

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra fyzikální a makromolekulární chemie

Stanovení konstant stability vybraných chirálních látek metodou kapilární zónové elektroforézy

Diplomová práce

Školitel: RNDr. Kateřina Ušelová, PhD.

Praha 2008

Bc. Jolana Skokanová

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením školitelky RNDr. Kateřiny Ušelové, PhD. a konsulantky RNDr. Ivy Zuskové, CSc. a že jsem všechny použité prameny řádně citovala.

Jsem si vědoma 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

Chtěla bych poděkovat své školitelce RNDr. Kateřině Ušelové, PhD. za vedení této diplomové práce, své konzultantce RNDr. Ivě Zuskové, CSc. za odborné připomínky a především bych chtěla poděkovat svým rodičům za jejich trpělivost, rady, podporu a za umožnění vysokoškolského studia.

Práce na tomto projektu byla finančně podporována výzkumným záměrem MSM 0021620857 Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky.

KLÍČOVÁ SLOVA

kapilární zónová elektroforéza

konstanta stability

opticky aktivní látky

profeny

chirální selektory

heptakis(2,3,6-tri-O-methyl)- β -cyklodextrin

OBSAH

1. POUŽITÉ SYMBOLY	1
2. POUŽITÉ ZKRATKY	3
3. MOTIVACE A CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE	4
4. TEORETICKÁ ČÁST	6
4.1 KAPILÁRNÍ ZÓNOVÁ ELEKTROFORÉZA	6
4.1.1 ZÁKLADNÍ PRINCIP	6
4.1.2 INSTRUMENTACE	6
4.1.3 ELEKTROOSMOTICKÝ TOK	8
4.1.4 DISPERZNÍ JEVY V CZE	8
4.1.5 ELEKTROFORETICKÁ POHYBLIVOST	9
4.1.5.1 VÝPOČET POHYBLIVOSTÍ Z ELEKTROFEROGRAMU	11
4.1.5.2 APLIKACE HVL FUNKCE PRO STANOVENÍ MIGRAČNÍCH ČASŮ ANALYTŮ	12
4.2 CHIRÁLNÍ SEPARACE KAPILÁRNÍ ZÓNOVOU ELEKTROFORÉZOU	13
4.2.1 CHIRÁLNÍ LÁTKY	13
4.2.1.1 PROFENY	13
4.2.2 PRINCIP CHIRÁLNÍ SEPARACE KAPILÁRNÍ ZÓNOVOU ELEKTROFORÉZOU	15
4.2.2.1 FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ CHIRÁLNÍ SEPARACI KAPILÁRNÍ ZÓNOVOU ELEKTROFORÉZOU	16
4.2.3 CYKLODEXTRINY	17
4.3 KONSTANTA STABILITY	19
4.3.1 DEFINIČNÍ VZTAHY	19
4.3.2 FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ HODNOTU KONSTANTY STABILITY	19
4.3.2.1 IONTOVÁ SÍLA	20
4.3.2.2 VIZKOZITA	20
4.3.3 PUBLIKOVANÉ POSTUPY STANOVENÍ KONSTANT STABILITY METODOU CZE	22
5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	23

5.1	POUŽITÉ CHEMIKÁLIE	23
5.2	INSTRUMENTACE A PROGRAMY	23
5.3	PŘÍPRAVA SEPARAČNÍCH ROZTOKŮ	24
6.	VÝSLEDKY A DISKUZE	26
6.1	NAVRŽENÍ METODY PRO STANOVENÍ KONSTANT STABILITY METODOU CZE	26
6.1.1	ODVOZENÍ TEORETICKÝCH VZTAHŮ	26
6.1.2	VOLBA SEPARAČNÍCH PODMÍNEK	28
6.1.3	EXPERIMENTY V ACETÁTOVÉM PUFRU	29
6.1.4	ODEČET MIGRAČNÍCH ČASŮ ANALYTŮ V ACETÁTOVÉM PUFRU	33
6.1.5	ZÁVISLOST EFEKTIVNÍCH POHYBLIVOSTÍ NA KONCENTRACI CYKLODEXTRINU V ACETÁTOVÉM PUFRU	34
6.1.6	STANOVENÍ KONSTANT STABILITY V ACETÁTOVÉM PUFRU	42
6.2	STANOVENÍ KONSTANT STABILITY V β -ALANINOVÉM PUFRU	45
6.2.1	EXPERIMENTY V β -ALANINOVÉM PUFRU	46
6.2.2	ODEČET MIGRAČNÍCH ČASŮ ANALYTŮ V β -ALANINOVÉM PUFRU	48
6.2.3	ZÁVISLOST EFEKTIVNÍCH POHYBLIVOSTÍ NA KONCENTRACI CYKLODEXTRINU V β -ALANINOVÉM PUFRU	48
6.2.4	KOREKCE POHYBLIVOSTÍ NA VSKOZITU	52
6.2.5	STANOVENÍ KONSTANT STABILITY	57
6.3	TERMODYNAMICKÁ KONSTANTA STABILITY	65
7.	ZÁVĚR	66
8.	POUŽITÁ LITERATURA	68

1. POUŽITÉ SYMBOLY

a	aktivita
a_i	aktivita i -té složky
c	analytická koncentrace látky
c_i	molární koncentrace i -tého iontu
E	intenzita elektrického pole
γ_i	aktivitní koeficient i -tého iontu
I	iontová síla
I	elektrický proud
η	dynamická viskozita prostředí
K	termodynamická konstanta stability
K'	zdánlivá konstanta stability
K_a	aciditní disociační konstanta
l_c	celková délka kapiláry
l_d	délka kapiláry od vstupního konce k detektoru
$\mu_{akt,i}$	aktuální pohyblivost i -tého iontu
μ_{ef}	efektivní pohyblivost molekuly
$\bar{\mu}_{ef}$	průměrná efektivní pohyblivost molekuly
$\mu_{ef,kor}$	efektivní pohyblivost molekuly korigovaná na viskozitu základního elektrolytu
μ_{EOF}	elektroforetická pohyblivost markeru elektroosmotického toku
μ_i	elektroforetická pohyblivost i -tého iontu
$\mu_{lim,i}$	limitní pohyblivost i -tého iontu
$\mu_{poz,i}$	pozorovaná elektroforetická pohyblivost i -tého iontu
v_i	rychlost i -tého iontu v elektrickém poli
pK_a	záporný dekadický logaritmus aciditní disociační konstanty
pK'_a	záporný dekadický logaritmus zdánlivé disociační konstanty

Q_i	celkový náboj i -tého iontu
r_i	poloměr i -tého iontu
t_{EOF}	čas průchodu markeru elektroosmotického toku detektorem
$t_{\text{mig},i}$	migrační čas i -tého iontu
U	napětí vložené na elektrody
ν	viskozitní korekční faktor
z_i	nábojové číslo i -tého iontu

2. POUŽITÉ ZKRATKY

ACE	afinitní kapilární elektroforéza
BGE	základní elektrolyt
DMSO	dimethylsulfoxid
COX	cyklooxygenáza
CZE	kapilární zónová elektroforéza
EOF	elektroosmotický tok
HVL	Haarhoff-Van der Lindeho funkce
TM- β -CD	heptakis(2,3,6-tri-O-methyl)- β -cyklodextrin
UV/VIS	ultrafialová a viditelná oblast spektra
NMR	nukleární magnetická resonance

3. MOTIVACE A CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE

Profeny jsou chirální látky používané jako účinné složky léků s protizánětlivým účinkem (např. Ibalgin, Fastum gel, Strefen a jiné). Za léčivý efekt je ve většině případů odpovědný pouze jeden z enantiomerů, přičemž druhý má obvykle pro organismus nežádoucí účinky. Především z tohoto důvodu jsou farmaceutické firmy nuceny monitorovat obsah nežádoucí formy použitého profenu v produkovaném léčivu.

Jednotlivé enantiomery profenu se shodují ve všech fyzikálně-chemických charakteristikách kromě směru otáčení roviny polarizovaného světla, a proto jsou v nechirálním prostředí nerozlišitelné. Jedním z možných způsobů jejich separace je metoda kapilární zónové elektroforézy s přidavkem vhodného chirálního aditiva (selektoru), které stereoselektivně rozpozná jednotlivé enantiomery. Rozdílná afinita enantiomerů ke zvolenému chirálnímu aditivu, tedy rozdílná „ochota“ jednotlivých enantiomerů k tvorbě komplexu se zvoleným chirálním selektorem, je podstatou jejich CZE separace. Fyzikální veličinou popisující afinitu enantiomeru k chirálnímu selektoru je konstanta stability. Čím je její hodnota vyšší, tím „ochotněji“ daný enantiomer vytváří se zvoleným chirálním selektorem komplex. Konstanta stability tedy obecně hraje klíčovou roli při návrhu a optimalizaci separačního systému pro zkoumaný analyt.

Vzhledem k farmakologické významnosti profenu se jejich chirální separací pomocí CZE zabývala již řada výzkumných týmů. Některé svou pozornost soustředily na nalezení optimálních podmínek pro jejich úspěšnou enantioseparaci (volba pufru, pH, chirálního selektoru, koncentrace složek), jiné týmy se pokusily na základě získaných experimentálních dat stanovit konstantu stability. Většina publikovaných konstant stabilit profenu s daným chirálním selektorem je tedy pevně svázána s experimentálními podmínkami při jejich stanovení (pH separačního pufru, iontová síla, atd.).

Cílem této diplomové práce je navrhnout postup pro stanovení konstant stability vybraných profenu využitím CZE tak, aby závislost stanovovaných

hodnot na zvolených separačních podmínkách byla co možná nejmenší. Z tohoto důvodu jsou dílčími cíli předkládané práce:

- sledování tvaru píků zkoumaných analytů a s ním souvisejícím způsobem odečtu jejich migračních časů,
- navržení a testování několika způsobů korekce experimentálně stanovených pohyblivostí sledovaných látek na viskozitě použitého separačního prostředí.

4. TEORETICKÁ ČÁST

4.1 KAPILÁRNÍ ZÓNOVÁ ELEKTROFORÉZA

4.1.1 ZÁKLADNÍ PRINCIP

Kapilární zónová elektroforéza (capillary zone electrophoresis, CZE) se řadí do skupiny kapilárních elektromigračních separačních metod. Základním separačním principem CZE je rozdílná elektroforetická pohyblivost iontů v separačním pufru (tzv. základním elektrolytu, background elektrolyte, BGE) po vložení stejnosměrného elektrického pole. Lze ji tedy použít jen pro separaci nabitých analytů. Pokud je do separačního systému přidáno vhodné nabitě aditivum (např. nabitý cyklodextrin, nabitě makrocyclické antibiotikum, nabitý polymer nebo jiné), může být CZE využita i pro separaci neutrálních analytů [1]. Nabitě aditivum vytvoří s neutrálním analytem komplex, kterému udělí náboj. Tento nabitý komplex se pohybuje jinou rychlostí než volný neutrální analyt. Rozdílná pohyblivost komplexu a volného neutrálního analytu pak může vést k jejich separaci.

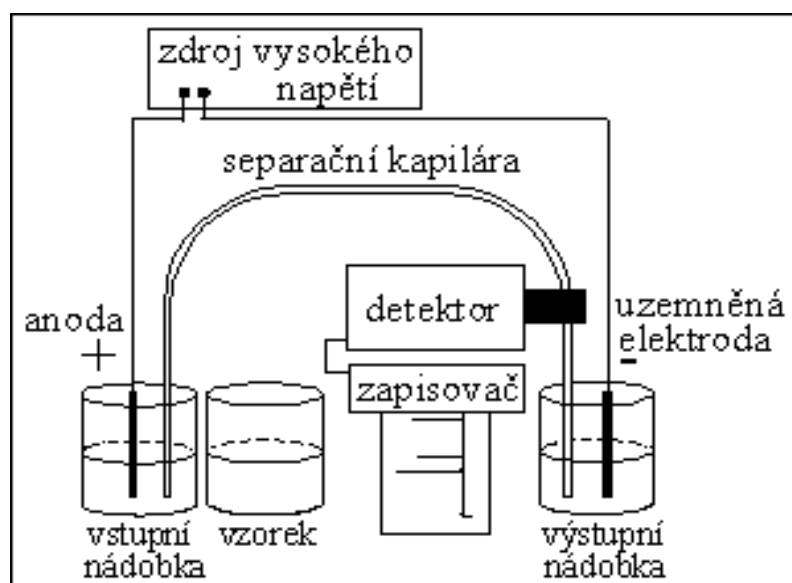
4.1.2 INSTRUMENTACE

Přístroj pro kapilární zónovou elektroforézu je složen ze vstupní a výstupní nádoby (tzv. vialky), separační kapiláry, zdroje vysokého napětí, dvou elektrod, detektoru a počítače, který zobrazuje výsledek separace a současně umožňuje ovládání celé aparatury. Zjednodušené schéma CZE aparatury znázorňuje Obr. 1.

Separací kapilára je nejčastěji realizována velmi tenkou křemennou trubičkou (o vnitřním průměru mezi 25-100 μm), jejíž vnější povrch je pokryt vrstvou polyimidu umožňující její tvarovou flexibilitu. Vzorek může být do separační kapiláry dávkován dvěma způsoby. Nejčastěji se využívá hydrodynamického dávkování, kdy se např. nádoba se vzorkem utěsní a na hladinu vzorku je působeno tlakem v podobě stlačeného vzduchu. Přetlak ve vialce způsobí nadávkování vzorku do separační kapiláry. Nadávkovaná zóna

vzorku má pak stejné složení jako vzorek ve vialce. Druhý způsob dávkování je elektrokinetický. Elektrokinetické dávkování je realizováno tak, že se na elektrody po dobu několika sekund vloží tzv. dávkovací napětí. Elektrické pole generované napětím způsobí naputování malého množství vzorku do kapiláry. Složení vzorku v kapiláře však není identické se složením vzorku v dávkovací nádobce, protože vlivem elektrického pole dochází ke zvýhodnění kationtů nebo aniontů.

K detekci analytů v kapiláře se stále častěji využívá propojení CZE s hmotnostním spektrometrem. Velmi cenné informace o procesu separace přináší také detekce vodivosti. Nejčastěji se však využívá UV/VIS detekce, kdy je měřena absorbance roztoku uvnitř kapiláry.



Obrázek 1: Schématické znázornění CZE aparatury [2].

4.1.3 ELEKTROOSMOTICKÝ TOK

V případě nejčastěji používaných křemenných kapilár dochází při pH separačního pufru vyšším než dvě jednotky k disociaci silanolových skupin na vnitřním povrchu kapiláry. Vnitřní povrch kapiláry je tedy tvořen negativně nabitými křemičitanovými skupinami a vodíkové kationy jsou přichyceny k vnitřní stěně kapiláry díky elektrostatickému přitahování. Po vložení napětí na elektrody se vodíkové kationy začnou pohybovat ke katodě a strhávají s sebou veškerý roztok v kapiláře. Tento pohyb se označuje jako elektroosmotický tok (electroosmotic flow, EOF). Velikost a směr EOF závisí na typu kapiláry. Při použití křemenných kapilár lze směr i velikost EOF měnit v závislosti na separačních podmínkách (pH, koncentraci základního elektrolytu, přidavku organického rozpouštědla či povrchově aktivní látky).

Pro zjištění směru a pohyblivosti EOF se používají tzv. markery elektroosmózy, což jsou látky bez náboje, které tedy nevykazují vlastní elektroforetickou pohyblivost a pohybují se rychlostí EOF.

4.1.4 DISPERZNÍ JEVY V CZE

Jako disperze v CZE jsou označovány jevy, které negativně působí na tvar píku analytu – přispívají k jeho rozmývání a deformaci. Mezi takové jevy se řadí:

- podélná difúze,
- tepelné efekty (Jouleovo teplo),
- elektromigrační disperze (elektrodisperze),
- adsorpce na stěnu kapiláry.

Difúzí je myšlen tok hmoty v důsledku koncentračního gradientu, který rozmývá píky analytů. Nedeformuje však jejich gaussovský tvar na trojúhelníkovitý. Difúzi nelze v kapilární zónové elektroforéze eliminovat.

Po vložení napětí na elektrody vzniká v kapiláře elektrický proud generující Jouleovo teplo. Tím dochází k ohřívání roztoku v kapiláře a změně

jeho viskozity, což vede ke změně pohyblivostí všech iontů přítomných v separačním elektrolytu. Vznik Joulova tepla lze omezit např. redukcí průměru kapiláry, snížením vodivosti základního elektrolytu či redukcí separačního napětí.

K elektrodisperzi píku analytu dochází tehdy, je-li nadávkován analyt o takové koncentraci, která ovlivňuje vodivost a pH základního elektrolytu. Působením elektrodisperze se gaussovský pík analytu deformuje na trojúhelníkovitý. Vlivem elektrodisperze rozlišujeme dva typy deformací píku analytu – tzv. „tailing“ pík (rozmytá zadní hrana píku) nebo „fronting“ pík (pík rozmytý vpředu). Elektrodisperze též úzce souvisí s pohyblivostí analytu a co-iontu (ion BGE se stejným nábojem jako analyt). Pohybuje-li se analyt rychleji než co-ion BGE, objeví se na elektroferogramu pík rozmytý vpředu. Pohybuje-li se analyt pomaleji než co-ion, vytvoří se pík rozmytý vzadu. Potlačení elektrodisperze lze docílit dávkováním vzorků o velmi nízkých koncentracích a vhodnou volbou složení základního elektrolytu.

Deformaci píku či úplnou ztrátu analytu ze vzorku může též způsobit adsorpce analytu na vnitřní stěnu kapiláry. Adsorpci lze předejít vhodnou volbou separačních podmínek (např. pH, modifikací vnitřního povrchu kapiláry).

4.1.5 ELEKTROFORETICKÁ POHYBLIVOST [3], [4]

Elektroforetická pohyblivost (mobilita) je pohyb iontů v elektrickém poli, který je způsoben elektrostatickým přitahováním náboje iontu k opačně nabitě elektrodě. Elektroforetická pohyblivost i -tého iontu μ_i je definována vztahem

$$\mu_i = \frac{v_i}{E}, \quad (1)$$

kde v_i vyjadřuje rychlost i -tého iontu v elektrickém poli o intenzitě E .

V reálném roztoku je pohyblivost iontů výrazně ovlivňována jejich vzájemným elektrostatickým přitahováním a je tedy závislá na iontové síle separačního elektrolytu I , která je definována vztahem

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

kde c_i je molární koncentrace a z_i je nábojové číslo i -tého iontu.

Pohyblivost i -tého iontu elektrolytu v roztoku o dané iontové síle je označována jako aktuální pohyblivost $\mu_{akt,i}$. Ta s klesající hodnotou iontové síly roste a v nekonečně zředěném roztoku nabývá maximální hodnoty, která je označována jako limitní (iontová) pohyblivost $\mu_{lim,i}$. Limitní pohyblivost daného iontu je závislá pouze na použitém rozpouštědle a teplotě. Limitní pohyblivosti běžných iontů lze pro vodná rozpouštědla a teplotu 25 °C nalézt v tabulkách.

Slabé elektrolyty se v roztoku mohou vyskytovat ve více formách. O zastoupení jednotlivých forem rozhoduje hodnota pH prostředí. Pro slabé elektrolyty byla tedy zavedena tzv. efektivní pohyblivost μ_{ef} , která vyjadřuje pohyblivost molekuly jako celku a je definována vztahem

$$\mu_{ef} = \frac{\sum_{i=1}^n c_i \mu_{akt,i} |z_i|}{c}, \quad (3)$$

kde c je analytická (celková látková) koncentrace slabého elektrolytu. Použijeme-li μ_{ef} definovanou tímto vztahem, považujeme pak pohyblivosti všech látek za kladné hodnoty.

Elektroforetická pohyblivost i -tého iontu je přímo úměrná celkovému náboji iontu Q_i , nepřímo úměrná poloměru iontu r_i a dynamické viskozitě prostředí η , jak vyplývá ze vztahu

$$\mu_i = \frac{Q_i}{6\pi\eta r_i}. \quad (4)$$

Z tohoto vztahu také plyne velmi významná závislost pohyblivostí na teplotě. S rostoucí teplotou se totiž snižuje viskozita prostředí, a tím dochází ke zvýšení pohyblivostí všech přítomných složek.

4.1.5.1 VÝPOČET POHYBLIVOSTÍ Z ELEKTROFEROGRAMU

Elektroferogram je časový záznam signálu detektoru. Zobrazuje zóny separovaných látek vzniklých během CZE analýzy v separační kapiláře v podobě píků, které nesou kvantitativní i kvalitativní informaci o analyzovaných látkách.

Elektroforetická pohyblivost markeru elektroosmózy

Elektroosmotický tok působí v CZE neselektivně, avšak jeho směr a velikost úzce souvisí s pohyblivostí zkoumaných analytů. Elektroforetickou pohyblivost EOF μ_{EOF} lze vypočítat z času průchodu markeru elektroosmózy detektorem t_{EOF} , ze znalosti celkové délky separační kapiláry l_c , délky kapiláry k detektoru l_d a vloženého napětí U

$$\mu_{\text{EOF}} = \frac{l_d l_c}{t_{\text{EOF}} U}. \quad (5)$$

Pozorovaná elektroforetická pohyblivost

Pozorovanou (zdánlivou) elektroforetickou pohyblivost i -tého iontu $\mu_{\text{poz},i}$ lze určit z rovnice

$$\mu_{\text{poz},i} = \frac{l_d l_c}{t_{\text{mig},i} U}, \quad (6)$$

kde $t_{\text{mig},i}$ je migrační čas i -tého iontu.

