

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA UNIVERZITY KARLOVY
KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE

DIZERTAČNÍ PRÁCE

SEPARACE A CHARAKTERIZACE STEREOIZOMERŮ
FOSFINÁTOVÝCH PSEUDOPEPTIDŮ A SERINU
KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZOU



ÚOCHB AV ČR

ÚSTAV ORGANICKE CHEMIE A BIOCHEMIE
AKADEMIE VED ČESKÉ REPUBLIKY
INSTITUTE OF ORGANIC CHEMISTRY AND BIOCHEMISTRY
ACADEMY OF SCIENCES OF THE CZECH REPUBLIC


Dušan KOVAL

PRAHA 2006

Předkládaná dizertační práce shrnuje výsledky, jež byly získány v letech 2000 – 2006 během mého doktorského studia vykonávaného na Katedře analytické chemie Přírodovědecké fakulty UK v Praze a ve skupině Elektromigračních metod na Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR.

Prohlašuji, že jsem tuto dizertační práci vypracoval samostatně, pod vedením školitelů Doc. RNDr. Ivana Jelínka, CSc. a RNDr. Václava Kašíčky, CSc., a že jsem všechny použité prameny řádně citoval.

V Praze dne 31. května 2006


.....

podpis

Obsah

Předmluva a poděkování	7
Seznam zkratk	9
Seznam symbolů	11
Seznam původních prací	13
1 Úvod	15
2 Kapilární zónová elektroforéza – základní aspekty	16
2.1 Pohyb iontů v elektrickém poli	16
2.1.1 Koncentrační závislost elektroforetických pohyblivostí	17
2.1.1.1 Onsagerův limitní zákon	17
2.1.1.2 Rozšířený Onsagerův model	18
2.1.1.3 Onsagerův-Fuossův model	19
2.2 Elektroosmóza	20
2.3 Disperzní jevy	21
2.3.1 Podélná difúze	21
2.3.2 Teplotní spád	21
2.3.3 Elektromigrační disperze	22
2.3.4 Adsorpce na stěny kapiláry	23
2.3.5 Nerovnoměrný elektroosmotický tok	23
2.3.6 Rozšíření zón v důsledku dávkování a detekce	23
2.3.7 Ostatní zdroje rozmývání zón	24
2.4 Separační účinnost a rozlišení	24
2.5 Stanovování fyzikálněchemických parametrů	26
2.6 Dělení stereoizomerů	28
3 Fosfinátové pseudopeptidy	29
4 Výzkumné cíle	30
5 Výsledky a diskuse	31
5.1 Analýza a charakterizace fosfinátových pseudopeptidů	31
5.1.1 Stanovování acidobazických disociačních konstant	33

5.1.1.1	Měření elektroforetických pohyblivostí	33
5.1.1.1.1	Kontrola teploty	33
5.1.1.1.2	Složení základních elektrolytů	35
5.1.1.1.3	Silně kyselé základní elektrolyty	36
5.1.1.1.4	Základní elektrolyty pro stanovení pK_a	39
5.1.1.1.5	Elektroosmóza a volba kapilár	39
5.1.1.1.6	Separční kapiláry pro analýzu fosfinátových pseudopeptidů.....	40
5.1.1.1.7	Měření pohyblivosti elektroosmotického toku	40
5.1.1.1.8	Koncentrační závislost pohyblivosti	42
5.1.1.1.9	Ověření platnosti Onsagerova modelu	43
5.1.1.2	Vyhodnocovací a výpočetní postupy	48
5.1.2	Stanovení pK_a fosfinátových pseudopeptidů	49
5.2	Separace diastereomerů fosfinátových pseudopeptidů	52
5.3	Stanovení D-serinu kapilární elektroforézou	55
6	Závěry	58
7	Literatura	59
8	Seznam publikací	64

Příloha: Publikace I - VII

Předmluva a poděkování

Dizertační práce je založena na sedmi původních publikacích v recenzovaných časopisech, dílem vyšlých, dílem přijatých do tisku, jejichž plná znění jsou uvedena v příloze. Dosud neotištěné publikace **VI** a **VII** (viz seznam na str. 13) jsou uvedeny ve formě zhuštěného rukopisu a elektronické verze před vytištěním.

Na tomto místě bych rád vzdal hold svým školitelům Václavu Kašičkovi a Ivanu Jelínkovi za úsilí a nasazení vynaložené při vedení mé dizertační práce, stejně jako ostatním členům skupiny Elektromigračních metod na ÚOChB AV ČR – Zdeňku Prusíkovi, Věře Liškové, Petře Sázelové a Veronice Šolínové, kteří spoluutvářeli jedinečnou, přátelskou atmosféru, v níž bylo nadmíru příjemné pracovat.

Jiřímu Jiráčkovi a Michaele Collinsové patří můj dík za syntézu a HPLC analýzy fosfinátových pseudopeptidů a celkově za možnost pracovat s těmito látkami, které se ukázaly být z hlediska kapilární elektroforézy velice zajímavé.

Chtěl bych ocenit spolupráci s Janou Jiráskovou a Kvidem Stříšovským na problematice stanovení D-serinu, neboť toto téma mi pomohlo významným způsobem rozšířit obzory při vývoji kapilárněelektroforetické metody k rutinnímu použití.

Ivě Zuskové bych rád poděkoval za osvětlení potměných zákoutí teorie elektrolytů.

Dále jsem zavázán Heleně Kovalové, Stephanii Weinreich a Jakubu Rohlenovi za jazykové úpravy textu dizertační práce a jejího souhrnu.

Nadevše si cením podpory svých blízkých, především své ženy Andulky, od nichž jsem mohl čerpat povzbuzení a doplňovat svou duševní energii, kdykoli to bylo potřeba.

Seznam zkratek

2-ME	2-merkptoethanol
AU	absorbanční jednotka
BHMT	betain:homocystein S-methyltransferasa
CAPS	kyselina 3-(cyklohexylamino)-1-propansulfonová
CE-MS	propojení kapilární elektroforézy s hmotnostní spektrometrií
CZE	kapilární zónová elektroforéza
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
CHES	kyselina 2-(cyclohexylamino)ethansulfonová
IC ₅₀	koncentrace, při níž je inhibováno 50% aktivity enzymu
ID	vnitřní průměr
LOD	mez detekce
LOQ	mez stanovitelnosti
MES	kyselina 2-(<i>N</i> -morfolino)ethansulfonová
MOPS	kyselina 3-(<i>N</i> -morfolino)propansulfonová
NMDA	<i>N</i> -methyl-D-aspartát
NMR	jaderná magnetická rezonance
OD	vnější průměr
OPA	<i>o</i> -ftaldialdehyd
Polybren	hexadimethrin bromid
Tricin	<i>N</i> -[tris(hydroxymethyl)methyl]glycin
tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
UV	ultrafialový
UV-VIS	ultrafialový-viditelný

Seznam symbolů

γ	aktivitní koeficient
ε	permitivita prostředí [Fm^{-1}]
η	dynamická viskozita [$\text{Pa}\cdot\text{s}$]
ζ	elektrokinetický potenciál, zeta potenciál [V]
κ	specifická elektrická vodivost [Sm^{-1}]
λ	Debyeova délka [m]
σ_r	směrodatná odchylka v prostorové doméně [m]
σ_t	směrodatná odchylka v časové doméně [s]
σ_x^2	střední kvadratická vzdálenost [m^2]
a_i	aktivita
a	hydratovaný iontový průměr [m]
c	látková (molární) koncentrace [$\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$]
D	difúzní koeficient [m^2s^{-1}]
D_{lim}	limitní difúzní koeficient [m^2s^{-1}]
e	elementární náboj ($1,602177\cdot 10^{-19}$ C)
E	intenzita elektrického pole [Vm^{-1}]
F	Faradayova konstanta ($96\,485,34$ Cmol^{-1})
I	iontová síla roztoku elektrolytu [$\text{mol}\cdot\text{m}^{-3}$]
I_{el}	elektrický proud [A]
K_a	kyselá disociační konstanta, konstanta kyselosti
K_a^{mix}	smíšená kyselá disociační konstanta
L_c	celková délka kapiláry [m]
L_{eff}	efektivní délka kapiláry [m]
m	elektroforetická pohyblivost [$\text{m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$]
m_{act}	aktuální iontová pohyblivost [$\text{m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$]
m_{app}	zdánlivá (pozorovaná) elektroforetická pohyblivost
m_{eff}	efektivní elektroforetická pohyblivost [$\text{m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$]
m_{eof}	pohyblivost elektroosmotického toku [$\text{m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$]
m_{lim}	limitní iontová pohyblivost [$\text{m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$]
M_r	relativní molekulová hmotnost
N	počet teoretických pater
N_A	Avogadrova konstanta ($6,022045\cdot 10^{23}$ mol^{-1})
N_{dif}	počet teoretických pater pouze za působení podélné difúze
N_{exp}	experimentálně zjištěný počet teoretických pater
p	hydrodynamický tlak [Pa]
pK_a	záporný dekadický logaritmus kyselé disociační konstanty

q_2	plošná hustota elektrického náboje [Cm^{-2}]
R	molární plynová konstanta ($8,31451 \text{ JK}^{-1}\text{mol}^{-1}$)
r	Stokesův poloměr [m]
R^2	koeficient determinace
R_i	vnitřní poloměr kapiláry [m]
R_{ij}	rozlišení píků
t	čas [s]
T	termodynamická teplota [K]
T_0	okolní teplota [$^{\circ}\text{C}$]
t_{eof}	migrační čas elektroneutrální látky [s]
t_{mig}	migrační čas [s]
U	elektrické napětí [V]
v_{eof}	rychlost elektroosmotického toku [ms^{-1}]
$w_{1/2}$	šířka píku v polovině výšky [s]
x	molární zlomek
z	nábojové číslo iontu

Seznam původních prací

Základem této dizertační práce jsou následující publikace, dále označované římskými číslicemi (I – VII):

- I. **Analysis and characterization of phosphinic pseudopeptides by capillary zone electrophoresis.**
Koval, D., Kašička, V., Jiráček, J., Collinsová, M., Garrow, T. A., *Electrophoresis* 2002, 23, 215-222.
- II. **Determination of dissociation constant of phosphinate group in phosphinic pseudopeptides by capillary zone electrophoresis.**
Koval, D., Kašička, V., Jiráček, J., Collinsová, M., Garrow, T. A., *J. Chromatogr. B* 2002, 770, 145-154.
- III. **Physicochemical characterization of phosphinic pseudopeptides by capillary zone electrophoresis in highly acidic background electrolytes.**
Koval, D., Kašička, V., Jiráček, J., Collinsová, M., *Electrophoresis* 2003, 24, 774-781.
- IV. **Separation of diastereomers of phosphinic pseudopeptides by capillary zone electrophoresis and reverse phase high-performance liquid chromatography.**
Koval, D., Kašička, V., Jiráček, J., Collinsová, M., *J. Sep. Sci.* 2003, 26, 653-660.
- V. **Investigation of the effect of ionic strength of tris-acetate background electrolyte on electrophoretic mobilities of mono-, di-, and trivalent organic anions by capillary electrophoresis.**
Koval, D., Kašička, V., Zusková, I., *Electrophoresis* 2005, 26, 3221-3231.
- VI. **Determination of pK_a values of diastereomers of phosphinic pseudopeptides by capillary zone electrophoresis.**
Koval, D., Kašička, V., Jiráček, J., Collinsová, M., *Electrophoresis* 2006, přijato do tisku.
- VII. **Capillary electrophoresis method for determination of D-serine and its application for monitoring of serine racemase activity.**
Koval, D., Jirásková, J., Stříšovský, K., Konvalinka, J., Kašička, V., *Electrophoresis* 2006, 27, přijato do tisku.

1 Úvod

Kapilární elektroforéza představuje rozvinutou analytickou separační technologii, která sdružuje řadu úžeji vymezených metod, jako jsou kapilární zónová elektroforéza (CZE), kapilární izotachoforéza (CITP), kapilární izoelektrická fokusace (CIEF), micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC) a další. Společným znakem těchto metod je, že využívají kapiláru malého průměru naplněnou roztokem základního elektrolytu k separaci částic vlivem elektrického pole. Spektrum částic analyzovatelných kapilární elektroforézou je kromobyčejně široké – sahá od malých iontů přes středně a vysokomolekulární látky až po buňky a mikroorganismy. Těžiště aplikací představují separace elektricky nabitých částic, avšak některé kapilární elektroseparační metody umožňují analýzu i neutrálních látek.

K vývoji elektroforetických technik v kapilárním měřítku docházelo ve druhé polovině 20. století prostřednictvím prací Hjerténa [1, 2], Everaertse [3], Virtanena [4], Mikkerse [5] a dalších. Počátkem 80. let se začíná používat kapilární zónová elektroforéza, s jejímž vznikem je nejčastěji spojována práce Jorgensona a Lukacsové [6], v podobě používané prakticky dodnes. Separace se v CZE dosahuje na základě rozdílné rychlosti putování iontů roztokem základního elektrolytu vlivem elektrického pole. Analyzované ionty vnesené na vstupní konec kapiláry se díky svým rozdílným elektroforetickým pohyblivostem rozdělí do samostatně putujících zón, které jsou zaznamenávány detektorem nejčastěji umístěným přímo na separační kapiláře či těsně za ní. K nejběžnějším typům detektorů patří UV-VIS absorpční, fluorimetrický, vodivostní, elektrochemický či hmotnostní spektrometr. CZE je obvykle prováděna v křemenných kapilárách vnitřních průměrů 25 – 75 μm a délek 20 – 100 cm. Separací napětí bývá do 30 kV, což odpovídá intenzitě elektrického pole zhruba 200 – 1000 $\text{V}\cdot\text{cm}^{-1}$. Migrační časy analytů se pohybují obvykle do 15 minut. Pro CZE je charakteristická nízká spotřeba vzorku, jelikož obvyklý dávkovaný objem bývá řádově v nanolitrech, a vysoká separační účinnost až stovek tisíc teoretických pater.

Cílem této disertační práce je rozšíření aplikačního pole CZE v oblasti separací stereoisomerů biomolekul a biologicky aktivních sloučenin, v jejichž analýze představuje CZE konkurenceschopnou metodu především díky své vysoké separační účinnosti, rychlosti, variabilitě, nízké spotřebě chemikálií a slučitelnosti se vzorky biologického původu. Druhou studovanou oblastí je použití CZE jako nástroje pro stanovování fyzikálněchemických parametrů látek, převážně pak acidobazických disociačních konstant ($\text{p}K_a$) slabých a středně silných ionizovatelných funkčních skupin v organických sloučeninách.

2 Kapilární zónová elektroforéza – základní aspekty

2.1 Pohyb iontů v elektrickém poli

Na ion i nacházející se ve stejnosměrném elektrickém poli působí síla $F_e = z_i e E$, kde z_i je nábojové číslo iontu, e je elementární náboj a E intenzita elektrického pole. Pohyb iontu je však ve viskózním kapalném prostředí bržděn silou F_s , která je dle Stokesova zákona $F_s = 6\pi r_i \eta v_i$, kde r_i představuje poloměr kulovité částice (tzv. Stokesův poloměr) pohybující se prostředím o dynamické viskozitě η rychlostí v_i . Bezprostředně po vložení elektrického pole se síly F_e a F_s dostanou do rovnováhy a ion se pohybuje konstantní rychlostí v_i , která je úměrná intenzitě elektrického pole E :

$$v_i = m_i E \quad (2.1)$$

kde m_i představuje elektroforetickou pohyblivost (rozměr $\text{m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$), kterou lze vyjádřit z rovnosti sil F_e a F_s vztahem (2.2):

$$m_i = \frac{z_i e}{6\pi \eta r_i} \quad (2.2)$$

Elektroforetická pohyblivost iontu je tedy dána jak jeho vlastními parametry (náboj, velikost) tak vlastnostmi prostředí (viskozita). Jednoduchý vztah (2.2) však plně nevystihuje situaci, neboť elektroforetická pohyblivost iontu, který se během kapilárně elektroforetického experimentu pohybuje v roztoku základního elektrolytu, může být ovlivněna mezimolekulovými interakcemi s iontovými i nenabitými částicemi, jenž základní elektrolyt obsahuje. Dále, předpoklad iontů o kulovitém tvaru je v souladu se skutečností u jednoatomových anorganických iontů, avšak nikoli u iontů organických, mnohdy strukturně složitých biomolekul.

Pro odhad elektroforetických pohyblivostí organických iontů byly vyvíjeny vztahy, které by korelovaly elektroforetickou pohyblivost s dostupnými údaji charakteristickými pro molekulu analytu. Dnes již klasický kvantitativní popis představil Offord [7], který použil jako míru velikosti molekuly relativní molekulovou hmotnost M_r :

$$m_i = k \cdot \frac{z_i e}{M_r^{2/3}} \quad (2.3)$$

kde k znamená konstantu úměrnosti, kterou je zapotřebí stanovit experimentálně. V pozdějších letech byly publikovány další semiempirické modely popisující vztah mezi elektroforetickou pohyblivostí a nábojem a relativní molekulovou hmotností analytu (pro přehled viz [8]), mnohé z nich však byly obměnami vztahu (2.3) a původní Offordův model slouží dodnes, 40 let po svém uvedení, pro rychlý odhad pohyblivostí převážně větších biomolekul.

V textu předkládané disertační práce je používáno několik druhů elektroforetických pohyblivostí m . Limitní elektroforetická pohyblivost m_{lim} představuje pohyblivost iontu v prostředí

o nekonečném zředění (neboli o nulové iontové síle), v němž se neuvažují žádné interakce iontu s okolními částicemi. Aktuální elektroforetická pohyblivost m_{act} má význam pohyblivosti plně nabitého iontu v aktuálním základním elektrolytu. Efektivní elektroforetická pohyblivost elektrolytu m_{eff} v daném základním elektrolytu je definována jako součet aktuálních pohyblivostí všech iontových forem elektrolytu násobených svými molárními zlomky. Zdánlivá (pozorovaná) elektroforetická pohyblivost m_{app} představuje součet efektivní pohyblivosti a pohyblivosti elektroosmotického toku.

V rámci této práce jsou elektroforetické pohyblivosti kationtů uváděny s kladnými znaménky, pohyblivosti aniontů pak se zápornými znaménky.

2.1.1 Koncentrační závislost elektroforetických pohyblivostí

2.1.1.1 Onsagerův limitní zákon

Závislost elektrické vodivosti iontů na koncentraci elektrolytů byla studována dlouho před vznikem elektroforetických metod. Prvním vztahem, který tento jev kvantitativně popisuje, je Onsagerův limitní zákon, neboli Debye-Hückel-Onsagerova rovnice. Byla odvozena na základě představ podobných Debye-Hückelově teorii zaměřené na výpočet aktivitních koeficientů nabitých částic v roztoku [9]. Onsagerův limitní zákon lze po převodu z původních molárních vodivostí na elektroforetické pohyblivosti iontů psát takto:

$$m_{act,i} = m_{lim,i} - \left(m_{lim,i} B_1 |z_i| |z_j| \frac{q}{1 + \sqrt{q}} + |z_i| B_2 \right) \quad (2.4)$$

kde $m_{act,i}$ je aktuální iontová pohyblivost, tj. pohyblivost plně nabitého iontu i v prostředí o iontové síle I , a $m_{lim,i}$ je limitní pohyblivost iontu i , tj. pohyblivost iontu při nekonečném zředění; z_i a z_j jsou nábojová čísla iontu i a jeho protiiontu j .

Konstanty B_1 a B_2 jsou dány takto:

$$B_1 = \frac{\sqrt{2}F^3}{12\pi N_A (\varepsilon RT)^{\frac{3}{2}}} \quad (2.5)$$

$$B_2 = \frac{\sqrt{2}F^2}{6\pi N_A \eta (\varepsilon RT)^{\frac{1}{2}}} \quad (2.6)$$

v nichž F je Faradayova konstanta, N_A je Avogadrova konstanta, ε je permitivita a η je dynamická viskozita roztoku základního elektrolytu. R je molární plynová konstanta a T je termodynamická teplota.

Parametr q v rovnici (2.4) lze vypočítat pomocí nábojových čísel z_i , z_j a limitních pohyblivostí iontů $m_{lim,i}$, $m_{lim,j}$:

$$q = \frac{|z_i||z_j|}{|z_i| + |z_j|} \frac{m_{\text{lim},i} + m_{\text{lim},j}}{|z_i|m_{\text{lim},j} + |z_j|m_{\text{lim},i}} \quad (2.7)$$

Iontová síla je dána součtem:

$$I = \frac{1}{2} \sum_i c_i z_i^2 \quad (2.8)$$

kde c_i a z_i jsou koncentrace a nábojová čísla každého iontu i v roztoku.

V Onsagerově teorii se objevuje iontová síla jakožto zobecněná charakteristika základního elektrolytu. K tomu jsou za příčiny, které způsobují změnu elektroforetické pohyblivosti iontů s iontovou silou, uvažovány výhradně elektroforetický a relaxační jev. Ostatní vlivy, jako například komplexační či asociační rovnováhy, nejsou vzaty v potaz.

2.1.1.2 Rozšířený Onsagerův model

Během odvození limitního Onsagerova zákona byla zavedena některá zjednodušení, jež významně omezují jeho platnost za podmínek běžně se vyskytujících v kapilární zónové elektroforéze. Horní hranice platnosti limitního Onsagerova zákona, která se projevuje jako lineární závislost aktuální iontové pohyblivosti na odmocnině iontové síly (\sqrt{I}), je udávána do 1 mM. Nicméně iontové síly základních elektrolytů používaných v kapilární elektroforéze se běžně pohybují v rozmezí 10 – 100 mM. Navíc jsou ionty považovány za bodové náboje, což rovněž věrně nevykresluje skutečné poměry.

Zavedení parametru zohledňujícího skutečnou velikost iontů bylo uskutečněno obdobně jako v rozšířené Debye-Hückelově teorii v Onsagerově rovnici (2.9):

$$m_{\text{act},i} = m_{\text{lim},i} - \left(m_{\text{lim},i} B_1 |z_i||z_j| \frac{q}{1 + \sqrt{q}} + |z_i| B_2 \right) \frac{\sqrt{I}}{1 + Ba\sqrt{I}} \quad (2.9)$$

kde a je hydratovaný iontový průměr a konstanta B je dána následovně:

$$B = \frac{\sqrt{2}F}{(\epsilon RT)^{1/2}} \quad (2.10)$$

Ostatní symboly jsou v souladu s rovnicí (2.4). Konstanty B_1 , B_2 a B dané vztahy (2.5), (2.6) a (2.10) nabývají ve vodném prostředí o teplotě 25°C těchto hodnot: $B_1 = 0,7853 \text{ dm}^{3/2} \text{ mol}^{-1/2}$; $B_2 = 31,42 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ dm}^{3/2} \text{ mol}^{-1/2}$; $B = 3,291 \cdot 10^9 \text{ m}^{-1} \text{ dm}^{3/2} \text{ mol}^{-1/2}$.

Podoba rovnice (2.9) je v podstatě shodná se vztahem navrženým Robinsonem a Stokesem [10] a s modelem, který představil Lucy a kol. [11], založeným na Pittsově teorii [12]. Rozsah platnosti Onsagerovy rovnice byl rozšířen do zhruba 75 mM iontové síly [13]. Hydratovaný iontový průměr a je však dostupný jen pro úzkou skupinu běžných iontů a tak se při výpočtech používají přibližné hodnoty součinu Ba v hodnotách 1,5; 1,65 nebo 2,4. Onsagerův rozšířený model navíc předpokládá kulovitý tvar iontů s vysokou nábojovou

hustotou, což pro obvykle analyzované organické ionty o rozličné nábojové hustotě opět plně neodráží skutečnost.

2.1.1.3 Onsagerův-Fuossův model

Onsagerův model byl navržen pro popis závislosti elektrické vodivosti silných elektrolytů v binární směsi aniontu a kationtu. V kapilární elektroforéze je však obvyklé, že analyzovaný ion migrující základním elektrolytem je obklopen několika jinými ionty. Oproti tomu je v Onsagerově modelu do výpočtu zahrnut jen protiion analytu. Obecnější přístup představuje model navržený Onsagerem a Fuossem [14], kteří přinesli vylepšený popis vlivu relaxačního jevu na vodivost, potažmo elektroforetickou pohyblivost, iontu ve směsi několika dalších:

$$m_{act,j} = m_{lim,j} - \left(m_{lim,j} B_1 z_j \sum_{n=0}^{\infty} C_n R_j^{(n)} + |z_j| B_2 \right) \frac{\sqrt{I}}{1 + Ba\sqrt{I}} \quad (2.11)$$

Symbody v rovnici (2.11) jsou formálně shodné s rovnicí (2.9), koeficienty C_n jsou dány vztahem (2.12), vektory $R_j^{(n)}$ rekurentním vzorcem (2.13):

$$c_0 = \frac{1}{2}(2 - \sqrt{2}); c_n = -\frac{\sqrt{2}}{2} \left(\frac{1}{2} \right)^n \text{ pro } n \geq 1 \quad (2.12)$$

$$R_j^{(n)} = \sum_i (2H - I)_{ji} R_i^{(n-1)} \quad (2.13)$$

kde H je matice, jejíž prvky jsou dány vztahem (2.15), a I je jednotková matice. Výchozí prvek vektoru $R_j^{(n)}$ se získá podle vztahu (2.14):

$$R_j^{(0)} = z_j - \frac{\sum_i z_i \mu_i}{\sum_i \left| \frac{z_i}{m_{lim,i}} \right| \mu_i} \left| \frac{z_j}{m_{lim,j}} \right| \quad (2.14)$$

kde z_j je nábojové číslo studovaného iontu, z_i jsou nábojová čísla všech iontů v roztoku, μ_i je podíl i -tého iontu na iontové síle roztoku ($\mu_i = c_i z_i^2 / \sum_i c_i z_i^2$). Pro symetrické elektrolyty platí, že $\sum_i c_i z_i^2 = 0$, čímž vymizí druhý člen ve výrazu (2.14). Prvky matice H se získají pomocí vztahu (2.15):

$$h_{ji} = \delta_{ji} \sum_l \mu_l \omega_{lj} + \mu_l \omega_{lj} \quad (2.15)$$

kde δ_{ji} je Kroneckerův symbol a $\omega_j = \frac{m_{lim,j}}{m_{lim,j} + m_{lim,i}}$ o vlastnostech $\omega_{ij} = 1 - \omega_{ji}$ a $\omega_{ii} = \frac{1}{2}$.

2.2 Elektroosmóza

Elektroosmóza je obecný jev příznačný pro systém dvou fází sestávající z nepohyblivé pevné a pohyblivé kapalně fáze, mezi nimiž je utvořena elektrická dvojvrstva [15, 16]. Po přiložení elektrického pole ve směru rovnoběžném s hranicí mezi pevnou a kapalnou fází se fáze začnou vůči sobě pohybovat rychlostí v_{eof} . V případě kapilární elektroforézy znamená elektroosmóza tok celého objemu roztoku základního elektrolytu separační kapilárou. Utvoření elektrické dvojvrstvy na rozhraní stěny kapiláry a roztoku základního elektrolytu je podmíněno ukotvením elektrického náboje na stěnu kapiláry. Toho lze v praxi dosáhnout adsorpcí nabitých částic a/nebo ionizací kyselých či zásaditých funkčních skupin přítomných na vnitřním povrchu kapiláry. Druhý uvedený případ je obvyklý pro v kapilární elektroforéze často užívané neupravované křemenné kapiláry, jejichž povrch obsahuje silanolové skupiny utvořené hydrolytickým narušením křemenného povrchu. Silanolové skupiny mají slabě kyselý charakter, tudíž při použití kyselých základních elektrolytů setrvávají tyto skupiny převážně v nenabité protonované formě a rychlost elektroosmotického toku bývá nízká. Se zvyšováním pH základního elektrolytu dochází v oblasti pH zhruba 4,5 – 5,5 k výraznému nárůstu podílu záporně nabitých disociovaných silanolových skupin a tím i k nárůstu elektroosmózy, která pak v alkalickém prostředí již dramaticky neroste.

Podobně jako migrace iontů je elektroosmotický tok charakterizován elektroosmotickou pohyblivostí m_{eof} , která je dána Helmholtzovou-Smoluchowskiho rovnicí (2.16):

$$m_{eof} = \frac{v_{eof}}{E} = -\frac{\epsilon\zeta}{\eta} \quad (2.16)$$

kde ζ je elektrokinetický neboli zeta potenciál mající význam elektrického potenciálu v rovině stříhu elektrické dvojvrstvy popsané tzv. Sternovým modelem [17]. Na podkladě zjednodušeného modelu elektrické dvojvrstvy lze pro elektrokinetický potenciál odvodit vztah (2.17) [15]:

$$\zeta = \frac{-\lambda q_2}{\epsilon} \quad (2.17)$$

v němž q_2 představuje plošnou hustotu elektrického náboje na povrchu pevné fáze a tloušťka dvojvrstvy je vyjádřena tzv. Debyeovou délkou λ z Debye-Hückelovy teorie [9]:

$$\lambda = \sqrt{\frac{\epsilon RT}{F^2 \sum_i c_i z_i^2}} \quad (2.18)$$

kde R je molární plynová konstanta, T je termodynamická teplota, F je Faradayova konstanta, c_i je molární koncentrace iontu i v celém objemu roztoku elektrolytu a z_i je nábojové číslo iontu i .

Podstatnou vlastností elektroosmotického toku v kapiláře je téměř rovný rychlostní profil (plug-like profile) v celém průřezu kapiláry, což má za následek minimální příspěvek

elektroosmózy na rozmytí zóny analytu, narozdíl od hydrodynamického toku o parabolickém rychlostním profilu.

Pro kapilárně-elektroforetický experiment představuje elektroosmóza neselektivní jev, který významně ovlivňuje migrační časy a rozlišení analytů a tím i účinnost separace. Vzhledem k širokému spektru látek analyzovaných kapilární elektroforézou neexistuje univerzální „optimální“ hodnota rychlosti elektroosmózy, nýbrž je třeba velikost a směr elektroosmotického toku upravit v závislosti na náboji a rozdílu pohyblivostí analyzovaných látek [18-20].

2.3 Disperzní jevy

Rozmývání a deformace migrující zóny vzorku je z hlediska separace nepříznivý jev, který snižuje citlivost a separační účinnost metody. Konečná šířka a tvar migrující zóny je výslednicí působení mnoha disperzních jevů, které jsou stručně popsány v následujících odstavcích. Pro podrobnější informace odkazují čtenáře na literaturu [21-25].

2.3.1 Podélná difúze

Podélná difúze je nevyhnutelným zdrojem rozšíření migrující zóny analytu v důsledku koncentračního spádu [26]. Ionty nacházející se v nejvyšší koncentraci ve středu migrující zóny mají snahu přesunovat se Brownovým pohybem do oblastí o nižší koncentraci. Střední kvadratická vzdálenost σ_x^2 , kterou ion vlivem difúze urazí za dobu t , popisuje Einsteinova-Smoluchowskiho rovnice (2.19):

$$\sigma_x^2 = 2D_i t \quad (2.19)$$

kde D_i je difúzní koeficient iontu i . V roztocích o nekonečném zředění lze vztáhnout limitní elektroforetickou pohyblivost $m_{lim,i}$ s difúzním koeficientem $D_{lim,i}$ pomocí Nernstova-Einsteinova vztahu (2.20).

$$D_{lim,i} = \frac{m_{lim,i} RT}{z_i F} \quad (2.20)$$

Z rovnic (2.19) a (2.20), přes jejich omezenou platnost v reálných roztocích, vyplývá, že podélnou difúzi nelze během elektroforetického experimentu potlačit, neboť snaha o omezení difúzního koeficientu, například zvýšením viskozity základního elektrolytu, vede zároveň ke snížení elektroforetické pohyblivosti iontu a tím i k prodloužení migračního času. V praxi tedy omezení difúze znamená zkrátit dobu analýzy kupříkladu vyšším separačním napětím či rychlejším elektroosmotickým tokem.

2.3.2 Teplotní spád

Působením elektrického pole se ionty základního elektrolytu a analytu pohybují vůči molekulám rozpouštědla, dochází k jejich srážkám a uvolňuje se energie ve formě tepla.

Z makroskopického hlediska můžeme na separační kapiláru naplněnou základním elektrolytem nahlížet jako na elektrický odpor, kterým po připojení stejnosměrného elektrického pole protéká elektrický proud a uvolňuje se přitom tzv. Jouleovo teplo. V důsledku toho se zvyšuje teplota základního elektrolytu, což však z hlediska rozmývání migrující zóny podélnou difúzí není kritické. Mnohem závažnější je skutečnost, že v kapiláře vzniká příčný i podélný [27, 28] teplotní spád. Zatímco Jouleovo teplo se uvolňuje přibližně rovnoměrně v celém průřezu kapiláry, odvod tepla do okolí se uskutečňuje pouze jejími stěnami. Ve středu kapiláry je tudíž vyšší teplota než při stěnách a to vinou klesající viskozity rozpouštědla základního elektrolytu se vzrůstající teplotou vede k místním rozdílům v pohyblivostech iontu (viz rovnice (2.2)) a tím i k rozmytí migrující zóny [16].

Způsobů, jak omezit tvorbu a zlepšit odvod Jouleova tepla, je několik. Účinným konstrukčním prvkem přístrojů je zařazení nuceného chlazení kapiláry, z experimentálního hlediska jsou výhodné nízkovodivé základní elektrolyty, nízká koncentrace (iontová síla) roztoků elektrolytů, nižší intenzita napětí a menší průřez kapiláry. Mnohé z vyjmenovaných způsobů však záporně ovlivňují jiné parametry separace (rychlost, účinnost) a je proto nutné uvážlivě volit podmínky, aby vedly ke splnění cíle separace.

2.3.3 Elektromigrační disperze

Elektromigrační disperze je jev způsobující deformaci migrující zóny analytu v důsledku nelineární podstaty elektromigračních dějů. K elektromigrační disperzi dochází tehdy, podílí-li se ionty analytu významně na celkové elektrické vodivosti v místě zóny analytu. Pro elektromigrační disperzi je výstižný trojúhelníkový tvar piků.

Pro silné elektrolyty platí v jednoduchých základních elektrolytech s jedním koiontem (tj. iontem základního elektrolytu o shodném znaménku s ionty vzorku) v tzv. bezpečné pH oblasti (tj. v pH, při níž jsou koncentrace H^+ a OH^- iontů zanedbatelné oproti koncentracím složek základního elektrolytu) pravidlo vztahující tvar píku s vlastnostmi analytu a základního elektrolytu. Je-li aktuální elektroforetická pohyblivost analytu vyšší než efektivní pohyblivost příslušného koiontu ze základního elektrolytu, je výsledkem pik s rozmytým čelem (fronting peak). Je-li naopak aktuální pohyblivost analytu nižší než příslušného koiontu, projeví se elektromigrační disperze chvostováním píku (tailing peak). A konečně, jsou-li pohyblivosti analytu a jeho koiontu shodné, elektromigrační disperze se neprojeví [29, 30].

V případě slabých elektrolytů je situace složitější a pro posouzení elektromigrační disperze je doporučené vhodné využít počítačové simulační programy jako například Peakmaster vytvořený ve skupině B. Gaše [31, 32].

Dalším jevem plynoucím z teorie elektromigračních dějů jsou tzv. systémové zóny [33]. Jedná se o poruchy v základním elektrolytu, které se mohou projevit jako píky v elektroforegramu, avšak které neodpovídají žádnému analyzovanému iontu. Příčinou vzniku systémových zón je vnesení nepravidelnosti do složení jinak stejnorodého základního elektrolytu, obvykle v podobě nadávkování zóny vzorku. Ačkoli lze vyslovit několik empirických

pravidel k předpovědím počtu a pohyblivosti systémových zón, je pro jejich podrobné prověření nejlepší, stejně jako v případě elektromigrační disperze, využít programu Peakmaster.

2.3.4 Adsorpce na stěny kapiláry

Adsorpce analytu na stěnu kapiláry je v kapilární elektroforéze poměrně častá a představuje jeden z hlavních problémů při analýze vysokomolekulárních látek [34, 35]. Nespecifické interakce vnášejí do elektroforetického procesu nežádoucí disperzní jevy, které se projevují podle rovnovážných a kinetických poměrů adsorpčních a desorpčních jevů různou deformací zóny analytu [36, 37]. V krajním případě, za vysoké afinity analytu ke stěnám kapiláry a nízké rychlosti desorpce, může být analyzovaná látka plně zachycena na stěně kapiláry a nemusí doputovat k detektoru. Obvyklými případy jsou adsorpce kationtů na záporně nabitý povrch křemenné kapiláry v neutrálním a zásaditém prostředí či adsorpce proteinů v křemenných kapilárách vlivem vodíkových vazeb a elektrostatického působení. Ke způsobům, jak omezit vliv adsorpce, patří pokrytí stěny kapiláry vhodným, nejčastěji polymerním materiálem, což lze učinit jak chemickým navázáním tak fyzikální adsorpcí [18-20].

2.3.5 Nerovnoměrný elektroosmotický tok

Nerovnoměrný elektroosmotický tok podél kapiláry je dalším přídavným zdrojem rozšíření elektroforetických zón. Vyskytnou-li se podél kapiláry úseky s různou hodnotou elektrokinetického potenciálu ζ , a tedy s místně rozdílně rychlým elektroosmotickým tokem (viz rovnice (2.16)), dochází na rozhraní takových úseků k vířivým tokům, které způsobují rozmytí elektroforetických zón. Nerovnoměrný elektrokinetický potenciál vzniká buď porušením pokrytí či adsorpcí nabitých částic na vnitřní povrch kapiláry [38, 39], nejčastěji však v důsledku podélných rozdílů v teplotě roztoku uvnitř kapiláry [27, 28]. V běžných elektroforetických přístrojích nebývá zajištěn stejnoměrný odvod Jouleova tepla, jelikož část kapiláry sice bývá chlazená, avšak nezanedbatelná část kapiláry bývá ponořená do roztoku základního elektrolytu, prochází těsněními, upevňovacími prvky a detektorem. A poněvadž veličiny určující elektroosmotickou pohyblivost ve vztahu (2.16), zvláště pak viskozita, jsou závislé na teplotě, vzniká nerovnoměrný elektroosmotický tok a tím i dodatečné rozšíření migrujících zón.

2.3.6 Rozšíření zón v důsledku dávkování a detekce

Příspěvky k rozšíření zóny analytu v důsledku nenulového objemu dávkované zóny a detekční cely se často nazývají mimokapilárními po vzoru chromatografického názvosloví, neboť tyto jevy jsou odlučitelné od samotné separace. Vyšší dávkované objemy a vyšší vlastní objem detekční komůrky vedou k vyšší disperzi zóny analytu. U detekce je navíc potřeba uvažovat vliv rychlosti odezvy detektoru, četnost sběru dat a úroveň filtrace dat.

Zatímco příspěvek detekce k rozmytí zón je plně poplatný konstrukci detektoru, dávkování se v kapilární elektroforéze obvykle uskutečňuje na vstupu separační kapiláry bez zařazení zvláštního dávkovacího zařízení. Nejběžnějším způsobem dávkování v kapilární

zónové elektroforéze je tzv. hydrodynamické dávkování, kdy je roztok analytu vpravován do kapiláry tlakovým rozdílem na obou koncích kapiláry. Dávkovaná zóna však není pravoúhlá, nýbrž je poněkud deformována vinou hydrodynamického toku během dávkování. Pravoúhlému profilu dávkované zóny, jaký se předpokládá např. u dávkovacích ventilů v HPLC, se v kapilární elektroforéze blíží tzv. elektrokinetické dávkování, při němž se vstupní konec kapiláry ponoří do roztoku vzorku a po připojení stejnosměrného napětí se ionty dostávají na vstupní konec kapiláry díky vlastní migraci a elektroosmóze.

V kapilární elektroforéze má dávkování spolu s počáteční fází elektroforetické separace významný vliv jak na účinnost, tak na citlivost metody. Podle toho, jaká jsou složení vzorku a základního elektrolytu, lze docílit zaostření analyzovaných iontů do užší zóny, než byla původně nadávkovaná (tzv. stacking), nebo naopak rozostření (tzv. destacking), které je z hlediska vysoké účinnosti a citlivosti nežádoucí. V průběhu doby bylo vyvinuto několik postupů použitelných pro zakoncentrování rozličných typů iontů ve vzorcích různého původu, které spolu s citlivou detekcí nabízejí možnosti ke stopové analýze pomocí kapilární elektroforézy [40-42].

2.3.7 Ostatní zdroje rozmývání zón

Dalším zdrojem rozmytí elektroforetických zón může být přítomnost dodatečného hydrodynamického toku v kapiláře [43], jenž obvykle vzniká při rozdílných výškách hladin roztoků v elektrodových nádobkách [44] nebo při použití CE-MS rozhraní [45].

Šířka zóny analytu může být rovněž zvýšená, jsou-li konce kapiláry rozřepené či jinak nepravidelné, čemuž lze předejít přesným a ostrým seřezáváním konců kapilár [46].

V minulosti často diskutovaným jevem byl příspěvek k rozšíření zón v důsledku ohybu separační kapiláry. Vyskytují-li se na kapiláře ohyby či smyčky, vznikají rozdíly ve vzdálenosti, kterou musí analyt urazit, a též vzniká nerovnoměrná intenzita elektrického pole v místech ohybu [47, 48]. Tento disperzní jev se však výrazněji uplatňuje pouze pro velmi malé poloměry křivosti kapiláry, které se v běžných kapilárně elektroforetických přístrojích nevyskytují.

2.4 Separační účinnost a rozlišení

Účinnost elektroforetické separace lze popsat jako míru rozšíření migrující zóny iontu během jejího putování k místu detekce. Obdobně jako v chromatografii se účinnost dělení pro látku i popisuje počtem teoretických pater N_i :

$$N_i = \frac{L_{\text{eff}}^2}{\sigma_{l,i}^2} = \frac{t_{\text{mig},i}^2}{\sigma_{t,i}^2} \quad (2.21)$$

kde L_{eff} je migrační vzdálenost (tj. efektivní délka kapiláry), $t_{\text{mig},i}$ je migrační čas analyzované látky i a $\sigma_{l,i}$ a $\sigma_{t,i}$ jsou směrodatné odchylky koncentračního gaussovského profilu v délkových, respektive časových jednotkách. Do počtu teoretických pater se promítají všechny rozmývací vlivy, jak byly popsány v kapitole 2.3. V praxi se počet teoretických pater stanovuje kupříkladu ze vztahu (2.22):

$$N_{\text{exp},i} = 5,54 \left(\frac{t_{\text{mig},i}}{w_{1/2,i}} \right)^2 \quad (2.22)$$

kde $w_{1/2,i}$ představuje šířku píky v jeho poloviční výšce. Vztah (2.22) platí přesně pouze pro symetrické gaussovské píky. Pro píky, jež nespĺňujú tyto požadavky, má rovnice (2.22) pouze přibližnou platnost.

Pro zjednodušený případ, kdy se z disperzních vlivů uvažuje pouze podélná difúze a za podmínky nulového elektroosmotického toku, je možno vyjádřit počet teoretických pater $N_{\text{dif},i}$ na základě Einsteinovy-Smoluchowskiho rovnice (2.19) takto:

$$N_{\text{dif},i} = \frac{m_{\text{eff},i} UL_{\text{eff}}}{2D_i L_c} \quad (2.23)$$

kde U je separační napětí a L_c je celková délka kapiláry. Difúzní koeficient D_i lze vyjádřit z Nernstovy-Einsteinovy rovnice (2.20), která však má limitní charakter a je platná pouze v roztocích o nekonečném zředění. Za předpokladu nevysokých nábojových čísel a iontové síly základního elektrolytu lze odvodit přibližný vztah (2.24):

$$N_{\text{dif},i} = \frac{z_i F U L_{\text{eff}}}{2 R T L_c} \quad (2.24)$$

v němž z_i je nábojové číslo analyzovaného iontu.

Vyčíslením konstant v rovnici (2.24) se pro teplotu 25°C získá přibližný výraz (2.25):

$$N_{\text{dif},i} \approx 20 z_i U \frac{L_{\text{eff}}}{L_c} \quad (2.25)$$

Rovnice (2.25) vede k obecným závěrům, že vysokých účinností se dosáhne použitím vysokého napětí, neboť analýza se urychlí a omezí se vliv difúze. Dále, počet teoretických pater roste s nábojovým číslem analytu, což vysvětluje vysokou účinnost kapilární elektroforézy při analýzách velkých biomolekul, jako jsou proteiny nebo části DNA.

Pro úspěšné rozdělení více iontů je kromě dostatečné účinnosti nutná též selektivita. Míra rozdělení dvou iontů i a j se vyjadřuje prostřednictvím rozlišení R_{ij} :

$$R_{ij} = \frac{t_{\text{mig},j} - t_{\text{mig},i}}{2(\sigma_{t,i} + \sigma_{t,j})} \quad (2.26)$$

Dvě maxima jsou patrná, pokud je $R_{ij} > 0,5$, a píky o shodné ploše jsou považovány za zcela oddělené při $R_{ij} > 1,5$. V kapilární elektroforéze se pro rozlišení uvádí vztah (2.27):

$$R_{ij} = \frac{1}{4} \frac{\Delta m_{\text{eff}}}{m_{\text{eff}}} \sqrt{N} \quad (2.27)$$

v němž $\Delta m_{\text{eff}} = m_{\text{eff},i} - m_{\text{eff},j}$ je rozdíl efektivních pohyblivostí iontů i a j , $\overline{m_{\text{eff}}}$ a \overline{N} jsou aritmetické průměry efektivních pohyblivostí a účinností píků iontů i a j . Rovnice (2.27) praví, že

zvýšení účinnosti \bar{N} např. zvýšením separačního napětí nemá odpovídající odezvu ve zvýšení rozlišení. Naopak, pro vylepšení rozdělení je vhodnější zaměřit se na optimalizaci selektivního členu $\Delta m_{eff} / (\overline{m_{eff}} + m_{eof})$ [49].

2.5 Stanovování fyzikálněchemických parametrů

Kapilární zónová elektroforéza může sloužit kromě kvalitativní a kvantitativní analýzy ionogenních látek též jako nástroj pro stanovování jejich fyzikálněchemických parametrů. Způsoby, jak stanovit fyzikálněchemické vlastnosti jednotlivých látek či dějů, jsou v zásadě dva: buďto se stanovované veličiny počítají z rychlosti pohybu při elektroforetickém pokusu (např. elektroforetické pohyblivosti, difúzní koeficienty, izoelektrické body, relativní molekulové hmotnosti, Stokesovy poloměry, asociační a disociační konstanty), nebo se vyhodnocují koncentrace analytů (např. při studiu reakčních kinetik či rovnováh).

Základní veličinou pro posouzení migračních vlastností látek je elektroforetická pohyblivost. Její stanovování, ať již ve formě limitní či aktuální iontové pohyblivosti, bylo prováděno pomocí kapilární izotachoforézy, první elektromigrační metody prováděné v kapilárním formátu. Rozsah prací T. Hirokawy a kol., v nichž publikovali limitní elektroforetické pohyblivosti několika stovek iontů [50-54], zůstává dodnes nenapodoben. Přesto byla publikována řada prací zaměřená na stanovování elektroforetických pohyblivostí z kapilárněelektroforetických měření ať již v obvyklém vodném prostředí [11, 55, 56], v nevodných rozpouštědlech [57, 58] či ve směsných vodno-organických systémech [59, 60].

Z nejvýznamnějších a nejrozšířenějších je využití kapilární elektroforézy ke stanovování acidobazických disociačních konstant pK_a slabých či středně silných kyselin a zásad. Využívá se závislosti efektivních pohyblivostí slabých elektrolytů na pH , jak je ukázáno na jednoduchém případě níže.

Mějme slabou jednosytnou kyselinu HA, která podléhá disociaci podle rovnice (2.28):



Pro zjednodušení zápisu nebyla uvažována tvorba oxoniového kationtu ve vodném prostředí či obecně lyoniového iontu.

Disociaci kyseliny HA je možno popsat disociační konstantou (konstantou kyselosti) K_a podle následujícího vztahu:

$$K_a = \frac{a_{H^+} a_{A^-}}{a_{HA}} \quad (2.29)$$

kde a_i jsou aktivity zúčastněných částic, které lze nahradit součinem jejich molární koncentrace c_i a aktivitního koeficientu γ_i :

$$K_a = \frac{a_{H^+} c_{A^-} \gamma_{A^-}}{c_{HA} \gamma_{HA}} \quad (2.30)$$

Aktivní koeficienty iontů γ se dají vypočítat z Debye-Hückelovy teorie [9]. Z praktického hlediska je výhodné zavést tzv. smíšenou disociační konstantu K_a^{mix} [55]:

$$K_a^{mix} = \frac{a_{H^+} c_{A^-}}{c_{HA}} \quad (2.31)$$

V rovnici (2.31) vystupující aktivita vodíkových kationtů, a_{H^+} je přímo měřitelné pH základního elektrolytu ($pH = -\log a_{H^+}$) a poměr koncentrací c_{A^-}/c_{HA} lze získat z elektroforetického měření.

Efektivní pohyblivost slabého elektrolytu i , $m_{eff,i}$, je dána součtem iontových pohyblivostí, m_j , všech forem elektrolytu i vážených jejich molárním zlomkem x_j :

$$m_{eff,i} = \sum_j m_j x_j \quad (2.32)$$

$$x_j = \frac{c_j}{\sum_j c_j} \quad (2.33)$$

kde c_j jsou molární koncentrace částic vystupujících v disociačních rovnováhách elektrolytu i .

Pro případ jednosytné kyseliny HA je efektivní elektroforetická pohyblivost $m_{eff,HA}$ dána výrazem (2.34):

$$m_{eff,HA} = \frac{m_{A^-} c_{A^-}}{c_{A^-} + c_{HA}} \quad (2.34)$$

Sjednocením rovnic (2.31) a (2.34) dostaneme výraz (2.35):

$$m_{eff,HA} = \frac{m_{A^-} 10^{pH - pK_a^{mix}}}{10^{pH - pK_a^{mix}} + 1} \quad (2.35)$$

který přináší vztah měřitelných veličin $m_{eff,HA}$ a pH a parametrů m_{A^-} a K_a^{mix} . V podstatě tedy pro stanovení smíšené disociační konstanty K_a^{mix} stačí znalost efektivních pohyblivostí $m_{eff,HA}$ při dvou různých hodnotách pH , jak bylo předvedeno v průkopnické práci Beckerse a kol. [61]. Mnohem větší statistickou váhu má ale postup, kdy se efektivní pohyblivosti měří v několika různých hodnotách pH a směsné disociační konstanty a iontové pohyblivosti se získají z regresní analýzy buď podle dnes již zastaralých linearizovaných forem vztahu (2.35) či rovnou nelineárního modelu (2.35). Smíšená disociační konstanta K_a^{mix} se nakonec přečte na termodynamickou disociační konstantu K_a ve smyslu vztahů (2.30) a (2.31).

Při volbě experimentálních podmínek je radno pamatovat na některé předpoklady a omezení plynoucí z obecného postupu, jenž byl popsán v rovnicích (2.28) - (2.35). Předně, koncentrace zkoumaného slabého elektrolytu a složení a koncentrace základního elektrolytu musí být takové, aby nadávkovaný vzorek významně neovlivnil pH , iontovou sílu a vodivost ve své elektroforetické zóně. Z hlediska co nejjednoduššího výpočetního postupu je výhodné, aby

základní elektrolyty v celém měřeném rozsahu pH měly konstantní iontovou sílu. Konečně, je zapotřebí zajistit, aby elektroforetické experimenty při stanovování pK_a byly prováděny při konstantní a známé teplotě, jelikož jak pohyblivosti, tak disociační konstanty složek základního elektrolytu i měřené látky jsou na teplotě závislé.

2.6 Dělení stereoizomerů

Stereoizomery představují druh izomerních molekul, které se vyznačují shodným molekulovým vzorcem, avšak liší se prostorovým uspořádáním svých atomů. Pro předkládanou disertační práci mají význam dva druhy stereoizomerů – enantiomery a diastereomery. Pro soubor látek vyskytujících se v této práci platí, že dvojice stereoizomerů jsou enantiomery, pokud si jsou jejich molekuly zrcadlovým obrazem, neboli pokud se liší v konfiguraci na všech chirálních centrech. Diastereomery naproti tomu nesplňují podmínku zrcadlového obrazu a jsou to takové stereoizomery, jež se liší v prostorovém uspořádání alespoň na jednom, avšak nikoli na všech chirálních centrech.

Z hlediska kapilární zónové elektroforézy není možné enantiomery rozdělit ve volném (achirálním) roztoku, neboť se neliší v takových vlastnostech, které by se projevíly v rozdílné elektroforetické pohyblivosti. Diastereomery se naopak mohou lišit ve vlastnostech, jako jsou hydrodynamický poloměr, disociační konstanty (pK_a), lipofilita apod., a lze je tedy v zásadě v achirálním prostředí rozdělit.

Enantiomery se separují buď tzv. přímou metodou, kdy se využívá rozdílných stereospecifických interakcí v chirálním prostředí, které je tvořeno tzv. chirálním selektorem. V kapilární elektroforéze se jako chirální selektory nejčastěji uplatňují cyklodextriny, dále chirální crown ethery, glykopeptidická makrocyclická antibiotika a další.

Druhým způsobem separace enantiomerů je tzv. nepřímá metoda, při níž se enantiomery nechají zreagovat s opticky čistým činidlem a utvořené diastereomery se dělí v achirálním prostředí. Příkladem je tzv. Marfeyho činidlo (1-fluoro-2,4-dinitrofenyl-5-L-alaninamid) používané pro chirální analýzu aminokyselin [62].

Problematika stereoselektivní analýzy elektromigračními technikami je podrobně zpracována například v knize [63] či přehledných článcích [64-68].

3 Fosfinátové pseudopeptidy

Fosfinátové pseudopeptidy představují třídu peptidových isosterů, v nichž je jedna peptidová vazba nahrazena fosfinátovými motivy $-P(O)OH-CH_2-$ nebo $-P(O)OH-$, které jsou odolné vůči enzymatické hydrolýze. Bylo zjištěno, že tento druh látek je schopen působit jako inhibitor přinejmenším dvou tříd proteolytických enzymů – zinkových metaloproteinás a aspartátových proteinás [69]. Fosfinátové pseudopeptidy byly v minulých letech intenzivně studovány ve skupině Dr. Jiráčka na ÚOChB AV ČR. Kombinatoriálním přístupem bylo zjištěno, že fosfinátové pseudotetrapeptidy vzorce $Ac-X_{aa}-DL-Ala-\psi[P(O)OH-CH_2]-DL-Leu-X_{aa}'-NH_2$, v němž X_{aa} a X_{aa}' jsou zbytky proteinogenních aminokyselin, jsou selektivními ligandy enzymu betain:homocystein S-methyltransferasy (BHMT). Následné studium ukázalo, že nejúčinnějšími ligandy jsou knihovny pseudopeptidů, v nichž X_{aa} je zbytek valinu. V dalším kroku bylo syntetizováno 20 derivátů o struktuře $Ac-Val-DL-Ala-\psi[P(O)OH-CH_2]-DL-Leu-X_{aa}'-NH_2$, z nichž testy označily za nejsilnější inhibitor pseudopeptid obsahující v pozici X_{aa}' zbytek histidinu. Struktura $Ac-Val-DL-Ala-\psi[P(O)OH-CH_2]-DL-Leu-His-NH_2$ (VH) pak posloužila jako výchozí bod pro racionální vývoj inhibitorů BHMT, jehož výsledkem byl nový inhibitor o struktuře $Val-DL-Phe-\psi[P(O)OH-CH_2]-DL-Leu-His-NH_2$ (N-VH-A) s IC_{50} přibližně $1 \mu M$ [70].

4 Výzkumné cíle

Obecným cílem této disertační práce bylo prozkoumat možnosti využití kapilární zónové elektroforézy pro analýzu, separaci a fyzikálněchemickou charakterizaci biologicky aktivních sloučenin, zejména peptidových mimetik. V oblasti fyzikálně chemické charakterizace látek bylo zamýšleno vypracovat ucelenou metodu pro stanovení pK_a slabých elektrolytů s důrazem na rozšíření intervalu stanovovaných pK_a především směrem do kyselé oblasti a tuto metodu aplikovat na nově syntetizovanou skupinu fosfinátových pseudopeptidů. Další oblast výzkumu byla zaměřena na separace stereoizomerů kapilární elektroforézou, v jejichž rámci bylo studováno dělení diastereomerů fosfinátových pseudopeptidů v achirálním prostředí a byla vypracována metoda pro kvantitativní stanovení D-serinu.

Díličními cíli bylo:

V oblasti analýzy a fyzikálněchemické charakterizace látek:

- Provést prvotní elektroforetickou analýzu a charakterizaci série fosfinátových pseudopeptidů (I).
- V rámci vývoje metody pro stanovení pK_a vypracovat postup pro stanovení teploty roztoku uvnitř separační kapiláry a pro měření elektroforetických pohyblivostí za definované teploty (I, III)
- Nalézt vhodné složení základních elektrolytů pro separace a měření elektroforetických pohyblivostí v kyselém prostředí o $pH < 2$ a v pH rozmezí 2 – 12 (III, VI).
- Ověřit platnost Onsagerova zákona za podmínek typických pro kapilární elektroforézu a jeho použití pro přesné přepočty elektroforetických pohyblivostí měřených v základních elektrolytech o různé koncentraci (V).
- Vyvinutou metodu stanovení pK_a aplikovat na skupinu nově syntetizovaných fosfinátových pseudopeptidů (II, VI).

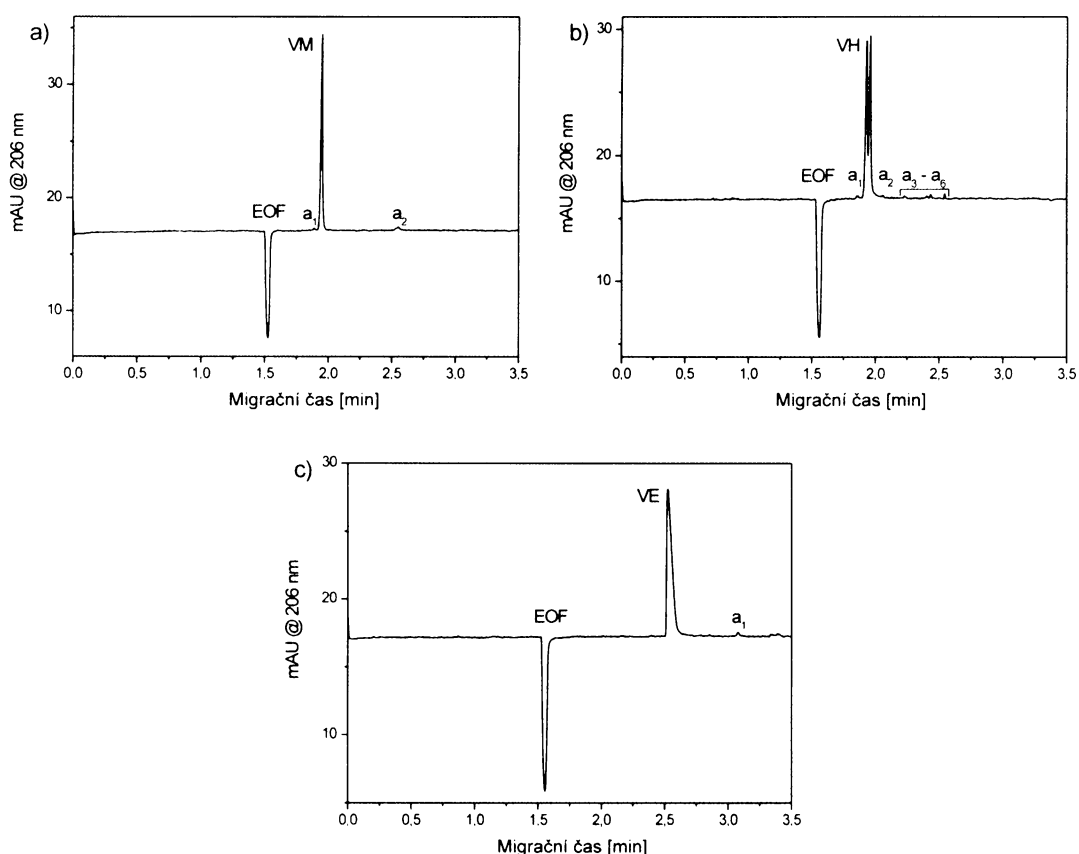
V oblasti separace stereoizomerů:

- Provéřit možnosti a popřípadě optimalizovat separace diastereomerů fosfinátových pseudopeptidů kapilární elektroforézou v achirálních základních elektrolytech (II, IV, VI).
- Porovnat CZE separace diastereomerů fosfinátových pseudopeptidů s HPLC separacemi na obrácené fázi (IV).
- Vypracovat metodu pro kvantitativní stanovení D-serinu vhodnou rychlé pro in-vitro sledování aktivity serin racemasy (VII).

