco, USA).

Data analysis was performed by means of Origin 8.1 (OriginLab Corporation, Northampton, USA) and Microsoft Office Excel (Microsoft).

Detailed experimental conditions are always given in the respective publication and therefore are not discussed here in detail.

4. Results and discussion

Description of dual-selector separation systems by the M-overall model

According to the M-overall model a mixture of selectors can be treated as a single selector, if the mixture composition (molar fractions of the individual selectors in the selector mixture) is kept constant. Interaction of this "overall" selector with the analyte is characterized with M-overall complexation parameters. The model describes how these overall parameters depend on the complexation parameters of the single selectors contained in the mixture. When the two selectors are mixed intentionally to improve the separation, the mixture composition is known and therefore, the M-overall model can be utilized to predict and inspect the separation potential of various mixture compositions and consequently to choose the optimal separation conditions.

This approach was experimentally verified in *Publication II*. Ibuprofen and flurbiprofen were chosen as model analytes. Even though these two compounds are chiral, chiral separation was not in our scope of interest (interaction of these analytes with cyclodextrins is not enantioselective at the selected pH). We focused on verification of the model, which can be used for optimization of both chiral and non-chiral separations. Therefore, ibuprofen was

regarded as the first analyte and flurbiprofen as the second analyte. At the selected pH (8.2), both analytes were singly negatively charged. Electromigration of these analytes in two different dual-selector systems (dimethyl- β -cyclodextrin and maltosyl- β -cyclodextrin; dimethyl- β -cyclodextrin and native β -cyclodextrin) was inspected.

Regarding a dual-selector mixture, two independent variables must be optimized by the M-overall model – a molar fraction of the first selector in the mixture and total concentration of the selector mixture (molar fraction of the second selector is determined by molar fraction of the first selector). This approach brings significant benefits compared to utilization of concentrations of the two respective selectors as the independent variables. Both selector concentrations can, in principle, go to infinity and it is rather difficult to imagine the system behavior in all their possible combinations. Conversely, the M-overall model shows, that it is actually the mixture composition represented by the molar fraction of the first selector that determines the properties of the system. This molar fraction can only attain values between zero and one. Thus a separation pattern can be easily inspected within these constraints as was demonstrated in *Publication II* for the following system characteristics:

- (i) Dependences of the separation selectivity (a ratio of the effective mobilities of the respective analytes) on the total selector concentration.
- (ii) Values of the overall complexation parameters.
- (iii) Electromigration order of the analytes and its possible reversal.

Agreement between the predictions by the M-overall model and the experimental results is shown in Figure 1, for the case (i). Though some of the experimental points do not always lie exactly at the expected curves, the shapes of the dependencies (including presence and approximate position of the maxima) are correct. The figure also demonstrates that these shapes change with the changing mixture composition rather “counterintuitively”.

The M-overall model enables finding optimal composition and total concentration of the dual-selector mixture. Utilizing this model, it can be also easily identified whether mixing two particular selectors may lead to an improvement of the separation. Another advantage of this mode is that it originates not from extension of a single-selector model but it is rather a special case of a more general multi-selector model.