Pokud se analyt a EOF pohybují v separační kapiláře stejným směrem, je možné skutečnou elektroforetickou pohyblivost i -tého iontu μ_i vyjádřit vztahem

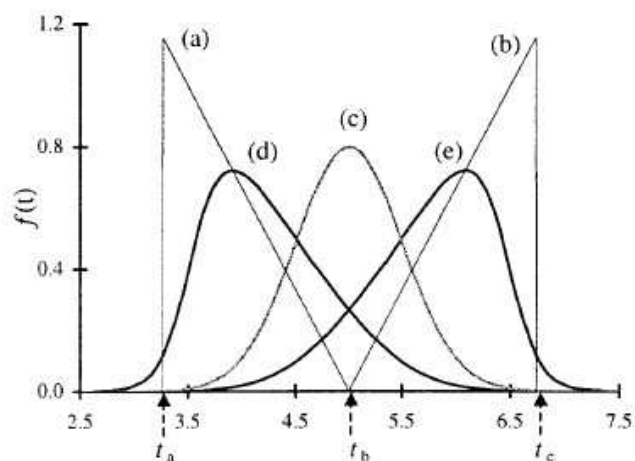
$$\mu_i = \mu_{\text{poz},i} - \mu_{\text{EOF}} \quad (7)$$

Pohybují-li se analyt a EOF opačnými směry, pak pro μ_i platí

$$\mu_i = \mu_{\text{EOF}} - \mu_{\text{poz},i} \quad (8)$$

4.1.5.2 APLIKACE HVL FUNKCE PRO STANOVENÍ MIGRAČNÍCH ČASŮ ANALYTŮ

Stanovení pohyblivosti analytu z elektroforetických experimentů a jejího využití pro další výpočty je významně ovlivněno tvarem píku sledovaného analytu. Vykazuje-li pík zkoumaného analytu gaussovský tvar (Obr. 2 (c)), pak pro výpočet jeho pozorované pohyblivosti (6) používáme čas, který odpovídá vrcholu píku. Vrchol rozmytého (trojúhelníkovitého) píku se v časové ose posouvá, a tudíž odečet migračního času z vrcholu píku zanáší do výpočtu pohyblivosti sledovaného analytu chybu. Odečtem migračních časů analytů vykazující trojúhelníkovitý tvar píku se v HPLC a CZE zabývali Erny, Bergström a Goodall [5], [6]. Pro odečtení migračního času navrhli využít tzv. HVL funkci (Haarhoff-Van der Linde function), jíž jsou fitovány rozmyté píky zkoumaných analytů. Prokázali, že jeden ze čtyř parametrů charakterizující proložení experimentálního píku HVL funkcí vypovídá o hodnotě „správného“ migračního času analytu. K proložení experimentálně získaných píků analytů rozmytých vlivem elektrodisperze funkcí HVL lze v principu použít běžně dostupné počítačové programy pro matematické a grafické zpracování a zobrazení experimentálních dat.



Obrázek 2: (a), (b) rozmyté (trojúhelníkovité) píky; (c) gaussovský pík; (d), (e) píky fitované HVL funkcí. Převzato z [6].

4.2 CHIRÁLNÍ SEPARACE KAPILÁRNÍ ZÓNOVOU ELEKTROFORÉZOU

4.2.1 CHIRÁLNÍ LÁTKY [4], [7]

Molekuly se stejnou strukturou, ale různou konfigurací (s různě uspořádanými atomy či skupinami atomů v prostoru) se nazývají stereoizomery. Jako optické izomery se označují stereoizomery, které obsahují minimálně jedno chirální centrum. Optické izomery otáčejí rovinu polarizovaného světla o stejný úhel, ale opačnými směry. Takové molekuly jsou samy sobě zrcadlovým obrazem a označují se enantiomery. Enantiomer stáčeující rovinu polarizovaného světla vlevo se nazývá levotočivý (značí se *D* či *R*) a enantiomer stáčeující rovinu polarizovaného světla vpravo se označuje jako pravotočivý (značí se *L* či *S*). Racemát je směs obou forem enantiomerů o stejných koncentracích, která je tedy opticky neaktivní. Diastereoizomery jsou optické izomery, u nichž se míra otáčení liší.

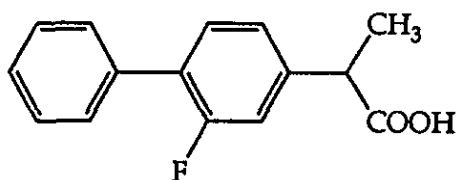
4.2.1.1 PROFENY

Profeny jsou deriváty 2-arylpropionové kyseliny. Všechny tyto kyseliny jsou chirální látky obsahující chirální uhlík v α -pozici propionové jednotky. Z fyzikálně-chemického hlediska se jedná o slabé jednosytné kyseliny

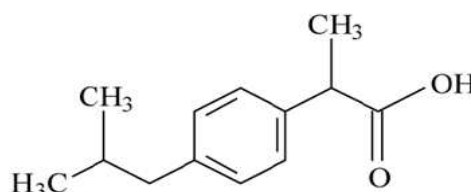
s hodnotou aciditní disociační konstanty řádově 10^{-4} . Míru jejich disociace ve vodných roztocích lze tedy ovlivnit volbou pH separačního pufru. V závislosti na pH se v roztoku mohou vyskytovat jako neutrální molekuly a/nebo jako anionty, tedy ve své disociované formě. Tab. 1 zobrazuje stručný přehled systematických názvů a hodnot pK'_a vybraných profenů. Na Obr. 3 jsou znázorněny jejich chemické struktury.

Tabulka 1: Názvy vybraných profenů.

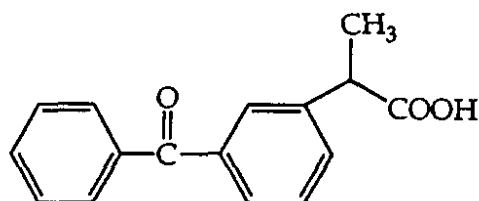
Generický název	Systematický (chemický) název	pK'_a [8], [9]
Flurbiprofen	2-(2-fluoro-4-bifenylyl)propionová kyselina	4,13
Ibuprofen	2-(4-isobutylyfenyl)propionová kyselina	4,12
Ketoprofen	2-(3-benzoylphenyl)propionová kyselina	4,03
(S)-Naproxen	(S)-(+)-2-(6-methoxynaftalen-2-yl)propionová kyselina	4,26



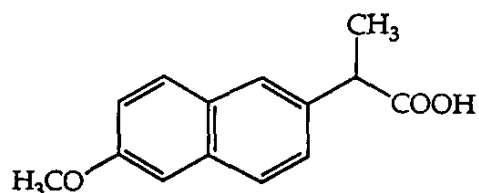
FLURBIPROFEN



IBUPROFEN



KETOPROFEN



NAPROXEN

Obrázek 3: Struktura vybraných profenů [8], [10].

Z farmakologického hlediska se profeny řadí do skupiny nesteroidních protizánětlivých léčiv. Léky obsahující jako léčivou složku profeny jsou dostupné jako racemáty či s příměsí neaktivní formy. Léčivé účinky má ve většině případů S-forma. V organismu dochází k metabolické inverzi profenové R-formy na S-formu [11], [12]. Rozsah této inverze závisí na struktuře arylpropionové kyseliny a živočišném druhu [13]. Někteří pacienti, zejména ve vyšším věku, mohou mít metabolismus pomalejší. Neaktivní enantiomer se potom vyskytuje v těle ve vyšším množství, což má na organismus nepříznivé účinky. Kontrola optické čistoty léčiva a separace jednotlivých enantiomerů profenů je z tohoto hlediska nezbytná.

Mechanismus působení profenů je založen na inhibici cyklooxygenáz COX-1 a COX-2 (jedná se o enzymy na endoplazmatickém retikulu, které se účastní přeměny kyseliny arachidonové, jež se uvolní z poškozené membrány, na prostaglandiny hrající významnou úlohu při zánětlivých procesech) [14]. Léčivý účinek vyplývá z inhibice cyklooxygenázy COX-2. Inhibicí COX-1, které se nelze vyhnout, je dosaženo spíše nežádoucích účinků (např. dysfunkce krevních destiček) [15].

Profeny mají převážně analgetický, antipyretický a protizánětlivý účinek. Proto se užívají ke snížení horečky, k potlačení bolesti, proti menstruačním křečím, k léčbě zánětů, tkáňových zranění, artritidy a jiných muskuloskeletárních onemocnění. K hlavním nežádoucím účinkům užívání profenů patří problémy s gastrointestinálním traktem (nauzea, krvácení, perforace), kardiovaskulárním systémem (porucha krvetvorby, zvýšené riziko infarktu myokardu), zrakové a sluchové potíže, narušení rovnováhy, hypertenze, porucha funkce jater nebo ledvin a další [14], [16]-[20].

4.2.2 PRINCIP CHIRÁLNÍ SEPARACE KAPILÁRNÍ ZÓNOVOU ELEKTROFORÉZOU

Jednotlivé enantiomery opticky aktivního analytu vykazují v nechirálním prostředí shodnou elektroforetickou pohyblivost a jsou tedy z elektromigračního hlediska nerozlišitelné. Jejich CZE separace vyžaduje přítomnost vhodného

aditiva, tzv. chirálního selektoru, který je buď přidán do BGE, nebo je navázán na vnitřní stěnu kapiláry. Chirální selektor tvoří s jednotlivými enantiomery zvoleného analytu diastereoizomerní komplexy stabilizované slabými (nekovalentními) mezimolekulárními interakcemi (vazbami hydrofobními, elektrostatickými, van der Waalsovými a vodíkovými můstky). Velmi často se na vzniku vazby podílí více mechanismů a slabých interakcí současně. Je-li afinita k chirálnímu selektoru pro jednotlivé enantiomery odlišná, liší se pak jejich elektroforetické pohyblivosti a může dojít k jejich separaci.

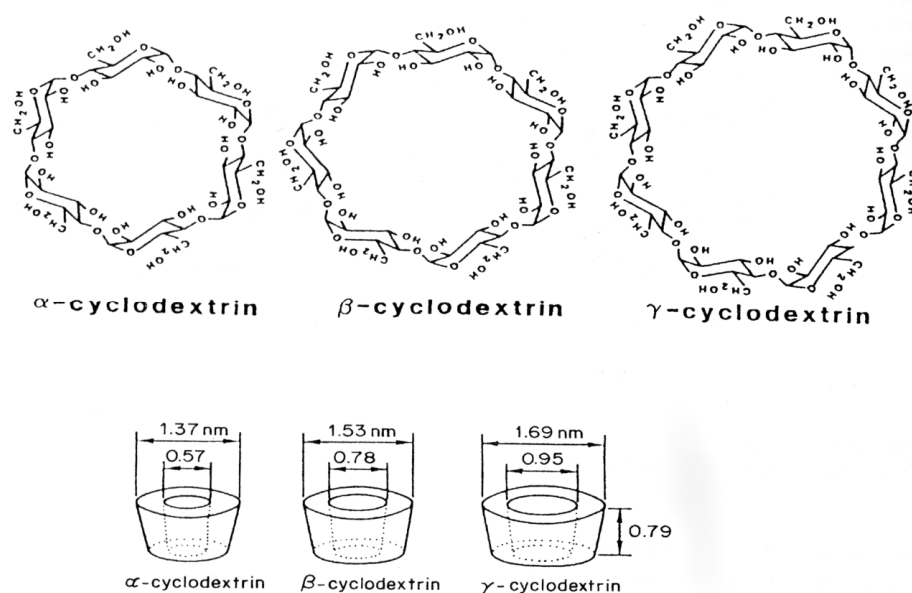
4.2.2.1 FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ CHIRÁLNÍ SEPARACI KAPILÁRNÍ ZÓNOVOU ELEKTROFORÉZOU

Chirální separaci ovlivňuje řada faktorů. Např. použitá koncentrace zvoleného chirálního selektoru ovlivňuje migrační časy analytů, a tím i rozdíly v migračních časech mezi enantiomery. Za optimální koncentraci selektoru je považována ta koncentrace, při které je rozdíl v migračních časech mezi enantiomery použitého analytu maximální. Mezi další faktory mající vliv na chirální separaci patří pH a složení separačního pufru [21], [22], [23]. Hodnota pH základního elektrolytu určuje náboj analyzovaných látek, a také velikost a směr EOF v kapiláře. Přídavkem organické látky do základního elektrolytu lze ovlivnit rozpustnost analytu a selektoru, docílit změny jejich vzájemné interakční rovnováhy, vodivosti BGE a pohyblivosti EOF [24]. Vlivem rozměrů kapiláry na chirální separaci se zabýval Pettersen [25]. Čím je průměr kapiláry menší a její délka větší, tím se enantiomery analytu lépe rozdělí. Výrazný vliv na oddělení enantiomerů má i náboj vnitřní stěny kapiláry. Ten lze měnit tzv. coatingem. Coating může být realizován tak, že se vnitřní stěna kapiláry pokryje látkou modifikující její náboj, což má za následek snížení interakce složek separačního systému se stěnou kapiláry či změnu pohyblivosti elektroosmotického toku. V neposlední řadě ovlivňuje chirální separaci také teplota a napětí vložené na elektrody.

4.2.3 CYKLODEXTRINY

Mezi populární a nejvíce prostudované chirální selektory patří cyklodextriny (CD) a jejich deriváty. Hojně se však používají také makrocyclická antibiotika, necyklické oligosacharidy, polymerní chirální selektory, peptidy a proteiny či crown ethery [26].

Nativní cyklodextriny jsou cyklické oligosacharidy, jejichž strukturu tvoří 6 až 12 β -1,4-D-glykosidů spojených α -1,4 vazbami. Nejčastěji se používají cykly o šesti, sedmi a osmi jednotkách označované jako α -, β - a γ -cyklodextrin, jejichž struktura je zobrazena na Obr. 4.



Obrázek 4: Struktura α , β , γ -cyklodextrinu a schémata kavit cyklodextrinů [1].

Ve vodných roztocích připomínají nativní cyklodextriny tvarem dutý komolý kužel. Průměr kavity se liší v závislosti na typu cyklodextrinu. Vnější povrch kavity je hydrofilní (díky sekundárním 2- a 3-hydroxylovým skupinám na širším okraji a primárním 6-hydroxylům na užším okraji kavity). Vnitřní povrch kavity je díky přítomnosti vodíků a etherických kyslíků hydrofóbní. Vybrané vlastnosti α -, β - a γ -CD jsou shrnuty v Tab. 2.

Tabulka 2: Stručný přehled vlastností α -, β - a γ -CD [1], [27].

Charakteristika	α -CD	β -CD	γ -CD
počet glukosových jednotek	6	7	8
relativní molekulová hmotnost	972	1135	1297
rozpuštnost ve vodě [g/100ml]	14,5	1,9	23,2
průměr kavity [nm]	0,47-0,53	0,6-0,65	0,75-0,83
hloubka kavity [nm]	0,79±0,01	0,79±0,01	0,79±0,01
pK_a	12,33	12,20	12,08
vnitřní objem kavity [nm ³]	17,4	26,2	47,2

Nativní cyklodextriny jsou nenabitě molekuly a z tohoto důvodu mohou být využity pouze pro CZE separaci nabitých analytů. Vhodnou substitucí nativních CD se připravují deriváty vykazující lepší rozpoznávací schopnost vůči vybraným typům analytů. Nejčastějšími substituenty na cyklodextrinovém kruhu jsou methyly a hydroxypropyly. Např. methylovaný β -CD je flexibilnější a má oproti nativnímu β -CD hlubší kavitu kvůli redukci vodíkových můstků [1].

Pro separaci nabitých, ale i neutrálních látek se využívají nabitě cyklodextrinové deriváty, které vykazují v elektrickém poli vlastní elektroforetickou pohyblivost. Oproti nativním CD se vyznačují též výrazně vyšší rozpustností ve vodě. K často využívaným nabitým selektorům patří sulfatované cyklodextriny. Podrobnější popis vlastností a využití některých typů chirálních selektorů byla věnována kap. 3.3 bakalářské práce [26].

4.3 KONSTANTA STABILITY

4.3.1 DEFINIČNÍ VZTAHY

Konstanta stability K (affinity, association, binding, complexation, formation constant) popisuje tvorbu komplexu AS z volného analytu A a selektoru S. Uvažujeme-li interakci analytu a selektoru v jednotkovém stechiometrickém poměru podle rovnice



pak je termodynamická konstanta stability definována relací

$$K = \frac{a_{AS}}{a_A a_S}, \text{ resp. } K = \frac{c_{AS} \gamma_{AS}}{c_A \gamma_A c_S \gamma_S} \quad (10)$$

kde a označuje aktivitu, c molární koncentraci a γ aktivní koeficient příslušné složky reakce (9).

Nahrazením aktivit jednotlivých složek reakce příslušnými molárními koncentracemi (příslušné aktivní koeficienty považujeme za jednotkové) získáme tzv. zdánlivou konstantu stability K' [$\text{dm}^3 \text{mol}^{-1}$]

$$K' = \frac{[AS]}{[A][S]}, \quad (11)$$

kde symbol $[i]$ vyjadřuje molární koncentraci i -té složky reakce.

4.3.2 FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ HODNOTU KONSTANTY STABILITY

Hodnota termodynamické konstanty stability (10) je závislá pouze na teplotě. Zdánlivá konstanta stability (11) však při zvolené teplotě závisí také na iontové síle separačního elektrolytu. V případě využití CZE pro stanovení konstant stability je získaná hodnota konstanty navíc ovlivněna viskozitou

použitého základního elektrolytu. Viskozita BGE má na konstantu stability nepřímý vliv. Přímo působí na pohyblivosti iontů v separačním systému, které jsou pak použity pro výpočet konstanty stability.

4.3.2.1 IONTOVÁ SÍLA

Pro stanovení termodynamické konstanty stability je nezbytný výpočet příslušných aktivitních koeficientů, jak vyplývá ze vztahu (10). Aktivitní koeficient závisí na hodnotě iontové síly separačního roztoku, na vlastnostech použitého rozpouštědla a příslušného iontu. Výpočet aktivitních koeficientů znesnadňují často nedostupné hodnoty nábojových čísel příslušných iontů (např. v případě tvorby komplexu s komerčně dostupnými sulfatovanými cyklodextriny [28]). Výpočet iontové síly je možný pouze při znalosti přesného složení separačního elektrolytu. V mnohých případech je však požadované hodnoty pH základního elektrolytu dosaženo titrací, což následně výpočet iontové síly znemožňuje.

4.3.2.2 VISKOZITA

Ke změně viskozity separačního systému dochází tehdy, přidáváme-li chirální selektor přímo do základního elektrolytu. Se zvyšující se koncentrací chirálního selektoru roste viskozita základního elektrolytu, a tím dochází k ovlivnění pohyblivostí všech přítomných látek.

V literatuře bylo popsáno několik způsobů korekce pohyblivostí sledovaných iontů na viskozitu BGE. Jednou z možností je využití tzv. markeru viskozity, tj. látky, jejíž pohyblivost je ovlivňována pouze změnou viskozity základního elektrolytu. Nalezení takového viskozitního markeru je poměrně problematické, neboť pohyblivost tohoto markeru by neměla být ovlivněna interakcí se žádnou ze složek separačního systému (analytem, selektorem ani puřrem) ani se stěnou kapiláry. Jeho velikost, náboj a struktura by se měly co možná nejvíce „podobat“ vlastnostem sledovaného komplexu. Při použití markeru viskozity lze viskozitní korekční faktor v určit jako poměr

elektroforetických pohyblivostí viskozitního markeru M v BGE bez přidavku selektoru $\mu_{M,0}$ a v BGE s určitou koncentrací selektoru μ_M

$$v = \frac{\mu_{M,0}}{\mu_M}. \quad (12)$$

Analogicky jako při použití viskozitního markeru lze korekční faktor v získat pomocí poměru proudů [29] v BGE bez přidavku selektoru $I_{S,0}$ a při určité koncentraci selektoru I_S

$$v = \frac{I_{S,0}}{I_S}. \quad (13)$$

Dalším možným způsobem korekce pohyblivostí iontů na viskozitu BGE je použití metody mobilitních poměrů [30]. Korekční faktor v lze získat z poměru pozorované elektroforetické pohyblivosti i -tého iontu $\mu_{\text{poz},i}$ a z pohyblivosti markeru EOF μ_{EOF}

$$v = \frac{\mu_{\text{poz},i}}{\mu_{\text{EOF}}}. \quad (14)$$

Někteří autoři provádějí stanovení viskozitního korekčního faktoru přímým měřením viskozity používaných pufrů viskozimetrem. Tento přístup ovšem zaměřuje tzv. makroskopickou viskozitu (veličina, jejíž hodnotu lze stanovit viskozimetrem) s tzv. mikroskopickou viskozitou, jak zmiňuje Erdey-Grúz [31]. Pohyblivost „malých“ iontů je ovlivňována mikroviskozitou separačního prostředí. Pokud však „malá“ molekula analytu komplexuje s „velkým“ selektorem jako je např. cyklodextrin, je pak pohyblivost vzniklého komplexu závislá na makroviskozitě prostředí [32].

