

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
Přírodovědecká fakulta  
Katedra fyzikální a makromolekulární chemie

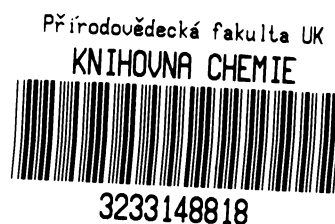
---

STANOVENÍ DISOCIAČNÍCH KONSTANT A LIMITNÍCH  
POHYBLIVOSTÍ VYBRANÝCH PROFENŮ  
METODOU KAPILÁRNÍ ZÓNOVÉ ELEKTROFORÉZY

Bakalářská práce  
studijního programu Klinická a toxikologická analýza

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Iva Zusková, CSc.

Praha 2009



Karolina Černá

Tato bakalářská práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru MSM0021620857.

## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně, pod vedením školitelky 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 1. června 2009.

*Karolina Čeruš!*  
.....

## Klíčová slova

kapilární zónová elektroforéza, disociační konstanta, limitní pohyblivost, profeny

## Poděkování

Chtěla bych poděkovat všem, kteří mi pomáhali při vypracování bakalářské práce, především své školitelce RNDr. Ivě Zuskové, CSc. a konzultantce RNDr. Kateřině Ušelové, PhD., za odborné vedení, trpělivost, ochotu a cenné rady. Dík patří také Mgr. Janě Svobodové za pomoc s překonáváním počátečních obtíží.

## Obsah

1.	Seznam použitých symbolů a zkratk .....	2
2.	Úvod a cíl práce.....	4
3.	Teoretická část.....	6
3.1	Teoretické základy kapilární zónové elektroforézy .....	6
3.2	Tlakem zprostředkovaná kapilární elektroforéza (PreMCE) .....	11
3.3	Princip stanovení disociačních konstant a elektroforetických pohyblivostí metodou CZE ...	12
3.4	Profeny .....	14
4.	Experimentální část .....	19
4.1	Chemikálie .....	19
4.2	Instrumentace a programy .....	19
4.3	Volba a příprava základních elektrolytů .....	20
4.4	Příprava vzorků .....	20
4.5	Další experimentální podmínky a postupy .....	21
5.	Výsledky.....	22
6.	Diskuse.....	29
7.	Závěr .....	30
	Citovaná literatura .....	31

## 1. Seznam použitých symbolů a zkratek

$a$	nejkratší vzdálenost středů protiiontů
$a_{A^-}$	aktivita aniontu kyseliny
$a_{HA}$	aktivita neutrálních molekul kyseliny
$a_{H_3O^+}$	aktivita oxoniových iontů
$c$	celková analytická koncentrace látky
$c_{A^-}$	koncentrace aniontu
$c_{HA}$	koncentrace neutrálních molekul kyseliny
$c_i$	koncentrace $i$ -té formy
$e$	elementární náboj
$E$	intenzita elektrického pole
$F_e$	elektrická síla
$F_f$	třecí síla
$I$	iontová síla
$L_c$	celková délka kapiláry
$L_d$	délka kapiláry k detektoru
$K_A$	termodynamická disociační konstanta
$K_A^{\text{mix}}$	smíšená disociační konstanta
$p$	aplikovaný tlak
$r$	poloměr částice
$t_a$	detekční čas analytu
$t_{N1}$	detekční čas neutrálního markeru N1
$t_{N2}$	detekční čas neutrálního markeru N2
$t_{\text{migr}}$	čas, po který je aplikováno napětí
$t_p$	čas odpovídající začátku aplikace tlaku ve finálním kroku
$U$	aplikované napětí
$v$	rychlost
$v_{\text{EOF}}$	rychlost elektroosmotického toku
$z$	nábojové číslo
$z_i$	nábojové číslo $i$ -tého iontu
$z_+$	nábojové číslo kationtu
$z_-$	nábojové číslo aniontu

$\gamma_{A^-}$	aktivitní koeficient aniontu kyseliny
$\eta$	viskozitní koeficient
$\mu$	elektroforetická pohyblivost, aktuální pohyblivost
$\mu_{A^-}$	aktuální pohyblivost aniontu
$\mu_{app}$	pozorovaná pohyblivost
$\mu_{eff}$	efektivní pohyblivost
$\mu_{EOF}$	elektroosmotická pohyblivost
$\mu_i$	aktuální pohyblivost <i>i</i> -té formy
$\mu_{lim}$	limitní pohyblivost
$\mu_{lim, A^z}$	limitní pohyblivost aniontu
$\mu_{lim, K^z}$	limitní pohyblivost kationtu
$A^-$	anion kyseliny HA
HA	neutrální forma kyseliny
BGE	základní elektrolyt, background electrolyte
CE	kapilární elektroforéza, capillary electrophoresis
Cox	cyklooxygenasa
Cox-1, Cox-2	isoenzymy cyklooxygenasy
CZE	kapilární zónová elektroforéza, capillary zone electrophoresis
DAD	spektrofotometrický detektor s diodovým polem, diod array detector
DMSO	dimethylsulfoxid
EOF	elektroosmotický tok, electroosmotic flow
MES	kyselina 2-morpholinoethansulfonová
NSAIDs	nesteroidní protizánětlivá léčiva, non-steroidal antiinflammatory drugs
PACE	tlakem podporovaná kapilární elektroforéza, pressure-assisted capillary electrophoresis
PreMCE	tlakem zprostředkovaná kapilární elektroforéza, pressure-mediated capillary electrophoretic method
UV-VIS	ultrafialová a viditelná oblast spektra

## 2. Úvod a cíl práce

Tato bakalářská práce navazuje na diplomovou práci J. Skokanové <sup>(1)</sup> zabývající se stanovením konstant stability vybraných profenů (S-flurbiprofen, R-flurbiprofen, S-ibuprofen, S-ketoprofen a S-naproxen) s neutrálním chirálním selektorem, heptakis(2,3,6-tri-*O*-methyl)- $\beta$ -cyklodextrinem. Byla vypracována metoda stanovení konstant stability jak komplexu aniontu příslušného profenu, tak i jeho neutrální molekuly s daným cyklodextrinem. Ke stanovení těchto konstant stability byla využita metoda nelineární regrese experimentálních závislostí efektivních pohyblivostí příslušného profenu na koncentraci cyklodextrinu v separačním prostředí o dvou rozdílných hodnotách pH. Nezbytným vstupním údajem regresní analýzy pro hodnotu pH, při které je daný profen přítomen jak v disociované, tak nedisociované formě, je jeho aciditní disociační konstanta. V citované práci byly použity disociační konstanty nalezené v literatuře (pro ibuprofen <sup>(2)</sup>, pro ostatní profeny <sup>(3)</sup>). Dalšími údaji potřebnými pro stanovení příslušných konstant stability jsou aktuální pohyblivosti profenů při zvolené iontové síle. Tyto hodnoty byly získány jako variabilní parametry příslušných regresních funkcí.

Původním záměrem této bakalářské práce bylo ověřit, zda při použití takto stanovených konstant stability pro výpočet efektivních pohyblivostí profenů v prostředí cyklodextrinu, jsou tyto vypočtené efektivní pohyblivosti ve shodě s experimentálně zjištěnými při jiných experimentálních podmínkách, především při jiných hodnotách pH prostředí, než při kterých byly konstanty stability stanoveny.

Ovšem již při stanovení efektivních pohyblivostí profenů při nulové koncentraci cyklodextrinu se ukázalo, že experimentálně zjištěné pohyblivosti nejsou ve shodě s teoreticky vypočtenými. Odchyly se pohybovaly řádově v desítkách procent (13–43%). Nejmenší odchylka teoreticky vypočtené a experimentálně zjištěné pohyblivosti byla nalezena u S-naproxenu, největší odchylku vykazoval S-ibuprofen. Možným vysvětlením této skutečnosti jsou nesprávné hodnoty disociačních konstant profenů převzatých z literatury. Na základě těchto zjištění bylo rozhodnuto stanovit disociační konstanty použitých profenů metodou kapilární zónové elektroforézy. Tato metoda ovšem umožňuje současně s disociační konstantou stanovit též aktuální pohyblivost iontové formy analyzované látky. Nezávislé stanovení aktuálních pohyblivostí aniontů profenů by přispělo ke zvýšení přesnosti i správnosti stanovovaných konstant stability.

Konstanty stability byly stanovovány mimo jiné pro R- i S-konfiguraci flurbiprofenu. Teoreticky mají oba enantiomery stejnou disociační konstantu i pohyblivost. Přesto byly obě konfigurace použity ke stanovení těchto hodnot. Dílčím cílem předkládané práce tak bylo

ověřit, do jaké míry lze této teoretické shody dosáhnout při experimentálním stanovení použitou metodou.

Hlavní cíle práce:

- Stanovit smíšené disociační konstanty a aktuální iontové pohyblivosti vyjmenovaných profenů při iontové síle, při které byly stanovovány jejich konstanty stability v diplomové práci J. Skokanové.
- Určit pravé termodynamické disociační konstanty a limitní pohyblivosti stanovovaných profenů.



### 3. Teoretická část

#### 3.1 Teoretické základy kapilární zónové elektroforézy <sup>(4; 5; 6; 7)</sup>

Kapilární zónová elektroforéza je separační metoda založená na rozdílné rychlosti migrace nabitých částic v roztoku vystaveném působení elektrického pole. Separace se obvykle provádí v křemenné kapiláře s vnitřním průměrem několik desítek mikrometrů. Nespornou výhodou kapilárních elektromigračních metod jsou velmi malé spotřeby vzorku a činidel potřebných pro separaci, velká účinnost separace a možnost zautomatizování metody. Naopak nevýhodou bývá horší reprodukovatelnost experimentů.

