

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Fyzikální chemie



**Mgr. Martin Ansorge**

Pokročilé techniky separace a analýzy dat v kapilární elektroforéze  
Advanced Separation Techniques and Data Processing in Capillary Electrophoresis

Disertační práce

Vedoucí práce: RNDr. Kateřina Ušelová, Ph.D.

Praha 2021

Předkládaná dizertační práce shrnuje výsledky vědeckého výzkumu, kterých bylo dosaženo během mého doktorského studia ve skupině *Elektromigračních a chromatografických metod* (ECHMET) na Přírodovědecké fakultě univerzity Karlovy, katedře Fyzikální a makromolekulární chemie.

Tato práce byla financována z fondů GA UK, grant č. 1266217 a GA ČR, granty č. 15-18424Y a 18-11776S.

### **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem tuto disertační práci vypracoval samostatně a že jsem všechny použité prameny řádně citoval. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědom toho, že případné využití výsledků získaných v této práci mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne .....

.....

podpis

## **Poděkování**

Byla to dlouhá cesta... a teď, když stojím na jejím konci, je načase se ohlédnout za těmi pěti bláznivými roky...

...a poděkovat.

Děkuji svému konzultantu Mgr. Pavlu Dubskému, Ph.D., který mi dovolil nastoupit na doktorát ve skupině ECHMET a nahlédnout tak pod pokličku toho, jak se dělá věda, a školitelce RNDr. Kateřině Ušelové, Ph.D., která se mne nakonec ujala. Bez nich by tato práce ani neměla příležitost vzniknout.

Děkuji všem těm úžasným lidem, které jsem na své cestě potkal a měl čest je pokládat za své blízké přátele - Magdě, Elišce, Vlád'ovi, Vaškovi a Petrovi, Milanovi, Michalovi a Denise, Marijaně, Luce. Bez Vás bych nebyl tam, kde jsem a především tím, kým jsem.

Děkuji i zbylému osazenstvu skupiny ECHMET, bylo mi ctí s Vámi všemi spolupracovat.

A v neposlední řadě děkuji své rodině za podporu při studiu, především pak své sestře; za vše, co se nedá slovy vyjádřit.

Děkuji!

Závěrem, protože zde a právě zde si to mohu dovolit: „Práce se mi líbila a byla přínosná pro můj budoucí rozvoj.“

**Klíčová slova**

Kapilární elektroforéza, kapilární zónová elektroforéza, afinitní kapilární elektroforéza, pf-ACE (metoda částečného plnění afinitní kapilární elektroforézy), izoelektrická fokusace, kapilární izoelektrická fokusace

**Keywords**

Capillary electrophoresis, capillary zone electrophoresis, affinity capillary electrophoresis, pf-ACE (partial-filling affinity capillary electrophoresis), isoelectric focusing, capillary isoelectric focusing

## Abstrakt

Metody kapilární elektroforézy jsou esenciálními postupy pro kvalitativní i kvantitativní analýzu široké řady látek. Nacházejí uplatnění v mnoha chemických oborech, počínaje farmakologickým průmyslem přes potravinářství až po vysoce specializovaná biotechnologická výzkumná pracoviště. Za svou více než stoletou historií jsou z teoretického hlediska podrobně prostudovány. Současný výzkum je tedy cílen především na vývoj nových, stále specializovanějších aplikací.

K nejvýznamnějším pokrokům v oblasti afinitní kapilární elektroforézy došlo v 90. letech 20. století, přičemž mnoho autorů používalo pro popis obdobných jevů rozdílnou terminologii. První část práce se zaměřuje na ucelení problematiky afinitní kapilární elektroforézy a sjednocení používaného názvosloví. Současně jsou zde diskutovány úkazy, ke kterým v průběhu měření může docházet, a jak mohou ovlivnit výsledek. V rámci studia ACE se zabýváme podmnnožinou této metody, konkrétně metodou afinitní kapilární elektroforézy s částečným plněním, která dosud nebyla dostatečně teoreticky prozkoumána. Představujeme zde její matematický popis pro využití ke stanovování komplexačních konstant a uvádíme i limitace dané metody.

Ve druhé části této práce se věnujeme vývoji a demonstraci využití počítačových programů pro optimalizaci experimentů a zjednodušení vyhodnocování experimentálních dat. Použitelnost programu pro optimalizaci separace optických enantiomerů (ACEResol) ukazujeme na vzorové separaci  $\beta$ -blokátoru pindololu. Současně uvedenou metodu validujeme pro účely kvantifikace jednotlivých enantiomerů. Druhý z prezentovaných počítačových programů (AnglerFish) slouží k jednokrokovému získávání termodynamických disociačních konstant a limitních elektroforetických pohyblivostí přímo z experimentálních dat a složení použitých základních elektrolytů. Jeho použitelnost demonstrujeme na stanovení těchto parametrů čtrnácti amfolytických látek, které mohou nalézt uplatnění jako pl markery při teoretickém studiu izoelektrické fokusace a následném experimentálním ověření.

## **Abstract**

Techniques of capillary electrophoresis are essential for both the quantitative and qualitative analysis of a large variety of compounds. They find application in many areas of chemistry, from pharmacological industry and food processing, up to highly specialized biotechnological laboratories. Over the last hundred years, their mathematical model has been described with precision. Thus, current research mainly aims for the development of more advanced and more specialized applications.

During the greatest boom of affinity capillary electrophoresis within the nineties, many authors would describe similar phenomena under different names. The first part of this work focuses on the consolidation and unification of the problematics and terminology of this method. It also discusses the phenomena which can affect electromigration and separation during electrophoretic processes. We will focus on a specific subset of affinity capillary electrophoresis, partial filling capillary electrophoresis, which, to our knowledge, has not been fully theoretically explored yet, and present a mathematical model allowing the determination of complexation constants and state some limitations of this approach.

The second part of this thesis focuses on the development and application of computer softwares, which are meant for the optimization of separations and simplification of the experimental data processing. The first program (ACEResol) specializes on the optimization of enantiomer separations and its applicability is demonstrated by the enantioseparation and subsequent validation of the enantiomer quantification of the  $\beta$ -blocker pindolol. The second software (AnglerFish) serves for one-step calculations of thermodynamic dissociation constants and limiting electrophoretic mobilities directly from the measured effective electrophoretic mobilities and the background electrolyte composition. The utility of this software was also demonstrated on the determination of thermodynamic dissociation constants and limiting electrophoretic mobilities of fourteen amphoteric compounds, which have the potential to serve as pI markers in the theoretical study and experimental verification of isoelectric focusing.