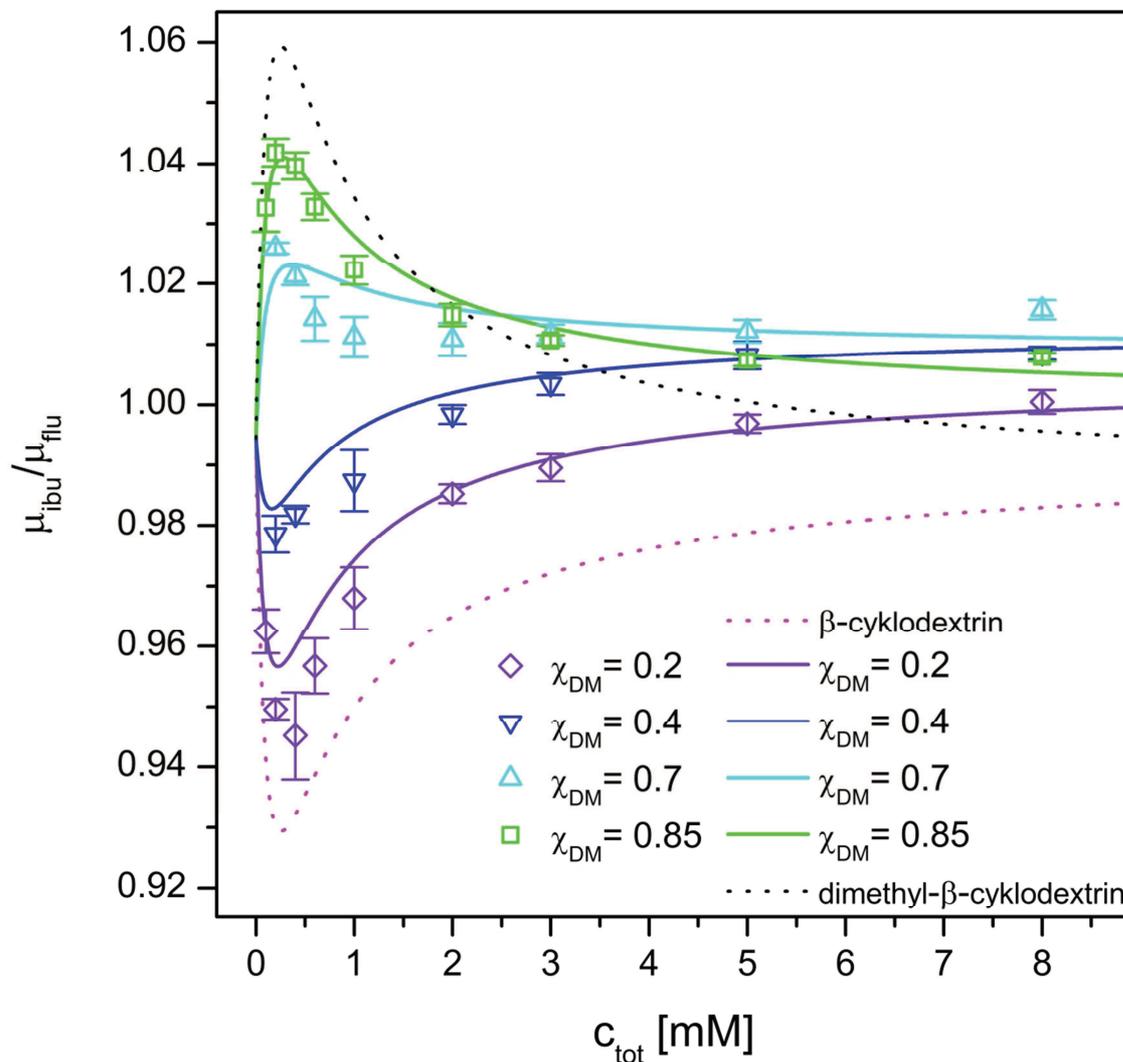


Figure 1: Dependence of the selectivity (a ratio of the effective mobilities of ibuprofen and flurbiprofen) on the (total) concentration of the selector in two single-selector systems (dimethyl- β -cyclodextrin and native β -cyclodextrin; dot lines) and in dual-selector mixtures of these two selectors predicted by the M-overall model (full lines) and determined experimentally (points); χ_{DM} – molar fraction of dimethyl- β -cyclodextrin in dual-selector mixture; adapted from *Publication II*.

Generalized model of electromigration in systems with 1:1 complexation ($M_A M_S$ model)

Systems in which analytes interact with multiple selectors have been extensively studied, as summarized in *Publication I*. Nevertheless, none of these models (including the M-overall model discussed above) took into account other possible equilibria in which the analyte may be involved next to complexation – especially acid-base dissociation equilibria. Such equilibria were included only in single-selector models.