4.3.3 PUBLIKOVANÉ POSTUPY STANOVENÍ KONSTANT STABILITY METODOU CZE

Ke stanovení konstant stability je možno využít různé experimentální přístupy a metody (např. UV/VIS, NMR) včetně postupů elektroforetických. Kapilární zónovou elektroforézu pro stanovení konstant stability využila celá řada výzkumných týmů [8], [33], [34], [35]. Konstanty stability konkrétně profenu se zvoleným chirálním selektorem byly elektroforeticky stanoveny Lelièvrem a Gareilem [8]. Využili separačních pufrů o různých hodnotách pH, v nichž stanovili příslušné efektivní pohyblivosti zkoumaného profenu při dvou různých koncentracích použitého chirálního selektoru. Řešením soustavy dvou rovnic o dvou neznámých pak vypočítali hledanou konstantu stability a pohyblivost vzniklého komplexu. Takto navržený postup stanovení konstant stability profenu však nebere v úvahu některé podstatné aspekty. Při jedné ze zvolených hodnot pH separačního pufru (pH 4) se profeny vyskytují jak ve své nabitě, tak i nenabitě formě, přičemž obě formy se zvoleným chirálním selektorem interagují. Interakce nenabitě formy profenu s použitým chirálním selektorem nebyla autory zmiňované práce vzata v úvahu. Výpočet hodnoty iontové síly základních elektrolytů je do značné míry ovlivněn způsobem přípravy separačních pufrů. Pufry byly připravovány titrací použité kyseliny hydroxidem sodným, aby bylo dosaženo požadované hodnoty pH, tudíž přesné složení pufrů (koncentrace jednotlivých složek) pravděpodobně není známo. Navíc autory uváděná hodnota iontové síly používaných pufrů (75 mmol dm^{-3}) je poměrně vysoká a stanovené zdánlivé konstanty stability se tedy budou významně lišit od termodynamických.

5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5.1 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE

Monohydrát hydroxidu lithného (99%) a heptakis(2,3,6-tri-*O*-methyl)- β -cyklodextrin (TM- β -CD) (98%) byly dodány firmou Fluka (Seelze, Německo). β -Alanin (99%), dimethylsulfoxid (DMSO) (99,9%), (*S*)-(+)-flurbiprofen (98%), (*R*)-(-)-flurbiprofen (97%), (*S*)-(+)-ibuprofen (99%), (*S*)-(+)-ketoprofen (99%), (*S*)-(+)-naproxen (98%) byly zakoupeny od firmy Sigma Aldrich (Praha, Česká republika). Racemická směs flurbiprofenu pocházela od firmy Boots Chemicals (Londýn, Velká Británie). Kyselina octová (99%) byla vyrobena společností Penta (Praha, Česká republika). Thiomočovina (99%) a chlorid draselný (p.a.) byly dodány firmou Lachema (Brno, Česká republika).

5.2 INSTRUMENTACE A PROGRAMY

Instrumentace

Měření pH bylo prováděno na digitálním pH-metru PHM 220 s kombinovanou skleněnou elektrodou od firmy Radiometer (Kopenhagen, Dánsko). Ke kalibraci pH-metru byly použity technické pufrы od firmy Radiometer (Kopenhagen, Dánsko). V kyselé oblasti pH byl použit technický pufr o hodnotě pH 1,679, v neutrální oblasti o hodnotě pH 7,000 a v zásadité oblasti o hodnotě pH 12,45.

Všechny elektroforetické experimenty byly proměřeny na HP^{3D}CE systému pro kapilární elektroforézu (Agilent Technologies, Waldbronn, Německo). Tento přístroj byl vybaven spektrofotometrickým UV/VIS detektorem s diodovým polem a bezkontaktním vodivostním detektorem [36].

Pro všechny experimenty byla použita nepokrytá křemenná kapilára (Composite Metal Services LTD, Hallow, Velká Británie) s vnitřním průměrem 50 μm o celkové délce přibližně 60 cm. Nová kapilára byla promývána 15 minut destilovanou vodou, 5 minut 0,1 mol dm^{-3} NaOH, 15 minut destilovanou vodou a 10 minut příslušným separačním pufrem. Pro ustálení elektroosmotického

toku byla kapilára naplněna příslušným separačním pufrům a na elektrody bylo vloženo napětí 15 kV po dobu 30 minut. Před každým experimentem byla kapilára proplachována příslušným základním elektrolytem po dobu 3 minut. Všechny elektroforetické experimenty probíhaly při napětí 20 kV. Termostat zajišťující temperování kazety s kapilárou byl nastaven na teplotu 25 °C.

Všechny roztoky byly připraveny z destilované vody, produkované purifikátorem od firmy Miele (Brno, Česká republika). Pomocí filtrů o velikosti pórů 0,2 μm od firmy Sigma Aldrich (Praha, Česká republika) se filtrovaly všechny použité pufrы.

Programy

Aparaturu HP^{3D}CE systému ovládal a řídil software Agilent ChemStation, který sloužil také ke sběru a vyhodnocení experimentálních dat. Pro nalezení složení vhodných základních elektrolytů bylo využito programu PeakMaster [37]. Pro vyhodnocení a grafické znázornění experimentálních dat byl použit program Origin 8 (Origin Corporation, Northampton, MA, USA).

5.3 PŘÍPRAVA SEPARAČNÍCH ROZTOKŮ

Acetátový pufr o pH 4,88 byl připraven smícháním příslušného objemu zásobního roztoku kyseliny octové o koncentraci 0,0965 mol dm⁻³ a pevného hydroxidu lithného.

β -alaninový pufr o hodnotě pH 10,30 byl připraven navážením příslušného množství β -alaninu a hydroxidu lithného. Tab. 3 shrnuje základní údaje týkající se vlastností a složení použitých pufrů.

Zásobní roztoky všech profenů o koncentraci 0,3 mmol dm⁻³ byly připraveny navážením příslušného množství pevného analytu a jeho rozpuštěním v separačním pufru. Všechny zásobní roztoky analytů byly sonifikovány. K přípravě vzorku pro CZE separaci bylo dané množství zásobního roztoku analytu rozpuštěno v použitém pufru tak, aby výsledná koncentrace analytu ve vzorku byla 0,125 mmol dm⁻³.

Zásobní roztok chirálního selektoru o koncentraci 60 mmol dm^{-3} byl připraven navážením příslušného množství heptakis(2,3,6-tri-O-methyl)- β -cyklodextrinu a jeho rozpuštěním v separačním pufru. Separací pufrů o dané koncentraci TM- β -CD pak byly připraveny smícháním příslušného objemu zásobního roztoku TM- β -CD a pufru. Základní elektrolyty byly filtrovány.

Zásobní roztok DMSO (2% obj.) vznikl smícháním 99,9% DMSO s acetátovým pufrům. Koncentrace DMSO v analyzovaném vzorku byla 0,033%.

Zásobní roztok thiomocoviny o koncentraci 10 mmol dm^{-3} byl připraven rozpuštěním příslušného množství thiomocoviny v β -alaninovém pufru. Koncentrace thiomocoviny ve vzorku pro CZE analýzu byla $0,5 \text{ mmol dm}^{-3}$.

Zásobní roztok KCl o koncentraci 10 mmol dm^{-3} byl získán navážením daného množství KCl. V separačním vzorku byl tento marker viskozity přítomen v koncentraci $1,7 \text{ mmol dm}^{-3}$.

Tabulka 3: Složení pufrů, jejich teoretické a experimentální pH ($\text{pH}_{\text{teor.}}$ a $\text{pH}_{\text{exp.}}$) a iontová síla (I).

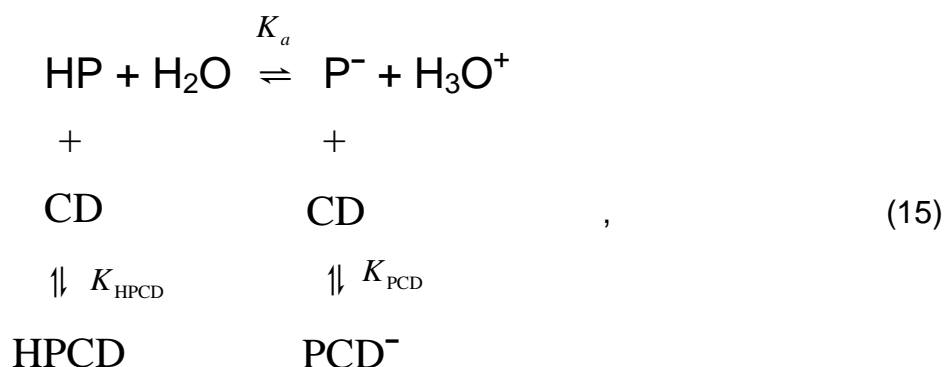
pufr	$c(\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O})$ [mmol dm^{-3}]	$c(\text{CH}_3\text{COOH})$ [mmol dm^{-3}]	$c(\beta\text{-alanin})$ [mmol dm^{-3}]	$\text{pH}_{\text{teor.}}$	$\text{pH}_{\text{exp.}}$	I [mmol dm^{-3}]
acetátový	4,80	8,00	–	4,90	4,88	4,81
β -alaninový	5,00	–	10,00	10,18	10,30	4,99

6. VÝSLEDKY A DISKUZE

6.1 NAVRŽENÍ METODY PRO STANOVENÍ KONSTANT STABILITY METODOU CZE

6.1.1 ODVOZENÍ TEORETICKÝCH VZTAHŮ

Profeny se řadí do skupiny slabých kyselin o hodnotách pK_a přibližně čtyři jednotky, jak je uvedeno v Tab. 1. V prostředí o pH v intervalu přibližně 2-7 jednotek se profeny tedy vyskytují ve své neutrální i nabitě (aniontové) formě. Je-li v takovém prostředí navíc přítomen ještě nenabitý cyklodextrin vytvářející komplex s oběma formami přítomného profenu a za předpokladu, že stechiometrie komplexotvorných reakcí je 1:1, lze takový systém popsat následujícími rovnicemi



kde HP značí neutrální molekulu profenu, P^- anion profenu, CD označuje neutrální cyklodextrin a HPCD a PCD^- symbolizují nenabitý komplex neutrální formy profenu s CD, respektive nabitý komplex CD-anion profenu.

Aciditní rovnováha profenu je popsána zdánlivou disociační konstantou

K'_a

$$K'_a = \frac{[\text{H}_3\text{O}^+][\text{P}^-]}{[\text{HP}]} \quad (16)$$

Symbole K_{HPCD} a K_{PCD} ve schématu (15) označují konstanty stability charakterizující tvorbu komplexu příslušné formy profenu a použitého neutrálního CD. Zdánlivé konstanty stability K'_{HPCD} a K'_{PCD} lze tedy vyjádřit

$$K'_{\text{HPCD}} = \frac{[\text{HPCD}]}{[\text{HP}][\text{CD}]} \quad (17)$$

a

$$K'_{\text{PCD}} = \frac{[\text{PCD}^-]}{[\text{P}^-][\text{CD}]} \quad (18)$$

Použijeme-li výše popsaný systém, tedy separační pufr o pH v rozmezí 2-7 jednotek s přidavkem neutrálního cyklodextrinu, jako základní elektrolyt pro CZE a dávkujeme-li profen, lze efektivní pohyblivost profenu vyjádřit vztahem

$$\mu_{\text{ef}} = \frac{[\text{P}^-]}{c} \mu_{\text{akt,P}^-} + \frac{[\text{PCD}^-]}{c} \mu_{\text{akt,PCD}^-}, \quad (19)$$

kde c označuje celkovou látkovou (analytickou) koncentraci profenu. Analytická koncentrace profenu je dána součtem koncentrací všech forem, v nichž se vybraný profen v separačním systému vyskytuje, tedy

$$c = [\text{P}^-] + [\text{HP}] + [\text{HPCD}] + [\text{PCD}^-]. \quad (20)$$

Vyjádřením např. koncentrací forem P^- , HP , a PCD^- (ze vztahů (16), (17), (18)) a jejich dosazením do rovnice (20) dostáváme výraz

$$c = \frac{K'_a [\text{HPCD}]}{K'_{\text{HPCD}} [\text{CD}] [\text{H}_3\text{O}^+]} + \frac{[\text{HPCD}]}{K'_{\text{HPCD}} [\text{CD}]} + [\text{HPCD}] + \frac{K'_{\text{PCD}} K'_a [\text{HPCD}]}{K'_{\text{HPCD}} [\text{H}_3\text{O}^+]}, \quad (21)$$

ze kterého lze vyjádřit koncentraci neutrálního komplexu HPCD

$$[\text{HPCD}] = \frac{c}{\frac{K'_a}{K'_{\text{HPCD}}[\text{CD}][\text{H}_3\text{O}^+]} + \frac{1}{K'_{\text{HPCD}}[\text{CD}]} + 1 + \frac{K'_{\text{PCD}} K'_a}{K'_{\text{HPCD}}[\text{H}_3\text{O}^+]}}. \quad (22)$$

Dosazením zmiňovaných vztahů a následnou matematickou úpravou získáme vztah pro efektivní pohyblivost zvoleného profenu ve tvaru

$$\mu_{\text{ef}} = \frac{K'_a}{K'_a + [\text{H}_3\text{O}^+] + K'_{\text{HPCD}}[\text{H}_3\text{O}^+][\text{CD}] + K'_{\text{PCD}} K'_a [\text{CD}]} \left(\mu_{\text{akt,P}^-} + K'_{\text{PCD}} [\text{CD}] \mu_{\text{akt,PCD}^-} \right). \quad (23)$$

Vztah (23) vyjadřuje závislost efektivní pohyblivosti vybraného profenu na koncentraci použitého CD. Proměřením experimentální závislosti efektivní pohyblivosti zvoleného profenu na koncentraci chirálního selektoru lze vztah (23) použít k nelineární regresi experimentálně získaných dat. V separačním pufru o zvolené hodnotě pH (tedy určité hodnotě $[\text{H}_3\text{O}^+]$) jsou parametry této nelineární regrese zdánlivé konstanty stability vznikajících komplexů K'_{HPCD} a K'_{PCD} , aktuální pohyblivosti nabitých forem profenu $\mu_{\text{akt,P}^-}$ a $\mu_{\text{akt,PCD}^-}$ a hodnota příslušné zdánlivé disociační konstanty K'_a .

6.1.2 VOLBA SEPARAČNÍCH PODMÍNEK

Experimentální proměření závislosti efektivní pohyblivosti vybraného profenu na koncentraci zvoleného chirálního selektoru lze realizovat např. metodou tzv. afinitní kapilární elektroforézy (affinity capillary electrophoresis, ACE) [38]. Experimentální uspořádání ACE spočívá v přidávání jedné ze složek (analytu nebo selektoru) do pufru a dávkování druhé složky, přičemž koncentrace složky přidávané do pufru se mění.

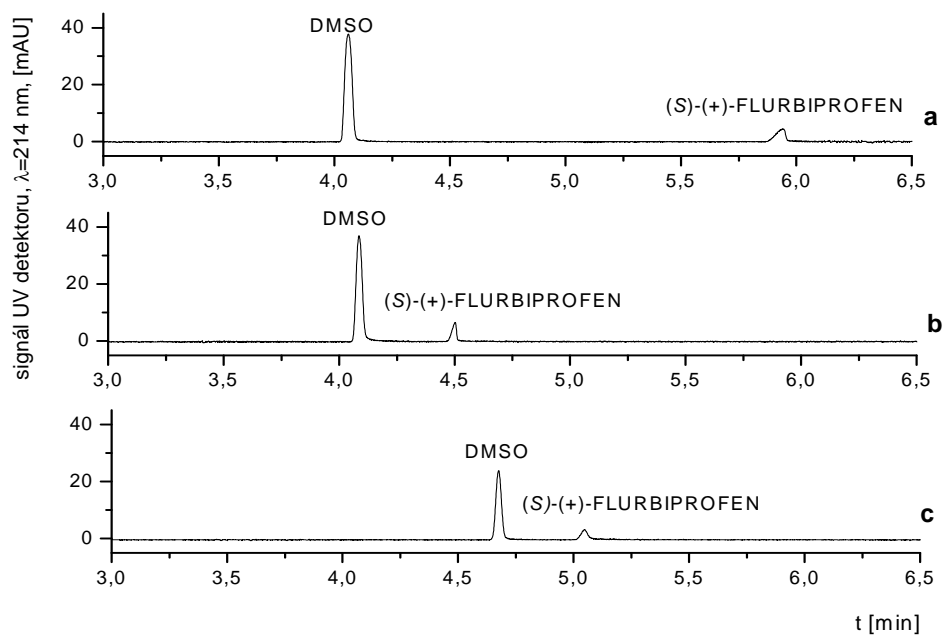
Poměrně obsáhlá skupina profenů byla pro naše účely zredukována a jako analyty byly vybrány enantiomery (S)-(+)-ibuprofen, (S)-(+)-ketoprofen, (S)-(+)-naproxen, (S)-(+)-flurbiprofen, (R)-(-)-flurbiprofen a racemická směs

flurbiprofenu. Na základě publikovaných výsledků chirálních separací profenů [8], [39] byl jako vhodný chirální selektor zvolen heptakis(2,3,6-tri-*O*-methyl)- β -cyklodextrin, který se ve vodných roztocích vyskytuje jako nenabitá molekula a vykazuje dobrou rozpustnost.

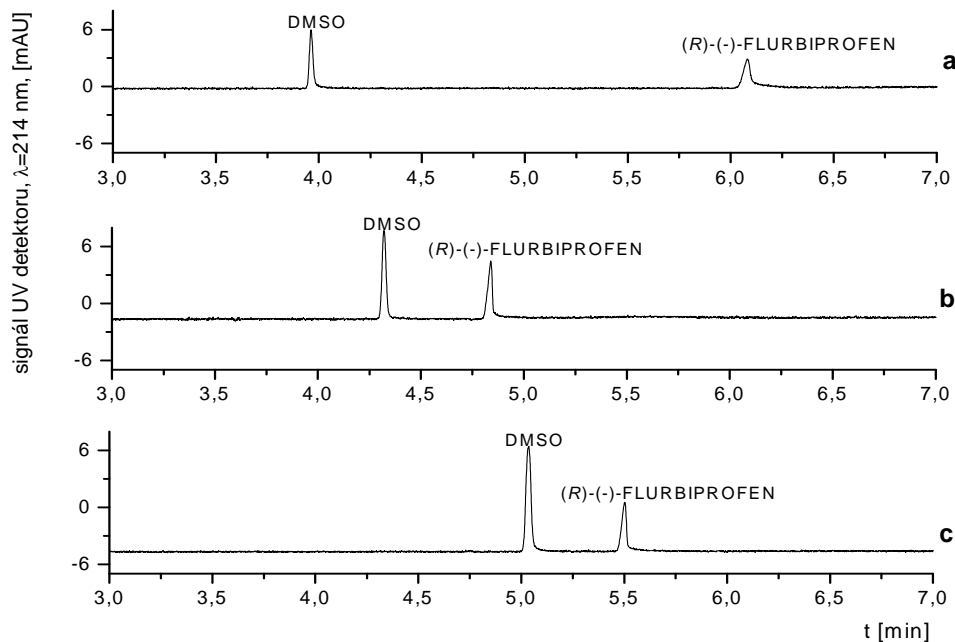
Acetátový pufr o teoretické hodnotě pH 4,90 a iontové síle přibližně 5 mmol dm⁻³ byl zvolen jako separační pufr a DMSO jako marker EOF. Při dané hodnotě pH acetátového pufru je DMSO neutrální molekula, jejíž interakce se složkami separačního systému nebyly v literatuře popsány.

6.1.3 EXPERIMENTY V ACETÁTOVÉM PUFRU

V acetátovém pufru byla proměřena závislost efektivní pohyblivosti (*S*)-(+)-, (*R*)-(-)-flurbiprofenu a racemické směsi flurbiprofenu na koncentraci TM- β -CD v rozmezí 0-50 mmol dm⁻³. Koncentrace TM- β -CD v separačním pufru byly 0, 1, 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 a 50 mmol dm⁻³. Pro koncentrace 0, 1, 3, 5, 10, 15, 20, 25 a 30 mmol dm⁻³ TM- β -CD v separačním pufru byly proměřeny efektivní pohyblivosti pro (*S*)-(+)-ibuprofen a (*S*)-(+)-naproxen. Pro koncentrace o hodnotách TM- β -CD 0, 2, 4, 5, 8, 10, 13, 15, 18, 20, 23, 25, 28 a 30 mmol dm⁻³ byly proměřeny efektivní pohyblivosti (*S*)-(+)-ketoprofenu. Každý experiment byl opakován třikrát. Na Obr. 5 a 6 je znázorněn typický záznam UV/VIS detektoru pro (*S*)-(+)-, (*R*)-(-)-flurbiprofen v acetátovém pufru s přídatkem TM- β -CD o koncentracích 0, 10 a 30 mmol dm⁻³.