5 Výsledky a diskuse

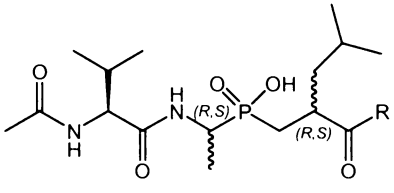
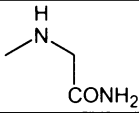
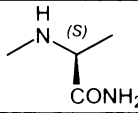
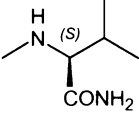
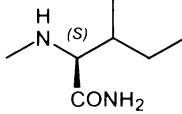
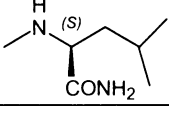
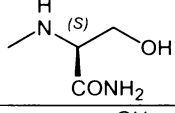
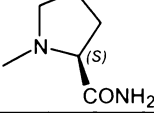
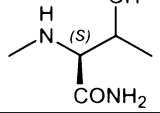
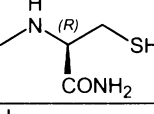
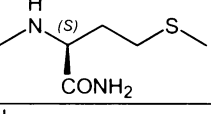
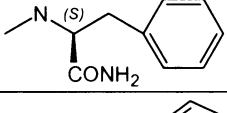
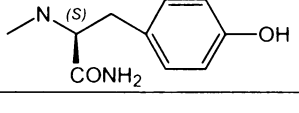
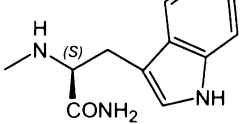
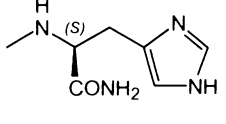
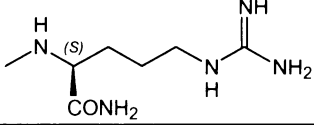
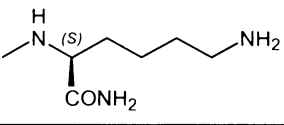
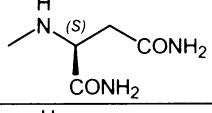
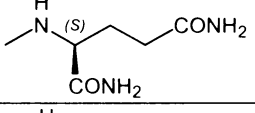
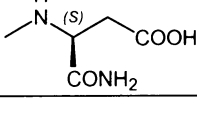
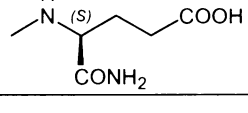
5.1 Analýza a charakterizace fosfinátových pseudopeptidů

Prvotní kapilárněelektroforetická analýza a charakterizace fosfinátových pseudopeptidů byla provedena se skupinou 20 látek obecného vzorce Ac-Val-DL-Ala-ψ[P(O)OH-CH₂]-DL-Leu-X_{aa}'-NH₂, v němž X_{aa}' je aminokyselinový zbytek (viz **Tabulka 1**). Pseudopeptidy obsahující v poloze X_{aa}' zbytek neutrální či kyselá aminokyseliny byly analyzovatelné jako anionty v poměrně širokém pH rozmezí. Analýzy těchto derivátů v tris-tricinovém základním elektrolytu o pH 8,1 poskytly údaje o čistotě preparátů čištěných semipreparativní HPLC, která se pohybovala v rozsahu 88,0 – 99,8 % (viz **Obrázek 1** a práce I). Pseudopeptidy s bazickými aminokyselinovými zbytky v poloze X_{aa}' spolu s deriváty VH (viz **Obrázek 2**) byly potenciálně analyzovatelné jako kationty v kyselé oblasti při částečně potlačené disociaci fosfinátové skupiny.



Obrázek 1. CZE kontrola čistoty fosfinátových pseudopeptidů (a) VM, (b) VH, (c) VE (struktury viz **Tabulka 1**). EOF – značka elektroosmotického toku (voda), a_i – neidentifikované příměsi; zákl. elektrolyt – 40 mM tris – 40 mM tricín, pH 8,1, neupravená křemenná kapilára 50/200 μm vnitřní/vnější průměr, 19,0/30,0 cm efektivní/celková délka; napětí 10 kV, proud 7,5 μA, UV absorpční detekce při 206 nm, podrobnosti viz. práce I.

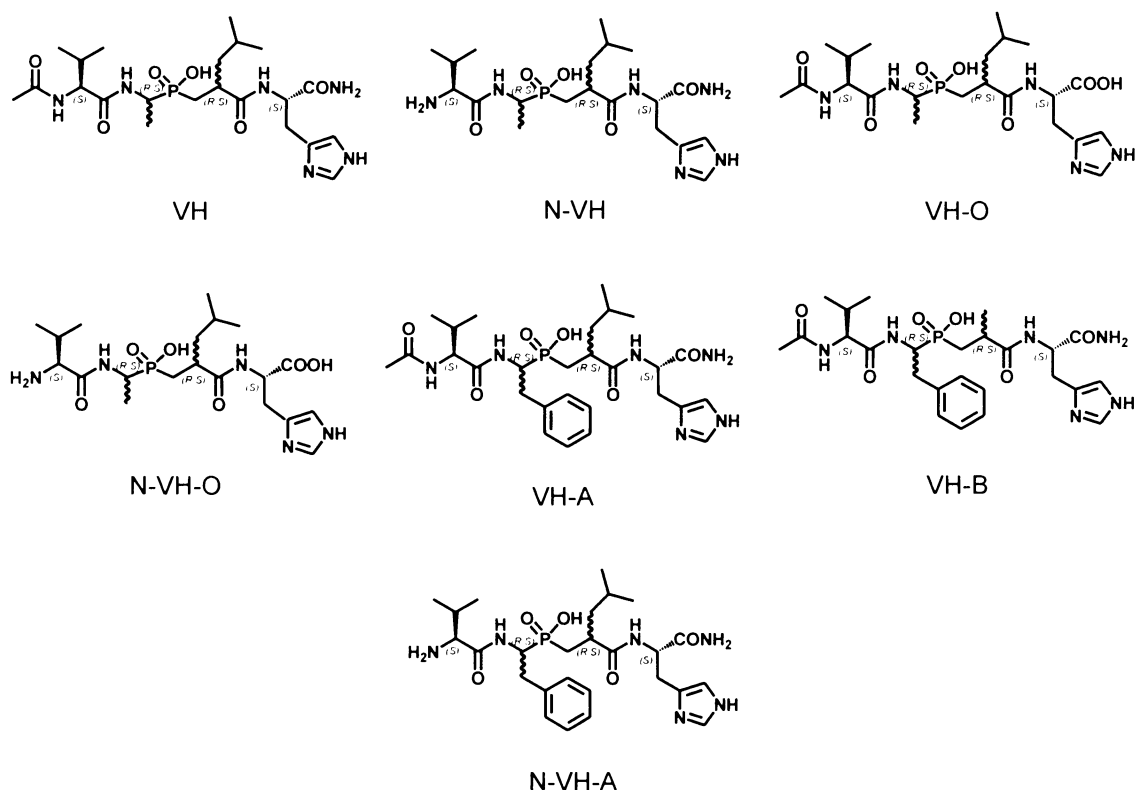
Tabulka 1. Analyzované fosfinátové pseudopeptidy Ac-Val-DL-Ala-ψ[P(O)OH-CH₂]-DL-Leu-Xaa'-NH₂.

			
Pseudopeptid ^a	-R	Pseudopeptid ^a	-R
VG		VA	
VV		VI	
VL		VS	
VP		VT	
VC		VM	
VF		VY	
VW		VH	
VR		VK	
VN		VQ	
VD		VE	

^a Pseudopeptidy jsou označeny jednopísmennými kódy aminokyselinových zbytků na N- a C- konci molekuly.

Odhadované hodnoty pK_a v peptidovém řetězci poměrně neobvyklé fosfinátové skupiny se pohybovaly kolem 1,8 [71], přesné hodnoty však známy nebyly, což zavržovalo příčinu k jejich stanovení pomocí kapilární elektroforézy. Další vlastností analyzovaných fosfinátových

pseudopeptidů bylo, že se jednalo o směs čtyř diastereomerů, jejichž separace tvořila další problém řešený v rámci této disertační práce.



Obrázek 2. Fosfinátové pseudopeptidy odvozené od struktury VH různým stupněm chránění N- a C-konců a modifikacemi bočních řetězců.

5.1.1 Stanovování acidobazických disociačních konstant

Postup stanovení pK_a lze rozdělit na experimentální část, jež spočívá v naměření spolehlivých hodnot efektivních elektroforetických pohyblivostí stanovované sloučeniny, a část výpočetní, během níž se zpracováním závislosti efektivních pohyblivostí na pH získají hodnoty pK_a a aktuální iontové pohyblivosti. Především v experimentální části je potřeba se vypořádat s mnohdy protichůdnými experimentálními podmínkami tak, aby měření poskytovala efektivní pohyblivosti splňující teoretické předpoklady formulované v kapitole 2.5, tj. pohyblivosti měřené za definované teploty, pH, iontové síly a neovlivněné působením jiných iontů.

5.1.1.1 Měření elektroforetických pohyblivostí

5.1.1.1.1 Kontrola teploty

Má-li metoda pro pK_a stanovení poskytovat spolehlivé výsledky, je třeba, aby byly efektivní pohyblivosti měřeny při známé a konstantní teplotě. Jouleovo teplo uvolňované během kapilárně-elektroforetického pokusu zvyšuje teplotu roztoku základního elektrolytu uvnitř kapiláry. Uvažujíc poměrně výraznou závislost efektivních pohyblivostí na teplotě, která činí zhruba 2 % na Celsiův stupeň, a k tomu teplotní závislost pK_a jak složek základního elektrolytu,

tak analyzovaných látek, získáme významný faktor, který je nutno při volbě experimentálních podmínek zohlednit. V praxi situaci ztěžuje nerovnoměrný odvod tepla v různých úsecích kapiláry, který je odvislý od konstrukčního provedení přístroje. Tímto se komplikuje i stanovení teploty kapaliny uvnitř kapiláry, k čemuž bylo navrženo několik postupů využívajících např. teplotní závislost intenzity fluorescence či NMR chemického posunu (více viz publikace III). V předkládané práci byl použit postup založený na měření elektrické vodivosti roztoku o známé teplotní závislosti, jako je kupříkladu vodný roztok chloridu draselného. Pro specifickou vodivost κ 20 mM vodného roztoku KCl platí v teplotním rozmezí 15 – 35°C lineární vztah:

$$\kappa = 0,14304 + 5,36 \cdot 10^{-3} T \quad (5.1)$$

Pro specifickou vodivost platí:

$$\kappa = \frac{L_c}{\pi R_i^2} \frac{I_{el}}{U} \quad (5.2)$$

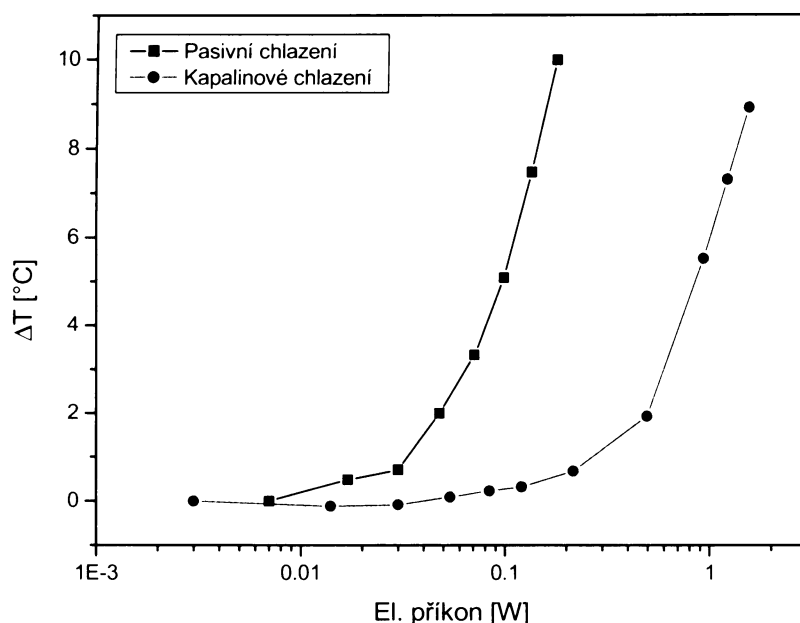
kde L_c je celková délka kapiláry, R_i je vnitřní poloměr kapiláry a I_{el} je elektrický proud vyvolaný napětím U . V použité metodě slouží kapilára za konduktometrickou celu a měřeným roztokem je 20 mM KCl. Geometrické parametry L_c/R_i^2 se stanoví z hodnoty proudu I_{el} protékajícím kapilárou při nízkém napětí, U , (obvykle 1 kV), kdy se zanedbá teplotní nárůst roztoku uvnitř kapiláry. Následně se v potřebném rozsahu proměří závislost elektrického proudu I_{el} na napětí U a sestrojí se kalibrační graf ve formě závislosti rozdílu teplot uvnitř a vně kapiláry na elektrickém příkonu vloženém na kapiláru (viz **Obrázek 3**, podrobnosti viz článek I). Takový kalibrační graf je společný pro kapiláry o shodných délkách a vnitřních průměrech, jsou-li osazeny ve stejném přístroji.

V rámci této práce byly užívány dva přístroje pro kapilární elektroforézu. Elektroforetické pohyblivosti uvedené v pracích I – III a VI byly měřeny na přístroji domácí konstrukce bez aktivního chlazení kapiláry. Pro pokusy byl v závislosti na vodivosti základního elektrolytu použit takový elektrický příkon, aby vyvolal zvýšení teploty v kapiláře ΔT oproti okolí (teplota T_o) obvykle o 4°C, maximálně o 10°C. Jelikož okolní teplota činila obvykle 22 – 23°C, byla průměrná teplota v kapiláře T_i vyšší než požadovaných standardních 25°C a pohyblivosti naměřené při teplotě T_i , m_{i,T_i} , byly přepočteny na standardní teplotu (pohyblivosti $m_{i,25}$) dle vzorce uvažujícího nárůst pohyblivosti 2 % na Celsiův stupeň:

$$m_{i,25} = m_{i,T_i} [1 - 0,02(T_o + \Delta T - 25)] \quad (5.3)$$

V počátečních stádiích této práce (článek I) byl uvažován teplotní nárůst elektroforetických pohyblivosti 2,5 % na Celsiův stupeň. Později byla na základě podrobnějšího prostudování teplotní závislosti viskozity vody, která se většinou podílí na teplotní závislosti pohyblivosti, brána hodnota 2,0 % na Celsiův stupeň. V teplotních korekcích naměřených pohyblivosti nebyl uvažován vliv teplotních změn pK_a složek základních elektrolytů a stanovovaných látek. Ve většině pokusů činila odhadovaná teplota elektrolytu uvnitř kapiláry 26

– 27°C a vyšší teploty se vyskytovaly ojediněle u vysoce vodivých základních elektrolytů. Tyto pohyblivosti byly zpracovávány s vědomím, že mohou být zatíženy nezanedbatelnou chybou.



Obrázek 3. Kalibrační grafy nárůstu teploty roztoku uvnitř kapiláry oproti okolí (ΔT), závislost na elektrickém příkonu na kapiláru. Srovnání účinnosti aktivního kapalinového chlazení (●) v přístroji Beckman Coulter MDQ a pasivního (■) v přístroji domácí konstrukce. Kapiláry: MDQ – vnitřní/vnější průměr 75/375 μm , efektivní/celková délka 29/39cm; domácí konstrukce - vnitřní/vnější průměr 50/200 μm , efektivní/celková délka 19/30cm.

Druhým používaným přístrojem byl komerční Beckman Coulter MDQ s kapalinovým chlazením kapiláry. Pomocí kalibračního grafu (viz **Obrázek 3**) byly zvoleny takové podmínky, které vyvolaly zvýšení průměrné teploty uvnitř kapiláry ΔT obvykle o 1°C, maximálně o 2°C. O tento rozdíl teplot byla ze standardních 25°C snížena teplota chlazení kapiláry. Bylo tedy předpokládáno, že průměrná teplota v kapiláře během elektroforetického pokusu je 25°C a naměřené pohyblivosti již nebyly dále numericky korigovány.

5.1.1.1.2 Složení základních elektrolytů

Základní elektrolyt má při záměru přesného měření elektroforetických pohyblivostí splňovat několik kritérií. Především je potřeba zaručit definované pH v zóně putujícího stanovovaného iontu, což znamená, že základní elektrolyt musí mít dostatečnou pufrací kapacitu. Zjednodušeně lze říci, že pH základního elektrolytu by mělo být vzdáleno maximálně o jednotku pH od pK_a pufrující složky. Proti požadavku na vysokou pufrací kapacitu, která roste i s rostoucí koncentrací, stojí protichůdné požadavky na nízkou vodivost základního elektrolytu a kolize s horní hranicí koncentrační platnosti Debye-Hückelovy teorie, podle níž se počítají aktivní koeficienty při přepočtu smíšených disociačních konstant pK_a^{mix} na

termodynamické pK_a ve smyslů vztahů (2.30) a (2.31). Z hlediska co nejlepší slučitelnosti s Debye-Hückelovou teorií je vhodné užívat uni-univalentní základní elektrolyty. Složení základního elektrolytu je vhodné volit co nejjednodušší, obvykle z jednoho kationtu a jednoho aniontu, aby se omezily rušivé vlivy nadbytečných systémových zón. Taktéž pohyblivost složek základního elektrolytu by měla být taková, aby docházelo k co možná nejnižší elektromigrační disperzi zón analytů. Je žádoucí zamezit interakcím analyzovaných iontů se složkami základního elektrolytu jakožto i s různými činidly přidávanými dodatečně do základního elektrolytu, například za účelem úprav elektroosmotického toku. Jinak může dojít k významnému ovlivnění elektroforetické pohyblivosti studovaného iontu i následně stanovených pK_a . V neposlední řadě je zapotřebí při volbě základního elektrolytu zohlednit používanou detekční techniku.

5.1.1.1.3 Silně kyselé základní elektrolyty

Pro stanovení pK_a poměrně silné fosfinátové skupiny ($pK_a \sim 2$) by bylo záhodno proměřit efektivní pohyblivosti i v oblasti pH, která zasahuje pod očekávanou pK_a hodnotu. Přesné měření pohyblivosti je však v silně kyselých základních elektrolytech, tj. pod pH 2, složité. S rostoucí kyselostí základního elektrolytu stoupá i koncentrace vysoce vodivých vodíkových kationtů, od 10 mM při pH 2, přes 32 mM při pH 1,5 až po například 100 mM při pH 1. Měření efektivních pohyblivosti pro stanovení pK_a se obvykle provádí v řadě základních elektrolytů o iontové síle v rozmezí 10 – 25 mM. Při snižování pracovního pH tedy může nastat situace, kdy vlastní iontová síla daná pH základního elektrolytu překročí iontovou sílu pracovní řady základních elektrolytů. S rostoucím podílem vodíkových iontů prudce roste vodivost základního elektrolytu, což značí potíže s udržením konstantní teploty roztoku v kapiláře. Vysoce pohyblivé vodíkové ionty svou přítomností navíc ovlivňují pohyblivost analyzovaných iontů, jak plyne z Onsager-Fuossovy teorie (viz kap. 2.1.1.3).

Studii zaměřenou na složení základních elektrolytů v nízké pH oblasti přináší práce III. Za pufrující složky byly zvoleny kyseliny fosforečná, fosforová, dichloroctová a šťavelová, jejichž pK_a se pohybuje v rozmezí 1,23 – 2,15 (viz **Tabulka 2**).

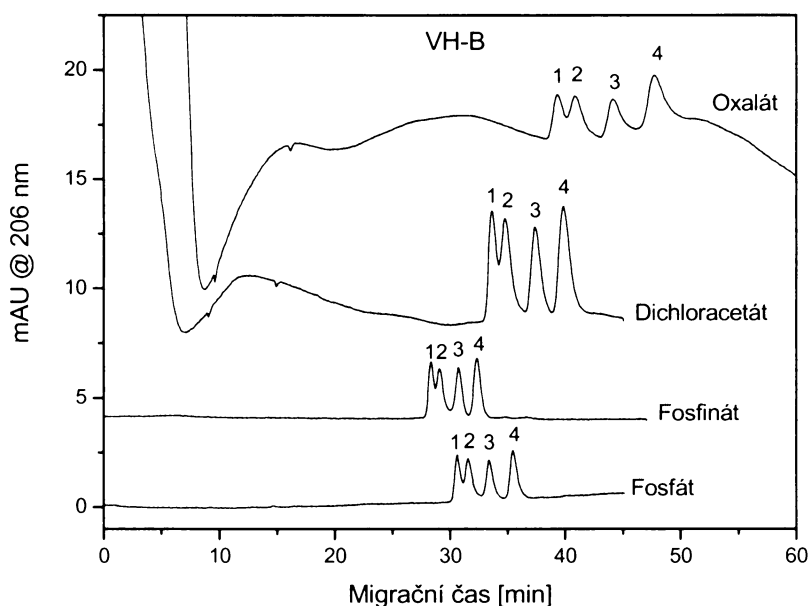
Základní elektrolyty o iontové síle 25 mM byly připraveny smíšením příslušné kyseliny a báze trisu. Pokud již roztok samotné kyseliny překročil tuto iontovou sílu ($pH < 1.6$), tris přidáván nebyl. Efektivní pohyblivosti byly měřeny při iontové síle daného základního elektrolytu a poté přepočteny na iontovou sílu 25 mM pomocí postupu popsání v kap. 5.1.1.1.8.

Srovnání separace diastereomerů fosfinátového pseudopeptidu VH-B v různých základních elektrolytech o pH 1,55 – 1,6 přináší **Obrázek 4**. Jak vidno, oxalátový (šťavelanový) základní elektrolyt poskytuje o něco širší píky než zbylé základní elektrolyty, rozdělení diastereomerů je nicméně téměř totožné. Z pohledu užití UV absorbní detekce při 206 nm se základní elektrolyty založené na kyselinách šťavelové a dichloroctové nejeví být příliš vhodné kvůli vyšší absorbanci oproti fosfátovým a fosfinátovým základním elektrolytům.

Tabulka 2. Disociační konstanty (pK_a) a limitní pohyblivosti (m_{lim}) složek silně kyselých základních elektrolytů.

	pK_a ^{a)}	m_{lim} [$10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$] ^{b)}
Kyselina fosforečná ^{c)}	2,15	35,1
Kyselina fosforná	1,23	45,2
Kyselina dichloroctová	1,26	39,7
Kyselina šťavelová ^{c)}	1,27	42,4

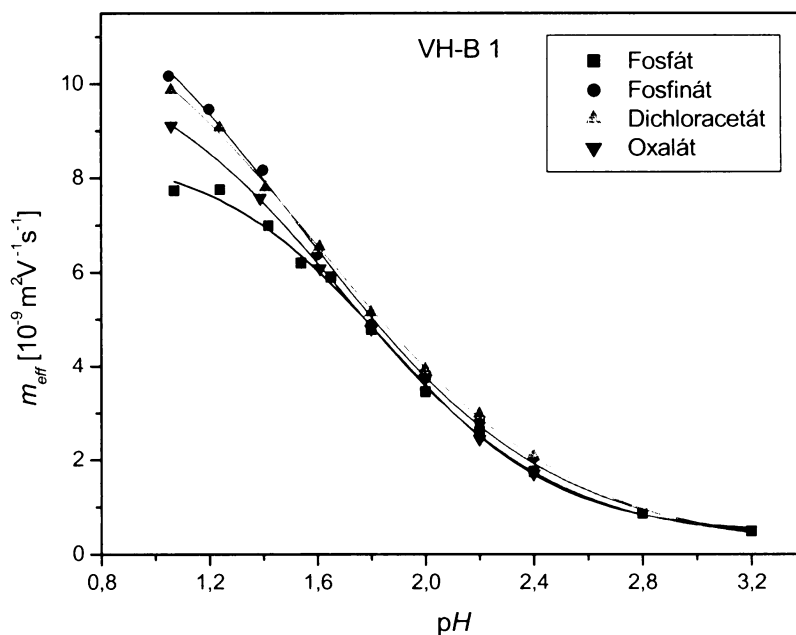
^{a)} pK_a hodnoty ve vodě při 25°C z ref. [72]; ^{b)} limitní pohyblivosti z ref. [51]; ^{c)} uvažována pouze $pK_{a,1}$ a m_{lim} iontové formy s nábojem (-1)



Obrázek 4. Separace diastereomerů fosfinátového pseudopeptidu VH-B v různých základních elektrolytech o pH 1,55 (fosfátový zákl. el.) a 1,6 (ostatní zákl. el.); kapilára – neupravený křemen, vnitřní/vnější průměr – 50/200 μm , efektivní/celková délka – 19,0/30,0 cm; separační napětí 3,3 kV, proud 23 – 32 μA ; detekce UV absorpční při 206 nm. Podrobnosti viz práce III.

Na **Obrázku 5** je vyobrazena pH závislost efektivních pohyblivostí diastereomeru VH-B 1 v základních elektrolytech o různém základu. V oblasti pH < 1,6 jsou jasně patrné rozdíly v efektivních pohyblivostech tohoto izomeru v jednotlivých základních elektrolytech. Zatímco pohyblivosti VH-B 1 v elektrolytech založených na kyselině fosforové a kyselině dichloroctové jsou prakticky shodné, pohyblivosti ve šťavelanových elektrolytech jsou poněkud nižší a pohyblivosti VH-B 1 ve fosfátových základních elektrolytech jsou již výrazně odlišné. Pozorované rozdíly v efektivních pohyblivostech jsou patrně způsobeny rozdílným stupněm

interakcí mezi celkově kladně nabitými fosfinátovými pseudopeptidy a anionty pufrujících kyselin.



Obrázek 5. Závislost efektivních pohyblivostí diastereomeru VH-B 1 na pH v různých základních elektrolytech. Pohyblivosti v pH 2,8 a 3,2 jsou společné pro všechny elektrolyty a pocházejí z fosfátových základních elektrolytů.

Tabulka 3. Disociační konstanta (pK_a) fosfinátové skupiny a aktuální iontová pohyblivost iontové formy (+1) (m_{act}) diastereomeru VH-B 1 stanovené v různých základních elektrolytech při 25°C.

Složka zákl. elektrolytu	pK_a	$m_{act} [10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}]$
Kyselina fosforečná	1,76±0,04	9,2±0,4
Kyselina fosforná	1,35±0,09	15,9±1,4
Kyselina dichloroctová	1,44±0,05	14,6±0,8
Kyselina šťavelová	1,56±0,04	11,9±0,5

V **Tabulce 3** jsou shrnuty pK_a a iontové pohyblivosti diastereomeru VH-B 1 stanovené v různých základních elektrolytech. Třebaže nelze ve světle pozdějších výsledků (viz kap. 5.1.1.1.9 a práce **V**) považovat tyto hodnoty za zcela spolehlivé, je možno z hodnot v **Tabulce 3** vysledovat, že složení základního elektrolytu může významně ovlivnit stanovované hodnoty pK_a a iontových pohyblivostí.

Na základě výsledků zjištěných ve studii III byly v pozdější práci používány pro měření pohyblivosti v pH 1,8 a nižším základní elektrolyty založené na kyselině fosforové.

5.1.1.1.4 Základní elektrolyty pro stanovení pK_a

Na podkladu studií III a VI a dalších předběžných pokusů byly navrženy základní elektrolyty pokrývající rozmezí pH 1,5 – 12, jejichž složení přináší **Tabulka 4**. Tyto elektrolyty byly vybrány s ohledem na slučitelnost s UV absorpční detekcí. V kyselém prostředí byla použita pro svou nízkou pohyblivost báze tris ($pK_a = 8,08$), která byla počínaje pH 4,25 nahrazena hydroxidem sodným. Z důvodů maximálního zjednodušení elektrolytového složení a pro předejití možným nesouladům v naměřených pohyblivostech se zdá být vhodné použít i v kyselém prostředí iont sodný, případně méně pohyblivý iont lithný. Elektrolyty v pH pod 1,8 obsahují kvůli dosažení patřičného pH pouze pufrující kyselinu fosforovou bez přídavků trisu.

Tabulka 4. Základní elektrolyty pro měření pohyblivosti při stanovování pK_a navržené na základě prací III a VI.

Rozmezí pH	Pufrující složka ^{a)}	Nepufrující složka
< 1,80	Kyselina fosforová ($pK_a = 1,23$)	
1,80 – 2,75	Kyselina fosforečná ($pK_a = 2,15$)	Tris
2,75 – 3,25	Kyselina chloroctová ($pK_a = 2,87$)	Tris
3,25 – 4,25	Kyselina mravenčí ($pK_a = 3,75$)	Tris
4,25 – 5,50	Kyselina octová ($pK_a = 4,76$)	NaOH
5,50 – 6,50	MES ($pK_a = 6,15; 20^\circ\text{C}$)	NaOH
6,50 – 7,50	MOPS ($pK_a = 7,20; 20^\circ\text{C}$)	NaOH
7,50 – 8,75	Tricin ($pK_a = 8,15; 20^\circ\text{C}$)	NaOH
8,75 – 9,75	CHES ($pK_a = 9,55; 20^\circ\text{C}$)	NaOH
9,75 – 11,25	CAPS ($pK_a = 10,40; 20^\circ\text{C}$)	NaOH
11,25 – 12,00	Piperidin ($pK_a = 11,12$)	Kyselina octová

^{a)} pK_a hodnoty jsou z ref. [72] pro 25°C , není-li uvedeno jinak.

5.1.1.1.5 Elektroosmóza a volba kapilár

Separáční kapiláru lze charakterizovat jak geometrickými parametry, tak z hlediska vlastností vnitřního povrchu. Pro měření pohyblivosti mají geometrické parametry spíše druhotný význam. Hodnota vnitřního průměru kapiláry je podstatná pro kontrolu teploty základního elektrolytu a citlivost optických detekcí. Délka kapiláry má být taková, aby dovolila pokud možno úplné rozdělení analytů v krátkém čase. Pro přesná měření pohyblivosti však

nejsou vhodné příliš krátké kapiláry, neboť jejich použitím dochází ke zvyšování relativní chyby při měření efektivní a celkové délky.

Druhou rovinou při posuzování separačních kapilár jsou vlastnosti jejich vnitřních povrchů. Zhusta přítomný povrchový náboj spolu s polárním povrchem u nejčastěji používaných křemenných kapilár jsou původci dvou podstatných jevů, a to elektroosmózy a adsorpce analytů (viz kapitoly 2.2 a 2.3.4). Zatímco druhý z uvedených jevů je v měření pohyblivosti vysloveně nežádoucí a je nutno jej v maximální míře potlačit, elektroosmotický tok se významně spolupodílí na rozlišení analytů a na čase analýzy. Velikost a směr elektroosmotického toku představují důležité parametry při plánování experimentů. Pro přesná měření elektroforetických pohyblivosti iontů je navíc klíčová stabilita elektroosmotického toku v čase.

5.1.1.1.6 Separční kapiláry pro analýzu fosfinátových pseudopeptidů

Analyzované pseudopeptidy obsahovaly kromě kyselých fosfinátových skupin ještě karboxylové skupiny na C-koncích a bočních řetězcích aminokyselinových zbytků, amino skupiny na N-koncích a další skupiny pocházející z bočních řetězců bazických aminokyselin. Pseudopeptidy s bazickými aminokyselinovými zbytky (viz **Tabulka 1** a **Obrázek 2**) byly v kyselém prostředí kladně nabitě a postupně se zvyšujícím se pH přecházely na neutrální až záporně nabitě formy. Pro analýzy většiny těchto pseudopeptidů byly použity neupravené křemenné kapiláry, v nichž byla díky potlačenému elektroosmotickému toku umožněna analýza kationtů v kyselých základních elektrolytech. Rychlý katodický elektroosmotický tok v křemenných kapilárách byl pak využit pro analýzu všech fosfinátových pseudopeptidů, které se vyskytovaly v aniontové formě v pH vyšším než 5.

Fosfinátové pseudopeptidy, jež obsahovaly neutrální a kyselé aminokyselinové zbytky v pozici X_{aa} (viz **Tabulka 1**), se vyskytovaly i v kyselém pH oblasti v aniontové formě. Takové látky byly analyzovány v kapilárách s obráceným anodickým elektroosmotickým tokem, kterého bylo docíleno dynamickým pokrytím vnitřního povrchu kapiláry bazickým polymerem Polybrenem. Elektroosmotický tok vykazoval za podmínek popsaných v práci **VI** průměrnou pohyblivost kolem $-30 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ a dobrou stabilitu i v pH nižších než 2. Naopak od pH 4,5 výše se začala elektroosmotická pohyblivost i stálost snižovat zřejmě v důsledku počínající disociace volných silanolových skupin na povrchu kapiláry.

5.1.1.1.7 Měření pohyblivosti elektroosmotického toku

Elektroforetická pohyblivost iontu se počítá jako rozdíl zdánlivé (pozorované) pohyblivosti iontu $m_{app,i}$ a elektroosmotické pohyblivosti m_{eof} .

$$m_i = m_{app,i} - m_{eof} \quad (5.4)$$

Pohyblivost m_{eof} se obvykle získává z migračního času elektroneutrální látky t_{eof} , která bývá dávkována společně s analyty:

$$m_{eof} = \frac{L_c L_{eff}}{U t_{eof}} \quad (5.5)$$

Pro přesná měření elektroforetických pohyblivostí potřebujeme rovněž přesně stanovit elektroosmotickou pohyblivost, a to i v kapilárách „bez elektroosmotického toku“, neboť i v kapilárách upravených neutrálním pokrytím často pozorujeme zbytkovou elektroosmózu, kterou nelze v rovnici (5.4) zanedbat (viz práce **V**).

Je-li elektroosmotický tok pomalý, je stanovení jeho pohyblivosti časově náročné. V mezních případech může trvat i 2 hodiny, než neutrální látka dosáhne detektoru. Kupříkladu v práci **III** byla prováděna měření v pH 1,6 v křemenné kapiláře s velmi pomalým elektroosmotickým tokem a navíc nízkým separačním napětím vloženým kvůli zamezení přílišného ohřevu základního elektrolytu uvnitř kapiláry. V podobných případech je výhodné použít tzv. tlakem urychlené stanovení elektroosmotické pohyblivosti, které bylo zavedeno v pracích [73, 74] a jehož upravená verze byla použita v této práci.

První krok uvedené techniky, jež je popsána na **Obrázku 6**, se neliší od obvyklého elektroforetického pokusu, v němž se stanovuje elektroosmotická pohyblivost ve smyslu vzorce (5.5). Rozdíl spočívá v tom, že se nečeká, až zóna neutrální značky N1 dosáhne detektoru, nýbrž se separační napětí přeruší v čase t_u poté, co je zóna posledního analytu zaznamenána detektorem. Nadávkuje se druhá zóna neutrální látky N2 a spolu se zónou N1 je tlakem hnána k detektoru. Pohyblivost elektroosmotického toku se vypočte podle vztahu:

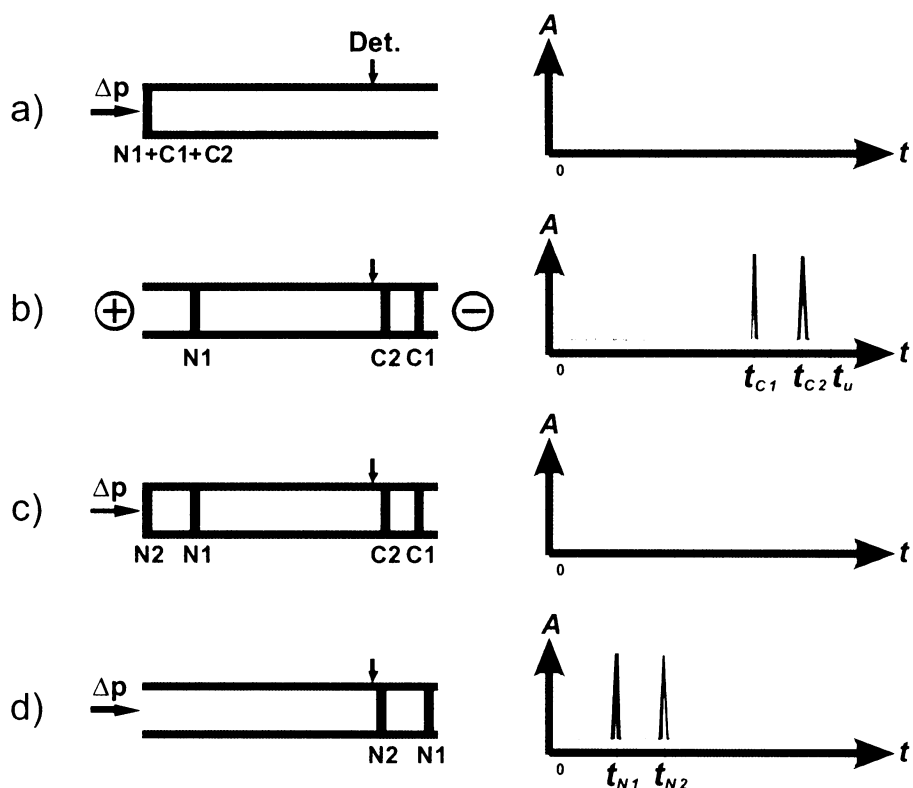
$$m_{eof} = \frac{L_c L_{eff}}{U t_u} \left(1 - \frac{t_{N1}}{t_{N2}} \right) \quad (5.6)$$

kde t_{N1} a t_{N2} jsou časy píků neutrálních zón N1 a N2. Popsaná metoda znamenala výraznou časovou úsporu při experimentech ve velmi kyselém prostředí (práce **III**) při zachování účinnosti elektroforetické separace.

Provedení úkonů popsaných na **Obrázku 6** trvá několik minut, což naopak u krátkých analýz může znamenat významné prodloužení. Rovněž, je-li zbytkový elektroosmotický tok příliš pomalý, je potřeba dostatečný čas t_u k tomu, aby zóna N1 urazila jistou nezanedbatelnou vzdálenost od začátku kapiláry a aby tak byly píky zón N1 a N2 v kroku d) na **Obrázku 6** rozlišeny.

V práci **V** bylo prováděno měření pohyblivostí aniontů organických kyselin v základních elektrolytech o různé koncentraci v pH 8. Pro tyto experimenty byly použity kapiláry s potlačeným elektroosmotickým tokem, čehož bylo dosaženo kovalentním pokrytím křemenného povrchu neutrálním polyakrylamidem. Tyto kapiláry vykazovaly zbytkový elektroosmotický tok podle koncentrace základního elektrolytu v rozmezí $0,3 - 0,7 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$, jehož měření byť i tlakem urychlenou metodou by vyžadovalo působení napětí (čas t_u) po dobu přibližně 30 minut. To by znamenalo značné prodloužení experimentů, neboť obvyklé migrační časy nejpomalejších iontů se pohybovaly v rozmezí 3 – 12 minut. Vzhledem k tomu, že zbytkový elektroosmotický tok byl velmi stálý (obvyklý posun $0,1 - 0,2 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ během

10 pokusů) bylo stanovení elektroosmotické pohyblivosti prováděno pouze před prvním a po posledním měření v sériích 10 pokusů v jednotlivých základních elektrolytech. Pohyblivost elektroosmotického toku byla dopočítávána pro každý pokus v sérii pomocí funkce předpokládající lineární závislost elektroosmotické pohyblivosti během měřené série pokusů.



Obrázek 6. Schématické znázornění tlakem urychleného měření elektroosmotické pohyblivosti. Po hydrodynamickém nadávkování analytů C1, C2 a neutrální značky N1 (a) je připojeno separační napětí. Krátce poté, co analyty dosáhnou detektoru (b), je separace napětím ukončena (v čase t_u) a je dávkována druhá zóna neutrálního markeru N2 (c). Obě zóny N1 a N2 jsou tlakem dopraveny k detektoru (d) a z časů t_{N1} , t_{N2} a t_u je počítána elektroosmotická pohyblivost, m_{eof} .

5.1.1.1.8 Koncentrační závislost pohyblivosti

Aby byl potlačen vliv koncentrace základního elektrolytu na pK_a a pohyblivosti analytů, provádějí se měření pohyblivosti při stanovení pK_a v sadách základních elektrolytů o stejné iontové síle. Iontová síla je dána vztahem (2.8) a slouží za obecný parametr základního elektrolytu. Pracujeme-li však v hodnotách pH, v nichž iontová síla překračuje zvolenou konstantní iontovou sílu základních elektrolytů v tzv. „pH bezpečné“ oblasti, nabízí se jako řešení přepočítání pohyblivosti naměřených při vyšší iontové síle na iontovou sílu této řady základních elektrolytů.

Takový přepočítání je zvláště pro neúplně disociované analyty poměrně obtížný a jeho správné provedení vyžaduje iterativní dopočítávání pK_a , které udává rozdělení iontových forem analytu v závislosti na pH, a též dopočítávání aktuálních iontových pohyblivosti analyzovaných

iontů. V pracích I – III bylo pro korekci pohyblivostí použito vztahu (5.7), který byl použit v práci [13] pro odhad limitních pohyblivostí peptidů.

$$m_{act,i} = m_{lim,i} - \frac{(0,229m_{lim,i} + 3,12 \cdot 10^{-8})\sqrt{I}}{1 + 3,28a\sqrt{I}} \quad (5.7)$$

Jedná se o vyčíslenou formu Onsagerova vztahu (2.9) pro teplotu 25°C a uni-univalentní elektrolyt ve vodném prostředí. Koncentrační korekce užitá v I – III nezahrnovaly v souladu s omezeními Onsagerovy teorie všechny přítomné ionty v migrující zóně analytu a zvláště pak vodíkové ionty. Taktéž použitý přepočítávací postup obsahoval zjednodušené zpracování efektivních nábojů analytů, což však nevedlo k výraznému nárůstu chyby stanovených pK_a hodnot.

5.1.1.1.9 Ověření platnosti Onsagerova modelu

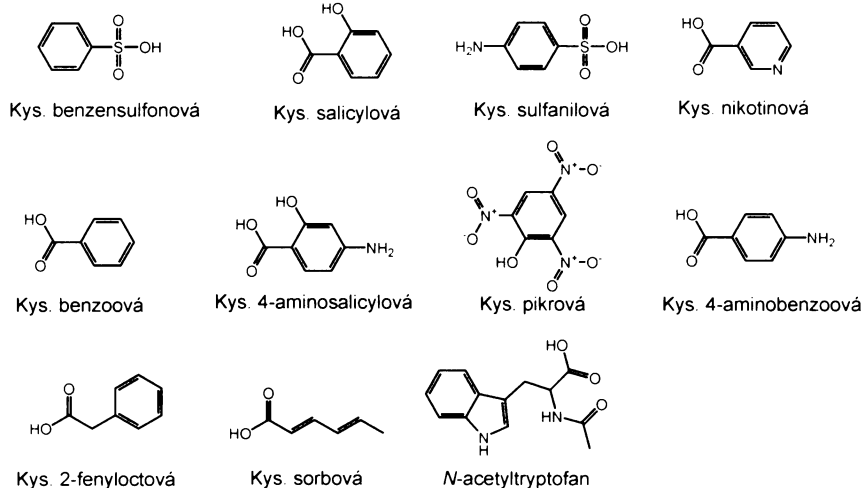
Klíčovým faktorem koncentračních korekcí je spolehlivost modelů uvedených v kapitole 2.1.1. Z poměrně mála prací, které se zabývaly studiem koncentračních závislostí pohyblivostí získaných experimentálně kapilární elektroforézou, si bohužel nejde vytvořit přesný obrázek o shodě teoretických předpokladů s praxí, pokud jde o koncentrační rozsah platnosti, vliv nábojového čísla iontů či vliv složení základního elektrolytu.

Zodpovědět alespoň část těchto otázek měla studie V, v jejímž rámci byly měřeny aktuální pohyblivosti dobře definovaných iontů v uni-univalentních základních elektrolytech v „pH bezpečné“ oblasti. Za analyty byly zvoleny organické kyseliny (viz **Obrázek 7**), které poskytují v mírně alkalickém prostředí úplnou disociaci anionty o nábojových číslech -1 – -3. Vzhledem k velkému rozpětí pohyblivostí těchto iontů byly na základě průzkumových studií (viz **Obrázek 8**) zvoleny elektrolyty sestávající z báze trisu a kyseliny octové v molárním poměru 2:1, v rozmezí iontové síly 3 – 100 mM a pH rozmezí 8,1 – 8,2. V těchto základních elektrolytech byla vyvážená elektromigrační disperze analytů, jež se projevovала frontujícím charakterem piků rychlých iontů a chvostováním pomalých. Poměrně značný počet analytů byl volen proto, aby se mohly zkoumat individuální rozdíly v chování iontů, které však nakonec nebyly pozorovány.

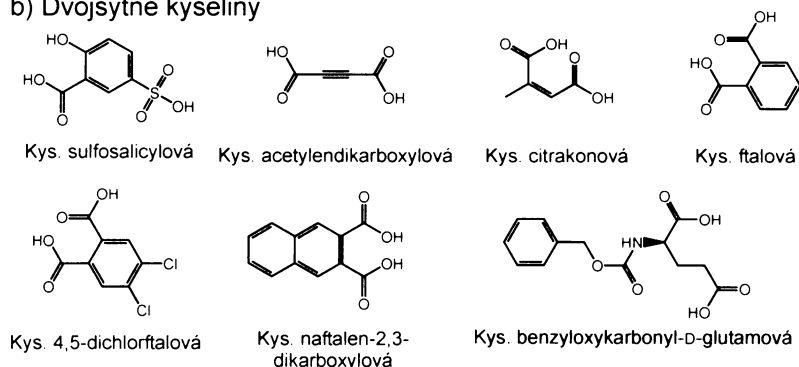
Po proměření aktuálních pohyblivostí bylo nejprve potřeba stanovit limitní pohyblivosti iontů analytů, coby vstupní údaje v modelech Onsagerova typu (viz kap. 2.1.1). Tradiční postup spočívá ve vynesení naměřených aktuálních pohyblivostí proti \sqrt{I} nebo $\sqrt{I}/(1 + Ba\sqrt{I})$ s vhodně zvoleným hydratovaným iontovým průměrem a a v následné grafické extrapolaci na nulovou iontovou sílu. V současnosti lze tento postup nahradit regresní analýzou ve vhodném počítačovém programu. Tradiční grafické metodě odpovídá regresní model (5.8):

$$m_{act,i} = m_{lim,i} - a_1 \frac{\sqrt{I}}{1 + Ba\sqrt{I}} \quad (5.8)$$

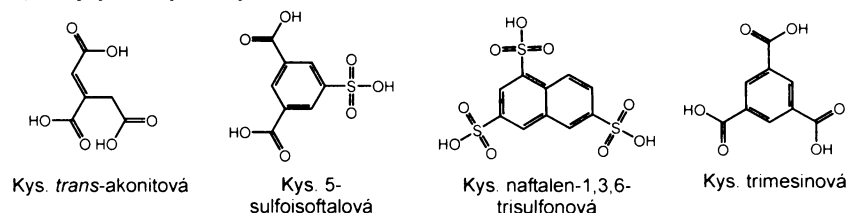
a) Jednosytné kyseliny



b) Dvojsytné kyseliny



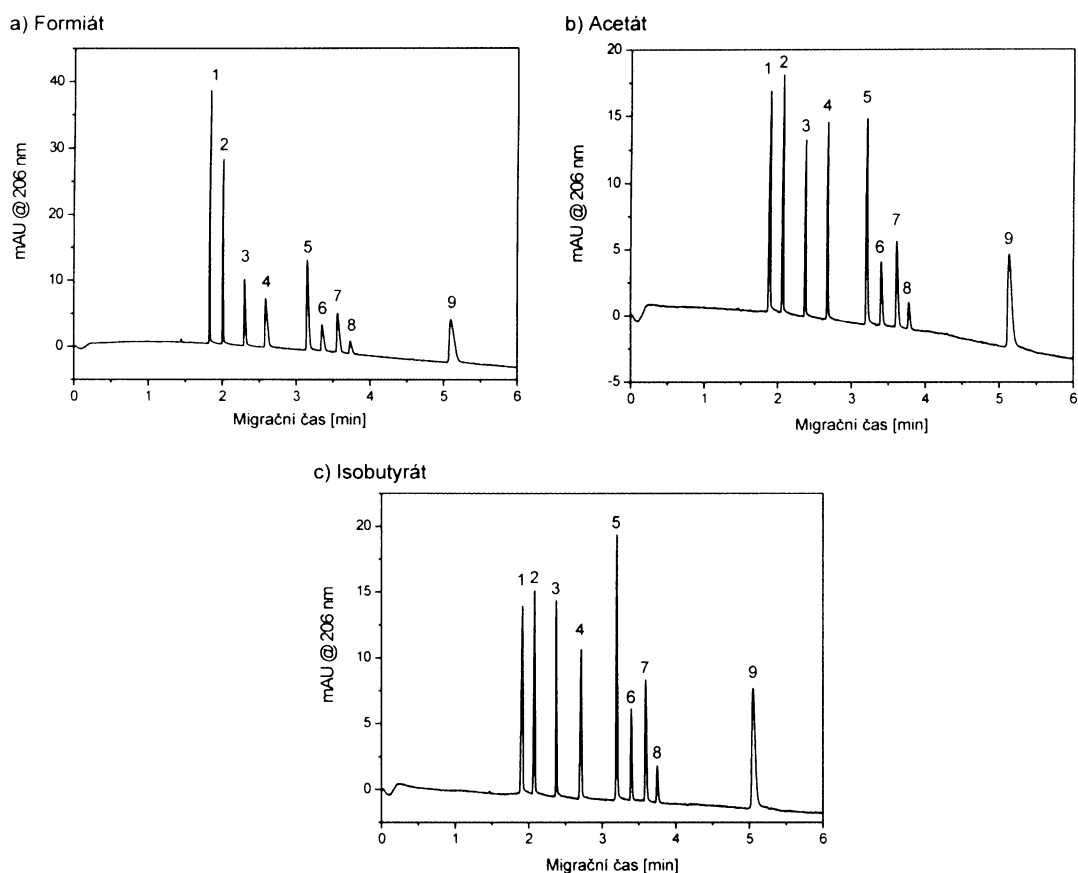
c) Trojsytné kyseliny



Obrázek 7. Organické kyseliny použité pro studium koncentračních závislostí elektroforetických pohyblivostí.

v němž $m_{lim,i}$ spolu s a_1 jsou parametry. Analýza se provádí při pevně zvoleném součinu Ba , který je v zásadě charakteristický pro daný iont v daném základním elektrolytu, obvykle se však používá obecná hodnota $Ba = 1,5$ (tzv. McInnesova aproximace), $Ba = 1,65$ (pro často užívanou hodnotu $a = 0,5$ nm) nebo $Ba = 2,4$ (odvozeno z experimentálních dat [11]). **Obrázek 9** přináší závislost aktuálních pohyblivostí vybraných aniontů na $\sqrt{I}/(1 + Ba\sqrt{I})$. Je-li $Ba = 0$, má vztah (5.8) formu limitního Onsagerova vztahu a **Obrázek 9** potvrzuje nelineární závislost aktuálních pohyblivostí na \sqrt{I} , která se prohlubuje se zvyšováním nábojového čísla iontu. Pro všechny ionty se naproti tomu dosáhne dobré linearity pro obě použité hodnoty $Ba = 1,65$ a Ba

= 2,4 stejně jako tehdy, nechá-li se Ba jako nastavitelný parametr. Výsledky regresní analýzy dat z **Obrázku 9** podle vztahu (5.8) přináší **Tabulky 5 a 6**.



Obrázek 8. Vliv koiontu základního elektrolytu na tvar píků aniontů v CZE separaci.

Popis píků: 1 – 5-sulfoisofthalát, 2 – sulfosalicylát, 3 – ftalát, 4 - naftalen-2,3-dikarboxylát, 5 – salicylát, 6 – nikotinát, 7 – pikrát, 8 – sorbát, 9 – *N*-acetyltryptofanát. Exp. podmínky: základní elektrolyty – 50 mM Tris + 25 mM odpovídající kyseliny – a) mravenčí, b) octová, c) izomáselná, pH 8,1; kapilára ID/OD 50/375 μm s polyakrylamidovým pokrytím, celková/efektivní délka 400/298 mm; UV absorpční detekce při 206 nm; teplota chladící kapaliny 23°C; separační napětí: -22 kV; proud 21 – 25 μA , koncentrace aniontů: 0,5 mM; hydrodynamické dávkování – 1 kPa po dobu 5 s.

Logickým postupem, jak stanovit limitní pohyblivost, je přímé proložení naměřených aktuálních pohyblivostí Onsagerovým modelem (2.9) s pevně daným parametrem a . Tento postup však nevedl ke zdárnému cíli, neboť nebyla nalezena uspokojivá korelace. O něco lépe se ukázala varianta proložení dat, při níž se v Onsagerově modelu (2.9) nechá kromě m_{lim} jako další nastavitelný parametr i Ba . Tímto postupem se dá získat i jinak obtížně dostupný parametr a , jak je ukázáno pro sérii oligopeptidů v práci [75]. Z výsledků této analýzy v **Tabulce 6** je patrný horší koeficient determinace R^2 , hlavně však stanovené hodnoty Ba nabývají místy až

nesmyslných hodnot. Tyto údaje vedou k domněnce, že pohyblivost aniontů organických kyselin nesleduje závislost předpokládanou Onsagerovým modelem.

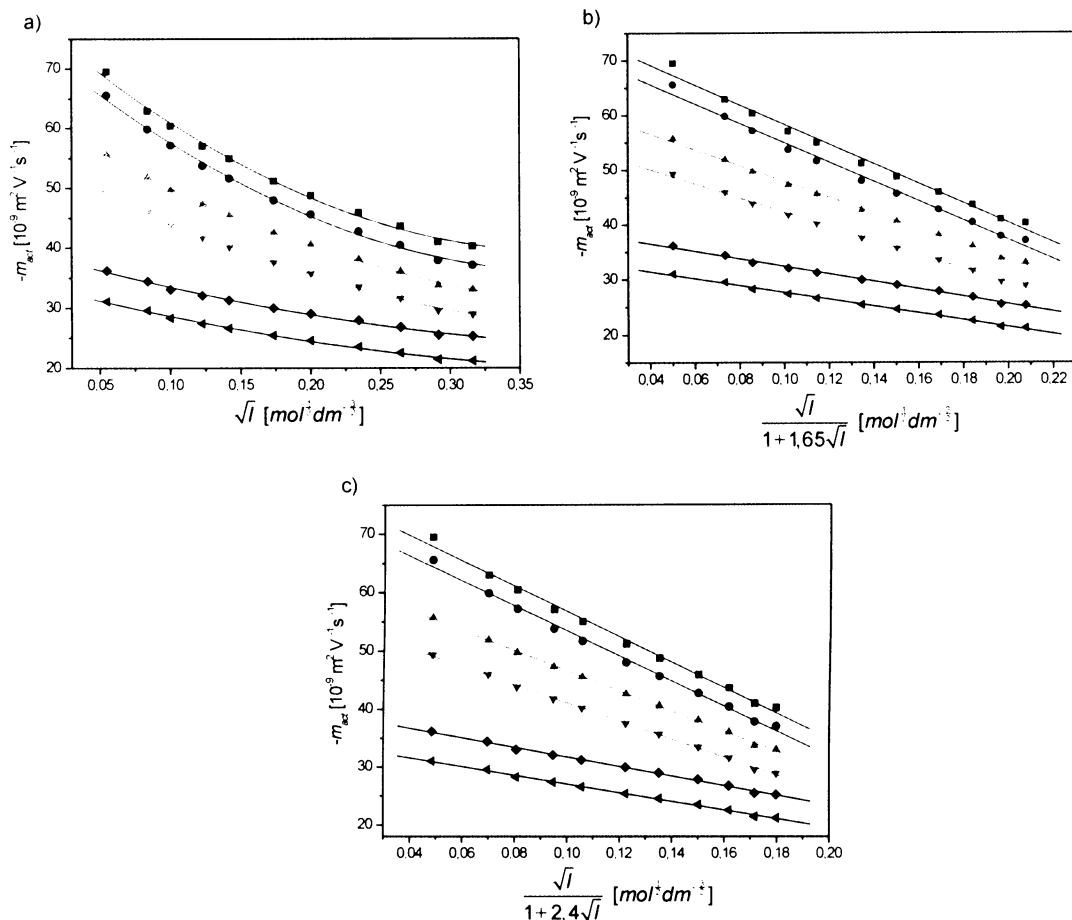
Tabulka 5. Výsledky regresní analýzy koncentrační závislosti aktuálních pohyblivostí organických aniontů v tris-acetátových základních elektrolytech při 25°C podle vztahu (5.8).

Iont	Náboj	$Ba = 1,65$			$Ba = 2,4$		
		$m_{lim,-}$	a_1	R^2	$m_{lim,-}$	a_1	R^2
salicylát	-1	39,3±0,2	68,5±1,5	0,995	40,1±0,2	82,6±1,6	0,997
sorbát	-1	33,9±0,2	62,2±1,3	0,996	34,6±0,2	74,9±1,3	0,997
citronát	-2	62,3±0,3	143,4±2,3	0,998	63,9±0,2	172,9±1,8	0,999
4,5-dichlorftalát	-2	55,2±0,3	129,0±2,2	0,997	56,6±0,2	155,5±1,7	0,999
5-sulfoisofthalát	-3	76,3±0,9	179,5±6,2	0,989	78,3±0,7	216,7±5,5	0,994
trimesát	-3	72,7±0,8	177,0±5,3	0,992	74,7±0,6	213,6±4,5	0,996

Tabulka 6. Výsledky regresní analýzy koncentrační závislosti aktuálních pohyblivostí organických aniontů v tris-acetátových základních elektrolytech při 25°C podle vztahu (5.8) a Onsagerova modelu (2.9)

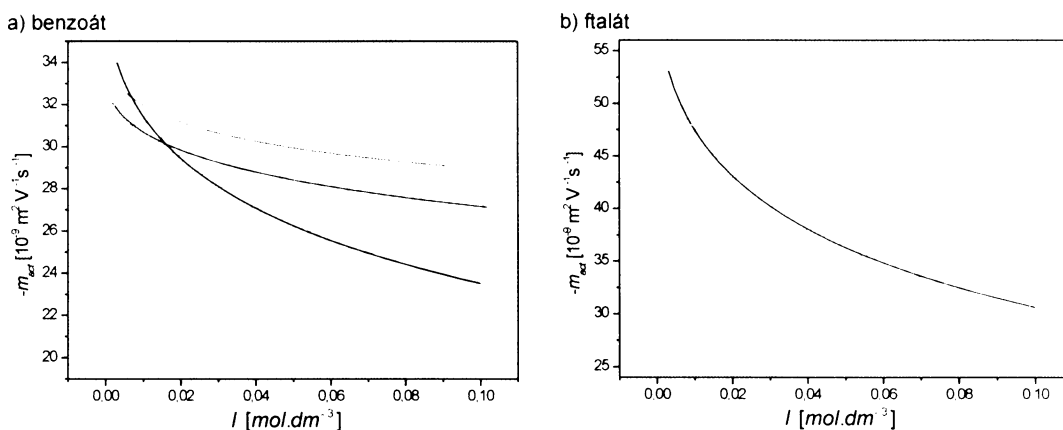
Iont	Ba nastavitelné				Onsagerův model		
	$m_{lim,-}$	a_1	Ba	R^2	$m_{lim,-}$	Ba	R^2
salicylát	40,3±0,6	86,8±11,6	2,6±0,6	0,997	37,4±0,3	0,01±0,12	0,981
sorbát	34,8±0,5	77,8±9,4	2,6±0,5	0,997	32,4±0,2	0,19±0,11	0,985
citronát	64,4±0,7	183,8±12,6	2,7±0,3	0,999	58,7±0,5	0,20±0,11	0,986
4,5-dichlorftalát	57,2±0,6	167,0±11,9	2,7±0,3	0,999	52,4±0,4	0,38±0,10	0,988
5-sulfoisofthalát	84,4±1,3	352,1±32,1	4,8±0,5	0,999	73,8±0,7	0,94±0,14	0,982
trimesát	79,5±1,0	317,9±23,1	4,3±0,4	0,999	70,2±0,7	0,91±0,13	0,984

Z výsledků v **Tabulkách 5 a 6** je patrné, že odhad limitní pohyblivosti iontu je silně závislý na použité metodě vyhodnocení. Spolehlivé stanovení limitní pohyblivosti se neobejde bez platnosti Onsagerova modelu v daném elektrolytovém systému a znalosti hydratovaného iontového průměru iontu a .