## Obsah

Seznam použitých zkratk a symbolů .....	8
Cíle práce .....	10
Základní aspekty kapilární elektroforézy.....	11
Teoretické aspekty afinitní kapilární elektroforézy (Publikace I) .....	13
Teorie metody částečného plnění afinitní kapilární elektroforézy (Publikace II) ..	16
Využití ACE pro rychlou enantioseparaci $\beta$ -blokátoru pindololu a validace metody (Publikace III) .....	19
AnglerFish – software pro jednoduchý a přesný výpočet limitních elektroforetických pohyblivostí a termodynamických disociačních konstant slabých elektrolytů (Publikace IV).....	21
Charakterizace pI markerů pro isoelektrickou fokusaci (Publikace V).....	25
Závěr .....	28
Literatura .....	30
Přílohy .....	<b>Chyba! Záložka není definována.</b>
A) Seznam publikací autora.....	<b>Chyba! Záložka není definována.</b>
B) Seznam konferenčních příspěvků .....	<b>Chyba! Záložka není definována.</b>
C) Komentované publikace .....	<b>Chyba! Záložka není definována.</b>

## Seznam použitých zkratk a symbolů

ACE	afinitní kapilární elektroforéza ( <i>affinity capillary electrophoresis</i> )
pf-ACE	metoda částečného plnění ( <i>partial-filling affinity capillary electrophoresis</i> )
BGE	základní elektrolyt ( <i>background electrolyte</i> )
CA	nosné amfolyty ( <i>carrier ampholytes</i> )
CE	kapilární elektroforéza ( <i>capillary electrophoresis</i> )
CZE	kapilární zónová elektroforéza ( <i>capillary zone electrophoresis</i> )
EOF	elektroosmotický tok ( <i>electroosmotic flow</i> )
GMP	guanosin monofosfát
IEF	izoelektrická fokusace ( <i>isoelectric focusing</i> )
cIEF	kapilární izoelektrická fokusace ( <i>capillary isoelectric focusing</i> )
OS- $\gamma$ -CD	okta(6- <i>O</i> -sulfo)- $\gamma$ -cyklodextrin
PSF	pseudostacionární fáze ( <i>pseudostationary phase</i> )



$a_i$	aktivita $i$ -té částice
$c_i$	molární koncentrace $i$ -té částice
$c_{i,rel}$	relativní molární koncentrace $i$ -té částice
$c_L$	molární koncentrace ligandu
$e$	elementární náboj, $e = 1,602\ 176\ 634 \cdot 10^{-19}\ C$
$E$	intenzita elektrického pole
$\gamma_i$	aktivitní koeficient $i$ -té částice
$\eta$	dynamický viskozitní koeficient
$K_A$	kyselá disociační konstanta
$K'_A$	zdánlivá kyselá disociační konstanta
$K'_{AL}$	zdánlivá komplexační konstanta mezi analytem a ligandem
$\Delta pK_A$	rozdíl záporných dekadických logaritmů dvou kyselých disociačních konstant
$K_+$	kyselá disociační konstanta jednomocně kladně nabitě formy amfolytu
$K_-$	kyselá disociační konstanta jednomocně záporně nabitě formy amfolytu
$I$	iontová síla
$pI$	izoelektrický bod
$\Delta pI$	rozdíl izoelektrických bodů
$\mu_A$	elektroforetická pohyblivost analytu
$\mu_{A,i}$	elektroforetická pohyblivost $i$ -té formy analytu
$\mu_{A,eff}$	efektivní elektroforetická pohyblivost analytu
$\mu_{A,lim}$	limitní elektroforetická pohyblivost analytu
$\mu_{AL}$	elektroforetická pohyblivost komplexu analyt-ligand
$r_i$	hydrodynamický poloměr $i$ -té částice
$v_i$	migrační rychlost $i$ -té částice
$x_i$	molární zlomek $i$ -té částice
$z_i$	nábojové číslo $i$ -té částice

## Cíle práce

- 1) Sjednocení používaného názvosloví a ucelení problematiky afinitní kapilární elektroforézy (publikace I).
- 2) Revize postupu stanovení interakčních konstant metodou částečného plnění (publikace II).
- 3) Vývoj a validace metody pro stanovení optických isomerů pomocí CZE (publikace III).
- 4) Vývoj nového software pro zjednodušení experimentů (publikace III) a vyhodnocení naměřených dat (publikace IV).
- 5) Charakterizace nízkomolekulárních amfolytických látek pro využití k simulacím isoelektrické fokusace (publikace V).

## Základní aspekty kapilární elektroforézy

Kapilární elektroforéza (CE) v sobě zahrnuje mnoho různých přístupů sloužících jak k separaci zpravidla nabitých analytů ve vzorku, tak i ke studiu chemických procesů a stanovení fyzikálně chemických parametrů látek. Společným jmenovatelem všech těchto postupů je elektromigrace – tedy pohyb nabitých částic v roztoku působením elektrického pole.

Elektroforetický proces probíhá typicky v tenkých křemenných kapilárách o průměru desítek mikrometrů naplněných roztokem elektrolytu. Tím bývá pufr o vhodně zvoleném pH nebo, v případě elektroforézy v nevodných prostředích, polární organická složka.

Jednou z hlavních podskupin CE je kapilární zónová elektroforéza (*capillary zone electrophoresis*, CZE), při které je celá kapilára naplněna uniformním roztokem základního elektrolytu (*background electrolyte*, BGE) a vzorek je dávkován jako krátká zóna na začátek kapiláry. Po vložení stejnosměrného elektrického napětí na oba konce kapiláry je vzorek separován na zóny příslušející jednotlivým analytům na základě jejich elektroforetických pohyblivostí.

Elektroforetická pohyblivost  $i$ -té částice  $\mu_i$  je fyzikálně chemickou veličinou, vyjadřující rychlost migrace dané částice  $v_i$  vztaženou na jednotkovou intenzitu elektrického pole  $E$ . Elektroforetická pohyblivost závisí kromě velikosti částice (charakterizované jejím hydrodynamickým poloměrem  $r_i$ ) i na jejím nábojovém čísle  $z_i$  a může být též výrazně ovlivněna viskozitou BGE, charakterizovanou dynamickým viskozitním koeficientem  $\eta$  (1)

$$\mu_i = \frac{v_i}{E} = \frac{z_i e}{6\pi\eta r_i}. \quad (1)$$

V nekonečně zředěných roztocích nabývá elektroforetická pohyblivost maximální hodnoty označované jako limitní elektroforetická pohyblivost,  $\mu_{A,\text{lim}}$  (pro dané rozpouštědlo a teplotu se jedná o tabelované hodnoty). V reálných roztocích, kde

se uplatňuje vliv mezimolekulových interakcí, závisí elektroforetická pohyblivost též na iontové síle.

Vyskytuje-li se látka A v roztoku ve více formách, mezi nimiž dochází k rychlému ustanovení chemické rovnováhy, pak je její efektivní elektroforetická pohyblivost  $\mu_{A,eff}$  dána váženým průměrem elektroforetických pohyblivostí jednotlivých jejích forem [1]

$$\mu_{A,eff} = \sum_i x_i \mu_{A,i}, \quad (2)$$

kde  $x_i$  je molární zlomek  $i$ -té formy látky A. Pro slabé elektrolyty, které podléhají disociaci, je pak jejich efektivní elektroforetická pohyblivost funkcí pH BGE. Závislosti  $\mu_{A,eff}$  iontů slabých elektrolytů na pH lze využít mimo jiné i při kvantitativní analýze vzorků. Současně je sledování změny efektivní elektroforetické pohyblivosti analytu v závislosti na pH základního elektrolytu i běžným postupem při stanovování kyselých disociačních konstant,  $K_A$ , a  $\mu_{A,lim}$  pomocí CE.

Ke zlepšení separace je dále možno využít alternaci elektroforetické pohyblivosti analytu reverzibilní interakcí s vhodným činidlem. Výsledná elektroforetická pohyblivost je pak závislá na míře interakce mezi analytem a zvoleným činidlem a na elektroforetické pohyblivosti komplexu analyt-ligand. Z hlediska mechanismu se jedná o obdobu z chromatografie známé interakce mezi analytem a stacionární fází s tím rozdílem, že roli stacionární fáze plní v CZE interakční činidlo rozpuštěné přímo v BGE (tzv. pseudostacionární fáze /PSF/ či pseudofáze). Mezi postupy CZE využívající interakce mezi analytem a PSF je řazena především afinitní kapilární elektroforéza (*affinity capillary electrophoresis*, ACE).