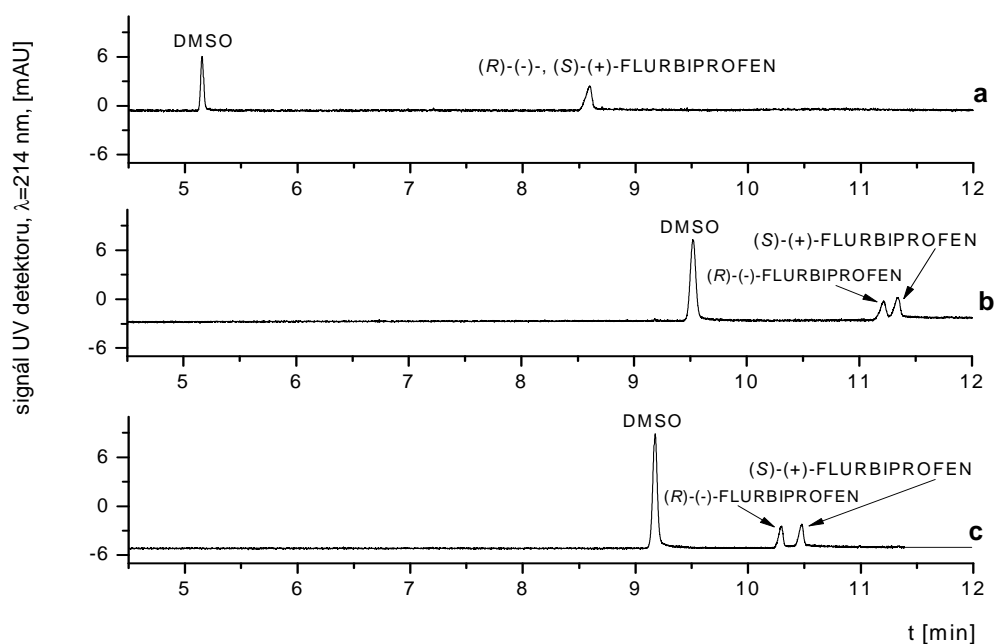


Obrázek 5: Záznam UV/VIS detektoru pro (S)-(+)-flurbiprofen v acetátovém pufru o pH 4,88 obsahujícím (a) 0 mmol dm⁻³, (b) 10 mmol dm⁻³, (c) 30 mmol dm⁻³ TM-β-CD. Separační kapilára o vnitřním průměru 50 μm, 50,7/59,2 cm detektor/celková délka; separační napětí 20 kV; teplota 25 °C. Dávkovaný vzorek (S)-(+)-flurbiprofenu 0,125 mmol dm⁻³ a DMSO 0,033%; dávkování 15 mbar 6s.



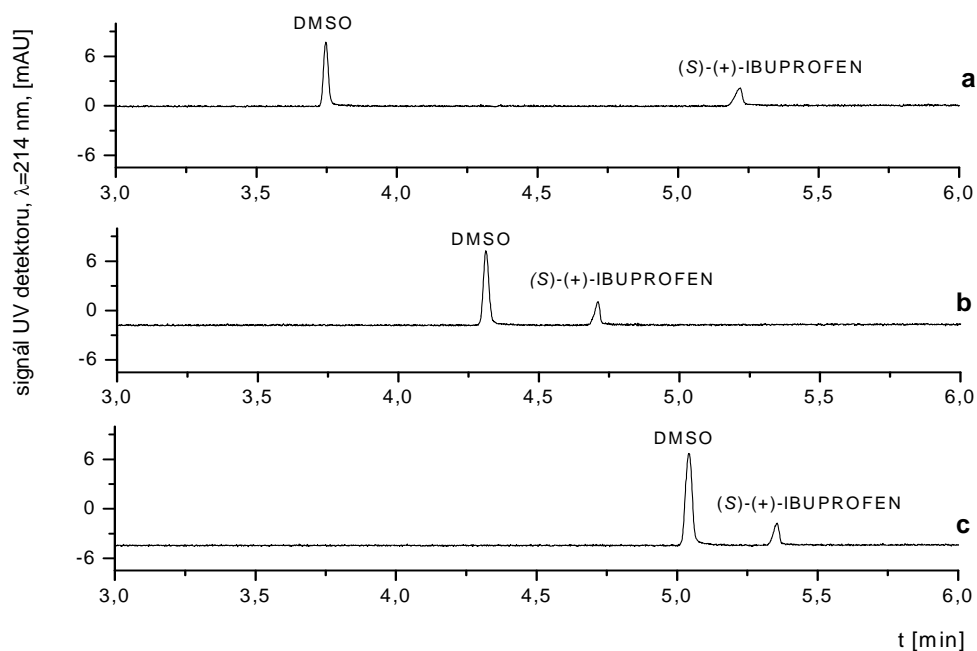
Obrázek 6: Záznam UV/VIS detektoru pro (R)-(-)-flurbiprofen v acetátovém pufru o pH 4,88 obsahujícím (a) 0 mmol dm⁻³, (b) 10 mmol dm⁻³, (c) 30 mmol dm⁻³ TM-β-CD. Separační kapilára o vnitřním průměru 50 μm, 47,8/56,3 cm detektor/celková délka; separační napětí 20 kV; teplota 25 °C. Dávkovaný vzorek (R)-(-)-flurbiprofenu 0,125 mmol dm⁻³ a DMSO 0,033%, dávkování 15 mbar 6s.

Obr. 7 znázorňuje sadu elektroferogramů racemické směsi flurbiprofenu v acetátovém pufru s 0, 25 a 50 mmol dm⁻³ TM-β-CD. K separaci jednotlivých enantiomerů racemické směsi flurbiprofenu došlo při koncentraci TM-β-CD vyšší než 25 mmol dm⁻³, což je v souladu s publikovanými výsledky [39].

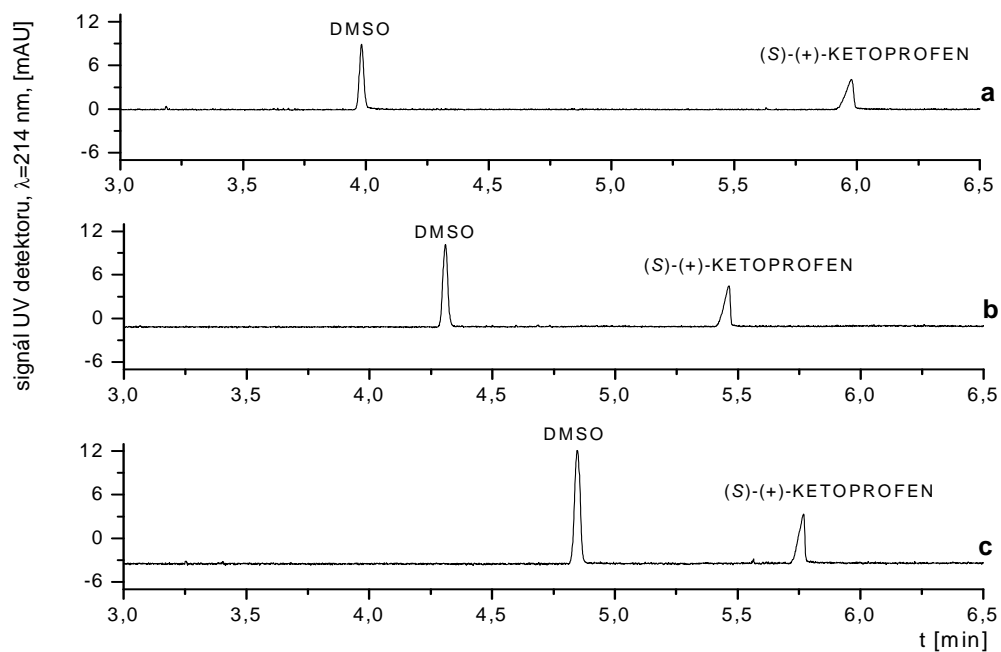


Obrázek 7: Záznam UV/VIS detektoru pro racemickou směs flurbiprofenu v acetátovém pufru o pH 4,88 obsahujícím (a) 0 mmol dm⁻³, (b) 25 mmol dm⁻³, (c) 50 mmol dm⁻³ TM-β-CD. Separační podmínky: stejné jako u Obr. 5.

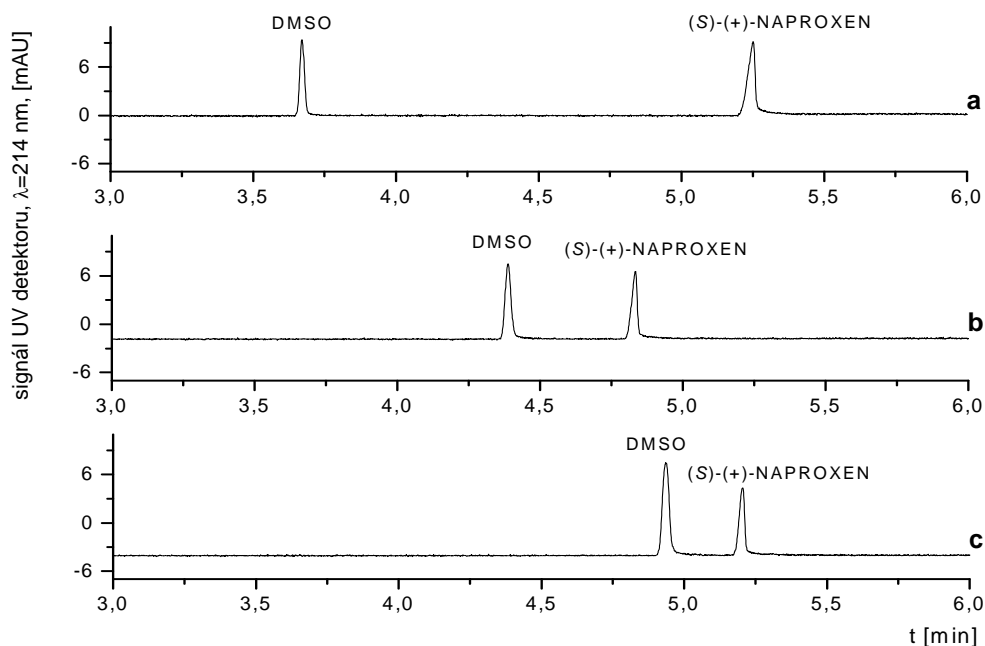
Typické elektroferogramy (S)-(+)-ibuprofenu, (S)-(+)-ketoprofenu a (S)-(+)-naproxenu v acetátovém pufru obsahujícím TM-β-CD o koncentracích 0, 10 a 30 mmol dm⁻³ jsou zobrazeny na Obr. 8, 9, 10.



Obrázek 8: Záznamu UV/VIS detektoru pro (S)-(+)-ibuprofen v acetátovém pufru o pH 4,88 obsahujícím (a) 0 mmol dm⁻³, (b) 10 mmol dm⁻³, (c) 30 mmol dm⁻³ TM-β-CD. Separační kapilára o vnitřním průměru 50 μm, 47,8/56 cm detektor/celková délka; separační napětí 20 kV; teplota 25 °C. Dávkovaný vzorek (S)-(+)-ibuprofenu 0,125 mmol dm⁻³ a DMSO 0,033%, dávkování 15 mbar 6s.



Obrázek 9: Záznam UV/VIS detektoru pro (S)-(+)-ketoprofen v acetátovém pufru o pH 4,88 obsahujícím (a) 0 mmol dm⁻³, (b) 10 mmol dm⁻³, (c) 30 mmol dm⁻³ TM-β-CD. Separační podmínky: stejné jako u Obr. 8.



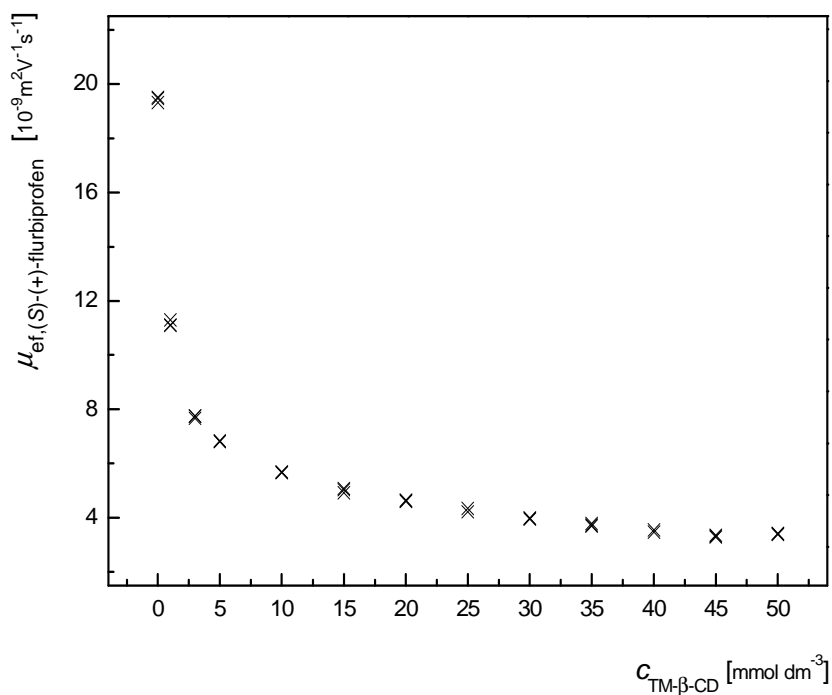
Obrázek 10: Záznam UV/VIS detektoru pro (S)-(+)-naproxen v acetátovém pufru o pH 4,88 obsahujícím (a) 0 mmol dm⁻³, (b) 10 mmol dm⁻³, (c) 30 mmol dm⁻³ TM-β-CD. Separční podmínky: stejné jako u Obr. 8.

6.1.4 ODEČET MIGRAČNÍCH ČASŮ ANALYTŮ V ACETÁTOVÉM PUFRU

Píky sledovaných analytů získané při CZE experimentech v acetátovém pufru vykazovaly vlivem elektromigrační disperze rozmytý trojúhelníkovitý tvar. Pro odečet migračních časů bylo využito fitování experimentálních píků analytů HVL funkcí. Porovnáním pozorovaných pohyblivostí analytu vypočítaných z migračních časů získaných pomocí HVL funkce a pozorovaných pohyblivostí analytu vypočítaných pomocí migračních časů získaných z vrcholu píků byla zjištěna odchylka přibližně 1,9 %. Z tohoto důvodu lze příspěvek elektromigrační disperze k rozmývání píků sledovaných analytů považovat za zanedbatelný, tedy nemající vliv na výpočet pozorované pohyblivosti zkoumaných analytů z jejich migračních časů. Proto se HVL funkce pro odečet migračních časů analytů v acetátového pufru dále nepoužívala.

6.1.5 ZÁVISLOST EFEKTIVNÍCH POHYBLIVOSTÍ NA KONCENTRACI CYKLODEXTRINU V ACETÁTOVÉM PUFRU

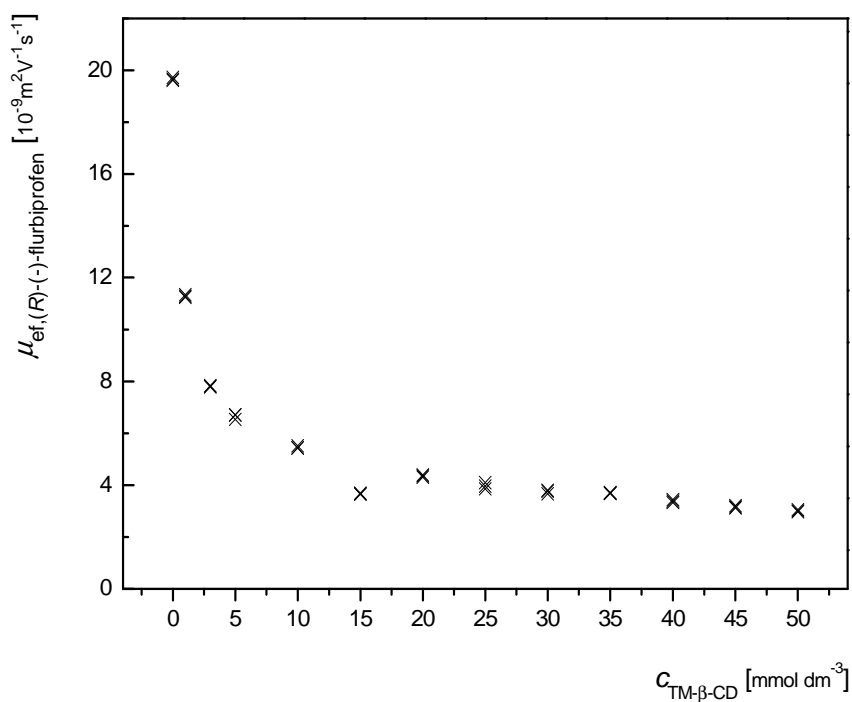
Efektivní pohyblivosti sledovaných analytů v acetátovém pufru o různých koncentracích TM- β -CD byly vypočítány pomocí vztahů (6) a (8) a zaznamenány do grafů v závislosti na koncentraci TM- β -CD v základním elektrolytu. Pro všechny zkoumané analyty jsou získané závislosti zobrazeny na Obr. 11 až 17. Tab. 4 až 10 uvádí průměrné hodnoty stanovených efektivních pohyblivosti sledovaných analytů. Pro grafické znázornění však byly využity všechny efektivní pohyblivosti vypočtené ze tří provedených experimentů při dané koncentraci TM- β -CD v BGE. Z grafického zobrazení závislosti efektivních pohyblivosti na koncentraci TM- β -CD v BGE (Obr. 11 až 17) i z hodnot efektivních pohyblivosti uvedených v Tab. 4 až 10 je patrné, že se vzrůstající koncentrací TM- β -CD v separačním pufru klesá efektivní pohyblivost analytů. Důvodem snižování efektivní pohyblivosti profenů s rostoucí koncentrací TM- β -CD v základním elektrolytu je především tvorba komplexu mezi profenem a TM- β -CD a také rostoucí viskozita BGE.



Obrázek 11: Závislost efektivní pohyblivosti (S)-(+)-flurbiprofenu na koncentraci TM-β-CD v acetátovém pufru.

Tabulka 4: Průměrné hodnoty efektivních pohyblivostí (S)-(+)-flurbiprofenu v acetátovém pufru s přidavkem TM-β-CD.

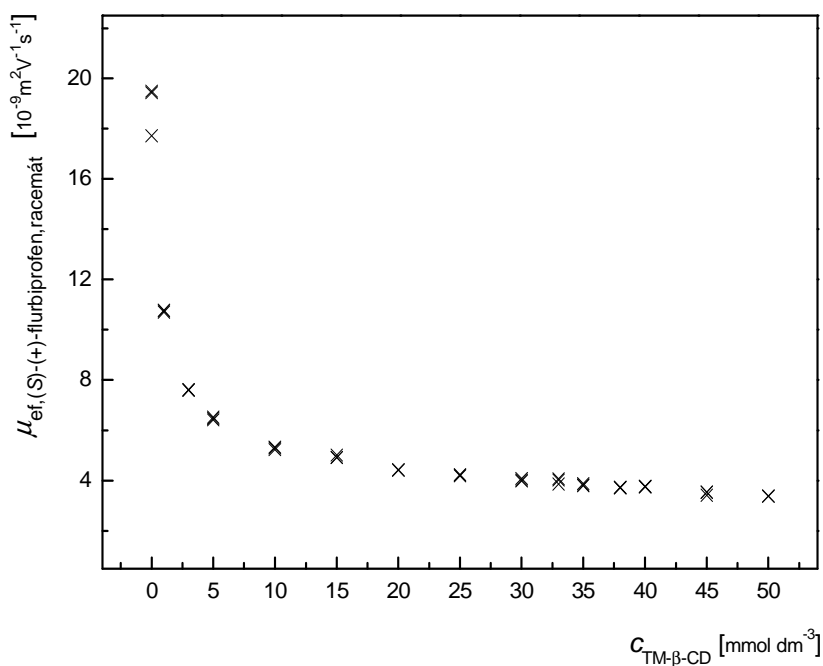
$c_{\text{TM-}\beta\text{-CD}}$ [mmol dm ⁻³]	$\mu_{\text{ef}, (S)-(+)\text{-flurbiprofen}}$ [$10^{-9} \text{m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$]
0	19,43
1	11,17
3	7,73
5	6,82
10	5,67
15	5,01
20	4,62
25	4,30
30	3,97
35	3,74
40	3,53
45	3,32
50	3,41



Obrázek 12: Závislost efektivní pohyblivosti (*R*)-(-)-flurbiprofenu na koncentraci TM-β-CD v acetátovém pufru.

Tabulka 5: Průměrné hodnoty efektivních pohyblivostí (*R*)-(-)-flurbiprofenu v acetátovém pufru s přidavkem TM-β-CD.