Obrázek 9. Závislost aktuálních iontových pohyblivostí vybraných aniontů na (a) odmocnině z iontové síly (\sqrt{I}), (b) $\sqrt{I}/(1+1,65\sqrt{I})$ a (c) $\sqrt{I}/(1+2,4\sqrt{I})$. Analyty: ■ – 5-sulfoisoftalát (náboj -3); ● – trimesát (-3); ▲ – citrakonát (-2); ▼ – 4,5-dichloroftalát (-2); ◆ – salicylát (-1); ◀ – sorbát (-1). Křivky odpovídají proložení polynomem 2. stupně (graf a) a lineární funkcí (grafy b, c). Experimentální podmínky: základní elektrolyty – acetát – tris, iontová síla 3 – 100 mM, pH 8,1 – 8,2; teplota v kapiláře – 25°C; separační napětí – -11,3 – -22,8 kV; koncentrace iontů – 0,25 mM; ostatní podmínky stejné jako u **Obrázku 8**.

Za účelem prozkoumání nesouladu koncentrační závislosti naměřených dat s Onsagerovým modelem bylo provedeno porovnání s daty uvedenými v práci [11]. **Obrázek 10** ukazuje, že průběh koncentračních závislostí aktuálních pohyblivostí benzoátu a ftalátu měřených v draselno-fosfátových a sodno-borátových základních elektrolytech je v souladu s Onsagerovým modelem. Vzhledem k tomu, že experimentální podmínky pro měření pohyblivostí v tris-acetátových elektrolytech byly navrženy pečlivě, je nepravděpodobné, že jsou získaná data zatížena systematickou chybou, která by se projevila v tak velkých rozdílech, jaké ukazuje **Obrázek 10**. Jejich příčinu je nejspíš potřeba hledat v interakcích analytů se složkami základních elektrolytů. Bližší prozkoumání by vyžadovalo další rozsáhlou sérii měření, která již bohužel překračuje možnosti této disertační práce.



Obrázek 10. Závislost aktuální iontové pohyblivosti (a) benzoátu a (b) fthalátu na iontové síle. Základní elektrolyty: ○ - draselnofosfatový, pH 7,2; ◻ - sodnoborátový, pH 10 (údaje pocházejí z práce [11]); △ - trisacetátový, pH 8,1 – 8,2 (práce V). Plné čáry jsou proložením bodů podle rovnice (5.8); čárkované – průběh limitního Onsagerova zákona, tečkované – Onsagerův model s $Ba = 1,65$ a čerchované – Onsagerův model s 2,4, výchozí limitní pohyblivosti převzaty z práce [11]: benzoát, $-33,6 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$; fthalát, $-54,6 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Podmínky experimentů v draselnofosfatových a sodnoborátových základních elektrolytech viz [11], ostatní podrobnosti viz práce V.

5.1.1.2 Vyhodnocovací a výpočetní postupy

V CZE metodách se hodnoty pK_a v současnosti téměř výhradně získávají nelineární regresí naměřené závislosti efektivních pohyblivostí na pH. V raném stadiu této práce (články I – III) byla za regresní model brána tzv. Boltzmanova sigmoida převzatá z publikace [76]:

$$m_{eff} = \frac{m_{act,1} - m_{act,2}}{1 + e^{\frac{\rho H - \rho K_a^{n_x}}{dpH}}} + m_{act,2} \quad (5.9)$$

kde $m_{act,1}$ a $m_{act,2}$ jsou odhady aktuálních pohyblivostí iontů účastných v acidobazické rovnováze, dpH popisuje strmost sigmoidy. Později (práce VI) byl tento model nahrazen vztahy odvozenými přímo z disociačních rovnováh studovaného elektrolytu postupem popsáným v kapitole 2.5. Tento způsob má blíže k fyzikálněchemické podstatě acidobazických rovnováh a je oproti vztahu (5.9) snáze upravitelný pro látky s více disociovatelnými skupinami.

Regrese byly prováděny programem Origin, verze 6, využívající metodu nejmenších čtverců počítanou obvyklým Levenberg-Marquardtovým algoritmem. Výstupem regrese jsou odhady aktuálních pohyblivostí a smíšených disociačních konstant, které byly v posledním kroku přepočteny (viz kap. 2.5) na termodynamické pK_a pomocí aktivitních koeficientů počítaných Debye-Hückelovým vztahem [9]:

$$\log \gamma_i = \frac{-0,5085z_i^2 \sqrt{I}}{1 + 3,281a\sqrt{I}} \quad (5.10)$$

v němž bylo za parametr a , který je stejný jako v Onsagerově modelu (2.9), dosazeno jednotné hodnoty 0,5 nm. Na základě závěrů kapitoly 5.1.1.1.9 se však dá předpokládat, že tato aproximace nebude zcela přesná.

5.1.2 Stanovení pK_a fosfinátových pseudopeptidů

Vrcholem úsilí o vytvoření ucelené metody pro stanovení pK_a je práce **VI**, která pojednává o stanovení pK_a fosfinátových pseudopeptidů s více disociovatelnými skupinami. Byly analyzovány syntetizované směsi čtyř diastereomerů a bylo možné stanovit jejich pK_a paralelně. Pokud byly pK_a jednotlivých diastereomerů rozdílné v rámci rozlišovací schopnosti CZE metody, bylo je možno i rozdělit. Disociační konstanty nerozdělených diastereomerů byly považovány za totožné.

Ve skupině deseti vícesytných fosfinátových pseudopeptidů nabývaly stanovené pK_a těchto hodnot: fosfinátová skupina 1,5 – 2,25; C-koncová karboxylová skupina 2,94 – 3,50; karboxylová skupina bočních řetězců glutamátu a aspartátu 4,68 – 4,97; imidazolylový zbytek histidinu 6,55 – 8,32; N-koncová amino skupina 7,65 – 8,28; ϵ -aminoskupina bočního řetězce lysinu 10,46 – 10,61. Podrobné výsledky jsou shrnuty v **Tabulka 7**.

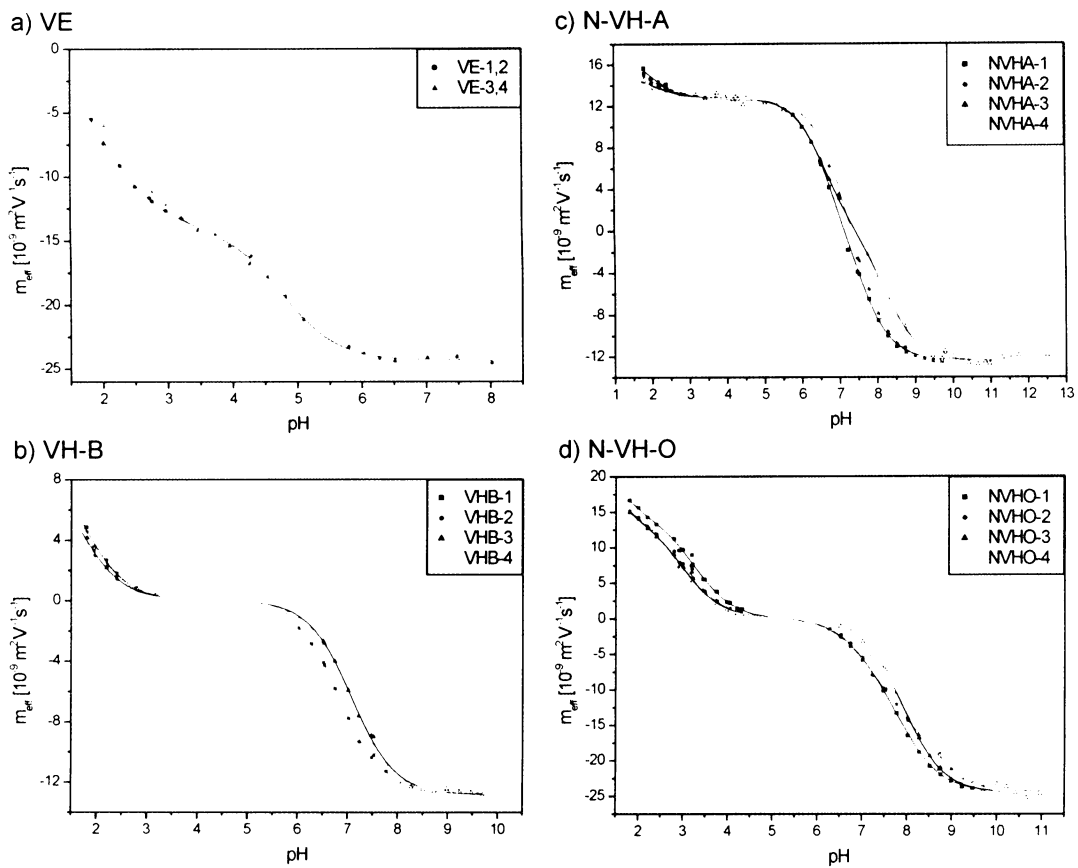
Efektivní pohyblivosti byly proměřovány v rozsahu pH 1,8 – 12,0. Ač by si poměrně nízké pK_a fosfinátové skupiny žádaly zařazení pohyblivosti i z nižšího pH, nebylo tak učiněno v důsledku rozporuplných závěrů kapitoly 5.1.1.1.9. Chybějící data v okolí pK_a fosfinátu vedla u většiny pseudopeptidů ke zvýšené nejistotě stanovení. Výjimkou jsou pseudopeptidy VD a VE, u nichž pohyblivost maximálně protonizované formy směřuje k nule a bylo možno v regresní analýze tuto hodnotu považovat za fixní. Stejným případem je stanovení pK_a imidazolylu a N-koncové amino skupiny pseudopeptidu NVHA (viz **Tabulka 7** a **Obrázek 11**).

Chyba stanovení pK_a je vyjádřena směrodatnou odchylkou. Z výsledků v **Tabulce 7** je vidět, že nejvyšší dosažená přesnost je až $\pm 0,01$. Je však nutno mít na zřeteli, že uvedené směrodatné odchylky zahrnují pouze chybu nelineární regrese, kdežto další zdroje nejistot plynoucí z variability naměřených efektivních pohyblivostí a pH základního elektrolytu nejsou zohledněny.

V článku **VI** byl též zkoumán odstup dvou následných pK_a , kdy ještě lze stanovit dvě samostatné pK_a hodnoty. Jsou-li následné pK_a hodnoty dostatečně vzdálené (viz **Obrázek 11a, b**), je jejich stanovení snadné. Je-li naopak rozdíl $\Delta pK_a \sim 1$, je stanovení pK_a určením poloh inflexních bodů na sigmoidní křivce závislé na spolehlivosti naměřených efektivních pohyblivostí. Například pseudopeptid N-VH-O se vyznačuje blízkostí pK_a imidazolylové a amino skupiny a pro diastereomer č.3 byly stanovené hodnoty $7,21 \pm 0,67$ a $8,17 \pm 0,08$. Velký nepoměr směrodatných odchylek spolu s nepoměrem odhadnutých aktuálních pohyblivostí příslušných iontových forem (viz **Tabulka 4** v práci **VI**) ukazuje, že nelineární regrese naměřených dat neposkytla v tomto případě spolehlivé pK_a .

Tabulka 7. Stanovené termodynamické pK_a diastereomerů fosfinátových pseudopeptidů při 25°C.

	Izomer	pK_a			
		fosfinát	karboxylát	imidazol	amino
VD	1+2	2,02±0,03	4,68±0,04		
	3	2,15±0,03	4,72±0,04		
	4	2,19±0,03	4,73±0,04		
VE	1+2	2,06±0,02	4,94±0,03		
	3+4	2,25±0,02	4,97±0,03		
VK	1+2	1,89±0,14			10,46±0,05
	3+4	1,71±0,20			10,61±0,04
VH	1+2	1,68±0,12		6,80±0,01	
	3+4	1,59±0,15		7,15±0,01	
VH-A	1	1,62±0,18		6,76±0,02	
	2	1,61±0,20		6,76±0,02	
	3	1,61±0,20		7,12±0,02	
	4	1,52±0,26		7,12±0,02	
VH-B	1	1,66±0,11		6,88±0,01	
	2	1,66±0,12		6,88±0,01	
	3	1,57±0,15		7,14±0,01	
	4	1,50±0,19		7,05±0,01	
N-VH	1	1,78±0,17		6,55±0,02	7,96±0,02
	2	1,90±0,16		6,85±0,03	7,87±0,03
	3	1,86±0,22		6,52±0,02	8,11±0,02
	4	2,10±0,18		6,80±0,02	8,04±0,02
N-VH-A	1	1,62±0,34		6,62±0,03	7,63±0,03
	2	1,87±0,31		6,97±0,04	7,65±0,04
	3	1,82±0,50		6,53±0,02	8,28±0,02
	4	1,42±0,73		6,79±0,02	8,24±0,03
VH-O	1	1,63±0,15	3,49±0,02	7,64±0,03	
	2	1,62±0,15	3,50±0,02	7,74±0,03	
	3+4	1,45±0,3	3,15±0,02	8,32±0,03	
N-VH-O	1	0,87±2,3	3,21±0,05	7,04±0,17	8,13±0,08
	2	0,93±3,6	3,01±0,08	7,29±0,06	8,81±0,08
	3	0,89±4,4	2,95±0,08	7,21±0,67	8,17±0,08
	4	1,25±3,4	2,94±0,10	7,62±0,16	8,56±0,16

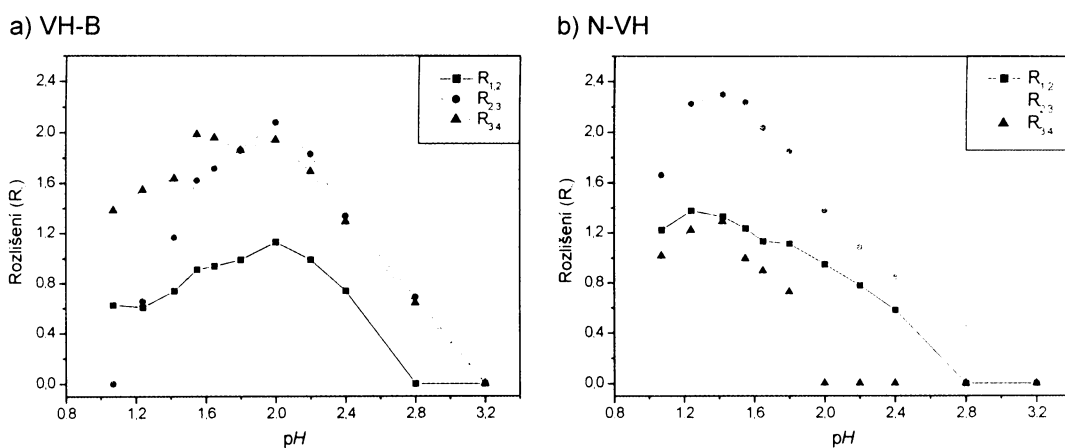


Obrázek 11. Závislost efektivních pohyblivostí diastereomerů vybraných fosfinátových pseudo-peptidů lišících se v počtu a druhu disociovatelných funkčních skupin na pH. Efektivní pohyblivosti odpovídají iontové síle 25 mM a teplotě 25°C. Podrobnosti viz práce VI.

5.2 Separace diastereomerů fosfinátových pseudopeptidů

Kromě stanovování pK_a byly v analýze fosfinátových pseudopeptidů zkoumány schopnosti kapilární elektroforézy pro separaci jejich diastereomerů. Použitý způsob syntézy poskytl směs čtyř diastereomerů, které bylo v principu možné rozdělit v achirálním prostředí. Diastereomery se díky různému prostorovému uspořádání atomů na chirálních centrech obecně liší v pK_a hodnotách a proto představuje pH velmi důležitou proměnnou při hledání optimálních separačních podmínek. Druhou podobou rozdílů mezi jednotlivými diastereomery, kterou lze využít v separacích kapilární zónovou elektroforézou, je různý tvar molekul, potažmo hydrodynamický průměr diastereomerů. Často však nebývají tyto rozdíly dostatečné pro úspěšnou separaci a proto bývá snaha o zvýraznění těchto rozdílů selektivní komplexací obvykle s chirálními ligandy. Hledání vhodného ligandu však může být zdlouhavé.

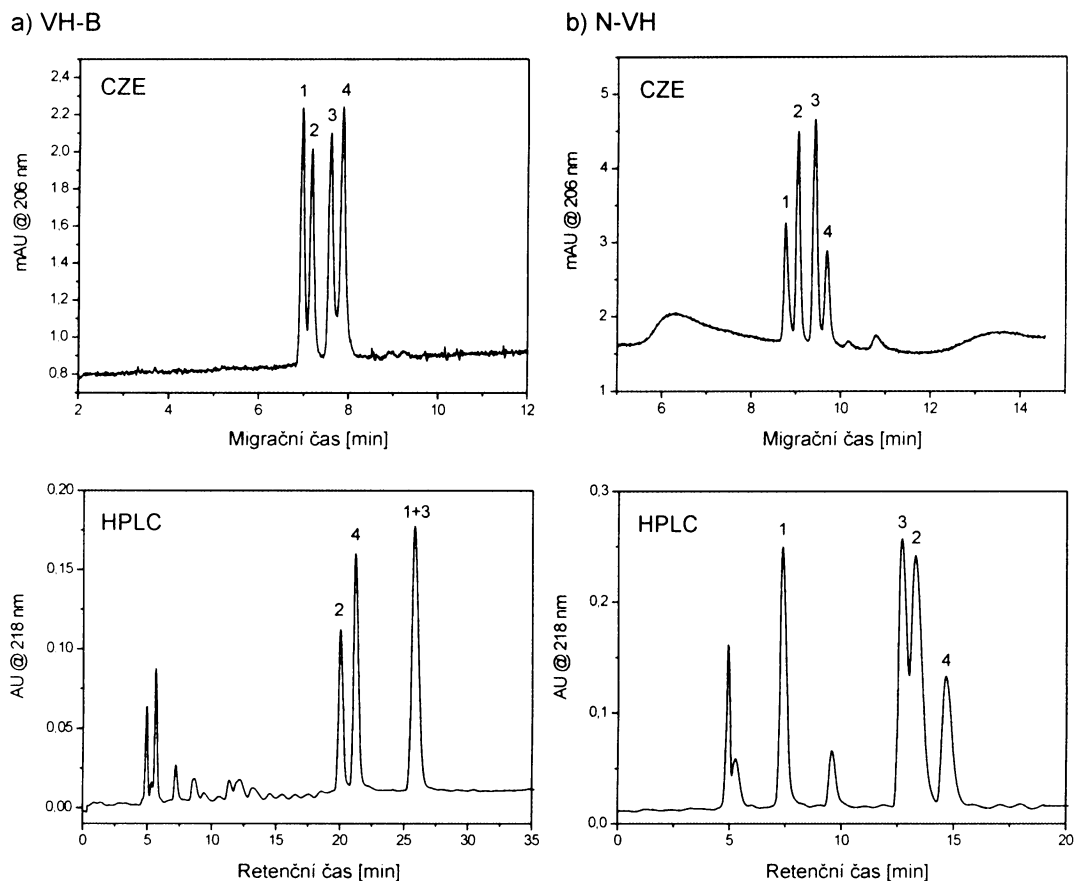
V této práci byl studován vliv pH na separaci diastereomerů jako druhotný výstup závislosti efektivních pohyblivostí na pH měřených za účelem stanovení pK_a . Vyhodnocením těchto pokusů ve formě rozlišení vs. pH (viz **Obrázek 12**) bylo zjištěno optimální pH základního elektrolytu a separace byla při tomto pH dále vylepšována úpravami separačního napětí, koncentrací či složením základního elektrolytu. Bylo pozorováno, že k separacím diastereomerů dochází výhradně v oblastech pH, které se přibližují k pK_a analytů (viz **Obrázek 11**), což podtrhuje význam znalosti pK_a pro optimalizaci separačních podmínek v kapilární elektroforéze.



Obrázek 12. Závislost rozlišení CZE separace diastereomerů vybraných fosfinátových pseudopeptidů na pH. Separací podmínky: neupravená křemenná kapilára 50/200 μm vnitřní/vnější průměr, 19,0/30,0 cm celková/efektivní délka; UV absorpční detekce při 206 nm; základní elektrolyty: kyselina fosforečná – tris; podrobnosti viz práce IV.

Většina analyzovaných fosfinátových pseudopeptidů poskytla separaci alespoň na dvě dvojice diastereomerů (např. VE na **Obrázku 11a**) a rozdělení všech čtyř izomerů bylo docíleno pro struktury odvozené od VH (práce IV a VI). **Obrázek 13** ukazuje příklad separací diastereomerů pseudopeptidů VH-B v tris-fosfátovém základním elektrolytu o pH 2,0 a N-VH, jejichž nejvyššího rozlišení bylo dosaženo až ve velmi nízkém pH 1,25. To je poměrně

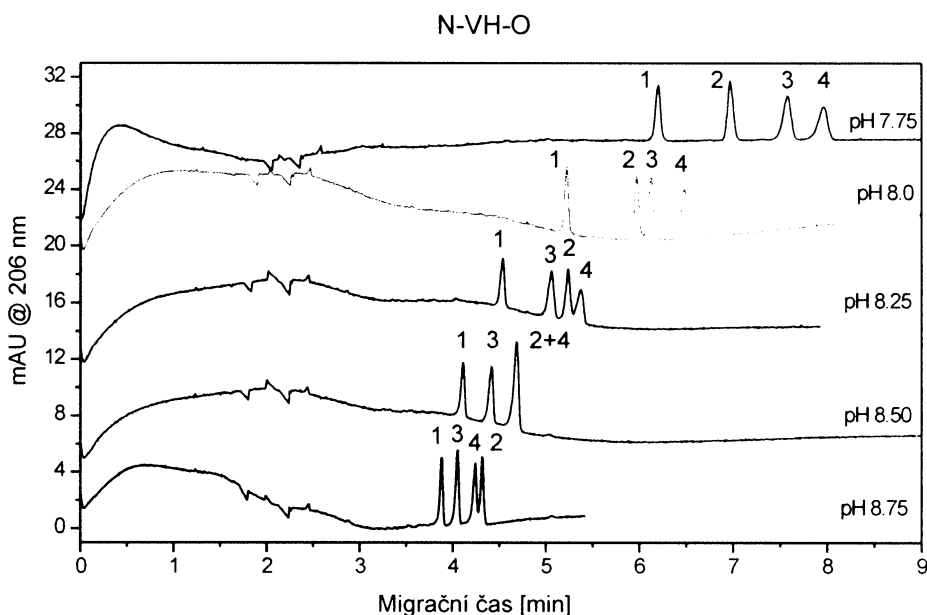
překvapivé, uvážíme-li extrémní vodivost takového základního elektrolytu, díky němuž mohlo být použito separační napětí pouhých 5 kV. Svědčí to o tom, že zvýšení selektivity v nízkém pH převážilo úbytek účinnosti způsobený vysokou vodivostí základního elektrolytu (viz rovnice (2.27)).



Obrázek 13. Separace diastereomérů fosfinátových pseudopeptidů CZE a HPLC. Diastereomery jsou číslovány podle migračního pořadí v CZE. Separací podmínky: CZE – a) VH-B, zákl. elektrolyt – 14 mM tris – 55 mM kys. fosforečná, pH 2,0, napětí 10 kV, b) N-VH, zákl. elektrolyt – 500 mM kys. fosforečná, pH 1,25, napětí 5 kV; neupravená křemenná kapilára 50/200 μm vnitřní/vnější průměr, 19,0/30,0 cm efektivní/celková délka; UV absorpční detekce při 206 nm; HPLC – kolona C₁₈ Vydac 218TP510 (250x10 mm, 5 μm), mobilní fáze kys. trifluoroctová (0,1 obj. %)/voda/acetonitril (8 – 80 obj. %), UV absorpční detekce při 218 nm; podrobnosti viz práce IV.

Po proměření efektivních pohyblivostí v širokém pH rozsahu lze říci, že nejlepších výsledků v separacích diastereomérů bylo dosaženo v kyselém prostředí okolo pH 2 v oblasti pK_a centrální fosfinátové skupiny pseudopeptidů. Jisté úspěchy však byly zaznamenány i mimo nízké pH (práce VI). Na **Obrázku 14** je ukázáno dělení diastereomérů pseudopeptidu N-VH-O v mírně alkalické pH oblasti 7,75 – 8,75. Zajímavostí je měnící se migrační pořadí diastereomérů s pH, které lze přičíst rozdílné distribuci hodnot pK_a imidazylové a aminové skupiny mezi jednotlivými diastereomery (viz **Tabulka 7. Stanovené termodynamické pK_a**

diastereomerů fosfinátových pseudopeptidů při 25°C.). Tento příklad dokresluje význačnou roli pH v separaci diastereomerů kapilární elektroforézou.

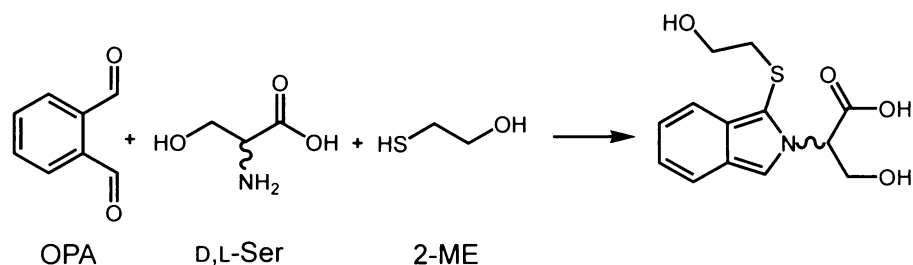


Obrázek 14. CZE separace diastereomerů fosfinátového pseudopeptidu NVHO v aniontovém režimu. Mění se migrační pořadí diastereomerů je způsobeno rozdílnou distribucí hodnot pK_a imidazolylových a aminových skupin mezi jednotlivými diastereomery (viz **Tabulka 7**). Separací podmínky: zákl. elektrolyty – 25 mM NaOH upravený tricinem na pH 7,75 – 8,75; kapilára – vnitřní průměr 50 μm , 19,0/30,0 cm efektivní/celková délka s neutrálním EPDMA pokrytím; napětí – -10 kV, UV absorpční detekce při 206 nm; podrobnosti viz práce **VI**.

CZE separace fosfinátových pseudopeptidů v kyselých základních elektrolytech byly porovnány se semipreparativními separacemi v HPLC na obrácených fázích (práce **IV**). Gradientová eluce mobilní fází složené z trifluoroctové kyseliny, vody a acetonitrilu z oktadecylsiloxanové kolony poskytla v průměru vyšší hodnoty rozlišení diastereomerů, na druhou stranu bylo v některých případech docíleno kapilární elektroforézou rozdělení píků, které v HPLC rozlišeny nebyly (viz **Obrázek 13**). Migrační pořadí diastereomerů v obou metodách bylo obecně různé, což spoludokládá komplementaritu kapilární elektroforézy a HPLC na reverzní fázi založených na využívání různých separačních mechanismů.

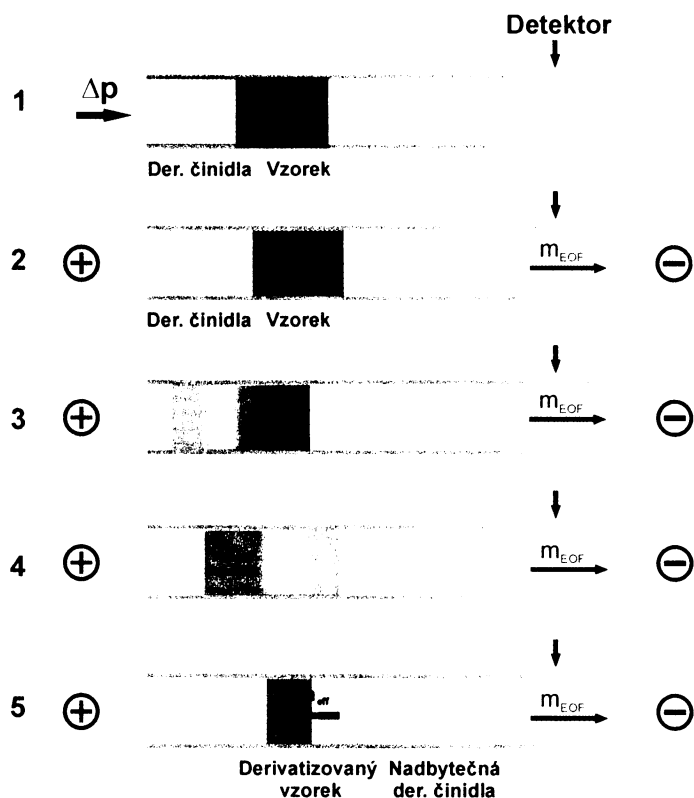
5.3 Stanovení D-serinu kapilární elektroforézou

Samostatnou kapitolu této disertační práce tvoří vývoj metody na stanovení D-serinu. Podnět k zahájení této činnosti vzešel ze skupiny J. Konvalinky na ÚOChB, která se zabývá studiem enzymu serin racemasy zajišťující přeměnu L-serinu na D-serin. D-Serin je přítomen v mozku savců v poměrně vysoké koncentraci a současné hypotézy mu přisuzují schopnost podílet se na aktivaci *N*-methyl-D-aspartátového (NMDA) receptoru přes tzv. „glycinové“ vazebné místo. To by umožnilo regulaci aktivity NMDA receptoru, který je spojován s důležitými životními funkcemi jako paměť, schopnost učení, vnímání bolesti a též s chorobami jako např. mozková mrtvice, alkoholismus či epilepsie. V procesu hledání inhibitoru serin racemasy coby nového farmaceutického cíle má rychlá, citlivá, snadno proveditelná a nenákladná metoda pro stanovení její aktivity klíčový význam.



Obrázek 15. Schéma derivatizace serinových enantiomerů reakcí s *o*-ftaldialdehydem (OPA) a 2-merkaptoethanolem (2-ME).

Ačkoli jsou aminokyseliny velmi oblíbenými analyty v kapilární elektroforéze [67, 77], nebylo do poloviny roku 2003 publikováno mnoho úspěšných separací enantiomerů serinu. Krátce po zahájení prací se však objevila publikace [78], v níž bylo popsáno vysoké rozlišení D- a L-serinu derivatizovaných *o*-ftaldialdehydem a 2-merkaptoethanolem (viz **Obrázek 15**) v alkalickém základním elektrolytu za přítomnosti 2-hydroxypropyl- γ -cyklohextrinu coby chirálního selektoru. Tato práce byla vzata jako základ pro vlastní vyvíjenou metodu. Již v předběžných pokusech však vyšla najevo nízká stabilita produktů derivatizace, která neumožnila klasickou ruční derivatizaci sady vzorků a pak jejich postupnou analýzu. Vzhledem k vysokému předpokládanému počtu analýz nepřicházelo v úvahu derivatizovat zvlášť každý vzorek bezprostředně před dávkováním. Jelikož je rychlost reakce aminokyselin s OPA a 2-ME poměrně vysoká, nabízelo se řešit problém nízké stability derivátů provedením derivatizace přímo v separační kapiláře během počáteční fáze elektroforetického experimentu [79-81]. Názorné zobrazení použitého uspořádání přináší **Obrázek 16**. Nejprve se hydrodynamicky nadávkuje vzorek následovaný roztokem derivatizačních činidel. Po připojení vysokého napětí dojde ke vpuštění záporně nabitých molekul serinu do zóny činidel a k jejich derivatizaci. Následně vstupuje derivát do základního elektrolytu obsahujícího chirální selektor, kde dochází k dělení enantiomerů.

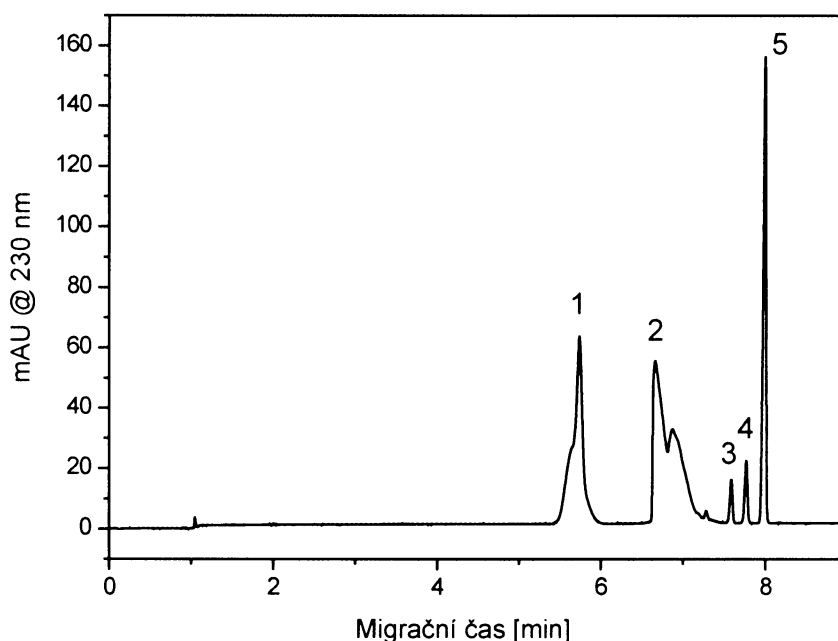


Obrázek 16. Schéma derivatizace serinu uvnitř neupravované křemenné kapiláry. 1 – hydrodynamické dávkování vzorku a derivatizačních činidel, 2 – přiložené napětí vyvolá míchání zón, 3 – 4 – pokračování míchání zón díky rozdílným efektivním pohyblivostem složek vzorku a derivatizačních činidel a současný průběh derivatizační reakce, 5 – separace derivatizovaných složek vzorku; významy symbolů: m_{eff} – elektroforetická pohyblivost složek vzorku (enantiomery serinu a jejich deriváty) směřující k anodě, m_{eof} – pohyblivost elektroosmotického toku směrem ke katodě. Jelikož je m_{eof} v absolutní hodnotě vyšší než m_{eff} , je výsledný směr pohybu analytů ke katodě, t.j. směrem k detektoru.

Derivatizace v separační kapiláře je poměrně složitý proces, který vyžaduje důkladnou optimalizaci. Doba, po níž je vzorek v kontaktu s derivatizačními činidly, je příliš krátká na dosažení úplné reakční přeměny na produkt. Reakce tedy probíhá za nestacionárních podmínek a je potřeba nastavit koncentrace činidel, délky dávkovaných zón či pH roztoku vzorku a činidel tak, aby se získalo dostatečné rozlišení derivatizovaných analytů při vyhovující citlivosti. V konečné podobě vypracované metody byl vzorek z in-vitro enzymatických reakcí obsahující 0 – 500 μM D-serinu spolu s 1 – 100 mM L-serinu ředěn v poměru 1:1 roztokem 50 mM tetraboritanu disodného o pH 9,7, čímž se dosáhlo částečného anionického charakteru aminokyselin. Derivatizační směs obsahovala 30 mM OPA a 60 mM 2-ME rozpuštěné v methanolu smíchaném v poměru 1:1 s 50 mM tetraboritanem disodným. Dávkovací parametry byly pro použitou neupravenou křemennou kapiláru vnitřního průměru 75 μm , efektivní/celkové délky 30/40 cm 10 mBar po 5 s pro vzorek a 10 mBar po 10 s pro derivatizační činidla. Reakční doba byla prodloužena zařazením polovičního separačního napětí (tj. 6 kV) v první minutě

analýzy, poté bylo napětí zvýšeno na 12 kV. Základní elektrolyt byl složen z 50 mM tetraboritanu disodného a 40 mM 2-hydroxypropyl- γ -cyklodextrinu.

Popsanou metodou bylo docíleno úplného rozdělení enantiomerů serinu a též jejich oddělení od zbytků činidel, vedlejších produktů derivatizace a vnitřního standardu glycinu za 8 minut (viz **Obrázek 17**). Citlivost pro UV absorpční detekci při 230 nm činila 3 μ M ve formě LOD a 5 μ M coby LOQ. Správnost metody studovaná jako výtěžnost na třech koncentračních úrovních D-serinu byla v rozmezí 98,2 – 114,3 %. Kalibrační křivky byly sestrojovány z podílu časem korigovaných ploch píků D-serinu a vnitřního standardu glycinu. Kalibrační křivky měřené v koncentračním rozsahu 5 – 500 μ M D-serinu vykazovaly mírně nelineární průběh, který lze přičíst na vrub nestacionárního průběhu reakce a rozdílných reakčních rychlostech D-serinu a glycinu.



Obrázek 17. Chirální separace enantiomerů serinu derivatizovaných o-ftaldialdehydem (OPA) a 2-merkptoethanolem (2-ME). Popis píků: 1 – OPA, 2 – 2-ME, 3 – glycin (vnitřní standard, 0,1 mM), 4 – D-serin (0,16 mM), 5 – L-serin (1 mM). Experimentální podmínky: derivatizace uvnitř kapiláry (podrobnosti viz **VII**), neupravená křemenná kapilára 75/375 μ m vnitřní/vnější průměr, 30/40 cm efektivní/celková délka, zákl. elektrolyt – 50 mM tetraboritan disodný (pH 9,7) + 40 mM 2-hydroxypropyl- γ -cyklodextrin, separační napětí – 12 kV, proud – 100 μ A, detekce – UV absorpční při 230 nm.

Vyvinutá metoda byla s úspěchem použita pro testování účinnosti souboru 80 potenciálních inhibitorů serin racemasy a přinesla jednodušší přípravu vzorků a zhruba třetinovou dobu analýzy v porovnání se zavedenou HPLC metodou (podrobnosti viz práce **VII**).

6 Závěry

Výsledky uvedené v této disertační práci ukazují, že kapilární zónová elektroforéza je vhodná metoda pro analýzu i fyzikálněchemickou charakterizaci biomolekul, což bylo doloženo na příkladech stanovení pK_a ionogenních skupin v řadě nově syntetizovaných fosfinátových pseudopeptidů a dále na separaci diastereoizomerů fosfinátových pseudopeptidů a enantiomerů serinu.

V rámci vypracování ucelené kapilárně-elektroforetické metody pro stanovení pK_a byly prozkoumány vlastnosti základních elektrolytů o různém složení v kyselé oblasti pod pH 2. Byla sestavena a odzkoušena řada základních elektrolytů umožňující měření spolehlivých elektroforetických pohyblivostí látek v rozmezí pH ~ 1,5 – 12. Byl vypracován postup dovolující snadné stanovení průměrné teploty roztoku v separační kapiláře, a tím i zpřesnění měřených elektroforetických pohyblivostí. Dále byl také navržen postup přinášející snížení časových nároků na stanovení pK_a , který zachovává separační účinnost metody a přesnost měřených elektroforetických pohyblivostí a který je založen na vhodném zkombinování rychlosti elektroosmotického toku modifikacemi vnitřního povrchu kapilár a efektivního, tlakem urychleného, stanovování elektroosmotické pohyblivosti.

Studie zaměřená na zkoumání platnosti teoretického Onsagerova modelu, jenž popisuje koncentrační závislost elektroforetických pohyblivostí, pro pohyblivostní data experimentálně stanovená v CZE upozornila na vliv složení základního elektrolytu na naměřené elektroforetické pohyblivosti. Dále bylo shledáno, že přesné přepočty elektroforetických pohyblivostí mezi základními elektrolyty o různých koncentracích jakož i stanovení spolehlivých limitních pohyblivostí iontů se neobejdou bez započtení individuálních parametrů analyzovaných iontů.

Z výzkumu separovatelnosti diastereomerů fosfinátových pseudopeptidů kapilární zónovou elektroforézou v achirálním prostředí lze vyvodit závěr, že k dělení dochází výlučně v pH oblasti, jež se přibližuje k hodnotám pK_a ionizovatelných skupin analytu, přičemž nejvyšší vliv na separaci měla disociace centrální fosfinátové skupiny. Všechny fosfinátové pseudopeptidy bylo možno rozdělit na dvě dvojice diastereomerů, u některých bylo dosaženo úplné separace všech čtyř diastereomerů. Ze srovnání CZE a HPLC separací vyplývá doplňkový charakter obou metod, neboť v průměru vyšších rozlišení diastereomerů bylo sice docíleno v HPLC, avšak v CZE byly rozděleny i diastereomery v HPLC nerozlišené.

Byla vypracována kapilárně-elektroforetická metoda pro stanovení D-serinu využívající derivatizaci analytů v prostoru separační kapiláry, která je použitelná obzvláště pro analýzy vysokého počtu vzorků v komerčních analyzátoch. Metoda byla použita pro testování aktivity řady potenciálních inhibitorů serin racemasy.

7 Literatura

1. Hjertén, S., *Arkiv. Kemi* 1958, 13, 151-152. „Free zone electrophoresis, preliminary note“
2. Hjerten, S., *Chromatogr. Rev.* 1967, 9, 122-219. „Free zone electrophoresis“
3. Everaerts, F. M., Hoving-Keulemans, W. M. L., *Sci. Tools* 1970, 17, 25-28. „Zone electrophoresis in capillary tubes“
4. Virtanen, R., *Acta Polytech. Scand.* 1974, 123, 1-67. „Zone electrophoresis in a narrow-bore tube employing potentiometric detection – a theoretical and experimental study.“
5. Mikkers, F. E. P., Everaerts, F. M., Verheggen, T. P. E. M., *J. Chromatogr.* 1979, 169, 11-20. „High-performance zone electrophoresis“
6. Jorgenson, J. W., Lukacs, K. D., *Anal. Chem.* 1981, 53, 1298-1302. „Zone electrophoresis in open-tubular glass-capillaries“
7. Offord, R. E., *Nature* 1966, 211, 591-593. „Electrophoretic mobilities of peptides on paper and their use in the determination of amide groups“
8. Šolínová, V., Kašička, V., Koval, D., Hlaváček, J., *Electrophoresis* 2004, 25, 2299-2308. „Separation and investigation of structure-mobility relationships of insect oostatic peptides by capillary zone electrophoresis“
9. Newman, J., Thomas-Alyea, K.E., *Electrochemical Systems*, John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey 2004, pp. 99-129.
10. Robinson, R.A., Stokes, R.H., *Electrolyte Solutions*, Dover Publications, Inc., Mineola, New York 2002, pp. 133-173.
11. Li, D. M., Fu, S. L., Lucy, C. A., *Anal. Chem.* 1999, 71, 687-699. „Prediction of electrophoretic mobilities. 3. Effect of ionic strength in capillary zone electrophoresis“
12. Pitts, E., *Proc. R. Soc. Lond.* 1953, 217A, 43-70. „An extension of the theory of the conductivity and viscosity of electrolyte solutions“
13. Survay, M. A., Goodall, D. M., Wren, S. A. C., Rowe, R. C., *J. Chromatogr. A.* 1996, 741, 99-113. „Self-consistent framework for standardising mobilities in free solution capillary electrophoresis: Applications to oligoglycines and oligoalanines“
14. Onsager, L., Fuoss, R. M., *J. Phys. Chem.* 1932, 36, 2689-2778. „Irreversible processes in electrolytes“
15. Newman, J., Thomas-Alyea, K.E., *Electrochemical Systems*, John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey 2004, pp. 241-261.
16. Grossman, P. D., in: Grossman, P. D., Colburn, J. C. (Eds.), *Capillary Electrophoresis*, Academic Press, San Diego 1992, pp. 3-43.
17. Stern, O., *Z. Elektrochem.* 1924, 30, 508-516. „Zur Theorie der Electrolytischen Doppelschicht“
18. Dolník, V., *Electrophoresis* 2004, 25, 3589-3601. „Wall coating for capillary electrophoresis on microchips“

19. Doherty, E. A. S., Meagher, R. J., Albarghouthi, M. N., Barron, A. E., *Electrophoresis* 2003, 24, 34-54. „Microchannel wall coatings for protein separations by capillary and chip electrophoresis”
20. Horváth, J., Dolník, V., *Electrophoresis* 2001, 22, 644-655. „Polymer wall coatings for capillary electrophoresis”
21. Kenndler, E., in: Khaledi, M. G. (Ed.), *High-Performance Capillary Electrophoresis: Theory, Techniques, and Applications*, John Wiley&Sons Inc., New York 1998, pp. 25-76.
22. Ghosal, S., *Electrophoresis* 2004, 25, 214-228. „Fluid mechanics of electroosmotic flow and its effect on band broadening in capillary electrophoresis”
23. Gaš, B., Kenndler, E., *Electrophoresis* 2002, 23, 3817-3826. „Peak broadening in microchip electrophoresis: A discussion of the theoretical background”
24. Gaš, B., Kenndler, E., *Electrophoresis* 2000, 21, 3888-3897. „Dispersive phenomena in electromigration separation methods”
25. Gaš, B., Štědrý, M., Kenndler, E., *Electrophoresis* 1997, 18, 2123-2133. „Peak broadening in capillary zone electrophoresis”
26. Foret, F., Křivánková, L., and Boček, P., *Capillary zone electrophoresis*, Verlag Chemie, Weinheim 1993, pp. 37-54
27. Xuan, X. C., Li, D. Q., *Electrophoresis* 2005, 26, 166-175. „Band-broadening in capillary zone electrophoresis with axial temperature gradients”
28. Gaš, B., *J. Chromatogr.* 1993, 644, 161-174. „Axial Temperature Effects in Electromigration”
29. Beckers, J. L., Boček, P., *Electrophoresis* 2003, 24, 518-535. „The preparation of background electrolytes capillary zone electrophoresis: Golden rules and pitfalls”
30. Štědrý, M., Jaroš, M., Gaš, B., *J. Chromatogr. A* 2002, 960, 187-198. „Eigenmobilities in background electrolytes for capillary zone electrophoresis - I. System eigenpeaks and resonance in systems with strong electrolytes”
31. Gaš, B., Jaroš, M., Hruška, V., Zusková, I., Štědrý, M., *Lc Gc Europe* 2005, 18, 282-288. „PeakMaster - A freeware simulator of capillary zone electrophoresis”
32. Jaroš, M., Hruška, V., Štědrý, M., Zusková, I., Gaš, B., *Electrophoresis* 2004, 25, 3080-3085. „Eigenmobilities in background electrolytes for capillary zone electrophoresis: IV. Computer program PeakMaster”
33. Gaš, B., Kenndler, E., *Electrophoresis* 2004, 25, 3901-3912. „System zones in capillary zone electrophoresis”
34. McLaughlin, G. M., Anderson, K. W., Hauffe, D. K., in: Khaledi, M. G. (Ed.), *High-Performance Capillary Electrophoresis*, John Wiley&Sons Inc., New York 1998, pp. 637-681.
35. Regnier, F. E., Lin, S., in: Khaledi, M. G. (Ed.), *High-Performance Capillary Electrophoresis: Theory, Techniques, and Applications*, John Wiley&Sons Inc., New York 1998, pp. 683-727.
36. Minárik, M., Gaš, B., Rizzi, A., Kenndler, E., *J. Capillary. Electrophor.* 1995, 2, 89-96. „Plate Height Contribution From Wall Adsorption in Capillary Zone Electrophoresis of Proteins”

37. Schure, M. R., Lenhoff, A. M., *Anal. Chem.* 1993, 65, 3024-3037. „Consequences of Wall Adsorption in Capillary Electrophoresis - Theory and Simulation"
38. Herr, A. E., Molho, J. I., Santiago, J. G., Mungal, M. G., Kenny, T. W., Garguilo, M. G., *Anal. Chem.* 2000, 72, 1053-1057. „Electroosmotic capillary flow with nonuniform zeta potential"
39. Potoček, B., Gaš, B., Kenndler, E., Štědrý, M., *J. Chromatogr. A.* 1995, 709, 51-62. „Electroosmosis in capillary zone electrophoresis with non- uniform zeta potential"
40. Urbánek, M., Křivánková, L., Boček, P., *Electrophoresis* 2003, 24, 466-485. „Stacking phenomena in electromigration: From basic principles to practical procedures"
41. Chien, R. L., *Electrophoresis* 2003, 24, 486-497. „Sample stacking revisited: A personal perspective"
42. Britz-McKibbin, P., Terabe, S., *J. Chromatogr. A* 2003, 1000, 917-934. „On-line preconcentration strategies for trace analysis of metabolites by capillary electrophoresis"
43. Grushka, E., *J. Chromatogr.* 1991, 559, 81-93. „Effect of Hydrostatic Flow on the Efficiency in Capillary Electrophoresis"
44. Jussila, M., Palonen, S., Porras, S. P., Riekkola, M. L., *Electrophoresis* 2000, 21, 586-592. „Compensation of the siphoning effect in nonaqueous capillary electrophoresis by vial lifting"
45. Mol, R., de Jong, G. J., Somsen, G. W., *Electrophoresis* 2005, 26, 146-154. „On-line capillary electrophoresis-mass spectrometry using dopant-assisted atmospheric pressure photoionization: Setup and system performance"
46. Cohen, N., Grushka, E., *J. Chromatogr. A.* 1994, 684, 323-328. „Influence of the capillary edge on the separation efficiency in capillary electrophoresis"
47. Culbertson, C. T., Jacobson, S. C., Ramsey, J. M., *Anal. Chem.* 1998, 70, 3781-3789. „Dispersion sources for compact geometries on microchips"
48. Kašička, V., Prusík, Z., Gaš, B., Štědrý, M., *Electrophoresis* 1995, 16, 2034-2038. „Contribution of capillary coiling to zone dispersion in capillary zone electrophoresis"
49. Weinberger, R., *Practical Capillary Electrophoresis*, Academic Press, Inc., San Diego, 1993, pp. 17-43.
50. Hirokawa, T., Nishino, M., Kiso, Y., *J. Chromatogr.* 1982, 252, 49-65. „Isotachophoretic determination of mobility and pKa by means of computer simulation II. Evaluation of m_0 and pKa of 65 anions"
51. Hirokawa, T., Nishino, M., Aoki, N., Kiso, Y., Sawamoto, Y., Yagi, T., Akiyama, J.-I., *J. Chromatogr. (Chromatographic Data)* 1983, 271, D1-D106. „Table of isotachophoretic indices. I. Simulated qualitative and quantitative indices of 287 anionic substances in the range pH 3- 10"
52. Hirokawa, T., Kobayashi, S., Kiso, Y., *J. Chromatogr.* 1985, 318, 195-210. „Isotachophoretic determination of mobility and pKa by means of computer simulation III. Evaluation of mobility and pKa of fifteen nucleotides and seven phosphorus oxoacids and their isotachophoretic separation"
53. Hirokawa, T., Gojo, T., Kiso, Y., *J. Chromatogr.* 1986, 369, 59-81. „Isotachophoretic determination of mobility and pKa by means of computer simulation IV. Evaluation of m_0 and pKa of twenty-six amino acids and assessment of the separability"

54. Hirokawa, T., Gojo, T., Kiso, Y., *J. Chromatogr.* 1987, 390, 201-223. „Isotachophoretic determination of mobility and pKa by means of computer simulation. V. Evaluation of μ and pKa of twenty-eight dipeptides and assessment of separability"
55. Včeláková, K., Zusková, I., Kenndler, E., Gaš, B., *Electrophoresis* 2004, 25, 309-317. „Determination of cationic mobilities and pK(a) values of 22 amino acids by capillary zone electrophoresis"
56. Roy, K. I., Lucy, C. A., *J. Chromatogr. A* 2002, 964, 213-225. „Capillary electrophoresis in aqueous-organic media Ionic strength effects and limitations of the Hubbard-Onsager dielectric friction model"
57. Včeláková, K., Zusková, I., Porras, S. P., Gaš, B., Kenndler, E., *Electrophoresis* 2005, 26, 463-472. „Analyte and system eigenpeaks in nonaqueous capillary zone electrophoresis: Theoretical description and experimental confirmation with methanol as solvent"
58. Porras, S. P., Riekkola, M. L., Kenndler, E., *J. Chromatogr. A* 2001, 924, 31-42. „Electrophoretic mobilities of cationic analytes in non-aqueous methanol, acetonitrile and their mixtures - Influence of ionic strength and ion-pair formation"
59. Roy, K. I., Lucy, C. A., *Electrophoresis* 2002, 23, 383-392. „Dielectric friction as a mechanism for selectivity alteration in capillary electrophoresis using acetonitrile-water media"
60. Roy, K. I., Lucy, C. A., *Anal. Chem.* 2001, 73, 3854-3861. „Dielectric friction in capillary electrophoresis: Mobility of organic anions in mixed methanol-water media"
61. Beckers, J. L., Everaerts, F. M., Ackermans, M. T., *J. Chromatogr.* 1991, 537, 407-428. „Determination of Absolute Mobilities, pK Values and Separation Numbers by Capillary Zone Electrophoresis - Effective Mobility As a Parameter for Screening"
62. B'Hymer, C., Montes-Bayon, M., Caruso, J. A., *J. Sep. Sci.* 2003, 26, 7-19. „Marfey's reagent: Past, present, and future uses of 1-fluoro-2,4-dinitrophenyl-5-L-alanine amide"
63. Chankvetadze, B., *Capillary electrophoresis in chiral analysis*, John Wiley&Sons, Chichester 1997.
64. Scriba, G. K. E., *Electrophoresis* 2006, 27, 222-230. „Recent advances in peptide and peptidomimetic stereoisomer separations by capillary electromigration techniques"
65. Czerwenka, C., Lindner, W., *Anal. Bioanal. Chem.* 2005, 382, 599-638. „Stereoselective peptide analysis"
66. Rizzi, A., *Electrophoresis* 2001, 22, 3079-3106. „Fundamental aspects of chiral separations by capillary electrophoresis"
67. Wan, H., Blomberg, L. G., *J. Chromatogr. A* 2000, 875, 43-88. „Chiral separation of amino acids and peptides by capillary electrophoresis"
68. Vespalec, R., Boček, P., *Chem. Rev.* 2000, 100, 3715-3753. „Chiral separations in capillary electrophoresis"
69. Collinsová, M., Jiráček, J., *Curr. Med. Chem.* 2000, 7, 629-647. „Phosphinic acid compounds in biochemistry, biology and medicine"

70. Collinsová, M., Castro, C., Garrow, T. A., Yiotakis, A., Dive, V., Jiráček, J., *Chemistry & Biology* 2003, 10, 113-122. „Combining combinatorial chemistry and affinity chromatography: Highly selective inhibitors of human betaine: Homocysteine S- methyltransferase”
71. Grams, F., Dive, V., Yiotakis, A., Yiallourous, I., Vassiliou, S., Zwilling, R., Bode, W., Stocker, W., *Nature Struct. Biol.* 1996, 3, 671-675. „Structure of astacin with a transition-state analogue inhibitor”
72. Dean, J.A. (Ed.), *Lange's Handbook of Chemistry 15th Edition*, McGraw-Hill, New York 1999.
73. Williams, B. A., Vigh, C., *Anal. Chem.* 1996, 68, 1174-1180. „Fast, accurate mobility determination method for capillary electrophoresis”
74. Sandoval, J. E., Chen, S. M., *Anal. Chem.* 1996, 68, 2771-2775. „Method for the accelerated measurement of electroosmosis in chemically modified tubes for capillary electrophoresis”
75. Plasson, R., Cottet, H., *Anal. Chem.* 2005, 77, 6047-6054. „Determination of homopolypeptide conformational changes by the modeling of electrophoretic mobilities”
76. Barták, P., Bednář, P., Stránský, Z., Boček, P., Vespalec, R., *J. Chromatogr. A* 2000, 878, 249-259. „Determination of dissociation constants of cytokinins by capillary zone electrophoresis”
77. Poinso, W., Lacroix, M., Maury, D., Chataigne, G., Feurer, B., Couderc, F., *Electrophoresis* 2006, 27, 176-194. „Recent advances in amino acid analysis by capillary electrophoresis”
78. O'Brien, K. B., Esguerra, M., Klug, C. T., Miller, R. F., Bowser, M. T., *Electrophoresis* 2003, 24, 1227-1235. „A high-throughput on-line microdialysis-capillary assay for D- serine”
79. Nováková, S., Van Dyck, S., Van Schepdael, A., Hoogmartens, J., Glatz, Z., *J. Chromatogr. A* 2004, 1032, 173-184. „Electrophoretically mediated microanalysis”
80. Ptolemy, A. S., Britz-McKibbin, P., *J. Chromatogr. A* 2006, 1106, 7-18. „Sample preconcentration with chemical derivatization in capillary electrophoresis - Capillary as preconcentrator, microreactor and chiral selector for high-throughput metabolite screening”
81. Zhang, J., Hoogmartens, J., Van Schepdael, A., *Electrophoresis* 2006, 27, 35-43. „Advances in capillary electrophoretically mediated microanalysis: An update”

8 Seznam publikací

a) Publikace v recenzovaných časopisech – hlavní autor

1. Koval, D., Kašička, V., Zusková, I., *Electrophoresis* 2005, 26, 3221-3231. „Investigation of the effect of ionic strength of Tris-acetate background electrolyte on electrophoretic mobilities of mono-, di-, and trivalent organic anions by capillary electrophoresis“
2. Koval, D., Kašička, V., Jiráček, J., Collinsová, M., *J. Sep. Sci.* 2003, 26, 653-660. „Separation of diastereomers of phosphinic pseudopeptides by capillary zone electrophoresis and reverse phase high-performance liquid chromatography“
3. Koval, D., Kašička, V., Jiráček, J., Collinsová, M., *Electrophoresis* 2003, 24, 774-781. „Physicochemical characterization of phosphinic pseudopeptides by capillary zone electrophoresis in highly acidic background electrolytes“
4. Koval, D., Kašička, V., Jiráček, J., Collinsová, M., Garrow, T. A., *J. Chromatogr. B* 2002, 770, 145-154. „Determination of dissociation constant of phosphinate group in phosphinic pseudopeptides by capillary zone electrophoresis“
5. Koval, D., Kašička, V., Jiráček, J., Collinsová, M., Garrow, T. A., *Electrophoresis* 2002, 23, 215-222. „Analysis and characterization of phosphinic pseudopeptides by capillary zone electrophoresis“

b) Publikace v recenzovaných časopisech – spoluautor

1. Šolínová, V., Kašička, V., Koval, D., Česnek, M., Holý, A., *Electrophoresis* 2006, 27, 1006-1019. „Determination of acid-base dissociation constants of amino- and guanidinopurine nucleotide analogs and related compounds by capillary zone electrophoresis“
2. Šolínová, V., Kašička, V., Koval, D., Hlaváček, J., *Electrophoresis* 2004, 25, 2299-2308. „Separation and investigation of structure-mobility relationships of insect oostatic peptides by capillary zone electrophoresis“
3. Šolínová, V., Kašička, V., Koval, D., Barth, T., Cencialová, A., Žáková, L., *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 2004, 808, 75-82. „Analysis of synthetic derivatives of peptide hormones by capillary zone electrophoresis and micellar electrokinetic chromatography with ultraviolet-absorption and laser-induced fluorescence detection“
4. Sázellová, P., Kašička, V., Koval, D., Peltre, G., *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 2004, 808, 117-123. „Analysis of liquid extracts from tree and grass pollens by capillary electromigration methods“

5. Sázelová, P., Kašička, V., Koval, D., Kilár, F., Knopp, D., Peltre, G., *J. Chromatogr. A* 2003, 990, 303-309. „Analysis of water extracts from airborne dust samples by capillary isotachopheresis”
6. Sázelová, P., Kašička, V., Koval, D., Prusík, Z., Peltre, G., *J. Chromatogr. B* 2002, 770, 303-311. „Evaluation of the efficiency of extraction of ultraviolet- absorbing pollen allergens and organic pollutants from airborne dust samples by capillary electromigration methods”

c) Příspěvky na konferencích – plakátová sdělení

1. Koval, D., Jirásková, J., Stříšovský, K., Konvalinka, J., Kašička, V.: „Determination of D-serine by capillary electrophoresis”, 20th Int. Symp. on Microscale Bioseparations (formerly HPCE series), MSB 2006, 22-26.1.2006, Amsterdam, NL, Book of Abstracts, G. Rozing, M. Rozing (Eds.), published by HPCE 2006 Foundation, Amsterdam 2006, NL, PF06, p. 257.
2. Koval, D., Kašička, V., Jiráček, J., Collinsová, M.: „Determination of dissociation constants of phosphinic pseudopeptides by capillary zone electrophoresis”, 4th Int. Symp. on Separations in the BioSciences, SBS 2005, 18-21.9.2005, Utrecht, The Netherlands, Program & Abstracts, P505, p. 135.
3. Koval, D., Kašička, V., Jiráček, J., Collinsová, M.: „Determination of dissociation constants of phosphinic pseudopeptides by capillary zone electrophoresis”, 11th Int. Symp. on Separation Sciences, ISSS 2005, 12-14.9.2005, Pardubice, Czech Rep., Book of Abstracts, P10-Tu, p. 220-221.
4. Koval, D., Jirásková, J., Stříšovský, K., Konvalinka, J., Kašička, V.: „Capillary electrophoresis assay for D-serine”, Czech and Slovak National Conference, Biologically Active Peptides IX, 20-22.4.2005, Praha, ČR, Program & Abstracts, J. Slaninová, M. Collinsová, L. Žáková (Eds.), published by IOCB ASCR, Prague, 2005 p. 28.
5. Koval, D., Jirásková, J., Stříšovský, K., Konvalinka, J., Kašička, V.: „Capillary electrophoresis assay for D-serine”, Konference Pokroky v chromatografii a elektroforéze 2005 a Chiral 2005, Olomouc, 7-10.2.2005, Sborník Abstrakt, Gavenda A., Ševčík J. (Eds.), vydala Univ. Palackého v Olomouci, 2005, str. 78.
6. Koval, D., Kašička, V., Jiráček, J., Collinsová, M.: „Determination of pKa values of acidic phosphinic pseudopeptides by capillary zone electrophoresis with reversed electroosmotic flow”, 14th Int. Symp. on Capillary Electroseparation Techniques, 12-15.9.2004, Rome, Italy, Abstracts Book, P 53.
7. Koval, D., Kašička, V., Jiráček, J., Collinsová, M.: „Determination of dissociation constants of polyprotic compounds by capillary zone electrophoresis”, 17th Int. Symp. on Microscale

Separations and Capillary Electrophoresis, 8-12.2.2004, Salzburg, Austria. Book of abstracts, P185, pp. 167-168.