In *Publication III*, a generalized model of electromigration in systems with 1:1 (analyte : selector) complexation stoichiometry was proposed. This model originates from the M-overall model and describes effective mobility of an analyte that is present in an arbitrary number of free (uncomplexed) forms among which fast equilibria is established. For the purposes of the model, these free-analyte forms are not necessarily specified, however, the (de)protonated forms of acidic / basic / amphoteric analytes are of the prime interest. Consequently, each of these forms interacts with each of an arbitrary number of selectors, the complexation stoichiometry being exclusively 1:1.

In such a multi-free-analyte-form multi-selector ($M_A M_S$) system, number of interconnected equilibria is established and all of them influence the resulting effective mobility of the analyte. Advantage of the $M_A M_S$ model is that it provides various perspectives from which such a complicated system can be regarded.

When composition of the selector mixture (represented by molar fractions of all the selectors) remains constant and so does the external conditions governing the distribution of the analyte among its free forms (in case of acid-base equilibria, this external condition is the pH of the BGE), then the $M_A M_S$ system can be treated as a $S_A S_S$ system: The dependence of analyte's effective mobility on the total selector concentration follows the same hyperbolic shape as in the case of a single free form of the analyte interacting with a single selector. Therefore, the relation (1) is universally applicable in systems with 1:1 complexation stoichiometry. This conclusion of the $M_A M_S$ model was verified experimentally in *Publication IV*: The effective mobilities of a model analyte (weak monoprotic acid R-flurbiprofen) were measured at various (total) concentrations of a single selector or a dual-selector mixture at constant pH and – in the case of selector mixtures – also a constant mixture composition. (Singly positively charged monoamino- β -cyclodextrin and native β -cyclodextrin were used as selectors, measurements were performed at three pH values and four mixture compositions.) These dependencies were consequently fitted with function (1) and quality of the fit, represented by the R^2 parameter, was the same in $S_A S_S$, $M_A S_S$, $S_A M_S$ and $M_A M_S$ systems (Figure 2 shows the fit for an $M_A M_S$ system).

The $M_A M_S$ model also shows how a system in which multiple free-analyte-forms interact with multiple selectors can be described (and optimized) by models originally developed for simpler systems:

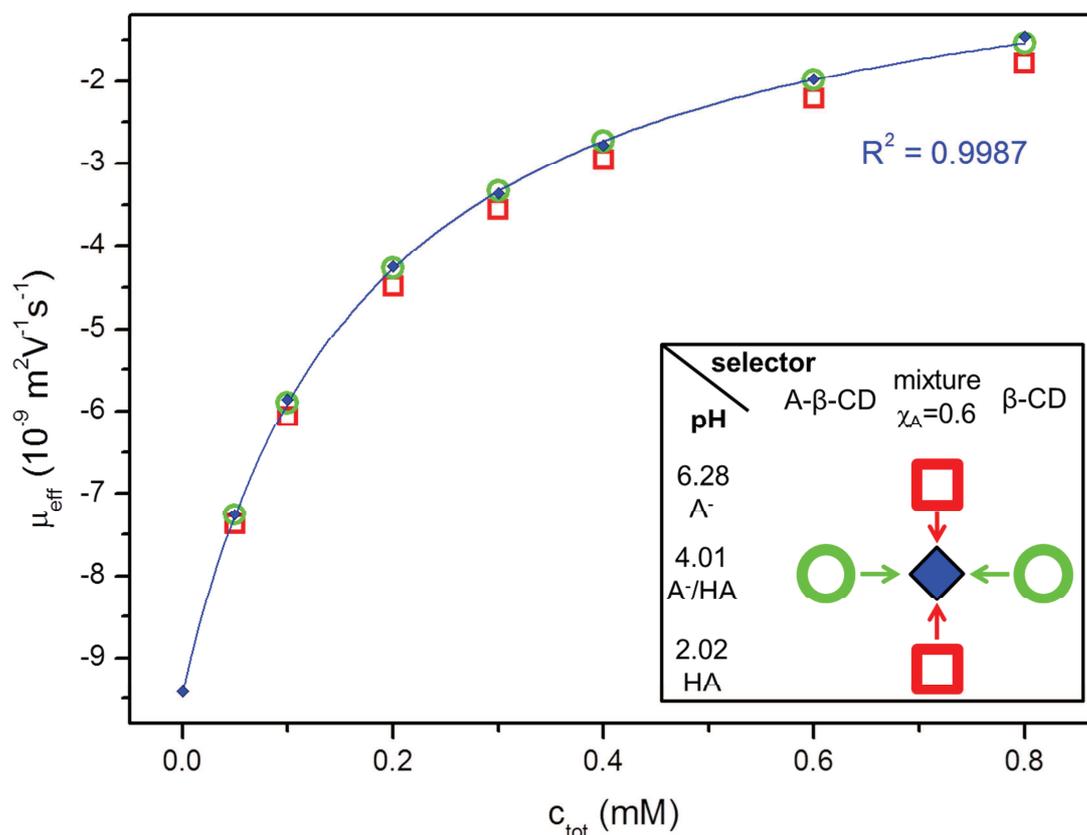


Figure 2: Dependence of effective mobility of R-flurbiprofen on total concentration of dual-selector composed of monoamino-β-cyclodextrin (A-β-CD) and native β-cyclodextrin (β-CD) at pH 4.01, fraction of the first selector in the mixture $\chi_A = 0.6$; diamonds – experimental effective mobilities, line – fit of experimental mobilities with function (1), squares – effective mobilities predicted by the pH-explicit approach, circles - effective mobilities predicted by the M-explicit approach; adapted from *Publication IV*.

- (i) More free forms of an analyte interacting with a single selector; *e.g.* models by Vigh *et al.* [18-21] (pH-explicit approach).
- (ii) A single free form of an analyte interacting with more selectors; *e.g.* dual-selector model by Lurie *et al.* [28] or the M-overall model published by us [35, 49] (M-explicit approach).

These two approaches were experimentally verified in *Publication IV*. Effective mobilities of R-flurbiprofen predicted by both pH-explicit and M-explicit approaches were in a good agreement with the experiment as shown in Figure 2.

These two approaches can be regarded as somewhat “orthogonal” as shows the inset in Figure 2. Actually, these approaches were sometimes adopted in past (*e.g.* while determining pH-apparent parameters of complexation with selectors which were actually

mixtures of various compounds [50]). Nevertheless, the model presented in *Publications III* and *IV* provides theoretical description of the $M_A M_S$ systems with 1:1 complexation for the first time. The model shows how the highly interconnected equilibria in which the analyte is involved can be decoupled and treated from various simpler perspectives. Consequently, the best suitable way of optimization can be chosen for a particular separation.

Effective mobility of EOF markers in BGE containing randomly sulfated β -cyclodextrin determined by two-detector method

The complexation parameters (that serve as an input to the above discussed models) can be determined by the ACE method. This requires measurement of accurate effective mobilities of the analyte in BGEs containing various concentrations of the selector. However, when the selector is charged, it may interact not only with the analyte but also with the EOF marker. Consequently this would result in obtaining biased values of the effective mobilities of the analyte.

In *Publication V*, a two-detector method was proposed which eliminates this problem. It is based on the same principle as the method by Vigh *et al.* [41] but can be utilized in commercial instrumentation. In the method, the distance between a marker zone (surrounded by an interacting-agent-free BGE) and the zone of the analyte (situated in the BGE containing the charged selector) is measured before and after short application of voltage. The method utilizes two detectors: UV diode array detector, its position is usually fixed near the outlet of the capillary (distance from outlet being 8.5 cm in the Agilent Technologies instrumentation used in this work), and contactless conductivity detector (this detector was originally developed in our laboratory [48] but now is commercially available from Agilent Technologies).