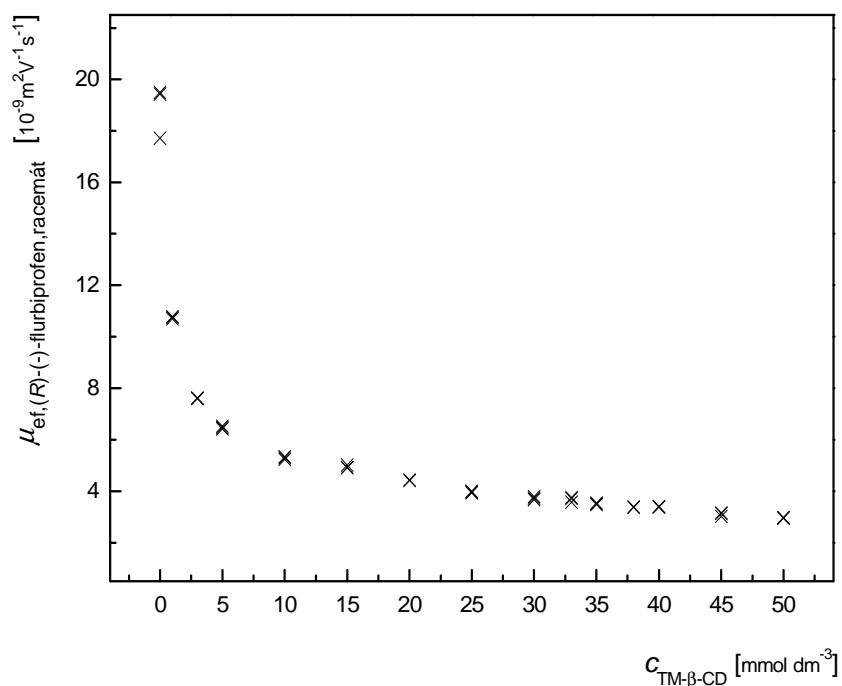
$C_{\text{TM-}\beta\text{-CD}}$ [mmol dm ⁻³]	$\bar{\mu}_{\text{ef}, (R)-(-)\text{-flurbiprofen}}$ [$10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$]
0	19,67
1	11,29
3	7,81
5	6,65
10	5,46
15	3,67
20	4,36
25	3,97
30	3,74
35	3,69
40	3,39
45	3,17
50	3,01



Obrázek 13: Závislost efektivní pohyblivosti (S)-(+)-flurbiprofenu z racemické směsi na koncentraci TM-β-CD v acetátovém pufru.

Tabulka 6: Průměrné hodnoty efektivních pohyblivostí (S)-(+)-flurbiprofenu z racemické směsi v acetátovém pufru s přidavkem TM-β-CD.

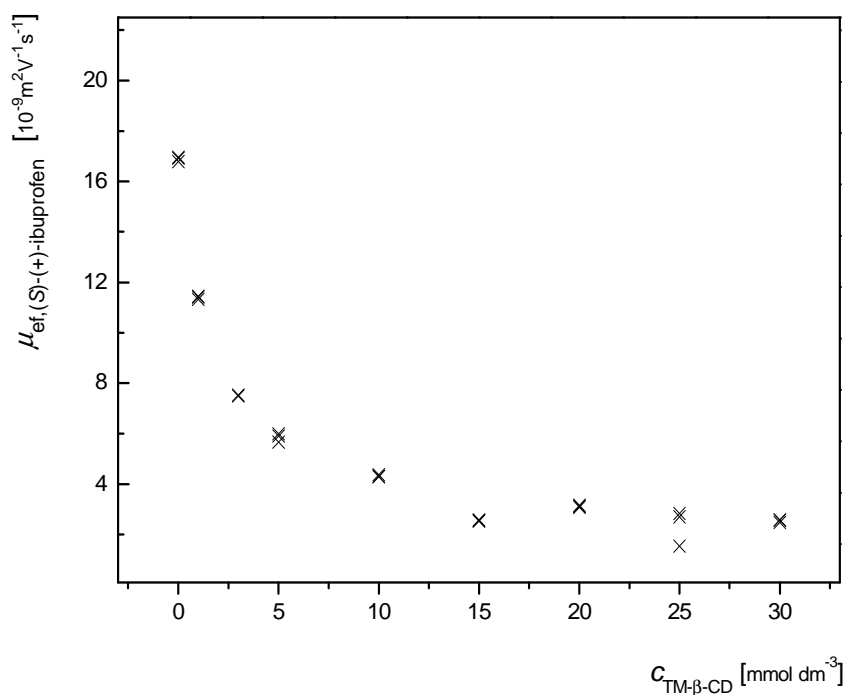
$C_{\text{TM-}\beta\text{-CD}}$ [mmol dm ⁻³]	$\overline{\mu}_{\text{ef}, (S)-(+)\text{-flurbiprofen, racemat}}$ [$10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$]
0	18,88
1	10,75
3	7,60
5	6,47
10	5,29
15	4,95
20	4,43
25	4,21
30	4,03
33	3,99
35	3,83
38	3,73
40	3,76
45	3,50
50	3,38



Obrázek 14: Závislost efektivní pohyblivosti (*R*)-(-)-flurbiprofenu z racemické směsi na koncentraci TM-β-CD v acetátovém pufru.

Tabulka 7: Průměrné hodnoty efektivních pohyblivostí (*R*)-(-)-flurbiprofenu z racemické směsi v acetátovém pufru s přidavkem TM-β-CD.

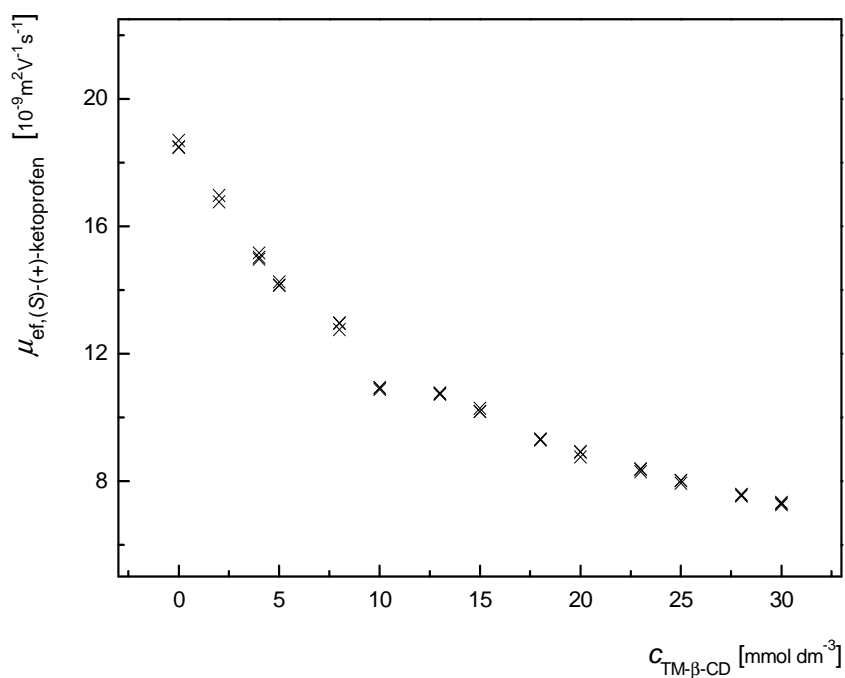
$C_{\text{TM-}\beta\text{-CD}}$ [mmol dm ⁻³]	$\bar{\mu}_{\text{ef}, (R)\text{-}(-)\text{-flurbiprofen, racemát}}$ [$10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$]
0	18,88
1	10,75
3	7,60
5	6,47
10	5,29
15	4,95
20	4,43
25	3,96
30	3,73
33	3,68
35	3,51
38	3,37
40	3,39
45	3,10
50	2,96



Obrázek 15: Závislost efektivní pohyblivosti (S)-(+)-ibuprofenu na koncentraci TM-β-CD v acetátovém pufru.

Tabulka 8: Průměrné hodnoty efektivních pohyblivostí (S)-(+)-ibuprofenu v acetátovém pufru s přidavkem TM-β-CD.

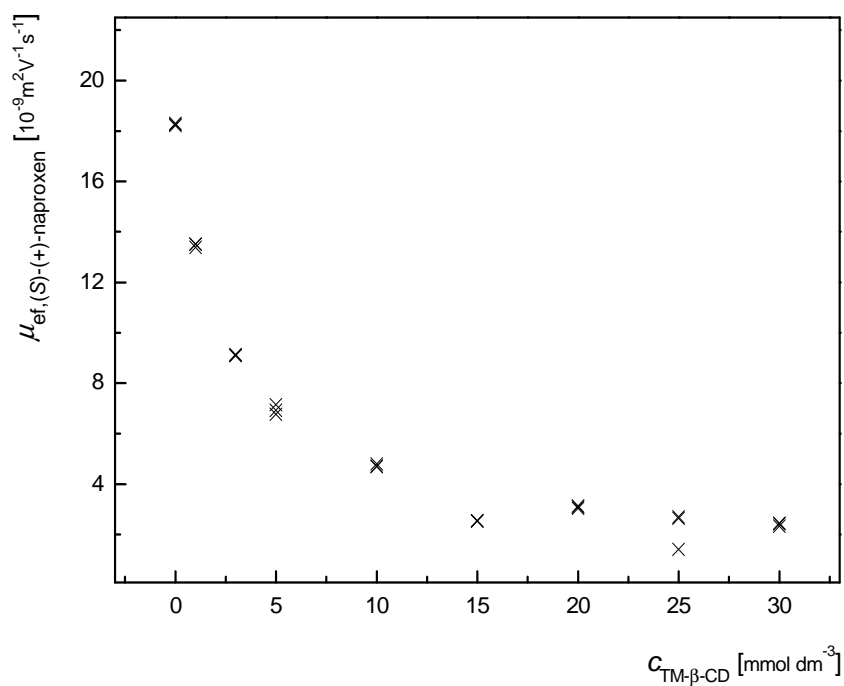
$c_{\text{TM-}\beta\text{-CD}}$ [mmol dm ⁻³]	$\bar{\mu}_{\text{ef,(S)-(+)-ibuprofen}}$ [$10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$]
0	16,89
1	11,39
3	7,52
5	5,86
10	4,32
15	2,55
20	3,12
25	2,35
30	2,55



Obrázek 16: Závislost efektivní pohyblivosti (S)-(+)-ketoprofenu na koncentraci TM-β-CD v acetátovém pufru.

Tabulka 9: Průměrné hodnoty efektivních pohyblivostí (S)-(+)-ketoprofenu v acetátovém pufru s přidavkem TM-β-CD.

$C_{\text{TM-}\beta\text{-CD}}$ [mmol dm ⁻³]	$\bar{\mu}_{\text{ef}, (S)-(+)\text{-ketoprofen}}$ [$10^{-9} \text{m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$]
0	18,56
2	16,84
4	15,06
5	14,18
8	12,89
10	10,92
13	10,74
15	10,21
18	9,31
20	8,87
23	8,35
25	7,99
28	7,56
30	7,30



Obrázek 17: Závislost efektivní pohyblivosti (S)-(+)-naproxenu na koncentraci TM-β-CD v acetátovém pufru.

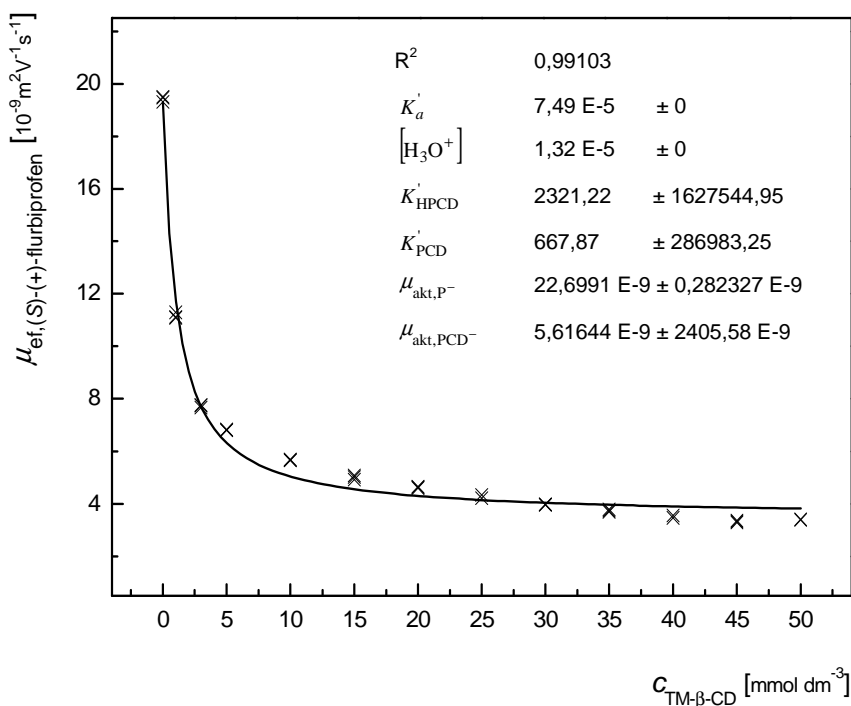
Tabulka 10: Průměrné hodnoty efektivních pohyblivostí (S)-(+)-naproxenu v acetátovém pufru s přidavkem TM-β-CD.

$c_{\text{TM-}\beta\text{-CD}}$ [mmol dm ⁻³]	$\bar{\mu}_{\text{ef,(S)-(+)-naproxen}}$ [$10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$]
0	18,26
1	13,47
3	9,11
5	6,95
10	4,73
15	2,54
20	3,09
25	2,26
30	2,40

6.1.6 STANOVENÍ KONSTANT STABILITY V ACETÁTOVÉM PUFRU

V acetátovém pufru o pH 4,88 se profeny účastní všech rovnováh uvažovaných ve schématu (15). Dochází tedy k ustavení rovnováhy mezi nedisociovanou a disociovanou formou sledovaného profenu (viz Tab. 1), přičemž obě formy profenu komplexují s použitým chirálním selektorem TM- β -CD. Vztah (23) lze využít k nelineární regresi experimentálně získané závislosti efektivní pohyblivosti zkoumaného profenu na koncentraci TM- β -CD v základním elektrolytu. Provádíme-li stanovení efektivních pohyblivostí sledovaných profenu v pufru o známé hodnotě pH, lze při nízké iontové síle použitého pufru (viz. Tab. 3) prakticky ztotožnit aktivitu s relativní koncentrací H_3O^+ iontů a do vztahu (23) dosadit relaci $[\text{H}_3\text{O}^+] \sim 10^{-\text{pH}} = 10^{-4,88} = 1,32 \cdot 10^{-5}$. Zbylé parametry nelineární závislosti efektivní pohyblivosti sledovaného profenu na koncentraci TM- β -CD v BGE, tedy K'_{PCD} , K'_{HPCD} , K'_a , $\mu_{\text{akt,P}^-}$ a $\mu_{\text{akt,PCD}^-}$, lze v principu získat regresi experimentálních závislostí.

Fitované parametry však vykazují chyby stanovení až o několik řádů vyšší než je samotná hodnota stanovovaných veličin. Redukce počtu hledaných parametrů nelineární regrese experimentálních dat se tedy ukazuje jako nezbytná. Hodnota zdánlivé disociační konstanty K'_a resp. $\text{p}K'_a$, vystupující též jako parametr diskutované nelineární regrese, je experimentálně dostupnou veličinou, která je pro většinu běžně používaných slabých analytů tabelována či publikována v literatuře. Konkrétně v případě zkoumaných profenu jsou z literatury dostupné hodnoty $\text{p}K'_a$ uvedeny v Tab. 1. Nafitujeme-li experimentální data navrženým vztahem (23) za předpokladu známé hodnoty K'_a , chyby hledaných parametrů jsou opět o několik řádů vyšší než vlastní stanovované hodnoty. Ukázka takové nelineární regrese pro (S)-(+)-flurbiprofen s tabulkou zobrazující stanovené parametry nelineární regrese je uvedena na Obr. 18. Hodnoty hledaných parametrů jsou zobrazeny ve tvaru stanovená hodnota \pm chyba stanovení. Nulová chyba stanovení znamená, že daná hodnota byla použita jako tzv. „fixní“, tedy nebyla fitována.

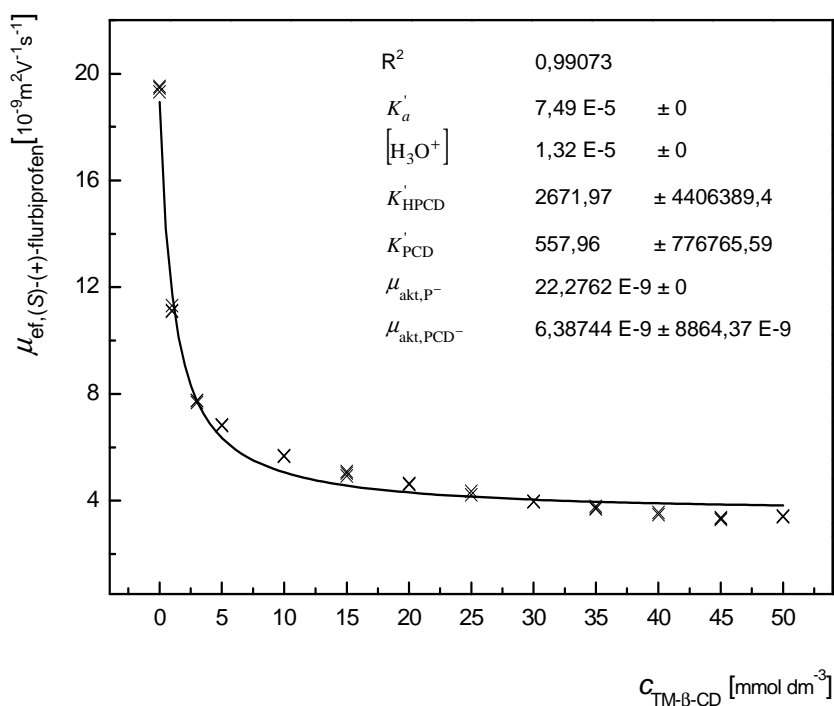


Obrázek 18: Nelineární regrese závislosti efektivní pohyblivosti (S)-(+)-flurbiprofenu na koncentraci TM-β-CD v acetátovém pufru dle vztahu (23). Bližší popis v textu.

Pro využití vztahu (23) ke stanovení hledaných parametrů je tedy nezbytná nejen znalost hodnoty K'_a zvoleného analytu a koncentrace H_3O^+ iontů v používaném pufru, ale také znalost hodnoty minimálně jednoho ze zbývajících parametrů vztahu (23).

Z elektroforetického hlediska nelze stanovit hodnotu K'_{HPCD} popisující komplexační rovnováhu mezi nedisociovanou formou sledovaného profenu a TM-β-CD (viz. schéma (15)), neboť všechny zúčastněné složky nevykazují vlastní elektroforetickou pohyblivost vzhledem k nulové hodnotě jejich nábojového čísla. Stanovení zdánlivé konstanty stability K'_{HPCD} pomocí CZE je tedy možné pouze využitím nelineární regrese závislosti efektivní pohyblivosti na koncentraci TM-β-CD dle vztahu (23).

Relativně jednoduchým způsobem je elektroforeticky možné stanovit aktuální pohyblivost disociované formy profenu $\mu_{\text{akt,P}^-}$. V separačním pufru bez přídavku TM- β -CD s hodnotou pH vyšší o dvě jednotky a více než je pK_a zkoumaného profenu (pro zajištění prakticky úplné disociace) není problém stanovit aktuální pohyblivost příslušné disociované formy. Ovšem ani začlenění této hodnoty pro nelineární regresi experimentálních dat vztahem (23) nevede k uspokojivým hodnotám hledaných veličin a chybám fitovaných parametrů, jak ukazuje Obr. 19.



Obrázek 19: Nelineární regrese závislosti efektivní pohyblivosti (S)-(+)-flurbiprofenu na koncentraci TM- β -CD v acetátovém pufru dle vztahu (23). Bližší popis v textu.

Stanovení pohyblivosti komplexu disociovaný profen-TM- β -CD $\mu_{\text{akt,PCD}^-}$ je neefektivní především z důvodu nadměrné spotřeby finančně relativně nákladného TM- β -CD zajišťujícího prakticky „úplnou“ komplexaci sledovaného profenu. Využitím kapilární zónové elektroforézy lze však stanovit hodnotu K'_{PCD}

popisující tvorbu komplexu disociované formy zkoumaného profenu s TM-β-CD (viz. schéma (15)). Pro tento účel by byl vhodný separační systém o vysoké hodnotě pH, kde by se zkoumaný analyt nacházel prakticky jen ve své disociované formě. V takto zvoleném separačním systému se ustavuje pouze rovnováha mezi disociovanou formou sledovaného profenu a vznikajícím komplexem s TM-β-CD, která je charakterizována zdánlivou konstantou stability K'_{PCD} dle vztahu (18).