8. Koval, D., Kašička, V., Jiráček, J., Collinsová, M.: „Separation of phosphinic pseudopeptide diastereomers by CZE and RP-HPLC, „100 years of chromatography“, 3rd Int. Symp. on Separations in BioSciences, SBS '03, 13-18.5.2003, Moscow, Russia; Program, Abstracts, P-152, p. 260.
9. Koval, D., Kašička, V., Jiráček, J., Collinsová, M.: „CZE in highly acidic background electrolytes – suitable tool for determination of low pKa values“, 13th Int. Symp. on Capillary Electro-separation Techniques, ITP 2002, Helsinki, Finland, 1-4.9.2002, Book of Abstracts, P3, p. 47.
10. Koval, D., Kašička, V., Jiráček, J., Collinsová, M.: „Kapilární elektroforéza v silně kyselých elektrolytových systémech – využití pro fyzikálněchemickou charakterizaci pseudopeptidů“, Konference Pokroky v chromatografii a elektroforéze 2002 a Chiralnality 2002, Olomouc, 24-27.6.2002, Sborník Abstrakt, A. Gavenda, J. Ševčík (Eds.), Alga Press 2002, Olomouc, str. 76.
11. Koval, D., Kašička, V., Jiráček, J., Collinsová, M., Garrow, T.A.: „Physicochemical characterization of phosphinic pseudopeptides by capillary zone electrophoresis“, 2nd Int. Symp. Separations in the BioSciences, SBS 2001, Prague, CR, 17-20.9.2001, Book of Abstracts, P38, p. 98.
12. Koval, D., Jiráček, J., Collinsová, M., Kašička, V.: „Analysis and characterization of phosphinic pseudopeptides by capillary zone electrophoresis“, ICES 2001, An Electrophoretic Odyssey, Verona, Italy, June 10-13, 2001, Abstracts Volume, CE12, p. 74.
13. Koval, D., Jiráček, J., Collinsová, M., Kašička, V.: „Analýza a charakterizace fosfinátových pseudopeptidů kapilární elektroforézou“; Věd. konference Biologicky aktivní peptidy VII, 25-27.4.2001, Praha, Věd. program a sborník, J. Slaninová, M. Collinsová (Eds.), vydal ÚOCHB AV ČR, 2001, p. 35.

Příloha: Publikace I - VII



Dušan Koval¹
Václav Kašička¹
Jiří Jiráček¹
Michaela Collinsová¹
Timothy A. Garrow²

¹Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, Czech Republic

²Department of Food Science and Human Nutrition, University of Illinois, Urbana, IL, USA

Analysis and characterization of phosphinic pseudopeptides by capillary zone electrophoresis

Capillary zone electrophoresis (CZE) was applied to analysis and characterization of phosphinic pseudopeptides with the general structure N -Ac-Val-Ala ψ (PO_2^- - CH_2)Leu-Xaa- NH_2 , where Xaa represents one of 20 proteinogenic amino acid residues. Pseudopeptides containing neutral or acidic amino acid residues in position Xaa were analyzed as anions in weakly alkaline (pH 8.1) Tris-Tricine background electrolyte (BGE), pseudopeptides with basic amino acid residues in position Xaa were analyzed as cations in acid BGEs (Tris-phosphate buffers). Acidity of phosphinic acid moiety in peptides with basic amino acid residues was determined from the dependence of effective mobility of these peptides on pH in the acid pH region (pH 1.4–2.8). Additionally, separation of diastereomers of some peptides was achieved.

Keywords: Phosphinic pseudopeptides / Phosphinate / Capillary zone electrophoresis / Dissociation constant determination / pK_a determination
EL 4757

1 Introduction

Phosphinic pseudopeptides represent a class of peptide isosteres where one peptide bond is substituted by enzymatically nonhydrolysable phosphinic acid moieties $-\text{PO}_2^- - \text{CH}_2 -$ or $-\text{PO}_2^- -$ [1]. These compounds are intensively studied because of their promising biological activities based on their mimicking of the substrate transition state for at least two classes of hydrolytic enzymes – Zn-metalloproteinases and aspartic acid proteinases [1, 2]. Capillary zone electrophoresis (CZE) is currently widely used for high-performance separations of various peptides [3] including phosphopeptides, *i.e.* peptides containing phosphate esterified to the hydroxyl group of amino acids serine, tyrosine and threonine. Analyses of synthetic phosphopeptides [4, 5] and of phosphopeptides often originating from hydrolysis of casein [6–9] have been reported. However, CZE analyses of peptides with phosphorus within the peptide chain have not been reported as yet to our knowledge. Two papers dealing with structures partially similar to pseudopeptides appeared when chiral analyses of various phosphonic and phosphinic acid analogues of phenylalanine and phenylglycine were performed [10, 11].

The aim of this study is to extend the applicability of CZE for the analysis of phosphinic pseudopeptides of the general structure N -Ac-Val-Ala ψ (PO_2^- - CH_2)Leu-Xaa- NH_2 ,

where Xaa represents one of 20 proteinogenic amino acid residues (see Table 1) and for the determination of the dissociation constant of the phosphinic acid group in the peptide chain. CZE is a suitable method for dissociation constant determination [12–18] since this technique offers several advantages over commonly used methods such as potentiometric titration and ultraviolet spectroscopy. CZE is capable to overcome drawbacks, such as low solubility in water or purity of compounds, which one can meet by the above-mentioned techniques. Moreover, CZE demands expressively lower amounts of analyte.

2 Materials and methods

2.1 Reagents and chemicals

All chemicals were of analytical reagent grade. Phosphoric acid, potassium chloride and dimethyl sulfoxide (DMSO) were obtained from Lachema (Brno, Czech Republic), Tris and N -[tris(hydroxymethyl)methyl]glycine Tricine were from Serva (Heidelberg, Germany), isophorone (3,5,5-trimethyl-2-cyclohexen-1-one) was from Fluka (Buchs, Switzerland). Phosphinic pseudopeptides were synthesized on a Rink Amide AM resin (Calbiochem-Novabiochem, L aufelfingen, Switzerland) following the procedure of Yiotakis *et al.* [19]. The protected phosphinic pseudopeptides precursor Fmoc-Ala ψ [PO(OAd)- CH_2]Leu-OH was a kind gift of Dr. Vincent Dive from Département d'Ingénierie et d'Etudes des Prot eines, CEA-Saclay, (Gif sur Yvette, France). Prior to CZE analyses, the pseudo-peptides were purified by HPLC using a Vydac C18 218TP510 column and characterized by mass spectrometry and amino acid analysis.

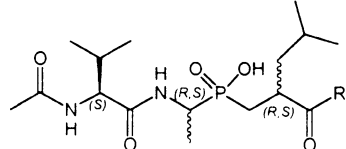
Correspondence: Dr. Václav Kašička, Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Flemingovo nám. 2, CZ-166 10 Prague 6, Czech Republic

E-mail: kasicka@uochb.cas.cz

Fax: +420-2-33323956

Table 1. Analyzed pseudopeptidesGeneral sequence: N-Ac-Val-Ala ψ (PO₂⁻-CH₂)Leu-Xaa-NH₂

Structural formula:



Pseudopeptide ^{a)}	-R	Pseudopeptide ^{a)}	-R
VG		VA	
VV		VI	
VL		VS	
VP		VT	
VC		VM	
VF		VY	
VW		VH	
VR		VK	
VN		VQ	
VD		VE	

a) Pseudopeptides are indicated by a single letter code of their *N*- and *C*-terminal amino acid residues.

2.2 Electrophoretic conditions

CZE experiments were carried out in a home made apparatus equipped with a UV detector monitoring absorbance at 206 nm. Data acquisition and handling were performed using the CSW Chromatography Station (DataApex, Prague, Czech Republic). Untreated fused silica capillaries (50 μ m ID, 200 μ m OD, 300 mm total length, 190 mm effective length) were supplied by the Institute of Glass and Ceramics Materials, Czech Academy of Sciences (Prague, Czech Republic). Separations were performed at ambient temperature (22–24°C). Pseudopeptides were dissolved in deionised water in a concentration range of 0.9–1.6 mM and were introduced into the capillary hydrodynamically (pressure 700 Pa for 10 s). In

order to equilibrate the capillary, the following wash cycle was performed. The new capillary was flushed sequentially with water for 5 min, 0.1 M NaOH for 5 min, and water again for 2 min, followed by the background electrolyte (BGE) for 2 min. Then, the BGE was left in the capillary overnight to stabilize the electroosmosis. After rinsing the capillary with BGE for 0.5 min, it was conditioned by applying for 20 min the same high voltage as used in the respective runs. Between runs at the same pH, the capillary was rinsed with the BGE for 0.5 min. Before any change of the BGE, the capillary was reactivated by washing with 0.1 M NaOH for 5 min and then stabilized using the above procedure. BGE solutions were prepared from deionised water and filtered through a 0.45 μ m filter (Millipore, Bedford, MA, USA) before use. A BGE composed of 40 mM Tris and 40 mM Tricine, pH 8.1, was selected for analyses and purity degree determination of peptides with neutral or acid amino acid residues in position *R*. BGEs for pK_a determination were prepared from Tris and phosphoric acid as shown in Table 2. Ionic strength of the BGEs was 25 mM except those composed of pure phosphoric acid. The higher ionic strength of phosphoric acid BGEs was unavoidable in order to reach pH values below 1.7.

2.3 Effective electrophoretic mobility determination

The effective electrophoretic mobility, m_{eff} , was determined from measurement of migration times of analyte t_{mig} and of neutral marker t_{eof} . In all experiments, either DMSO or isophorone were used as electroosmotic flow markers and m_{eff} was calculated from Eq. (1)

$$m_{\text{eff}} = \frac{L_t L_d}{U} \left(\frac{1}{t_{\text{mig}}} - \frac{1}{t_{\text{eof}}} \right) \quad (1)$$

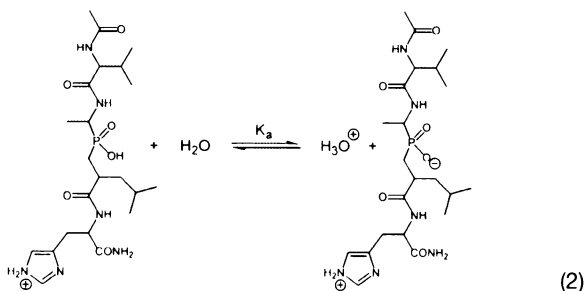
where L_t and L_d are the total and effective capillary length, respectively, and U is the applied separation voltage.

Table 2. pH, composition and ionic strength of the BGEs, separation voltage and input power used for phosphinate pK_a determination

pH	Phosphoric acid (mM)	Tris (mM)	Ionic strength (mM)	Voltage (kV)	Input power (Wm ⁻¹)
1.42	250	0	46	3.50	0.55
1.55	150	0	34	3.30	0.35
1.65	100	0	27	3.30	0.26
1.80	74	7	25	3.90	0.25
2.00	55	14	25	4.75	0.26
2.20	45	18	25	5.55	0.26
2.40	37	20	25	6.48	0.26
2.80	30	24	25	7.80	0.26

2.4 Theoretical

The dissociation constant of the phosphinate group was determined in the pseudopeptides containing in position *R* residues of basic amino acids of lysine, arginine and histidine (see Table 1). In these peptides, the negative charge originates from the phosphinate group and the positive charge from the side chain of basic amino acid. The dissociation equilibrium of the phosphinic acid group in a pseudopeptide (VH taken as example) can be presented as follows:



The thermodynamic dissociation constant K_a can be expressed as

$$K_a = \frac{a_{\text{H}_3\text{O}^+} a_{\text{A}^- \text{BH}^+}}{a_{\text{HABH}^+}} = \frac{a_{\text{H}_3\text{O}^+} [\text{A}^- \text{BH}^+]}{[\text{HABH}^+]} \gamma_{\text{A}^- \text{BH}^+} \gamma_{\text{HABH}^+} \quad (3)$$

where $a_{\text{H}_3\text{O}^+}$ is the activity of hydroxonium ions, $a_{\text{A}^- \text{BH}^+}$ and a_{HABH^+} are activities of the zwitterionic and cationic form of the pseudopeptide, respectively. Activities of species $\text{A}^- \text{BH}^+$ and HABH^+ can be expressed as a product of their concentrations $[\text{A}^- \text{BH}^+]$, $[\text{HABH}^+]$ and corresponding activity coefficients $\gamma_{\text{A}^- \text{BH}^+}$ and γ_{HABH^+} . The activity coefficient of zwitterionic and generally uncharged species $\text{A}^- \text{BH}^+$ is assumed to be equal to 1. The value of the activity coefficient of charged species for aqueous solutions at 25°C can be evaluated according to Debye-Hückel:

$$-\log \gamma = \frac{0.5085z^2 \sqrt{I}}{1 + 3.281a\sqrt{I}} \quad (4)$$

where z is the charge, a the effective hydrated diameter (nm) and I the ionic strength of the solution (mol dm^{-3}) defined as:

$$I = \frac{1}{2} \sum_i c_i z_i^2 \quad (5)$$

where c_i is molarity (mol dm^{-3}) and z_i is the charge of i th ion in the solution. As hydrated diameters of ions are seldom exactly known, the approximative value of $a = 0.5$ nm was used for calculations of activity coefficients in this paper.

It is favorable to define the apparent acidity constant K'_a as:

$$K'_a = \frac{a_{\text{H}_3\text{O}^+} [\text{A}^- \text{BH}^+]}{[\text{HABH}^+]} \quad (6)$$

The substitution of Eq. (6) in Eq. (3) with respect to unity value of $\gamma_{\text{A}^- \text{BH}^+}$ gives:

$$pK_a = pK'_a + \log \gamma_{\text{HABH}^+} \quad (7)$$

The effective electrophoretic mobility of analyzed pseudopeptides containing a basic amino acid residue, m_{eff} , at low pH where the basic group is fully protonated can be expressed as:

$$m_{\text{eff}} = \alpha m_{\text{HABH}^+} + (1 - \alpha) m_{\text{A}^- \text{BH}^+} \quad (8)$$

where m_{HABH^+} and $m_{\text{A}^- \text{BH}^+}$ are the electrophoretic mobilities of respective species, α is the degree of dissociation defined as:

$$\alpha = \frac{[\text{HABH}^+]}{[\text{HABH}^+] + [\text{A}^- \text{BH}^+]} \quad (9)$$

As the electrophoretic mobility of the zwitterion $\text{A}^- \text{BH}^+$ is equal to 0, Eqs. (8) and (9) can be combined to

$$\frac{[\text{A}^- \text{BH}^+]}{[\text{HABH}^+]} = \frac{m_{\text{HABH}^+} - m_{\text{eff}}}{m_{\text{eff}}} \quad (10)$$

Substitution of this ratio in Eq. (6) by that in Eq. (10) gives:

$$m_{\text{eff}} = \frac{m_{\text{HABH}^+}}{1 + 10^{(\text{pH} - \text{p}K'_a)}} \quad (11)$$

Equation (11) is a particular case of the Boltzman sigmoidal decay function of the general form

$$y = \frac{A_1 - A_2}{1 + e^{\frac{x-x_0}{dx}}} + A_2 \quad (12)$$

where x is the independent variable, and y the dependent variable. The constants A_1 and A_2 are the initial ($y(-\infty)$) and final ($y(+\infty)$) values of the dependent variable, respectively; x_0 is center and dx is the width of the sigmoidal curve.

When Eq. (12) is modified for dependence of effective electrophoretic mobility m_{eff} on pH, the following equation is obtained:

$$m_{\text{eff}} = \frac{m_1 - m_0}{1 + e^{\frac{\text{pH} - \text{p}K'_a}{d\text{pH}}}} + m_0 \quad (13)$$

where m_0 and m_1 are the electrophoretic mobilities of the deprotonated and protonated form of compound taking part in the dissociation equilibrium, respectively. Equation (13) represents a general mathematical model for determination of $\text{p}K_a$ values by the fitting of experimental data.

3 Results and discussion

3.1 Analysis and mobility determination

The suitable CZE separation conditions for analysis of pseudopeptides were selected taking into account their specific structure, *i.e.* the presence of an anionogenic phosphinate group in all peptides and other sources of electric charge originating from ionogenic groups of the amino acid residues in position *R*, as can be seen from the structures given in Table 1. Most of the pseudopeptides were successfully analyzed at weakly alkaline conditions in a BGE consisting of 40 mM Tris and 40 mM Tricine, pH 8.1. The separation voltage was 10 kV and the current 7.5 μ A. The purity degree based on the relative peak area and the effective mobilities of pseudopeptides are given in Table 3.

Pseudopeptides with positively charged basic amino acid residues of lysine (VK) and arginine (VR) in position *R* could not be analyzed at this pH due to compensation of their positive charge by negative charge of the phosphinate group resulting in zero effective charge. The pseudopeptide with the basic amino acid residue histidine (VH) in position *R* migrated with an effective mobility slightly lower than did the whole group of peptides containing neutral amino acid residues in position *R*. This indicates a high degree of deprotonation of the imidazole group of histidine at this pH, which is in agreement with the average pK_a value of histidine in a polypeptide chain ($pK_a \sim 6$). On the other hand, pseudopeptides containing the negatively charged acid amino acid residues of aspartate (VD) and glutamate (VE) exhibited a distinctly higher effective

mobility. This is in accordance with anticipation, since these peptides are double-negatively charged. Typical electropherograms of all three subgroups of the whole set of the pseudopeptides with neutral, basic and acid amino acid residues in position *R* are given in Fig. 1.

The pseudopeptides were synthesized as mixtures of four diastereomers, the structures of which are presented in Table 1. Diastereomers, which have different physicochemical properties, are in general separable in achiral conditions. However, separation of all four diastereomers was not achieved for any of the pseudopeptides and only a few (VG, VC and VH) were separated into two diastereomeric pairs in the alkaline BGE. Analyses with acid BGEs led to separation to diastereomeric pairs for all analyzed pseudopeptides (VK, VR, VH); an example of such separation is presented in Fig. 2.

3.2 Dissociation constant determination

Three pseudopeptides with the basic amino acid residues lysine (VK), arginine (VR) and histidine (VH) in the molecule were selected for dissociation constant determination of their phosphinate group. It is possible to analyze the selected pseudopeptides as cations at pH around the phosphinate pK_a value, which is estimated to be 1.8 in related compounds [2]. Although the pH range for obtaining mobility data for pK_a determination should cover about 2 pH units both above and below the expected pK_a , it was not possible to follow this recommendation in our case due to the relatively low pK_a value of the phosphinate group. CZE experiments in untreated fused-silica

Table 3. Purity degrees based on relative peak area and effective electrophoretic mobilities of analyzed pseudopeptides

Pseudo-peptide ^{a)}	m_{eff} ($10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$)	Purity degree	Pseudo-peptide ^{a)}	m_{eff} ($10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$)	Purity degree
VG	-14.3; -21.5 ^{b)}	94.0%	VF	-12.9	95.1%
VA	-14.1	98.5%	VY	-13.1	94.9%
VV	-13.7	98.5%	VW	-12.7	99.1%
VI	-13.1	99.8%	VH	-11.9; -12.6 ^{b)}	98.2%
VL	-13.3	97.4%	VR	- ^{c)}	–
VS	-13.6	98.7%	VK	- ^{c)}	–
VP	-13.5	89.9%	VN	-13.8	99.2%
VT	-13.5	94.8%	VQ	-13.4	96.5%
VC	-13.9; -17.0 ^{b)}	99.6%	VD	-24.5	88.1%
VM	-13.6	98.8%	VE	-24.2	98.9%

a) Pseudopeptides are indicated by single letter code of their *N*- and *C*- terminal amino acid residues

b) Effective mobilities of two separated diastereomeric pairs

c) Mobility close to zero

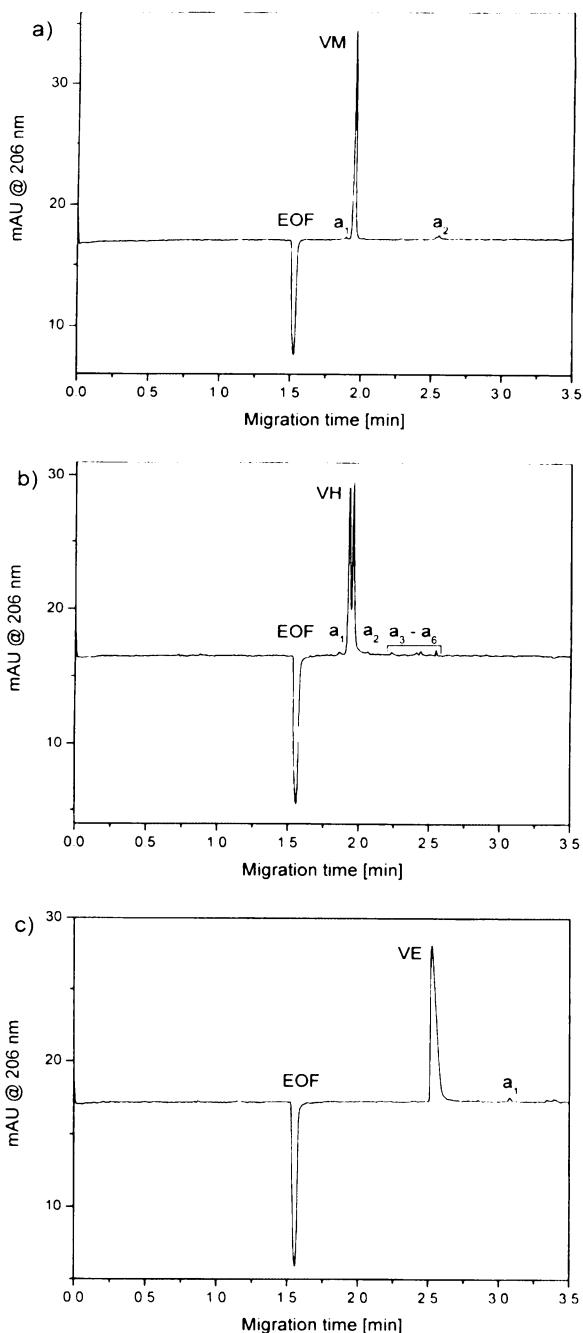


Figure 1. Electropherograms of pseudopeptides (a) VM, (b) VH, (c) VE. EOF, electroosmotic flow marker (water); a., unidentified admixtures; BGE, Tris-Tricine, pH 8.1; voltage, 10 kV; current, 7.5 μ A. For other experimental conditions see text.

capillaries at strongly acid conditions are hampered by the large electric conductivity of the BGE leading to high Joule heat of applied electric field. Thus, lower voltage must be applied in order to keep input power and tem-

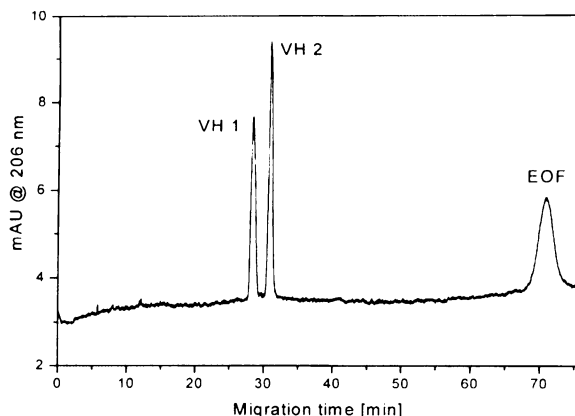


Figure 2. Electropherogram of the separated diastereomeric pairs VH 1 and VH 2. EOF, electroosmotic flow marker (isophorone); BGE, Tris-phosphate, pH 2.0; voltage, 4.75 kV; current, 16 μ A.

perature inside the capillary at the same level as that of low-conductivity BGEs. The necessity of low voltage application along with small electroosmotic flow rate at low pH may lead to long migration time. Owing to the facts mentioned, 250 mM phosphoric acid (pH 1.42) was the most acid BGE used in this study. The upper pH value of BGE used was at pH 2.8, where peaks of analytes were still separated from the EOF marker peak. At this pH the effective charge of the whole molecule of pseudopeptides became close to zero due to compensation of the positive charge from basic amino acid residues by the negative charge from the almost fully dissociated phosphinate.

BGEs of constant ionic strength (25 mM) were used in the pH range of 1.8–2.8. BGEs of pH below 1.8 exceeded the selected ionic strength; hence effective mobilities obtained in these BGEs were recalculated to 25 mM ionic strength according to a procedure given further in the text. Phosphoric acid and Tris were employed as buffer components because they produce in the given pH range univalent ions, which are consistent with the Debye-Hückel theory utilized for calculation of activity coefficient and mobility correction for ionic strength. Tris was preferred to sodium ion because of lower mobility and then lower conductivity of BGE. In order to keep the temperature inside the capillary constant, experiments were carried out at constant input power of 0.26 Wm⁻¹ except for BGEs of pH 1.55 and 1.42 when higher input power was applied because the migration time tended to be unacceptably long.

3.2.1 Correction of mobilities for dissipated power

All experiments were carried out in a home made device, which was not equipped with any kind of active cooling of the capillary. Therefore, mobilities were determined at

ambient temperature generally different from the standard temperature of 25°C. This fact required the knowledge of the actual buffer temperature inside the capillary during the experiments and the employment of some correcting procedure on experimental mobilities. In order to compensate for the mobility shift due to the increased temperature inside the capillary, the following procedure, a modification of those reported in [20, 21], was used. The electric current was measured in a wide range of voltages at the same setup as used for CZE experiments, only with the exception that the capillary was filled with a 0.02 M potassium chloride aqueous solution. The specific electric conductivity κ of the electrolyte solution was calculated from Eq. (14)

$$\kappa = \frac{L_t \cdot i}{\pi R_i^2 U} \quad (14)$$

where R_i is the inner radius of the capillary (m) and i is the electric current through the capillary (A).

At the lowest applied voltage, when thermal effects can be neglected, the conductivity of KCl solution at ambient temperature was obtained. When performing linear regression of tabulated conductivity data of standard a 0.02 M KCl solution in the temperature range from 15°C to 35°C [22], a linear relation is obtained with a regression coefficient $R = 0.99992$.

$$\kappa = 0.14304 + 5.36 \times 10^{-3} T \quad (15)$$

where κ is specific conductivity (Sm^{-1}) and T is the temperature (°C).

The change of the electric conductivity at a given power applied was recalculated to the temperature increment, ΔT , occurring at the corresponding power.

$$\Delta T = T_i - T_o = \frac{\kappa_{Ti} - \kappa_{To}}{5.36 \times 10^{-3}} \quad (16)$$

where T_i is the average temperature inside the capillary (°C), T_o is ambient temperature during calibration (°C), κ_{Ti} is the conductivity of the electrolyte at given power applied and κ_{To} is the conductivity at the lowest power applied when the temperature increase inside the capillary is taken as negligible. A calibration plot was obtained for the temperature increments of the solution inside the capillary on the power applied (Fig. 3).

The measured effective mobilities were subsequently recalculated to a temperature of 25°C assuming the mean increase of mobility to be 2.5% per °C

$$m_{\text{eff},25} = m_{\text{eff},T_i} [1 + 0.025(T_{\text{am}} + \Delta T - 25)] \quad (17)$$

where $m_{\text{eff},25}$ and m_{eff,T_i} are effective mobilities at 25°C and at actual experimental conditions, respectively, T_{am} is the ambient temperature during actual CZE experiment.

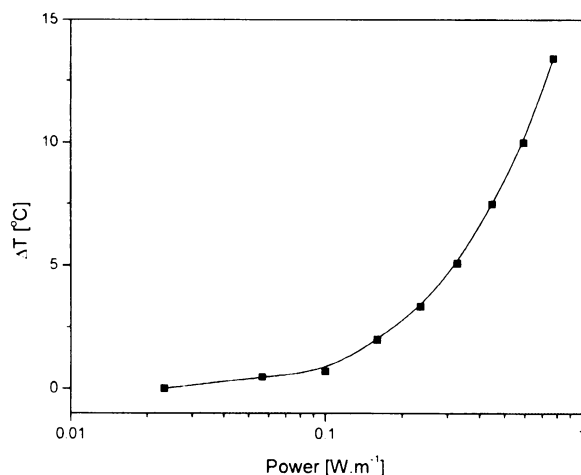


Figure 3. Calibration plot of temperature increase versus input power.

3.2.2 Correction of mobilities for ionic strength

Due to the dependence of electrophoretic mobilities on the ionic strength of the BGE all experiments for determination of dissociation constants should be carried out in BGEs of constant ionic strength. Some of the used BGEs of pH below 1.80 exceeded the selected value of 25 mM ionic strength, hence mobilities obtained in these BGEs and already corrected for temperature growth were recalculated to the values corresponding to the ionic strength of 25 mM. The approach describing deviations of mobilities from ideality was reported in [23]

$$m = m^0 - \frac{(0.229m^0 + 3.12 \times 10^{-8})\sqrt{I}}{1 + 3.28a\sqrt{I}} \quad (18)$$

where m^0 ($\text{m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$) is the limiting mobility, I the ionic strength (mol dm^{-3}) and a is the diameter of the counterion (nm). Equation (18) was experimentally verified to be valid for uni-univalent aqueous solutions of electrolytes over an ionic strength interval up to 75 mM [23]. Thus, Eq. (18) allows recalculation of the mobility values obtained in the BGEs of different ionic strength to the same ionic strength within the validity range.

3.2.3 Calculation procedure

The calculation of $\text{p}K_a$ values from effective mobility data may be accomplished in several ways such as linear regression or weighted linear regression of linear model, which describes the relationship between mobilities and pH [15, 17]. Another possibility is nonlinear regression of an exponential model [12, 15, 16, 18] or point-to-point calculation utilizing the Henderson-Hasselbalch equation [12]. It was experimentally verified that nonlinear regres-

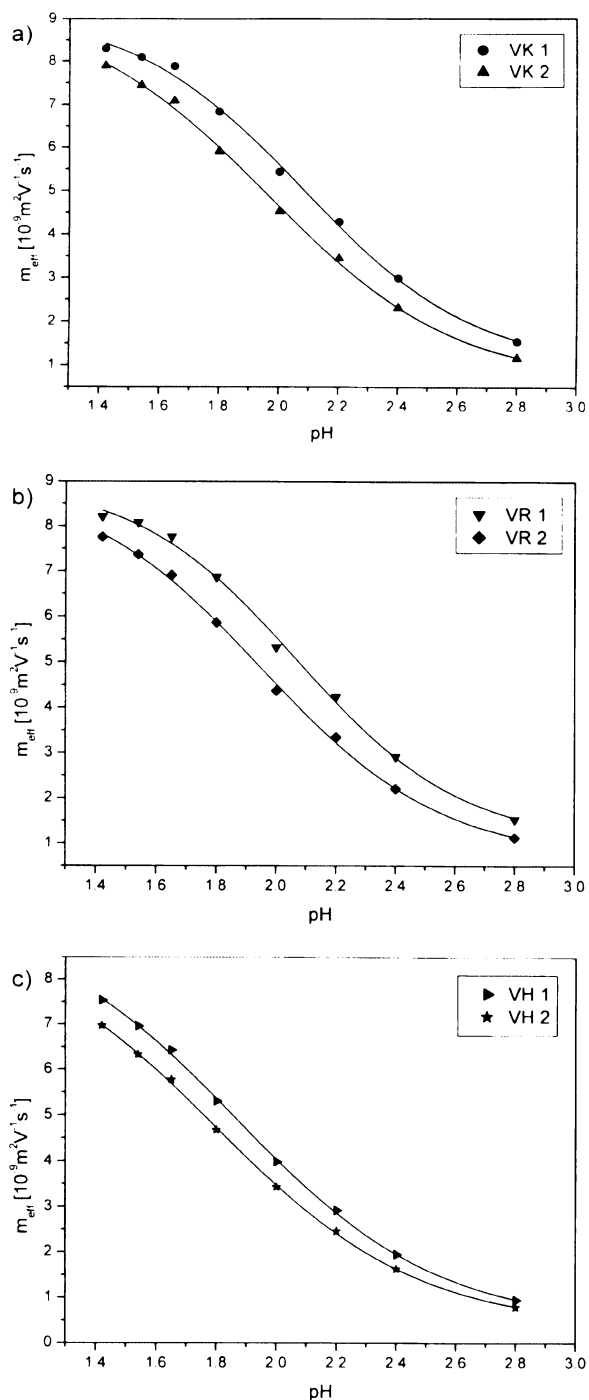


Figure 4. pH dependence of the effective mobility of diastereomeric pairs of pseudopeptides (a) VK 1 and VK 2, (b) VR 1 and VR 2, (c) VH 1 and VH 2.

sion gives the least biased determination [12, 15], therefore this approach was used in the present study. For all pseudopeptides with basic amino acid residues in posi-

Table 4. Values of pK_a of the phosphinate group in diastereomeric pairs of selected pseudopeptides

Pseudopeptide	$pK_a(1) \pm SD$	$pK_a(2) \pm SD$
VK	2.01 ± 0.03	1.89 ± 0.04
VR	2.01 ± 0.03	1.89 ± 0.03
VH	1.80 ± 0.03	1.73 ± 0.04

$pK_a(1)$, pK_a of faster diastereomeric pair; $pK_a(2)$, pK_a of slower diastereomeric pair

tion *R* baseline separation of two diastereomeric pairs was achieved in all acid BGEs, hence the dependence of effective electrophoretic mobilities on pH can be plotted for both separated diastereomeric pairs as it is shown in Fig. 4. Calculations of apparent dissociation constant K'_a values were performed by nonlinear fitting of experimental data to Eq. (13) using the computer program Origin 6.1 (OriginLab, Northampton, MA, USA). Thermodynamic dissociation constants, pK_a , of separated diastereomeric pairs were consecutively obtained using Eq. (7) and the values are presented in Table 4. The determined pK_a values of phosphinate group, which were found to be in the interval 1.73–2.01, are close to the published value of 1.8 for related phosphinates [2].

In conclusion this work outlines suitability of CZE to rapid and high-performance analysis of phosphinic pseudopeptides along with a procedure for determination of dissociation constant of the phosphinate group in selected pseudopeptides. Additionally, due to achieved separation of diastereomeric pairs, direct determination of their dissociation constants was possible, which demonstrates one of the benefits of CZE for obtaining such physico-chemical characteristics.

The work was supported by the Grant Agency of the Academy of Sciences of the Czech Republic, grant No. B4055 003 and Research Project Z4 055 905, and by Ministry of Education of the Czech Republic, grant No. OK 382.

Received July 9, 2001

4 References

- [1] Collinsová, M., Jiráček, J., *Curr. Med. Chem.* 2000, 7, 629–647.
- [2] Grams, F., Dive, V., Yiotakis, A., Yiallourous, I., Vassiliou, S., Zwilling, R., Bode, W., Stocker, W., *Nat. Struct. Biol.* 1996, 3, 671–675.
- [3] Kašička, V., *Electrophoresis* 1999, 20, 3084–3105.
- [4] Yoo, Y. S., Han, Y. S., Suh, M. J., Park, J., *J. Chromatogr. A* 1997, 763, 285–293.
- [5] Gamble, T. N., Ramachandran, C., Bateman, K. P., *Anal. Chem.* 1999, 71, 3469–3476.

- [6] Adamson, N. J., Reynolds, E. C., *Electrophoresis* 1995, 16, 525–528.
- [7] Cao, P., Stults, J. T., *J. Chromatogr. A* 1999, 853, 225–235.
- [8] Cao, P., Stults, J. T., *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2000, 14, 1600–1606.
- [9] Meisel, H., Olieman, C., *Anal. Chim. Acta* 1998, 372, 291–297.
- [10] Dzygiel, P., Rudzińska, E., Wieczorek, P., Kafarski, P., *J. Chromatogr. A* 2000, 895, 301–307.
- [11] Fischer, C., Schmidt, U., Dwars, T., Oehme, G., *J. Chromatogr. A* 1999, 845, 273–283.
- [12] Barták, P., Bednář, P., Stránský, Z., Boček, P., Vespalec, R., *J. Chromatogr. A* 2000, 878, 249–259.
- [13] Castagnola, M., Rossetti, D. V., Cassiano, L., Misiti, F., Pennacchietti, L., Giardina, B., Messina, I., *Electrophoresis* 1996, 17, 1925–1930.
- [14] Castagnola, M., Messina, I., Rossetti, D. V., in: Righetti, P. G. (Ed.), *Capillary Electrophoresis in Analytical Biotechnology*, CRC Press, Boca Raton, FL 1996, pp. 239–275.
- [15] Gluck, S. J., Cleveland, J. A., *J. Chromatogr. A* 1994, 680, 49–56.
- [16] Mercier, J. P., Morin, P., Dreux, M., Tambute, A., *Chromatographia* 1998, 48, 529–534.
- [17] Cai, J., Smith, J. T., El Rassi, Z., *J. High. Resolut. Chromatogr.* 1992, 15, 30–32.
- [18] Yang, L. L., Yuan, Z. B., *Electrophoresis* 1999, 20, 2877–2883.
- [19] Yiotakis, A., Vassiliou, S., Jiráček, J., Dive, V., *J. Org. Chem.* 1996, 61, 6601–6605.
- [20] Bello, M. S., Chiari, M., Nesi, M., Righetti, P. G., Saracchi, M., *J. Chromatogr.* 1992, 625, 323–330.
- [21] Foret, F., Křivánková, L., Boček, P., *Capillary Zone Electrophoresis*, Verlag Chemie, Weinheim 1993, pp. 39.
- [22] Stauff, J., Jaenicke, R., in: Rauen, H. M. (Ed.), *Biochemisches Taschenbuch*, Springer-Verlag, Berlin 1964, pp. 112.
- [23] Survej, M. A., Goodall, D. M., Wren, S. A. C., Rowe, R. C., *J. Chromatogr. A* 1996, 741, 99–113.



ELSEVIER

Journal of Chromatography B, 770 (2002) 145–154

JOURNAL OF
CHROMATOGRAPHY B

www.elsevier.com/locate/chromb

Determination of dissociation constant of phosphinate group in phosphinic pseudopeptides by capillary zone electrophoresis

Dušan Koval^a, Václav Kašička^{a,*}, Jiří Jiráček^a, Michaela Collinsová^a,
Timothy A. Garrow^b

^a*Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Flemingovo nám. 2,
166 10 Prague 6, Czech Republic*

^b*Department of Food Science and Human Nutrition, University of Illinois, Urbana, IL 61801, USA*

Abstract

Capillary zone electrophoresis (CZE) was used for determination of dissociation constant of phosphinate group in phosphinic pseudopeptides, i.e. peptides where one peptide bond is substituted by phosphinic acid moiety $-\text{PO}_2^--\text{CH}_2-$. The dissociation constants were determined for a set of newly synthesized pseudopeptides derived from a structure $\text{N-Ac-Val-Ala}(\text{PO}_2^--\text{CH}_2)\text{Leu-His-NH}_2$ by nonlinear regression of experimentally measured pH dependence of their effective electrophoretic mobilities. CZE experiments were carried out in Tris-phosphate background electrolytes in the pH range 1.4–3.2. The pseudopeptides were synthesized as a mixture of four diastereomers, the separation of which was achieved in most cases. Moreover, differences of the effective mobilities of the pseudopeptide diastereomers enabled simultaneous determination of the dissociation constant of their phosphinate group without necessity of previous isolation of individual isomers. © 2002 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: Dissociation constant; Phosphinic pseudopeptides; Phosphinate

1. Introduction

Phosphinic pseudopeptides represent a class of peptide isosteres where one peptide bond is substituted by enzymatically nonhydrolysable phosphinic acid moieties $-\text{PO}_2^--\text{CH}_2-$ or $-\text{PO}_2^-$ [1]. These compounds are intensively studied because of their promising biological activity – mimicking of the substrate transition state for at least two classes of proteolytic enzymes – Zn-metalloproteinases and aspartic acid proteinases [1,2].

Capillary zone electrophoresis (CZE) is currently

widely used for high-performance separations of various peptides [3–5] including phosphopeptides, i.e. peptides containing phosphate esterified to the hydroxyl group of amino acids serine, tyrosine and threonine. Analyses of synthetic phosphopeptides [6,7] and of phosphopeptides originating from hydrolysis of phosphoproteins, e.g. casein [8,9] have been reported. However, to our knowledge CZE analyses of peptides with phosphorus within the peptide chain have not been yet reported. Two papers dealing with CZE separation of compounds partially similar to phosphinic pseudopeptides appeared when chiral analyses of various phosphonic and phosphinic acid analogues of phenylalanine and phenylglycine were performed [10,11].

CZE has emerged as a convenient and precise

*Corresponding author. Tel.: +420-2-2018-3239; fax: +420-2-3332-3956.

E-mail address: kasicka@uochb.cas.cz (V. Kašička).

method for determination of acid dissociation constants (pK_a) of ionogenic groups of various types of compounds [12–23] including amino acids [24] and peptides [25,26]. The pK_a values were mostly determined in aqueous media, but recently the determination of pK_a in nonaqueous and mixed aqueous organic solvents was reported [27–30]. CZE, unlike commonly used methods for pK_a determination such as potentiometric titration and ultraviolet spectroscopy, is capable of overcoming some drawbacks connected with these methods. CZE demands expressively lower amounts of analyte at lower concentration; therefore also pK_a of poorly soluble compounds can be determined. In the CZE method only migration time is measured, without the necessity of solute quantification or high purity degree of

analyzed compound since impurities can be separated from the solutes of interest.

The aim of this study is to extend the applicability of CZE for determination of the dissociation constant of the phosphinic acid group in the set of pseudo-peptide diastereomers derived from a structure N-Ac-Val-Ala ψ ($PO_2^-CH_2$)Leu IIis NH_2 indicated by its N- and C-terminal amino acid residues as VII. Derivatives with side chain modifications of VII are indicated as VII A and VII B, respectively, and derivatives with deprotected N- and/or C-terminus are indicated as N-VII, VII O and N-VII O, respectively (see Fig. 1).

2. Materials and methods

2.1. Reagents and chemicals

All chemicals were of analytical reagent grade. Phosphoric acid, potassium chloride and dimethylsulfoxide (DMSO) were obtained from Lachema (Brno, Czech Republic), Tris (tris(hydroxymethyl)aminomethane) was from Serva (Heidelberg, Germany). Phosphinic pseudo-peptides were synthesized as a mixture of four diastereomers on a Rink Amide AM resin or 2-chlorotrityl resin (Calbiochem Novabiochem, L aufelfingen, Switzerland) following the procedure of Yiotakis [31]. The protected phosphinic pseudo-peptides precursors Fmoc Ala ψ [PO(OAd)CH₂]Leu OH, Fmoc Phe ψ [PO(OAd)CH₂]Leu OH and Fmoc-Phe ψ [PO(OAd)CH₂]Ala OH were a kind gift of Dr Vincent Dive from Département d'Ingénierie et d'Etudes des Prot eines, CEA-Saclay, Gif sur Yvette, France. Prior to CZE analyses, the pseudo-peptides were purified by HPLC (Waters, Milford, MA, USA) using a Vydac C₁₈ 218TP510 column (Grace Vydac, Hesperia, CA, USA) and characterized by mass spectrometry and amino acid analysis.

2.2. CZE separation conditions

CZE experiments were carried out in a home made apparatus equipped with a UV detector monitoring absorbance at 206 nm. Data acquisition and handling were performed using the CSW Chromatography Station (DataApex, Prague, Czech Republic). Un-

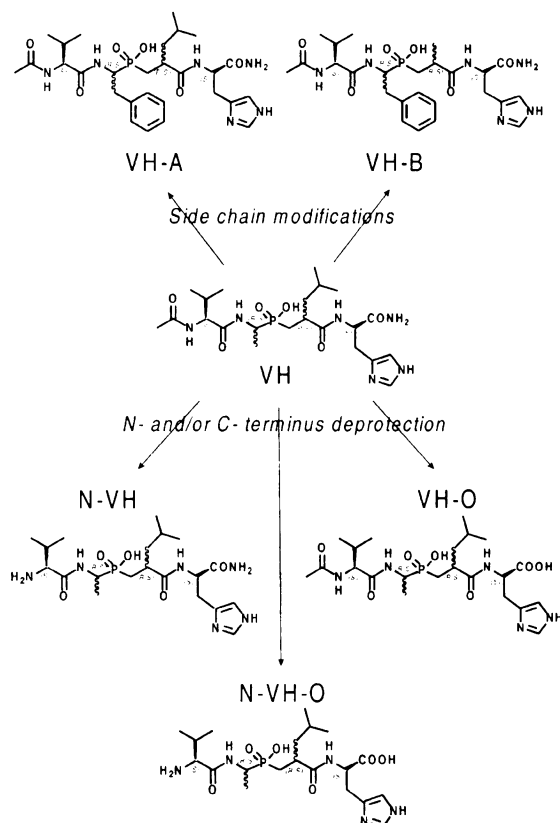


Fig. 1. Structures of analyzed phosphinic pseudo-peptides (including stereochemical configurations) and their structural relationships.

treated fused-silica capillaries (I.D. 50 μm , O.D. 200 μm , total length 300 mm, effective length 190 mm) were supplied by the Institute of Glass and Ceramics Materials, Czech Academy of Sciences (Prague, Czech Republic). Separations were performed at ambient temperature (22–26 $^{\circ}\text{C}$). Pseudopeptides were dissolved in deionised water in a concentration range of 0.7–2.5 mM and were introduced into the capillary hydrodynamically (pressure 700 Pa for 10 s).

In order to equilibrate the capillary, the following wash cycle was performed. The new capillary was flushed sequentially with water for 5 min, 0.1 M NaOH for 5 min, and water again for 2 min, followed by background electrolyte (BGE) for 2 min. Then, the BGE was left in the capillary overnight to equilibrate the inner fused-silica capillary surface and to stabilize the electroosmosis during the subsequent CZE runs. After rinsing the capillary with BGE for 0.5 min, it was conditioned by a 20-min application of the same high voltage as used in the respective runs. Between runs at the same pH, the capillary was rinsed with the BGE for 0.5 min. Before any change of the BGE, the capillary was rinsed with 0.1 M NaOH for 5 min and then stabilized using the above procedure.

BGE solutions were prepared by mixing the appropriate amounts of Tris and phosphoric acid in deionised water in the concentrations given in Table 1. BGEs were filtered through a 0.45- μm syringe filter (Millipore, Bedford, MA, USA) before use. Ionic strength of the BGEs was 25 mM except those composed of pure phosphoric acid. The higher ionic

strength of phosphoric acid BGEs was unavoidable in order to reach pH values below 1.7.

2.3. Effective electrophoretic mobility determination

The effective electrophoretic mobility, m_{eff} , was determined from measurement of migration times of analyte, t_{mig} , and of neutral marker, t_{eof} . In all experiments DMSO was used as electroosmotic flow marker and m_{eff} was calculated from Eq. (1):

$$m_{\text{eff}} = \frac{L_t L_d}{U} \left(\frac{1}{t_{\text{mig}}} - \frac{1}{t_{\text{eof}}} \right) \quad (1)$$

where L_t and L_d are total and effective capillary length, respectively; U is the applied separation voltage.

3. Theoretical

Dissociation constant of phosphinate group was determined in the pseudopeptides containing anionogenic phosphinic acid group and cationogenic histidine residue. The pseudopeptides without blocked C- and/or N-termini by a nonionic substituent have additional source of the charge in the carboxylic group (VH–O and N–VH O) and in the amino group (N–VII and N–VII O). The pseudopeptides with blocked N-terminus can be considered as monovalent bases whereas the pseudopeptides with unblocked N-terminus are in fact divalent bases.

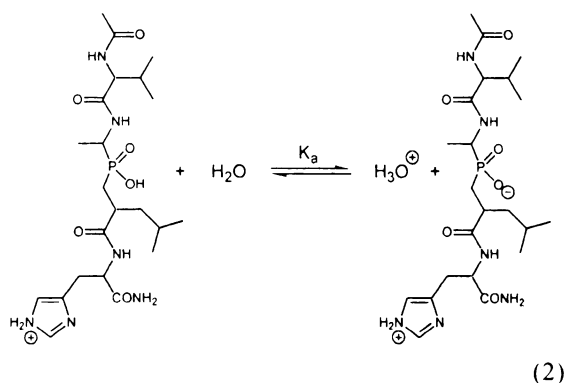
Table 1
pH, composition and ionic strength of the BGEs, separation voltage and input power used for phosphinate $\text{p}K_a$ determination

pH	Phosphoric acid (mM)	Tris (mM)	Ionic strength (mM)	Voltage (kV)	Input power (W/m)
1.42	250	0	46	3.50	0.55
1.55	150	0	34	3.30	0.35
1.65	100	0	27	3.30	0.26
1.80	74	7	25	3.90	0.26
2.00	55	14	25	4.75	0.26
2.20	45	18	25	5.55	0.26
2.40	37	20	25	6.48	0.26
2.80	30	24	25	7.80	0.26
3.20	27	25	25	8.50	0.26

Owing to this difference a modified calculation procedure has to be employed for both groups of the pseudopeptides. Since the CZE analyses of pseudopeptides were performed at strong acid pH region, the dissociation of unprotected carboxylic group was not considered in the theoretical models of acid–base equilibrium.

3.1. Pseudopeptides with blocked N-terminus

The dissociation equilibrium of the phosphinic acid group in a pseudopeptide with protected N-terminus (VII taken as example) can be presented as follows:



The thermodynamic dissociation constant K_a can be expressed as:

$$K_a = \frac{a_{\text{H}_3\text{O}^+} \cdot a_{\text{A}^- \text{BH}^+}}{a_{\text{HABH}^+}} = \frac{a_{\text{H}_3\text{O}^+} \cdot [\text{A}^- \text{BH}^+]}{[\text{HABH}^+]} \gamma_{\text{A}^- \text{BH}^+} \quad (3)$$

where $a_{\text{H}_3\text{O}^+}$ is activity of hydroxonium ions, $a_{\text{A}^- \text{BH}^+}$ and a_{HABH^+} are activities of zwitterionic and cationic form of the pseudopeptide, respectively. Activities of species $\text{A}^- \text{BH}^+$ and HABH^+ can be expressed as a product of their concentrations $[\text{A}^- \text{BH}^+]$, $[\text{HABH}^+]$ and corresponding activity coefficients $\gamma_{\text{A}^- \text{BH}^+}$ and γ_{HABH^+} . The activity coefficient of zwitterionic and generally uncharged species $\text{A}^- \text{BH}^+$ is assumed to be equal to 1. The value of activity coefficient of charged species for aqueous solutions at 25 °C can be evaluated according to Debye Hückel:

$$-\log \gamma = \frac{0.5085z^2 \sqrt{I}}{1 + 3.281a\sqrt{I}} \quad (4)$$

where z is the charge and a is the effective hydrated diameter (nm) of the ion and I the ionic strength of the solution (mol/dm^3) defined as:

$$I = \frac{1}{2} \sum_i c_i z_i^2 \quad (5)$$

where c_i is molarity (mol/dm^3) and z_i is the charge of i th ion in the solution. As hydrated diameters of ions are seldom exactly known, the approximative value of $a=0.5$ nm was used for calculations of activity coefficients in this paper.

It is favorable to define the apparent acidity constant K'_a as:

$$K'_a = \frac{a_{\text{H}_3\text{O}^+} \cdot [\text{A}^- \text{BH}^+]}{[\text{HABH}^+]} \quad (6)$$

The substitution of Eq. (6) in Eq. (3) with respect to unity value of $\gamma_{\text{A}^- \text{BH}^+}$ gives:

$$\text{p}K_a = \text{p}K'_a + \log \gamma_{\text{HABH}^+} \quad (7)$$

The effective electrophoretic mobility of analyzed pseudopeptides behaving like monovalent bases, m_{eff} , at low pH where the basic group is fully protonated can be expressed as:

$$m_{\text{eff}} = \alpha m_{\text{HABH}^+} + (1 - \alpha) m_{\text{A}^- \text{BH}^+} \quad (8)$$

where m_{HABH^+} and $m_{\text{A}^- \text{BH}^+}$ are the electrophoretic mobilities of respective species, α is the degree of dissociation defined as:

$$\alpha = \frac{[\text{HABH}^+]}{[\text{HABH}^+] + [\text{A}^- \text{BH}^+]} \quad (9)$$

As the electrophoretic mobility of the zwitterion $\text{A}^- \text{BH}^+$ is equal to 0, Eq. (8) and Eq. (9) can be combined to:

$$\frac{[\text{A}^- \text{BH}^+]}{[\text{HABH}^+]} = \frac{m_{\text{HABH}^+} - m_{\text{eff}}}{m_{\text{eff}}} \quad (10)$$

Substitution of this ratio in Eq. (6) by that in Eq. (10) gives:

$$m_{\text{eff}} = \frac{m_{\text{HABH}^+}}{1 + 10^{(\text{pH} - \text{p}K'_a)}} \quad (11)$$

Eq. (11) is a particular case of the Boltzman sigmoidal decay function of the general form:

$$y = \frac{A_1 - A_2}{1 + e^{\frac{x-x_0}{dx}}} + A_2 \quad (12)$$

where x is the independent variable, y the dependent variable. Constants A_1 and A_2 are the initial ($y(-\infty)$) and final ($y(+\infty)$) values of the dependent variable, respectively; x_0 is center and dx is width of the sigmoidal curve.

When Eq. (12) is modified for dependence of effective electrophoretic mobility m_{eff} on pH, the following equation is obtained:

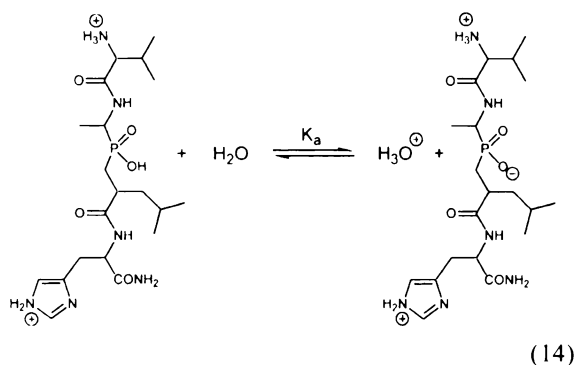
$$m_{\text{eff}} = \frac{m_1 - m_0}{1 + e^{\frac{\text{pH} - \text{p}K_a}{\text{dpH}}}} + m_0 \quad (13)$$

where m_0 and m_1 are the electrophoretic mobilities of the deprotonated and protonated form of compound taking part in the dissociation equilibrium, respectively.

Eq. (13) represents a general mathematical model for determination of $\text{p}K_a$ values by the fitting of experimental data.

3.2. Pseudopeptides with free N-terminus

The pseudopeptides with free amino group in the N-terminus which exist as doubly charged cations at highly acidic conditions become singly charged during deprotonation of the phosphinic acid group. The dissociation equilibrium of pseudopeptides N VII is described as follows:



The thermodynamic dissociation constant K_a is then:

$$K_a = \frac{a_{\text{H}_3\text{O}^+} \cdot a_{\text{A}^- \text{BH}_2^{2+}}}{a_{\text{HABH}_2^+}} = \frac{a_{\text{H}_3\text{O}^+} \cdot [\text{A}^- \text{BH}_2^{2+}] \gamma_{\text{A}^- \text{BH}_2^{2+}}}{[\text{HABH}_2^+] \gamma_{\text{HABH}_2^+}} \quad (15)$$

Relation analogous to Eq. (7) can be derived following the same procedure as that described in the above section:

$$\text{p}K_a = \text{p}K_a' + 3 \log \gamma_{\text{A}^- \text{BH}_2^{2+}} \quad (16)$$

The apparent acidity constant $\text{p}K_a'$ of this type of pseudopeptides can be calculated utilizing the same model represented by Eq. (13) as used for the pseudopeptides behaving like monovalent bases.

4. Results and discussion

4.1. Selection of experimental conditions

The studied pseudopeptides carry positive net charge in the pH region close to the phosphinate $\text{p}K_a$ due to positively charged residues of histidine and N-terminal amino group and due to mostly only partial dissociation of phosphinic acid group and almost negligible dissociation of carboxylic group. The CZE experiments leading to $\text{p}K_a$ determination can be then carried out in the bare fused-silica capillaries in the cationic CZE mode. Because $\text{p}K_a$ of phosphinate group is estimated to be 1.8 in related compounds [2], it is not possible to measure the mobility data in optimal pH interval with regard to reach very low pH region ($\text{pH} < 1$) of fully protonated phosphinate group. CZE experiments in untreated fused-silica capillaries at strongly acid conditions are hampered by the large electric conductivity of the BGE leading to high Joule heat of applied electric field. Thus, lower voltage must be applied in order to keep input power and temperature inside the capillary at the same level as that of the low conductivity BGEs. The necessity of low voltage application along with small electroosmotic flow rate at low pH lengthen migration times, namely of EOF marker. Owing to these facts, 250 mM phosphoric acid ($\text{pH} 1.42$) was the most acid BGE used in this study.

BGEs of constant ionic strength (25 mM) were used in the pH interval 1.8–3.2. BGEs of pH below 1.8 exceeded the selected ionic strength; hence effective mobilities obtained in these BGEs were recalculated to 25 mM ionic strength according to a procedure given further in the text. Phosphoric acid and Tris were employed as buffer components because they produce in the given pH range univalent ions, which are consistent with Debye–Hückel theory utilized for calculation of activity coefficient and mobility correction for ionic strength.