The two-detector method was used to measure the effective mobilities of four popular EOF markers (dimethyl sulfoxide, mesityl oxide, nitromethane and thiourea) in a BGE containing randomly sulfated β -cyclodextrin in a concentration of 60 g/L (approximately 30 mM). All the four markers exhibited a measurable effective mobility, the lowest (in absolute value) being $-1,5 \cdot 10^{-9} \text{m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$ for dimethyl sulfoxide and nitromethane. Therefore, these two compounds are the most appropriate EOF markers for this BGE even though they also slightly interact with the selector.

Determination of HVL function parameters from geometric characteristics of an electrophoretic peak

An electrophoretic peak deformed by the EMD can be described by the HVL function. The migration time that corresponds to the effective mobility of the analyte at its infinite dilution can be obtained as one of the HVL function parameters. Therefore, the value of this parameter should be used for calculation of the effective mobility which in turn serves *e.g.* to determine the complexation parameters by the ACE method.

For a given EMD-deformed peak, the following geometric characteristics can be depicted: the time corresponding to the peak maxima, the peak's width at a certain fraction of its maximal height and the peak's asymmetry (this can be quantified *e.g.* as a ratio of its right and left half-widths; the U. S. Pharmacopeia tailing factor serves as a measure of asymmetry of the peak in the ChemStation software by Agilent Technologies).

Nevertheless, the relation between these geometric characteristics and the parameters of the HVL function is not straightforward. Therefore, until now, it was necessary to export the electropherogram data into suitable software (*e.g.* Origin) and analyze them by means of a nonlinear regression. In *Publication VI*, such relations were introduced. The new relations utilize a set of coefficients which depend exclusively on the asymmetry of the peak. Unfortunately, these dependencies cannot be expressed in a closed form. However, they can be calculated numerically for the desired measures of peak width and asymmetry.

Therefore, in *Publication IV* the dependencies were calculated for the geometric characteristics used by the ChemStation software and incorporated in an MS Excel table (can be downloaded from the website of our laboratory [51]). This table enables quick and easy calculation of the HVL function parameters based on the characteristics provided automatically by ChemStation. Results of this calculation were in an agreement with the nonlinear regression performed by Origin 8.1. In the case of a real electropherogram, the calculation error was comparable with the sampling rate of the instrument.

5. Conclusions

This dissertation thesis focused on a theoretical description of capillary electrophoresis which utilizes interaction of the analyte with a mixture of two or more selectors, the analyte possibly also undertaking acid-base dissociation. The thesis also dealt with determination of correct effective mobility of the analyte in such systems.

The overall complexation model of electromigration was used to describe a dual-selector systems of known composition. The model shows that when the mixture composition (represented by a molar fraction of the first selector) is kept constant, the dual-selector mixture can be treated as a single selector. The parameters of complexation of an analyte with this "overall" selector can be predicted by the model. Consequently, utilizing the overall complexation parameters, the dependence of analyte's effective mobility on the total selector concentration can be predicted. The molar fraction of the first selector in the dual-selector mixture can only attain values between zero and one and thus the selector mixture separation capabilities can be easily inspected by the model. The proposed approach was verified experimentally on a model system of two negatively charged analytes and two different dual-selector systems composed of neutral selectors. Very good agreement between the predicted and the measured overall complexation parameters was observed. It was also shown that the model can predict dependencies of the selectivity (ratio of the effective mobilities of the analytes) on the total selector concentration.