6.2 STANOVENÍ KONSTANT STABILITY K'_{PCD} V β-ALANINOVÉM PUFRU

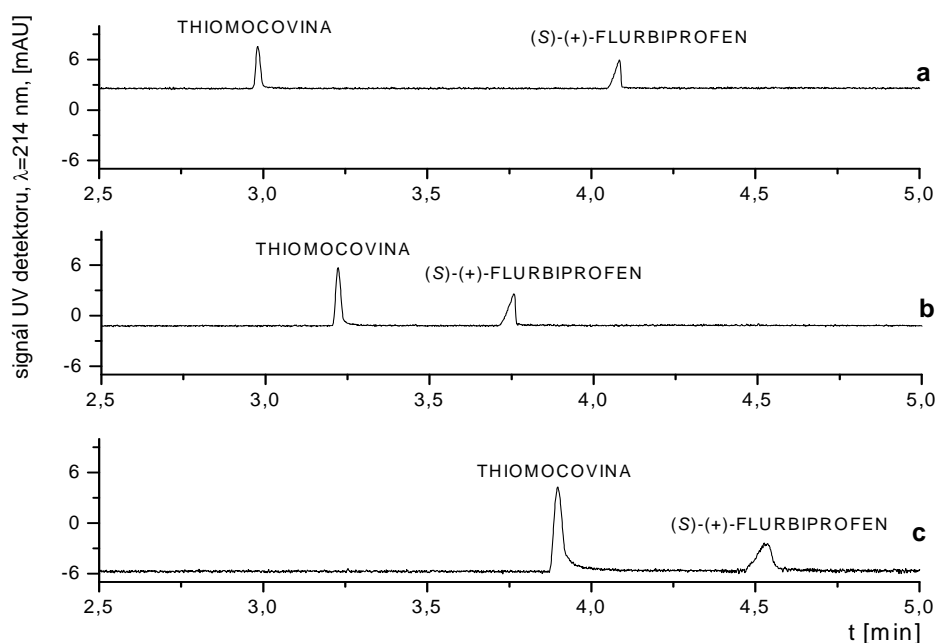
Pro stanovení zdánlivé konstanty stability disociované formy profenu s TM-β-CD K'_{PCD} byly jako modelové analyty ze sledovaných profenů vybrány pouze (S)-(+)- a (R)-(-)-flurbiprofen a racemická směs flurbiprofenu. Jako základní elektrolyt byl zvolen separační pufr složený z β-alaninu a hydroxidu lithného o experimentálním pH 10,30 (viz. Tab. 3). V takto zásaditém separačním elektrolytu se sledované profeny vyskytují prakticky jen v disociované formě a v takovém systému lze tedy uvažovat pouze ustavení rovnováhy disociovaný profen-TM-β-CD charakterizované konstantou K'_{PCD} (schéma (15)). Kombinací efektivní pohyblivosti zvoleného profenu (3) a rovnice (11) dostáváme vztah

$$\mu_{\text{ef}} = \frac{\mu_{\text{akt,P}^-} + \mu_{\text{akt,PCD}^-} K'_{\text{PCD}} [\text{CD}]}{1 + K'_{\text{PCD}} [\text{CD}]}, \quad (24)$$

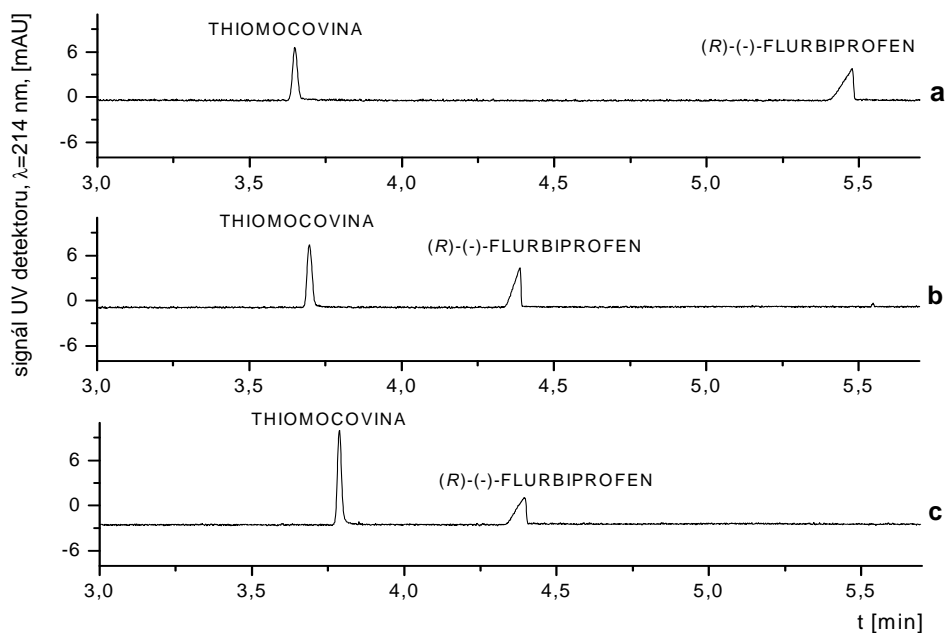
který lze použít k nelineární regresi závislosti experimentálně proměřených efektivních pohyblivostí profenu na koncentraci TM-β-CD. Tato rovnice byla využita pro stanovení zdánlivých konstant stabilit vybraných profenů v prostředí β-alaninového pufu.

6.2.1 EXPERIMENTY V β -ALANINOVÉM PUFRU

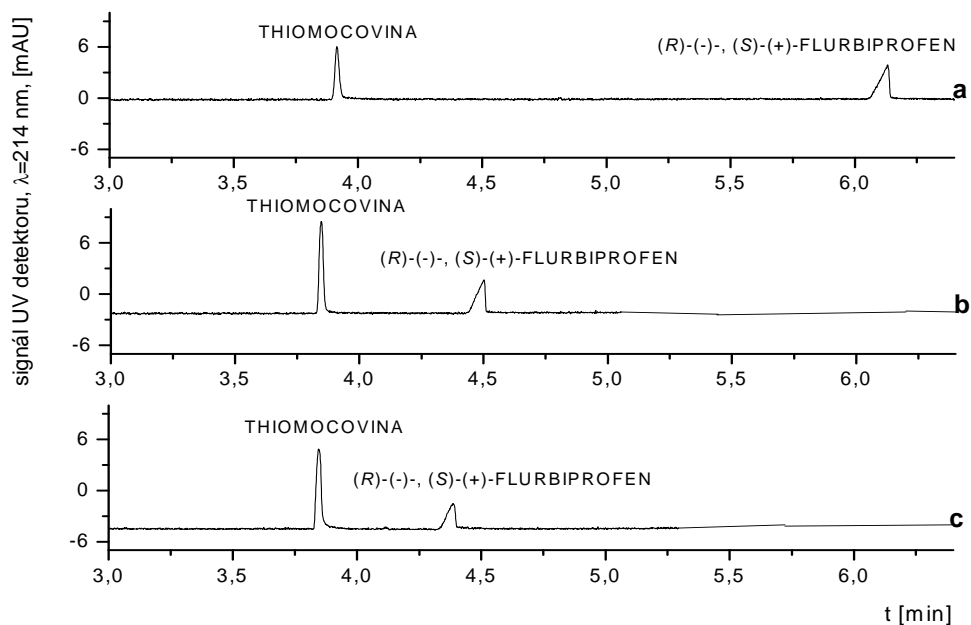
V β -alaninovém pufru byly proměřeny efektivní pohyblivosti (*S*)-(+)-flurbiprofenu, (*R*)-(-)-flurbiprofenu a jejich racemické směsi v závislosti na koncentraci TM- β -CD. Koncentrace TM- β -CD v separačním pufru byly 0, 1, 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 a 50 mmol dm⁻³ a každý experiment s určitou koncentrací TM- β -CD byl opakován třikrát. Jako marker EOF byla zvolena thiomocovina, která je při zvoleném pH separačního pufru neutrální molekula, a její interakce s kteroukoliv ze složek systému není prokázána. Obr. 20 a 21 znázorňuje záznam UV/VIS detektoru pro (*S*)-(+)-flurbiprofen a (*R*)-(-)-flurbiprofen v β -alaninovém pufru s přídavkem TM- β -CD o koncentracích 0, 10 a 30 mmol dm⁻³. Na Obr. 22 je znázorněn záznam UV/VIS detektoru pro racemickou směs flurbiprofenu. Z obrázku je patrné, že k separaci enantiomerů nedošlo ani při 50 mmol dm⁻³ koncentraci TM- β -CD.



Obrázek 20: Záznam UV/VIS detektoru pro (*S*)-(+)-flurbiprofen v β -alaninovém pufru o pH 10,30 obsahujícím (a) 0 mmol dm⁻³, (b) 10 mmol dm⁻³, (c) 30 mmol dm⁻³ TM- β -CD. Separační kapilára o vnitřním průměru 50 μ m, 50,7/59,2 cm detektor/celková délka; separační napětí 20 kV; teplota 25 °C. Dávkovaný vzorek (*S*)-(+)-flurbiprofenu 0,125 mmol dm⁻³ a thiomocoviny 0,5 mmol dm⁻³, dávkování 15 mbar 6s.



Obrázek 21: Záznam UV/VIS detektoru pro (*R*)-(-)-flurbiprofen v β -alaninovém pufru o pH 10,30 obsahujícím (a) 0 mmol dm⁻³, (b) 10 mmol dm⁻³, (c) 30 mmol dm⁻³ TM- β -CD. Separační podmínky: stejné jako u Obr. 20.



Obrázek 22: Záznam UV/VIS detektoru pro racemickou směs flurbiprofenu v β -alaninovém pufru o pH 10,30 obsahujícím (a) 0 mmol dm⁻³, (b) 25 mmol dm⁻³, (c) 50 mmol dm⁻³ TM- β -CD. Separační podmínky: stejné jako u Obr. 20.

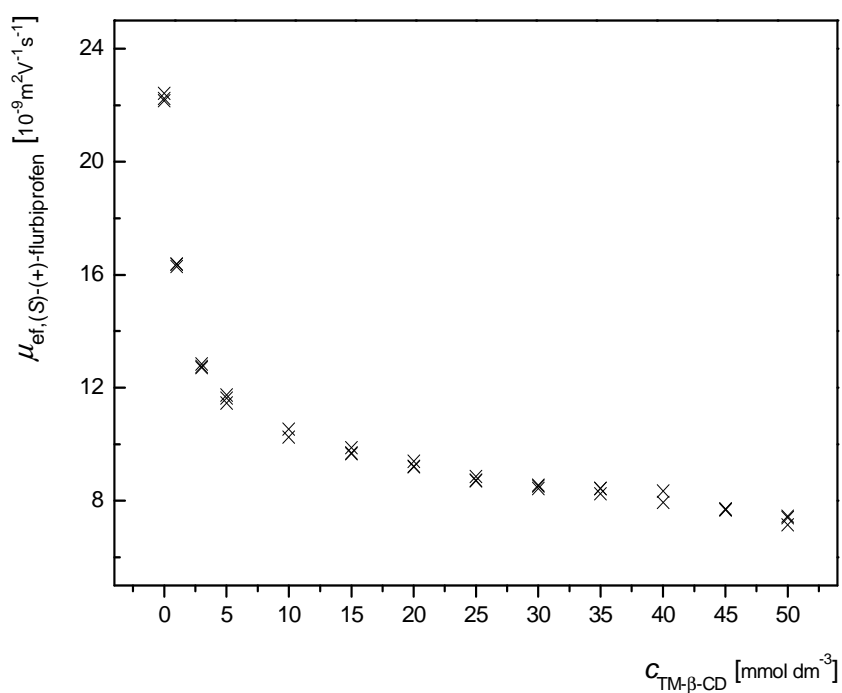
6.2.2 ODEČET MIGRAČNÍCH ČASŮ ANALYTŮ V β -ALANINOVÉM PUFRU

Píky (S)-(+)-, (R)-(-)-flurbiprofenu a jejich racemické směsi, které byly získány z experimentů v β -alaninovém pufru, byly rozmyty vlivem elektrodisperze a vykazovaly tedy trojúhelníkovitý tvar. Proto bylo pro odečet migračních časů využito fitování píků analytů HVL funkcí.

Při porovnání pozorovaných pohyblivostí zkoumaného profenu, jež byly vypočítány z migračních časů získaných pomocí HVL funkce, a pozorovaných pohyblivostí profenu vypočítaných pomocí migračních časů, které byly získány z vrcholu píků, byla zjištěna odchylka přibližně 5,5 %. Hodnota této odchylky je významná, a proto vliv elektromigrační disperze na rozmývání píků nelze zanedbat. Z toho důvodu byly všechny experimentálně získané píky profenu fitovány HVL funkcí a migrační časy získané touto úpravou byly použity pro výpočet pozorovaných pohyblivostí.

6.2.3 ZÁVISLOST EFEKTIVNÍCH POHYBLIVOSTÍ NA KONCENTRACI CYKLODEXTRINU V β -ALANINOVÉM PUFRU

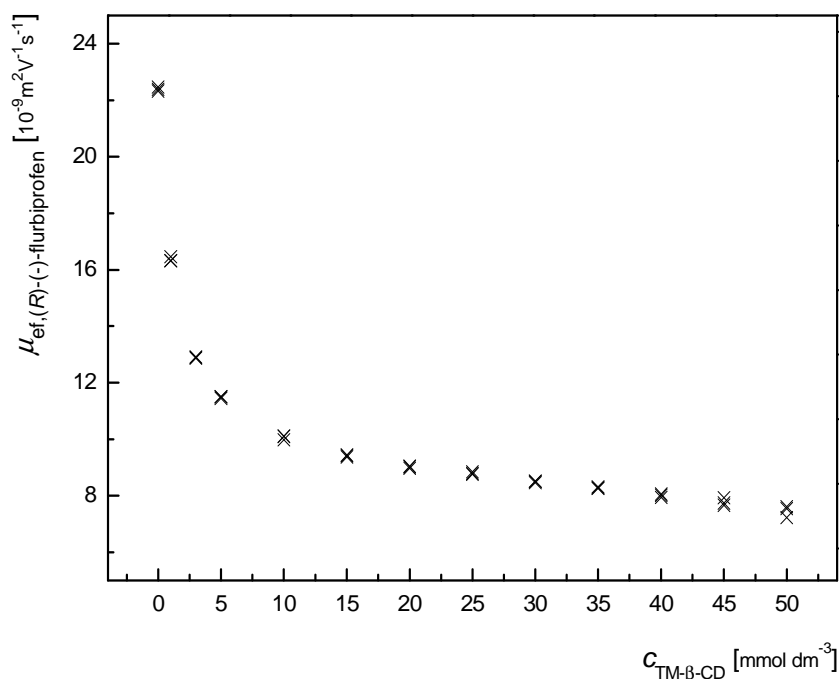
Efektivní pohyblivosti (S)-(+)-flurbiprofenu, (R)-(-)-flurbiprofenu a racemické směsi flurbiprofenu v prostředí β -alaninového pufru s různými koncentracemi TM- β -CD byly vypočteny podle vztahů (6) a (8). Jejich hodnoty byly vyneseny do grafu v závislosti na použité koncentraci TM- β -CD v separačním elektrolytu. Tyto závislosti jsou pro (S)-(+)-, (R)-(-)-flurbiprofen a jejich racemickou směs zobrazeny na Obr. 23, 24 a 25. Tab. 11, 12 a 13 shrnují průměrné hodnoty stanovených efektivních pohyblivostí zvolených profenů. Z uvedených obrázků i tabulek vyplývá, že s rostoucí koncentrací TM- β -CD v BGE klesá efektivní pohyblivost proměřených profenů. Příčinou je především vytváření komplexu profen-TM- β -CD a rostoucí viskozita separačního prostředí.



Obrázek 23: Závislost efektivní pohyblivosti (S)-(+)-flurbiprofenu na koncentraci TM-β-CD v β-alaninovém pufru.

Tabulka 11: Průměrné hodnoty efektivních pohyblivostí (S)-(+)-flurbiprofenu v β-alaninovém pufru s přidavkem TM-β-CD.

$C_{\text{TM-}\beta\text{-CD}}$ [mmol dm ⁻³]	$\mu_{\text{ef, (S)-(+)-flurbiprofen}}$ [$10^{-9} \text{m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$]
0	22,28
1	16,35
3	12,77
5	11,62
10	10,35
15	9,74
20	9,27
25	8,76
30	8,50
35	8,38
40	8,08
45	7,69
50	7,33



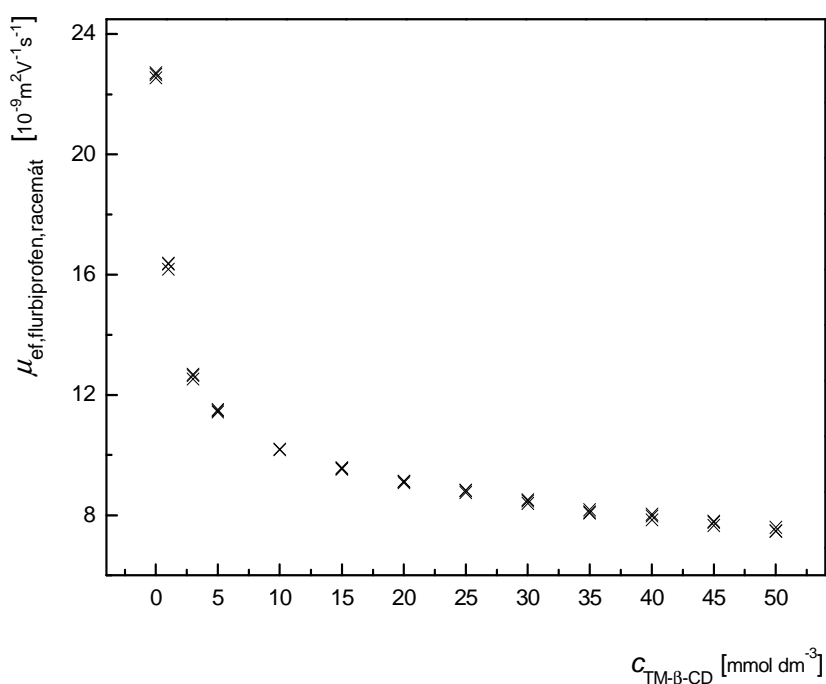
Obrázek 24: Závislost efektivní pohyblivosti (*R*)-(-)-flurbiprofenu na koncentraci TM-β-CD v β-alaninovém pufru.

Tabulka 12: Průměrné hodnoty efektivních pohyblivostí (*R*)-(-)-flurbiprofenu v β-alaninovém pufru s přidavkem TM-β-CD.

^a...Efektivní pohyblivosti korigované na viskozitu BGE dle rovnice (13).

^b...Efektivní pohyblivosti korigované na viskozitu BGE dle rovnice (12).

$C_{\text{TM-}\beta\text{-CD}}$ [mmol dm ⁻³]	$\bar{\mu}_{\text{ef}, (R)-(-)\text{-flurbiprofen}}$ [$10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$]	$\bar{\mu}_{\text{ef}, \text{kor}, (R)-(-)\text{-flurbiprofen}}$ [$10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$]	^a $\bar{\mu}_{\text{ef}, \text{kor}, (R)-(-)\text{-flurbiprofen}}$ [$10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$]	^b $\bar{\mu}_{\text{ef}, \text{kor}, (R)-(-)\text{-flurbiprofen}}$ [$10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$]
0	22,39	22,39		22,39
1	16,37	18,12		17,34
3	12,89	14,47		13,82
5	11,48	12,24		12,22
10	10,06	10,23		10,46
15	9,41	9,65		9,96
20	9,01	9,36		9,80
25	8,79	10,12		9,56
30	8,49	10,02		9,35
35	8,29	9,86		9,23
40	8,01	9,80		8,89
45	7,78	9,66		8,71
50	7,47	9,29		8,52



Obrázek 25: Závislost efektivní pohyblivosti racemické směsi flurbiprofenu na koncentraci TM-β-CD v β-alaninovém pufru.

Tabulka 13: Průměrné hodnoty efektivních pohyblivostí racemické směsi flurbiprofenu v β-alaninovém pufru s přidavkem TM-β-CD.

$c_{\text{TM-}\beta\text{-CD}}$ [mmol dm ⁻³]	$\bar{\mu}_{\text{ef,flurbiprofen,racemát}}$ [$10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$]
0	22,64
1	16,31
3	12,62
5	11,47
10	10,19
15	9,56
20	9,11
25	8,80
30	8,46
35	8,12
40	7,95
45	7,74
50	7,51

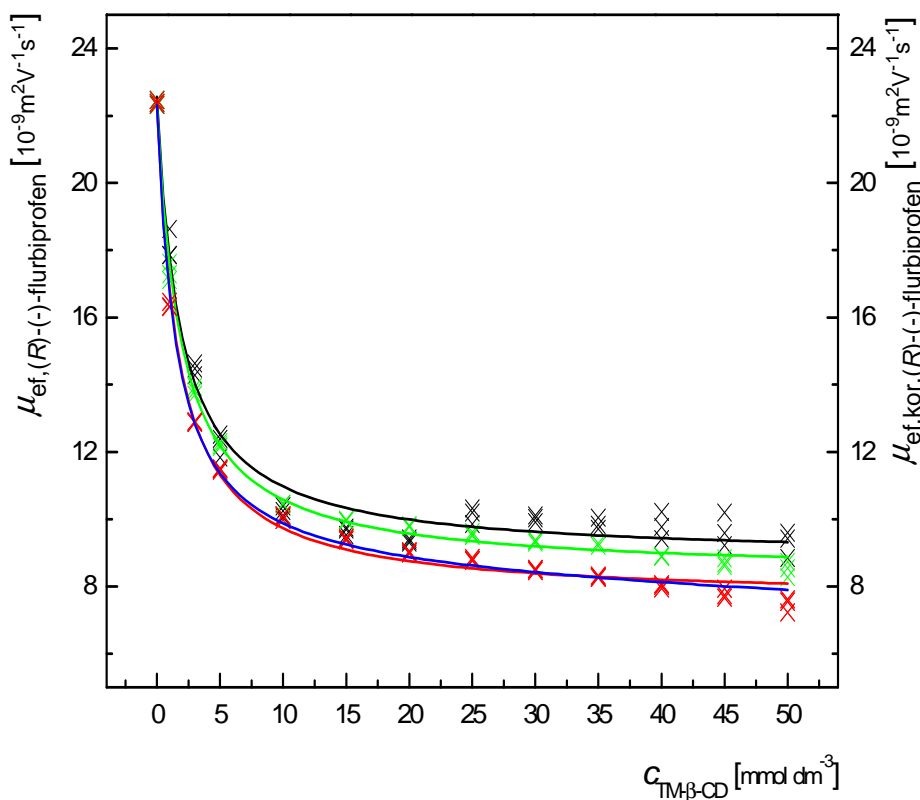
6.2.4 KOREKCE POHYBLIVOSTÍ NA VSKOZITU BGE

Přídavek TM- β -CD do separačního pufru způsobuje vzrůst viskozity BGE. Viskozita je jedním z faktorů, který má vliv na efektivní pohyblivost profenů. Z toho důvodu je provedení korekce pohyblivostí iontů na viskozitu separačního prostředí nezbytným krokem. Také Penn, Bergström a Goodall [40] zdůraznili význam provedení korekce pohyblivostí iontů na viskozitu BGE v systému, v němž je používána vysoká koncentrace neutrálního cyklodextrinu. Proto byly zvoleny tři způsoby korekce, jež byly aplikovány na (R)-(-)-flurbiprofen jako na modelový analyt s cílem zjistit, který ze zvolených způsobů korekce je nejvhodnější. Ten byl pak použit i na (S)-(+)-flurbiprofen a racemickou směs flurbiprofenu.