## **Teoretické aspekty afinitní kapilární elektroforézy (Publikace I)**

Afinitní kapilární elektroforéza (ACE) odkazuje na skupinu metod, jejichž společnou vlastností je reverzibilní interakce analytu s jednou nebo více složkami elektroforetického systému během elektroforetického procesu [2, 3]. Interakční složka (komplexační činidlo, ligand) plní roli PSF a zpravidla jí bývají cyklodextriny [4], crown-ethery [5], makrocyclická antibiotika [6], případně proteiny [7, 8]. Mezi ligandem a analytem dochází k tvorbě nekovalentních, tzv. „*host-guest*“ komplexů. Sílu interakce popisuje interakční (komplexační) konstanta. Metoda ACE se kromě separace využívá právě i pro studium těchto interakcí a stanovování interakčních konstant. Dále, je-li PSF tvořena chirálním ligandem, je možno ACE použít i k separaci optických izomerů, enantiomerů, analytu [9].

Metody ACE nacházejí uplatnění při studiu proteinů, v imunologii, ve výzkumu léčiv, v molekulární biologii a mikrobiologii, stejně jako v separačních vědách [2, 3, 10-12].

Právě vzhledem k využití metod ACE v širokém spektru vědeckých odvětví je používaná terminologie, případně i konkrétní postupy (korekce na viskozitu či iontovou sílu) autory často „upravena“ pro účely konkrétní aplikace. Z důvodu ucelení problematiky a sjednocení používané terminologie jsme tematiku afinitní kapilární elektroforézy zpracovali v přehledovém článku [13].

V první části článku se zabýváme teoretickým, fyzikálně chemickým popisem komplexačních procesů probíhajících v ACE mezi analytem a ligandem a jejich vlivem na efektivní elektroforetickou pohyblivost analytu. Přestože by se mohlo zdát, že efektivní elektroforetická pohyblivost analytu je v ACE všeobecně dobře definována, množství rozdílných typů rovnovah (komplexačních a disociačních), které se mohou v separačních systémech ACE projevit, se odráží ve velké škále různých vyjádření pro výpočet této veličiny, což znesnadňuje orientaci v dané problematice.

Pozornost zaměříme zejména na interakce v poměru 1:1, který je nejběžněji předpokládaným a nejčastěji používaným interakčním poměrem. V publikaci

shrnujeme, že pro komplexaci v poměru 1:1 je většina publikovaných vztahů pro  $\mu_{A,eff}$  úpravou rovnice (3), připisované Wrenovi a Rowemu [14]

$$\mu_{A,eff} = \frac{\mu_A + \mu_{AL}K'_{AL}c_L}{1 + K'_{AL}c_L}. \quad (3)$$

Symbole  $\mu_A$  a  $\mu_{AL}$  značí elektroforetickou pohyblivost analytu a komplexu,  $c_L$  molární koncentraci ligandu a  $K'_{AL}$  tzv. zdánlivou komplexační konstantu závislou na iontové síle BGE.

Současně zde pojednáváme i o problematice interakce jednoho analytu s více ligandy [15]. Uvažujeme také systémy, ve kterých kromě komplexačních rovnováh vystupují i rovnováhy acidobazické, čímž se efektivní elektroforetická pohyblivost stává navíc funkcí pH a iontové síly BGE. Rovněž zde komentujeme jevy, ke kterým dochází, jsou-li porušeny základní předpoklady, tedy interakční stechiometrie 1:1, rychlost komplexace vzhledem k separační rychlosti, úbytek volného ligandu v důsledku komplexace a interakce ligandu se složkami BGE. Ukazujeme, které jevy mohou nastat při porušení jednotlivých základních předpokladů: v případě pomalé interakční rychlosti, respektive pomalého ustanovení komplexační rovnováhy, může dojít až k rozštěpení píku analytu, nachází-li se ligand v BGE v nízké koncentraci, může dojít k nepředvídané disperzi migrující zóny a, v případě komplexace ligandu se složkami BGE, může docházet ke změně pH BGE. Z tohoto důvodu doporučujeme pH BGE vždy po přidání ligandu přeměřit. Dojde-li ke změně pH i v případě přidavku neutrálního ligandu, je to indikátorem vedlejších interakcí mezi ligandem a složkou/složkami BGE.

Jedním ze zásadních přínosů publikace je přehledné zpracování jevů, které mají vliv na sílu interakce a na efektivní elektroforetickou pohyblivost analytu. Kromě pH základního elektrolytu, které se projevuje zejména při disociaci analytu (slabého elektrolytu), zde zmiňujeme i posunutí  $K_A$  analytu způsobené komplexací, tedy že částice vázaná v nekovalentním komplexu má jinou hodnotu  $K_A$  než částice volná.

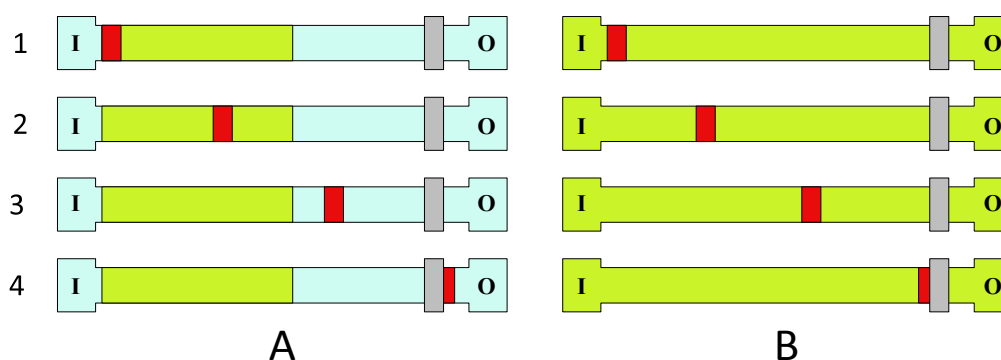
Ve druhé části publikace pojednáváme o vlivu prostředí, viskozity a iontové síly BGE na elektroforetickou efektivní pohyblivost analytu. Kriticky zde hodnotíme

použití zejména následujících tří způsobů korekce elektroforetické pohyblivosti na viskozitu prostředí, a to 1) tzv. Waldenovo pravidlo [16,17], 2) použití neinteragujícího analytu jako mobilitního standardu [18] (diskutujeme zde i o možnosti použití elektroosmotického toku /*electroosmotic flow*, EOF/ coby mobilitního standardu; na základě protichůdných názorů uváděných v literatuře [19-21] však tento postup nedoporučujeme) a 3) alternativní způsob použití Waldenova pravidla vycházející z předpokladu, že částice způsobující zvýšení viskozity separačního prostředí budou ovlivňovat elektroforetickou pohyblivost jen podobně velké částice [22]. Konstatujeme, že nalezení univerzálního způsobu korekce elektroforetické efektivní pohyblivosti na vliv viskozity je problematikou vyžadující další výzkum.

Iontová síla v ACE ovlivňuje komplexační a acidobazické rovnováhy a tedy i pohyb iontu v BGE. Ukazujeme, že hodnota komplexační konstanty není ovlivněna iontovou silou, interaguje-li neutrální analyt s jakýmkoliv selektorem nebo jejich směsí. V případě interakce nabitého analytu je zapotřebí hodnoty zdánlivých komplexačních konstant přepočítat na hodnoty termodynamické pomocí vhodné aproximace. V této souvislosti uvádíme, že tento postup lze aplikovat pouze v případě použití směsi nabitých ligandů o známém složení. V případě korekce vlivu iontové síly na efektivní elektroforetickou pohyblivost analytu doporučujeme použít Onsagerovu-Fuossovu teorii, ačkoliv i další přístupy jsou možné [23]. Bez ohledu na použitou metodu korekce navrhuje používat BGE o nízké a především konstantní iontové síle, je-li to možné. Na závěr podotýkáme, že v případě používání ligandů s vysokým nábojovým číslem (např.: heptasulfatované cyklodextriny [24-27]) je spolehlivost korekce elektroforetické pohyblivosti na iontovou sílu přinejmenším sporná.