In the analytical practice, analytes are often weak acids, bases or ampholytes. Therefore, they may be present in more free forms among which the acid-base equilibria are established. Each of these free forms can undergo complexation with the present selectors. The equilibria among analyte's free forms were included into the overall complexation model. The thus obtained generalized model of electromigration with 1:1 (analyte : selector) complexation stoichiometry for the first time describes systems in which more free-analyte forms interact with more selectors. The model shows, how the highly interconnected complexation and acid-base dissociation equilibria can be decomposed and regarded from various simpler perspectives. Validity of the model was demonstrated on the simplest, yet practically highly relevant, system in which more free forms of analytes interact with more selectors: a weak monoprotic acid was used as the analyte and two cyclodextrins (one neutral, one singly positively charged) were used as the selectors. Analyte's effective mobilities in this system were predicted in two different ways enabled by the model and in

both cases good agreement with the experiment was observed. The results also confirmed that the relation describing the dependence of the effective mobility of the analyte on the concentration of the selector, which was originally developed for the system of a single free-analyte form interacting with a single selector, is universally applicable in systems with 1:1 complexation stoichiometry (regardless whether one or more forms of the free analyte interact with one or more selector).

In the second part of this dissertation thesis a two-detector method was proposed which enables determination of correct effective mobility of analyte in a system in which a charged interacting agent (*e.g.* a charged selector) can interact with the EOF marker. Correct effective mobility is crucial for measurement of complexation parameters utilized by the electromigration models discussed above. By the two-detector method, applicability of four popular EOF markers was investigated in a BGE containing randomly sulfated β -cyclodextrin. Dimethyl sulfoxide and nitromethane were found to have the lowest yet still measurable effective mobility in this BGE – therefore, they were found to be the least inappropriate EOF markers for this system.

A procedure was also proposed that allows determination of HVL function parameters of an electrophoretic peak deformed by the electromigration dispersion without the need of a nonlinear regression. One of these parameters is the migration time corresponding to analyte's effective mobility at its infinite dilution which in turn serves for the determination of *e.g.* complexation parameters utilized by the electromigration models. Therefore, the proposed procedure much simplifies the determination of correct effective mobilities and therefore also complexation parameters in systems in which analyte peaks undergo triangulation.

6. References

- [1] Van Eeckhaut A., Michotte Y., *Electrophoresis* 2006, *27*, 2880-2895.
- [2] Guebitz G., Schmid M. G., *J. Chromatogr. A* 2008, *1204*, 140-156.
- [3] Scriba G. K. E., *J. Sep. Sci.* 2008, *31*, 1991-2011.
- [4] Lu H., Chen G., *Anal. Methods* 2011, *3*, 488-508.
- [5] Schmitt U., Branch S. K., Holzgrabe U., *J. Sep. Sci.* 2002, *25*, 959-974.
- [6] Juvancz Z., Bodane Kendrovics R., Ivanyi R., Sente L., *Electrophoresis* 2008, *29*, 1701-1712.
- [7] Cucinotta V., Contino A., Giuffrida A., Maccarrone G., Messina M., *J. Chromatogr. A* 2010, *1217*, 953-967.
- [8] Wren S. A. C.; Rowe R. C., *J. Chromatogr.* 1992, *603*, 235-241.
- [9] Scriba G. K. E., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2001, *27*, 373-399.
- [10] Jac P., Scriba G. K. E., *J. Sep. Sci.* 2013, *36*, 52-74.
- [11] Penn S. G., Goodall D. M., Loran J. S., *J. Chromatogr.* 1993, *636*, 149-152.
- [12] Wren S. A. C., *J. Chromatogr.* 1993, *636*, 57-62.
- [13] Penn S. G., Bergstrom E. T., Goodall D. M., Loran J. S., *Anal. Chem.* 1994, *66*, 2866-2873.
- [14] Wren S. A. C., *Electrophoresis* 1995, *16*, 2127-2131.
- [15] Seals T. H., Sheng C., Davis J. M., *Electrophoresis* 2001, *22*, 1957-1973.
- [16] Britz-McKibbin P., Chen D. D. Y., *J. Chromatogr. A* 1997, *781*, 23-34.
- [17] Rogan M. M., Altria K. D., Goodall D. M., *Electrophoresis* 1994, *15*, 808-817.
- [18] Rawjee Y. Y., Staerk D. U., Vigh G., *J. Chromatogr.* 1993, *635*, 291-306.
- [19] Rawjee Y. Y., Williams R. L., Vigh G., *J. Chromatogr. A* 1993, *652*, 233-245.
- [20] Williams B. A., Vigh G., *J. Chromatogr. A* 1997, *777*, 295-309.
- [21] Zhu W., Vigh G., *Electrophoresis* 2000, *21*, 2016-2024.
- [22] Lelievre F., Gareil P., Jardy A., *Anal. Chem.* 1997, *69*, 385-392.
- [23] Chen F.-T. A., Shen G., Evangelista R. A., *J. Chromatogr. A* 2001, *924*, 523-532.
- [24] Chankvetadze B., Blaschke G., *J. Chromatogr. A* 2001, *906*, 309-363.
- [25] Schmitt U., Ertan M., Holzgrabe U., *Electrophoresis* 2004, *25*, 2801-2807.
- [26] Lurie I. S., *J. Chromatogr. A* 1997, *792*, 297-307.
- [27] Fillet M., Hubert P., Crommen J., *J. Chromatogr. A* 2000, *875*, 123-134.
- [28] Lurie I. S., Klein R. F. X., Dal Cason T. A., LeBelle M. J., Brenneisen R., Weinberger R. E., *Anal. Chem.* 1994, *66*, 4019-4026.
- [29] Zhu X., Ding Y., Lin B., Jakob A., Koppenhoefer B., *J. Chromatogr. A* 2000, *888*, 241-250.
- [30] Sepaniak M. J., Copper C. L., Whitaker K. W., Anigbogu V. C., *Anal. Chem.* 1995, *67*, 2037-2041.
- [31] Szolar O. H. J., Brown R. S., Luong J. H. T., *Anal. Chem.* 1995, *67*, 3004-3010.
- [32] Matthijs N., Van Hemelryck S., Maftouh M., Luc Massart D., Vander Heyden Y., *Anal. Chim. Acta* 2004, *525*, 247-263.