První způsob korekce pohyblivostí nabitého (R)-(-)-flurbiprofenu na viskozitu BGE byl proveden pomocí poměrů proudů. Dle rovnice (13) byly vypočteny pro všechny použité koncentrace TM- β -CD korekční faktory, jimiž byly vynásobeny příslušné elektroforetické pohyblivosti (R)-(-)-flurbiprofenu. Pro další způsob korekce pohyblivostí byl využit marker viskozity, draselný kation molekuly KCl. Interakce tohoto viskozitního markeru s profeny, TM- β -CD ani se složkami separačního pufru není známa. Tudiž by jeho pohyblivost měla být ovlivněna pouze změnou viskozity základního elektrolytu v důsledku rostoucího přídavku TM- β -CD. Proměřením elektroforetických pohyblivostí draselného kationtu při všech použitých koncentracích zvoleného chirálního selektoru byly získány korekční faktory vypočítané podle rovnice (12). Těmi byly násobeny příslušné elektroforetické pohyblivosti (R)-(-)-flurbiprofenu. Poslední způsob korekce pohyblivostí tohoto profenu na viskozitu BGE opět využíval korekčních faktorů získaných z poměru elektroforetických pohyblivostí draselného kationtu. Vynesením závislosti těchto korekčních faktorů na koncentraci TM- β -CD byla získána lineární funkce $v = a + b [CD]$, kterou byl vynásoben vztah pro výpočet efektivní pohyblivost (R)-(-)-flurbiprofenu, jež je popsán rovnicí (24). Symboly a , b jsou koeficienty lineární funkce. Výsledný vztah měl tedy podobu

$$\mu_{\text{ef,kor}} = \frac{\mu_{\text{akt,P}^-} + \mu_{\text{akt,PCD}^-} K'_{\text{PCD}} [CD]}{1 + K'_{\text{PCD}} [CD]} \frac{1}{a + b [CD]} \quad (25)$$

Poslední zmíněný způsob korekce na viskozitu byl začleněn do vztahu pro nelineární regresi závislosti efektivních pohyblivostí (*R*)-(-)-flurbiprofenu na koncentraci TM- β -CD. V Tab. 12 jsou průměrné efektivní pohyblivosti (*R*)-(-)-flurbiprofenu v β -alaninovém pufru při dané koncentraci TM- β -CD nekorigované na viskozitu BGE porovnány s efektivními pohyblivostmi (*R*)-(-)-flurbiprofenu, u nichž byla provedena korekce na viskozitu BGE. Efektivní pohyblivosti byly korigovány na viskozitu BGE pomocí korekčních faktorů vypočítaných z poměru proudů a z poměru pohyblivostí K^+ . Obr. 26 zobrazuje nelineární funkce, jež byly získány nelineární regresí (vztah (24) a (25)) závislosti efektivní pohyblivosti (*R*)-(-)-flurbiprofenu na koncentraci TM- β -CD. Dále tento obrázek znázorňuje nelineární funkce, které byly získány regresí (vztah (24)) závislosti efektivní pohyblivosti (*R*)-(-)-flurbiprofenu korigované na viskozitu BGE pomocí poměru proudů a poměru pohyblivostí K^+ na koncentraci TM- β -CD. Tab. 14 a 15 shrnuje parametry nelineárních funkcí znázorněných na Obr. 26.



Obrázek 26: Nelineární regrese (vztah (24), (25)) závislosti efektivních pohyblivostí (R)-(-)-flurbiprofenu na koncentraci TM- β -CD a nelineární regrese (vztah (24)) závislosti korigovaných efektivních pohyblivostí (R)-(-)-flurbiprofenu na viskozitu BGE pomocí viskozitního korekčního faktoru získaného z poměru proudů a z poměru pohyblivostí K^+ na koncentraci TM- β -CD.

- x Efektivní pohyblivost (R)-(-)-flurbiprofenu nekorigovaná na viskozitu BGE při dané koncentraci TM- β -CD v BGE.
- Nelineární regrese (vztah (24)) závislosti efektivní pohyblivosti (R)-(-)-flurbiprofenu na koncentraci TM- β -CD v BGE.
- x Efektivní pohyblivost (R)-(-)-flurbiprofenu korigovaná na viskozitu BGE pomocí poměru proudů při dané koncentraci TM- β -CD v BGE.
- Nelineární regrese (vztah (24)) závislosti efektivní pohyblivosti (R)-(-)-flurbiprofenu, korigované na viskozitu BGE pomocí poměru proudů, na koncentraci TM- β -CD v BGE.
- x Efektivní pohyblivost (R)-(-)-flurbiprofenu korigovaná na viskozitu BGE pomocí poměru pohyblivostí K^+ při dané koncentraci TM- β -CD v BGE.
- Nelineární regrese (vztah (24)) závislosti efektivní pohyblivosti (R)-(-)-flurbiprofenu, korigované na viskozitu BGE pomocí poměru pohyblivostí K^+ , na koncentraci TM- β -CD v BGE.
- Nelineární regrese (vztah (25)) závislosti efektivní pohyblivosti (R)-(-)-flurbiprofenu na koncentraci TM- β -CD.

Tabulka 14: Parametry nelineárních regresních funkcí (vztah (24)) z Obr. 26.

Červená data: Parametry nelineární regrese závislosti efektivních pohyblivostí (R)-(-)-flurbiprofenu na koncentraci TM-β-CD v BGE.

Černá data: Parametry nelineární regrese závislosti efektivních pohyblivostí (R)-(-)-flurbiprofenu korigovaných na viskozitu BGE pomocí poměru proudů na koncentraci TM-β-CD v BGE.

Zelená data: Parametry nelineární regrese závislosti efektivních pohyblivostí (R)-(-)-flurbiprofenu korigovaných na viskozitu BGE pomocí poměru pohyblivostí K^+ na koncentraci TM-β-CD v BGE.

R^2	0,99416
	0,98311
	0,99743
μ_{akt,P^-}	22,2379 E-9 ± 0,179419 E-9
	22,5622E-9 ± 0,288007 E-9
	22,34 E-9 ± 0,113447 E-9
μ_{akt,PCD^-}	7,60454 E-9 ± 0,0849529
	8,82802 E-9 ± 0,140445 E-9
	8,36643 E-9 ± 0,055694 E-9
K'_{PCD}	589,37 ± 28,12
	541,8 ± 44,42
	531,96 ± 16,91

Tabulka 15: Parametry nelineární regresní funkce (vztah (25)) z Obr. 26.

Modrá data: Parametry nelineární regrese závislosti efektivních pohyblivostí (R)-(-)-flurbiprofenu na koncentraci TM-β-CD.

R^2	0,99747
μ_{akt,P^-}	23,1916 E-9 ± 0,123517 E-9
μ_{akt,PCD^-}	8,54511 E-9 ± 0,0592573 E-9
K'_{PCD}	666,72 ± 22,06
a	1,03957 ± 0
b	0,00193 ± 0

Korekce efektivních pohyblivostí (R)-(-)-flurbiprofenu na viskozitu základního elektrolytu, jež byla provedena pomocí poměrů proudů, způsobila velký rozptyl experimentálně získaných efektivních pohyblivostí (R)-(-)-flurbiprofenu. Korekce pohyblivostí zvoleného profenu pomocí poměrů

pohyblivostí draselného kationu se ukázala jako přijatelnější, poněvadž tento způsob korekce experimentální data výrazně nerozptýlil. Navíc nelineární regresní funkce závislosti efektivní pohyblivosti (*R*)-(-)-flurbiprofenu, která byla korigována pomocí poměru pohyblivostí K^+ , na koncentraci TM- β -CD procházela vynesnými body v této závislosti lépe než nelineární funkce závislosti efektivní pohyblivosti (*R*)-(-)-flurbiprofenu na koncentraci TM- β -CD, kde byla pohyblivost (*R*)-(-)-flurbiprofenu korigována pomocí poměru proudů. To dokazuje hodnota R^2 (Tab. 14), vyjadřující, jak „dobře“ daná funkce prochází vynesnými body závislosti. Čím blíže je hodnota R^2 jedničce, tím lépe funkce body prochází.

Ve způsobu korekce pohyblivostí (*R*)-(-)-flurbiprofenu pomocí poměru pohyblivostí K^+ byla ztotožněna velikost volné formy profenu a jeho komplexu s TM- β -CD s velikostí zvoleného viskozitního markeru. Vhodně zvolený marker viskozity by měl mít podobnou velikost molekuly jako měřený analyt. Tato podmínka byla splněna v případě, kdy se v separačním systému vyskytovala pouze volná forma profenu, jejíž velikost je možné přirovnat k velikosti K^+ . Po přidání TM- β -CD do základního elektrolytu došlo k tvorbě komplexu profen-TM- β -CD, který má nesrovnatelně větší velikost, než je velikost volné formy profenu. Draselný kation je tedy vhodným markerem viskozity pro systém bez přítomnosti TM- β -CD, v němž je sledovaný profen ve své volné formě. Pro separační systém, ve kterém se vyskytuje komplex tohoto chirálního selektoru s analyzovaným profenem, by měl být zvolen ještě další způsob korekce zohledňující velikost vzniklého komplexu.

V námi zvoleném separačním systému je tedy třeba provést dva způsoby korekce pohyblivostí na viskozitu BGE, jež by zohledňovaly jak přítomnost volného analytu, tak i jeho několikanásobně většího komplexu s chirálním selektorem. Aby mohly být provedeny současně dva různé způsoby korekce na viskozitu BGE, bylo nezbytné získat dvě korekční funkce. Ty by se začlenily do rovnice nelineární regrese (24) sloužící ke stanovení zdánlivé konstanty stability. Za tímto účelem byla korekce na viskozitu pomocí poměru pohyblivostí K^+ upravena tak, abychom získali první ze dvou korekčních funkcí zohledňující přítomnost volného profenu. Druhý způsob korekce na viskozitu,

který zohledňuje přítomnost komplexu profen-TM- β -CD z časových důvodů nebyl proveden. Vztah (25), do něhož byla začleněna první ze dvou korekčních funkcí, je prvním krokem na cestě k získání správného způsobu korekce na viskozitu separačního prostředí a byl aplikován na všechny ostatní proměřené optické formy flurbiprofenu.

Tab.16 shrnuje rovnice regrese, jež byly získány ze závislosti korekčních faktorů (rovnice (12)) na koncentraci TM- β -CD a které byly použity pro korekci pohyblivostí (*R*)-(-)-flurbiprofenu, (*S*)-(+)-flurbiprofenu a racemické směsi flurbiprofenu na viskozitu β -alaninového pufru.

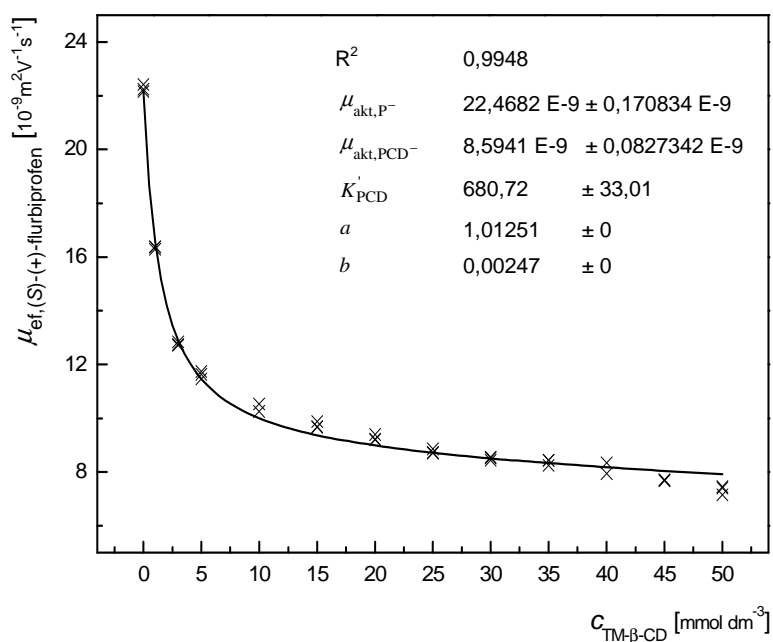
Tabulka 16: Rovnice regrese $v = a + b[CD]$ získané ze závislosti korekčních faktorů (rovnice (12)) na koncentraci TM- β -CD, které byly použity pro korekci pohyblivostí (*R*)-(-)-flurbiprofenu, (*S*)-(+)-flurbiprofenu a jejich racemické směsi na viskozitu β -alaninového pufru.

profen	rovnice regrese
(<i>R</i>)-(-)-flurbiprofen	$v = 1,03957 + 0,00193 [CD]$
(<i>S</i>)-(+)-flurbiprofen	$v = 1,01251 + 0,00247 [CD]$
racemát flurbiprofenu	$v = 1,02704 + 0,00229 [CD]$

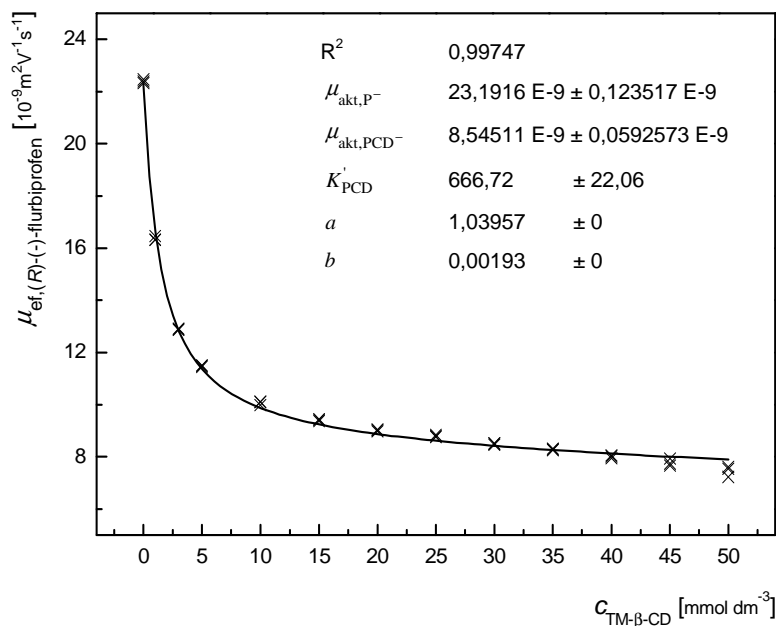
6.2.5 STANOVENÍ KONSTANT STABILITY

Pro stanovení zdánlivých konstant stabilit aniontových forem (*S*)-(+)-flurbiprofenu, (*R*)-(-)-flurbiprofenu a racemické směsi flurbiprofenu v prostředí β -alaninového pufru byl použit vztah (25), který slouží k nelineární regresi experimentálně získané závislosti efektivních pohyblivostí zkoumaných profenů na koncentraci TM- β -CD v základním elektrolytu. Součástí vztahu (25) je lineární funkce korigující pohyblivost daného profenu na viskozitu separačního prostředí. Parametry nelineární funkce (25) jsou aktuální pohyblivost volné aniontové formy profenu μ_{akt,P^-} , aktuální pohyblivost komplexu aniontové formy profenu s TM- β -CD μ_{akt,PCD^-} a zdánlivá konstanta stability komplexu nabitě

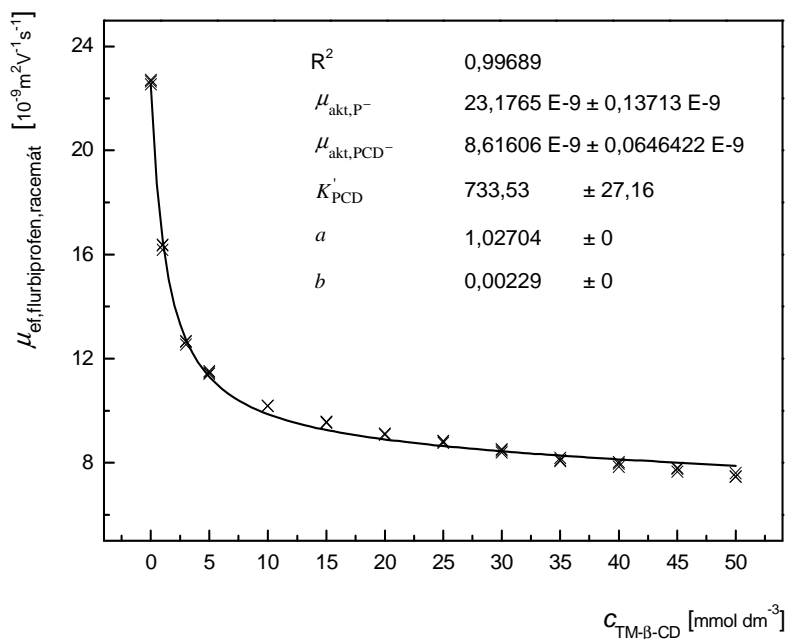
formy profenu a TM- β -CD K'_{PCD} . Všechny tyto parametry lze získat regresí experimentální závislosti efektivních pohyblivostí profenu na koncentraci TM- β -CD v BGE. Obr. 27, 28 a 29 znázorňuje závislost efektivní pohyblivosti (S)-(+)-flurbiprofenu, (R)-(-)-flurbiprofenu a racemické směsi flurbiprofenu na koncentraci TM- β -CD, nelineární regresi této závislosti (vztah (25)) a tabulku s hodnotami fitovaných parametrů. Tab. 17 shrnuje hodnoty zdánlivých konstant stabilit K'_{PCD} (S)-(+)-, (R)-(-)-flurbiprofenu a jejich racemické směsi v prostředí β -alaninového pufru.



Obrázek 27: Nelineární regrese závislosti efektivní pohyblivosti (S)-(+)-flurbiprofenu na koncentraci TM- β -CD v β -alaninovém pufru dle vztahu (25) s tabulkou fitovaných parametrů.



Obrázek 28: Nelineární regrese závislosti efektivní pohyblivosti (R)-(-)-flurbiprofenu na koncentraci TM- β -CD v β -alaninovém pufru dle vztahu (25) s tabulkou fitovaných parametrů.



Obrázek 29: Nelineární regrese závislosti efektivní pohyblivosti racemické směsi flurbiprofenu na koncentraci TM- β -CD v β -alaninovém pufru dle vztahu (25) s tabulkou fitovaných parametrů.

Tabulka 17: Hodnoty zdánlivých konstant stabilit K'_{PCD} (získané ze vztahu (25)) aniontových forem (S)-(+)-, (R)-(-)-flurbiprofenu a racemické směsi flurbiprofenu. Pohyblivosti korigovány na viskozitu β -alaninového pufru. Hodnoty zdánlivých konstant stabilit zobrazeny ve tvaru stanovená hodnota \pm chyba stanovení.

analyt	K'_{PCD} [$\text{mol}^{-1}\text{dm}^3$]
(S)-(+)-flurbiprofen	681 ± 33
(R)-(-)-flurbiprofen	667 ± 22
racemát flurbiprofenu (S)-(+)-, (R)-(-)-flurbiprofen	734 ± 27

Nelineární regresi (vztah (25)) experimentálně proměřené závislosti efektivních pohyblivostí zkoumaných profenů na koncentraci TM- β -CD v β -alaninovém pufru byly získány hodnoty aktuálních pohyblivostí volné $\mu_{\text{akt,P}^-}$ a komplexované aniontové formy $\mu_{\text{akt,PCD}^-}$ pro (S)-(+)-, (R)-(-)-flurbiprofen, racemickou směs flurbiprofenu a jejich zdánlivé konstanty stability K'_{PCD} . Uvedené hodnoty byly použity jako fixní parametry pro vztah (23). Známými parametry v tomto vztahu jsou tedy kromě K'_a a $[\text{H}_3\text{O}^+]$ také $\mu_{\text{akt,P}^-}$, $\mu_{\text{akt,PCD}^-}$ a K'_{PCD} . Na základě jejich znalosti je možno nafitovat experimentální data proměřená v acetátovém pufru navrženým vztahem (23). Fitovaným (neznámým) parametrem zůstává pouze zdánlivá konstanta stability komplexu neutrální profen-TM- β -CD K'_{HPCD} .