## Teorie metody částečného plnění afinitní kapilární elektroforézy (Publikace II)

Ze stejných principů jako ACE vychází i metoda částečného plnění (*partial filling affinity capillary electrophoresis*, pf-ACE) [7]. Jediný rozdíl, kterým se tyto dva přístupy odlišují, spočívá v distribuci ligandu v kapiláře. Zatímco v klasické ACE je ligand v BGE přítomen v celém objemu kapiláry, v pf-ACE je směs naplněna pouze část kapiláry, zatímco ve zbytku se nachází čistý BGE. Rozdíl v instrumentálním uspořádání je ukázán na obr. 1.



**Obrázek 1: Srovnání experimentálního uspořádání pf-ACE (A) a ACE (B);** 1) počáteční stav po nadávkování analytu (červená), 2 + 3B) migrace analytu roztokem základního elektrolytu s přidavkem ligandu (zelená) směrem k detektoru (šedá), 3A) migrace analytu roztokem základního elektrolytu bez ligandu (modrá), 4) detekce analytu. Pro demonstraci byl zvolen neutrální ligand a vliv elektroosmotického toku není uvažován. Písmena I a O označují vstupní (inlet) a výstupní (outlet) rezervoár se zásobním roztokem BGE.

Výhodou uspořádání pf-ACE je, že při vhodně zvolených podmínkách neprochází ligand detektorem a nemůže tak svou přítomností zkreslit detekci. Toho lze využít v případě kombinace CE s hmotnostní spektrometrickou detekcí (CE-MS) [28-30]. Případně lze touto metodou eliminovat šum způsobovaný UV-absorbujícím ligandem. Další výhodou pak může být i nižší spotřeba ligandu [31, 32]. Tato technika nachází uplatnění převážně při separaci léčiv a jejich enantiomerů [33-36].

V publikaci II jsme se zaměřili na teorii pf-ACE pro potřeby stanovení interakčních konstant mezi analytem a ligandem. Poprvé byla pro tyto účely



představena Heintzem a kol. [37]. Autoři tuto techniku využili kvůli její nízké spotřebě ligandu. V jimi publikovaném experimentálním uspořádání bylo čelo zóny ligandu dopraveno elektroosmotickým tokem k detektoru ještě před samotnou detekcí analytu. To jim umožnilo využít ke stanovení komplexační konstanty vztahy používané v klasické ACE.

Obecný postup pro stanovení komplexační konstanty v ACE vychází ze vztahu  $\mu_{A,eff}$  a  $K'_{AL}$  (3). V případě pf-ACE, kdy je roztokem ligandu naplněna jen část separačního prostoru, je tento přístup v porovnání s klasickou ACE komplikovanější. Touto problematikou se jako první zabývali Amini a Westerlund [38, 39]. Jejich přístup vychází z předpokladu, že pozorovaná elektroforetická pohyblivost analytu je dána váženým průměrem jeho elektroforetických pohyblivostí v zóně ligandu ( $\mu_{A,eff}$ ) a mimo ni ( $\mu_A$ ) a případnou elektroforetickou pohyblivostí EOF. Současně předpokládají, že analyt interaguje s neutrálním ligandem, a tudíž vlastní elektroforetická pohyblivost ligandu je nulová. Pozorovaná elektroforetická pohyblivost se tak stává funkcí délky zóny ligandu.

Cílem naší publikace [40] bylo především ukázat, že předpoklad pozorované elektroforetické pohyblivosti coby vážený průměr elektroforetických pohyblivostí uvnitř a vně zóny ligandu není obecně platný. V literatuře uváděný přístup jsme podrobili rozboru za pomoci počítačových simulací ve výpočetním softwaru Simul 5 Complex [41, 42]. Kritérium pro nás představovala odchylka, s jakou byla ze simulovaných dat zpětně dopočítána hodnota komplexační konstanty v porovnání s hodnotou vkládanou do simulací jako vstupní parametr. Pro počítačové simulace byly použity systémy s různými stupni komplexace. Získané výsledky ukázaly, že tento přístup je z větší části pouze aproximativní a spolehlivě funguje jen v případě slabě interagujících systémů.

Z tohoto důvodu jsme navrhli nový způsob vyhodnocení. Námí prezentovaný způsob současně počítá s vlivem EOF a možností použít ligand s vlastní nenulovou mobilitou. Správnost odvození jsme ověřili vyhodnocením stejných dat, která jsme předtím využili ke studiu v literatuře uváděného přístupu.

V publikaci dále uvádíme a porovnááme několik způsobů výpočtu efektivní elektroforetické pohyblivosti pomocí námi navrženého vztahu (přímý výpočet, případně jeho linearizované formy) a následného stanovení komplexační konstanty. Současně uvádíme požadavky a limitace jednotlivých postupů.

Tato publikace je, dle našich informací, vůbec první, ve které byla metoda pf-ACE studována pomocí počítačových simulací.

## Využití ACE pro rychlou enantioseparaci $\beta$ -blokátoru pindololu a validace metody (Publikace III)

Metodu ACE lze kromě stanovování fyzikálně-chemických parametrů analytů využít i k jejich separacím. Především se však ACE využívá k chirálním separacím (enantioseparacím). Enantioseparace hrají stěžejní roli nejen ve farmaceutickém průmyslu, ale i v zemědělství a potravinářství. Metody analýzy chirálních látek mají široké využití při kontrole kvality a čistoty produktů, uplatňují se však i při studiu jejich degradace a při monitoringu jejich přítomnosti v životním prostředí. Enantioselektivní separace umožňují studium farmakokinetiky a farmakodynamiky každého z enantiomerů, případně diastereomerů, zvláště.

Jednou z významných skupin léčiv jsou  $\beta$ -blokátory, látky blokující  $\beta$ -adrenergní receptory. Pindolol ( $pK_A = 9,49$  [43]) jako jeden ze skupiny  $\beta$ -blokátorů se předepisuje zejména při léčbě kardiovaskulárních onemocnění [44 - 48]. Jako většina biologicky aktivních léčiv, i pindolol je opticky aktivní látka s jedním chirálním centrem a dvěma enantiomery. K léčbě se předepisuje jako racemát, ale uvádí se, že S(-) forma má asi 200x vyšší biologickou aktivitu než R(+) forma [44]. Navíc dle Evropské agentury pro léčivé přípravky (EMA) by léky měly obsahovat pouze terapeuticky aktivní látku. Není-li to možné, druhý z enantiomerů by měl být uveden jako nečistota [49].

V publikaci III jsme se zaměřili na současnou separaci a kvantifikaci optických izomerů pindololu pomocí sulfatovaného okta(6-*O*-sulfo)- $\gamma$ -cyklodextrinu (OS- $\gamma$ -CD) [25, 50]. Přestože OS- $\gamma$ -CD je přítomen pouze jako jeden izomer, jeho separační schopnost umožňuje rychlou a účinnou enantioseparaci pindololu.