- [33] Peng X., Bowser M. T., Britz-McKibbin P., Bebault G. M., Morris J. R., Chen D. D. Y., *Electrophoresis* 1997, *18*, 706-716.
- [34] Kranack A. R., Bowser M. T., Britz-McKibbin P., Chen D. D. Y., *Electrophoresis* 1998, *19*, 388-396.
- [35] Dubsky P., Svobodova J., *Gas B., J. Chromatogr. B* 2008, *875*, 30-34.
- [36] Dubsky P., Svobodova J., Tesarova E., *Gas B., Electrophoresis* 2010, *31*, 1435-1441.
- [37] Uselova-Vcelakova K., Zuskova I., *Gas B., Electrophoresis* 2007, *28*, 2145-2152.
- [38] Jiang C., Armstrong D. W., *Electrophoresis* 2010, *31*, 17-27.
- [39] Riekkola M.-L., Joensuu J. A., Smith R. M., *Pure Appl. Chem.* 2004, *76*, 443-451.
- [40] Wang W., Zhou F., Zhao L., Zhang J.-R., Zhu J.-J., *J. Chromatogr. A* 2007, *1170*, 1-8.
- [41] Williams B. A., Vigh G., *Anal. Chem.* 1997, *69*, 4445-4451.
- [42] Xu X., Kok W. T., Poppe H., *J. Chromatogr. A* 1996, *742*, 211-227.
- [43] Hruska V., Svobodova J., Benes M., *Gas B., J. Chromatogr. A* 2012, *1267*, 102-108.
- [44] Benes M., Svobodova J., Hruska V., Dvorak M., Zuskova I., *Gas B., J. Chromatogr. A* 2012, *1267*, 109-115.
- [45] Haarhoff P. C., van der Linde H. J., *Anal. Chem.* 1966, *38*, 573-582.
- [46] Erny G. L., Bergstroem E. T., Goodall D. M., Grieb S., *Anal. Chem.* 2001, *73*, 4862-4872.
- [47] Hruska V., Riesova M., *Gas B., Electrophoresis* 2012, *33*, 923-930.
- [48] *Gas B., Zuska J., Coufal P., van de Goor T., Electrophoresis* 2002, *23*, 3520-3527.
- [49] Mullerova L., Dubsky P., *Gas B., Journal of Chromatography A* 2014, *1330*, 82-88.
- [50] Mofaddel N., Krajian H., Villemin D., Desbene P. L., *Talanta* 2009, *78*, 631-637.
- [51] echmet.natur.cuni.cz [downloaded 25. 5. 2015].