Pro korekci efektivních pohyblivostí profenů na viskozitu acetátového pufru byl opět použit jako viskozitní marker draselný kation. Ze závislosti korekčních faktorů (vypočítány dle rovnice (12)) na koncentraci TM- β -CD byla získána lineární korekční funkce $v = a + b [\text{CD}]$, jež byla zabudována do vztahu (23). Symboly a , b vyjadřují koeficienty lineární funkce. Vztah (23) byl tedy upraven na tvar

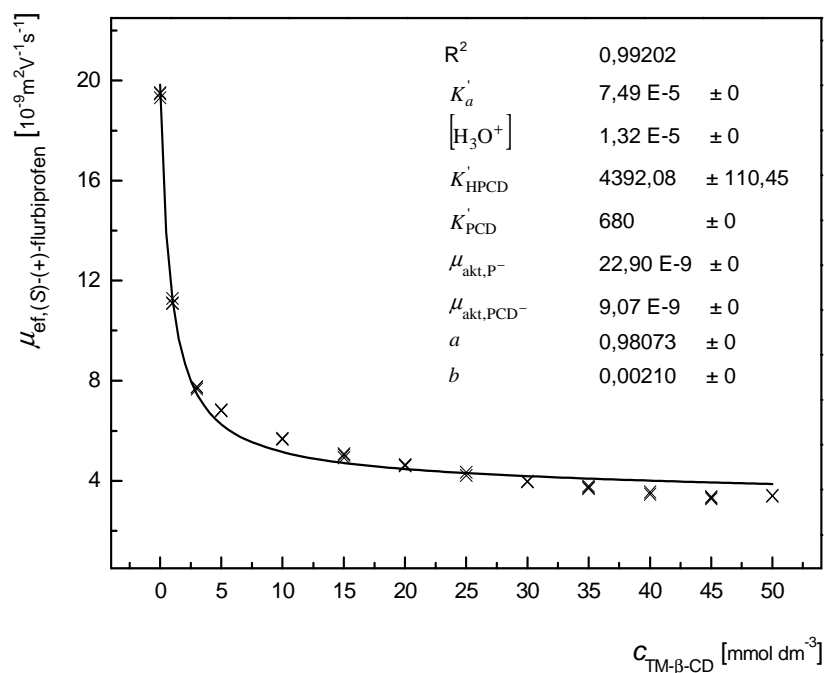
$$\mu_{\text{ef,kor}} = \frac{K'_a}{K'_a + [\text{H}_3\text{O}^+] + K'_{\text{HPCD}}[\text{H}_3\text{O}^+][\text{CD}] + K'_{\text{PCD}}K'_a[\text{CD}]} \left(\mu_{\text{akt,P}^-} + K'_{\text{PCD}}[\text{CD}]\mu_{\text{akt,PCD}^-} \right) \frac{1}{a + b[\text{CD}]} \quad (26)$$

Tab.18 shrnuje rovnice regrese získané ze závislosti korekčních faktorů (rovnice (12)) na koncentraci TM-β-CD, které byly využity pro korekci pohyblivostí (R)-(-)-flurbiprofenu, (S)-(+)-flurbiprofenu a racemické směsi flurbiprofenu na viskozitu acetátového pufru.

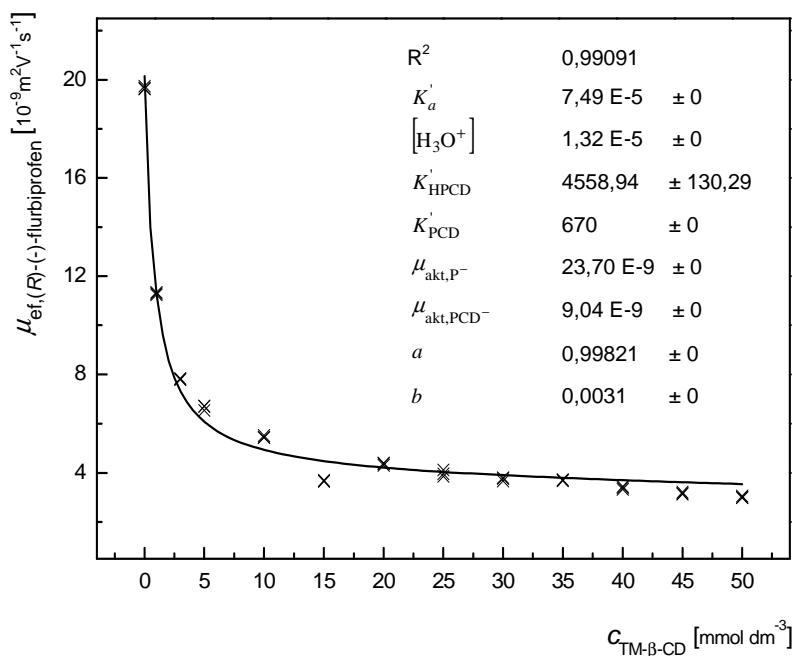
Tabulka 18: Rovnice regrese $v = a + b[\text{CD}]$ získané ze závislosti korekčních faktorů (rovnice (12)) na koncentraci TM-β-CD, které byly použity pro korekci pohyblivostí (R)-(-)-flurbiprofenu, (S)-(+)-flurbiprofenu a jejich racemické směsi na viskozitu acetátového pufru.

profen	rovnice regrese
(R)-(-)-flurbiprofen	$v = 0,99821 + 0,0031[\text{CD}]$
(S)-(+)-flurbiprofen	$v = 0,98073 + 0,0021[\text{CD}]$
racemát flurbiprofenu	$v = 0,9953 + 0,00269[\text{CD}]$

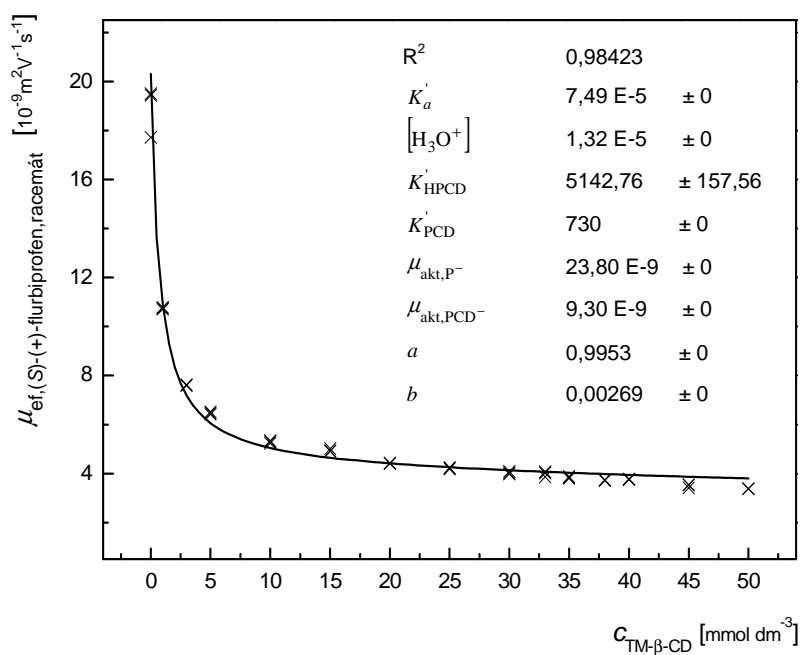
Obr. 30 až 33 znázorňuje závislost efektivní pohyblivosti (S)-(+)-flurbiprofenu, (R)-(-)-flurbiprofenu, (S)-(+)-flurbiprofenu z racemické směsi a (R)-(-)-flurbiprofenu z racemické směsi na koncentraci TM-β-CD v acetátovém pufru, průběh nelineární regrese této závislosti vycházející ze vztahu (26) a tabulku s hodnotami fitovaných parametrů. Uvedené hodnoty K'_{PCD} , jež shrnuje Tab. 17, jsou vzhledem k chybě stanovení zaokrouhleny na desítky. Tab. 19 shrnuje hodnoty zdánlivých konstant stabilit K'_{HPCD} (S)-(+)-flurbiprofenu, (R)-(-)-flurbiprofenu a (S)-(+)-, (R)-(-)-flurbiprofenu z racemické směsi v prostředí acetátového pufru. Tab. 20 kompletně shrnuje hodnoty zdánlivých konstant stabilit K'_{PCD} a K'_{HPCD} pro nabitě a neutrální formy (S)-(+)-flurbiprofenu, (R)-(-)-flurbiprofenu a jejich racemické směsi získané z experimentů v β-alaninovém a acetátovém pufru.



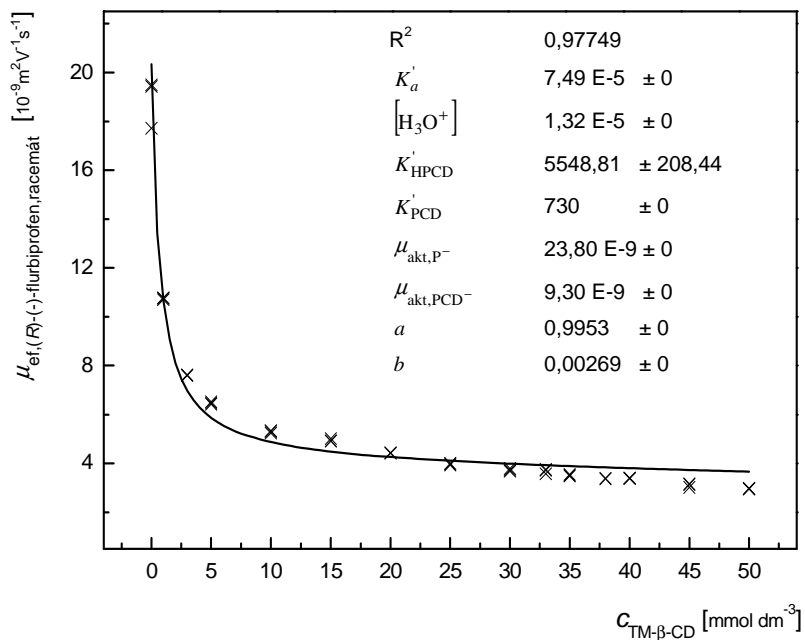
Obrázek 30: Nelineární regrese závislosti efektivní pohyblivosti (S)-(+)-flurbiprofenu na koncentraci TM- β -CD v acetátovém pufru dle vztahu (26) s tabulkou fitovaných parametrů.



Obrázek 31: Nelineární regrese závislosti efektivní pohyblivosti (R)-(-)-flurbiprofenu na koncentraci TM- β -CD v acetátovém pufru dle vztahu (26) s tabulkou fitovaných parametrů



Obrázek 32: Nelineární regrese závislosti efektivní pohyblivosti (S)-(+)-flurbiprofenu z racemické směsi na koncentraci TM-β-CD v acetátovém pufru dle vztahu (26) s tabulkou fitovaných parametrů.



Obrázek 33: Nelineární regrese závislosti efektivní pohyblivosti (R)-(-)-flurbiprofenu z racemické směsi na koncentraci TM-β-CD v acetátovém pufru dle vztahu (26) s tabulkou fitovaných parametrů.

Tabulka 19: Hodnoty zdánlivých konstant stabilit K'_{HPCD} (získané ze vztahu (26)) neutrálních forem (S)-(+)-, (R)-(-)-flurbiprofenu a racemické směsi flurbiprofenu. Pohyblivosti korigovány na viskozitu acetátového pufru. Hodnoty zdánlivých konstant stabilit zobrazeny ve tvaru stanovená hodnota \pm chyba stanovení.

analyt	K'_{HPCD} [mol ⁻¹ dm ³]	
(S)-(+)-flurbiprofen	4392 \pm 110	
(R)-(-)-flurbiprofen	4559 \pm 130	
racemát flurbiprofenu	(S)-(+)-flurbiprofen	5143 \pm 158
	(R)-(-)-flurbiprofen	5549 \pm 208

Tabulka 20: Hodnoty zdánlivých konstant stabilit K'_{PCD} (vztah (25)) a K'_{HPCD} (vztah (26)) pro nabitě a neutrální formy (S)-(+)-flurbiprofenu, (R)-(-)-flurbiprofenu a jejich racemické směsi. Pohyblivosti korigovány na viskozitu separačního pufru. Hodnoty zdánlivých konstant stabilit zobrazeny ve tvaru stanovená hodnota \pm chyba stanovení.

analyt	K'_{PCD} [mol ⁻¹ dm ³]	K'_{HPCD} [mol ⁻¹ dm ³]
(S)-(+)-flurbiprofen	681 \pm 33	4392 \pm 110
(R)-(-)-flurbiprofen	667 \pm 22	4559 \pm 130
racemát flurbiprofenu	(S)-(+)-flurbiprofen	5143 \pm 158
	(R)-(-)-flurbiprofen	5549 \pm 208

6.3 TERMODYNAMICKÁ KONSTANTA STABILITY

Ke stanovení termodynamické konstanty stability je nezbytné znát hodnoty aktivitních koeficientů analyzovaných profenů, TM- β -CD a jejich komplexu, přesněji řečeno parametry, které jsou k výpočtu příslušného aktivitního koeficientu potřebné. Z důvodu nedostupnosti těchto parametrů (především neznámé velikosti sledovaných částic) nebyly hodnoty aktivitních koeficientů vypočteny. Separační pufrы byly navoleny tak, že jejich iontová síla byla velmi nízká ($\sim 5 \text{ mmol dm}^{-3}$) a tedy vliv iontové síly na stanovení konstanty lze považovat za zanedbatelný.

7. ZÁVĚR

Hlavní význam této práce spočíval ve stanovení zdánlivých konstant stability vybraných profenů. K tomuto účelu byla využita metoda nelineární regrese experimentální závislosti efektivních pohyblivostí profenů na koncentraci TM- β -CD v BGE. Podařilo se stanovit zdánlivé konstanty stability pro nabitě a neutrální formy (S)-(+)-flurbiprofenu, (R)-(-)-flurbiprofenu a racemické směsi flurbiprofenu. Pro stanovení zdánlivých konstant stability (S)-(+)-ibuprofenu, (S)-(+)-naproxenu a (S)-(+)-ketoprofenu je ještě nutné experimentálně získat jejich efektivní pohyblivosti v závislosti na koncentraci TM- β -CD v prostředí separačního elektrolytu, v němž se budou vyskytovat pouze ve své disociované formě. Pomocí vztahu pro nelineární regresi této závislosti je pak možné získat potřebné parametry pro nařizování zdánlivých konstant stability těchto profenů.

Dalším úkolem této diplomové práce bylo sledovat tvary píků zkoumaných analytů a v závislosti na nich zvolit správný způsob odečtu jejich migračních časů. Ukázalo se, že píky analyzovaných profenů v acetátovém i β -alaninovém pufru vykazovaly trojúhelníkovitý tvar. Avšak rozmytí píků profenů v prostředí acetátového pufru bylo ve srovnání s rozmytím píků v β -alaninovém pufru zanedbatelné. Z toho důvodu byly migrační časy píků získaných experimenty v acetátovém pufru odečítány z jejich vrcholů a pro odečet migračních časů píků získaných z β -alaninového pufru bylo využito fitování tvaru píků HVL funkcí.

Pro korekci efektivních pohyblivostí profenů na viskozitu separačního prostředí byly testovány tři způsoby. První z nich využíval korekční faktory získané z poměru proudů. Druhý zvolený postup vycházel z korekčních faktorů získaných z poměru pohyblivostí viskozitního markeru (draselného kationtu). Poslední způsob korekce, který se ukázal jako nejlepší, rovněž využíval korekční faktory vycházející z poměru pohyblivostí draselného kationtu. Tyto korekční faktory byly vyneseny do grafu v závislosti na koncentraci TM- β -CD, čímž jsme získali lineární regresní funkci, jíž jsme vynásobili vztah pro nelineární regresi závislosti efektivní pohyblivosti profenu na použité koncentraci TM- β -CD. Tento vztah sloužil pro stanovení zdánlivých konstant stability komplexu profen-TM- β -CD.

V dostupných studiích zabývajících se volbou správného způsobu korekce pohyblivostí analyzovaných látek na viskozitu separačního prostředí bylo zjištěno, že

velikost zvoleného markeru viskozity by měla odpovídat velikosti analyzované látky. Velikost draselného kationtu jako markeru viskozity odpovídá velikosti profenu jako analytu. S přidavkem TM- β -CD do základního elektrolytu však dochází ke vzniku komplexu profen-TM- β -CD o nesrovnatelně větší velikosti, než má draselný kation. Z toho vyplývá, že velikost zmiňovaného komplexu tedy nelze ztotožnit s velikostí použitého viskozitního markeru. Pro korekci pohyblivostí profenů, jež jsou v komplexu s TM- β -CD, na viskozitu BGE je nezbytné použít ještě jiný způsob korekce na viskozitu, který by zohledňoval přítomnost komplexu. Ten nebyl z časových důvodů proveden. Proto lze považovat tuto práci za první krok pro navržení vhodného způsobu korekce pohyblivostí zvolených analytů na viskozitu separačního pufru, což by mohlo být náplní další navazující práce.

8. POUŽITÁ LITERATURA

- [1] Chankvetadze B.: *Capillary Electrophoresis in Chiral Analysis*, Wiley, Chichester 1997.
- [2] Coufal P.; Suchánková J.: *Separáční metody – přednáška*, UK Praha, 2005.
- [3] Kašička V.: *Chem. Listy* **91**, 320-329 (1997).
- [4] Štulík K. a kol.: *Analytické separáční metody*, Karolinum, Praha 2005.
- [5] Erny G. L.; Bergström E. T.; Goodall D. M.: *J.Chromatogr. A* **959**, 229-239 (2002).
- [6] Erny G. L.; Bergström E. T.; Goodall D. M.: *Anal.Chem.* **73**, 4862-4872 (2001).
- [7]  ervinka O.: *Chem. Listy* **93**, 294-305 (1999).
- [8] Leli vre F.; Gareil P.: *J. Chromatogr. A* **735**, 311-320 (1996).
- [9] Hergert L. A.; Escandar G. M.: *Talanta* **60**, 235-246 (2003).
- [10] Stafiej A.; Pyrzynska K.; Regan F.: *J. Sep. Sci.* **30**, 985-991 (2007).
- [11] Hutt A. J.; Caldwell J.: *J. Pharm. Pharmacol.* **35**, 693-704 (1983).
- [12] Caldwell J.; Hutt A. J.; Fournel-Gileux S.: *Biochem. Pharmacol.* **37**, 105-114 (1988).
- [13] Hall S. D.; Hassanzadeh-Khayyat M.; Knadler M. P.; Mayer P. R.: *Chirality* **4**, 349-352 (1992).
- [14] Smr ek S.: *Chemie l čiv II. – předn ška*, UK Praha 2007.
- [15] <http://old.if3.cuni.cz/ustavy/farmakologie/COX-2basic/coxII-inhibitory.html>
- [16] www.medicinenet.com/flurbiprofen/article.htm
- [17] www.drugs.com/mtm/flurbiprofen.html
- [18] www.drugs.com/ibuprofen.html
- [19] www.medicinenet.com/ketoprofen/article.htm
- [20] www.medicinenet.com/naproxen/article.htm
- [21] Williams R. L.; Vigh G.: *J. Chromatogr. A* **730**, 273-278 (1996).
- [22] Williams R. L.; Vigh G.: *J. Liq. Chromatogr.* **18**, 3813-3824 (1995).
- [23] Williams R. L.; Vigh G.: *J. Chromatogr. A* **744**, 75-80 (1996).
- [24] Wren S. A. C., Rowe R. C.: *J. Chromatogr.* **609**, 363-367 (1992).
- [25] Pettersen T. E.: *J. Chromatogr.* **630**, 353-361 (1993).
- [26] Skokanov  J.: *Bakal rsk  pr ce*, UK Praha 2006.
- [27] www.uochb.cas.cz/Zpravy/PostGrad2004/8_Kraus.pdf

- [28] www.sigmaaldrich.com/catalog/search/SearchResultsPage/Expand
- [29] Schipper B. R.; Ramstad T.: *J. Pharm. Sci.* **94**, 1528-1536 (2005).
- [30] Kawaoka J.; Gomez F. A.: *J. Chromatogr. B* **715**, 203-210 (1998).
- [31] Erdey-Grúz T.: *Transport Phenomena in Aqueous Solutions*, Budapest, Akadémiai Kiadó 1974.
- [32] Robinson R. A.; Stokes R. H.: *Elektrolyte Solutions*, Second Revised Edition, Dover Publications, INC., Mineola, New York.
- [33] Foulon C.; Danel C.; Vaccher M. P.: *Electrophoresis* **25**, 2735-2744 (2004).
- [34] Lucy C. A.; Brown R.; Yeung K. K. C.: *J. Chromatogr. A* **745**, 9-15 (1996).
- [35] Vaccher M. P.; Lipka E.; Bonte J. P.; Foulon C.; Goossens J. F.; Vaccher C.: *Electrophoresis* **26**, 2974-2983 (2005).
- [36] Gaš B.; Zuska J.; Coufal P.; van de Goor T.: *Electrophoresis* **23**, 3520-3527 (2002).
- [37] <http://natur.cuni.cz/~gas>
- [38] Tanaka Y.; Terabe S.: *J. Chromatogr. B* **768**, 81-92 (2002).
- [39] Fanali S.; Aturki Z.: *J. Chromatogr. A* **694**, 297-305 (1995).
- [40] Penn S. G.; Bergström E. T.; Goodall D. M.: *Anal. Chem.* **66**, 2866 (1994).