In order to keep the temperature increase inside the capillary constant, experiments were carried out at constant input power of 0.26 W/m except for BGEs of pH 1.55 and 1.42 for which the higher input power was applied in order to avoid unacceptably long CZE experiments with low input power.

The upper pH value of BGE used for CZE of the pseudopeptides without free C-terminal carboxylic group was 3.2. At this pH the effective charge of the whole molecule of pseudopeptides became close to zero (peptides VH, VII A and VII B) or close to unity value (peptide N-VH) due to compensation of the positive charge from basic residues by the negative charge from almost fully dissociated phosphinate. Mobility data of the pseudopeptides with free carboxylic group were used up to pH 2.8. The effective charge of pseudopeptides VH-O became negative due to the dissociation of the carboxylic group causing impossibility to measure mobilities of VII-O above pH 2.8 by the used set-up. Mobilities of N-VH-O exhibited further decrease owing to the same reason above pH 2.8 and were not included into the calculation of phosphinate pK_a .

4.2. Correction of mobilities for dissipated power

All experiments were carried out in a home made device, which was not equipped with active cooling of the capillary. Therefore mobilities were determined at ambient temperature generally different from the standard temperature of 25 °C. This fact required the knowledge of the actual buffer temperature inside the capillary during the experiments and the employment of some correcting procedure for experimental mobilities. In order to compensate for the mobility shift due to the increased temperature

inside the capillary, the following procedure, a modification of those reported in [32,33], was used. The electric current was measured in a wide range of voltages at the same set-up as that used for CZE experiments, only the capillary was filled with 0.02 M potassium chloride aqueous solution. The specific electric conductivity κ of the electrolyte solution was calculated from Eq. (17):

$$\kappa = \frac{L_1}{\pi R_i^2} \frac{i}{U} \quad (17)$$

where R_i is the inner radius of the capillary (m) and i is the electric current through the capillary (A).

At the lowest applied voltage, when thermal effects can be neglected, the conductivity of KCl solution at ambient temperature was obtained. When performing linear regression of tabulated conductivity data of standard 0.02 M KCl solution in the temperature range from 15 to 35 °C [34], a linear relation is obtained with a regression coefficient $R = 0.99992$:

$$\kappa = 0.14304 + 5.36 \times 10^{-3} T \quad (18)$$

where κ is specific conductivity (S/m) and T is the temperature (°C).

The change of the electric conductivity at given power was recalculated to the temperature increment, ΔT , occurring at the corresponding power:

$$\Delta T = T_i - T_o = \frac{\kappa_{T_i} - \kappa_{T_o}}{5.36 \times 10^{-3}} \quad (19)$$

where T_i is average temperature inside the capillary (°C), T_o is ambient temperature during calibration (°C), κ_{T_i} is the conductivity of the electrolyte at given power applied and κ_{T_o} is the conductivity at the lowest power applied when the temperature increase inside the capillary is taken as negligible. A calibration plot relating the temperature increments of the solution inside the capillary to the applied power was constructed with the following estimation of the temperature increment: 4 °C at power 0.26 W/m; 6 °C at 0.35 W/m and 10 °C at 0.55 W/m. The measured effective mobilities were subsequently recalculated to a temperature of 25 °C assuming the mean increase of mobility to be 2.0% per Celsius

degree. This correction procedure is in more details described elsewhere [35].

4.3. Correction of mobilities for ionic strength

Due to the dependence of electrophoretic mobilities on ionic strength of BGE all experiments for determination of dissociation constants should be carried out in BGEs of constant ionic strength. BGEs of pH below 1.80 exceeded the selected value of 25 mM ionic strength; hence mobilities obtained in these BGEs and already corrected for temperature growth inside the capillary were recalculated to the values corresponding to the ionic strength of 25 mM. The approach describing deviations of mobilities from ideality was reported in Ref. [36]:

$$m = m^0 - \frac{(0.229m^0 + 3.12 \times 10^{-8}) \sqrt{I}}{1 + 3.28a\sqrt{I}} \quad (20)$$

where m^0 ($\text{m}^2/\text{V}/\text{s}$) is the limiting mobility, I the ionic strength (mol/dm^3) and a is the diameter of the counterion (nm). Eq. (20) was experimentally verified to be valid for uni-univalent aqueous solutions of electrolytes over an ionic strength interval up to 75 mM [36]. Thus, Eq. (20) allows recalculation of the mobility values obtained in the BGEs of different ionic strength to the same ionic strength within the validity range.

4.4. Electrophoretic behavior of phosphinic pseudo-peptides

Dependencies of effective mobilities of diastereomers of analyzed pseudo-peptides were obtained in the pH interval 1.4–3.2. As can be seen in Fig. 2, lower pH led to bigger mobility difference and better resolution among diastereomers of majority of the pseudo-peptides, only in the case of the pseudo-peptide N VII O this tendency was opposite (see Fig. 2d). Insight into the effective mobilities brings the following conclusions:

- The close values of effective mobilities of VII O and VII indicate that free carboxylic group of VII O remains almost fully protonated below pH 2 (see Fig. 2c and a).
- The pseudo-peptides with free N-terminus (N VII and N VII O) exhibit distinctly higher mobilities comparing to VII due to higher effective charge (see Fig. 2b, d and a).
- Effective mobilities of the pseudo-peptides VII, VII A and VII B decrease with increasing size of the molecules, i.e. in order VII > VII B > VII A (see Fig. 2a, f and e).

4.5. Dissociation constants calculation

The calculation of apparent dissociation constant pK'_a values were accomplished by non-linear fitting of experimental data to Eq. (13) using the computer program Origin 6.1 (OriginLab, Northampton, MA, USA) because this approach was verified to give the least biased determination [21] in comparison with other approaches such as linear regression of linearised exponential model, which describes relationship between mobilities and pH [12,14], or point-to-point calculation utilizing the Henderson Haselbalch equation [21]. Thermodynamic dissociation constants, pK_a , of separated diastereomers were consecutively obtained from apparent dissociation constants pK'_a using either Eq. (7) for the pseudo-peptides with blocked N-terminal amino group or Eq. (16) for the pseudo-peptides with free N-terminus. The obtained pK_a values are presented in Table 2. Dissociation constants of comigrating diastereomers of pseudo-peptides VII 1 and VII 2, VII 3 and VII 4, VII A 2 and VII A 3 were assumed to be equal. The determined pK_a values of phosphinate group in the analyzed phosphinic pseudo-peptides are generally in a good agreement with the published value of 1.8 for related phosphinates [2].

5. Conclusions

This work outlines suitability of CZE for determination of dissociation constants of phosphinate group in the phosphinic pseudo-peptides. Additionally, due to the achieved separation of diastereomers, simultaneous determination of their dissociation constants was possible without their previous preparative separation, which demonstrates the usefulness of CZE as a separation technique for obtaining im-

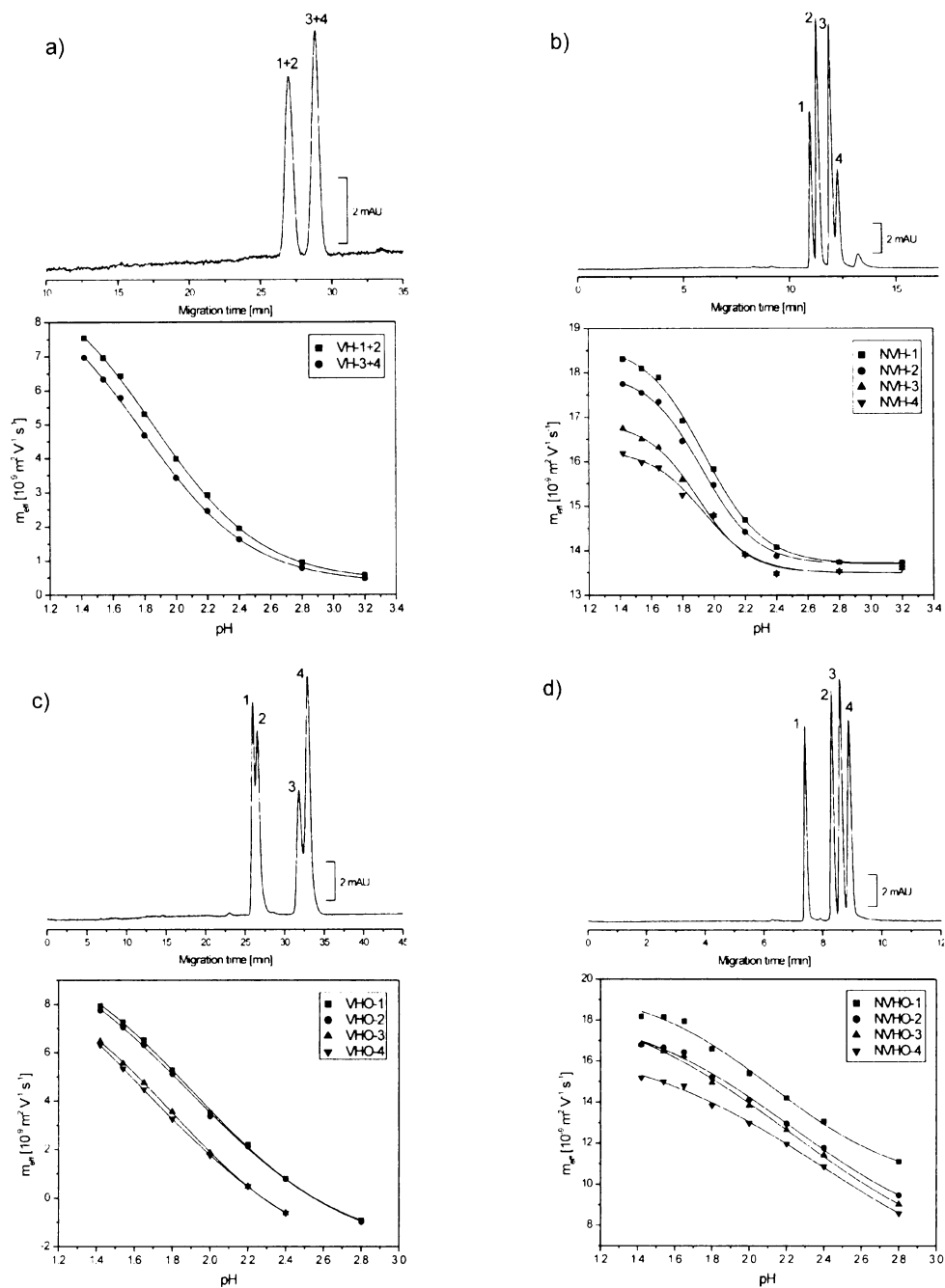


Fig. 2. Dependencies of effective mobilities, m_{eff} , of separated pseudopeptide diastereomers on pH with example of electropherogram at the best achieved resolution of diastereomers in Tris-phosphate BGEs at indicated pH. The pseudopeptides are indicated by abbreviations given in Fig. 1; peaks of the individual diastereomers are numbered in the order of decreasing electrophoretic mobility: (a) VH, electropherogram at pH 2.40, (b) N-VH, electropherogram at pH 1.42, (c) VH-O, electropherogram at pH 1.55, (d) N-VH-O, electropherogram at pH 2.80, (e) VH-A, electropherogram at pH 2.00, (f) VH-B, electropherogram at pH 1.55. Capillary 50 μm I.D./200 μm O.D., total/effective length 300/190 mm, UV detection at 206 nm, injection 700 Pa for 10 s, sample concentration 0.7–2.5 mM, voltage—see Table 1.

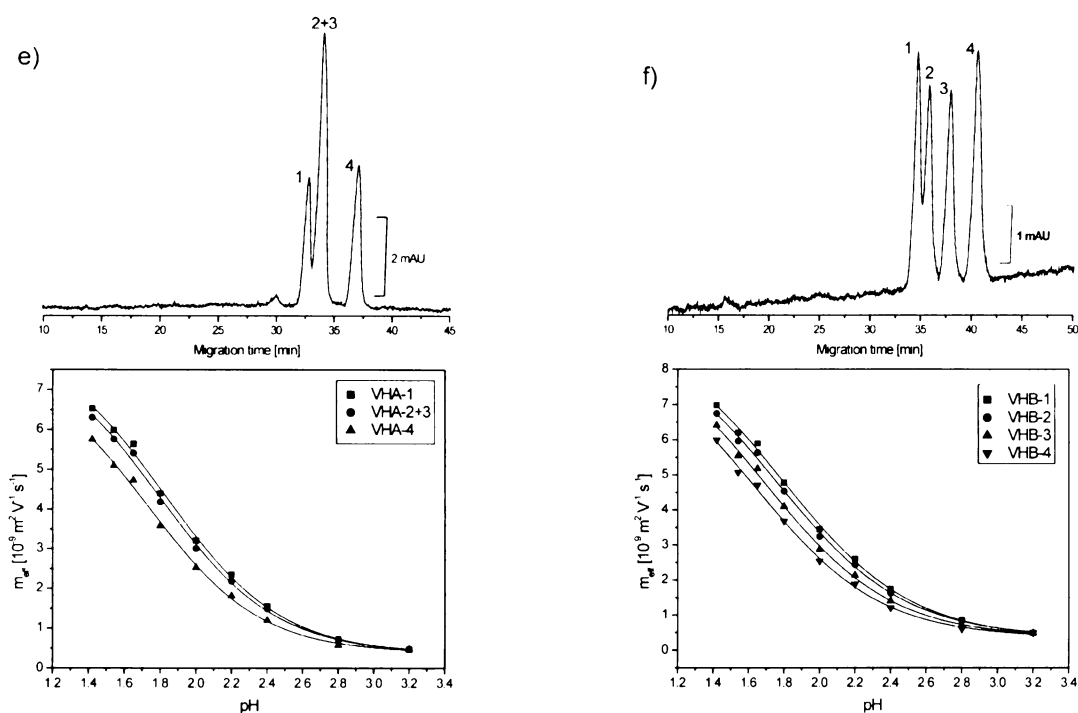


Fig. 2. (continued)

Table 2

Determined values of pK_a of phosphinate group in separated diastereomers of the pseudopeptides

Pseudopeptide	pK_a (1)	pK_a (2)	pK_a (3)	pK_a (4)
VH	1.80 ± 0.03	1.80 ± 0.03	1.73 ± 0.04	1.73 ± 0.04
N-VH	1.75 ± 0.02	1.73 ± 0.02	1.71 ± 0.03	1.74 ± 0.03
VH-O	1.84 ± 0.03	1.82 ± 0.04	1.73 ± 0.04	1.52 ± 0.20
N-VH-O	1.93 ± 0.05	2.03 ± 0.08	2.03 ± 0.10	2.21 ± 0.23
VH-A	1.76 ± 0.05	1.73 ± 0.06	1.73 ± 0.06	1.67 ± 0.07
VH-B	1.73 ± 0.07	1.74 ± 0.08	1.63 ± 0.09	1.58 ± 0.11

portant physicochemical characteristics of biomolecules.

905, and by Ministry of Education of the Czech Republic, grant no. OK 382.

Acknowledgements

The work was supported by the Grant Agency of the Academy of Sciences of the Czech Republic, grant no. B4055 003 and Research Project Z4 055

References

- [1] M. Collinsová, J. Jiráček, *Curr. Med. Chem.* 7 (2000) 629.
- [2] F. Grams, V. Dive, A. Yiotakis, I. Yiallouros, S. Vassiliou, R. Zwilling, W. Bode, W. Stocker, *Nat. Struct. Biol.* 3 (1996) 671.

- [3] V. Kašička, *Electrophoresis* 20 (1999) 3084.
- [4] G.M. McLaughlin, K.W. Anderson, D.K. Hauffe, in: M.G. Khaledi (Ed.), *High-Performance Capillary Electrophoresis*, Wiley, New York, 1998, p. 637.
- [5] Z. Deyl, I. Mikšik, in: Z. Deyl (Ed.), *Advanced Chromatographic and Electromigration Methods in BioSciences*, Elsevier, Amsterdam, 1998, p. 465.
- [6] Y.S. Yoo, Y.S. Han, M.J. Suh, J. Park, *J. Chromatogr. A* 763 (1997) 285.
- [7] T.N. Gamble, C. Ramachandran, K.P. Bateman, *Anal. Chem.* 71 (1999) 3469.
- [8] N.J. Adamson, E.C. Reynolds, *Electrophoresis* 16 (1995) 525.
- [9] P. Cao, J.T. Stults, *J. Chromatogr. A* 853 (1999) 225.
- [10] P. Dzygiel, E. Rudzińska, P. Wiczorek, P. Kafarski, *J. Chromatogr. A* 895 (2000) 301.
- [11] C. Fischer, U. Schmidt, T. Dwars, G. Oehme, *J. Chromatogr. A* 845 (1999) 273.
- [12] J. Cai, J.T. Smith, Z. El Rassi, *J. High. Res. Chromatogr.* 15 (1992) 30.
- [13] J.A. Cleveland, M.H. Benkő, S.J. Gluck, Y.M. Walbroehl, *J. Chromatogr. A* 652 (1993) 301.
- [14] S.J. Gluck, J.A. Cleveland, *J. Chromatogr. A* 680 (1994) 49.
- [15] S.J. Gluck, K.P. Steele, M.H. Benkő, *J. Chromatogr. A* 745 (1996) 117.
- [16] P. Schmitt, T. Poiger, R. Simon, D. Freitag, A. Ketrup, A.W. Garrison, *Anal. Chem.* 69 (1997) 2559.
- [17] J.P. Mercier, P. Morin, M. Dreux, A. Tambute, *Chromatographia*, 48 (1998) 529.
- [18] Y. Mrestani, R. Neubert, A. Munk, M. Wiese, *J. Chromatogr. A* 803 (1998) 273.
- [19] X. Xu, R.J. Hurtubise, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 22 (1999) 669.
- [20] S.D. Mendonsa, R.J. Hurtubise, *J. Chromatogr. A* 841 (1999) 239.
- [21] P. Barták, P. Bednář, Z. Stránský, P. Boček, R. Vespalec, *J. Chromatogr. A* 878 (2000) 249.
- [22] Z.J. Jia, T. Ramstad, M. Zhong, *Electrophoresis* 22 (2001) 1112.
- [23] M. Pérez-Urquiza, J.L. Beltrán, *J. Chromatogr. A* 917 (2001) 331.
- [24] L.L. Yang, Z.B. Yuan, *Electrophoresis* 20 (1999) 2877.
- [25] M. Castagnola, D.V. Rossetti, L. Cassiano, F. Misiti, L. Pennacchietti, B. Giardina, I. Messina, *Electrophoresis* 17 (1996) 1925.
- [26] M. Castagnola, D.V. Rossetti, M. Corda, M. Pellegrini, F. Misiti, A. Olianias, B. Giardina, I. Messina, *Electrophoresis* 19 (1998) 2273.
- [27] S.P. Porras, M.L. Riekkola, E. Kenndler, *J. Chromatogr. A* 905 (2001) 259.
- [28] J. Barbosa, D. Barrón, J. Cano, E. Jiménez-Lozano, V. Sanz-Nebot, I. Toro, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 24 (2001) 1087.
- [29] J. Barbosa, D. Barrón, E. Jiménez-Lozano, V. Sanz-Nebot, *Anal. Chim. Acta* 437 (2001) 309.
- [30] V. Sanz-Nebot, F. Benavente, I. Toro, J. Barbosa, *J. Chromatogr. A* 921 (2001) 69.
- [31] A. Yiotakis, S. Vassiliou, J. Jiráček, V. Dive, *J. Org. Chem.* 61 (1996) 6601.
- [32] M.S. Bello, M. Chiari, M. Nesi, P.G. Righetti, M. Saracchi, *J. Chromatogr.* 625 (1992) 323.
- [33] F. Foret, L. Krivánková, P. Boček, *Capillary Zone Electrophoresis*, Chemie, Weinheim, 1993, p. 39.
- [34] J. Stauff, R. Jaenicke, in: H.M. Rauen (Ed.), *Biochemisches Taschenbuch*, Springer, Berlin, 1964, p. 112.
- [35] D. Koval, V. Kašička, J. Jiráček, M. Collinsová, T.A. Garrow, *Electrophoresis* 2002 (in press).
- [36] M.A. Survay, D.M. Goodall, S.A.C. Wren, R.C. Rowe, *J. Chromatogr. A* 741 (1996) 99.



Dušan Koval
Václav Kašička
Jiří Jiráček
Michaela Collinsová

Institute of Organic Chemistry
and Biochemistry,
Academy of Sciences
of the Czech Republic,
Prague, Czech Republic

Physicochemical characterization of phosphinic pseudopeptides by capillary zone electrophoresis in highly acidic background electrolytes

Phosphinic pseudopeptides (*i.e.*, peptide isosteres with one peptide bond replaced by a phosphinic acid moiety) were analyzed and physicochemically characterized by capillary zone electrophoresis in the pH range of 1.1–3.2, employing phosphoric, phosphinic, oxalic and dichloroacetic acids as background electrolyte (BGE) constituents. The acid dissociation constant (pK_a) of phosphinate group in phosphinic pseudopeptides and ionic mobilities of these analytes were determined from the pH dependence of their effective electrophoretic mobilities corrected to standard temperature and constant ionic strength of the BGEs. It was shown that these corrections are necessary whenever precise mobility data at very low pH are to be determined. Additionally, it was found that the ionic mobilities of the phosphinic pseudopeptides and pK_a of their phosphinate group are affected by the BGE constituent used. The variability of migration behavior of the pseudopeptides can be attributed to their ion-pairing formation with the BGE components.

Keywords: Capillary zone electrophoresis / Dissociation constant / Ion-pairing / Phosphinic pseudopeptides
EL 5318

1 Introduction

Selection of the pH of a background electrolyte (BGE) is of key importance in selectivity optimization in capillary zone electrophoresis (CZE) of weak and moderately strong electrolytes. CZE of these types of analytes, including peptides [1], has been performed in a broad pH range but rather rarely has it been used for separations below a pH of 2. Nevertheless, utilization of such a low pH is useful, and sometimes necessary, for the analysis and physicochemical characterization of analytes possessing ionogenic groups with low pK_a values in order to enhance the selectivity of their separation and to determine their pK_a values and ionic mobilities. McCormick [2] separated six dipeptides using 150 mM phosphoric acid of pH 1.5 as the BGE and Lin *et al.* [3] reported separation of sulfonamides in citrate BGEs with pH values as low as 1.6. Another utilization of very acid BGEs was reported by Gluck *et al.* [4] and Barták *et al.* [5] who used phosphoric acid-based BGEs in their measurement of the pH dependence of effective mobilities and for the CZE determination of pK_a

of analytes, a convenient method for the determination of these important characteristics (see, *e.g.*, [5–10]). Phosphinic pseudopeptides represent a class of peptide isosteres with one peptide bond substituted by phosphinic acid moiety – $PO_2 - CH_2 -$. These compounds are currently the subject of intensive research concerning their biological activity due to their capability to mimic the substrate transition state of Zn-metalloproteinases [11, 12].

The present study deals with CZE analysis of the following phosphinic pseudopeptides: *N*-Ac-Val-Ala ψ ($PO_2^-CH_2$)Leu-His-NH₂, indicated by its *N*- and *C*-terminal amino acid residues as VH, *N*-Ac-Val-Phe ψ ($PO_2^-CH_2$)Leu-His-NH₂ (indicated as VH-A), and *N*-Ac-Val-Phe ψ ($PO_2^-CH_2$)Ala-His-NH₂ (indicated as VH-B); for the structure of the pseudopeptides see Fig. 1. Analyses were carried out in the pH range 1.1–3.2 by using phosphoric, phosphinic, oxalic and dichloroacetic acids as BGE constituents. The pH dependence of the effective mobilities of these analytes was used to estimate their ionic mobilities and pK_a of phosphinate group in order to investigate the influence of the BGE constituents on these analyte characteristics.

Correspondence: Dr. Václav Kašička, Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Flemingovo nám. 2, CZ-166 10 Prague 6, Czech Republic

E-mail: kasicka@uochb.cas.cz
Fax: +420-2-33323956

Abbreviations: **VH**, *N*-Ac-Val-Ala ψ ($PO_2^-CH_2$)Leu-His-NH₂; **VH-A**, *N*-Ac-Val-Phe ψ ($PO_2^-CH_2$)Leu-His-NH₂; **VH-B**, *N*-Ac-Val-Phe ψ ($PO_2^-CH_2$)Ala-His-NH₂

2 Materials and methods

2.1 Reagents and chemicals

All chemicals were of analytical reagent grade. Phosphoric acid, oxalic acid, potassium chloride, phenol and dimethyl sulfoxide (DMSO) were obtained from Lachema

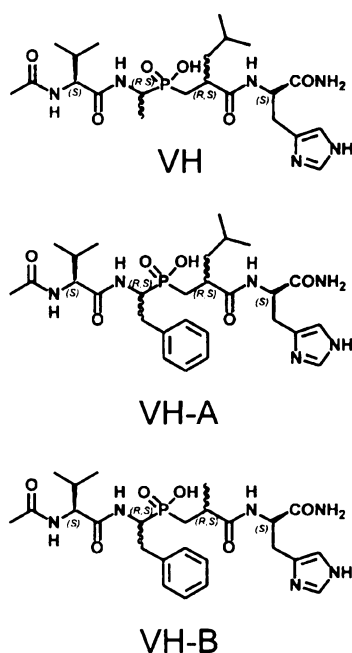


Figure 1. Structures of the analyzed phosphinic pseudopeptides including their stereochemical configuration.

(Brno, Czech Republic), phosphinic acid and isophorone (3,5,5-trimethyl-2-cyclohexen-1-one) were from Fluka (Buchs, Switzerland), Tris was from Serva (Heidelberg, Germany), dichloroacetic acid was from Aldrich (Milwaukee, WI, USA). Phosphinic pseudopeptides were synthesized as a mixture of four diastereomers by a procedure described elsewhere [13]. Prior to CZE analyses, the pseudopeptides were purified by reverse-phase HPLC and characterized by mass spectrometry and amino acid analysis.

2.2 CZE separation conditions

CZE experiments were carried out in a home-made apparatus equipped with a UV detector monitoring absorbance at 206 nm. Data acquisition and handling were performed using the CSW 32 Chromatography Station (DataApex, Prague, Czech Republic). Untreated fused-silica capillaries (ID 50 μm ; OD 200 μm ; total length, 300 mm; effective length, 190 mm) with outer polyimide coating were supplied by the Institute of Glass and Ceramics Materials, Czech Academy of Sciences (Prague, Czech Republic). Separations were performed at ambient temperature of 22–26°C with no active capillary cooling. Pseudopeptides were dissolved in deionized water in a concentration range of 0.7–2.5 mM and were introduced into the capillary hydrodynamically (1.5 kPa pressure for

5–10 s). Phenol, DMSO and isophorone were alternatively used as markers of electroosmotic flow (EOF). The new capillaries were flushed sequentially with water, 0.1 M NaOH, water, followed by the background electrolyte (BGE), each for 5 min. Then, the capillary was conditioned by a 20 min application of the high voltage used in the respective runs in order to equilibrate the inner fused-silica capillary surface and to stabilize the EOF during the subsequent CZE runs. Between runs at the same pH, the capillary was rinsed with the BGE for 1 min. Prior to any change of the BGE, the capillary was rinsed with 0.1 M NaOH for 2 min and then stabilized using the above procedure. CZE separations were performed in the pH range 1.1–3.2 using phosphoric, phosphinic, oxalic and dichloroacetic acids as BGE constituents. The pK_a values of these acids and the limiting mobilities of respective anions are given in Table 1. The BGE solutions were prepared by mixing the appropriate amounts of the acid constituents and Tris in deionized water at the concentrations given in Tables 2 and 3. The BGEs were filtered through a 0.45 μm syringe filter (Millipore, Bedford, MA, USA) before

Table 1. Dissociation constants (pK_a) and limiting mobilities (m^0) of the acidic BGEs constituents

	pK_a^{a}	m^0^{b}
Phosphoric acid ^c	2.15	35.1
Phosphinic acid	1.23	45.2
Dichloroacetic acid	1.26	39.7
Oxalic acid ^c	1.27	42.4

a) pK_a values in water at 25°C taken from [14]

b) Mobilities taken from [15]

c) Only pK_{a1} was taken into account.

Table 2. pH, composition and ionic strength of phosphate BGEs, separation voltage and input power used for the CZE separation and characterization of diastereomers of phosphinic pseudopeptides

pH	Phosphoric acid (mM)	Tris (mM)	Ionic strength (mM)	Voltage (kV)	Input power ($\text{W}\cdot\text{m}^{-1}$)
1.1	1050	0	110	2.10	0.58
1.25	500	0	71	2.70	0.55
1.42	250	0	46	3.50	0.55
1.55	150	0	34	3.30	0.35
1.65	100	0	27	3.30	0.26
1.80	74	7	25	3.90	0.26
2.00	55	14	25	4.75	0.26
2.20	45	18	25	5.55	0.26
2.40	37	20	25	6.48	0.26
2.80	30	24	25	7.80	0.26
3.20	27	25	25	8.50	0.26

Table 3. Composition of phosphinate, dichloroacetate and oxalate BGEs used for the CZE separations of pseudo-peptides

pH	Phosphinate BGEs		Dichloroacetate BGEs		Oxalate BGEs	
	Phosphinic acid (mM)	Tris (mM)	Dichloroacetic acid (mM)	Tris (mM)	Oxalic acid (mM)	Tris (mM)
1.1	250	0	250	0	250	0
1.2	150	0	130	0	150	0
1.4	75	0	75	0	80	0
1.6	40	0	40	0	40	0
1.8	31	6.5	31	6.5	31	6.5
2.0	28.5	13.5	29	13.5	28.5	13
2.2	27.5	17.5	27.5	17.5	27	17.5
2.4	26.5	20.5	26.5	20.5	26	20

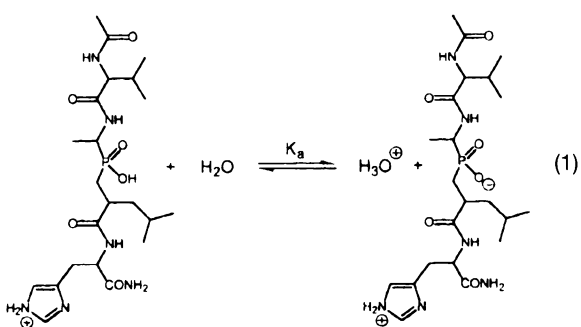
The other characteristics of the BGEs were close to those given in Table 2.

use. The ionic strength of the BGEs was 25 mM, except for those composed of pure acids. The higher ionic strength of these pure acid-based BGEs was unavoidable below pH 1.7.

3 Results and discussion

3.1 Acid-base equilibria of phosphinic pseudo-peptides

The dissociation constant of the phosphinate group was determined in the pseudo-peptides containing not only the negatively chargeable phosphinic acid group but also the cationogenic imidazole group. The dissociation equilibrium of the phosphinic acid group in model pseudo-peptide VH can be expressed as follows:



The thermodynamic dissociation constant K_a can be then written as

$$K_a = \frac{a_{\text{H}_3\text{O}^+} a_{\text{A}^- \text{BH}^+}}{a_{\text{HABH}^+}} = \frac{a_{\text{H}_3\text{O}^+} [\text{A}^- \text{BH}^+]}{[\text{HABH}^+]} \gamma_{\text{A}^- \text{BH}^+} \quad (2)$$

where $a_{\text{H}_3\text{O}^+}$ is the activity of hydroxonium ions, and $a_{\text{A}^- \text{BH}^+}$ and $a_{\text{A}^- \text{HABH}^+}$ are the activities of the zwitterionic and cationic form of the pseudo-peptide, respectively. Activities of species $\text{A}^- \text{BH}^+$ and HABH^+ can be expressed as a product of their concentrations $[\text{A}^- \text{BH}^+]$, $[\text{HABH}^+]$ and the corresponding activity coefficients $\gamma_{\text{A}^- \text{BH}^+}$ and γ_{HABH^+} . The activity coefficients of zwitterionic and generally uncharged species $\text{A}^- \text{BH}^+$ are considered unity, whereas the activity coefficients of charged species for aqueous solutions at 25°C can be evaluated according to the Debye-Hückel formula:

$$-\log \gamma = \frac{0.5085z^2 \sqrt{I}}{1 + 3.281a\sqrt{I}} \quad (3)$$

where z is the charge of the ion, I is the ionic strength of the solution $I = \frac{1}{2} \sum c_i z_i^2$ given in $\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, and a is the effective hydrated diameter (nm) taken as 0.5 nm for all ions in this study. If we define the apparent acidity constant K'_a as:

$$K'_a = \frac{a_{\text{H}_3\text{O}^+} [\text{A}^- \text{BH}^+]}{[\text{HABH}^+]} \quad (4)$$

it is possible to express the thermodynamic dissociation constant pK_a from Eqs. (2) and (4) as:

$$pK_a = pK'_a + \log \gamma_{\text{HABH}^+} \quad (5)$$

The effective electrophoretic mobility of the analyzed pseudo-peptides, m_{eff} , at low pH where the basic group is fully ionized can be expressed by the ionic electrophoretic mobility of the respective species m_{HABH^+} and the degree of dissociation of the phosphinic acid group and Eq. (4) as:

$$m_{\text{eff}} = \frac{m_{\text{HABH}^+}}{1 + 10^{(\text{pH} - \text{p}K'_a)}} \quad (6)$$

Equation (6) describes the dependence of the effective electrophoretic mobility on pH, with the ionic mobility m_{HABH^+} and the apparent acidity constant K'_a as parameters. For the determination of the K'_a values by nonlinear fitting of the experimental mobility data, a modification of Eq. (6) was used:

$$m_{\text{eff}} = \frac{m_1 - m_0}{1 + e^{\frac{\text{pH} - \text{p}K'_a}{\text{pH} - \text{p}K'_a}}} + m_0 \quad (7)$$

where m_0 and m_1 are the electrophoretic mobilities of the deprotonated and protonated forms of the compound taking part in the dissociation equilibrium, respectively. Once the apparent acidity constant K'_a is obtained from the regression procedure, the thermodynamic dissociation constant pK_a can be calculated according to Eq. (5).

3.2 Selection of the BGEs

Phosphinic pseudopeptides containing one acidic phosphinate group ($pK_a \sim 1.8$) and one basic residue of histidine ($pK_a \sim 6$) can be analyzed by CZE as cations at a pH below 3. In order to determine the pK_a value of the phosphinate group in the pseudopeptide chain and the ionic mobility of the fully charged analytes, CZE experiments should be carried out at pH values even below 1. CZE experiments and precise mobility measurements at such low pH are hampered by several factors such as excessive electric conductivity of the BGEs, which leads to substantial temperature increase inside the capillary, high ionic strength of highly acid BGEs that influences the actual mobilities, and the very slow EOF in the uncoated fused-silica capillaries due to the suppressed ionization of the silanol groups that elongates migration time of the neutral EOF marker. These obstacles can be overcome by application of low input power along with correction of mobilities to standard temperature and constant ionic strength. Additionally, analysis time can be reduced by pressure-accelerated measurement of electroosmotic mobility.

BGE constituents used for pK_a determinations by CZE should meet several criteria. First, the pH of the BGEs should be within the $pK_a \pm 1$ range of the BGE constituent so as to assure sufficient buffering capacity of the BGE. Second, interactions between the analyte and the BGE constituents should be as low as possible. Third, low conductivity of the BGE is beneficial in order to limit Joule heating. BGEs consisting of phosphoric, phosphinic, dichloroacetic and oxalic acids as anionic BGE constituents were tested; dissociation constants and mobilities of these components are given in Table 1. The migration behavior of phosphinic pseudopeptides (see Fig. 1) was investigated in the 1.1–2.4 pH region in phosphinate, dichloroacetate and oxalate BGEs and in the 1.1–3.2 pH interval in phosphate BGEs. Compositions of these BGEs are given in Tables 2 and 3. BGEs differ in electric conductivity only a little below pH 2, because conductivity of such acidic BGEs is mostly controlled by the highly conductive hydroxonium ions. At pH values above 2, only the phosphate BGEs exhibit slightly lower conductivities than the other BGEs due to the lowest ionic mobility of the dihydrogenphosphate anions. Electropherograms were recorded by UV-absorption detector at 206 nm and various baseline courses were observed for the different BGEs. Whilst the almost transparent phosphate and phosphinate BGEs provided fairly straight baselines, BGEs composed of somewhat absorbing dichloroacetic and oxalic acids gave some disturbances in the absorbance profiles (see Fig. 2).

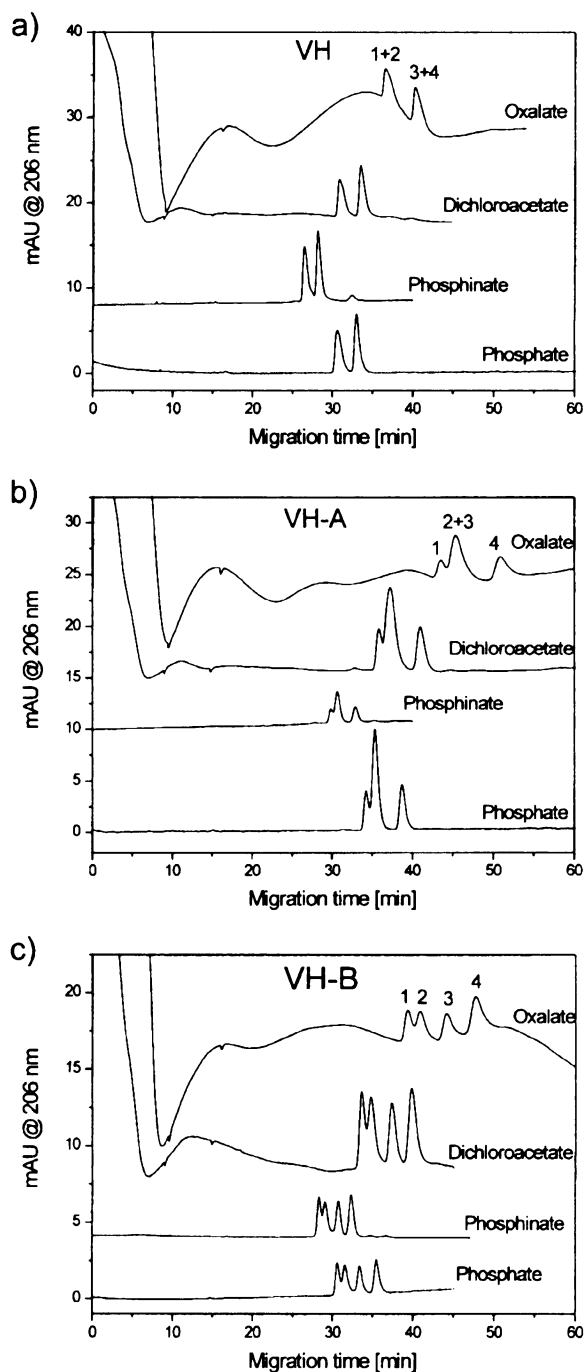


Figure 2. Electropherograms of the diastereomers of the phosphinic pseudopeptides (a) VH, (b) VH-A and (c) VH-B using different BGE constituents at pH 1.55 (phosphate BGE) and at pH 1.6 (phosphinate, dichloroacetate and oxalate BGEs); voltage, 3.3 kV; current, 23–32 μ A. For other experimental conditions see the text. Peaks of the diastereomers are indicated by numbers. The diverse peak heights are due to different injected sample amounts.

The phosphinic pseudopeptides were synthesized as a mixture of four diastereomers and they have been applied for CZE analyses in this form. It was shown that the diastereomers of these pseudopeptides were mostly separable by CZE in achiral, acidic BGEs [13, 16]. However, complete baseline separation of all diastereomers was not achieved for all pseudopeptides due to the lower efficiency of CZE at the relatively low electric field strengths used. Low electric field strength was used to minimize the temperature increase of the BGE that was caused by Joule heating. As can be seen in Fig. 2, the nature of the BGEs constituents virtually does not affect the resolution of the diastereomers. Separation efficiency in the oxalate BGEs was, on the other hand, lower than in the other BGEs. The identical migration order of the diastereomers of the given pseudopeptide in the different BGEs has been confirmed by the addition of the diastereomer standards to the given pseudopeptide sample. The diastereomer standards were available from the preparative HPLC separations of the pseudopeptide diastereomers mixtures [16].

3.3 Determination of the effective electrophoretic mobilities

The effective electrophoretic mobility of pseudopeptides, m_{eff} , in phosphate BGEs in the 1.4–3.2 pH interval was determined from the measurement of migration times of these analytes, t_{mig} , and of the neutral EOF marker, t_{eof} , using Eq. (8):

$$m_{\text{eff}} = \frac{L_t L_d}{U} \left(\frac{1}{t_{\text{mig}}} - \frac{1}{t_{\text{eof}}} \right) \quad (8)$$

where L_t and L_d are the total and effective capillary length, respectively; U is the applied separation voltage.

Due to the suppression of the EOF in low pH BGEs, long migration times of the EOF marker hampered the experiments. Therefore, pressure-accelerated determination of electroosmotic mobility was employed in order to shorten the analysis time. This approach introduced by Williams and Vigh [17] and by Sandoval and Chen [18] can be described as follows. Firstly, the sample solution is injected along with neutral marker (band A) into the capillary filled with BGE. Next, CZE analysis is started by the application of separation voltage, the analytes are separated and the neutral marker zone moves with the velocity of EOF. Then, analysis is terminated at a specific time (t_U) just after zones of the separated compounds pass the detector. Then, after the separation voltage is turned off, a second band of the neutral marker (band B) is injected. Finally, upon application of the injection pressure onto the pure BGE electrolyte vessel, both zones of the neutral marker A and B reach the detector at mobilization times t_A and t_B ,

which are recorded in the usual manner. If the injection times are negligible compared to the mobilization times t_A and t_B , electroosmotic mobility, m_{eof} , can be expressed as follows:

$$m_{\text{eof}} = \frac{L_t L_d}{U t_U} \left(1 - \frac{t_A}{t_B} \right) \quad (9)$$

Then the effective mobility of the analytes can be calculated from their migration times according to Eq. (10):

$$m_{\text{eff}} = \frac{L_t L_d}{U} \left(\frac{1}{t_{\text{mig}}} - \frac{1}{t_U} + \frac{t_A}{t_U t_B} \right) \quad (10)$$

This approach was used for all experiments in phosphate, dichloroacetate and oxalate BGEs as well as for experiments in phosphate BGEs at pH 1.1 and 1.2.

In this procedure of effective mobility determination we did not take into account that using water solution of the peptide samples for their CZE separations in the BGEs of different composition and pH may result in different sample stacking effects in the initial phase of the CZE experiment. However, this initial phase, during which the peptides move with higher velocity due to the higher electric field strength in the water sample zone, is very short in comparison with the time of their migration in the homogeneous medium of the BGE. Consequently, the effective electrophoretic mobilities, determined from the average migration velocities, are not significantly influenced by these effects.

3.4 Correction of mobilities to standard temperature

Temperature dependence of the electrophoretic mobilities is one of the most important effects influencing the precision of CZE determination of pK_a values because Joule heating produced during the CZE experiments causes an elevation of the average temperature of the BGE inside the capillary which, in turn, affects the actual electrophoretic mobilities of the present ions. The temperature increase can be minimized by using BGEs with low conductivities, low input power, capillaries of small inner diameter and also active cooling of the capillary. However, extremely acidic BGEs exhibit relatively high conductivity due to the high concentration of hydroxonium ions. Moreover, experiments were carried out in a home-made device, which was not equipped with active cooling of the capillary. Under these circumstances, knowledge of the actual temperature inside the capillary during the CZE runs and subsequent recalculation of the mobilities to the standard temperature of 25°C is necessary. Temperature increase can be determined by several approaches, such as from the temperature variation of the electroosmotic mobility [19, 20], from the tempera-

ture-dependent absorption of a thermochromic solution [21] or by Raman [22] or NMR [23] thermometry. The buffer temperature can also be estimated from changes in the electrical conductivity of the solution [19, 24, 25]. This approach was chosen for estimation of the temperature increase because it provides an average temperature increase and the conductivity can be simply measured without any special equipment.

The electric current was measured in a wide range of voltages with the capillary filled with an aqueous solution of 0.02 M potassium chloride and the specific electric conductivity κ of the electrolyte solution was calculated from Eq. (11)

$$\kappa = \frac{L_t}{\pi R_i^2} \frac{i}{U} \quad (11)$$

where R_i is the inner radius of the capillary (m) and i is the electric current through the capillary (A). The virtually linear variation of the specific electric conductivity of the standard 0.02 M KCl solution in the 15°C to 35°C temperature range allows expression of the temperature increase, ΔT , at the corresponding power as:

$$\Delta T = T_i - T_o = 1.86 \times 10^2 (\kappa_{T_i} - \kappa_{T_o}) \quad (12)$$

where T_i is the average temperature inside the capillary (°C), T_o is the ambient temperature during calibration (°C), κ_{T_i} is the conductivity of the electrolyte at a given applied power and κ_{T_o} is the conductivity at the lowest calibration voltage when the temperature increase inside the capillary was taken as negligible. A calibration plot relating the temperature increments of the solution inside the capillary to the applied power leads to the following estimation of the temperature increments: 4°C at a power of 0.26 W·m⁻¹; 6°C at 0.35 W·m⁻¹ and 10°C at 0.55 W·m⁻¹. The measured effective mobilities were subsequently recalculated to the standard temperature of 25°C assuming that the mean increase of mobility was 2.0%/°C. This is a lower value than 2.5%/°C value used in our previous paper [26] where the procedure for temperature correction of mobilities is described in more detail. We have preferred this lower value from a generally acceptable 2–2.5%/°C range of this coefficient since using 2.5%/°C value resulted in overestimated temperature corrections of the mobilities at relatively high input power used in the most acidic BGEs.

3.5 Correction of mobilities to constant ionic strength

Due to the dependence of the electrophoretic mobilities on the ionic strength of the BGE, it is recommended to carry out all experiments for dissociation constant determination in BGEs of constant ionic strength. Therefore, an ionic strength of 25 mM was selected for most of our

experiments. However, some of the BGEs used exceeded this ionic strength value because their pH was very low. Hence, mobilities obtained in these BGEs and already corrected for temperature increase were recalculated to the values corresponding to the ionic strength of 25 mM by combining a formula reported in [27]:

$$m = m^0 - \frac{(0.229m^0 + 3.12 \times 10^{-8})\sqrt{I}}{1 + 3.28a\sqrt{I}} \quad (13)$$

where m^0 (m²V⁻¹s⁻¹) is the limiting mobility, I is the ionic strength (mol·dm⁻³) and a is the diameter of the counterion (nm). Equation (13) was experimentally verified to be valid for uni-univalent aqueous solutions of electrolytes over an ionic strength interval of up to 75 mM. Nevertheless, mobilities of the compounds analyzed at pH 1.1 were also handled using Eq. (13) despite the fact that the ionic strength of these BGEs exceeded the limit of 75 mM. However, it is reasonable to assume, that validity of Eq. (13) does not stop strictly at 75 mM ionic strength and the error in the mobility correction caused by its application at 110 mM ionic strength will not be dramatically large. Note that the square root of the ionic strength is used in Eq. (13), which means that the effective exceeding of its validity range is even smaller than the apparent one. In addition, due to the low pK_a of phosphinate group to be determined from the pH dependence of the effective mobilities, it is advantageous to have the values of effective mobilities at pH as low as possible. Also for the ionic mobility determination it is better to have at the lowest value of pH 1.1 the approximate value of the effective mobility than no value.

3.6 Determination of the ionic mobilities and dissociation constants

The effective mobilities of the phosphinic pseudopeptides were measured in 1.1–3.2 pH interval in phosphate BGEs and in the 1.1–2.4 pH interval in the case of phosphinate, dichloroacetate and oxalate BGEs. In order to keep sufficient buffering capacity, pH 2.4 was the highest pH value for these BGEs. The phosphinic pseudopeptides contained the ionizable anionic group of phosphinate ($pK_a \sim 1.8$) and basic residue of histidine ($pK_a \sim 6$). Effective mobilities of the pseudopeptides were then close to zero at pH 3.2 and turned into positive values at lower pH due to protonation of the phosphinate group. The effective mobilities obtained at ambient temperature were first recalculated to the standard temperature of 25°C and then standardized to the ionic strength of 25 mM using procedures described above. As can be seen in Fig. 3, the effects of the elevated temperature and variable ionic strength of the BGEs on the effective mobilities are enormous at the lowest pH values.

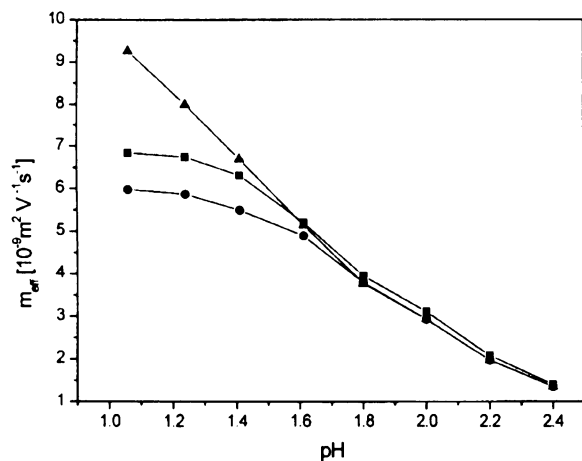


Figure 3. pH dependencies of (■) uncorrected effective mobilities, (●) mobilities corrected to standard temperature of 25°C and (▲) mobilities corrected to standard temperature and constant ionic strength of the BGEs for the diastereomer VH-A 4 in dichloroacetic acid BGEs.

Effective mobilities (mean values from two CZE measurements differing less than 1–2%) of selected single pseudo-peptide diastereomers previously corrected to the standard temperature of 25°C, and the constant ionic strength of 25 mM of the BGEs were used for the determination of their phosphinate group pK_a and ionic mobilities. These characteristics were determined by nonlinear regression of the mobility data to Eq. (7) and the results for selected pseudo-peptide diastereomers, VH 1, VH-A 4 and VH-B, are presented in Table 4. The pK_a values and ionic mobilities have been calculated for all four diastereomers of three pseudo-peptides analyzed, but only the characteristics of single representative diastereomer of each pseudo-peptide obtained in four different BGEs are presented in Table 4 since the differences of pK_a values of individual diastereomers of the given pseudo-peptide determined in phosphate BGEs have been already published in our previous paper [13]. Note that regression of mobilities obtained in all kinds of BGEs was performed in 1.1–3.2 pH interval by using mobilities gained in the phosphate BGEs at pH 2.8 and 3.2. This approximation is substantiated by close values of the effective mobilities at pH values above 2 in all four BGEs used (see Fig. 4) and by their approaching zero value with increasing pH. The phosphinate and dichloroacetate BGEs provided fairly close effective mobilities in the whole pH range, whereas the effective mobilities in the oxalate BGEs were slightly lower in the more acidic part of the pH range (see Fig. 4). On the other hand, mobilities in the phosphate BGEs differ significantly from mobilities obtained in the other BGEs in the most acidic pH region. This fact is reflected both in the estimated ionic mobilities and in the deter-

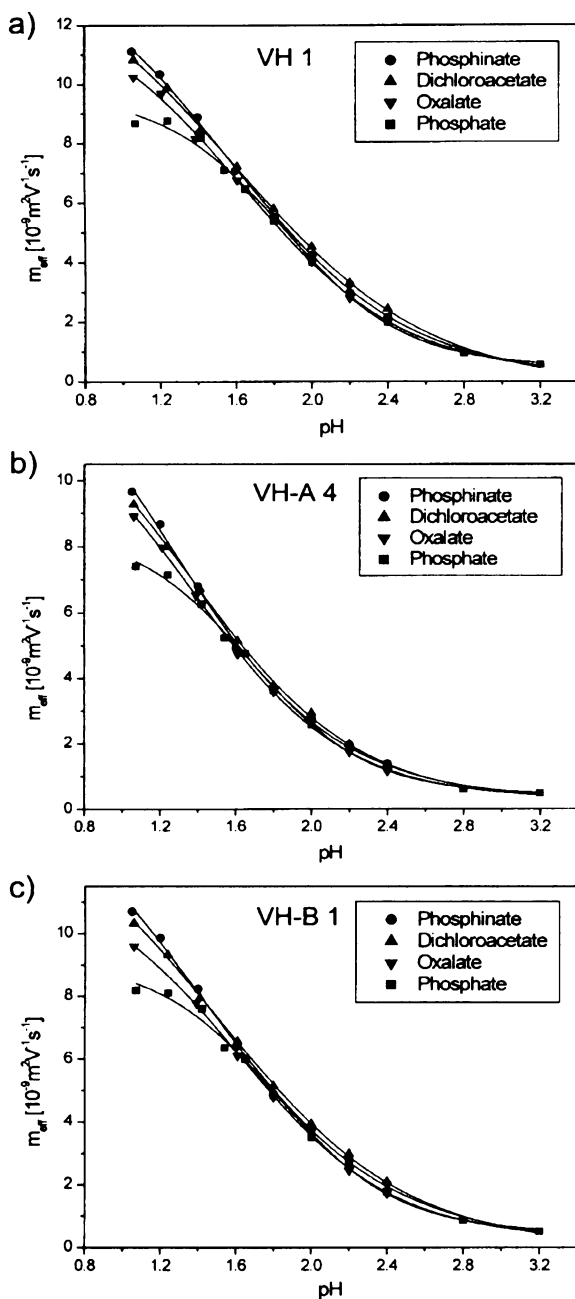


Figure 4. Dependencies of the effective mobilities of selected diastereomers (a) VH 1, (b) VH-A 4 and (c) VH-B 1 on the pH of BGEs composed of different constituents.

mined pK_a values of the phosphinate group (see Table 4). Phosphinate pK_a values obtained from phosphate BGEs in 1.1–3.2 pH range are in good agreement with the pK_a values obtained in phosphate BGEs in 1.4–3.2 pH interval reported earlier [13], which suggests suitability of the correction procedures used. Nevertheless, pK_a values from

Table 4. Phosphinate group pK_a values and ionic mobilities (m) of selected diastereomers of the phosphinic pseudopeptides determined using different BGE constituents

BGE constituent	Pseudopeptide diastereomer					
	VH 1		VH-A 4		VH-B 1	
	pK_a	m	pK_a	m	pK_a	m
Phosphate	1.79 ± 0.03	9.7 ± 0.4	1.62 ± 0.03	8.5 ± 0.3	1.76 ± 0.04	9.2 ± 0.4
Phosphinate	1.50 ± 0.06	14.9 ± 0.9	1.19 ± 0.11	15.7 ± 2.0	1.35 ± 0.09	15.9 ± 1.4
Dichloroacetate	1.53 ± 0.07	14.7 ± 1.0	1.32 ± 0.06	13.6 ± 0.9	1.44 ± 0.05	14.6 ± 0.8
Oxalate	1.58 ± 0.04	12.8 ± 0.6	1.33 ± 0.05	12.7 ± 0.8	1.56 ± 0.04	11.9 ± 0.5

the phosphate BGEs differ significantly from the pK_a values obtained with other BGEs. Such differences in ionic mobilities and pK_a values are likely due to differences in solvation or ion-pair formation between the phosphinate pseudopeptides and the different BGE constituents.

4 Concluding remarks

It was shown that CZE in highly acidic BGEs is a suitable method for analysis and physicochemical characterization of phosphinic pseudopeptides. Obstacles arising from the fundamental features of the highly acidic BGEs, *i.e.*, high ionic strength and high electric conductivity, can be overcome by application of low electric field strengths and appropriate correction procedures. Additionally, the results suggest that attention should be paid to the selection of the BGE constituents, since ion pairing of the analytes with the BGE components may have substantial effects on the ionic mobility and dissociation constant values calculated from the experiments.

This work was supported by the Grant Agency of the Czech Republic, grant No. 203/02/1467, the Grant Agency of the Academy of Sciences of the Czech Republic, grant No. B4055 003 and the Research Project AVOZ4 055 905 of the Academy of Sciences of the Czech Republic.

Received September 30, 2002

5 References

- [1] Kašička, V., *Electrophoresis* 2001, 22, 4139–4162.
- [2] McCormick, R. M., *Anal. Chem.* 1988, 60, 2322–2328.
- [3] Lin, C. E., Chang, C. C., Lin, W. C., *J. Chromatogr. A* 1997, 759, 203–209.
- [4] Gluck, S. J., Steele, K. P., Benkő, M. H., *J. Chromatogr. A* 1996, 745, 117–125.
- [5] Barták, P., Bednář, P., Stránský, Z., Boček, P., Vespalec, R., *J. Chromatogr. A* 2000, 878, 249–259.
- [6] Cleveland, J. A., Benkő, M. H., Gluck, S. J., Walbroehl, Y. M., *J. Chromatogr. A* 1993, 652, 301–308.
- [7] Cai, J., Smith, J. T., El Rassi, Z., *J. High Resolut. Chromatogr.* 1992, 15, 30–32.
- [8] Gluck, S. J., Cleveland, J. A., *J. Chromatogr. A* 1994, 680, 43–48.
- [9] Gluck, S. J., Cleveland, J. A., *J. Chromatogr. A* 1994, 680, 49–56.
- [10] Mrestani, Y., Neubert, R., Munk, A., Wiese, M., *J. Chromatogr. A* 1998, 803, 273–278.
- [11] Collinsová, M., Jiráček, J., *Curr. Med. Chem.* 2000, 7, 629–647.
- [12] Grams, F., Dive, V., Yiotakis, A., Yiallourous, I., Vassiliou, S., Zwilling, R., Bode, W., Stocker, W., *Nat. Struct. Biol.* 1996, 3, 671–675.
- [13] Koval, D., Kašička, V., Jiráček, J., Collinsová, M., Garrow, T. A., *J. Chromatogr. B* 2002, 770, 145–154.
- [14] Dean, J. A., *Lange's Handbook of Chemistry 15th Edition*, McGraw-Hill, New York 1999.
- [15] Hirokawa, T., Nishino, M., Aoki, N., Kiso, Y., Sawamoto, Y., Yagi, T., Akiyama, J.-I., *J. Chromatogr.* 1983, 271, D1–D106.
- [16] Koval, D., Kašička, V., Jiráček, J., Collinsová, M., *J. Sep. Sci.* 2003, in print.
- [17] Williams, B. A., Vigh, C., *Anal. Chem.* 1996, 68, 1174–1180.
- [18] Sandoval, J. E., Chen, S. M., *Anal. Chem.* 1996, 68, 2771–2775.
- [19] Burgi, D. S., Salomon, K., Chien, R. L., *J. Liq. Chromatogr.* 1991, 14, 847–867.
- [20] Knox, J. H., McCormack, K. A., *Chromatographia* 1994, 38, 207–214.
- [21] Wätzig, H., *Chromatographia* 1992, 33, 445–448.
- [22] Liu, K. L. K., Davis, K. L., Morris, M. D., *Anal. Chem.* 1994, 66, 3744–3750.
- [23] Lacey, M. E., Webb, A. G., Sweedler, J. V., *Anal. Chem.* 2000, 72, 4991–4998.
- [24] Gobie, W. A., Ivory, C. F., *J. Chromatogr.* 1990, 516, 191–210.
- [25] Bello, M. S., Chiari, M., Nesi, M., Righetti, P. G., Saracchi, M., *J. Chromatogr.* 1992, 625, 323–330.
- [26] Koval, D., Kašička, V., Jiráček, J., Collinsová, M., Garrow, T. A., *Electrophoresis* 2002, 23, 215–222.
- [27] Survay, M. A., Goodall, D. M., Wren, S. A. C., Rowe, R. C., *J. Chromatogr. A* 1996, 741, 99–113.