7. Appendices

A List of publications

Publication I

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

L. Müllerová, P. Dubský, B. Gaš

Electrophoresis 2014, *35*, 2688-2700.

Publication II

Separation efficiency of dual-selector systems in capillary electrophoresis

L. Müllerová, P. Dubský, B. Gaš

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

Publication III

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

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

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

Publication IV

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

L. Müllerová, P. Dubský, B. Gaš

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

Publication V

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

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

Electrophoresis 2013, *34*, 768-776.

Publication VI

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

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

Electrophoresis 2015, *36*, 655-661.

B Conference contributions

Oral presentations

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

Posters

2010 – 2014 Seven posters at international conferences.

Others

1. PeakMaster for beginners (workshop)
L. Müllerová, M. Riesová; 10th International Students Conference 'Modern Analytical Chemistry', September 2014, Prague, Czech Republic
2. Computer Optimization of Electrolytes for Capillary Electrophoresis (Pre-Symposium Course)
L. Müllerová, M. Riesová, B. Gaš; ITP & LACE 2014 – 21st International Symposium on Electro- and Liquid Phase-Separation Techniques & 20th Latin-American Symposium on Biotechnology, Biomedical, Biopharmaceutical, and Industrial Applications of Capillary Electrophoresis and Microchip Technology, October 2014, Natal, RN, Brazil

C Curriculum vitae

Name: **Ludmila Müllerová**
Date of birth: 19. 8. 1986
Place of birth: Prague
Address: Mánesova 85, 120 00 Praha 2

Education

- 2011 – Ph.D. study, Physical Chemistry; Charles University in Prague, Faculty of Science; Thesis topic: *Influence of the interacting constituent of the background electrolyte on electrophoretic separation*
- 2009 – 2011 Master of Science, Physical Chemistry; Charles University in Prague, Faculty of Science; Diploma thesis title: *Determination of electrophoretic mobility of alkaline cations in micellar systems*, summa cum laude
- 2006 – 2009 Bachelor of Science, Chemistry; Charles University in Prague, Faculty of Science; Bachelor thesis title: *Ion pairing of some cations in micellar electrophoresis systems*, summa cum laude

International scientific study stays

- April 2014 Neofit Rilski South-West University – Blagoevgrad, Faculty of Natural Sciences, Department of Chemistry, Prof. Tamara Pajpanova
- September 2011 University of Warsaw, Faculty of Chemistry, Department of Inorganic and Analytical Chemistry, Prof. Marek Trojanowicz

Research projects

- 2012 – 2014 *Computer modelling of sharp concentration boundaries in electrophoresis with practical aim to isoelectric focusing and protein fractionation* funded by the Grant Agency of Charles University in Prague, project leader
- 2014 – 2015 *Optimization of chiral separations in capillary zone electrophoresis using computer simulations* funded by the Grant Agency of Charles University in Prague, project leader
- 2009 – 2015 member of research teams of two more projects funded by the Grant Agency of Charles University in Prague, member of research team of one project funded by the Czech Science Foundation

Teaching at the Faculty of Science, Charles University in Prague

- Basic practical course of physical chemistry
- Advanced practical course of physical chemistry (capillary electrophoresis)

Language skills

2013 FCE (Cambridge ESOL examinations), B2