V rámci publikace jsme stanovili interakční konstanty pro oba enantiomery v neutrálním (pH = 7,12, nabitá forma pindololu) a v zásaditém (pH=12,2, neutrální forma pindololu) prostředí. Získané hodnoty interakčních konstant nám umožnily optimalizovat metodu pro minimální čas separace a maximální rozlišení pomocí jednoduchého, námi navrženého výpočetního software ACEResol. Při optimálních podmínkách, tj. BGE MOPS/Na 80/40 mM, pH = 7,12 s přídatkem 6mM OS- $\gamma$ -CD,

bylo separace k základní linii dosaženo za 6 minut. Za těchto podmínek jsme navržený postup separace validovali dle směrnic Mezinárodní rady pro harmonizaci technických požadavků na léčivé přípravky ICH [51], a to v rozmezí nízkých koncentrací (5-55  $\mu\text{g/mL}$ ) a vysokých koncentrací (50-300  $\mu\text{g/mL}$ ). Metoda poskytuje v obou koncentračních rozmezích přijatelnou správnost a preciznost, limity detekce (1,2  $\mu\text{g/mL}$ ) a kvantifikace jsou srovnatelné s výsledky analýzy pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) při použití stejného typu detektoru [52]. Použitelnost validované metody jsme ověřili kvantitativní enantiomerní analýzou pindololu ve dvou druzích léčiva: Visken® Sandoz pro intravenózní použití s deklarovaným obsahem účinné látky 200  $\mu\text{g/mL}$  a ve Visken® Teofarma tabletách pro orální užití s deklarovaným obsahem účinné látky 5 mg.

## AnglerFish – software pro jednoduchý a přesný výpočet limitních elektroforetických pohyblivostí a termodynamických disociačních konstant slabých elektrolytů (Publikace IV)

Jednou z nesporných výhod CE je její takřka dokonale popsáný matematický model. To umožňuje vývoj software, s jehož pomocí lze zkoumat jevy, k nimž dochází v průběhu elektroforetických procesů, aniž by byl proveden vlastní experiment. Současně lze simulační software využít i k optimalizaci elektroforetických separací. Nezbytnou podmínkou je ale existence spolehlivých vstupních parametrů. V naší výzkumné skupině postupně vznikly dva programy k předpovědi elektroforetického chování – PeakMaster [53] a Simul [54]. Tyto programy využívají jako vstupní parametry limitní iontové pohyblivosti a termodynamické disociační konstanty, jejichž hodnoty jsou pro omezený počet nejběžněji používaných látek přejaty z prací Hirokawy a kol. [55-63]. Pro simulace specifických systémů je potřeba manuálně zadat konkrétní experimentálně stanovené hodnoty limitních iontových pohyblivostí a termodynamických konstant, které společně s pH BGE určují efektivní elektroforetickou pohyblivost iontu slabého elektrolytu.

Efektivní elektroforetická pohyblivost i disociační konstanta jsou v reálných roztocích zkresleny vlivem prostředí, v němž se analyt vyskytuje. V důsledku coulombických interakcí se kolem iontu vytváří shluk opačně nabitých částic, tzv. iontová atmosféra, která stíní náboj iontu. Síla tohoto stínění vzrůstá s rostoucí koncentrací iontů v roztoku.

Popis chování iontové atmosféry představili Debye a Hückel ve své teorii aktivitního koeficientu,  $\gamma_i$  [64, 65]. Ta vyjadřuje aktivitu  $i$ -té částice,  $a_i$ , jako relativní molární koncentraci  $i$ -té částice korigovanou na vliv iontové síly  $I$  roztoku:

$$a_i = c_{i,rel}\gamma_i \quad (4)$$

$$\log \gamma_i = -Az_i^2\sqrt{I} \quad (5)$$

V rovnici (5) konstanta  $A$  zahrnuje termodynamickou teplotu a dielektrickou konstantu. Iontová síla je definována jako polovina sumy součinů molárních koncentrací jednotlivých iontových forem  $c_i$  a kvadrátu jejich nábojových čísel.

$$I = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^n c_i z_i^2 \quad (6)$$

Z Debyeovy-Hückelovy teorie také vyplývá, že pravou termodynamickou disociační konstantu  $K_A$  je nezbytné vyjadřovat nikoliv pomocí koncentrací, ale za pomoci aktivit jednotlivých složek. Právě aktivita  $i$ -té formy analytu je tak klíčovou veličinou při stanovení termodynamické disociační konstanty.

Proces korekce efektivní elektroforetické pohyblivosti na vliv iontové síly je v porovnání s korekcí  $K_A$  složitější. Zatímco  $\gamma_i$  vystihuje chování iontové atmosféry statické částice, v případě pohybující se částice je potřeba vzít v úvahu i dynamiku formování iontové atmosféry, která se pohybuje společně s částicí. Při transportním ději se na částici migrující v iontové atmosféře projevují dva jevy: i) elektroforetický efekt, při kterém je migrující ion brzděn opačně migrujícími částicemi tvořícími iontovou atmosféru, a ii) relaxační efekt, při kterém dochází k desymetrizaci iontové atmosféry a dalšímu zpomalení migrujícího ionu. Oba tyto jevy a jejich vliv na migrující částici popisuje Onsagerova-Fuossova teorie elektromigrace [66]. Nejednodušená teorie uvažuje i vliv tzv. „směšného efektu“, který je zvláště patrný v extrémních oblastech pH. V těchto oblastech se vyskytují ve vysokých koncentracích především rychle se pohybující ionty  $H_3O^+$ , respektive  $OH^-$ , které svou elektromigrací strhávají ostatní koionty, a tím zvyšují jejich elektroforetickou pohyblivost. Při korekcích je tedy potřeba brát v úvahu všechny tyto efekty.

Stanovování  $pK_A$  a  $\mu_A$  pomocí CZE se běžně provádí sledováním závislosti  $\mu_{A,eff}$  na pH základního elektrolytu a následným proložením naměřených hodnot vhodnou nelineární regresní funkcí [67-70]. Získané parametry jsou dále korigovány na nulovou iontovou sílu použitím Debyeovy-Hückelovy teorie a Onsagerovy rovnice [71] v případě elektroforetických pohyblivostí. Takovýto postup vyžaduje sadu měření v pufrch o konstantní iontové síle, které je prakticky nemožné dosáhnout při velmi nízkých a vysokých pH. Zároveň je ve své podstatě

i nesprávný, jelikož naměřené hodnoty  $\mu_{A,eff}$  jsou současně závislé jednak na limitních elektroforetických pohyblivostech, jednak na  $pK_A$  konstantách. Nepřesnost tohoto postupu se projeví zejména v případě, kdy dvě  $pK_A$  analytu leží blízko sebe a  $\mu_{A,eff}$  je funkcí obou  $pK_A$  zároveň, což znesnadňuje vyhodnocení.

Z uvedeného vyplývá, že celkový design experimentu pro získání termodynamických hodnot  $K_A$  a  $\mu_{A,lim}$  je náročná záležitost vyžadující přesné plánování, při které se lze snadno dopustit řady nepřesností. V publikaci IV prezentujeme počítačový program AnglerFish, který tento proces do značné míry zjednodušuje a vyhodnocení naměřených dat automatizuje.

Program AnglerFish řeší na základě zadaných parametrů (složení použitých pufrů, naměřené  $\mu_{A,eff}$  v každém ze zadaných pufrů, odhady  $pK_A$  a  $\mu_{A,lim}$ ) tzv. Tiseliovu rovnici (3) pro každý ze zadaných pufrů současně a pomocí nelineární regrese se snaží nalézt taková  $\mu_{A,lim}$  a  $K_A$ , aby závislost  $\mu_{A,eff}$  na pH co nejlépe odpovídala experimentálním hodnotám. Jelikož se navíc jako vstupní parametry zadávají přesná složení pufrů, provádí program současně v každém iteračním kroku i korekci na iontovou sílu dle Debyeovy-Hückelovy a Onsagerovy-Fuossovy teorie.