Dušan Koval,
Václav Kašička,
Jiří Jiráček,
Michaela Collinsová

Institute of Organic Chemistry
and Biochemistry, Academy of
Sciences of the Czech
Republic, Flemingovo nám. 2,
166 10 Prague 6,
Czech Republic

Separation of diastereomers of phosphinic pseudopeptides by capillary zone electrophoresis and reverse phase high-performance liquid chromatography

Capillary zone electrophoresis (CZE) and reverse phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) were used for separation of diastereomers of phosphinic pseudopeptides in achiral separation media. A set of phosphinic pseudopeptides, i. e. peptides with one peptide bond substituted by phosphinic acid moiety $-PO_2^-CH_2-$ derived from the structure N-Ac-Val-AlaB(-CH₂)Leu-His-NH₂ synthesized as a mixture of four diastereomers was used. Separations of diastereomers by CZE were carried out in Tris-phosphate background electrolytes in the pH range 1.1–3.2 and at least partial separation of the four diastereomers of each pseudopeptide was achieved. A routinely used RP-HPLC method (C₁₈-silica column and water/acetonitrile/trifluoroacetic acid mobile phase) was also capable of resolving the diastereomers. In addition, since individual diastereomers of majority of the pseudopeptides were isolated by RP-HPLC it was possible to check the purity of these RP-HPLC separated diastereomers and to compare the migration order of the diastereomers in CZE with their elution order in RP-HPLC. The results obtained by CZE and RP-HPLC demonstrate a complementarity of both methods in analysis and separation of phosphinic pseudopeptides including their diastereomers.

Key Words: Diastereomer separation; Phosphinate; Phosphinic pseudopeptides; Capillary zone electrophoresis; HPLC

Received: June 27, 2002; revised: November 4, 2002; accepted: November 7, 2002

DOI 10.1002/jssc.200301382

1 Introduction

Capillary zone electrophoresis (CZE) has developed within the last decade into a powerful analytical tool for the separation of biomolecules such as peptides [1–4], including separation of their stereoisomers. Despite the fact that the most important stereoisomer separations are separations of enantiomers, utilisation of CZE for separations of diastereomers is also challenging, especially in achiral separation media. Molecular shape differences of diastereomers expressed as minor changes of hydrodynamic radii and dissociation constants of ionisable groups are the principal reason for variations of the electrophoretic mobilities of diastereomers. However, such mobility differences might be insufficient to enable successful CZE diastereomer separation in a free achiral solution. Therefore, addition of chiral selectors or polymers to the back-

ground electrolyte (BGE) is often used as a means of achieving satisfactory diastereomer separation [5].

Nevertheless, separations of peptidic diastereomers by CZE play an important role in indirect separations of enantiomers. This approach of chiral analysis without the presence of a chiral selector in the BGE involves derivatization of the enantiomers with an optically pure agent and subsequent separation of the resulting diastereomers in achiral separation systems [6]. One of the earliest application of this approach was the conversion of four stereoisomers of dipeptide L,D-Ala-L,D-Ala into diastereomers via derivatization with L-Marfey's reagent and their separation by MEKC employing sodium borate-SDS achiral medium [7]. Another CZE diastereomer separation of peptides occurs as a step preceding chiral analysis. At first, separation of stereoisomers is optimised in terms of BGE composition, pH, or ionic strength and separation of the diastereomers is often achieved. Then a chiral selector is added to the BGE and chiral analysis is performed. This strategy was applied for CZE separation of oligopeptide stereoisomers [8–11] in acid phosphate or citrate [12] BGEs and for MEKC separation of derivatized dipeptides stereoisomers in borate-SDS system [13].

Correspondence: Václav Kašička, Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Flemingovo nám. 2, 166 10 Prague 6, Czech Republic. Phone: +420 2 20183239. Fax: +420 2 33323956. E-mail: kasicka@uochb.cas.cz.

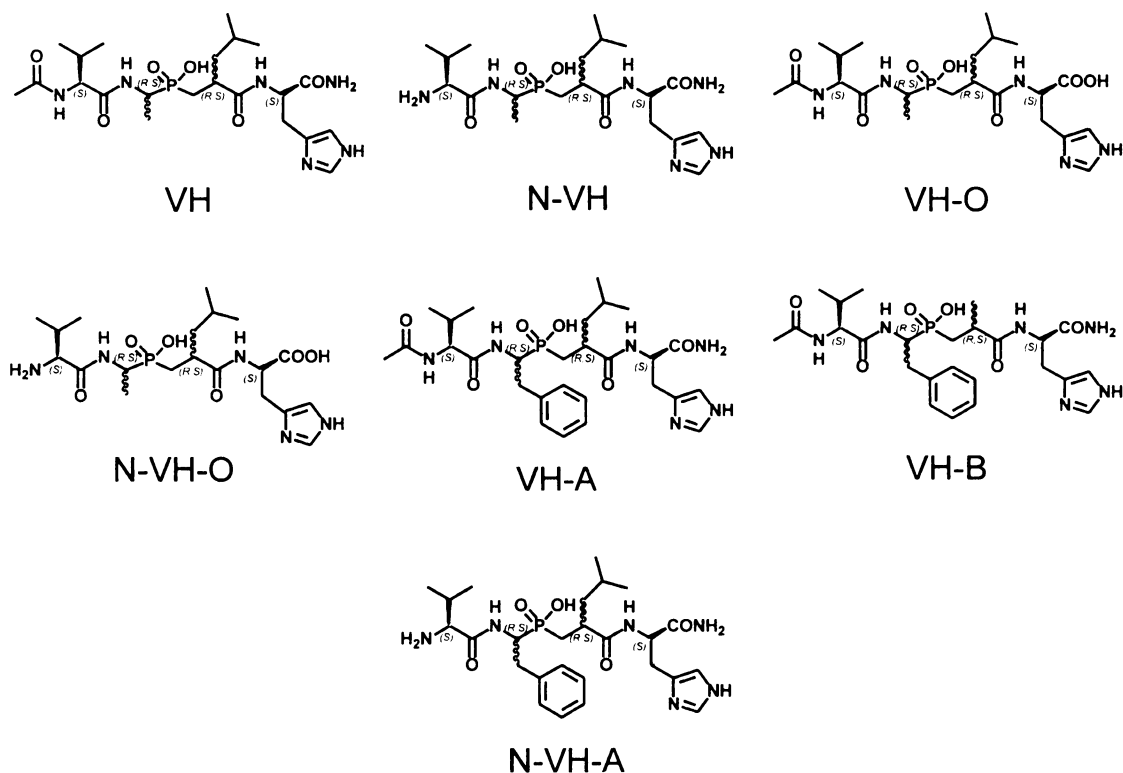


Figure 1. Structures of analyzed phosphinic pseudopeptides including stereochemical configurations.

As an example of diastereomer separation of peptides in achiral conditions, a paper of Zhang et al. [14] dealing with 13 pairs of diastereomers of synthetic L-Ala and D-Ala analogs of a tridecapeptidic pheromone by CZE in phosphate BGEs can be cited. Gilges et al. [15] reported a separation of diastereomers of a bradykinin B₂ antagonist by MEKC with non-ionic surfactants and Hansen et al. [16] separated dipeptide diastereomers by nonaqueous capillary electrophoresis.

HPLC is a well-established technique for peptide analysis [17, 18] and it is currently also used, mostly in reverse phase mode (RP-HPLC), for routine separations of stereoisomers in crude synthetic products [19, 20]. A separation of diastereomers of synthetic analogues of deltorphin C and enkephalin by Péter et al. [21], a study on a series of D-isomer substitutions of 36-peptide neuropeptide Y by Kirby et al. [22], an ion-pair RP-HPLC separation of diastereomers of tripeptide thymotrinan and tetrapeptide thymocartin by Gazdag et al. [23], or a separation of tryptophan peptide diastereomers by Griehl et al. [24] may serve as relevant examples of successful RP-HPLC separations of peptide diastereomers.

Phosphinic pseudopeptides represent a class of peptide isosteres with one peptide bond substituted by enzymati-

cally nonhydrolysable phosphinic acid moieties $-PO_2^-CH_2-$ or $-PO_2^-$ [25]. These compounds are intensively studied because of their promising biological activity – mimicking of the substrate transition state for at least two classes of proteolytic enzymes – Zn-metalloproteinases and aspartic acid proteinases [25, 26].

The aim of this study is to demonstrate the applicability of CZE and RP-HPLC for the separation of diastereomers in achiral conditions for the set of phosphinic pseudopeptides derived from the structure N-Ac-Val-Ala $\psi(PO_2^-CH_2)$ Leu-His-NH₂ indicated by its N- and C-terminal amino acid residues as VH. Derivatives with side chain modifications of VH are indicated as VH-A and VH-B, respectively, and derivatives with deprotected N- and/or C-terminus are indicated as N-VH, N-VH-A, VH-O, and N-VH-O, respectively (see Figure 1).

2 Materials and methods

2.1 Reagents and chemicals

All chemicals were of analytical reagent grade. Phosphoric acid was obtained from Lachema (Brno, Czech Republic), Tris (tris(hydroxymethyl)aminomethane) was from Serva (Heidelberg, FRG), acetonitrile was from Merck

Table 1. pH, composition, and ionic strength of the BGEs, separation voltage, and input power used as starting conditions for determination of pH dependence of resolution of pseudopeptide diastereomers by CZE.

pH	Phosphoric acid [mM]	Tris [mM]	Ionic strength [mM]	Voltage [kV]	Input power [W · m ⁻¹]
1.10	1050	0	110	2.10	0.58
1.25	500	0	71	2.70	0.55
1.42	250	0	46	3.50	0.55
1.55	150	0	34	3.30	0.35
1.65	100	0	27	3.30	0.26
1.80	74	7	25	3.90	0.26
2.00	55	14	25	4.75	0.26
2.20	45	18	25	5.55	0.26
2.40	37	20	25	6.48	0.26
2.80	30	24	25	7.80	0.26
3.20	27	25	25	8.50	0.26

(Darmstadt, FRG), and trifluoroacetic acid from Fluka (Buchs, Switzerland). Phosphinic pseudopeptides were synthesized as a mixture of four diastereomers on a Rink Amide AM resin or 2-chlorotrityl resin (Calbiochem-Novabiochem, Läufeingen, Switzerland) following the procedure of Yiotakis [27]. The protected phosphinic pseudopeptides precursors Fmoc-Ala ψ [PO(OAd)-CH₂]Leu-OH, Fmoc-Phe ψ [PO(OAd)-CH₂]Leu-OH, and Fmoc-Phe ψ [PO(OAd)-CH₂]Ala-OH were a kind gift from Dr. Vincent Dive of the Département d'Ingénierie et d'Etudes des Protéines, CEA-Saclay, Gif sur Yvette, France. Prior to CZE analyses, the pseudopeptides were purified by RP-HPLC (see below) and characterized by mass spectrometry and amino acid analysis.

2.2 CZE separation conditions

CZE experiments were carried out in a home made apparatus equipped with a UV detector monitoring absorbance at 206 nm. Data acquisition and handling were performed using the CSW 32 Chromatography Station (DataApex, Prague, Czech Republic). Untreated fused silica capillaries (ID 50 μ m, OD 200 μ m, total length 300 mm, effective length 190 mm) were supplied by the Institute of Glass and Ceramics Materials, Czech Academy of Sciences (Prague, Czech Republic). Separations were performed at ambient temperature of 23–26 C. Pseudopeptides were dissolved in deionised water in a concentration range of 0.7–2.5 mM and were introduced into the capillary hydrodynamically (pressure 700 Pa for 5 s).

The new capillaries were flushed sequentially with water, 0.1 M NaOH, and water again, followed by background electrolyte (BGE) for 5 min each. Then, the BGE was conditioned by 20 min application of the same high voltage as that used in the respective runs in order to equilibrate the inner fused silica capillary surface and to stabilize the

electroosmosis during the subsequent CZE runs. Between runs at the same pH, the capillary was rinsed with the BGE for 1 min. Prior to any change of BGE, the capillary was rinsed with 0.1 M NaOH for 5 min and then stabilized using the above procedure.

BGE solutions were prepared by mixing the appropriate amounts of Tris and phosphoric acid in deionised water in the concentrations given in **Table 1**. BGEs were filtered through a 0.45 μ m syringe filter (Millipore, Bedford, MA, USA) before use.

2.3 RP-HPLC separation conditions

RP-HPLC experiments were performed on a Waters liquid chromatograph with a Waters 625 LC gradient pump and a Waters 486 UV/VIS detector operating at 218 nm (Waters Corporation, Milford, MA, USA). Data were acquired and handled with a CSW 1.7 Chromatography Station (DataApex, Prague, Czech Republic). A semipreparative Vydac 218TP510 column of parameters 250 \times 10 mm, 5 μ m (Grace Vydac, Hesperia, CA, USA) was used with flow rate 3 mL min⁻¹ of mobile phase of composition described in **Table 2**. Pseudopeptide samples in the form of crude synthetic product were dissolved in 8% (v/v) acetonitrile/water mixture in approximate concentration 10 mg mL⁻¹ and injected in volume 10–200 μ L.

3 Results and discussion

3.1 Selection of CZE experimental conditions

The whole set of studied pseudopeptides contains basic residue of histidine and anionogenic phosphinic acid group. Additional ionogenic N-terminal amino and C-terminal carboxylic groups appear if *N*-acetyl and/or amide protecting groups are removed from the pseudopeptide

Table 2. Composition of mobile phase and linear gradient programs used for separation of pseudopeptide diastereomers by RP-HPLC.

Compound	Composition of mobile phase		
	A – 0.1% (v/v) trifluoroacetic acid (TFA) in water B – 80% (v/v) acetonitrile + 0.1% (v/v) TFA in water		
	Linear gradient program		
VH	0 min – 10% B	40 min – 35% B	45 min – 100% B
N-VH	0 min – 10% B	40 min – 18% B	61 min – 100% B
VH-O	0 min – 10% B	40 min – 25% B	45 min – 100% B
N-VH-O	0 min – 8% B	40 min – 18% B	45 min – 100% B
VH-A	0 min – 10% B	40 min – 35% B	45 min – 100% B
VH-B	0 min – 10% B	16 min – 20% B 55 min – 20% B	56 min – 100% B
N-VH-A	0 min – 10% B	40 min – 30% B	60 min – 100% B

termini. Since the phosphinate dissociation constant (pK_a) in these pseudopeptides is in the range 1.5–2.0 [28] and the dissociation constant of terminal carboxylic group may be estimated to be 3–4, all of the pseudopeptides carry positive net charge in the strong acid region close to phosphinate pK_a and can be then analyzed in the bare fused silica capillaries in the cationic CZE mode. When pH increases and the phosphinate group becomes negatively charged, pseudopeptides N-VH and N-VH-A with two cationogenic groups in the molecules originating from the free amino group and histidine are still positively charged whereas those with only one basic residue of histidine (VH, VH-A, and VH-B) become uncharged. Mobilities of pseudopeptides VH-O and N-VH-O are influenced by dissociation of the free carboxylic group at the C-terminus resulting in negative mobility of VH-O at pH above 2.4 [28]. Due to the very low electroosmotic flow in acid BGEs this compound cannot be analyzed in the cationic CZE mode at pH above 2.4. On the other hand, N-VH-O still remains as a cation in this pH region owing to one extra positive charge from the free N-terminal amino group in comparison to VH-O.

3.2 Optimisation of diastereomer separation by CZE

It was reported in our recent studies [28, 29] that separation of diastereomers of phosphinic pseudopeptides occurs at pH values close to phosphinate pK_a values. At first, the dependence of resolution of diastereomers in the pH interval 1.1–3.2 was investigated using phosphoric acid or Tris-phosphate buffers as BGEs. Composition and other characteristics of BGEs along with applied voltages used as starting conditions for diastereomer separations are given in Table 1. Resolution $R_{i,j}$ between i th and j th diastereomer was calculated from their migration times

($t_{mig,i}$, $t_{mig,j}$) and peak widths at the baseline (w_i , w_j) determined from peak widths at 50% height:

$$R_{ij} = \frac{2(t_{mig,j} - t_{mig,i})}{w_i + w_j} \quad (1)$$

In the case of pseudopeptides with blocked N-terminus, i.e. VH, VH-O, VH-A, and VH-B, the optimal pH for separation of their diastereomers proved to be in the pH region 1.5–2.0, as can be seen from the pH dependence of resolution of diastereomers of pseudopeptide VH-B in **Figure 2.a**, which shows the typical pH dependence of diastereomer resolution of this subgroup of pseudopeptides. Pseudopeptides with free N-terminus, N-VH and N-VH-A, exhibited the best resolutions of diastereomers in BGEs of more acid pH range 1.2–1.4 as demonstrated by the pH dependence of resolution of diastereomers of a representative pseudopeptide of this subgroup, N-VH, in **Figure 2.b**. On the other hand, the best resolution of diastereomers of the pseudopeptide with free both N- and C-termini, N-VH-O, was achieved at less acid pH range 2.8–3.2 (see **Figure 2.c**). Apparently, only in the case of pseudopeptides with blocked N-terminus the optimal pH range of their diastereomer resolution (pH 1.5–2.0) matched the interval of pK_a values of their phosphinate group ($pK_a = 1.5–1.8$) [28]. In the other two subgroups of pseudopeptides the pH optimum of their diastereomers resolution was shifted to the more acid region (for peptides with free N-terminus) or to the higher pH value (for peptide with both N- and C-termini free), i.e. differences in phosphinic pK_a values of these diastereomers were not the main sources of their different mobilities and did not play a major role in their separation.

The measurements of pH dependence of the diastereomer separation were carried out in BGEs of constant ionic strength 25 mM with the exception of BGEs composed of phosphoric acid only, i.e. in BGEs with pH lower than 1.7.

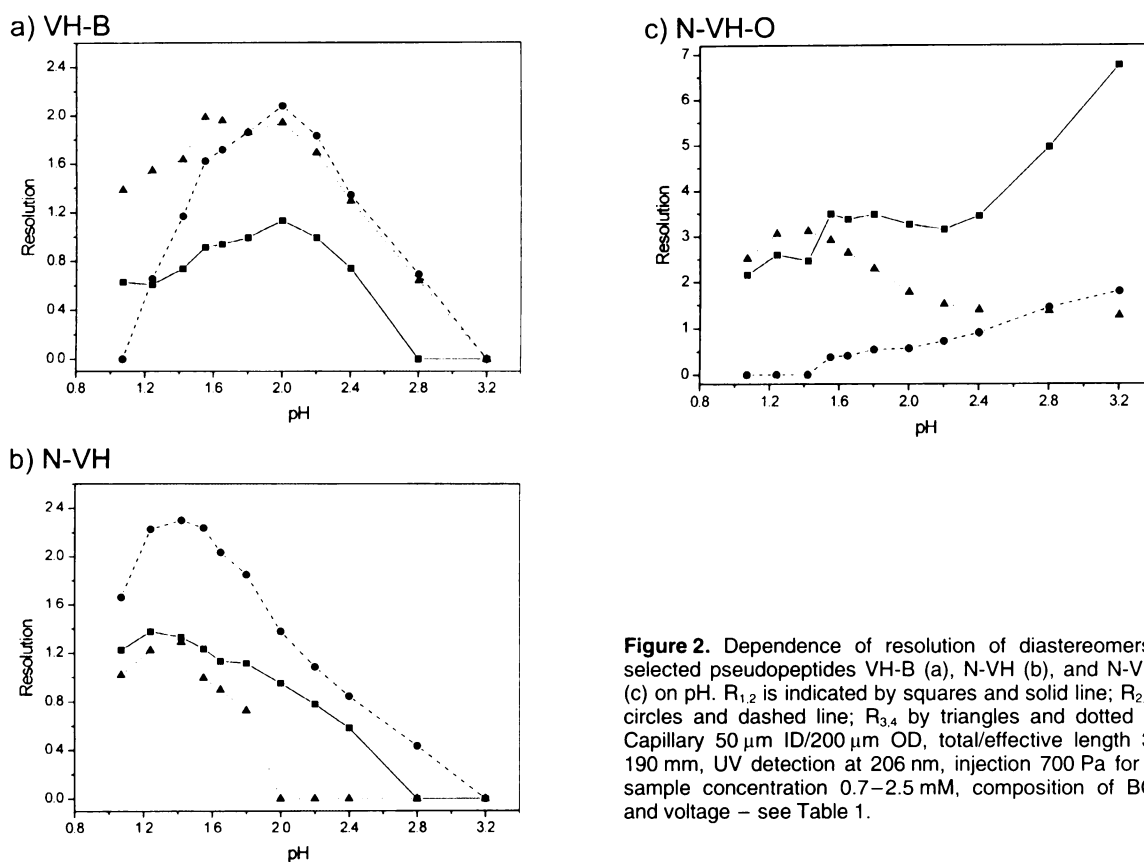


Figure 2. Dependence of resolution of diastereomers of selected pseudopeptides VH-B (a), N-VH (b), and N-VH-O (c) on pH. R_{1,2} is indicated by squares and solid line; R_{2,3} by circles and dashed line; R_{3,4} by triangles and dotted line. Capillary 50 μm ID/200 μm OD, total/effective length 300/190 mm, UV detection at 206 nm, injection 700 Pa for 5 s, sample concentration 0.7–2.5 mM, composition of BGEs and voltage – see Table 1.

Such low pH values of BGEs cannot be achieved without increasing ionic strength above 25 mM. Also the input power for these highly acidic BGEs was higher than the constant and low input power (0.26 W m⁻¹) applied to BGEs with pH values above 1.7 (see Table 1). From this point of view, the measured pH dependence of resolution of pseudopeptide diastereomers is partially influenced also by increasing ionic strength of BGEs and rising temperature inside the capillary, but in view of the fact that the influence of these quantities on the mobility is much lower than the influence of pH, the obtained dependences of resolution can be interpreted mainly as pH dependences. However, for the determination of pK_a values of the phosphinic acid moiety in pseudopeptides, the effects of increased ionic strength and temperature have been considered and the measured effective mobilities have been corrected to constant ionic strength and standard temperature [28].

The starting separation conditions presented in Table 1 were further optimized by means of increased separation voltage and ionic strength of BGEs and at least partial separation was achieved for all four diastereomers of each pseudopeptide. By using a BGE of pH 2.0, an ionic strength of 50 mM, and a separation voltage of 9–10 kV,

a substantial enhancement of diastereomers separation was achieved for pseudopeptides VH (Figure 3.a) and VH-A (Figure 3.c) and only a small improvement was observed for pseudopeptides VH-B (Figure 3.d) and VH-O (record not shown). Optimal separation for diastereomers of pseudopeptide N-VH was achieved at pH 1.25 (Figure 3.b) and for diastereomers of pseudopeptide N-VH-A at pH 1.42 (Figure 3.e); the separation voltage was 5 kV for both compounds. Due to excessive conductivity of the BGEs with pH below 1.7, no experiment with increased ionic strength was carried out and only the BGEs given in Table 1 were used for these pseudopeptides. In addition, no further optimization of separation conditions was necessary also for pseudopeptide N-VH-O. As can be seen from Figure 2.c, sufficient resolution of the diastereomers of this pseudopeptide was achieved using the starting conditions of BGE with pH 2.8 presented in Table 1.

3.3 Separation of pseudopeptide diastereomers by RP-HPLC

RP-HPLC separations of the pseudopeptides were performed on a routinely used semipreparative chromatogra-

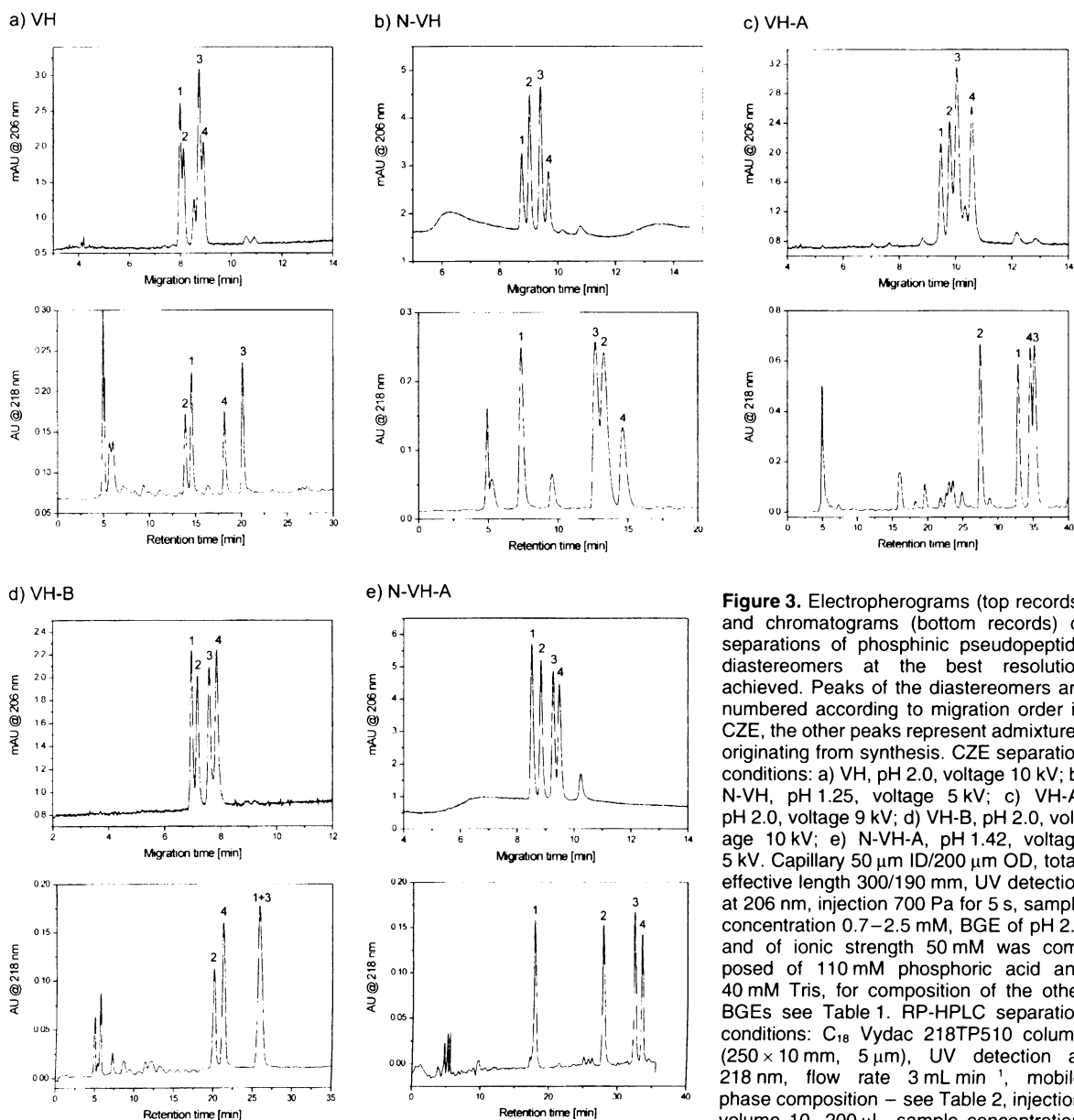


Figure 3. Electropherograms (top records) and chromatograms (bottom records) of separations of phosphinic pseudopeptide diastereomers at the best resolution achieved. Peaks of the diastereomers are numbered according to migration order in CZE, the other peaks represent admixtures originating from synthesis. CZE separation conditions: a) VH, pH 2.0, voltage 10 kV; b) N-VH, pH 1.25, voltage 5 kV; c) VH-A, pH 2.0, voltage 9 kV; d) VH-B, pH 2.0, voltage 10 kV; e) N-VH-A, pH 1.42, voltage 5 kV. Capillary 50 μm ID/200 μm OD, total/effective length 300/190 mm, UV detection at 206 nm, injection 700 Pa for 5 s, sample concentration 0.7–2.5 mM, BGE of pH 2.0 and of ionic strength 50 mM was composed of 110 mM phosphoric acid and 40 mM Tris, for composition of the other BGEs see Table 1. RP-HPLC separation conditions: C₁₈ Vydac 218TP510 column (250 \times 10 mm, 5 μm), UV detection at 218 nm, flow rate 3 mL min⁻¹, mobile phase composition – see Table 2, injection volume 10–200 μL , sample concentration approx. 10 mg mL⁻¹.

phy system (see above). In spite of lower efficiency of the system, separations of all four diastereomers of the pseudopeptides were achieved except for VH-B (see Figure 3). Samples of pseudopeptides were injected as a crude reaction mixture without any previous purification and so many accompanying substances can be seen in the chromatograms. However, good pseudopeptide to admixtures ratio proves high yields and convenience of the synthetic procedure. From the analysis of the chromatograms some relationships can be observed between the structure of

the pseudopeptides and their retention in RP-HPLC. The presence of phenyl groups in the side chains of pseudopeptides VH-A and N-VH-A (see Figure 1) resulting in their higher hydrophobicity is reflected by their longer retention times in comparison with their analogues VH and N-VH without the phenyl group in the molecule (see Figure 3). Since the HPLC separations were carried out in acid mobile phases (see Table 2), chromatograms of the pseudopeptides N-VH and VH demonstrate a negative influence of additional positive charge from the free N-ter-

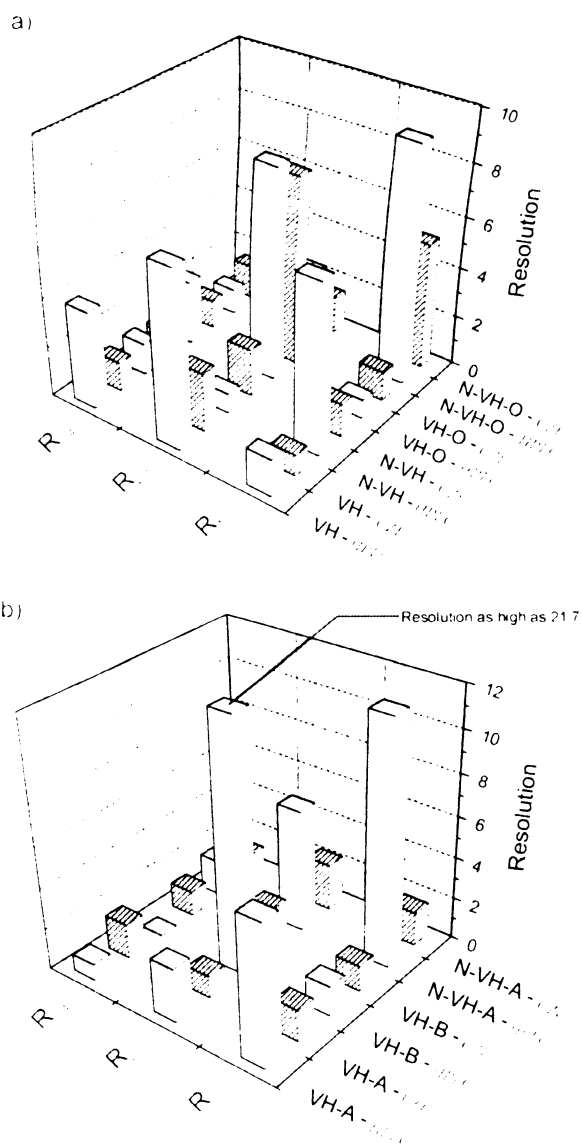


Figure 4. a, b. Comparison of resolution of pseudopeptide diastereomer separations achieved by CZE (hatched columns) and by RP-HPLC (blank columns).

minus of N-VH on its retention in RP-HPLC (see Figure 3.a and Figure 3.b).

3.4 Comparison of CZE and RP-HPLC separations of diastereomers

In comparison with CZE separations, RP-HPLC generally provided higher resolution of diastereomers of pseudopeptides and a higher number of baseline separated diastereomers (see Figure 3 and **Figure 4**). Unlike CZE, RP-

HPLC was not successful in the separation of all VH-B diastereomers (see Figure 3.d). CZE was capable of resolving additional admixtures in samples previously purified by HPLC, which demonstrates the complementarity of the two methods. It is also worth mentioning that the CZE analyses were faster than the HPLC ones (see Figure 3).

Because individual isomers of most of the pseudopeptides were preparatively separated by HPLC, it was possible to compare the migration order of the diastereomers in CZE with their elution order in HPLC. Individual diastereomers were not isolated for the pseudopeptides VH-O and N-VH-O; however, in the case of VH-O it was possible to assign corresponding peaks of the diastereomers on the basis of their relative area and of resemblance of their migration order to the pseudopeptide VH (data not presented). Generally, the migration order of the diastereomers in CZE has been found to differ from the elution order of HPLC, which again confirms the complementarity of the methods.

The lack of a uniform migration/elution pattern of diastereomers suggests that minor differences in phosphinate pK_a values and hydrodynamic radii resulting in various electrophoretic mobilities of the diastereomers in CZE do not correlate with changes of diastereomer hydrophobicity responsible for their separation in RP-HPLC.

4 Concluding remarks

This work demonstrates suitability of CZE and RP-HPLC methods for analytical (CZE) and preparative (RP-HPLC) separations of diastereomers of phosphinic pseudopeptides in achiral separation systems. Since the two techniques are based on the different separation principles, the results confirm their complementarity both in qualitative analysis and in providing physicochemical characteristics of the studied compounds.

Acknowledgement

The work was supported by the Grant Agency of the Czech Republic, grant no. 203/02/1467, the Grant Agency of the Academy of Sciences of the Czech Republic, grant no. B4055003 and Research Project AVOZ4055905 of the Academy of Sciences of the Czech Republic.

References

- [1] V. Kašička, *Electrophoresis* **2001**, *22*, 4139–4162.
- [2] V. Kašička, *Electrophoresis* **1999**, *20*, 3084–3105.
- [3] Z. Deyl, I. Mikšik, in: *Advanced Chromatographic and Electromigration Methods in BioSciences*, Z. Deyl (Ed.), Elsevier, Amsterdam 1998, pp. 465–523.

- [4] G.M. McLaughlin, K.W. Anderson, D.K. Hauffe, in: *High-Performance Capillary Electrophoresis*, M. G. Khaledi (Ed.), John Wiley & Sons Inc., New York 1998, pp. 637–681.
- [5] R. Vespalec, P. Boček, *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 3715–3753.
- [6] H. Wan, L.G. Blomberg, *J. Chromatogr. A* **2000**, *875*, 43–88.
- [7] A.D. Tran, T. Blanc, E.J. Leopold, *J. Chromatogr.* **1990**, *516*, 241–249.
- [8] J.J. Li, K.C. Waldron, *Electrophoresis* **1999**, *20*, 171–179.
- [9] S. Sabah, G.K.E. Scriba, *J. Microcolumn. Sep.* **1998**, *10*, 255–258.
- [10] S. Sabah, G.K.E. Scriba, *J. Chromatogr. A* **1998**, *822*, 137–145.
- [11] D.J. Skanchy, R. Wilson, T. Poh, G.H. Xie, C.W. Demarest, J.F. Stobaugh, *Electrophoresis* **1997**, *18*, 985–995.
- [12] R. Kuhn, D. Riestler, B. Fleckenstein, K.H. Wiesmüller, *J. Chromatogr. A* **1995**, *716*, 371–379.
- [13] K. DeSilva, Q. Jiang, T. Kuwana, *Biomed. Chromatogr.* **1995**, *9*, 295–301.
- [14] Y.L. Zhang, J.M. Becker, F.R. Naider, *Anal. Biochem.* **1996**, *241*, 220–227.
- [15] M. Gilges, M. Hadley, *Electrophoresis* **1997**, *18*, 2944–2949.
- [16] S.H. Hansen, I. Bjørnsdottir, J. Tjørnemund, *J. Chromatogr. A* **1997**, *792*, 49–55.
- [17] A.F.R. Hühmer, G.I. Aced, M.D. Perkins, R.N. Gürsoy, D.S.S. Jois, C. Larive, T.J. Siahaan, C. Schöneich, *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 29R–57R.
- [18] C.K. Larive, S.M. Lunte, M. Zhong, M.D. Perkins, G.S. Wilson, G. Gokulrangan, T. Williams, F. Afroz, C. Schöneich, T.S. Derrick, C.R. Middaugh, S. Bogdanowich-Knipp, *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 389R–423R.
- [19] C. Yang, R. Qamar, S.J. Norton, P.F. Cook, D.E. Minter, *Tetrahedron* **1994**, *50*, 1919–1926.
- [20] A. Vinther, A. Holm, T. Høeg-Jensen, A.M. Jespersen, N.K. Klausen, T. Christensen, H.H. Sørensen, *Eur. J. Biochem.* **1996**, *235*, 304–309.
- [21] A. Péter, G. Tóth, E. Olajos, D. Tourwé, *J. Chromatogr. A* **1995**, *705*, 267–273.
- [22] D.A. Kirby, C.L. Miller, J.E. Rivier, *J. Chromatogr.* **1993**, *648*, 257–265.
- [23] M. Gazdag, K. Mihályfi, S. Görög, *Anal. Chim. Acta* **1997**, *352*, 231–237.
- [24] C. Griehl, J. Weigt, H. Jeschkeit, *J. High Resol. Chromatogr.* **1994**, *17*, 700–704.
- [25] M. Collinsová, J. Jiráček, *Curr. Med. Chem.* **2000**, *7*, 629–647.
- [26] F. Grams, V. Dive, A. Yiotakis, I. Yiallourous, S. Vassiliou, R. Zwillig, W. Bode, W. Stocker, *Nat. Struct. Biol.* **1996**, *3*, 671–675.
- [27] A. Yiotakis, S. Vassiliou, J. Jiráček, V. Dive, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 6601–6605.
- [28] D. Koval, V. Kašička, J. Jiráček, M. Collinsová, T.A. Garrow, *J. Chromatogr. B* **2002**, *770*, 145–154.
- [29] D. Koval, V. Kašička, J. Jiráček, M. Collinsová, T.A. Garrow, *Electrophoresis* **2002**, *23*, 215–222.

v

Dušan Koval¹
Václav Kašička¹
Iva Zusková²

¹Institute of Organic Chemistry
and Biochemistry,
Academy of Sciences of the
Czech Republic,
Prague, Czech Republic

²Charles University,
Faculty of Science,
Prague, Czech Republic

Investigation of the effect of ionic strength of Tris-acetate background electrolyte on electrophoretic mobilities of mono-, di-, and trivalent organic anions by capillary electrophoresis

The effect of ionic strength of the background electrolyte (BGE) composed of tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris) and acetic acid on the electrophoretic mobility of mono-, di- and trivalent anions of aliphatic and aromatic carboxylic and sulfonic acids was investigated by capillary zone electrophoresis (CZE). Actual ionic mobilities of the above anions were determined from their CZE separations in Tris-acetate BGEs of pH 8.1 to 8.2 in the 3 to 100 mM ionic strength interval at constant temperature (25 °C). It was found that the ionic strength dependence of experimentally determined actual ionic mobilities does not follow the course supposed by the classical Onsager theory. A steeper decrease of actual ionic mobilities with the increasing ionic strength of BGE and a higher estimated limiting mobility of the anions than that found in the literature could be attributed to the specific behavior of the Tris-acetate BGEs. Presumably, not only a single type of interaction of anionic analytes with BGE constituents but rather the combination of effects, such as ion association or complexation equilibria, seems to be responsible for the observed deviation of the concentration dependence of the actual ionic mobilities from the Onsager theory. Additionally, several methods for the determination of limiting ionic mobilities from CZE measured actual ionic mobilities were evaluated. It turned out that the determined limiting ionic mobilities significantly depend on the calculation procedure used.

Keywords: Actual ionic mobility / Capillary zone electrophoresis / Ionic strength / Limiting electrophoretic mobility / Onsager theory
DOI 10.1002/elps.200500260

1 Introduction

1.1 General aspects

Since its introduction about two decades ago, capillary zone electrophoresis (CZE) has developed into a recognized separation technique [1]. The impact of a number of variables on selectivity and separation efficiency has been thoroughly studied. For instance, the effect of pH on the electrophoretic mobility of weak electrolytes or the effect of conductivity of the background electrolyte (BGE) on Joule heating became early well-understood fundamental aspects of CZE [2–5]. In addition to instrumentation development, a remarkable progress in the theory of electromigration processes was recently achieved [6–9]. Even complex phenomena of electromigration dispersion and system peaks can be easily analyzed with the aid of

simulation software [10]. On the other hand, our knowledge of the effect of concentration of BGE on the analyte mobility remains insufficient. Only a few studies were devoted to systematic investigation of this effect in aqueous [11–13] and nonaqueous [14–16] media. Nevertheless, understanding of concentration dependence of the analyte mobility is particularly important for the accurate prediction of electrophoretic mobility in solutions of defined ionic strength and for the proper simulation of electromigration processes.

The aim of this work was to study the effect of the ionic strength of BGE on the actual ionic mobilities of organic anions experimentally determined by CZE by employing models arisen from classical electrolyte theory. Electrophoretic mobilities were measured for a set of 22 anions of charge numbers ranging from -1 to -3 in the 3 to 100 mM ionic strength interval. Tris-acetate BGEs of mildly alkaline pH 8.1 to 8.2 were used in order to assure full dissociation of analyzed acidic compounds and, consequently, to enable direct determination of the actual ionic mobility from CZE experiment.

Correspondence: Dr. Václav Kašička, Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Flemingovo nám. 2, 166 10 Prague 6, Czech Republic
E-mail: kasicka@uochb.cas.cz
Fax: +420-220-18-3592

1.2 Theoretical background

1.2.1 Onsager limiting law

Long before CZE was introduced, the theory of electrolyte solutions was extensively studied. The Onsager limiting law (or Debye–Hückel–Onsager equation) as a primary approach dealing with variation of electrolyte conductivity with concentration was derived analogously to the Debye–Hückel theory devoted to calculation of activity coefficient of ionic species (see, *e.g.*, [17]). After conversion of original molar conductivity into ionic electrophoretic mobility, the Onsager limiting law can be written for a single anion as follows:

$$m_{\text{act},-} = m_{\text{lim},-} - \left(m_{\text{lim},-} B_1 z_- |z_-| \frac{q}{1 + \sqrt{q}} + |z_-| B_2 \right) \sqrt{I} \quad (1)$$

where $m_{\text{act},-}$ is the actual ionic mobility, *i.e.*, mobility at the actual ionic strength of BGE, and $m_{\text{lim},-}$ is the limiting mobility of anion, *i.e.*, mobility at infinite dilution (zero ionic strength); z_- and z_+ are the charge numbers of anion and its counterion, respectively; I is the ionic strength.

The constants B_1 and B_2 are defined as:

$$B_1 = \frac{\sqrt{2}F^3}{12\pi N_A (\epsilon RT)^{3/2}} \quad (2)$$

$$B_2 = \frac{\sqrt{2}F^2}{6\pi N_A \eta (\epsilon RT)^{1/2}} \quad (3)$$

where F is the Faraday constant; N_A is the Avogadro constant; ϵ is the permittivity and η is the dynamic viscosity of the BGE solution; R is the gas constant and T is the thermodynamic temperature.

The parameter q in Eq. (1) can be obtained from the charge numbers, z_+ , z_- , and the limiting mobilities $m_{\text{lim},+}$, $m_{\text{lim},-}$ of the ions:

$$q = \frac{z_+ |z_-|}{z_+ + |z_-|} \frac{m_{\text{lim},+} + m_{\text{lim},-}}{|z_-| m_{\text{lim},+} + z_+ m_{\text{lim},-}} \quad (4)$$

The ionic strength is given by the summation:

$$I = \frac{1}{2} \sum_i c_i z_i^2 \quad (5)$$

where c_i and z_i are concentration and the charge number of each ion i in the solution.

In the Onsager theory, ionic strength is used as generalized parameter of BGE and electrophoretic and relaxation effects are exclusively considered to cause variation of the ionic mobility with ionic strength. Other effects, such as complexation or ion association, are not taken into account.

1.2.2 Extended Onsager model

The limiting Onsager law was developed by using approximations that substantially limit its validity under the conditions typical for CZE. Linear dependence of the actual ionic mobility with the square root of ionic strength ($I^{1/2}$) is stated to be valid up to 1 mM. In CZE, BGEs of ionic strength from the 10 to 100 mM interval are most frequently used. Further, ions are considered as point charges of zero volume which is not appropriate for ions migrating in CZE.

Introduction of a parameter allowing for a definite ionic radius was performed again in analogy to the extended Debye–Hückel theory to give the Onsager equation:

$$m_{\text{act},-} = m_{\text{lim},-} - \left(m_{\text{lim},-} B_1 z_- |z_-| \frac{q}{1 + \sqrt{q}} + |z_-| B_2 \right) \frac{\sqrt{I}}{1 + Ba\sqrt{I}} \quad (6)$$

where a is the ionic size parameter, *i.e.*, the shortest distance of the ion and the counterion centers, and constant B is:

$$B = \frac{\sqrt{2}F}{(\epsilon RT)^{1/2}} \quad (7)$$

Other symbols are the same as for Eq. (1) to Eq. (4). The constants B_1 , B_2 and B , defined by Eqs. (2), (3) and (7), respectively, have the following values for aqueous solutions at 25 °C: $B_1 = 0.7853 \text{ dm}^{3/2} \text{ mol}^{-1/2}$; $B_2 = 31.42 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ dm}^{3/2} \text{ mol}^{-1/2}$; $B = 3.291 \times 10^9 \text{ m}^{-1} \text{ dm}^{3/2} \text{ mol}^{-1/2}$.

Equation (6) is formally identical with models proposed by Robinson and Stokes [17] and Lucy *et al.* [13], which was based on Pitts theory [18]. The validity region of Onsager equation was broadened up to about 75 mM ionic strength [12], but the ionic size parameter, a , is seldom available for actual ion. Approximate values of product Ba equal to 1.5; 1.65 or 2.4 were used [12, 13]. Moreover, the ionic size parameter, a , should characterize a spherical ion with high charge density, which is not consistent with the generally asymmetrical organic ions of low charge density usually separated by CZE.

The Onsager model was proposed to describe electric conductivity dependence of a strong electrolyte on its concentration in a binary composition of a cation and an anion. In CZE, the analyte migrates in a BGE which contains typically several ionic constituents. However, according to the Onsager theory, only the analyte counterion is taken into account. A more sophisticated approach dealing with a multiple ion mixture was worked out by Onsager and Fuoss [19] and recently introduced in CZE by Jaroš *et al.* [6]. The Onsager–Fuoss model provides a more precise prediction of actual ionic mobilities than the Onsager model mainly if the BGE contains rele-

vant concentrations of ions with limiting mobilities significantly differing from those of the analyzed ions, e.g., highly mobile hydroxonium cations or hydroxide anions in the highly acidic or strongly alkaline BGEs, respectively. This was not the case of the used Tris-acetate BGEs, the pH value of which (8.1 to 8.2) was selected within the safe pH range (4 to 10), where the concentration of hydroxonium cations or hydroxide anions is negligible in comparison with the concentration of the BGE constituents. Consequently, the Onsager model has been used for most of the calculations of actual and limiting mobilities of the analyzed organic anions, whereas the Onsager–Fuoss model has only been applied for some comparative calculations.

1.2.3 Empirical relations

For above limitations, Friedl *et al.* [11] abandoned the Onsager theory and favored the empirical expression:

$$m_{\text{act}} \approx m_{\text{lim}} e^{0.85z^2 / 19j^{0.52}} \quad (8)$$

which was in further simplified to the square root relationship:

$$m_{\text{act}} \approx m_{\text{lim}} e^{-0.77\sqrt{z}} \quad (9)$$

These expressions were based on experimental mobility data for sulfonates of charge numbers ranging from -2 to -6 measured in sodium-acetate BGEs of pH 4.75 in the 1 to 100 mM ionic strength interval. However, a systematic error was observed for monovalent sulfonates. Despite the success of the empirical Eqs. (8) and (9), it is unlikely to expect their reliability for other analytes or buffer systems.

2 Materials and methods

2.1 Reagents and chemicals

Chemicals used for capillary modification and BGE preparation were of analytical reagent grade. Acetic acid, formic acid, hydrochloric acid, isobutyric acid and sodium hydroxide were obtained from Lachema (Brno, Czech Republic), isophorone (3,5,5-trimethyl-2-cyclohexen-1-one) was from Fluka (Buchs, Switzerland); acrylamide, ammonium persulfate, 3-methacryloxypropyltrimethoxysilane, TEMED and Tris were from Serva (Heidelberg, Germany). Analyzed carboxylic and sulfonic acids were supplied by several companies either as free acids or their sodium salts. Purity degree of these chemicals were in the 95 to 99% range except for naphthalene-1,3,6-trisulfonic acid trisodium salt (Fluka) containing 20% of the 1,3,7-isomer. Both isomers were however resolved in the majority of used BGEs.

2.2 Instrumentation

CZE experiments were carried out on a P/ACE MDQ (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) analyzer equipped with a diode array UV-VIS-absorption detector. Absorbance of analyzed compounds and the electroosmotic flow (EOF) marker isophorone were monitored at 206 and 240 nm, respectively. Data acquisition and handling were performed using the P/ACE MDQ system, version 2.3. Origin 6.1 (OriginLab) was used for data plotting and regression analysis. Fused-silica capillaries with outer polyimide coating (ID 50 μm , OD 375 μm , supplied by Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, USA) were internally coated with polyacrylamide. The total and effective length of the separation capillary was 400 and 298 mm, respectively. Samples were injected hydrodynamically (1 kPa pressure for 5 s). Liquid capillary cooling in conjunction with a moderate separation voltage (input power) was used for temperature control. Then 10 mM stock solutions of the analyzed compounds were prepared by dissolving the acids or corresponding salts in water or 1.2 equivalent of aqueous NaOH whenever the solubility of free acid in water was not sufficient. The analyzed compounds were pooled into three subgroups according to their actual ionic mobilities to ensure baseline resolution of the components in each BGE. Finally, 1:1 dilution of the subgroup solution with actual BGE was performed to obtain a 0.25 mM concentration of each acid in the injected sample. A 2 mM solution of neutral marker isophorone in 1:4 water–BGE mixture was used for determination of the remaining EOF in the separation capillary. Prior to any change of BGE, the capillary was conditioned by application of the separation voltage for 30 min. Between runs, the capillary was rinsed with the BGE for 1 min (pressure of 200 kPa).

2.3 Capillary modification

Polyacrylamide-modified capillaries were prepared using the combination of previously used methods [20–22] as follows. First, the surface of a new fused-silica capillary was activated by rinsing with filtered solution of sodium hydroxide (5 g) in a mixture of methanol (40 mL) and deionized water (10 mL) at room temperature for 1 h. Subsequently, the capillary was rinsed with deionized water, 0.1 M hydrochloric acid and heated at 75 C for 2 h, then rinsed with deionized water and dried in a gentle nitrogen stream at 160 C for 6 h. Silanization of the capillary wall was performed by filling the capillary with 3-methacryloxypropyltrimethoxysilane containing 0.5% v/v concentrated acetic acid and allowing the mixture to react at room temperature overnight. In the meantime, aqueous solutions of 1% m/v acrylamide, 10% v/v

ammonium persulfate and 10% v/v TEMED were prepared and oxygen was removed by bubbling with nitrogen for 15 min. Then, 1 mL acrylamide, 2.5 μ L ammonium persulfate and 2.5 μ L TEMED solutions were mixed and immediately introduced into the capillary previously rinsed with acetone and deionized water. Polymerization was then allowed to proceed at room temperature for 6 h followed by final flushing with deionized water.

3 Results and discussion

3.1 Selection of experimental conditions

The aim of this study was to evaluate the validity and precision of models describing the dependence of actual ionic mobility of analytes on BGE concentration using mobility data obtained from CZE experiments. Accurate determination of mobilities by CZE is not trivial and several important aspects have to be considered.

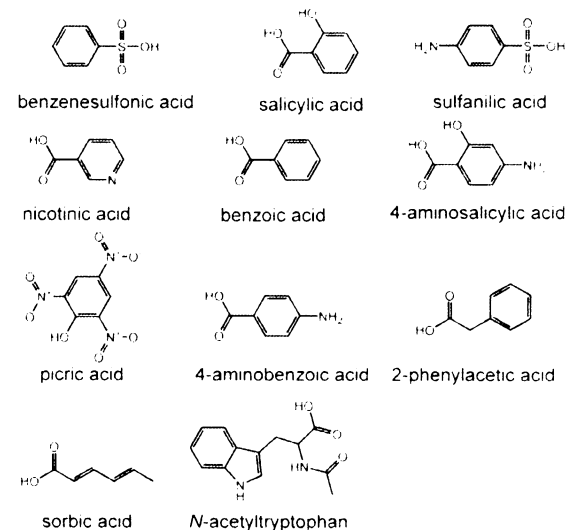
3.1.1 Analyzed ions

A set of test compounds for investigation of concentration dependence of the actual ionic mobilities should possess diversity in structural moieties and number of ionogenic groups in order to recognize compounds which would exhibit some specific migration behavior, *e.g.*, specific complexation with a BGE constituent or interaction with the capillary wall. Additionally, a tested compound should provide fair detector response and should be fully dissociated at the pH of the BGE, *i.e.*, the pH of the BGE should be more than 2 pH units off a dissociation constant of the analyzed compounds in order to get rid of acid-base equilibria in further calculations. Thus, a set of 22 carboxylic and sulfonic acids were selected as well available ionogenic compounds fulfilling the above criteria. The structures of analyzed compounds are given in Fig. 1.

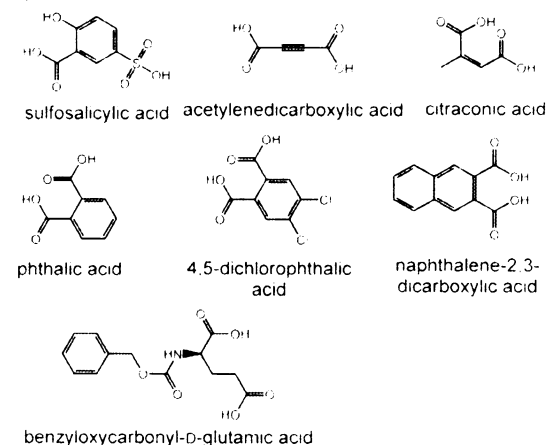
3.1.2 BGE selection

The experiments should be preferably performed in the "safe" pH region of 4 to 10 in which the disturbing effects of highly mobile hydroxonium and hydroxide ions do not play an important role. BGEs can be then prepared in the 1 to 100 mM ionic strength range convenient for investigation of concentration dependence of actual ionic mobilities. Uni-univalent components of BGE are preferred due to consistence with the Onsager theory. Since the pKa values of the test compounds available in the litera-

a) Monovalent acids



b) Divalent acids



c) Trivalent acids

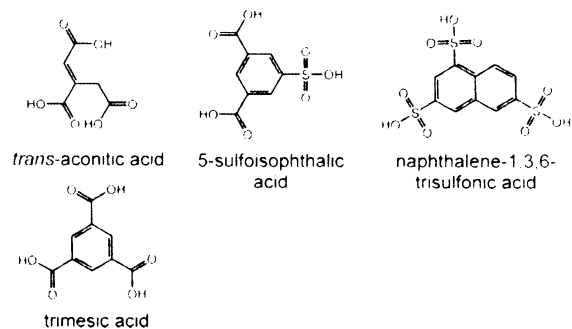


Figure 1. Structures of the test compounds.

ture show a maximal value of 6.2 (see Table 1), the pH value of the BGE should then be > 8 in order to get almost fully dissociated ions.

Table 1. Dissociation constants of the analyzed organic acids available in the literature [10, 31]

Analyte	pKa (1)	pKa (2)	pKa (3)
Salicylic acid	2.98 (-COOH)	12.38 (-OH)	
Sulfanilic acid ^{a)}	3.27 (-NH ₂)		
Nicotinic acid	2.07 (-COOH)	4.81 (pyridinyl)	
Benzoic acid	4.20		
Picric acid	0.71		
4-Aminobenzoic acid	2.41 (-COOH)	4.85 (-NH ₂)	
2-Phenylacetic acid	4.31		
Sorbic acid	4.77		
Sulfosalicylic acid ^{a)}	2.49 (-COOH)	12.0 (-OH)	
Acetylenedicarboxylic acid	1.75	4.40	
Citraconic acid	2.29	6.15	
Phthalic acid	2.95	5.41	
Trimesic acid	2.12	4.10	5.18

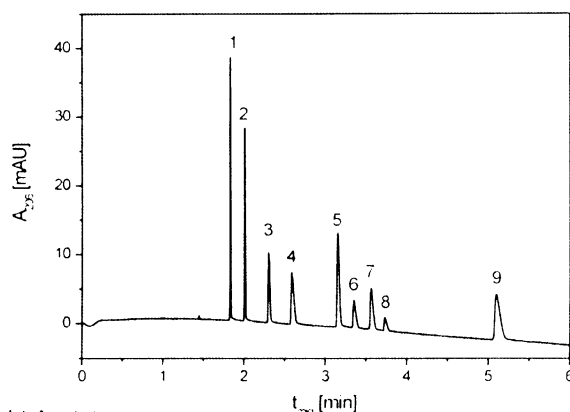
a) Strongly acidic sulfonic acid moiety was considered as fully dissociated.

Electromigration dispersion is a phenomenon, which can deteriorate resolution and efficiency of a CZE separation by distortion of migrating zones and, consequently, can hamper the determination of mobilities. In a simple BGE composed of one buffering ion and its counterion in the "safe" pH region, electromigration dispersion can be reduced to an acceptable level by matching the analyte mobility to its co-ion mobility. However, mobilities of the tested compounds cover a broad mobility range of approximately $25\text{--}70 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$, which seriously limits the possibility of getting peaks unaffected by electromigration dispersion. Based on a simulation performed with the PeakMaster program [10], it was decided to use a BGE consisting of a rather mobile anionic co-ion and a buffering base as a cationic counterion. The effect of formate, acetate and isobutyrate BGE co-ions on the analyte peak shape is demonstrated in Fig. 2 suggesting acetate as the convenient BGE constituent. Tris was selected as a buffering counterion due to its good UV transparency and pKa value of 8.1. BGEs were prepared by mixing acetic acid and Tris at a molar concentration ratio of 1:2. The BGEs then contained half-protonated Tris and the concentration of fully dissociated acetic acid readily fixed the ionic strength in the 3 to 100 mM interval. The alkaline pH of the solutions ranged from 8.1 to 8.2 for 3 to 100 mM ionic strength, respectively, and was not further adjusted. This pH difference was neglected as it does not significantly influence dissociation of the analytes or ionic strength of the BGEs.

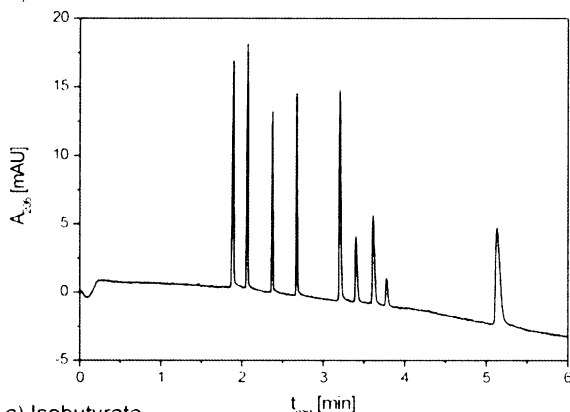
3.1.3 Experimental setup

CZE analysis of anions in a BGE of > 8 can be performed by using several experimental modes. Firstly, standard counter-electroosmotic separation in bare fused-silica

a) Formate



b) Acetate



c) Isobutyrate

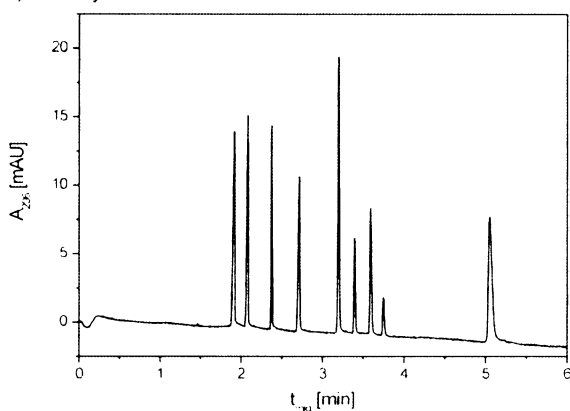


Figure 2. Effect of BGE co-ion (a) formate, (b) acetate and (c) isobutyrate on the peak shape of anions: 5-sulfoisophthalate, 1; sulfosalicylate, 2; phthalate, 3; naphthalene-2,3-dicarboxylate, 4; salicylate, 5; nicotinate, 6; picrate, 7; sorbate, 8; *N*-acetyltryptophanate, 9. Experimental conditions: BGE, 50 mM Tris + 25 mM corresponding carboxylic acid, pH 8.1; capillary, ID/OD 50/375 μm , total/effective length 400/298 mm, polyacrylamide-coated; detection, direct UV absorption at 206 nm; temperature, 23 $^{\circ}\text{C}$; separation voltage, -22 kV ; electric current, 25 to 21 μA ; anions concentration, 0.5 mM; injection, hydrodynamic, 1 kPa for 5 s.

capillaries is limited because the EOF is not fast enough to enable analysis of fast trivalent anions in reasonable time. Pressure assistance as an approach capable of speeding up the analysis suffers from decreased separation efficiency that turned out to be impractical in this case. Secondly, co-electroosmotic analysis of anions can be carried out in capillaries covalently or dynamically modified by introduction of positive charge on the capillary wall [23]. A covalent coating is preferred since it provides a more stable EOF in the alkaline pH, but some experience is necessary in order to produce capillaries with the desired EOF. Thirdly, CZE separation in capillaries with suppressed EOF represents another approach for analysis of anionic compounds [24]. Since neutral polymers attached to the capillary wall by covalent bonding are again much more resistant compared to a dynamic coating, polyacrylamide-modified capillaries were employed in this study. Tris-acetate BGEs of mildly alkaline pH 8.1 to 8.2 were selected with respect to limited stability of the polyacrylamide coating under alkaline conditions.