Klíčovou veličinou všech elektromigračních metod je tzv. elektroforetická pohyblivost (krátce pohyblivost či mobilita).

#### Elektroforetická pohyblivost

Je-li kulová částice o nábojovém čísle  $z$  umístěna do elektrického pole o intenzitě  $E$ , působí na ni hnací síla elektrického pole  $F_e$

$$F_e = |z|eE, \quad (1)$$

kde  $e$  je elementární náboj. Intenzita elektrického pole  $E$  uvnitř separační kapiláry je dána podílem napětí  $U$  vloženého mezi elektrody a celkové délky kapiláry  $L_c$

$$E = \frac{U}{L_c}. \quad (2)$$

Zároveň pohyb částice o poloměru  $r$  v prostředí o viskozitním koeficientu  $\eta$  brzdí protichůdná třecí síla  $F_f$ , která je způsobena srážkami s ostatními částicemi v kapalném prostředí a popisuje ji Stokesův zákon

$$F_f = 6\pi\eta r v, \quad (3)$$

ve kterém  $v$  je rychlost dané částice. Velikosti těchto protichůdných sil se ovšem za krátký čas vyrovnají a částice se pohybuje konstantní rychlostí  $v$

$$v = \frac{|z|e}{6\pi\eta r} E. \quad (4)$$

Pro porovnávání rychlostí migrace iontů byla zavedena veličina elektroforetická pohyblivost  $\mu$ , definovaná vztahem

$$\mu = \frac{v}{E}. \quad (5)$$

Elektroforetická pohyblivost tedy představuje rychlost pohybu nabitě částice v kapalném prostředí vystaveném působení stejnosměrného elektrického pole o jednotkové intenzitě. Z kombinace výrazů (4) a (5) plyne pro elektroforetickou pohyblivost iontu v ideálně zředěném roztoku vztah

$$\mu = \frac{|z|e}{6\pi\eta r}, \quad (6)$$

podle kterého má pohyblivost iontu vždy kladnou hodnotu. Obvykle se však zavádí konvence, podle které má pohyblivost kationtů kladnou hodnotu a pohyblivost aniontů hodnotu zápornou. Tato konvence je použita i v této práci. Vztah (6) byl odvozen za předpokladu ideálního chování roztoku, platí tedy pouze pro tzv. limitní pohyblivost iontu  $\mu_{\text{lim}}$ . Limitní pohyblivosti jsou tabelované jako fyzikálně chemické konstanty iontů. V reálných roztocích závisí elektroforetická pohyblivost na iontové síle roztoku. Elektroforetická pohyblivost iontů při nenulové iontové síle prostředí se nazývá aktuální pohyblivost a dále je označována symbolem  $\mu$ .

Iontová síla  $I$  je definovaná vztahem

$$I = \frac{1}{2} \sum_i c_i z_i^2, \quad (7)$$

ve kterém  $c_i$  a  $z_i$  je koncentrace a nábojové číslo  $i$ -tého iontu v roztoku.

Závislost aktuální pohyblivosti iontu binárního elektrolytu na iontové síle vyjadřuje rozšířený Onsagerův limitní zákon <sup>(8)</sup>, který popisuje relaci mezi aktuální a limitní pohyblivostí iontu. Výsledná rovnice pro aktuální pohyblivost aniontu  $\mu_{A^z}$  nabývá tvaru

$$\mu_{A^z} = \mu_{\text{lim}, A^z} - \left( \mu_{\text{lim}, A^z} |z_-| z_+ B_1 \frac{q}{1 + \sqrt{q}} + B_2 |z_-| \right) \frac{\sqrt{I}}{1 + B a \sqrt{I}}, \quad (8)$$

ve kterém  $\mu_{\text{lim}, A^z}$  je limitní pohyblivost daného aniontu,  $z_+$  a  $z_-$  jsou nábojová čísla kationtu a aniontu,  $B_1$ ,  $B_2$  a  $B$  jsou konstanty (pro vodné roztoky při teplotě 25 °C:

$B_1 = 0,7853 \text{ dm}^{3/2} \text{ mol}^{-1/2}$ ,  $B_2 = 31,38 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ dm}^{3/2} \text{ mol}^{-1/2}$ ,  $B = 3,291 \cdot 10^9 \text{ m}^{-1} \text{ dm}^{3/2} \text{ mol}^{-1/2}$ ) a  $a$  představuje nejkratší vzdálenost, na jakou se mohou přiblížit středy aniontu a kationtu. Hodnota součinu  $Ba$  přibližně odpovídá  $1,5 \text{ dm}^{3/2} \text{ mol}^{-1/2}$  a s touto hodnotou je vztah (8) používán v této práci.

Parametr  $q$  v rovnici (8) je dán výrazem

$$q = \frac{z_+ |z_-|}{z_+ + |z_-|} \frac{\mu_{\text{lim}, K^{z_+}} + \mu_{\text{lim}, A^{z_-}}}{|z_-| \mu_{\text{lim}, K^{z_+}} + z_+ \mu_{\text{lim}, A^{z_-}}}, \quad (9)$$

kde  $\mu_{\text{lim}, K^{z_+}}$  značí limitní pohyblivost kationtu v daném binárním elektrolytu.

Pro látky, které se v roztoku vyskytují ve více formách, mezi nimiž dochází k rychlému ustavování rovnováhy, se definuje efektivní pohyblivost  $\mu_{\text{eff}}$  vztahem

$$\mu_{\text{eff}} = \frac{\sum_{i=1}^n c_i \mu_i}{c}, \quad (10)$$

ve kterém  $\mu_i$  je aktuální pohyblivost  $i$ -té formy dané látky a  $c$  je její analytická koncentrace. Pojem efektivní pohyblivost se formálně používá i pro ionty silných elektrolytů, u kterých má ale význam aktuální pohyblivosti.

V případě slabých elektrolytů je efektivní pohyblivost závislá na hodnotě pH. V roztoku o vhodném pH disociují a jsou tak v roztoku přítomny v neutrální formě a ve formě iontu/ů (aniontu  $A^-$  v případě jednosytných kyselin nebo kationtu  $BH^+$  v případě jednosytných bází). Mezi těmito formami dochází vždy k ustavování rychlé dynamické rovnováhy a látka se pohybuje jako celek svou efektivní elektroforetickou pohyblivostí.

### Elektroosmotický tok

Dalším transportním jevem, který ovlivňuje chování v kapiláře, je elektroosmotický tok (electroosmotic flow, EOF) neboli elektroosmóza. K vytvoření elektroosmotického toku dojde vložení napětí několika desítek kilovoltů mezi elektrody na koncích kapiláry. V případě, že je křemenná kapilára naplněna vhodným elektrolytem, dojde na vnitřní stěně kapiláry k hydrolyze siloxanových skupin za vzniku silanolových, které disociují, a povrch kapiláry tak má negativní náboj ( $\equiv \text{Si-O}^-$ ). Volně pohyblivé oxoniové kationty v roztoku, uvolněné po disociaci, vytvoří kladně nabitou vrstvu přilehlou ke stěně kapiláry. Vložení napětí mezi elektrody se docílí pohybu hydratovaných oxoniových iontů směrem ke katodě. Tyto pohybující se ionty s sebou strhnou celý obsah kapiláry a tím dojde ke vzniku elektroosmotického toku.

Rychlost elektroosmotického toku  $v_{\text{EOF}}$  je přímo úměrná intenzitě elektrického pole  $E$  a konstantou úměrnosti je tzv. elektroosmotická pohyblivost (pohyblivost EOF)  $\mu_{\text{EOF}}$

$$v_{\text{EOF}} = \mu_{\text{EOF}} E. \quad (11)$$

Elektroosmotický tok směřující ke katodě se označuje jako kationický a přiřazuje se mu kladná hodnota pohyblivosti, analogicky elektroosmotický tok směřující k anodě se nazývá anionický a přiřazuje se mu pohyblivost záporná.

Významnou roli ve velikosti a směru EOF hraje pH roztoku v kapiláře. Hodnota pH ovlivňuje disociaci silanolových skupin a tím náboj na vnitřním povrchu kapiláry. Čím je pH roztoku uvnitř kapiláry vyšší, tím větší negativní náboj je rozprostřen na vnitřní stěně kapiláry a tím rychlejší je elektroosmotický tok. Při pH nižším než 4 jednotky se elektroosmóza výrazně zpomaluje, případně může dojít k otočení jejího směru. Kromě pH má na rychlost elektroosmózy vliv také iontová síla. Nižší iontová síla roztoku vede k rychlejšímu elektroosmotickému toku.