Použitelnost námi představovaného software jsme ověřili na vzorovém příkladu stanovení termodynamických disociačních konstant a limitních elektroforetických pohyblivostí jednotlivých iontových forem guanosin monofosfátu (GMP) a jejich srovnání s hodnotami získanými „klasickou“ procedurou [67]. V klasickém postupu jsme změřili  $\mu_{A,eff}$  v 33 BGE o konstantní 10mM iontové síle v rozmezí  $2 < \text{pH} < 12$ . Získané hodnoty jsme v programu OriginPro proložili Hendersonovou-Hasselbalchovou funkcí (7),

$$\mu_{A,eff} = \frac{\mu_A}{1 + 10^{pK'_A - \text{pH}}} \quad (7)$$

a získané parametry,  $K'_A$  a  $\mu_A$  dále korigovali. Hodnoty  $K'_A$  jsme přepočítali na  $K_A$  pomocí Debyeovy-Hückelovy funkce. Limitní  $\mu_A$  jsme stanovili ručně pomocí postupné úpravy parametrů analytu zadaných do programu PeakMaster následující procedurou: Jako BGE jsme zvolili 10,000mM roztok hydroxidu sodného, ve kterém se předpokládá úplná disociace jakékoliv slabé kyseliny. Poté jsme krok po kroku

poskládali GMP jako analyt. Nejprve jako hypotetickou univalentní formu s hodnotou  $pK_A$  získanou z nelineární regrese; hodnota  $\mu_{A,\text{lim}}$  jednomocně nabitě formy byla upravována tak dlouho, dokud hodnota  $\mu_{A,\text{eff}}$  neodpovídala hodnotě získané z nelineární regrese. Následně jsme stejný postup provedli i pro hypoteticky bivalentní a trivalentní formu GMP.

Postup výpočtu v programu AnglerFish je po zadání vstupních parametrů zcela automatizovaný. Výsledky získané oběma přístupy byly v rámci chyby stanovení shodné.

Námi prezentovaný program AnglerFish skýtá oproti klasickému přístupu několik výhod. První z nich je možnost stanovení termodynamických hodnot  $K_A$  a  $\mu_{A,\text{lim}}$  v jednom kroku bez potřeby mezivýpočtů. Tím je brána do úvahy i jejich možná vzájemná závislost, což se v konečném důsledku projeví v nižších hodnotách směrodatných odchylek, respektive stanovené hodnoty jsou přesnější.

Druhá z nich vychází ze zabudování nezjednodušené Onsagerovy-Fuossovy teorie přímo do výpočetního algoritmu. Tím je brán v potaz i vliv „směšného efektu“, který je v klasickém postupu mnohdy opomíjen.

Poslední výhoda vychází z plánování experimentů. Zatímco v klasickém postupu je potřeba pracovat s BGE o konstantní iontové síle, pro program AnglerFish je důležitým vstupním parametrem přesné složení BGE, nikoli jen jeho iontová síla. Toho lze s výhodou využít při měření v kyselějších či zásaditějších oblastech pH, ve kterých je problematické připravit BGE o nízké iontové síle.



## Charakterizace pI markerů pro isoelektrickou fokusaci (Publikace V)

Námi prezentovaný software AnglerFish jsme využili při určování termodynamických  $pK_A$  a limitních iontových pohyblivostí nízkomolekulárních látek, které mohou sloužit jako pI markery v izoelektrické fokusaci.

Metoda izoelektrické fokusace (IEF) je jednou z podskupin kapilární elektroforézy a slouží zejména k separaci amfolytických látek. Významné uplatnění nachází například při studiu proteinů, kde se využívá jak při jejich prosté separaci, tak při sledování čistoty v průběhu purifikačního procesu. Mechanismus separace v IEF je založen na principu distribuce analytů ve stabilním pH gradientu na základě hodnot jejich isoelektrických bodů (pI).

Separačním médiem v IEF je směs čítající až několik stovek speciálně navržených amfolytů, tzv. nosných amfolytů (*carrier ampholytes*, CA) [72, 73], které po vložení stejnosměrného napětí na elektrody a následné fokusaci vytváří stabilní, monotónně rostoucí pH gradient. Amfolytické analyty jsou před vlastní separací přidávány do roztoku nosných amfolytů a podílí se tak na tvorbě pH gradientu. K fokusaci analytů dochází v místě, kde pH odpovídá jejich pI. Proto je pro určení pI analytů klíčovým údajem přesně stanovené pH v místě, kde je analyt fokusován.

V případě kapilární isoelektrické fokusace (cIEF) je stanovení pH v místě fokusace zajištěno nepřímo. Do směsi vzorku a CA se přidávají standardy o předem definovaném pI, tzv. pI markery. Současně se předpokládá, že distribuce pH je v úseku mezi dvěma takovými standardy lineární.

Pro účely značkování pH bylo navrženo a je používáno mnoho různých, strukturně odlišných skupin látek: oligopeptidy [74, 75], synteticky připravené substituované nitrofenoly [76, 77] a monoalkylpyperidinoamidy fluoresceinu [78], azobarviva [79] či amfolytické trisulfonamidopyreny [80].

U mnoha z těchto markerů jsou známy jen jejich hodnoty pI, které jsou stanoveny buď experimentálně, nebo dopočítány jako aritmetický průměr z naměřených hodnot jejich disociačních konstant (8)

$$pI = \frac{pK_+ + pK_-}{2}. \quad (8)$$

Symboly  $K_+$  a  $K_-$  značí kyselou disociační konstantu jednomocně kladně a jednomocně záporně nabitě formy amfolytu. Přesné stanovení jejich limitních elektroforetických pohyblivostí a případně dalších  $pK_A$  však chybí. To je do značné míry limituje k využití při teoretickém studiu cIEF procesů pomocí počítačových simulací.

Z tohoto důvodu jsme se v publikaci V zaměřili na výběr vhodných nízkomolekulárních amfolytických látek, které mohou sloužit jako alternativa k běžně používaným pI markerům, a na jejich charakterizaci pro potřeby použití v počítačových simulacích cIEF coby referenční metody ověřování správnosti experimentů.

Předvýběr možných kandidátů jsme provedli na základě našich předchozích zkušeností se strukturálně podobnými látkami. Volili jsme takové látky, jejichž teoretické pI se nachází v rozmezí  $3 < pH < 10$ , které mají dobře definovanou strukturu s ne více jak dvěma kyselými a dvěma zásaditými funkčními skupinami a jsou komerčně dostupné (levné, případně snadno syntetizovatelné) v přijatelné čistotě. Zároveň jsme cílili na analyty, které splňují kritéria pro dobrý pI marker stanovená Rilbem [81, 82] a Šťastnou [79], a to zejména na jejich dobrou zaostřovací schopnost (charakterizována vysokou hodnotou  $-dz/dpH$  v pI; dobrý pI marker by měl mít hodnotu  $-dz/dpH > 0,66$ ) a dobrou detekovatelnost.

Na základě výše uvedených podmínek jsme vybrali 14 amfolytických látek, u nichž jsme proměřili závislost  $\mu_{A,eff}$  na pH v pufrch o iontové síle 10 mM v oblasti  $2 < pH < 12$ . Na základě znalosti jejich struktury (počtu disociujících funkčních skupin) jsme z naměřených dat pomocí software AnglerFish (více viz komentář k publikaci IV) [83] stanovili jejich  $pK_A$ ,  $\mu_{A,lim}$  a následně dopočítali hodnoty jejich pI. Jedenáct ze čtrnácti námi vybraných amfolytů splňuje vytyčenou

podmínku  $-dz/dpH > 0,66(\Delta pK_A < 1,5)$  pro excelentní pI markery. Zbylé tři amfolyty s  $1,55 < \Delta pK_A < 2,45$  lze pokládat za markery s dostatečnou fokusační schopností.