3.1.4 Temperature control

A serious problem in correct determination of electrophoretic mobility by CZE is its variation with temperature by about 2% per °C in aqueous media. A reliable method for determination of the temperature increase inside the capillary due to Joule heating is necessary in order to set the experimental conditions correctly. Herein, an approach based on temperature variation of the specific electric conductivity of an aqueous potassium chloride was used as described in [25]. Driving voltage was set carefully considering the conductivity of the BGE so as to achieve a temperature increase inside the capillary of up to 2 °C. Such a temperature increase was further compensated by capillary cooling to ensure the mean temperature of the media in the capillary to the standard value of 25 °C.

3.2 Actual ionic mobilities

The actual ionic mobility of the anion, $m_{act,-}$, was calculated from its apparent mobility, $m_{app,-}$, and the electroosmotic mobility, m_{eof} , according to Eq. (10):

$$m_{act,-} = m_{app,-} - m_{eof} \quad (10)$$

The apparent mobility was determined from the measurement of migration time, t_{mig} , of the analytes using Eq. (11):

$$m_{app} = \frac{L_t L_d}{U_{av} t_{mig}} \quad (11)$$

where L_t and L_d are the total and effective capillary length, respectively; U_{av} is the average applied separation voltage which is introduced in order to correct for effect of the initial voltage ramp in initial phase of CZE run. The initial voltage ramp was shown to have a strong impact on the accuracy of electrophoretic mobility determination if the migration time is commensurable with the ramp time [26] which was, in fact, the case in this study.

The average separation voltage, U_{av} , is defined by Eq. (12):

$$U_{av} = \frac{U_R t_R + U_M (t_{mig} - t_R)}{t_{mig}} \quad (12)$$

where U_R is the average ramp voltage over the ramp time, t_R , which is a time region covering the initial voltage ramp event until the constant separation voltage, U_M , is reached. Value of the ramp time, t_R , was chosen as 1 min for 0.2 min voltage ramp selected in the CZE software method. The average ramp voltage, U_R , was determined as a median of four measurements with a mean relative standard deviation of 0.3%.

The migration time of the analytes was determined from the peak maximum. Nevertheless, we are aware that treating time of peak maximum as migration time is not quite correct for triangular shaped peaks formed due to electromigration dispersion. A fitting of the peaks with the Haarrhoff-van der Linde (HVL) function [27] was proposed to correct determination of the migration time of distorted zones [28] but routine application of the HVL function is a laborious process without special peak analyzing software. Here, the fairly mobile acetate anion was chosen as the analyte co-ion in order to limit electromigration dispersion and the impact of determination of migration time from peak maxima and HVL function was additionally investigated. Actual mobilities of the ion most affected by electromigration dispersion in 3 mM acetate – 6 mM Tris BGE calculated by using both methods for determination of migration time were compared. It was discovered that the obtained mobility difference does not play an important role in the effects described herein.

The remaining cathodic electroosmotic mobility, m_{eof} , in polyacrylamide-modified capillaries was determined by using pressure-accelerated approach [29] according to our previous paper [25]. The mean electroosmotic mobility ranged from $0.3 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ in 100 mM acetate – 200 mM Tris BGE (pH 8.2) to $0.7 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ in 3 mM acetate – 6 mM Tris BGE (pH 8.1); the stability of the remaining EOF expressed in the EOF mobility units was in the range of 0.1 to $0.2 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ over ten runs.

Table 2. Regression analysis of ionic strength dependence of the actual ionic mobilities in Tris-acetate BGE

Anion	Charge	m_{lim} (lit.) ^{a)}	Eq. (13), $Ba = 1.65$			Eq. (13), $Ba = 2.4$		
			m_{lim}	a_1	R^2	m_{lim}	a_1	R^2
Benzenesulfonate	-1	38.7	39.7 ± 0.2	63.9 ± 1.6	0.994	40.4 ± 0.2	77.1 ± 1.6	0.996
Salicylate	-1	35.4	39.3 ± 0.2	68.5 ± 1.5	0.995	40.1 ± 0.2	82.6 ± 1.6	0.997
Sulfanilate	-1	33.7	37.6 ± 0.2	64.4 ± 1.6	0.994	38.3 ± 0.2	77.7 ± 1.6	0.996
Nicotinate	-1	34.6	37.4 ± 0.2	66.9 ± 1.3	0.996	38.1 ± 0.2	80.6 ± 1.3	0.998
Benzoate	-1	33.6	37.1 ± 0.2	66.2 ± 1.4	0.996	37.8 ± 0.2	79.7 ± 1.4	0.997
4-Aminosalicylate	-1		36.7 ± 0.2	68.3 ± 1.3	0.997	37.4 ± 0.2	82.3 ± 1.4	0.997
Picrate	-1	31.5	35.2 ± 0.2	63.1 ± 1.4	0.995	35.9 ± 0.2	76.0 ± 1.4	0.997
4-Aminobenzoate	-1		34.9 ± 0.2	66.8 ± 1.2	0.997	35.6 ± 0.2	80.4 ± 1.4	0.997
2-Phenylacetate	-1	31.7	34.3 ± 0.2	62.3 ± 1.4	0.996	35.0 ± 0.2	75.1 ± 1.4	0.997
Sorbate	-1	33.4	33.9 ± 0.2	62.2 ± 1.3	0.996	34.6 ± 0.2	74.9 ± 1.3	0.997
<i>N</i> -Acetyltryptophanate	-1		26.3 ± 0.1	55.3 ± 1.0	0.997	27.0 ± 0.1	66.6 ± 1.0	0.998
Sulfosalicylate	-2		74.5 ± 0.4	146.0 ± 3.0	0.996	76.1 ± 0.3	176.0 ± 2.7	0.998
Acetylenedicarboxylate	-2		64.5 ± 0.4	127.9 ± 2.8	0.996	65.9 ± 0.3	154.2 ± 2.5	0.998
Citraconate	-2	56.0	62.3 ± 0.3	143.4 ± 2.3	0.998	63.9 ± 0.2	172.9 ± 1.8	0.999
Phthalate	-2	52.9	59.6 ± 0.3	141.6 ± 2.3	0.998	61.2 ± 0.2	170.7 ± 1.7	0.999
4,5-Dichlorophthalate	-2		55.2 ± 0.3	129.0 ± 2.2	0.997	56.6 ± 0.2	155.5 ± 1.7	0.999
Naphthalene-2,3-dicarboxylate	-2		54.1 ± 0.3	135.6 ± 2.4	0.997	55.6 ± 0.2	163.4 ± 1.7	0.999
Benzyloxycarbonyl-D-glutamate	-2		45.9 ± 0.4	103.7 ± 2.6	0.995	47.1 ± 0.3	125.1 ± 2.2	0.997
<i>trans</i> -Aconitate	-3		78.4 ± 1.0	201.7 ± 7.0	0.989	80.7 ± 0.8	243.5 ± 6.2	0.994
5-Sulfoisophthalate	-3		76.3 ± 0.9	179.5 ± 6.2	0.989	78.3 ± 0.7	216.7 ± 5.5	0.994
Naphthalene-1,3,6-trisulfonate	-3		74.2 ± 0.8	165.0 ± 5.5	0.990	76.1 ± 0.6	199.1 ± 4.9	0.995
Timesate	-3		72.7 ± 0.8	177.0 ± 5.3	0.992	74.7 ± 0.6	213.6 ± 4.5	0.996

a) Data from [32]

3.3 Limiting mobilities

Limiting mobility or conductivity of the ions of the strong electrolytes was traditionally determined from experimental data obtained for fairly diluted electrolyte solutions. Experimental data were plotted versus $I^{1/2}$ or $I^{1/2}/(1 + BaI^{1/2})$ for a chosen ionic size parameter, a , and linear dependence was sought. Limiting conductivity or mobility was finally obtained by extrapolation of the linear dependence to zero ionic strength.

Nowadays, graphical evaluation of experimental data can be comfortably replaced by regression analysis using the appropriate software. Either linear fitting of experimental data versus $I^{1/2}/(1 + BaI^{1/2})$ or a nonlinear fitting according to Eq. (13) [13] with fixed Ba value can be employed. If the product Ba is treated as adjustable parameter, optimized value of the ionic size parameter, a , can be determined in addition to limiting mobility, m_{lim} .

$$m_{\text{act.}} = m_{\text{lim.}} - a_1 \frac{\sqrt{I}}{1 + Ba\sqrt{I}} \quad (13)$$

Herein, limiting mobilities of the organic anions were estimated using either fixed values of Ba in Eq. (13) equal to 1.65 and 2.4 or Ba was adjustable. Regression results are presented in Table 2. A very good fit is achieved for all modifications of regression model (Eq. 13) as demonstrated by high values of R^2 . Mean values of the optimized

Ba product are 2.6 for monovalent, 2.9 for divalent and 4.7 for trivalent anions. The Ba values are significantly higher than 1.65, which corresponds to the commonly used approximate ionic size parameter, a , of 0.5 nm. Good agreement of Ba value for monovalent ions with empirically determined Ba equal to 2.4 by Lucy *et al.* [13] is achieved.

However, significant differences can be observed between limiting mobilities depending on the determination procedure used (see Table 2).

Since parameter a_1 in Eq. (13) is directly related to limiting mobility, $m_{\text{lim.}}$, Eq. (13) can be modified to Eq. (14):

$$m_{\text{act.}} = m_{\text{lim.}} - (m_{\text{lim.}} \cdot b_1 + b_2) \frac{\sqrt{I}}{1 + Ba\sqrt{I}} \quad (14)$$

where the parameters b_1 and b_2 are related to the Onsager model (Eq. 6) by the following relations:

$$b_1 = B_1 z_- |z_-| \frac{q}{1 + \sqrt{q}} \quad (15)$$

$$b_2 = |z_-| B_2 \quad (16)$$

For ions of equal valence, Eq. (16) supposes a constant value of parameter b_2 , which is not held for experimental data (see Table 2). Variability of b_1 is also higher than can

Table 2. (continued)

Anion	Charge	Eq. (13), <i>Ba</i> adjustable			Eq. (14) ^{b)}			Onsager model (Eq. 6)		
		$m_{lim, \dots}$	a_1	<i>Ba</i>	R^2	b_1	b_2	$m_{lim, \dots}$	<i>Ba</i>	R^2
Benzenesulfonate	-1	40.8 ± 0.6	85.5 ± 12.7	2.9 ± 0.7	0.996	0.986	45.2	38.1 ± 0.2	0.21 ± 0.12	0.982
Salicylate	-1	40.3 ± 0.6	86.8 ± 11.6	2.6 ± 0.6	0.997	1.010	46.2	37.4 ± 0.3	0.01 ± 0.12	0.981
Sulfanilate	-1	38.8 ± 0.6	87.3 ± 12.5	2.9 ± 0.7	0.996	1.034	47.2	35.9 ± 0.2	0.16 ± 0.13	0.981
Nicotinate	-1	38.2 ± 0.5	83.7 ± 9.5	2.6 ± 0.5	0.998	0.995	45.7	35.5 ± 0.2	0.05 ± 0.11	0.983
Benzoate	-1	37.8 ± 0.6	79.0 ± 10.2	2.4 ± 0.5	0.997	0.938	43.5	35.3 ± 0.2	0.07 ± 0.11	0.984
4-Aminosalicylate	-1	37.4 ± 0.5	80.7 ± 9.8	2.3 ± 0.5	0.997	0.967	44.6	34.7 ± 0.2	-0.03 ± 0.11	0.984
Picrate	-1	36.2 ± 0.6	81.7 ± 10.8	2.7 ± 0.6	0.997	0.996	45.6	33.6 ± 0.2	0.17 ± 0.12	0.983
4-Aminobenzoate	-1	35.3 ± 0.5	75.1 ± 8.5	2.1 ± 0.5	0.998	0.917	42.8	33.0 ± 0.2	0.00 ± 0.10	0.986
2-Phenylacetate	-1	35.2 ± 0.5	78.6 ± 10.2	2.6 ± 0.6	0.997	0.965	44.5	32.7 ± 0.2	0.19 ± 0.12	0.984
Sorbate	-1	34.8 ± 0.5	77.8 ± 9.4	2.6 ± 0.5	0.997	0.962	44.4	32.4 ± 0.2	0.19 ± 0.11	0.985
<i>N</i> -Acetyltryptophanate	-1	27.0 ± 0.4	68.0 ± 7.3	2.5 ± 0.5	0.998	0.911	43.4	25.1 ± 0.2	0.39 ± 0.10	0.988
Sulfosalicylate	-2	77.1 ± 1.0	196.3 ± 20.2	2.9 ± 0.5	0.998	1.611	72.0	71.2 ± 0.5	0.34 ± 0.11	0.986
Acetylenedicarboxylate	-2	67.1 ± 0.9	178.8 ± 18.4	3.1 ± 0.5	0.998	1.599	71.5	62.1 ± 0.4	0.58 ± 0.11	0.988
Citraconate	-2	64.4 ± 0.7	183.8 ± 12.6	2.7 ± 0.3	0.999	1.670	76.2	58.7 ± 0.5	0.20 ± 0.11	0.986
Phthalate	-2	61.8 ± 0.6	183.0 ± 11.7	2.7 ± 0.3	0.999	1.698	78.1	56.0 ± 0.5	0.19 ± 0.11	0.985
4,5-Dichlorophthalate	-2	57.2 ± 0.6	167.0 ± 11.9	2.7 ± 0.3	0.999	1.627	73.9	52.4 ± 0.4	0.38 ± 0.10	0.988
Naphthalene-2,3-dicarboxylate	-2	56.6 ± 0.6	184.1 ± 11.3	2.9 ± 0.3	0.999	1.784	82.9	50.7 ± 0.5	0.22 ± 0.11	0.984
Benzoyloxycarbonyl-D-glutamate	-2	48.7 ± 0.7	158.6 ± 15.0	3.5 ± 0.5	0.999	1.676	77.0	44.5 ± 0.3	0.91 ± 0.11	0.989
<i>trans</i> -Aconitate	-3	87.8 ± 1.3	402.0 ± 32.4	4.9 ± 0.5	0.999	2.725	162.8	74.5 ± 0.9	0.59 ± 0.15	0.976
5-Sulfoisophthalate	-3	84.4 ± 1.3	352.1 ± 32.1	4.8 ± 0.5	0.999	2.488	142.2	73.8 ± 0.7	0.94 ± 0.14	0.982
Naphthalene-1,3,6-trisulfonate	-3	81.2 ± 1.3	313.1 ± 30.1	4.6 ± 0.5	0.999	2.298	126.3	72.7 ± 0.6	1.18 ± 0.13	0.986
Trimesate	-3	79.5 ± 1.0	317.9 ± 23.1	4.3 ± 0.4	0.999	2.354	130.9	70.2 ± 0.7	0.91 ± 0.13	0.984

a) Data from [32]

b) Estimated parameters $m_{lim, \dots}$, a_1 and correlation coefficient R^2 are identical with regression parameters according to Eq. 13 with *Ba* as adjustable parameter

be expected from the Onsager model since the parameter q , which is related to the limiting mobility by Eq. (4), has only a minor impact on the b_1 value.

All these issues can be explained by the high cross-correlation of regression parameters in Eqs. (13) and (14), which almost disables the independent determination of any of the parameters. Hence, determination of limiting mobilities is strongly influenced by the chosen *Ba* value in the fitting model. The dependence of the regression parameters $m_{lim, \dots}$, a_1 and a in Eq. (13) is natural because all of these parameters are related to fundamental properties of the ion such as charge number and/or size, which determines its electrophoretic mobility.

Basically, the limiting mobility can be determined by fitting of actual ionic mobilities to the Onsager model of Eq. (6) in which $m_{lim, \dots}$ was the adjustable parameter. Correct determination of limiting mobilities requires accurate mobility data and a reliable model describing concentration dependence of the mobilities. A presumption of such an approach is a good accordance of concentration dependence of experimental mobilities with the theoretical Onsager model and correct selection of ionic size pa-

rameter, a . As shown in Fig. 4, these assumptions are not fulfilled for variation of actual ionic mobilities of organic anions with the ionic strength of Tris-acetate BGEs.

3.4 Concentration dependence of actual ionic mobilities

The traditional Onsager limiting law (Eq. 1), which predicts linear dependence of the ionic electrophoretic mobilities *versus* the square root of ionic strength, was shown not to be valid under the CZE conditions by Reijenga and Kenndler a decade ago [11, 30]. Therefore, significant nonlinearities observed for $I^{1/2}$ plot in Fig. 3a are not surprising. Allowing for the ionic size parameter, a , in the Onsager theory (Eq. 6) brings substantially improved linearity, provided the actual ionic mobility is plotted *versus* $I^{1/2}/(1 + BaI^{1/2})$. Figures 3b and c show excellent linearity for monovalent and divalent anions if $Ba = 1.65$, *i.e.*, $a = 0.5$ nm and $Ba = 2.4$, *i.e.*, $a = 0.73$ nm. Acceptable linearity for trivalent anions is obtained for $Ba = 2.4$ nm as proposed by Lucy *et al.* [13]. However, fitting of experimental actual mobility values to Eq. (6) with limiting mobility, $m_{lim, \dots}$,

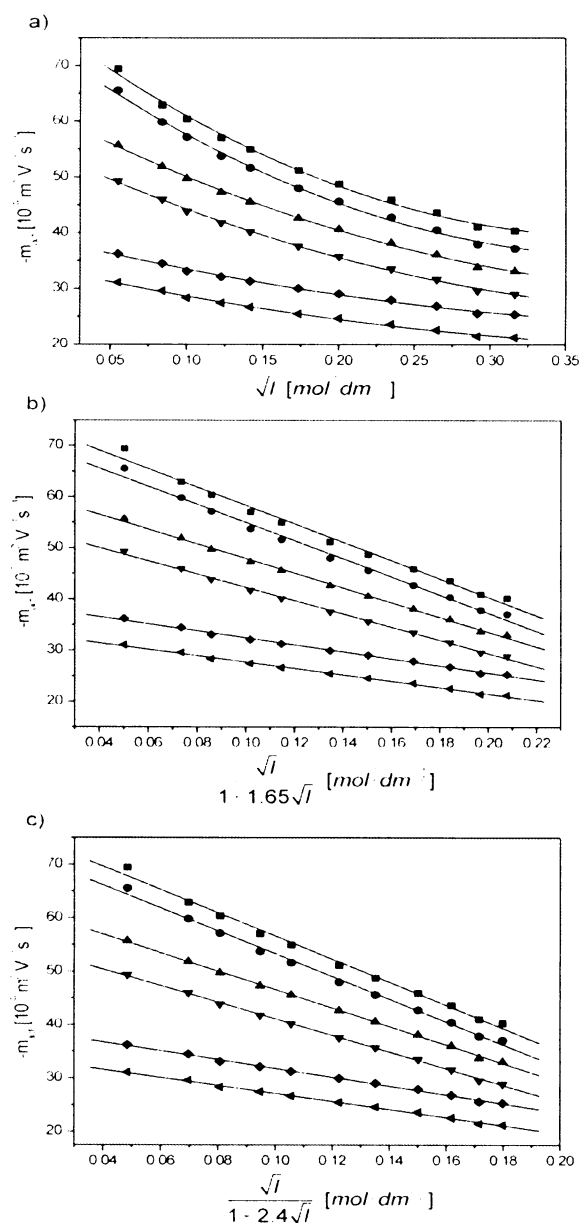


Figure 3. Dependence of the actual ionic mobility of representative mono-, di- and trivalent anions on (a) the square root of ionic strength ($I^{1/2}$), (b) $I^{1/2}/(1 + 1.65I^{1/2})$ and (c) $I^{1/2}/(1 + 2.4I^{1/2})$. Analytes: monovalent: (◆), salicylate; (◄), sorbate; divalent: (▲), citraconate; (▼), 4,5-dichlorophthalate; trivalent: (■), 5-sulfoisophthalate; (●), trimesate. Curves are second order polynomial fit (a) and linear fit (b; c). Experimental conditions: BGE, Tris-acetate, ionic strength 3 to 100 mM, pH 8.1 to 8.2; capillary, ID/OD 50/375 μm , total/effective length 400/298 mm, polyacrylamide coated; detection, direct UV absorption at 206 nm; temperature, 25 C; separation voltage, -11.3 to -22.8 kV; sample concentration, 0.25 mM; injection, hydrodynamic, 1 kPa for 5 s.

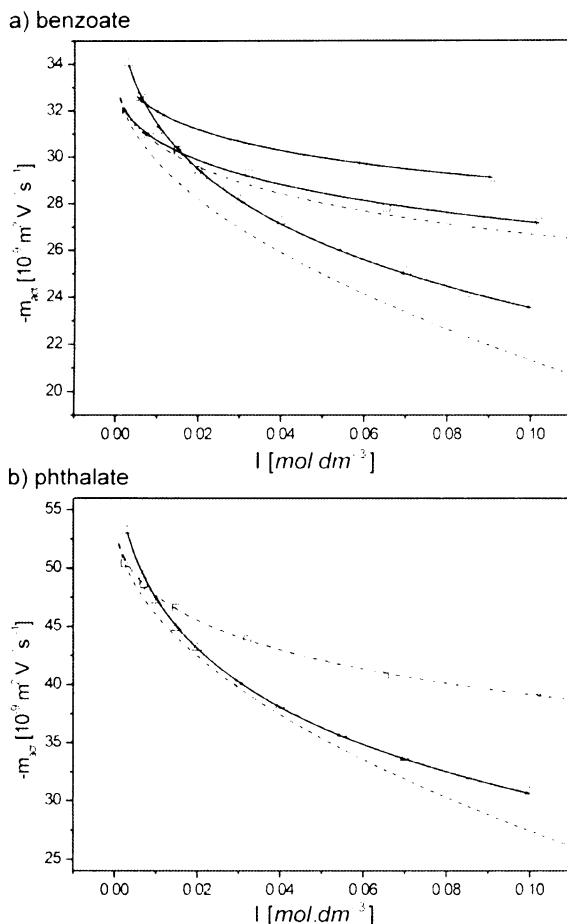


Figure 4. Dependence of the actual ionic mobility of (a) benzoate and (b) phthalate on ionic strength of BGEs. BGE: (○), potassium-phosphate, pH 7.2; (◻), sodium-borate, pH 10 (data taken from ref [13]); (△), Tris-acetate, pH 8.1 to 8.2. Curves are fit to Eq. (13) (solid); limiting Onsager law (dash), Onsager law with $Ba = 1.65$ (dot) and 2.4 (dash dot), respectively, used limiting mobilities according to ref. [13]: benzoate, $-33.6 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$; phthalate, $-54.6 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Experimental conditions for potassium-phosphate and sodium-borate BGEs: capillary, bare fused silica, ID/OD 50/365 μm , total/effective length 37/30 cm; detection, direct UV absorption at 214 nm; temperature, 25 C; separation voltage, 5 kV; sample concentration, 0.1 mM; injection, hydrodynamic, 0.5 psi for 1 to 4 s. Experimental conditions for Tris-acetate BGEs: see Fig. 3.

as the only adjustable parameter fails regardless of the Ba value. Regression results given in Table 3 demonstrate inconsistency between concentration dependence of the actual mobility of the anions observed in Tris-acetate BGEs and Onsager theory. Some improvement in fitting precision is achieved when two adjustable parameters,

Table 3. Regression analysis of the actual ionic mobilities of benzoate and phthalate according to the Onsager model (Eq. 6)

Anion	BGE	$Ba = 1.65^{a)}$		$Ba = 2.4^{a)}$	
		$m_{lim.}$	R^2	$m_{lim.}$	R^2
Benzoate	Potassium-phosphate ^{b)}	36.0 ± 0.4	0.689	35.5 ± 0.2	0.919
	Sodium-borate ^{b)}	34.5 ± 0.3	0.875	34.0 ± 0.1	0.980
	Tris-acetate	33.5 ± 0.4	0.830	33.0 ± 0.6	0.737
Phthalate	Sodium-borate ^{b)}	55.6 ± 0.4	0.955	54.5 ± 0.1	0.998
	Tris-acetate	52.4 ± 0.9	0.848	51.1 ± 1.2	0.754

a) Parameter Ba in Eq. (6) treated as fixed

b) Data from [13] and reanalyzed

$m_{lim.}$ and Ba in Eq. (6) are allowed, as can be seen in Table 2. Nevertheless, the mean estimated values of Ba product are 0.93 for trivalent, 0.34 for divalent and 0.16 for monovalent anions. It suggests that the mobilities of mono- and divalent ions are in good agreement with the Onsager limiting law which is, naturally, meaningless.

We have reanalyzed the mobility data of benzoate and phthalate published by Lucy *et al.* [13] in order to investigate the failure of the Onsager theory for our experimental actual ionic mobilities. Figure 4 reveals that benzoate and phthalate actual ionic mobilities determined in Tris-acetate BGE decrease with ionic strength more rapidly than predicted by the Onsager theory. On the other hand, benzoate and phthalate mobilities from Lucy *et al.* [13] determined in sodium-borate and potassium-phosphate BGEs exhibit a very good fit to the Onsager model of Eq. (6) if Ba is taken as 2.4. Significant deterioration of fitting precision is, however, observed for $Ba = 1.65$ as demonstrated in Table 3. Additionally, benzoate actual mobility measured in potassium phosphate BGEs of pH 7.2 are substantially higher than the actual mobility determined in sodium borate BGEs of pH 10. Hence, it is easy to appreciate that the nature of BGE influences actual mobility of the anions. BGE effects can be expressed by simple shift of the actual mobilities as can be seen from data reported by Lucy *et al.* [13] or by more complex variation of concentration dependence of the actual ionic mobility as demonstrated by the mobilities of organic anions in Tris-acetate BGEs. Since the classical Onsager model is based entirely on electrostatic theory, it cannot describe properly a system in which specific interactions such as ion association between analytes and BGE constituents take place.

It is worth mentioning that we have also tested the Onsager–Fuoss model describing the ionic strength dependence of actual mobilities in the multiple ion mixtures. It turned out that the difference between the course of ionic

strength dependence of actual mobilities of analyzed organic anions according to the Onsager–Fuoss and Onsager models, respectively, was insignificant in the applied Tris-acetate BGEs. This was in agreement with our expectations, since the concentrations of highly mobile hydroxonium cations or hydroxide anions in the BGEs used (pH 8.1 to 8.2) were negligible in comparison with the concentration of Tris and acetate ions (3 to 100 mM). Due to this fact, the Onsager–Fuoss model made only insignificant corrections of the mobilities calculated according to the Onsager model. Additionally, performing regression calculation procedures is more complicated with the Onsager–Fuoss model than with the Onsager model. Consequently, the Onsager model has been used for the presented calculations of the ionic strength dependence of actual ionic mobilities.

4 Concluding remarks

It was found that the concentration dependence of actual ionic mobilities of organic anions in Tris-acetate BGEs does not follow the course supposed by the theoretical Onsager model. A steeper decrease of experimental actual mobilities with ionic strength of BGE and a higher estimated limiting mobility of the anions in comparison with the literature data could be attributed to the specific behavior of the Tris-acetate BGEs. Presumably, not only a single type of interaction of anionic analytes with BGE constituents but rather a combination of effects such as ion association or complexation equilibria seem to be responsible for the observed deviation of the concentration dependence of actual ionic mobilities from the Onsager theory.

Although our results do not give tangible evidence of the interactions between the analytes and the BGE constituents, we consider this hypothesis as the most likely explanation of the above discrepancy. Ionic interactions

(association) and complexation frequently occur in electrolyte solutions and they have been accepted as the most natural reason for the observed differences between the electrophoretic mobilities determined by CZE and those predicted by the Onsager theory [13, 14]. Moreover, both the experimental and theoretical procedures used have been performed very carefully and under the rationally selected conditions, which minimize the risk of any substantial defect in these procedures.

Due to the substantial uncertainty of the determined limiting mobilities and their dependence on the nature of the BGE constituents, a general application of the classical Onsager model seems not to be quite reliable for fine prediction and simulation of the electromigration behavior of the ions. More detailed and more complex studies will have to be carried out in order to understand interactions of various BGE constituents with both organic and simple spherical inorganic ionic analytes in CZE.

Additionally, it turned out from evaluation of methods for determination of limiting ionic mobilities that a significant difference in determined limiting mobilities occurs depending on the computation approach used. Precision of extrapolation of the actual ionic mobilities to zero ionic strength is limited by the fact that the electrophoretic mobilities are scarcely experimentally available for the ionic strength lower than 0.001 M due to CZE methodology constraints.

This work was supported by the Grant Agency of the Czech Republic, grants no. 203/03/0716, 203/04/0098, 203/05/2539, and the Research Project Z40550506 of the Academy of Sciences of the Czech Republic.

Received April 5, 2005

5 References

- [1] Khaledi, M. G. (Ed.), *High-Performance Capillary Electrophoresis: Theory, Techniques, and Applications*, Wiley, New York 1998.
- [2] Grossman, P. D., Colburn, J. C., *Capillary Electrophoresis: Theory and Practice*, Academic Press, San Diego, CA 1992.
- [3] Kenndler, E., Friedl, W., *J. Chromatogr.* 1992, 608, 161–170.
- [4] Foret, F., Křivánková, L., Boček, P., *Capillary Zone Electrophoresis*, Verlag Chemie, Weinheim 1993.
- [5] Reijenga, J. C., Verheggen, T. P. E. M., Martens, J. H. P. A., Everaerts, F. M., *J. Chromatogr. A* 1996, 744, 147–153.
- [6] Jaroš, M., Včeláková, K., Zusková, I., Gaš, B., *Electrophoresis* 2002, 23, 2667–2677.
- [7] Jaroš, M., Hruška, V., Štědrý, M., Zusková, I., Gaš, B., *Electrophoresis* 2004, 25, 3080–3085.
- [8] Štědrý, M., Jaroš, M., Včeláková, K., Gaš, B., *Electrophoresis* 2003, 24, 536–547.
- [9] Štědrý, M., Jaroš, M., Hruška, V., Gaš, B., *Electrophoresis* 2004, 25, 3071–3079.
- [10] <http://www.natur.cuni.cz/~gas/>.
- [11] Friedl, W., Reijenga, J. C., Kenndler, E., *J. Chromatogr. A* 1995, 709, 163–170.
- [12] Survej, M. A., Goodall, D. M., Wren, S. A. C., Rowe, R. C., *J. Chromatogr. A* 1996, 741, 99–113.
- [13] Li, D. M., Fu, S. L., Lucy, C. A., *Anal. Chem.* 1999, 71, 687–699.
- [14] Porras, S. P., Riekkola, M. L., Kenndler, E., *J. Chromatogr. A* 2001, 924, 31–42.
- [15] Porras, S. P., Riekkola, M. L., Kenndler, E., *Electrophoresis* 2002, 23, 367–374.
- [16] Včeláková, K., Zusková, I., Porras, S. P., Gaš, B., Kenndler, E., *Electrophoresis* 2005, 26, 463–472.
- [17] Robinson, R. A., Stokes, R. H., *Electrolyte Solutions, Second Revised Edition*, Dover Publications, Mineola, New York 2002, pp. 133–173.
- [18] Pitts, E., *Proc. R. Soc. Lond.* 1953, 217A, 43–70.
- [19] Onsager, L., Fuoss, R. M., *J. Phys. Chem.* 1932, 36, 2689–2778.
- [20] Čabala, R., personal communication.
- [21] Cifuentes, A., Canalejas, P., Diez-Masa, J. C., *J. Chromatogr. A* 1999, 830, 423–438.
- [22] Hjertén, S., *J. Chromatogr.* 1985, 347, 191–198.
- [23] Sun, P., Landman, A., Barker, G. E., Hartwick, R. A., *J. Chromatogr. A* 1994, 685, 303–312.
- [24] Horváth, J., Dolnik, V., *Electrophoresis* 2001, 22, 644–655.
- [25] Koval, D., Kašička, V., Jiráček, J., Collinsová, M., *Electrophoresis* 2003, 24, 774–781.
- [26] Williams, B. A., Vigh, G., *Anal. Chem.* 1995, 67, 3079–3081.
- [27] Haarhoff, P. C., van der Linde, H. J., *Anal. Chem.* 1966, 38, 573–582.
- [28] Erny, G. L., Bergström, E. T., Goodall, D. M., *J. Chromatogr. A* 2002, 959, 229–239.
- [29] Williams, B. A., Vigh, C., *Anal. Chem.* 1996, 68, 1174–1180.
- [30] Reijenga, J. C., Kenndler, E., *J. Chromatogr. A* 1994, 659, 403–415.
- [31] Dean, J. A. (Ed.), *Lange's Handbook of Chemistry*, 15th Edition, McGraw-Hill, New York 1999.
- [32] Hirokawa, T., Nishino, M., Aoki, N., Kiso, Y., Sawamoto, Y., Yagi, T., Akiyama, J.-I., *J. Chromatogr.* 1983, 271, D1–D106.

Determination of pK_a values of diastereomers of phosphinic pseudopeptides by capillary zone electrophoresis

Dušan Koval, Václav Kašička*, Jiří Jiráček, Michaela Collinsová

Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Flemingovo nám. 2, 166 10 Prague 6, Czech Republic

Address for correspondence:

Dr. Václav Kašička
Institute of Organic Chemistry and Biochemistry
Academy of Sciences of the Czech Republic
Flemingovo nám. 2
166 10 Prague 6
Czech Republic
tel. +420-220 183 239, fax. +420-220 183 592
e-mail: kasicka@uochb.cas.cz

Abbreviations: EPDMA, epoxy-poly(dimethylacrylamide); FS, fused silica

Keywords: Capillary electrophoresis/ Phosphinic pseudopeptide/ pK_a determination/ Diastereomer separation

ABSTRACT

Capillary electrophoresis method was used for determination of acidity constants (pK_a) of a series of ten phosphinic pseudopeptides, which varied in number and type of ionogenic groups. Effective electrophoretic mobilities were measured in the 1.8 - 12.0 pH range in the background electrolytes (BGEs) of constant ionic strength of 25 mM. Effective electrophoretic mobilities, corrected to standard temperature of 25°C, were subjected to non-linear regression analysis and the obtained apparent pK_a values were recalculated to thermodynamic pK_a s by extrapolation to zero ionic strength according to the extended Debye-Hückel model. Determined pK_a values of the phosphinic acid group fell typically in the 1.5 – 2.25 interval, C-terminal carboxylic groups in the 2.94 – 3.50 interval, carboxylic groups of the lateral chain of glutamate and aspartate in the 4.68 – 4.97 interval, imidazolyl moiety of histidine in the 6.55 – 8.32 interval, N-terminal amino groups in the 7.65 – 8.28 interval and ϵ -amino group of the lateral chain of lysine in the 10.46 – 10.61 interval. Further, separation of diastereomers of the phosphinic pseudopeptides was investigated in achiral BGEs. Evaluation of resolution of the diastereomers as a function of pH of the BGE revealed that most suitable pH region for separation of the diastereomers is around pK_a values of central phosphinic acid group of the pseudopeptides. Successful separation of some diastereomers was, however, achieved in the neutral and alkaline BGEs as well.

1 INTRODUCTION

Acidity constant (pK_a) is one of the fundamental quality parameters for characterization of chemical compounds in liquid phase or solution. Knowledge of pK_a values of substances is important, e.g., in rather specific fields such as separation methods for modeling, design and optimization of electrophoretic, chromatographic or extraction processes. More general is importance of pK_a values in drug development for studying of phenomena such as transport of active substance into the target organ, penetration through the cell membrane, mechanism of action, metabolic pathways or biological uptake. Consequently, due to the fact that large number of contemporary developed and introduced drugs are weak electrolytes, development of reliable method for fast determination of pK_a values is desirable.

Capillary zone electrophoresis (CZE) was introduced as a method for determination of pK_a of ionogenic groups in weak electrolytes in early 1990's [1] and since then it became frequently used alternative to classical potentiometric or spectroscopic approaches. Theoretical and methodical aspects of pK_a

determination were subject of many publications which were reviewed in our previous paper [2] and in ref. [3]. Out of numerous recent papers, several remarkable contributions appeared to make CZE more feasible method for pK_a determination. Firstly, Včeláková et al. [4] used dual contactless conductivity detector by which disturbing effects in the initial stage of electrophoretic run, such as stacking, destacking, voltage ramp effect, etc., were eliminated. In addition, a temperature control of the background electrolyte (BGE) inside the capillary was improved and the effect of peak distortion due to electromigration dispersion on correct determination of migration time was limited. Further, Lalwani et al. [5] employed computer modeling to design a composition of BGEs for pK_a determination of non-UV-absorbing compounds. BGE constituents were tailored to individual compounds in order to minimize electromigration dispersion in indirect UV absorption detection mode. Finally, considerable effort has been made to improve throughput of CZE method for determination of pK_a by using pressure assisted capillary electrophoresis in

single [6-8] or multiplexed [9] capillary electrophoretic devices.

Phosphinic pseudo-peptides represent a novel type of biologically active compounds investigated as inhibitors of Zn-metalloproteinases and aspartic proteinases [10, 11]. These compounds are peptide isosteres with one peptide bond substituted by enzymatically nonhydrolysable phosphinic acid moiety $-P(O)OH-CH_2-$. Present work brings an extension of our previous study [2] dealing with determination of pK_a values of highly acidic phosphinic acid group. Herein, determination of pK_a values of other ionogenic groups in the pseudo-peptide molecules was performed. These groups were carboxylic and amino functions at C- and N-termini of the pseudo-peptide chain or functional groups of the side-chain of pseudo-peptide amino acid constituents (see Fig. 1). Further, potential of CZE as a high-performance separation technique for pK_a determination is demonstrated on parallel determination of pK_a values of closely related diastereomers of phosphinic pseudo-peptides, which were successfully separated in achiral BGEs.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Reagents and chemicals

All chemicals were of analytical reagent grade. Phosphoric acid, chloroacetic acid, formic acid, acetic acid, sodium hydroxide and dimethylsulfoxide (DMSO) were obtained from Lachema (Brno, Czech Republic). MES (2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid), MOPS (3-(N-morpholino)propanesulfonic acid), tricine (N-[tris(hydroxymethyl)methyl]glycine), CHES (2-(cyclohexylamino)ethanesulfonic acid) and CAPS (3-(cyclohexylamino)-1-propanesulfonic acid) were from Serva (Heidelberg, Germany). Tris (tris(hydroxymethyl)aminomethane) was from Merck (Darmstadt, Germany), piperidine was from Sigma (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MI, USA) and Polybrene (hexadimethrine bromide) was from Aldrich (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MI, USA). Epoxy-poly(dimethylacrylamide) (EPDMA) [12] was kindly donated by Dr. M. Chiari (CNR, Milano, Italy). Phosphinic pseudo-peptides were synthesized as a mixture of four diastereomers and preparatively separated by HPLC as described in refs. [2, 13].

2.2 Instrumentation

CZE experiments were carried out in a home made apparatus equipped with a UV detector monitoring absorbance at 206 nm. Data acquisition and handling were performed using the Clarity chromatography station (DataApex, Prague, Czech Republic). Origin 6.1 software package (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA) was used for regression analysis. Fused silica (FS) capillaries (ID 50 μ m, OD 200 μ m, total length 300 mm and effective length 190 mm) were supplied by the Institute of Radio Engineering and Electronics, Czech Academy of Sciences (Prague, Czech Republic). Separations were performed at ambient temperature of 23 - 26°C. Pseudo-peptides were dissolved in deionized water in the 0.7 - 2.5 mM

concentration range and were introduced into the capillary hydrodynamically (pressure 700 Pa for 5 s).

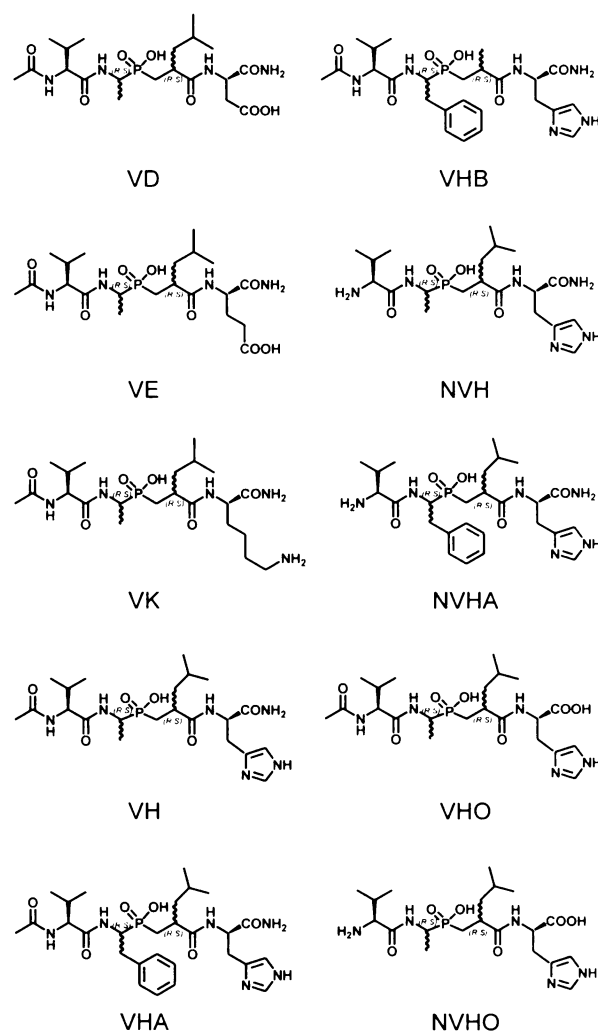


Figure 1. Structures of analyzed phosphinic pseudo-peptides.

Composition of the acidic BGE solutions containing Tris and phosphoric acid, chloroacetic acid, formic acid and acetic acid as well as the alkaline BGE solutions containing piperidine and acetic acid was calculated by Peakmaster software package [14]. Experimental evaluation of pH of the BGEs was performed by a CyberScan 2100 pH meter (Eutech Instruments, Ayer Rajah Crescent, Singapore). BGEs composed from sodium hydroxide and Good buffering substances (i.e. MES, MOPS, tricine, CHES and CAPS) were prepared by titration of the appropriate amount of sodium hydroxide with the 0.5 - 1 M stock solution of the buffering compound. The BGEs were filtered through a 0.45 μ m syringe filter (Millipore, Bedford, MA, USA) before use.

Separations of phosphinic pseudo-peptides, which occur as cations in the acidic pH region, and all experiments at $pH \geq 5.5$ were carried out in untreated FS capillaries. The new capillaries were flushed sequentially with water, 0.1 M NaOH, and water again, followed by BGE for 5 min each. Then, the capillary

was conditioned by 20 min application of the separation voltage in order to equilibrate the inner capillary surface and to stabilize electroosmotic flow (EOF) during the subsequent CZE runs. Between runs in the same BGE, the capillary was rinsed with the BGE for 1 min. Prior to any change of BGE, the capillary was rinsed with water for 5 min and then stabilized using the above procedure.

Phosphinic pseudopeptides, which remain in the anionic form in the acidic pH region, were analyzed in Polybrene modified capillaries. Dynamic coating of the capillary inner surface by Polybrene forming reversed (anodic) course of EOF was prepared as follows. The new FS capillaries were rinsed with water and 0.1 M NaOH for 5 min each. Then, capillary was flushed with 5 % m/m aqueous Polybrene solution for 5 min followed by rinsing with water and BGE solution for 5 min each. Further steps were the same as described above for untreated FS capillaries. Polybrene coating was found fairly stable in the 1.8 – 4 pH interval. At pH values higher than 4, slow deterioration of the coating was observed and coating procedure had to be repeated after 10 – 15 runs.

Separations of diastereomers of the phosphinic pseudopeptides were performed in capillaries with reduced EOF. Two types of modification were used, (i) covalently bonded polyacrylamide coating prepared according to procedure described in ref. [15], and (ii) dynamic EPDMA coating performed by following the procedure from ref. [12].

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Experimental design

3.1.1 Capillaries

Majority of the pseudopeptides were in the cationic form in acidic pH region and were gradually converted into the anions in neutral and alkaline region. Thus, these pseudopeptides were analyzed in untreated FS capillaries. Conversely, acidic pseudopeptides (i.e. VD, VE and VHO; see Fig. 1) were analyzed as anions in co-electroosmotic mode in capillaries with anodic EOF in the 1.8 – 5.5 pH region. Reversal of EOF was achieved by dynamic coating with cationic polymer Polybren and mobility of EOF in the modified capillaries was approximately $-30 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$.

3.1.2 Background electrolytes

Effective mobilities of the phosphinic pseudopeptides were measured in the 1.8 – 12.0 pH range in BGEs of the constant 25 mM ionic strength. Components of the BGEs (see Table 1) were selected to achieve a compromise between contradictory conditions of buffering capacity, conductivity, sensitivity of UV detection and electromigration dispersion.

3.1.3 Effective mobilities

The effective mobility was determined from the measurement of migration time, t_{mig} , of the analytes using Eq. (1):

$$m_{eff} = \frac{L_{eff}}{U} \left(\frac{1}{t_{mig}} - \frac{1}{t_{eof}} \right) \quad (1)$$

where L_t and L_{eff} are the total and effective capillary length, respectively; U is the applied separation voltage and t_{eof} is the migration time of the neutral EOF marker. Time of peak maximum was considered as a migration time of the analyte and neutral marker. Since the samples were available only as aqueous solution in low volume (typically 50 μl), EOF marker dissolved in BGE was injected separately behind the zone of the analyte solution. No significant difference in calculated mobilities was, however, observed as compared to experiments with EOF marker mixed with the analyte. Concentration of the EOF marker (DMSO) was tailored for each BGE composition to outweigh low absorbance of water gap of the analyte zone and to provide positive symmetrical peak of the EOF marker.

Experimental effective mobilities were corrected to

Table 1. Composition of background electrolytes

pH range	BGE constituents ^{a,b}	
1.80 – 3.00	phosphoric acid ($pK_a = 2.15$)	Tris
3.00 – 4.25	formic acid ($pK_a = 3.75$)	Tris
4.25 – 5.50	acetic acid ($pK_a = 4.76$)	NaOH
5.50 – 6.50	MES ($pK_a = 6.15$; 20°C)	NaOH
6.50 – 7.50	MOPS ($pK_a = 7.20$; 20°C)	NaOH
7.50 – 8.75	Tricine ($pK_a = 8.15$; 20°C)	NaOH
8.75 – 9.75	CHES ($pK_a = 9.55$; 20°C)	NaOH
9.75 – 11.25	CAPS ($pK_a = 10.40$; 20°C)	NaOH
11.25 – 12.00	acetic acid	piperidine ($pK_a = 11.12$)

a) pK_a values are from ref. [22]

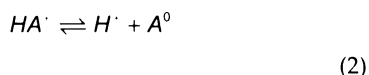
b) pK_a values correspond to 25°C unless otherwise specified

temperature increase inside the capillary due to Joule heating according to a procedure from ref. [16]. Briefly, heat dissipation capability of the separation capillary in the CE apparatus was calibrated with KCl solution of tabulated temperature course of specific conductivity. Then, input power responsible for average increase of temperature of BGE of about 2-3°C was used to achieve standard temperature of 25°C inside the capillary. Whenever elevated ambient temperature lead to temperature in the capillary higher than 25°C, experimental effective mobility was recalculated to the standard temperature assuming the 2 % per Centigrade increase in mobility.

3.2 pKa determination

3.2.1 Protolytic equilibria of phosphinic pseudopeptides

Relations associated with acid-base equilibria and the process of determination of pK_a values of the phosphinic pseudopeptides is demonstrated on a structure comprising one acidic and one basic ionisable group, such as VH (see Fig. 1). Protolytic equilibria of a compound of this type can be described by Eqs. (2) and (3) and thermodynamic acidity constants, $K_{a,i}$, are defined by Eqs. (4) and (5) where a_i are the activities of involved species. Notice that, for simplicity, H^+ is used instead of H_3O^+ ion.



$$K_{a,1} = \frac{a_{H^+} a_{A^0}}{a_{HA^+}} \quad (4)$$

$$K_{a,2} = \frac{a_{H^+} a_{A^-}}{a_{A^0}} \quad (5)$$

Similarly to ref. [4], so-called mixed acidity constants, $K_{a,i}^{mix}$, are defined for the purpose of this paper as follows:

$$K_{a,1}^{mix} = \frac{a_{H^+} c_{A^0}}{c_{HA^+}} \quad (6)$$

$$K_{a,2}^{mix} = \frac{a_{H^+} c_{A^-}}{c_{A^0}} \quad (7)$$

Mixed acidity constant can be evaluated from CZE experimental data since activity of hydroxonium ions, a_{H^+} , is directly measurable pH of the BGE ($pH = -\log a_{H^+}$) and concentration ratio of the species HA^+ , A^0 and A^- from Eqs. (6) and (7) is related to the effective electrophoretic mobility of the analyte.

The effective electrophoretic mobility of the analyte, $m_{i,eff}$, is primary data available from CZE experiment. The effective mobility can be expressed as a summation of the ionic mobilities, m_i , of all ionic forms, i , of the analyte weighted by their molar fraction, x_i , by Eq. (8):

$$m_{eff} = \sum_i m_i x_i \quad (8)$$

Molar fraction, x_i , of the species i is defined by Eq. (9) as:

$$x_i = \frac{c_i}{\sum_i c_i} \quad (9)$$

where c_i is the molar concentration of the species i and $\sum_i c_i$ represents summation of molar concentration of all forms of the analyte in the solution, *i.e.* total (analytical) concentration of the analyte. Mobility of uncharged form of the analyte is considered as zero. Further, electrophoretic mobilities of positively charged ions are treated as positive, mobilities of anions as negative throughout the paper.

For a phosphinic pseudopeptide containing one acidic and one basic functional group, the following Eq. (10) can be obtained by combination of Eqs. (8) and (9):

$$m_{eff} = \frac{m_{A^+} c_{A^+} + m_{A^0} c_{A^0}}{c_{A^+} + c_{A^0} + c_{A^-}} \quad (10)$$

Effective mobility can be further expressed by Eq. (11) formed by combination and rearrangement of Eqs. (6), (7) and (10):

$$m_{eff} = \frac{m_{A^+} 10^{pK_{a,1}^{mix} - pH} + m_{A^0} 10^{pH - pK_{a,2}^{mix}}}{10^{pK_{a,1}^{mix} - pH} + 10^{pH - pK_{a,2}^{mix}} + 1} \quad (11)$$

Eq. (11) describes dependence of the effective electrophoretic mobility of phosphinic pseudopeptides containing one acidic and one basic functional group, *i.e.* VK, VH, VHA and VHB (see Fig. 1), on the single variable – pH. Parameters in Eq. (11), the ionic

Table 2. Coefficients k for conversion of mixed $pK_{a,i}^{mix}$ to thermodynamic $pK_{a,i}$

Pseudopeptide	k^a			
	phosphinic acid	carboxyl	imidazolyl	amino
VD, VE	$-\log \gamma_i$	$-3 \log \gamma_i$		
VK	$\log \gamma_i$			$-\log \gamma_i$
VH, VHA, VHB	$\log \gamma_i$		$-\log \gamma_i$	
NVH, NVHA	$3 \log \gamma_i$		$\log \gamma_i$	$-\log \gamma_i$
VHO	$\log \gamma_i$	$-\log \gamma_i$	$-3 \log \gamma_i$	
NVHO	$3 \log \gamma_i$	$\log \gamma_i$	$-\log \gamma_i$	$-3 \log \gamma_i$

a) γ_i is the activity coefficient of univalent ion according to Eq. (20)

mobilities, $m_{A,i}$, and the mixed acidity constants $pK_{a,i}^{mix}$, can be obtained by regression analysis of the experimental pH dependence of the effective electrophoretic mobilities by employing Eq. (11). Effective mobilities are, however, not only function of pH but also of other variables such as temperature and concentration (ionic strength) of the BGE. CZE experiments should be designed so as to keep constant the variables which affect $pK_{a,i}$ values. Thus, the ionic mobilities, $m_{A,i}$, and the mixed acidity constants, $pK_{a,i}^{mix}$, obtained by regression analysis of the electrophoretic mobilities are related to the experimental conditions.

Further, regression models similar to Eq. (11) can be derived by the above procedure for the phosphinic pseudopeptides with various combinations of ionogenic groups:

i) two acidic groups (VD,VE):

$$m_{eff} = \frac{m_{A,2} 10^{2pH - pK_{a,1}^{mix} - pK_{a,2}^{mix}} + m_{A,1} 10^{pH - pK_{a,1}^{mix}}}{10^{2pH - pK_{a,1}^{mix} - pK_{a,2}^{mix}} + 10^{pH - pK_{a,1}^{mix}} + 1} \quad (12)$$

ii) one acidic and two basic groups (NVH, NVHA):

$$m_{eff} = \frac{m_{A,2} 10^{pK_{a,1}^{mix} + pK_{a,2}^{mix} - 2pH} + m_{A,1} 10^{pK_{a,2}^{mix} - pH} + m_{A,3} 10^{pH - pK_{a,3}^{mix}}}{10^{pK_{a,1}^{mix} + pK_{a,2}^{mix} - 2pH} + 10^{pK_{a,2}^{mix} - pH} + 10^{pH - pK_{a,3}^{mix}} + 1} \quad (13)$$

iii) two acidic and one basic groups (VHO):

$$m_{eff} = \frac{m_{A,1} 10^{pK_{a,1}^{mix} - pH} + m_{A,2} 10^{pH - pK_{a,2}^{mix}} + m_{A,3} 10^{2pH - pK_{a,2}^{mix} - pK_{a,3}^{mix}}}{10^{pK_{a,1}^{mix} - pH} + 10^{pH - pK_{a,2}^{mix}} + 10^{2pH - pK_{a,2}^{mix} - pK_{a,3}^{mix}} + 1} \quad (14)$$

iv) two acidic and two basic groups (NVHO):

$$m_{eff} = \frac{m_{A,2} 10^{pK_{a,1}^{mix} + pK_{a,2}^{mix} - 2pH} + m_{A,1} 10^{pK_{a,2}^{mix} - pH} + m_{A,3} 10^{pH - pK_{a,3}^{mix}} + m_{A,4} 10^{2pH - pK_{a,3}^{mix} - pK_{a,4}^{mix}}}{10^{pK_{a,1}^{mix} + pK_{a,2}^{mix} - 2pH} + 10^{pK_{a,2}^{mix} - pH} + 10^{pH - pK_{a,3}^{mix}} + 10^{2pH - pK_{a,3}^{mix} - pK_{a,4}^{mix}} + 1} \quad (15)$$

Mixed acidity constants, $pK_{a,i}^{mix}$, obtained by regression analysis of the experimental mobility data can be recalculated to thermodynamic acidity constants $pK_{a,i}$. Relation between these constants can be expressed for an ampholyte containing one acidic and one basic ionogenic group (such as VH) from Eqs. (4) - (7) according to procedure from ref. [4]:

$$K_{a,1} = K_{a,1}^{mix} \frac{\gamma_{A^0}}{\gamma_{HA^+}} \quad (16)$$

$$K_{a,2} = K_{a,2}^{mx} \frac{\gamma_A}{\gamma_{A0}} \quad (17)$$

where γ_i is the activity coefficient of corresponding species.

Eqs. (16) and (17) can be rewritten to conventional logarithmic form as follows:

$$pK_{a,1} = pK_{a,1}^{mx} + \log \gamma_{HA} - \log \gamma_{A0} \quad (18)$$

$$pK_{a,2} = pK_{a,2}^{mx} + \log \gamma_{A0} - \log \gamma_A \quad (19)$$

The value of activity coefficient of i -th charged species for aqueous solutions at 25°C, γ_i , can be evaluated according to Debye-Hückel theory [17]:

$$-\log \gamma_i = \frac{0.5085 \cdot z_i^2 \sqrt{I}}{1 + 3.281 \cdot a \sqrt{I}} \quad (20)$$

where z_i is the charge number, a is the effective hydrated diameter (nm) of the ion and I is the ionic strength of the solution (mol.dm⁻³) defined as:

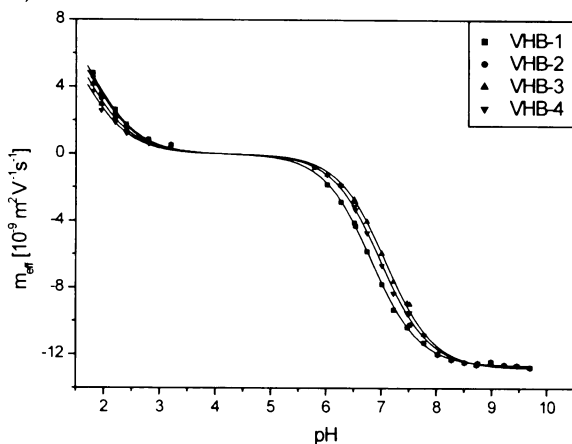
$$I = \frac{1}{2} \sum_i c_i z_i^2 \quad (21)$$

where c_i is molarity (mol.dm⁻³) of i th ion in the solution. Hydrated diameters of inorganic and small organic ions are tabulated [18, 19], however hydrated diameters of novel compounds are not available. Therefore, widely used approximative value of $a = 0.5$ nm was utilized for calculations of activity coefficients in this paper. Nevertheless, we are aware that incorrect hydrated diameter may lead to inaccurate value of the activity coefficient in analogy to conclusions of our previous paper investigating Debye-Hückel-Onsager theory for description of concentration dependence of the electrophoretic mobilities of organic anions [15].

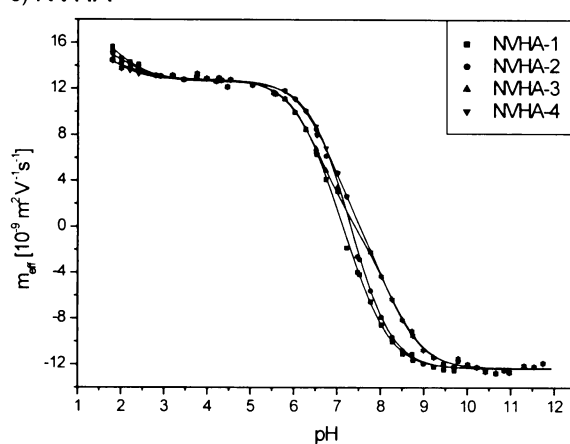
In this paper, activity coefficient of uncharged species is taken as zero according to Debye-Hückel theory (Eq. (20)). Although this assumption is widely used in the CE methods for pK_i determination, it is disputable whether zwitterions of zero net charge but comprising oppositely charged parts of the molecule can be treated in the same way as absolutely uncharged species in calculations of the activity coefficients.