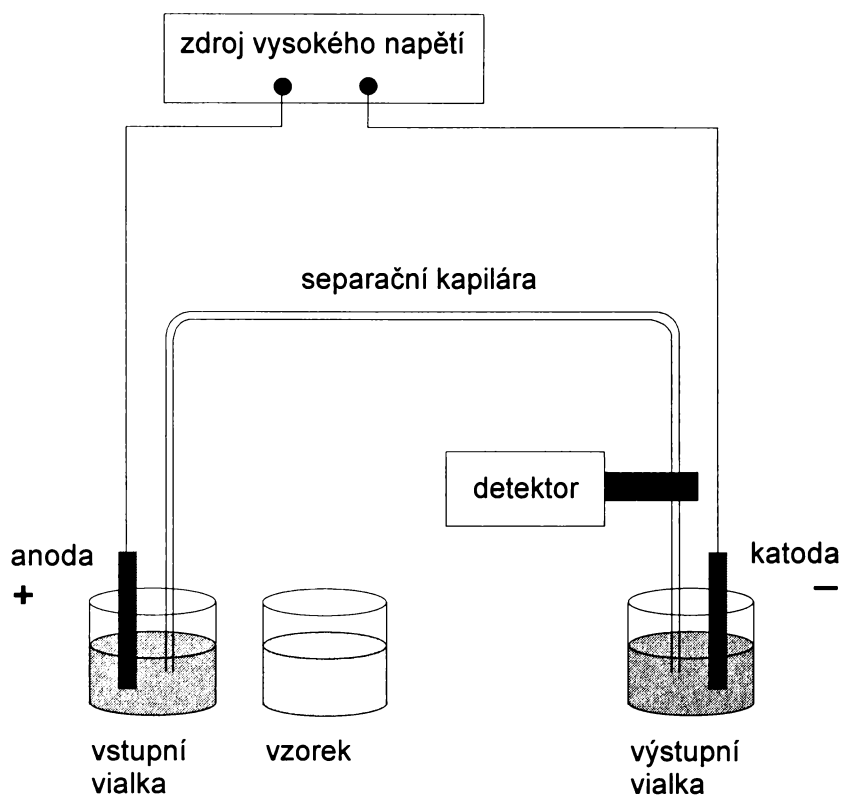
Rychlost nebo pohyblivost elektroosmotického toku se zjišťuje pomocí tzv. markerů EOF. Jako markery EOF se volí elektroneutrální látky, které unáší kapilárou pouze elektroosmotický tok, tudíž z jejich detekčního času lze požadovanou pohyblivost snadno spočítat.

Částice nesoucí náboj jsou též transportovány elektroosmotickým tokem roztoku, ale navíc také svou vlastní migrací. Jejich tzv. pozorovaná (apparent) pohyblivost  $\mu_{\text{app}}$  je dána součtem jejich efektivní pohyblivosti a pohyblivosti EOF

$$\mu_{\text{app}} = \mu_{\text{EOF}} + \mu_{\text{eff}}. \quad (12)$$

### **Základní experimentální uspořádání a princip CZE**

Na Obr. 1 je schematicky znázorněno experimentální uspořádání hlavních komponent přístroje pro kapilární zónovou elektroforézu. Základem je křemenná kapilára pokrytá vnější vrstvou polyimidu, který odstraňuje přílišnou křehkost kapiláry a naopak dodává jí potřebnou pružnost. Vnitřní průměr kapiláry bývá obvykle v rozmezí 25–100  $\mu\text{m}$  a délka se volí v rozsahu 30–100 cm. Oba konce kapiláry jsou ponořeny do elektrodových nádobek (vialek), které obsahují vhodný separační elektrolyt, tzv. základní elektrolyt (BGE). Na elektrody se vkládá napětí v řádu desítek kilovoltů ze zdroje stejnosměrného konstantního napětí. Součástí aparatury je detektor umístěný poblíž výstupního konce kapiláry. V CZE se nejčastěji používá absorpční fotometrický detektor pracující v UV-VIS oblasti spektra.

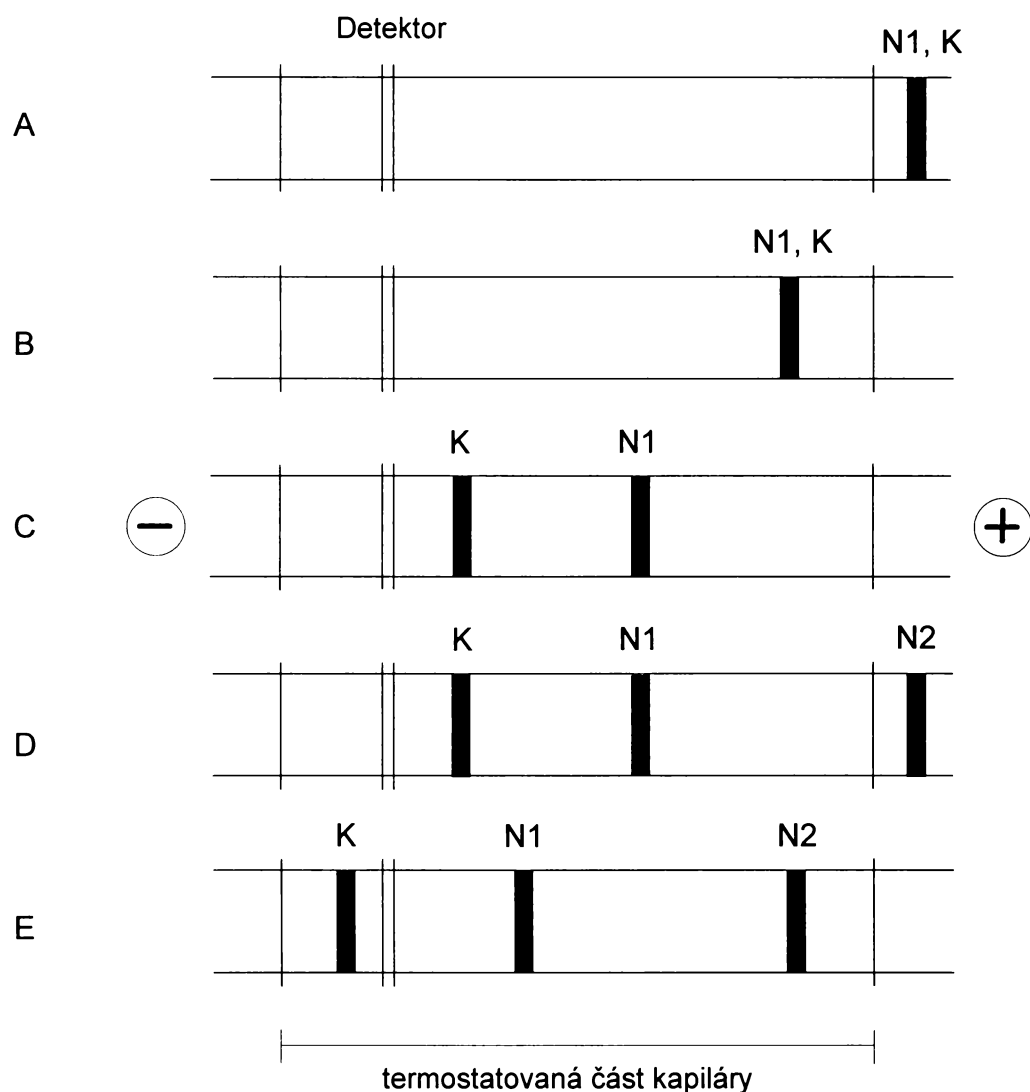


Obr. 1 Schéma přístroje pro kapilární zónovou elektroforézu (překresleno podle <sup>(4)</sup>).

Před vlastní analýzou je kapilára naplněna základním elektrolytem. Poté se nadávkuje vzorek obsahující směs analytů a markeru EOF v základním elektrolytu. Dávkování lze realizovat dvěma způsoby. Při elektrokinetickém dávkování je na elektrody vloženo dávkovací napětí a vlivem elektroosmózy a samotné elektroforetické migrace iontů je vzorek transportován do kapiláry. Tímto způsobem dávkování ovšem dojde ke změně složení v nadávkované zóně oproti původnímu připravenému vzorku z důvodu rozdílné pohyblivosti analytů. Častěji využívaným způsobem je hydrodynamické dávkování, kdy je roztok vzorku do kapiláry natlačen vytvořením přetlaku na hladinu ve vialce se vzorkem. Po nadávkování vzorku a vložení napětí vypořádávají elektricky nabitě složky z nadávkované zóny do prostředí základního elektrolytu a liší-li se dostatečně svojí elektroforetickou pohyblivostí, rozdělí se do samostatných zón. Při vhodně zvolené polaritě zdroje a nenulové pozorované pohyblivosti doputují zóny analytů i markeru EOF k detektoru (pro uspořádání znázorněné na Obr. 1 tato situace nastane v případě, že pozorované pohyblivosti analytů i markeru EOF budou mít kladnou hodnotu). Na časovém záznamu detektoru, tzv. elektroferogramu, se při nenulové odezvě projeví zóny složek vzorku jako píky.

### 3.2 Tlakem zprostředkovaná kapilární elektroforéza (PreMCE)

Tlakem zprostředkovaná kapilární elektroforéza je metoda, kterou zavedli Williams a Vigh<sup>(9; 10)</sup>. Metoda PreMCE eliminuje problémy s kolísáním EOF během separace, eliminuje nedostatky při separaci v netermostatované části kapiláry a také umožňuje rychle a reprodukovatelně měřit velmi nízké mobility analytů i EOF. Jednou z největších výhod této metody je možnost stanovení pohyblivosti kationtů a aniontů v jednom experimentu nezávisle na velikosti a směru EOF.



Obr. 2 Pořadí kroků PreMCE metody k určení elektroforetické pohyblivosti kationtu K (překresleno podle<sup>(9)</sup>). N1 a N2 značí elektroneutrální látky. Bližší popis je uveden v textu.

Obr. 2 ukazuje schematické znázornění určení efektivní pohyblivosti kationtu, pro anion je určení analogické. V prvním kroku A se do kapiláry naplněné BGE nadávávkou dávkovacím tlakem vzorek, který obsahuje analyt a neutrální marker N1 rozpuštěný v BGE. V kroku B je

zóna vzorku natlačena do termostatované části kapiláry konstantním tlakem  $p$ . Poté v kroku C je aplikováno separační napětí  $U$  po čas  $t_{\text{migr}}$  tak, aby ani analyt ani neutrální marker „nepřešly“ přes detektor nebo nevyputovaly vstupním koncem kapiláry. V tomto kroku dochází k separaci neutrálního markeru a kationtu. Neutrální marker se pohybuje směrem ke katodě (v případě kationického EOF), kation putuje směrem ke katodě kombinací své elektroforetické pohyblivosti a pohyblivosti elektroosmózy. Po vypnutí napětí je v následujícím kroku D nadávkován další neutrální marker N2 rozpuštěný v BGE. Nakonec v kroku E je opět aplikován konstantní tlak  $p$  po dobu, než se na záznamu detektoru objeví pík markeru N2.