Markery, z nichž 12 absorbuje záření o vlnové délce 280 nm (absorbance při této vlnové délce je považována za nejběžněji používanou vlnovou délku při detekci proteinů [84]), jsme použili ke sledování formování a finálního tvaru pH gradientu komerční směsi nosných amfolytů, CEInfinite AESlyte SH 3-10 od společnosti Advanced Electrophoresis Solutions, Ltd. Experimenty jsme provedli pomocí přístroje CEInfinite, zařízení pro cIEF s detektorem zobrazujícím celou kapiláru v „reálném čase“, respektive v několikavteřinových intervalech („*on-line*“ *whole-column imaging detection*). Experimentální výsledky jsme porovnali se záznamem simulace (v programu Simul 5 Complex) vývoje pH gradientu směsi 181 hypotetických amfolytů s ekvidistantně rozdělenými pI ( $\Delta pK_A = 1$ ,  $\Delta pI = 0,04$ ), pokrývajícími rozsah  $3 < pH < 10$  za současné fokusace „našich“ markerů.

Záznamy z experimentu a simulace vykazují stejný trend – pH gradient se značně odklání od linearitu, a to jak ve výrazně kyselé, tak ve velmi bazické oblasti. Tento úkaz je způsoben obousměrnými izotachoforetickými procesy [85], při kterých dochází k nepřetržitému odčerpávání nejkrajnějších nosných amfolytů, a tím pádem i k rozšiřování jejich zóny. Předpoklad linearitu reálného gradientu v celé oblasti jeho pH tedy není obecně správný.

## Závěr

Předkládaná dizertační práce je zaměřena na teoretické aspekty pokročilých metod kapilární elektroforézy a na vývoj software pro optimalizaci experimentů a vyhodnocování dat v kapilární zónové elektroforéze.

Sjednotili jsme problematiku a ucelili názvosloví používané v afinitní kapilární elektroforéze publikované v literatuře mezi roky 1993–2015.

Dále jsme revidovali v literatuře uvedený postup stanovení komplexačních konstant metodou částečného plnění afinitní kapilární elektroforézy, který bylo možno aplikovat pouze za specifických podmínek, a navrhli postup nový, který se neomezuje pouze na slabě interagující analyty s neutrálními ligandy, ale je použitelný univerzálně. Současně jsme představili i použití námi předkládaného postupu pro výpočet komplexačních konstant a ukázali limitace jednotlivých aplikací.

V rámci separace optických izomerů metodou afinitní kapilární elektroforézy jsme vytvořili jednoduchý počítačový program ACEResol pro optimalizaci separačních podmínek analytů s nabitými ligandy. Použitelnost daného počítačového programu jsme ověřili na nalezení optimálních separačních podmínek  $\beta$ -blokátoru pindololu s OS- $\gamma$ -CD. Za optimalizovaných podmínek jsme metodu separace validovali dle směrnic ICH pro kvantitativní analýzu ve dvou koncentračních rozmezích.

Vytvořili jsme počítačový program AnglerFish pro jednoduché a přesné vyhodnocování experimentálních výsledků při stanovování limitních elektroforetických pohyblivostí a termodynamických kyselých disociačních konstant pomocí kapilární zónové elektroforézy. Tento námi představený počítačový program stanovuje dané parametry přímo z experimentálních hodnot efektivních elektroforetických pohyblivostí a složení příslušných základních elektrolytů. Současně provádí i korekci na iontovou sílu pomocí Debyeovy-Hückelovy a Onsagerovy-Fuossovy teorie.

Program AnglerFish jsme využili i při stanovování izoelektrických bodů vybraných amfolytických látek, majících potenciál sloužit jako tzv. pI markery v kapilární izoelektrické fokusaci, a to zejména při experimentálním ověřování dějů studovaných pomocí počítačových simulací. Použitelnost námi navržených pI markerů jsme demonstrovali počítačovou simulací a experimentálním ověřením vývoje a konečného tvaru pH gradientu komerční pH-gradientové směsi.

## Literatu

---

- [1] Tiselius, A.: *Nova Acta Regiae Soc. Sci. Upsal.* **7** (1930), 1-107
- [2] Heegaard, N. H. H.; Kennedy, R.: *Electrophoresis* **20** (1999), 3122-3133
- [3] Heegaard, N. H. H.: *Electrophoresis* **30** (2009), 229-239
- [4] Fanali, S.: *J. Chromatogr. A* **875** (2000), 89-122
- [5] Kuhn, R.; Stoecklin, F.; Erni, F.: *Chromatographia* **33** (1992), 32-36
- [6] Ward, T. J.; Farris III, A. B.: *J. Chromatogr. A* **906** (2001), 73-89
- [7] Valtcheva, L.; Mohammad, J.; Pettersson, G.; Hjertén, S.: *J. Chromatogr.* **638** (1993), 263-267
- [8] Tanaka, Y.; Terabe, S.: *J. Chromatogr. A* **694** (1995), 277-284
- [9] Chankvetadze, B.; Blaschke, G.: *J. Chromatogr. A* **906** (2001), 309-363
- [10] Vuignier, K.; Schappler, J.; Veuthey, J. L.; Carrupt, P. A., Masrtel, S.: *Anal. Bioanal. Chem.* **398** (2010), 53-66
- [11] Heegaard, N. H. H.: *Electrophoresis* **24** (2003), 3879-3891
- [12] Colton, I. J.; Carbeck, J. D.; Rao, J.; Whitesides, G. M.: *Electrophoresis* **19** (1998), 367-382
- [13] Dubský, P.; Dvořák, M.; Ansorge, M.: *Anal. Bioanal. Chem.* **408** (2016), 8623-8641
- [14] Wren, S. A. C.; Rowe, R. C.: *J. Chromatogr.* **603** (1992), 235-241
- [15] Müllerová, L.; Dubský, P.; Gaš, B.: *Electrophoresis* **35** (2014), 2688-2700
- [16] Walden, P.: *Z. Phys. Chem.* **55** (1906), 207-249
- [17] Robinson, R. A.; Stokes, R. H.: *Electrolyte solutions. 2nd ed.* Minolea: Dover (2002), s. 125-131, s. 303-313
- [18] Britz-McKibbin, P.; Chen, D. D. Y.: *Electrophoresis* **23** (2002), 880-888
- [19] Valkó, I. E.; Billiet, H. A. H.; Frank, J.; Luyben, K. C. A. M.: *Chromatographia* **38** (1994), 730-736
- [20] Lemesle-Lamache, V.; Taverna, M.; Wouessldjewe, D.; Duchêne, D.; Ferrier, D.: *J. Chromatogr. A* **735** (1996), 321-331
- [21] Bowser, M. T.; Chen, D. D. Y.: *Anal. Chem.* **70** (1998), 3261-3270
- [22] Beneš, M.; Zusková, I.; Svobodová, J.; Gaš, B.: *Electrophoresis* **33** (2012), 1032-1039