If we assume constant value of the hydrated diameter, a , in Eq. (20), Eqs. (18) and (19) can be rewritten to obtain Eqs. (22) and (23):

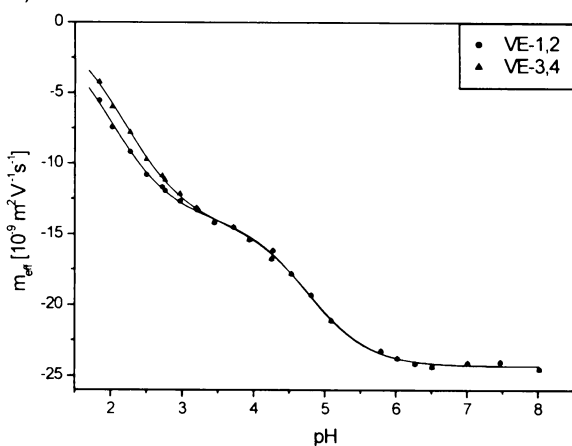
a) VHB



c) NVHA



b) VE



d) NVHO

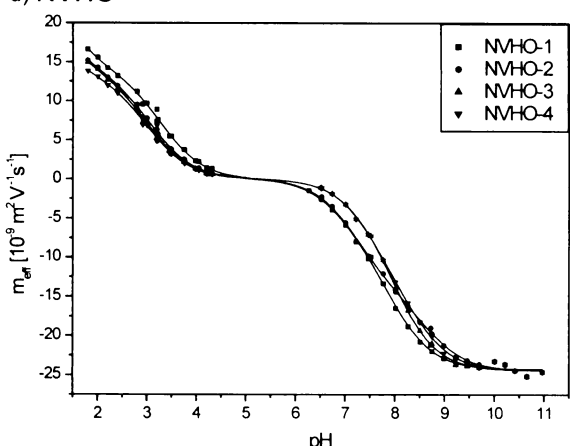


Figure 2. Plots of the effective mobilities vs. pH of the diastereomers of selected pseudopeptides, which vary in number and type of ionogenic groups. Effective mobilities correspond to the 25 mM ionic strength and the temperature of 25°C. Curves are non-linear fitting traces according to Eqs. (11) (a - VHB), (12) (b - VE), (13) (c - NVHA) and (15) (d - NVHO).

$$pK_{a,1} = pK_{a,1}^{mix} + (z_{HA}^2 - z_{A0}^2) \log \gamma_{\pm} \quad (22)$$

$$pK_{a,2} = pK_{a,2}^{mix} + (z_{A0}^2 - z_A^2) \log \gamma_{\pm} \quad (23)$$

where z is the charge number of respective species and γ_{\pm} is the activity coefficient of univalent ion.

Following the above procedure, relations similar to Eqs. (22) and (23) can be derived for electrolytes possessing various number of ionisable groups in the molecule. Results are summarized in Table 2 in the form of constant k from Eq. (24):

$$pK_{a,i} = pK_{a,i}^{mix} + k \quad (24)$$

3.2.2 pKa calculation

Mixed acidity constants, $pK_{a,i}^{mix}$, were determined by non-linear regression of pH dependence of the effective mobilities according to formulas (11) - (15). Regression analysis was performed independently for each diastereomer of the pseudopeptides whereas equal value of the effective mobility was used for unresolved diastereomers. Obtained $pK_{a,i}^{mix}$ values were recalculated to thermodynamic pK_a values according to Eq. (24) and the constant k from Table 2.

Table 3. Determined thermodynamic pK_a values of diastereomers of the phosphinic pseudopeptides at 25°C

Pseudopeptide	Diastereomer ^a	pK_a^b			
		phosphinic acid	carboxyl	imidazolyl	amino
VD	1+2	2.02±0.03	4.68±0.04		
	3	2.15±0.03	4.72±0.04		
	4	2.19±0.03	4.73±0.04		
VE	1+2	2.06±0.02	4.94±0.03		
	3+4	2.25±0.02	4.97±0.03		
VK	1+2	1.89±0.14			10.46±0.05
	3+4	1.71±0.20			10.61±0.04
VH	1+2	1.68±0.12		6.80±0.01	
	3+4	1.59±0.15		7.15±0.01	
VHA	1	1.62±0.18		6.76±0.02	
	2	1.61±0.20		6.76±0.02	
	3	1.61±0.20		7.12±0.02	
	4	1.52±0.26		7.12±0.02	
VHB	1	1.66±0.11		6.88±0.01	
	2	1.66±0.12		6.88±0.01	
	3	1.57±0.15		7.14±0.01	
	4	1.50±0.19		7.05±0.01	
NVH	1	1.78±0.17		6.55±0.02	7.96±0.02
	2	1.90±0.16		6.85±0.03	7.87±0.03
	3	1.86±0.22		6.52±0.02	8.11±0.02
	4	2.10±0.18		6.80±0.02	8.04±0.02
NVHA	1	1.62±0.34		6.62±0.03	7.63±0.03
	2	1.87±0.31		6.97±0.04	7.65±0.04
	3	1.85±0.50		6.53±0.02	8.28±0.02
	4	1.42±0.73		6.79±0.02	8.24±0.03
VHO	1	1.63±0.15	3.49±0.02	7.64±0.03	
	2	1.62±0.15	3.50±0.02	7.74±0.03	
	3+4	1.45±0.30	3.15±0.02	8.32±0.03	
NVHO	1	0.87±2.3	3.21±0.05	7.04±0.17	8.13±0.08
	2	0.93±3.6	3.01±0.08	7.29±0.06	8.81±0.08
	3	0.89±4.4	2.95±0.08	7.21±0.67	8.17±0.08
	4	1.25±3.4	2.94±0.10	7.62±0.16	8.56±0.16

^a) Diastereomers are numbered according to their effective mobilities at pH 2, ^b) $pK_a \pm SD$

3.3 *pK_a of phosphinic pseudopeptides*

Generally, CZE is utilized for determination of pK_a values in the 2 – 12 range. Herein, we analyzed peptide analogues comprising fairly acidic phosphinate group of pK_a close to 2. Electrophoretic mobilities, which were used for pK_a calculation, were recorded in pH values down to 1.8. BGEs of even lower pH were not used because of considerable concentration of highly mobile H^+ ions and inherent high ionic strength, which exceeds the 25 mM working ionic strength of the BGEs. However, estimated pK_a value of the phosphinic acid group is for some pseudopeptides markedly lower than minimal experimental pH. This is reflected in increased SD values of estimated pK_a and ionic mobilities (see

Tables 3 and 4). Lowering of the limits for pK_a determination by CZE requires availability of experimental mobility data for highly acidic pH. In BGEs of extreme pH values, the electrophoretic mobility of the analyte is affected according to the Onsager-Fuoss theory by considerable concentration of highly mobile H^+ or OH^- ions. A numerical correction procedures based on theory of concentration dependence of the electrophoretic mobilities seem to be, however, unable to provide reliable results for the larger ions [15].

For the determination of individual pK_a values in the compounds containing several ionogenic functional groups, the distance between consecutive pK_a s is

Table 4. Determined actual ionic mobilities of various forms of diastereomers of the phosphinic pseudopeptides at 25°C and 25 mM ionic strength

Pseudopeptide	Diastereomer ^a	Ionic mobilities			
		m(+2)	m(+1)	m(-1)	m(-2)
VD	1+2			-14.2±0.2	-24.7±0.1
	3			-14.6±0.2	-24.7±0.1
	4			-14.7±0.2	-24.7±0.1
VE	1+2			-13.9±0.1	-24.3±0.1
	3+4			-14.2±0.1	-24.3±0.1
VK	1+2		11.8±2.0	-12.0±0.4	
	3+4		12.5±3.5	-12.0±0.2	
VH	1+2		11.2±1.9	-12.7±0.1	
	3+4		11.1±2.6	-12.8±0.1	
VHA	1		9.8±2.7	-12.1±0.1	
	2		9.5±2.9	-12.1±0.1	
	3		9.5±2.9	-12.1±0.1	
	4		9.2±3.9	-12.1±0.1	
VHB	1		10.2±1.7	-12.7±0.1	
	2		9.7±1.7	-12.7±0.1	
	3		9.8±2.3	-12.8±0.1	
	4		9.7±2.9	-12.8±0.1	
NVH	1	22.0±1.6	13.7±0.1	-13.2±0.1	
	2	20.5±1.1	13.6±0.1	-13.1±0.1	
	3	19.2±1.3	13.7±0.1	-13.2±0.1	
	4	17.9±0.7	13.6±0.1	-13.2±0.1	
NVHA	1	18.1±2.5	12.7±0.1	-12.3±0.1	
	2	16.2±1.2	12.6±0.1	-12.4±0.1	
	3	15.3±1.4	12.8±0.1	-12.4±0.1	
	4	17.0±4.8	12.7±0.1	-12.3±0.1	
VHO	1		13.8±3.2	-13.0±0.1	-24.1±0.1
	2		13.9±3.3	-13.1±0.1	-24.0±0.1
	3+4		13.4±6.8	-13.2±0.1	-24.0±0.1
NVHO	1	33.2±81.7	14.1±1.1	-7.8±2.4	-24.3±0.1
	2	26.3±80.3	13.8±1.8	-14.2±1.0	-24.5±0.2
	3	26.6±103.2	13.7±2.1	-2.7±3.9	-24.4±0.1
	4	18.0±23.4	13.1±2.5	-12.6±4.4	-24.5±0.2

^a) Diastereomers are numbered according to their effective mobilities at pH 2

^b) $m_i \pm SD$

important. If the consecutive pK_a s are fairly off, their determination from well separated sigmoidal parts of the experimental pH mobility dependence is smooth (see Figs. 2a and 2b). Conversely, the closer the consecutive pK_a s are, the more complicated becomes their resolution (see Figs. 2c and 2d). In such cases, precise experimental electrophoretic mobilities are critical in order to achieve good resolution of the consecutive pK_a values. For instance, estimations of pK_a (3) and pK_a (4) of NVHO, diastereomer No. 3 are pK_a (3) = 7.21 ± 0.67 , pK_a (4) = 8.17 ± 0.08 (see Table 3). High disproportion in SD of the pK_a estimations as well as apparently erroneous estimation of the ionic mobility $m_{i,3} = -2.7 \pm 3.9 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (see Table 4) implies that the regression procedure is herein unable to determine pK_a (3) and pK_a (4) of this diastereomer correctly.

3.4 Separation of diastereomers

Separability of diastereomers of the phosphinic pseudopeptides was inspected in a broad pH range. The results were in agreement with rule of thumb saying that separation of diastereomers is most likely to be achieved in BGE of pH around pK_a values of the analyte. Summarized data of this paper and our previous work [20] reveal that, in general, diastereomers of phosphinic pseudopeptides were most successfully separated in strongly acidic BGEs. Slight differences of pK_a values of central phosphinate group between the diastereomers were more markedly reflected in resolution of the diastereomers than differences in pK_a of the peripheral functional groups. However, successful separations of the diastereomers were achieved also in neutral and alkaline BGEs. Further, pH variation in relative migration order of the diastereomers was observed for some of the pseudopeptides, e.g., for NVHO (Fig. 3) and NVHA (Fig. 4) in the 6 – 8 pH region. These variations in the relative migration order of the diastereomers are presumably due to differences in the distribution order

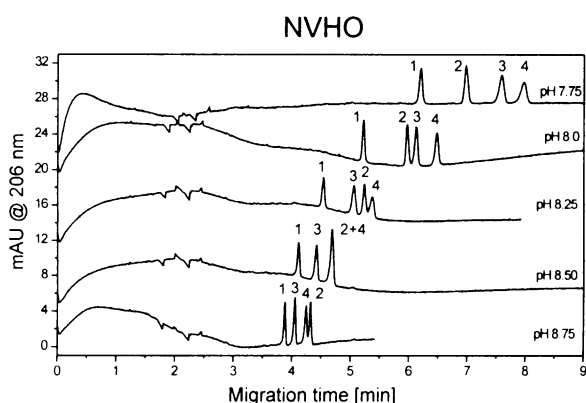


Figure 3. Separation of diastereomers of the pseudopeptide NVHO in the anionic mode. Variations in the migration order of the diastereomers in the 7.75 – 8.75 pH region is due to different distribution of pK_a values of the imidazolyl and amino residues between the diastereomers, see Table 3. Experimental conditions: BGEs, 25 mM NaOH titrated with tricine to pH 7.75 – 8.75; capillary, i.d./o.d. 50/200 μm , total/effective length 300/190 mm, EPDMA coated; detection, direct UV absorption at 206 nm; temperature, ambient (23°C); separation voltage, -10 kV; electric current, 13 – 15 μA ; overall analyte concentration.

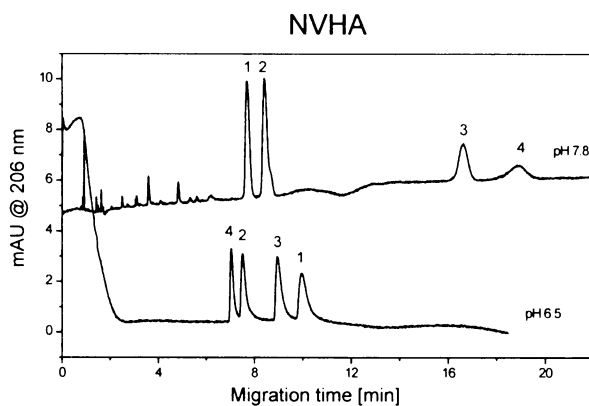


Figure 4. Separation of diastereomers of the pseudopeptide NVHA in the cationic (pH 6.5) and anionic (pH 7.8) mode. Experimental conditions: a) cationic mode; BGE, 40 mM NaOH adjusted with MES to pH 6.5; separation voltage, 12 kV; electric current, 28 μA ; injection, hydrodynamic, 1.5 kPa for 4 s; b) anionic mode; BGE, 40 mM NaOH adjusted with phosphoric acid to pH 7.8; separation voltage, -10 kV; electric current, 33 μA ; injection, hydrodynamic, 1.0 kPa for 10 s; the other conditions were the same for both modes: capillary, i.d./o.d. 50/200 μm , total/effective length 300/190 mm, polyacrylamide coated; detection, direct UV absorption at 206 nm; temperature, ambient (23°C); overall analyte concentration, 2 mM. Diastereomers are numbered according to their effective mobilities at pH 2.

of the pK_a values of individual ionogenic groups among the group of four diastereomers (see e.g. pK_a values of NVHA in Table 3). A pH dependent reversal order of stereoisomers was demonstrated in the separation of peptide enantiomers in cyclodextrin based BGEs [21]. Conversely to phosphinic pseudopeptide diastereomers, reversal in migration order of the peptide enantiomers was attributed either to pH-dependent association constants or varying effective mobilities of the enantiomer-cyclodextrin complex.

4 CONCLUDING REMARKS

Effective mobilities measured in the 1.8 – 12.0 pH range allowed pK_a determination of carboxylic, imidazolyl and amino moieties in a series of phosphinic pseudopeptides. Low pK_a of the phosphinic acid group was determined in fair precision for the pseudopeptides, the pK_a of which corresponded to the lowest measured pH of 1.8. Nevertheless, acidity of the phosphinic acid group in some of the analyzed pseudopeptides was too low to be successfully determined from their CZE analyses.

Resolution power proved to be important feature of the CZE method for pK_a determination for compounds possessing multiple ionisable groups. It turned out that minimal distance of two consecutive pK_a s should be about 1.5 to enable their precise determination. In specific cases, i.e. if charge of the analyte species involved in both consecutive dissociation degrees is zero, it was possible to determine pK_a s which differed in as low as one pH unit with SD of 0.02 – 0.04. Generally, precision of experimental effective mobilities is critical for

resolution power of a CZE method for consecutive pK_a determination.

Separation of diastereomers of the phosphinic pseudopeptides was achieved by difference in their pK_a s. Effective mobilities of the diastereomers proved to be uniform in the pH regions in which ions corresponding to given dissociation degree were only present. Hence, the diastereomers were successfully separated exclusively in the BGEs of pH around pK_a value of the analyte. Comparison of results obtained herein and in our previous paper [20] revealed that, in general, dissociation of central phosphinate group has the major effect on separation selectivity. Next, distribution order of pK_a values of individual ionogenic groups varied between the diastereomers, which was reflected in variation in migration order of the diastereomers with pH.

ACKNOWLEDGMENT

The work was supported by the Grant Agency of the Czech Republic, grants no. 203/04/0098, 203/05/2539, and by the Research Project Z40550506 of the Academy of Sciences of the Czech Republic.

REFERENCES

1. Beckers, J. L., Everaerts, F. M., Ackermans, M. T., *J. Chromatogr.* 1991, 537, 407-428.
2. Koval, D., Kašička, V., Jiráček, J., Collinsová, M., Garrow, T. A., *J. Chromatogr. B* 2002, 770, 145-154.
3. Poole, S. K., Patel, S., Dehring, K., Workman, H., Poole, C. F., *J. Chromatogr. A* 2004, 1037, 445-454.
4. Včeláková, K., Zusková, I., Kenndler, E., Gaš, B., *Electrophoresis* 2004, 25, 309-317.
5. Lalwani, S., Tutu, E., Vigh, G., *Electrophoresis* 2005, 26, 2503-2510.
6. Wan, H., Holmén, A. G., Wang, Y. D., Lindberg, W., Englund, M., Någård, M. B., Thompson, R. A., *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2003, 17, 2639-2648.
7. Wan, H., Holmén, A., Någård, M., Lindberg, W., *J. Chromatogr. A* 2002, 979, 369-377.
8. Ishihama, Y., Nakamura, M., Miwa, T., Kajima, T., Asakawa, N., *J. Pharm. Sci.* 2002, 91, 933-942.
9. Zhou, C. X., Jin, Y. K., Kenseth, J. R., Stella, M., Wehmeyer, K. R., Heineman, W. R., *J. Pharm. Sci.* 2005, 94, 576-589.
10. Collinsová, M., Jiráček, J., *Curr. Med. Chem.* 2000, 7, 629-647.
11. Collinsová, M., Castro, C., Garrow, T. A., Yiotakis, A., Dive, V., Jiráček, J., *Chemistry & Biology* 2003, 10, 113-122.
12. Chiari, M., Cretich, M., Stastna, M., Radko, S. P., Chrambach, A., *Electrophoresis* 2001, 22, 656-659.
13. Koval, D., Kašička, V., Jiráček, J., Collinsová, M., Garrow, T. A., *Electrophoresis* 2002, 23, 215-222.
14. Peakmaster 5.1, <http://www.natur.cuni.cz/~gas/>
15. Koval, D., Kašička, V., Zusková, I., *Electrophoresis* 2005, 26, 3221-3231.
16. Koval, D., Kašička, V., Jiráček, J., Collinsová, M., *Electrophoresis* 2003, 24, 774-781.
17. Debye, P., Hückel, E., *Physik. Z.* 1923, 24, 185-206.
18. Kielland, J., *J. Am. Chem. Soc.* 1937, 59, 1675-1678.
19. Robinson, R.A., Stokes, R.H., *Electrolyte Solutions*, Dover Publications, Inc., Mineola, New York 2002, pp. 461.
20. Koval, D., Kašička, V., Jiráček, J., Collinsová, M., *J. Sep. Sci.* 2003, 26, 653-660.
21. Süß, F., Sängler-van de Griend, C. E., Scriba, G. K. E., *Electrophoresis* 2003, 24, 1069-1076.
22. *Lange's Handbook of Chemistry 15th Edition*, Dean, J.A. (ed.), McGraw-Hill, New York 1999.

Dušan Koval¹
 Jana Jirásková^{1,2}
 Kvido Strišovský^{1*}
 Jan Konvalinka^{1,2}
 Václav Kašička¹

¹Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, Czech Republic

²Department of Biochemistry, Faculty of Natural Science, Charles University, Prague, Czech Republic

Received December 22, 2005

Revised March 8, 2006

Accepted March 8, 2006

Research Article

Capillary electrophoresis method for determination of D-serine and its application for monitoring of serine racemase activity

Serine racemase (SR) is an enzyme responsible for the biosynthesis of D-serine, the coagonist of the N-methyl-D-aspartate receptor, in the brain. Therefore, it has been suggested as a possible therapeutic target for the treatment of various neurodegenerative diseases. To develop a potent inhibitor of SR, a simple, sensitive, fast, and robust assay is needed. In this paper, a new CE method for the determination of D-serine is described. Serine enantiomers are resolved in the form of o-phthalaldehyde (OPA)/2-mercaptoethanol (2-ME) derivatives in an alkaline BGE composed of 50 mM sodium tetraborate, pH 9.7, and containing 40 mM 2-hydroxypropyl- γ -CD as a chiral selector. The problem of time-limited stability of OPA/2-ME derivatives has been overcome by employing in-capillary derivatization of the sample, *i.e.*, the derivatization reaction was carried out directly in the separation capillary in the first phase of the CE run. UV-absorption detection at 230 nm allowed concentration detection limit of 3 μ M. Baseline resolution of D- and L-serine derivatives was achieved in less than 10 min. This fact, together with the simple sample pretreatment, allowed application of the method to medium-throughput monitoring of SR activity, such as the screening of potential SR inhibitors. A good agreement was achieved between the developed CE method and the previously established HPLC method for determination of the inhibition constant, K_i , of a new SR inhibitor, L-erythro-3-hydroxyaspartate.

Keywords: Capillary zone electrophoresis / Chiral separation / D-Serine / In-capillary derivatization / Serine racemase
 DOI 10.1002/elps.200500946

1 Introduction

All higher organisms use L amino acids for the synthesis of proteins. However, a significant amount of D-serine has been found in mouse and rat brain, and it has been suggested to act as a coagonist at the "glycine site" of the N-methyl-D-aspartate (NMDA) subtype of L-glutamate receptors occurring in the mammalian central nervous system (for a review see [1]).

Correspondence: Dr. Václav Kašička, Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Flemingovo 2, CZ-166 10 Prague 6, Czech Republic
E-mail: kasicka@uochb.cas.cz
Fax: +420-220-183-592

Abbreviations: **Ammediol**, 2-amino-2-methyl-1,3-propanediol; **AOAA**, aminoxyacetic acid hemihydrochloride; **FDA**, 1-fluoro-2,4-dinitrophenyl-5-L-alanine amide; **2-HP- γ -CD**, 2-hydroxypropyl- γ -CD; **IS**, internal standard; **3-MPA**, 3-mercaptopropionic acid; **2-ME**, 2-mercaptoethanol; **NAC**, N-acetyl-L-cysteine; **NMDA**, N-methyl-D-aspartate; **OPA**, o-phthalaldehyde; **PLP**, pyridoxal 5'-phosphate; **SR**, serine racemase

The NMDA receptors mediate a number of important physiological processes, including brain development, learning, and memory. However, overactivation of these receptors might lead to various neuropathies including postischemic brain damage, Alzheimer's disease, and diabetic neuropathy (for review see [2, 3]).

Serine racemase (SR), a pyridoxal 5'-phosphate (PLP)-dependent enzyme that catalyzes the direct conversion of L-serine to D-serine, was first isolated from rat brain [4]. Subsequently it was found in mice and humans [5, 6]. Inhibition of this enzyme has been suggested as a possible way to prevent neuronal cell damage in instances when NMDA receptor overactivation results in neurotoxic levels of glutamate [1, 7].

For the identification of an inhibitor of a novel pharmaceutical target, development of a fast, user-friendly, sensitive, and reliable assay is critical. We and others pre-

* Current address: MRC Laboratory of Molecular Biology, Hills Road, Cambridge CB2 2QH, UK.

viously observed that SR not only racemizes serine but also converts L-serine and the synthetic compound L-serine-O-sulfate into pyruvate *via* its β -elimination activity [8–10]. Although, activity assays of SR could be based on the side activity, direct analysis of the racemization is clearly superior to any other activity assays. However, separation and detection of the serine enantiomers is not an easy task. Due to the absence of a strong chromophore, fluorophore, or electroactive moiety in the serine molecule it has to be derivatized with chromogenic or fluorogenic compounds to increase its sensitivity to detection. The analysis was further complicated by the enantiomeric selectivity required to resolve the optical isomers. This is usually achieved by chromatographic or electrophoretic methods for chiral separation.

Chiral separations of amino acids have been performed by GC or HPLC for many years, and a number of methods for resolution of the serine enantiomers has been developed. In GC, D- and L-serine were separated as their *N,O*-pentafluoropropionyl derivatives on a chiral capillary column of Chirasil-L-Val [11]. HPLC approaches to chiral separation of serine include derivatization with the chiral reagents 1-fluoro-2,4-dinitrophenyl-5-L-alanine amide (FDAA, Marfey's reagent) [12] or *o*-phthalaldehyde (OPA) in conjunction with *N-tert*-butyloxycarbonyl-L-cysteine [13] followed by separation of the diastereomeric derivatives on an RP column. In addition, serine enantiomers have been resolved as their 7-nitrobenzofurazan-4-yl (NBD) derivatives using a Pirkle-type chiral column [14]. However, separation of serine enantiomers by these chromatographic methods is laborious and time-consuming.

CE, a complementary separation technique to HPLC, is a highly efficient and fast method for analysis of biomolecules. Different separation modes, such as CZE and MEKC, have been developed to facilitate chiral separation of amino acids [15, 16]. Separation of serine enantiomers derivatized with fluorescein-5-isothiocyanate (FITC) by MEKC was achieved in several different environments, including γ -CD (γ -CD)/SDS [17], β -CD/sodium taurocholate [18] or β -CD/SDS [19]. Another MEKC approach utilizes derivatization of the serine enantiomers with the chiral reagent (+/–)-1-(9-anthryl)-2-propyl chloroformate (APOC) and separation of the diastereomeric products using a pseudostationary phase composed of SDS and DOC [20]. Recently, fast separation of 3-(4-carboxybenzoyl)-2-quinoline-carboxaldehyde (CBQCA) serine derivatives was reported in a β -CD/SDS system [21]. Additionally, serine enantiomers were reacted with naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde (NDA) in the presence of potassium cyanide and resolved in a β -CD/DOC environment [22]. In CZE, separation of NBD derivatives with

hydroxypropyl- β -CD (HP- β -CD) [23, 24] and NDA/KCN derivatives was acquired in a mixture containing HP- β -CD and D-glucose [25]. One of the best resolutions of D- and L-serine reported so far using CE was achieved by the CZE approach employing derivatization with OPA in the presence of 2-mercaptoethanol (2-ME) with 2-hydroxypropyl- γ -CD (2-HP- γ -CD) as a chiral selector [26].

The aim of this work was to elaborate a new, simple, fast, and robust method for determination of D-serine in the presence of L-serine and to apply it to evaluation of SR activity and inhibitor screening. The developed method involves in-capillary derivatization of serine enantiomers with OPA and 2-ME (Fig. 1) in the inlet port of the separation capillary and subsequent separation of D- and L-serine derivatives using 2-HP- γ -CD as chiral selector. The high chiral selectivity of the previously proposed method [26] is combined with the newly implemented in-capillary derivatization, which allows the assay to overcome problems originating from time-limited stability of OPA/2-ME amino acid derivatives. Hence, the proposed assay can be carried out in a commercially available CE analyzer without the need for hardware modification.

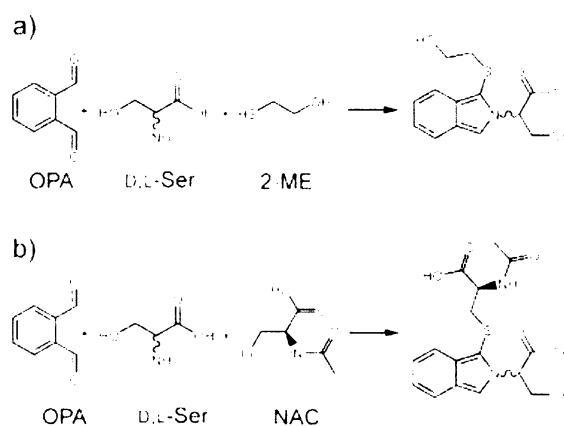


Figure 1. Schemes of the serine enantiomer derivatization reactions with OPA in conjunction with (a) 2-ME or (b) NAC.

2 Materials and methods

2.1 Reagents and chemicals

All chemicals were of analytical reagent grade. D-Serine, L-serine, *N*-acetyl-L-cysteine (NAC), β -CD, 4-(2-hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid (HEPES), D,L-DTT, PLP, 2-HP- β -CD (0.6 M substitution), 3-mercaptopropionic acid (3-MPA), and ACN were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA); magnesium chloride, glycine, sodium tetraborate, sodium hydroxide, lithium

hydroxide, boric acid, and methanol were obtained from Lachema (Brno, Czech Republic); 2-ME, OPA, 2-HP- γ -CD, and α -CD were from Fluka (Buchs, Switzerland); 2-amino-2-methyl-1,3-propanediol (Ammediol), and 2-(cyclohexylamino)ethane-2-sulfonic acid (CHES) were from Serva (Heidelberg, Germany); aminoxyacetic acid hemihydrochloride (AOAA) was from ICN Biomedicals (Aurora, OH, USA); EDTA was from USB (Cleveland, OH, USA); Marfey's reagent, FDAA was from Pierce Biotech. (Rockford, IL, USA); and L-erythro- β -hydroxyaspartic acid was from Wako Pure Chemical Industries (Osaka, Japan).

2.2 Instrumentation

CZE experiments were carried out in a P/ACE MDQ (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) analyzer equipped with a diode array UV-Vis detector. Absorbance of derivatized amino acids was monitored at 230 nm. Data acquisition and handling were performed using the Karat 32 system, version 7.0. Fused-silica capillaries with outer polyimide coating (id/od 75/375 μ m, total/effective length 400/298 mm, supplied by Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, USA) were used. Samples were injected hydrodynamically (1 kPa pressure for 5 s). Temperature of the liquid capillary coolant was set at 20°C.

2.3 Enzymatic reaction

All testing was carried out with highly purified recombinant mouse SR [27]. Racemization activity in the presence of putative mouse SR inhibitors was analyzed in a pH 9.0 reaction buffer containing 20 mM sodium-CHES, 20 μ M PLP, 1 mM MgCl₂, 1 mM ATP, 5 mM DTT, and 0.5 μ M enzyme sample. After 10–20 min preincubation with the inhibitory compound (typically present at a final concentration of 5 μ M) at room temperature 10 μ L of the substrate was added (to a final concentration of 3 mM and a final reaction volume of 100 μ L).

To evaluate the mechanism of inhibition, the samples were prepared in the same way, but the substrate and inhibitor concentrations were varied.

The reactions proceeded from 20 min to 2 h at 37°C. For CZE analysis the reactions were stopped by addition of 20 μ L of a 30 mM EDTA and 6 mM AOAA mixture. EDTA and AOAA impair SR activity by Mg²⁺ chelation and cofactor interaction, respectively. Prepared mixtures were stored at –20°C prior to CZE analysis.

The reactions for HPLC analysis were stopped by addition of 20 μ L of 1.875 M HClO₄, which causes mouse SR to precipitate. The precipitate was then removed by cen-

trifugation (15 000 \times g, 10 min, room temperature). Before starting the precolumn derivatization with FDAA the excess HClO₄ was eliminated by adding 20 μ L of 1.875 M KOH, thus producing the nonsoluble salt KClO₄ (for details see [27]). Five microliters of 20 mM glycine solution was added to the final mixture as an internal standard (IS).

2.4 HPLC analysis of SR activity

The HPLC method for SR activity analysis is described elsewhere [8]. Briefly, the formed serine racemate was derivatized using FDAA (Marfey's reagent). The formed diastereomers were subsequently resolved on an RP-HPLC column using the 2795 Alliance HPLC System (Waters, Milford, MA, USA).

2.5 Derivatization

The derivatizing agent solutions were prepared as follows: 60 mM OPA solution was prepared by dissolving solid OPA in a 50% v/v water–methanol or water–ACN mixture and 120 mM thiol solution was obtained by mixing the thiol with a 50 mM sodium tetraborate solution. Then, a 1:1 mixture of these two solutions was prepared to obtain a 30/60 mM OPA/thiol mixture which was used for pre- and in-capillary derivatization of amino acids.

The pre-capillary derivatization used in CZE method development was performed as follows: 90 μ L of serine sample was mixed with 90 μ L of 0.2 mM glycine (IS) solution in 25 mM sodium tetraborate and 20 μ L of 30/60 mM OPA/thiol mixture. The solution was vortexed, centrifuged, and injected immediately, thus allowing the reaction to proceed at ambient temperature for about 5 min.

The in-capillary derivatization procedure (see Section 3.1.5 for its optimization) employing reaction of amino acids with OPA and 2-ME (Fig. 1) involved mixing 50 μ L of serine sample with 50 μ L of 0.2 mM glycine (IS) solution in 25 mM sodium tetraborate. This mixture was then hydrodynamically injected into the separation capillary at 1 kPa for 5 s, followed by injection of the 30/60 mM OPA/2-ME mixture at 1 kPa for 10 s (Fig. 2). Next, the electric field was switched on. As a result, the analyte sample zone and the derivatization agent zone were mixed, due to countermovement of these zones created by differences in the electrophoretic mobilities of their components. This reaction proceeded at a separation voltage of 6 kV for 1 min, then, for the electrophoretic separation, the voltage was increased to 12 kV.

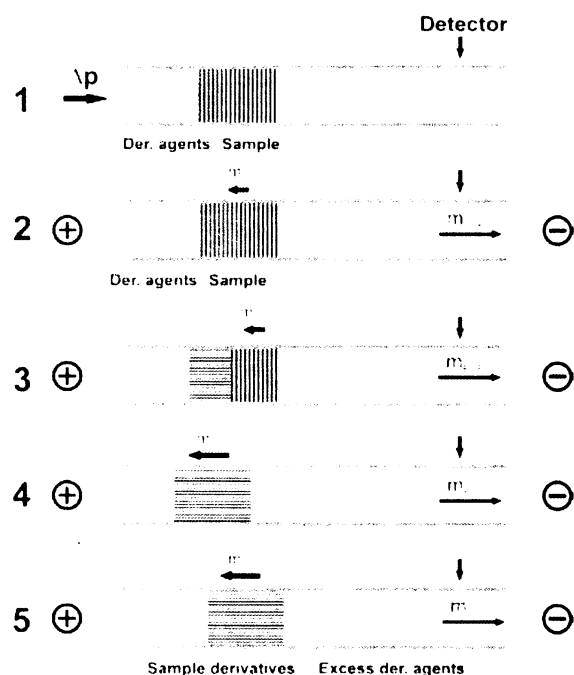


Figure 2. Scheme of the in-capillary serine derivatization reaction in an untreated fused-silica capillary. (1) Consecutive hydrodynamic injection of the sample and derivatization agents; (2) application of the electric field introducing the zone mixing and the derivatization process; (3, 4) continuation of the zone mixing due to differences in the effective electrophoretic mobilities of their components and proceeding of the in-capillary derivatization; (5) CE separation of the derivatized sample components. m_{EFF} , Electrophoretic mobility of the sample components (serine enantiomers and/or their derivatives), directed to anode; m_{EOF} , EOF mobility of the bulk solution inside the capillary, directed to cathode. Due to the fact that absolute value of m_{EOF} is greater than that of m_{EFF} , the resulting migration direction of all components is to the cathode, *i.e.*, to the direction of the detector.

3 Results and discussion

3.1 CZE separation and method development

3.1.1 Chiral separation system

Separation of serine enantiomers is an extremely challenging task. This fact is reflected in the rather low number of publications reporting chiral resolution of D- and L-serine by CE. However, remarkable resolution of serine enantiomers in the form of OPA/2-ME derivatives was achieved using 2-HP- γ -CD as chiral selector in a homemade CE device [26]. Additionally, this derivatization reaction is completed in a few minutes, in contrast to other widely used procedures for amino acid derivatiza-

tion such as labeling with FITC, which requires a reaction time of several hours [18, 19]. Nevertheless, the fairly attractive reaction rate of OPA/2-ME labeling of amino acids is complicated by the time-limited stability of the reaction product. We have observed serious deterioration of the serine derivative in *ca.* 30 min (data not shown). Therefore, precapillary derivatization of serine with OPA/2-ME would not be suitable for the analysis of large series of samples.

Thus, alternative systems of serine derivative-chiral selector suitable for resolution of the serine enantiomers with precapillary derivatization were examined. Thiols such as NAC and 3-MPA were reported to provide more stable reaction products with primary amines and OPA as compared to 2-ME [28]. Chiral separation of serine enantiomers labeled with OPA/NAC and OPA/3-MPA was investigated in a BGE composed of 50 mM sodium tetraborate (pH 9.7) using various CDs (α -CD, β -CD, 2-HP- β -CD, and 2-HP- γ -CD) as the chiral selectors. Resolution of D- and L-serine was achieved only for their OPA/NAC derivatives in the BGE containing γ -CD at a relatively high concentration of 60 mM (Fig. 3). However, this resolution was lower than that of serine enantiomers labeled with OPA/2-ME and separated in borate BGE with 2-HP- γ -CD [26]. In addition, the serine OPA/NAC derivatives were not sufficiently time-stable to enable development of a precapillary derivatization method for D-serine determination. Hence, further research in the field of serine OPA/

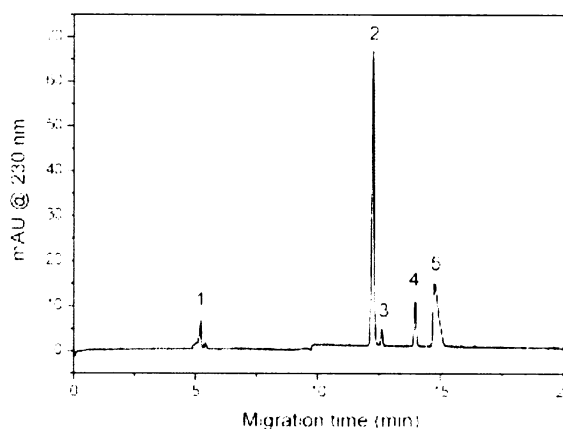


Figure 3. CZE chiral separation of serine enantiomers derivatized with OPA/NAC. Peak identification: (1) OPA; (2) L-serine (1 mM); (3) D-serine (0.05 mM); (4) glycine (IS; 0.1 mM); (5) NAC. Experimental conditions: precapillary derivatization (see text for details); BGE, 50 mM sodium tetraborate (pH 9.7) + 60 mM γ -CD; untreated fused-silica capillary, id/od 75/360 μm , total/effective length 400/298 mm; separation voltage, 12 kV; current, 80 μA ; direct UV-absorption detection at 230 nm; temperature, 20°C; injection, hydrodynamic, 1 kPa for 5 s.

NAC derivatives was abandoned and development of in-capillary derivatization of serine enantiomers with OPA/2-ME was begun.

3.1.2 BGE

Based on promising preliminary results obtained with the in-capillary derivatization mode, the BGE was optimized in order to achieve fair resolution of serine enantiomers and to be compatible with samples from enzymatic reactions. Since the serine-OPA/2-ME derivatives contain a carboxylic group (Fig. 1), they are predetermined to be analyzed as anions in an alkaline BGE. Chiral separation of the serine derivatives was investigated for sodium-borate, sodium-CHES, Ammediol-borate, lithium-borate, and Ammediol-HEPES BGEs. Ammediol and CHES were selected as alternative buffering substances; lithium and HEPES were chosen as BGE counterions with low mobility. Comparative experiments investigating the effect of the BGE constituents on resolution of D- and L-serine enantiomers were performed with BGEs of pH 9.2 or 9.7 and 100 mM ionic strength containing 40 mM 2-HP- γ -CD. Sodium-borate BGE provided the best resolution and the highest detection sensitivity among the studied BGEs (data not shown) and was used in subsequent experiments.

The effect of pH on chiral separation was studied in the range of pH 9.2–10.2. The effective mobility of the serine derivative was not influenced by pH of the BGE since the ionogenic carboxylic group was fully dissociated in the investigated pH region. But, an effective mobility shift of the remaining 2-ME was observed, as the reported pK_a of 2-ME was 9.88 [29]. However, the mobility shift was not dramatic, and the 2-ME zone did not migrate behind the zones of the amino acids. The 2-ME peak and the serine peaks remained distinct in the separation pattern (Fig. 4). Hence, borate buffer prepared as a 50 mM aqueous solution of sodium tetraborate, pH 9.7 (the median), was used as the BGE in further CZE experiments.

The ionic strength of the BGE is another fundamental parameter for optimization of CZE separations. An increase in ionic strength of the BGE induces a reduction of the EOF rate and electromigration dispersion of the analyte peaks. However, the ionic strength increase also causes an increase in BGE conductivity leading to peak broadening due to Joule heating. Therefore, the effect of ionic strength of borate BGE on chiral separation of D- and L-serine was investigated in the 20–50 mM concentration range of sodium tetraborate. The best symmetry and resolution of the analyte peak(s) were achieved in the BGE composed of 50 mM sodium tetraborate (Fig. 4). Fair peak symmetry and resolution were achieved with this

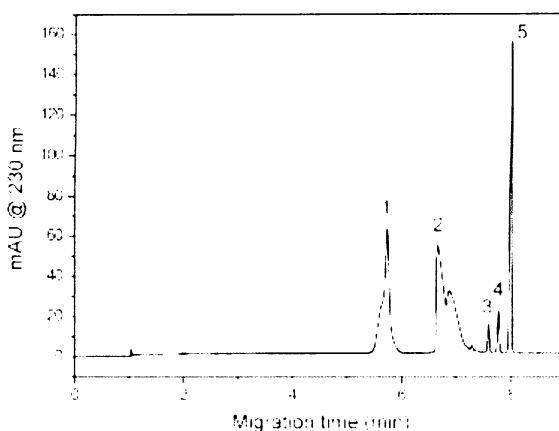


Figure 4. CZE chiral separation of serine enantiomers derivatized with OPA/2-ME. Peak identification: (1) OPA; (2) 2-ME residues; (3) glycine (IS; 0.1 mM); (4) D-serine (0.16 mM); (5) L-serine (1 mM). Experimental conditions: in-capillary derivatization (see text for details); BGE, 50 mM sodium tetraborate (pH 9.7) + 40 mM 2-HP- γ -CD; current, 100 μ A. Other conditions are the same as in Fig. 3.

BGE even at very high concentrations of L-serine (up to 50 mM). Therefore, all subsequent experiments were performed in 50 mM sodium tetraborate BGE.

3.1.3 Separation voltage and temperature

Increasing the separation voltage provides higher separation efficiency until the deteriorative effect of Joule heating becomes significant. Herein, a separation voltage of 12 kV (*i.e.*, 300 V/cm) and a capillary coolant temperature of 20°C were determined as optimal for 50 mM sodium tetraborate BGE and for the above-described capillary dimensions (Section 2.2). In summary, parameters such as BGE composition, pH, and ionic strength; separation voltage; and coolant temperature have to be balanced in order to achieve maximum separation resolution and efficiency. All of these parameters have been investigated/optimized for this particular system.

3.1.4 Detection

OPA/2-ME amino acid derivatives can be detected fluorimetrically using 340/455 nm excitation/emission wavelengths [30]. LIF detection was performed by excitation with the 325 nm line of a He-Cd laser [31] or with the 351 nm line of an argon ion laser [26], and emitted light was collected at 450 nm. Our instrumentation was, however, limited to a diode array UV-absorption detector. Absorbance of the derivatives can be selectively monitored at 330 nm or more sensitively at 230 nm (Fig. 5). The

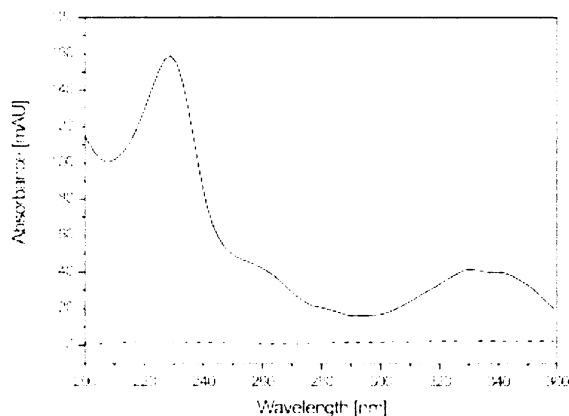


Figure 5. Absorption spectra of serine OPA/2-ME derivative (solid), 2-ME (dotted), and sodium-borate BGE (dashed). Curves are diode array traces of the peak maxima from a CZE experiment carried out with a sample containing 0.16 mM D-serine, 1 mM L-serine, and 0.1 mM glycine and a mixture of 30 mM OPA and 60 mM 2-ME as agents for in-capillary derivatization. For other experimental conditions see Fig. 4 and the text.

detection wavelength of 230 nm was selected with respect to the fact that in some cases, *e.g.*, at higher concentration and/or longer injection time of the derivatization agents, the zone of 2-ME is likely to interfere with the zone of Gly. The overlapping of the peaks of these two zones is minimal at the detection wavelength of 230 nm, at which the difference in absorption between 2-ME and amino acid derivatives is maximal.

3.1.5 In-capillary derivatization

The extent of the derivatization reaction performed inside the capillary is influenced by several factors, mainly by concentration of the derivatization agents, reaction time, solvent, and temperature. Optimal reaction conditions must also be set with respect to CZE separation. High temperature and concentration of the derivatization agents both have a positive effect on the reaction rate but, on the other hand, can deteriorate efficiency and resolution of the separation. Variability in solvent is limited to aqueous BGE or to organic solvents miscible with water such as methanol or ACN. Reaction time is the actual contact time of the analyte with the derivatizing agents, which depends on the length of the injected zone of the derivatizing agents and on the relative migration velocities of the analyte and derivatizing agent zones. In this system the reaction yield was maximized by mixing of analytes and agents zones due to differences in effective electrophoretic mobilities of their components (Fig. 2).

Herein, since the enzymatic reaction was carried out in 20 mM sodium-CHES buffer adjusted to pH 9, which is close to the electrophoretic conditions, the CZE samples were prepared simply by 1:1 volume dilution of the reaction mixture in the 25 mM sodium tetraborate solution, pH 9.7, containing 0.2 mM glycine as an IS. Thus, serine was at least partially negatively charged (pK_a values: 2.21 (–COOH), 9.15 (–NH₃⁺), 13.6 (–OH) [29]) in the injected sample zone, thereby ensuring a difference in the electrophoretic mobilities of serine and OPA/2-ME. The derivatization agent was prepared as a 1:1 v/v mixture of the OPA solution in 50% v/v organic solvent–water and 2-ME in 50 mM sodium tetraborate. The moderate electric conductivity of this mixture prevented a significant potential drop in the derivatization agent zone during the in-capillary derivatization at the initial stage of the CZE run. Two organic solvents, methanol and ACN, were tested for preparation of OPA solution. No significant difference in reaction rates was observed between the two. Despite its volatility, methanol was preferred because a white precipitate was formed in the ACN derivatization mixture in ca. 12 h.

Glycine was used as IS since it was not present in the investigated system and the migration time of its derivative was shorter (mobility was lower) than that of the serine enantiomer derivatives, *i.e.*, inclusion of glycine as IS did not prolong the analysis time. Another advantage of glycine is that it is an achiral amino acid, which prevents problems with chiral purity of the IS.

Optimization of the OPA/2-ME concentration was carried out simultaneously with optimization of the injection volumes of derivatization mixture and sample. A high reaction yield with sufficient resolution of the analytes was achieved at an OPA/2-ME concentration of 30/60 mM and hydrodynamic injection of the OPA/2-ME solution for 10 kPa·s (pressure 1 kPa applied for 10 s) and the analyte for 5 kPa·s (pressure 1 kPa applied for 5 s). Further amplification of the yield of the derivatization process was achieved by application of a 6 kV separation voltage for 1 min at the beginning of the analysis. The effect of the OPA/2-ME ratio to reaction yield was studied for 1:1 to 1:2 molar ratios. The results showed that the 1:2 OPA/2-ME ratio provides slightly higher peak area of the analytes with the same resolution as for 1:1 OPA/2-ME ratio.

3.2 Method validation

Baseline separation was achieved for D-serine, L-serine, and the glycine IS. Method selectivity was confirmed by analyzing the blank reaction mixture (without enzyme). It should be noted that traces of D-serine were detected in blank samples containing at least 10 mM L-serine of

declared minimal purity 99.5%. However, this small contamination was not a serious problem in our case since the amount of D-serine formed by the conversion of L-serine was significantly higher than the initial contamination of L-serine by D-serine. The problem can be solved by the use of a higher enantiomeric purity degree of L-serine. In addition, D-serine can be removed from L-serine enzymatically, e.g., by D-amino-acid-oxidase.

Detector response to D-serine was investigated in the 5–500 μM range. The calibration curve was constructed from a ratio of corrected area of D-serine to corrected area of the glycine IS. Corrected area is peak area divided by its migration time. Linear evaluation of calibration data provides the relation $y = -0.1976 + 17.03 \cdot x$ (x stands for D-serine concentration, and y for corrected area ratio), with correlation coefficient $r^2 = 0.9975$. Due to partial curvature of the calibration plot, reflected by the linear regression's non-negligible intercept of the calibration curve, the nonlinear model $y = a \cdot x^b$ seemed more appropriate for D-serine quantitation. By fitting the calibration data to this model, the following function was obtained: $y = 19.14 \cdot x^{1.137}$; $r^2 = 0.9988$.

The nonlinear course of the calibration curve is presumably caused by not quite steady conditions, in which the derivatization reaction is carried out in the separation capillary. In support of this hypothesis, it was observed that deviation of the calibration curve from a linear course is affected by length of the zone of the derivatizing agents and by lower separation voltage applied at the beginning of the electrophoretic run. Since the reaction rates depend on concentration of the reactants it implies that concentration ratio of D-serine and glycine is not constant in the calibrated range under unsteady conditions of in-capillary derivatization. Further aspects that may impair linearity and precision of the method are different reaction rates and different mobilities of serine and glycine in the mixed reaction zone, and fluctuations of the reaction temperature because the reaction is performed in the nonthermostated part of the capillary and the injected volume fluctuates.

The concentration LOD and the LOQ for D-serine were estimated by inspection of the level of D-serine that yielded appropriate S/N. The LOD, defined as an S/N of 3/1, was 3 μM and the LOQ, defined as an S/N of 10/1, was 5 μM . Precision of the method was evaluated with respect to repeatability of consecutive injections. A solution of 0.05 mM D-serine, 1 mM L-serine, and 0.1 mM glycine (IS) was injected six times in one day (intraday precision) and on four different days (interday precision). Corrected peak-area ratio based evaluation of the experiments showed that RSD of D-serine determination precision was 4.7% intraday ($n = 6$) and 5.0% interday ($n = 24$). This relatively high value of RSD is presumably caused by the

complicated process of the in-capillary derivatization. Short contact time and the somewhat puzzling process of mixing of the sample and derivatization agents zones during in-capillary derivatization are the sources of not quite stable conditions of the derivatization reaction that, probably, introduce some bias into the method. If necessary, the precision of the method can be improved by the prolongation of the in-capillary derivatization reaction. This can be achieved by a homemade apparatus combining a CE analyzer with a derivatization device [26, 32].

Accuracy of the method was evaluated for three concentration levels of D-serine (0.04, 0.08, and 0.2 mM) in the presence of 1.5 mM L-serine and 0.1 mM glycine (IS). The intraday accuracy interval ($n = 4$) was 98.2–105.4% for 0.04 mM; 100.8–104.3% for 0.08 mM, and 106.0–114.3% for 0.2 mM D-serine.

Solution stability is an important characteristic of the method especially when long-term measurements of a large series of samples are performed. It was found that 50 mM sodium tetraborate solution can be stored at 4°C for 2 months. No degradation of BGE composed of 50 mM sodium tetraborate (pH 9.7), and 40 mM 2-HP- γ -CD was observed after exposure of the solution at room temperature for 3 days. Stock aqueous solutions of the serine enantiomers and glycine were stable for at least 1 month if kept at -20°C . The racemization rate of L-serine in alkaline conditions of 50 mM sodium tetraborate solution was evaluated and no D-serine was detected in the 1 mM L-serine solution stored at room temperature for 2 weeks. Conversely, peak area of the amino acid derivatives is strongly affected by the age of the OPA/2-ME mixture. Therefore, a fresh solution of the derivatizing agents was prepared prior to analysis of a set of 12–15 samples.

3.3 Applications

The CZE method described here has been applied for a large-scale screening of SR activity; in particular, a series of 70 potential SR inhibitors has been successfully tested. The inhibitor candidates stemmed from a broader preliminary screening. Our results corresponded well to the rough screening data performed by an alternative, more laborious, and less precise method using two coupled enzyme reactions [33].

Furthermore, we have compared the suitability of the developed method to the well established but more time-consuming RP-HPLC method, which employs an FDAA precolumn derivatization [8]. The recently described novel SR inhibitor L-erythro-3-hydroxyaspartate [27] was used for these comparative measurements. The mode of inhibition was analyzed using the Lineweaver–Burk plot. The

final plots show the same pattern for both the HPLC and the CE approach (Fig. 6). The resulting values of the inhibition constant K_i are within the error margin: $(43 \pm 7) \mu\text{M}$ for HPLC and $(35 \pm 3) \mu\text{M}$ for CZE. The K_i determined by HPLC is an average of three independent experiments while the K_i determined by CZE was calculated from one reaction setup that was injected repeatedly. The calculations and linear regressions were performed using the GraFit program version 5 [34].

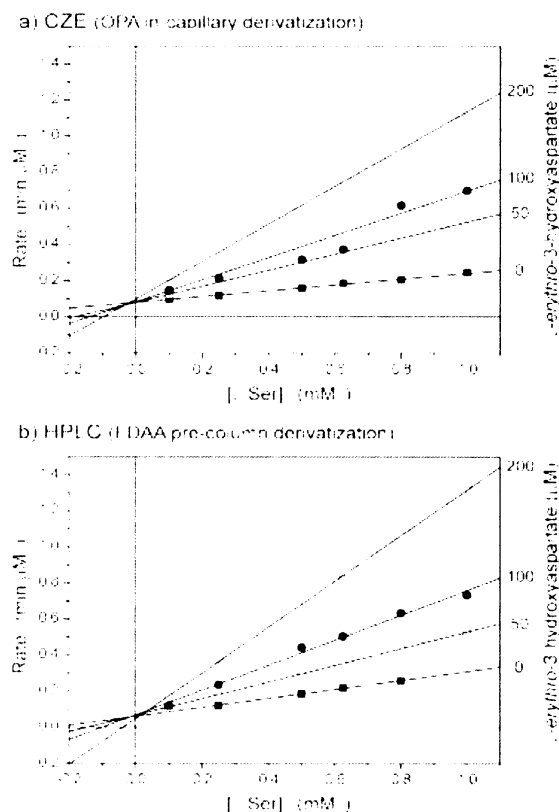


Figure 6. Comparison of the new CZE method to the commonly used HPLC method illustrated on representative Lineweaver–Burk plots for the SR inhibitor L-erythro-3-hydroxyaspartate. Enzymatic reactions were carried out independently at pH 9.0, 20 μM PLP, 1 mM Mg^{2+} , 1 mM ATP, 5 mM DTT, and 0.5 μM SR. Reactions for CZE analyses were stopped by AOAA/EDTA mixture as described above, whereas the reactions for HPLC analyses were treated with HClO_4 for protein precipitation (for further details see Section 2).

4 Concluding remarks

The CZE method described here enables determination of D-serine in less than 10 min. Its advantage is that the conditions of CZE separation are compatible with buffer-

ing substances, proteins, and other components that occur in samples arising from enzymatic studies. This method provides substantial simplification in sample pretreatment in comparison with the RP-HPLC method in which removal of proteins is a prerequisite [8]. The CZE method can be used in applications in which repeatability of 5% is acceptable, e.g., in SR inhibitor screening as well as in the subsequent kinetic characterization of the inhibition type and determination of the inhibition constant K_i .

This work was supported by the Grant Agency of the Czech Republic, grants no. 203/04/0098, 203/05/2539, and by the Research Project Z40550506 of the Academy of Sciences of the Czech Republic. Research support from the Czech Ministry of Education, Youth and Sports for J. J., K. S., and J. K. (grant no. LC512) is gratefully acknowledged. Hillary Hoffman is thanked for language corrections.

5 References

- [1] Schell, M. J., *Philos. Trans. R. Soc. London, Ser. B* 2004, 359, 943–964.
- [2] Fagg, G. E., Foster, A. C., Ganong, A. H., *Trends Pharmacol. Sci.* 1986, 7, 357–363.
- [3] Danysz, W., Parsons, A. C., *Pharmacol. Rev.* 1998, 50, 597–664.
- [4] Wolosker, H., Sheth, K. N., Takahashi, M., Mothet, J. P. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999, 96, 721–725.
- [5] Neidle, A., Dunlop, D. S., *Neurochem. Res.* 2002, 27, 1719–1724.
- [6] De Miranda, J., Santoro, A., Engelender, S., Wolosker, H., *Gene* 2000, 256, 183–188.
- [7] Wolosker, H., Blackshaw, S., Snyder, S. H., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999, 96, 13409–13414.
- [8] Striřšovský, K., Jirásková, J., Bařinka, C., Majer, P. *et al.*, *FEBS Lett.* 2003, 535, 44–48.
- [9] Panizzutti, R., De Miranda, J., Ribeiro, C. S., Engelender, S., Wolosker, H., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2001, 98, 5294–5299.
- [10] De Miranda, J., Panizzutti, R., Foltyn, V. N., Wolosker, H., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2002, 99, 14542–14547.
- [11] Hashimoto, A., Nishikawa, T., Hayashi, T., Fujii, N. *et al.*, *FEBS Lett.* 1992, 296, 33–36.
- [12] Nagata, Y., Yamamoto, K., Shimojo, T., *J. Chromatogr.* 1992, 575, 147–152.
- [13] Hashimoto, A., Nishikawa, T., Oka, T., Takahashi, K., Hayashi, T., *J. Chromatogr.* 1992, 582, 41–48.
- [14] Fukushima, T., Kato, M., Santa, T., Imai, K., *Biomed. Chromatogr.* 1995, 9, 10–17.
- [15] Wan, H., Blomberg, L. G., *J. Chromatogr. A* 2000, 875, 43–88.
- [16] Poinot, V., Bayle, C., Couderc, F., *Electrophoresis* 2003, 24, 4047–4062.
- [17] Liu, J. P., Dabrah, T. T., Matson, J. A., Klohr, S. E. *et al.*, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1997, 16, 207–214.
- [18] Lu, X. N., Chen, Y., *J. Chromatogr. A* 2002, 955, 133–140.
- [19] Simó, C., Barbas, C., Cifuentes, A., *J. Agric. Food Chem.* 2002, 50, 5288–5293.

- [20] Thorsen, G., Bergquist, J., *J. Chromatogr. B* 2000, 745, 389–397.
- [21] Thongkhao-On, K., Kottegoda, S., Pulido, J. S., Shippy, S. A., *Electrophoresis* 2004, 25, 2978–2984.
- [22] Zhao, S. L., Song, Y. R., Liu, Y. M., *Talanta* 2005, 67, 212–216.
- [23] Zhao, S. L., Yuan, H. Y., Xiao, D., *J. Chromatogr. B* 2005, 822, 334–338.
- [24] O'Brien, K. B., Miller, R. F., Bowser, M. T., *Neurosci. Lett.* 2005, 385, 58–63.
- [25] Quan, Z., Song, Y., Feng, Y. Z., LeBlanc, M. H., Liu, Y. M., *Anal. Chim. Acta* 2005, 528, 101–106.
- [26] O'Brien, K. B., Esguerra, M., Klug, C. T., Miller, R. F., Bowser, M. T., *Electrophoresis* 2003, 24, 1227–1235.
- [27] Stříšovský, K., Jirásková, J., Mikulová, A., Rulišek, L., Konvalinka, J., *Biochemistry* 2005, 44, 13091–13100.
- [28] Stroka, J., Capelletti, C., Papadopoulou-Bouraoui, A., Palaroni, L., Anklam, E., *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 2002, 25, 1821–1833.
- [29] Dean, J. A., *Lange's Handbook of Chemistry*, 15th Edn., McGraw-Hill, New York 1999.
- [30] Roth, M., *Anal. Chem.* 1971, 43, 880–882.
- [31] Copper, C. L., Collins, G. E., *Electrophoresis* 2004, 25, 897–902.
- [32] Ciriacks, C. M., Bowser, M. T., *Anal. Chem.* 2004, 76, 6582–6587.
- [33] Cook, S. P., Galve-Roperh, I., del Pozo, A. M., Rodriguez-Crespo, I., *J. Biol. Chem.* 2002, 277, 27782–27792.
- [34] Leatherbarrow, R. J., *GraFit Version 5*, Erithacus Software Ltd., Horley 2001.