Popsaný způsob umožňuje stanovení efektivní pohyblivosti analytu. K přesnému stanovení pohyblivosti EOF metoda zahrnuje ještě další kroky. Princip výpočtu efektivní pohyblivosti analytu je následující. Přes detektor procházejí zóny v kroku E rychlostí hydrodynamického toku. Tato rychlost se určí z času, za který marker N2 doputuje v kroku E k detektoru. Z této rychlosti a rozdílu detekčních časů markeru N1 a analytu K pak lze vyjádřit dráhový rozdíl, na který se od sebe vzdálí analyt a marker N1 během kroku C, kdy je aplikováno separační napětí. Tento dráhový rozdíl je dán součinem efektivní pohyblivosti analytu, doby  $t_{\text{migr}}$  a intenzity elektrického pole.

### 3.3 Princip stanovení disociačních konstant a elektroforetických pohyblivostí metodou CZE (7; 11; 12)

Stanovení disociačních konstant a iontových pohyblivostí kapilární zónovou elektroforézou je založeno na proměření závislosti efektivní pohyblivosti zkoumaného analytu na pH základního elektrolytu. Efektivní pohyblivost je však funkcí nejenom pH, ale je také ovlivňována iontovou silou. V praxi to tedy znamená použití série základních elektrolytů o různém pH s prakticky konstantní iontovou silou, což umožňuje vynést efektivní pohyblivost v závislosti na jediné proměnné – pH. Experimentálně získaná závislost se proloží vhodnou regresní funkcí. Optimální regresní funkcí je teoreticky odvozený vztah mezi efektivní pohyblivostí, disociační konstantou a aktuální pohyblivostí. Následující odvození je uvedeno pro jednosytnou kyselinu.

Ve vodném roztoku slabé jednosytné kyseliny se ustavuje rovnováha popsaná stechiometrickou rovnicí



kde HA symbolizuje nedisociovanou formu a  $A^-$  anion této kyseliny. Odpovídající termodynamická disociační konstanta  $K_A$  je vyjádřena vztahem

$$K_A = \frac{a_{A^-} a_{H_3O^+}}{a_{HA}}, \quad (14)$$

ve kterém  $a_{A^-}$  značí aktivitu aniontu kyseliny,  $a_{H_3O^+}$  je aktivita oxoniových iontů a  $a_{HA}$  aktivita nedisociované formy této kyseliny. Vychází-li stanovení disociační konstanty z experimentálně zjištěné hodnoty pH, která je úměrná aktivitě oxoniových iontů, a efektivní pohyblivosti, která je úměrná koncentraci aniontu  $c_{A^-}$  a neutrálních molekul kyseliny  $c_{HA}$ , je vhodné zavést tzv. smíšenou disociační konstantou  $K_A^{\text{mix}}$  vztahem

$$K_A^{\text{mix}} = \frac{a_{H_3O^+} c_{A^-}}{c_{HA}}. \quad (15)$$

Relace mezi termodynamickou a smíšenou disociační konstantou je daná výrazem

$$K_A = K_A^{\text{mix}} \gamma_{A^-}, \quad (16)$$

kde  $\gamma_{A^-}$  představuje aktivní koeficient aniontu kyseliny. Tento vztah platí za předpokladu, že aktivní koeficient neutrálních molekul HA je jednotkový.

V případě, že iontová síla je menší než  $10 \text{ mol dm}^{-3}$ , lze pro výpočet aktivního koeficientu univalentního iontu  $\gamma_{A^-}$  použít McInnesovu aproximaci ve tvaru

$$\log \gamma_{A^-} = \frac{-A\sqrt{I}}{1 + 1,5\sqrt{I}}, \quad (17)$$

kde  $I$  je iontová síla v jednotkách  $\text{mol dm}^{-3}$  a  $A$  je konstanta, která má pro vodný roztok při teplotě  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  hodnotu  $0,5085 \text{ dm}^{3/2} \text{ mol}^{-1/2}$ .

Pro efektivní pohyblivost dané kyseliny podle rovnice (10) platí

$$\mu_{\text{eff}} = \mu_{A^-} \frac{c_{A^-}}{c_{HA} + c_{A^-}}, \quad (18)$$

kde  $\mu_{A^-}$  značí aktuální pohyblivost aniontu kyseliny.



Kombinací rovnic (15) a (18) dostaneme výraz

$$K_A^{\text{mix}} = 10^{-\text{pH}} \frac{\mu_{\text{eff}}}{\mu_{A^-} - \mu_{\text{eff}}}, \quad (19)$$

který po úpravě poskytne hledaný vztah pro závislost efektivní pohyblivosti na pH ve tvaru

$$\mu_{\text{eff}} = \frac{\mu_{A^-}}{1 + 10^{\text{p}K_A^{\text{mix}} - \text{pH}}}. \quad (20)$$

Tato funkce se využije jako regresní funkce k proložení experimentální závislosti efektivní pohyblivosti na pH. Parametry funkce jsou aktuální pohyblivost aniontu  $\mu_{A^-}$  a smíšená disociační konstanta  $\text{p}K_A^{\text{mix}}$  při dané iontové síle. Korekcí těchto parametrů na nulovou iontovou sílu (nekonečné zředění) dostaneme limitní pohyblivost aniontu  $\mu_{\text{lim}, A^-}$  a termodynamickou disociační konstantu  $K_A$ .

### 3.4 Profeny

Profeny jsou deriváty 2-arylpropionové kyseliny<sup>(13; 14)</sup>. Z fyzikálně chemického hlediska se jedná o slabé jednosytné kyseliny. Všechny tyto kyseliny patří mezi látky chirální.<sup>(3)</sup>

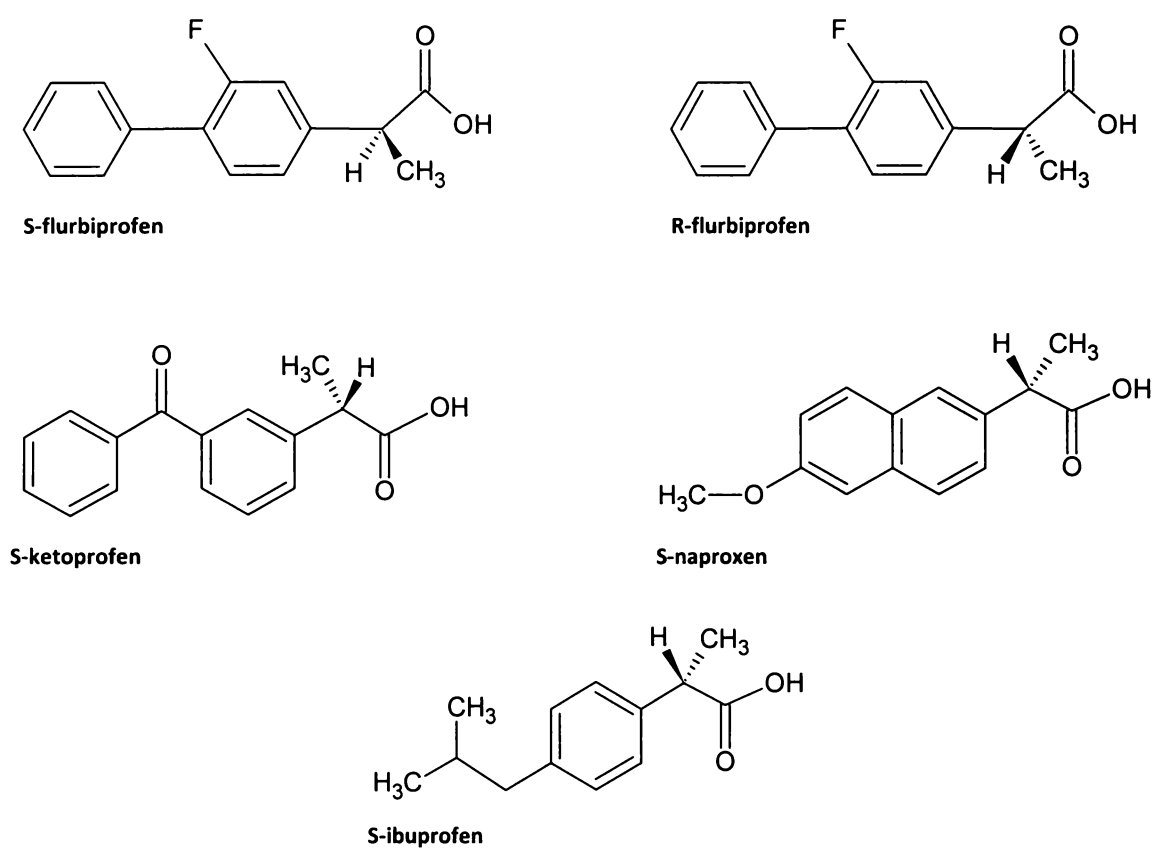
Z farmakologického hlediska patří profeny do skupiny nesteroidních protizánětlivých léčiv (NSAIDs).<sup>(3; 15)</sup> NSAIDs jsou běžně používanými léčivy, která efektivně utišují bolest, snižují horečku a ve vyšších dávkách mají protizánětlivý účinek. Součástí léčiv jsou racemáty profenů nebo jejich R-forma.<sup>(13; 3; 16)</sup> Léčivý účinek profenů má enantiomer s S-konfigurací. V organismu dochází k metabolické přeměně R-konfigurace na S-konfiguraci. Rozsah této přeměny závisí na struktuře kyseliny a na živočišném druhu.<sup>(3)</sup>