- 
- [23] Friedl, W.; Reijenga, J. C.; Kenndler, E.: *J. Chromatogr. A* **709** (1995), 163-170
- [24] Maynard, D. K.; Vigh, G.: *Electrophoresis* **22** (2001), 152-162
- [25] Zhu, W.; Vigh, G.: *Electrophoresis* **24** (2003), 130-138
- [26] Busby, M. B.; Lim, P.; Vigh, G.: *Electrophoresis* **24** (2003), 351-362
- [27] Nzeadibe, K.; Vigh, G.: *Electrophoresis* **28** (2007), 2589-2605
- [28] Tanaka, Y.; Otsuka, K.; Terabe, S.: *J. Chromatogr. A* **875** (2000), 323-330
- [29] Michalke, D.; Welsch, T.: *J. Chromatogr. A* **960** (2002), 209-220
- [30] Rudaz, S.; Cherkaoui, S.; Gauthier, J. Y.; Lantéri, P.; Veuthey, J. L.: *Electrophoresis* **22** (2001), 3316-3326
- [31] Růžička, M.; Čížková, M.; Jirásek, M.; Teplý, F.; Koval, D.; Kašička, V.: *J. Chromatogr. A* **1349** (2014), 116-121
- [32] Růžička, M.; Koval, D.; Vávra, J.; Reyes-Guitérrez, P. E.; Teplý, F.; Kašička, V.: *J. Chromatogr. A* **1467** (2016), 417-426
- [33] Nelson, W. M.; Lee, C. S.: *Anal. Chem.* **68** (1996) 3265-3269
- [34] Yagi, Y.; Yamamoto, S.; Kakehi, K.; Hayakawa, T.; Ohyama, Y.; Suzuki, S.: *Electrophoresis* **32** (2011), 2979-2985
- [35] Rudaz, S.; Le Saux, T.; Prat, J.; Gareli, P.; Veuthey, J. L.: *Electrophoresis* **25** (2004), 2761-2771
- [36] Xu, H.; Yu, X.; Chen, H.: *Anal. Sci.* **20** (2004), 1409-1413
- [37] Heintz, J.; Hernandez, M.; Gomez, F. A.: *J. Chromatogr. A* **840** (1999), 261-268
- [38] Amini, A.; Westerlund, D.: *Anal. Chem.* **70** (1998), 1425-1430
- [39] Amini, A.; Merclin, N.; Bastami, S.; Westerlund, D.: *Electrophoresis* **20** (1999), 180-188
- [40] Ansorge, M.; Dubský, P.; Ušelová, K.: *Electrophoresis* **39** (2018), 742-751
- [41] Hruška, V.; Beneš, M.; Svobodová, J.; Zusková, I.; Gaš, B.: *Electrophoresis* **33** (2012), 938-947
- [42] Svobodová, J.; Beneš, M.; Hruška, V.; Ušelová, K.; Gaš, B.: *Electrophoresis* **33** (2012), 948-957
- [43] Shalaeva, M.; Kenseth, J.; Lombardo, F.; Bastin, A.: *J. Pharm. Sci.* **97** (2008), 2581-2606
- [44] Jeppsson, A. B.; Johansson, U.; Waldeck, B.: *Acta Pharmacol. Toxicol.* **54** (1984), 285-291

- 
- [45] Michel, T.; Hoffman, B. B.: *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 12th edition*, McGraw-Hill Medical, New York (2011), s. 745-788
- [46] Law, M.; Morris, J. K.; Wald, D. S.: *Brit. Med. J.* **338** (2009), 1-19
- [47] Poirier, L.; Tobe, S. W.: *Can. J. Cardiol.* **30** (2014), 9-15
- [48] Akhbar, S.; Alorainy, M. S.: *Saudi Med. J.* **35** (2014), 1307-1317
- [49] International Conference on Harmonisation, *Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for New Drug substances and New Drug Products: Chemical Substances*, ICH Topic Q 6 A, CPMP/ICH/367/96
- [50] Zhu, W. H.; Vigh, G.: *J. Chromatogr. A* **987** (2003), 459-466
- [51] International Conference on Harmonisation, *Validation of analytical procedures: Text and methodology*, ICH Topic Q 2 (R1), CPMP/ICH/381/95
- [52] Morante-Zarcelero, S.; Sierra, I.: *Chirality* **24** (2012), 860-866
- [53] Malý, M.; Dovhunová, M.; Dvořák, M.; Gerlero, G. S.; Kler, P. A.; Hruška, V.; Dubský, P.: *Electrophoresis* **40** (2019), 683-692
- [54] Gaš, B.; Bravenec, P.: *Electrophoresis* **42** (2021), 1291-1299
- [55] Hirokawa, T.; Kiso, Y.: *J. Chromatogr.* **248** (1982), 341-362
- [56] Hirokawa, T.; Nishimo, M.; Aoki, N.; Kiso, Y.; Sawamoto, Y.; Yagi, T.; Akiyama, J.: *J. Chromatogr.* **271** (1982), D1-106
- [57] Hirokawa, T.; Kiso, Y.: *J. Chromatogr.* **252** (1982), 33-48
- [58] Hirokawa, T.; Nishino, M.; Kiso, Y.: *J. Chromatogr.* **252** (1982), 49-65
- [59] Hirokawa, T.; Kobayashi, S.; Kyso, Y.: *J. Chromatogr.* **318** (1985), 195-210
- [60] Hirokawa, T.; Gojo, T.; Kiso, Y.: *J. Chromatogr.* **269** (1986), 59-81
- [61] Hirokawa, T.; Tsuyoshi, T.; Kiso, Y.: *J. Chromatogr.* **408** (1978), 27-41
- [62] Hirokawa, T.; Gojo, T.; Kiso, Y.: *J. Chromatogr.* **390** (1987), 201-223
- [63] Hirokawa, T.; Kiso, Y.; Gaš, B.; zusková, I.; Vacík, J.: *J. Chromatogr.* **628** (1993), 283-308
- [64] Debye, P.; Hückel, E.: *Physik. Z.* **24** (1923), 185-206
- [65] Debye, P.; Hückel, E.: *Physik. Z.* **24** (1923), 305-325
- [66] Onsager, L.; Fuoss, R. M.: *J. Phys. Chem.* **36** (1932), 2689-2778
- [67] Cai, J.; Smith, J. T.; El Rassi, Z.: *J. High Resol. Chromatogr.* **15** (1992), 30-32



- 
- [68] Tůmová, T.; Monincová, L.; Čeřovský, V., Kašička, V.: *Electrophoresis* **37** (2016), 3186-3195
- [69] Šlampová, A.; Boček, P.: *Electrophoresis* **29** (2008), 538-541
- [70] Šlampová, A.; Křivánková, L.; Gebauer, P.; Boček, P.: *J. Chromatogr. A* **1216** (2009), 3637-3641
- [71] Onsager, L.: *Phys. Z.* **28** (1927), 277-298
- [72] Vesterberg, O.: *Acta Chem. Scand.* **23** (1969), 2653-2666
- [73] Righetti, P. G.; Simó, C.; Sebastiano, R.; Citterio, A.: *Electrophoresis* **28** (2007), 3799-3810
- [74] Shimura, K.; Wang, Z.; Matsumoto, H.; Kasai, K.: *Electrophoresis* **21** (2000), 603-610
- [75] Shimura, K.; Kamiya, K.; Matsumoto, H.; Kasai, K.: *Anal. Chem.* **74** (2002), 1046-1053
- [76] Šlais, K.; Friedl, Z.: *J. Chromatogr. A* **661** (1994), 249-256
- [77] Šlais, K.; Friedl, Z.: *J. Chromatogr. A* **695** (1995), 113-122
- [78] Šlais, K.; Horká, M.; Nováčková, J.; Friedl, Z.: *Electrophoresis* **23** (2002), 1682-1688
- [79] Šťastná, M.; Trávníček, M.; Šlais, K.: *Electrophoresis* **26** (2005), 53-59
- [80] Vigh, G., Li. M.: *US Patent 9,689,841* (2017)
- [81] Svensson, H.: *Acta Chem. Scand.* **16** (1962), 456-466
- [82] Rilbe, H.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **209** (1973), 11-22
- [83] Malý, M.; Boublík, M.; Pocrnić, M.; Ansorge, M.; Lorinčíková, K.; Svobodová, J.; Hruška, V.; Dubský, P.; Gaš, B.: *Electrophoresis* **41** (2020), 493-501
- [84] Rodriguez-Diaz, R.; Wehr, T.; Zhu, M.: *Electrophoresis* **18** (1997), 2134-2144
- [85] Mosher, R. A.; Thormann, W.: *Electrophoresis* **11** (1990), 717-723