Většina NSAIDs působí jako inhibitor aktivity enzymu cyklooxygenasa (Cox). Isoenzymy cyklooxygenas, Cox-1 a Cox-2, katalyzují přeměnu kyseliny arachidonové na prostaglandin  $H_2$ , který je poté metabolizován tkáňově specifickými isomerásami na další formy prostaglandinů. Některé prostaglandiny jsou látky, které podporují srážení krevních destiček, chrání obsah žaludku před poškozením kyselinami, jiné se významně podílí na zánětech, bolestech a horečkách. Isoforma Cox-1 je označována jako příznivá pro organismus, vyskytuje se ve většině tkání a buněk, hraje roli při homeostáze a produkuje prostaglandiny

s pozitivními účinky, zatímco nepříznivá isoforma Cox-2 produkuje prostaglandiny způsobující horečky, záněty a podněcuje vznik rakovinných buněk.<sup>(17)</sup>

Existuje přes 50 dostupných NSAIDs, které se dělí do skupin podle chemické struktury, farmakokinetického hlediska a podle toho, zda vykazují Cox-1 selektivitu nebo Cox-2 selektivitu.<sup>(17)</sup>

V této práci byly použity čtyři profeny, a to flurbiprofen, naproxen, ketoprofen a ibuprofen, konkrétně jejich S-forma, od flurbiprofenu také R-forma. Struktury těchto látek jsou na Obr. 3.<sup>(18)</sup> Jejich  $pK_A$  hodnoty se podle literárních zdrojů<sup>(3; 19; 20; 21; 15)</sup> pohybují v rozmezí 3,9–4,4.



Obr. 3 Strukturní vzorce vybraných profenů, S-flurbiprofen, R-flurbiprofen, S-ketoprofen, S-naproxen, S-ibuprofen (překresleno podle<sup>(18)</sup>)

Článek autorů F. Lelièvre a P. Gareil<sup>(3)</sup> se primárně zabývá chirální separací profenů v pufrch o hodnotách pH 4, 6, 8 a 10 a iontové síle 75 mmol dm<sup>-3</sup> obsahujících neutrální cyklodextriny metodou CZE. Ovšem pro pochopení chování studovaných profenů a vzhledem k nedostupnosti aciditních konstant některých studovaných profenů, se článek zabývá také stanovením hodnot disociačních konstant. Experimenty pro určení  $pK_A$  byly provedeny pouze

ve dvou pufrách o hodnotách pH 4 a 10 a iontové síle  $75 \text{ mmol dm}^{-3}$ . Hodnota  $pK_A$  byla vypočtena z aktuální pohyblivosti profenu při pH 10, kdy je tato látka plně disociována, a z efektivní pohyblivosti profenu při pH 4, kdy je látka disociována přibližně z 50%. Pro přepočet smíšené disociační konstanty na termodynamickou byla použita McInnesova aproximace. Separace probíhaly při napětí 30 kV a teplota se pohybovala v rozmezí 26–27 °C. Přesnost autoři odhadují lepší než 0,1 jednotky  $pK_A$ . Správnost stanovených hodnot však může být nepříznivě ovlivněna nejen kolísáním teploty, ale také výpočtem  $pK_A$  pouze ze dvou experimentálních bodů.

V publikaci M. Melouna a kol. <sup>(15)</sup> se autoři zabývají určením disociačních konstant ibuprofenu, flurbiprofenu a ketoprofenu pH-titrací v kombinaci se spektrofotometrií. Metoda je založená na titraci vodných roztoků obsahujících analyty o koncentraci  $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ , kyselinu chlorovodíkovou o koncentraci  $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$  a KCl pro udržení konstantní iontové síly. Zkoumaný roztok je titrován  $0,1 \text{ M KOH}$  a při daném pH je ihned proměřena absorbance při vlnových délkách v intervalu 200–330 nm. Tyto tři hodnoty, pH, absorbance a vlnová délka, poté slouží k vytvoření trojrozměrné (3D) závislosti. Pomocí speciálních programů a použitím regresní analýzy byly z těchto závislostí vypočítány smíšené disociační konstanty při různých hodnotách iontové síly v intervalu  $0,018\text{--}0,139 \text{ mol dm}^{-3}$ . Termodynamické disociační konstanty byly získány proložením experimentálních dat ( $pK_A^{\text{mix}}$  vs.  $I^{1/2}$ ) Debyeovým-Hückelovým rozšířeným vztahem s lineárním členem <sup>(22)</sup>. Popsaná spektrofotometrická pH-titrace je metoda velmi složitá jak z hlediska instrumentace, tak z hlediska statistického zpracování experimentálních údajů. Důvěryhodnost popsané metody však snižuje skutečnost, že autory uvedené hodnoty iontové síly menší než  $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$  neodpovídají složení titrovaného roztoku.

V práci S. K. Poole a kol. <sup>(20)</sup> byly proměřeny disociační konstanty mimo jiné také ibuprofenu a ketoprofenu v sérii dvanácti pufrů o pH 2–11,4 s ekvidistantním krokem pH ( $\Delta\text{pH} = 0,85$ ) a iontovou silou roztoků  $50 \text{ mmol dm}^{-3}$  metodou CE podporovanou tlakem (pressure-assisted capillary electrophoresis, PACE). Široké rozmezí pH bylo zvoleno proto, aby stejné základní elektrolyty mohly být použity pro širokou škálu látek o různých hodnotách  $pK_A$ , ovšem pro profeny je využitelná pouze oblast pH 2,85–6,25. Pufry v elektrodových nádobkách byly použity vždy pro všech 20 stanovovaných látek, aniž by došlo k jejich výměně. Autoři předpokládají, že změna pH v nádobkách není větší než 0,07 jednotky pH. Z popsaného článku vyplývá, že získané hodnoty  $pK_A$  jsou smíšené disociační konstanty při iontové síle  $50 \text{ mmol dm}^{-3}$ .

Y. Ishikama a kol. <sup>(19)</sup> vyvinuli velmi rychlou metodu pro určení hodnot  $pK_A$  96 látek během jednoho dne metodou CE podporovanou tlakem (PACE) s použitím fotometrického detektoru. Pro separace byly připraveny tři sady pufrů (pH 3–8; 6–11; 3–11) o konstantní iontové síle  $50 \text{ mmol dm}^{-3}$  s ekvidistantní změnou pH ( $\Delta\text{pH} = 1$ ). Výběr sady pufrů závisel na povaze analytu, tudíž pro profeny byla zřejmě zvolena sada o pH 3–8. Proměření vzorku v jedné sadě pufrů bylo spojeno do jednoho experimentu. Kapilára byla naplněna prvním pufrům, byl nadávkován vzorek a aplikováno napětí 10 kV po velmi krátkou dobu (0,9–1,5 min). Poté byl do stejné kapiláry natlačen další pufr, znovu nadávkován vzorek a aplikováno napětí. Po natlačení posledního pufru, nadávkování a aplikaci napětí byl obsah kapiláry protlačen konstantním tlakem přes detektor, takže z jednoho elektroferogramu byly získány efektivní pohyblivosti daného analytu při všech hodnotách pH dané série pufrů. Získaná data byla vyhodnocena a aplikací Debyeovy-Hückelovy rovnice (blíže nespecifikované) byly určeny termodynamické disociační konstanty.

Smíšené disociační konstanty téměř 100 různých látek včetně dvou profenů, ibuprofenu a naproxenu, určili autoři článku <sup>(21)</sup>, M. Shalaeva a J. Kenseth, za použití aparatury s 96 kapilárami (multiplexed 96-capillary array electrophoresis) a sady 24 pufrů v rozmezí pH 1,75–11,2 s iontovou silou  $50 \text{ mmol dm}^{-3}$ . Teplota v kapilárách při separaci se pohybovala v intervalu 20–25 °C, což podle autorů mohlo být zdrojem variability měřených efektivních pohyblivostí. Možný vliv teploty na hodnotu disociační konstanty ale nepřipouštějí s odůvodněním nevýznamné závislosti  $pK_A$  na teplotě. Experimentální data, tedy efektivní pohyblivosti, z nichž je  $pK_A$  stanovena, se však se změnou teploty o 1 K změní přibližně o 2 %.

Publikace autorů L. A. Hergert a G. M. Escandar <sup>(2)</sup> se zabývá spektrofotometrickým a spektrofluorimetrickým stanovením smíšených disociačních konstant ibuprofenu samotného a ibuprofenu vázaného v komplexu s  $\beta$ -cyklodextrinem. Nejprve byla proměřena závislost absorbance (při vlnové délce 225 nm) na pH tak, že roztok obsahující kyselinu chlorovodíkovou (koncentrace neuvedena) a ibuprofen o koncentraci  $1,40 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$  byl titrován roztokem NaOH ( $1-0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ ). Roztok NaOH byl přidáván po malých objemech (0,05–0,2 ml) a po dosažení určeného pH bylo vždy proměřeno absorpční spektrum. V článku je udáno pouze rozmezí pH (2–12), nikoliv přesné pH, při kterých bylo spektrum měřeno. Vliv pH na fluorescenci byl studován analogicky jako předchozí závislost. Počáteční koncentrace ibuprofenu v roztoku byla  $3,7 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ . Hodnota  $pK_A$  z obou závislostí byla stanovena s přesností  $\pm 0,08$  jednotky  $pK_A$ . Obě titrace probíhaly při teplotě 25 °C a iontová síla byla udržována na hodnotě  $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ .

Hodnoty disociačních konstant jsou shrnuty v Tabulce 1.

Tabulka 1 Hodnoty  $pK_A^{\text{mix}}$  a  $pK_A$  zkoumaných profenů z literatury

látka	$pK_A^{\text{mix}}$				$pK_A$		
	a)	b)	c <sub>I</sub> )	c <sub>II</sub> )	d)	e)	f)
Flurbiprofen	-	-	-	-	4,13	4,17	3,91
Naproxen	-	4,27	-	-	4,26	-	4,20
Ketoprofen	4,02	-	-	-	4,03	4,07	4,14
Ibuprofen	4,14	4,35	4,12	4,10	-	4,38	4,27

a) <sup>(20)</sup> CE,  $I = 50 \text{ mol dm}^{-3}$ , 25 °C

b) <sup>(21)</sup> CE,  $I = 50 \text{ mol dm}^{-3}$ , 20–25 °C

c<sub>I</sub>) <sup>(2)</sup> spektrofotometrická pH-titrace,  $I = 100 \text{ mol dm}^{-3}$ , 25 °C

c<sub>II</sub>) <sup>(2)</sup> spektrofluorimetrická pH-titrace,  $I = 100 \text{ mol dm}^{-3}$ , 25 °C

d) <sup>(3)</sup> CE, 26–27 °C

e) <sup>(15)</sup> spektrofotometrická pH-titrace (3D), 25 °C

f) <sup>(19)</sup> PACE, 25 °C

## 4. Experimentální část

### 4.1 Chemikálie

K přípravě základních elektrolytů byla použita kyselina mravenčí HCOOH a kyselina octová CH<sub>3</sub>COOH (Lach-Ner, s.r.o., Česká republika), kyselina 2-morpholinoethansulfonová MES a monohydrát hydroxidu litného LiOH·H<sub>2</sub>O (Sigma-Aldrich, Německo). K určení pohyblivosti EOF sloužil dimethylsulfoxid DMSO (99%) (Sigma-Aldrich, Německo). Studováno bylo pět profenů, a to S-flurbiprofen (98%), R-flurbiprofen (97%), S-naproxen (98%), S-ketoprofen (99%) a S-ibuprofen (99%) (Sigma-Aldrich, Německo). Všechny roztoky byly připraveny z deionizované vody (Rowapur 100 + Ultrapur, Watrex, Česká republika). K proplachování kapiláry byl použit 0,1 M NaOH (Agilent Technologies, Německo). Ke kalibraci pH-metru sloužily IUPAC pufrů (Radiometr, Dánsko) o hodnotách pH 1,679±0,010 a 7,000±0,010.

### 4.2 Instrumentace a programy

Elektroforetické experimenty byly provedeny na přístroji <sup>3D</sup>CE (Agilent Technologies, Německo), který je vybaven vestavěným fotometrickým UV-VIS detektorem s diodovým polem (DAD). Součástí aparatury je počítač s nainstalovaným programem Agilent ChemStation, pomocí kterého je aparatura řízena, je prováděn sběr dat a vyhodnocování dat.

Elektroferogramy byly zaznamenávány při vlnové délce 229 nm (pro S-naproxen) a 198 nm (pro ostatní profeny). Vlnové délky byly vybrány na základě spekter profenů proměřených na spektrofotometru UV-240 (Shimadzu, Japonsko).

Experimenty probíhaly v křemenné kapiláře s vnitřním průměrem 50 μm a vnějším průměrem 375 μm (Polymicro, U.K.) o celkové délce 59 cm. Délka kapiláry k detektoru činila 50,5 cm.

Teplota v termostatované části aparatury byla nastavena na hodnotu 25 °C.

pH pufrů bylo měřeno digitálním pH-metrem PHM 220 s kombinovanou skleněnou elektrodou (Radiometer, Dánsko).

Program Origin 8.0 (OriginLab, USA) byl využit ke grafickému zpracování experimentálně zjištěných závislostí a k regresní analýze dat.

### 4.3 Volba a příprava základních elektrolytů

Pro stanovení limitních pohyblivostí iontů slabých elektrolytů je žádoucí proměřit závislost efektivních pohyblivostí do hodnoty pH, při které jsou tyto elektrolyty prakticky úplně disociovány; pro stanovení jejich disociačních konstant je vhodné měření provádět v okolí jejich  $pK_A$  hodnot, kde je tato závislost nejstrmější. Podle literatury se hodnoty  $pK_A$  vybraných profenů pohybují přibližně v oblasti 3,9–4,4. Hodnoty pH základních elektrolytů proto byly zvoleny v rozmezí 3,6–6,2 s přibližně ekvidistantním krokem pH ( $\Delta pH \sim 0,3$ ). Pro danou oblast pH byly vybrány pufrы tvořené slabými kyselinami (kyselina mravenčí,  $pK_A = 3,75$ , kyselina octová,  $pK_A = 4,75$ , MES,  $pK_A = 6,095$ ) a hydroxidem litným. Hodnota iontové síly ( $5 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ ) základních elektrolytů byla zvolena stejná jako byla použita v práci <sup>(1)</sup> ke stanovení konstant stabilit daných profenů. Formiátové a acetátové pufrы byly připravovány z faktorovaných zásobních roztoků příslušných kyselin o koncentraci  $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ . Složení základních elektrolytů o požadovaných hodnotách pH a iontové síle bylo spočítáno pomocí programu PeakMaster <sup>(23)</sup>. Tabulka 2 udává složení těchto roztoků, teoretické a experimentální hodnoty pH a velikost iontové síly.

**Tabulka 2** Programem PeakMaster určené teoretické pH ( $pH_{\text{teor}}$ ), iontová síla základních elektrolytů ( $I_{\text{BGE}}$ ) a složení základních elektrolytů.  $pH_{\text{exp}}$  odpovídá experimentálně změřenému pH základních elektrolytů.

$pH_{\text{teor}}$	$\frac{I}{\text{mmol dm}^{-3}}$	složení BGE	$pH_{\text{exp}}$
3,73	4,95	9,75 mM HCOOH + 4,75 mM LiOH	3,61
3,92	5,03	8,20 mM HCOOH + 4,90 mM LiOH	3,86
4,22	5,02	6,60 mM HCOOH + 4,95 mM LiOH	4,09
4,52	5,03	13,00 mM CH <sub>3</sub> COOH + 5,00 mM LiOH	4,43
4,81	5,02	9,15 mM CH <sub>3</sub> COOH + 5,00 mM LiOH	4,72
5,21	5,01	6,65 mM CH <sub>3</sub> COOH + 5,00 mM LiOH	5,11
5,50	5,00	23,30 mM MES + 5,00 mM LiOH	5,56
5,81	5,00	14,00 mM MES + 5,00 LiOH	5,87
6,10	5,00	9,55 mM MES + 5,00 LiOH	6,17

### 4.4 Příprava vzorků

Profeny byly měřeny ve vzorku jednotlivě a v pořadí: S-flurbiprofen, R-flurbiprofen, S-naproxen, S-ketoprofen, S-ibuprofen. Příslušné navážky profenů byly rozpuštěny ve 100 ml každého základního elektrolytu o daném pH tak, aby koncentrace profenů v tomto zásobním

roztoku byla  $1,5 \text{ mmol dm}^{-3}$ . Profeny vykazují špatnou rozpustnost, proto se roztoky vždy sonifikovaly po dobu 10 minut. Také zásobní roztoky markeru DMSO o koncentraci 2% obj. byly připraveny smísením příslušného objemu DMSO (99% obj.) a základního elektrolytu o daném pH.

Všechny experimenty byly prováděny metodou PreMCE. Při použití této metody se dávkuje dvakrát. Pro první dávkování byl vzorek připravován vždy smísením  $475 \mu\text{l}$  základního elektrolytu,  $25 \mu\text{l}$  zásobního roztoku DMSO (2% obj.) a  $100 \mu\text{l}$  zásobního roztoku profenu. Výsledná koncentrace analytu ve vialce se vzorkem činila  $0,25 \text{ mmol dm}^{-3}$ , výsledná koncentrace DMSO ve vzorku byla 0,083% obj.

Pro druhé dávkování vzorek obsahoval  $575 \mu\text{l}$  základního elektrolytu a  $25 \mu\text{l}$  zásobního roztoku DMSO. Koncentrace DMSO v tomto vzorku činila také 0,083% obj.

#### 4.5 Další experimentální podmínky a postupy

Separační napětí bylo nastaveno na hodnotu  $-15 \text{ kV}$ . Znaménko „mínus“ značí, že u vstupního konce kapiláry (inlet) byla nastavena záporná polarita (-). Procházející proud se pohyboval v rozsahu  $2,9\text{--}3,2 \mu\text{A}$ . Doba  $t_{\text{migr}}$ , po kterou bylo napětí aplikováno, se lišila v závislosti na hodnotě pH. Po dobu 8 minut bylo separační napětí aplikováno u BGE o hodnotách pH  $3,61\text{--}4,43$  (při pH  $4,43$  byl v tomto módu proměřen pouze S-flurbiprofen a R-flurbiprofen), 4 minuty bylo separační napětí aplikováno u BGE o pH  $4,43$  pro S-naproxen, S-ketoprofen a S-ibuprofen, a dále u vyšších hodnot pH ( $4,72\text{--}6,17$ ) pro všechny profeny.

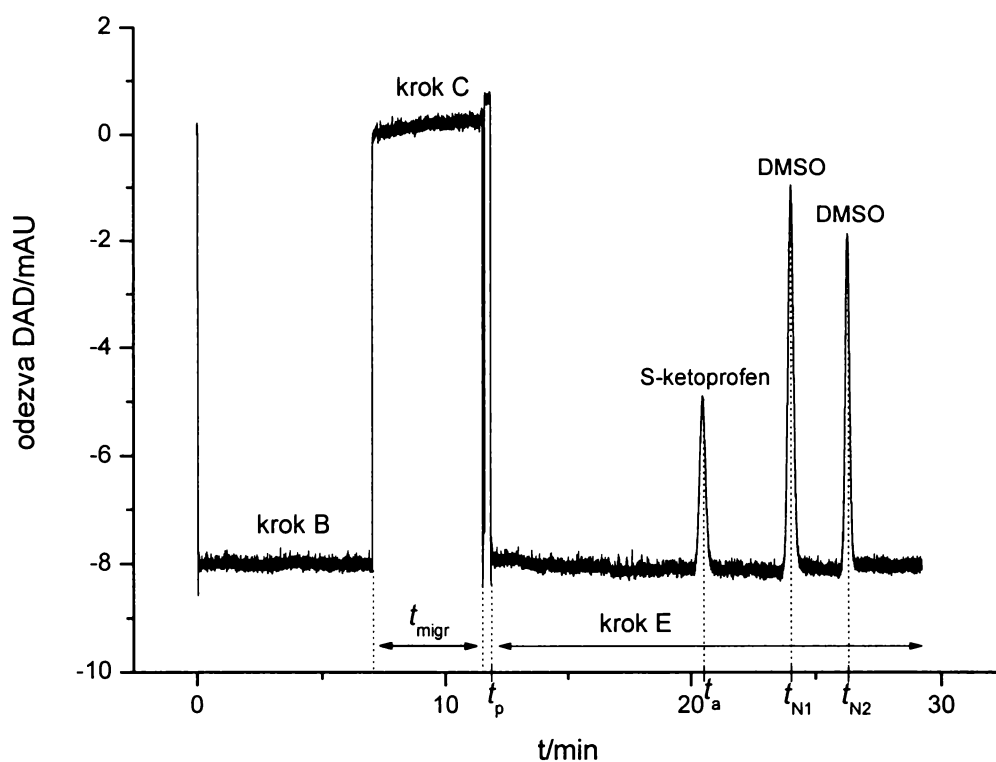
Tlak  $p$  použitý k natlačení první dávkované zóny do termostatované části kapiláry a k protlačení druhé dávkované zóny přes detektor byl nastaven na  $40 \text{ mbar}$ . K nadávkování vzorku se použilo hydrodynamické dávkování  $10 \text{ mbar} \times 6 \text{ sekund}$  ve všech experimentech. Jednotlivá měření byla opakována 3 až 7krát vždy s čerstvým pufrem ve vstupní i výstupní vialce.

Před prvním měřením byla kapilára proplachována třikrát 3 minuty vodou, následně 5 minut  $0,1 \text{ M NaOH}$ , třikrát 5 minut vodou, 10 minut prvním separačním pufrem. Pro stabilizaci elektroosmotického toku bylo vloženo napětí  $15 \text{ kV}$  po dobu 30 minut. Před změnou pH separačního elektrolytu byla kapilára proplachována třikrát 3 minuty vodou a poté 5 minut separačním elektrolytem o aktuálním pH. Mezi jednotlivými experimenty bylo prováděno proplachování 3 minuty aktuálním pufrem. Všechny roztoky byly před použitím přefiltrovány přes filtry Sartorius (Minisart, Germany) o velikosti pórů  $0,45 \mu\text{m}$ .



## 5. Výsledky

Nejprve byla provedena sada experimentů za účelem vytipování vhodných podmínek metody PreMCE. Tato metoda byla použita z důvodu otočení směru elektroosmózy v prvních experimentech prováděných při nejnižší hodnotě pH základního elektrolytu. Oproti očekávanému kationickému EOF byl EOF anionický. V průběhu proměřované série experimentů se směr elektroosmózy změnil na kationický, metoda PreMCE však již byla použita pro celou sérii. Při vyšších hodnotách pH základního elektrolytu však bylo třeba zkrátit dobu aplikace separačního napětí z původních 8 minut na 4 minuty. Kationický směr EOF v kombinaci s jeho rostoucí rychlostí při zvyšujícím se pH totiž způsobil vyputování prvního dávkovaného vzorku vstupním koncem kapiláry.



Obr. 4 Elektroferogram pořízený DAD při vlnové délce 198 nm, v pufru o pH 5,56,  $I = 5$  mM,  $U = -15$  kV,  $t_{\text{migr}} = 4$  min. Krok B odpovídá natlačení první dávkované zóny vzorku do termostátované části kapiláry, v kroku C je aplikováno napětí  $U$  po dobu  $t_{\text{migr}}$ . Finální aplikace tlaku  $p$  odpovídá kroku E. Analyt byl S-ketoprofen a marker elektroosmózy byl DMSO.

Na Obr. 4 je ukázka elektroferogramu pořízeného DAD se schematicky vyznačenými kroky B, C a E metody PreMCE (viz odstavec 3.2) a potřebnými časovými údaji pro výpočet efektivní pohyblivosti analytu. Krok B odpovídá natlačení první dávkované zóny vzorku do termostatované části kapiláry tlakem  $p$ , v kroku C je aplikováno napětí  $U$  působící po dobu  $t_{\text{migr}}$ .

Ze všech získaných elektroferogramů byly pomocí integrační funkce programu ChemStation odečteny detekční časy analytů  $t_a$  a neutrálních markerů  $t_{N1}$  a  $t_{N2}$ . Doba  $t_{\text{migr}}$ , po kterou bylo vloženo separační napětí, a čas  $t_p$  odpovídající začátku aplikace tlaku ve finálním kroku E, nebyly odečítány z elektroferogramu. Jejich hodnoty jsou vstupními údaji metody PreMCE.

Efektivní elektroforetické pohyblivosti analytů byly spočteny podle vztahu

$$\mu_{\text{eff}} = \frac{L_c L_d (t_{N1} - t_a)}{U t_{\text{migr}} (t_{N2} - t_p)}, \quad (21)$$

ve kterém  $L_d$  je délka kapiláry k detektoru.

V Tabulce 3 jsou shrnuty absolutní hodnoty vypočtených efektivních pohyblivostí analytů.

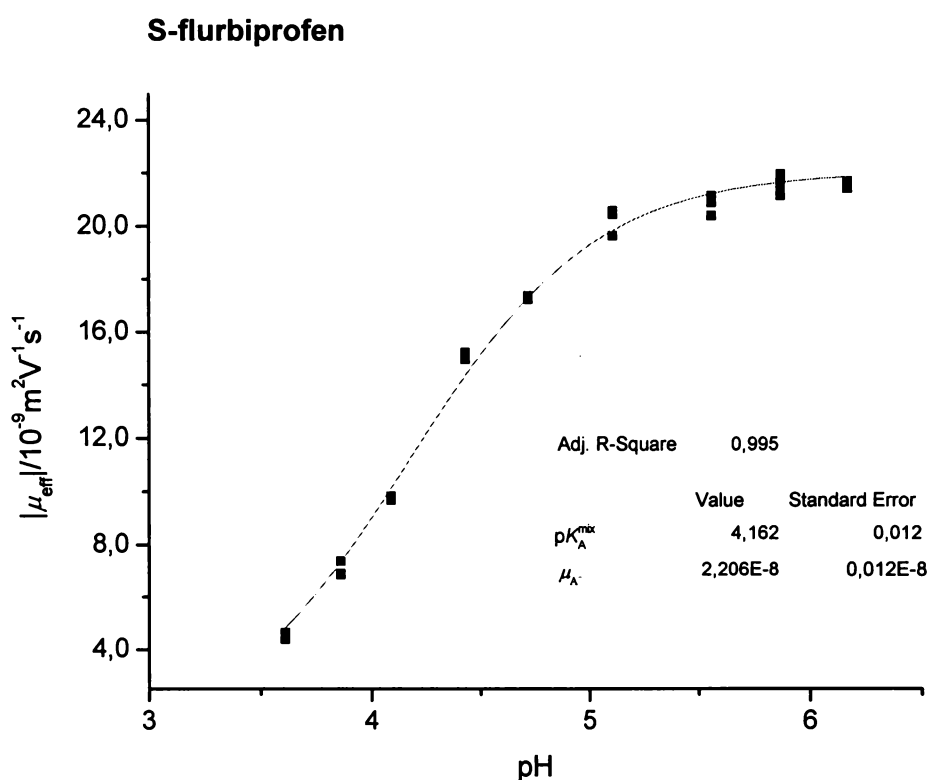
**Tabulka 3** Experimentální hodnoty efektivních pohyblivostí analytů vypočtené z primárních experimentálních údajů podle rovnice (21)

pH <sub>exp</sub>	$\frac{ \mu_{\text{eff}} }{10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}}$				
	S-flurbiprofen	R-flurbiprofen	S-naproxen	S-ketoprofen	S-ibuprofen
3,61	4,63	4,75	3,92	5,25	3,53
3,61	4,61	4,91	3,99	5,48	3,48
3,61	4,39	5,05	3,97	5,19	3,57
3,61	--	--	3,82	5,37	--
3,86	6,85	6,81	5,48	6,90	4,30
3,86	6,91	6,87	5,44	6,83	4,29
3,86	7,37	7,06	5,44	6,99	4,30
4,09	9,69	10,1	8,44	9,86	6,65
4,09	9,83	10,1	8,46	9,82	6,65
4,09	9,80	10,1	8,32	9,88	6,55

Tabulka 3 pokračování

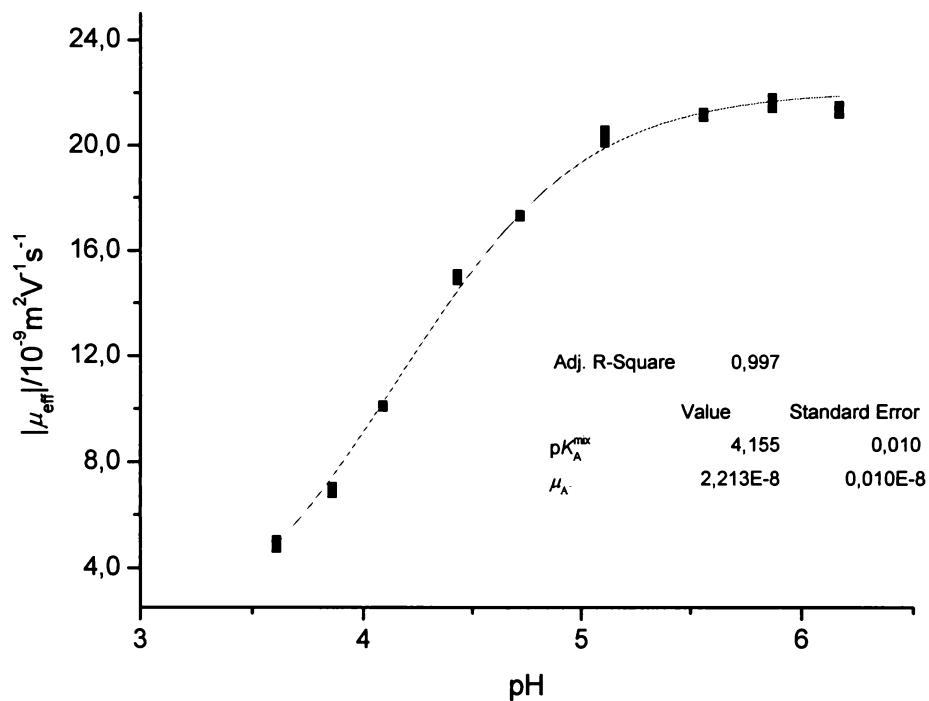
pH <sub>exp</sub>	$\frac{ \mu_{\text{eff}} }{10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}}$				
	S-flurbiprofen	R-flurbiprofen	S-naproxen	S-ketoprofen	S-ibuprofen
4,43	15,0	14,9	13,6	14,5	11,4
4,43	15,2	14,9	13,3	14,6	11,4
4,43	15,0	15,1	13,6	14,5	11,4
4,43	--	--	13,4	--	--
4,72	17,2	17,4	16,3	17,0	14,4
4,72	17,3	17,3	16,3	16,7	14,4
4,72	17,4	17,3	16,3	16,8	14,3
5,11	20,6	20,4	20,2	19,7	18,2
5,11	20,5	20,4	20,2	19,6	18,2
5,11	20,6	20,6	19,7	19,3	18,4
5,11	19,6	20,1	19,4	--	--
5,56	20,9	21,3	21,5	20,4	20,2
5,56	20,4	21,3	21,5	20,3	20,2
5,56	21,0	21,1	21,6	20,6	20,4
5,56	21,1	--	--	20,4	--
5,87	21,8	21,8	22,0	20,6	20,9
5,87	21,6	21,7	21,7	20,7	20,7
5,87	21,9	21,7	21,8	20,7	20,9
5,87	21,2	21,5	--	--	21,1
5,87	21,5	21,6	--	--	--
5,87	21,9	21,7	--	--	--
5,87	21,8	--	--	--	--
6,17	21,7	21,5	22,3	21,2	21,5
6,17	21,4	21,6	22,7	21,1	21,4
6,17	21,5	21,3	22,2	21,3	21,6
6,17	--	--	--	20,7	21,9
6,17	--	--	--	21,8	--

Hodnoty efektivních pohyblivostí jednotlivých zkoumaných profenů byly vyneseny do grafu v závislosti na změřené hodnotě pH základních elektrolytů. Aplikací regresní funkce popsané rovnicí (20) na tyto experimentální závislosti byly získány křivky s požadovanými parametry: aktuální pohyblivostí aniontu  $\mu_{A^-}$  daného profenu a jeho smíšené disociační konstanty  $pK_A^{\text{mix}}$  při iontové síle  $5 \text{ mmol dm}^{-3}$ . Grafy pro jednotlivé profeny jsou uvedeny na Obr. 5–9. Součástí obrázků pro jednotlivé profeny je tabulka s výslednými naitovanými parametry.



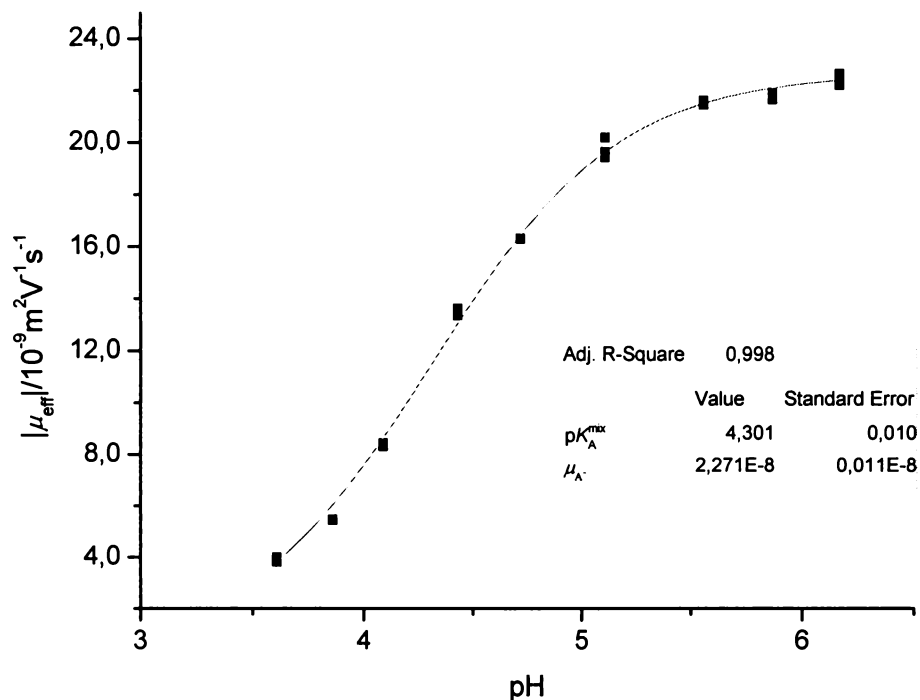
Obr. 5 Závislost efektivní elektroforetické pohyblivosti S-flurbiprofenu na pH základních elektrolytů. Křivka znázorňuje regresní funkci dle vztahu (20). Symboly ■ odpovídají experimentálním hodnotám.

### R-flurbiprofen

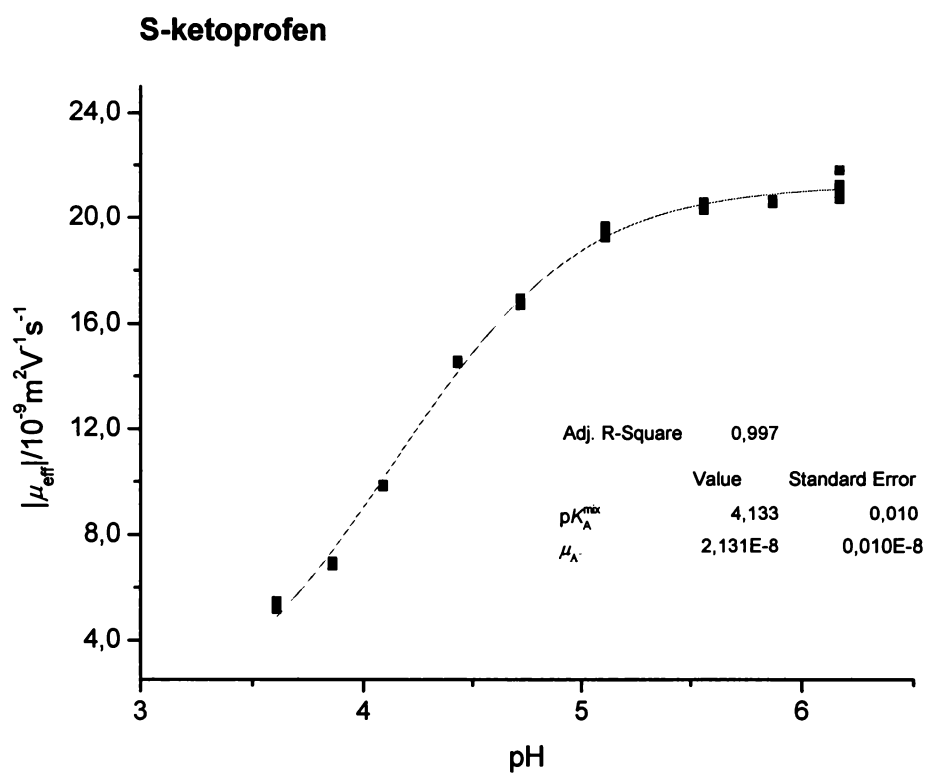


Obr. 6 Závislost efektivní elektroforetické pohyblivosti R-flurbiprofenu na pH základních elektrolytů. Křivka znázorňuje regresní funkci dle vztahu (20). Symboly ■ odpovídají experimentálním hodnotám.

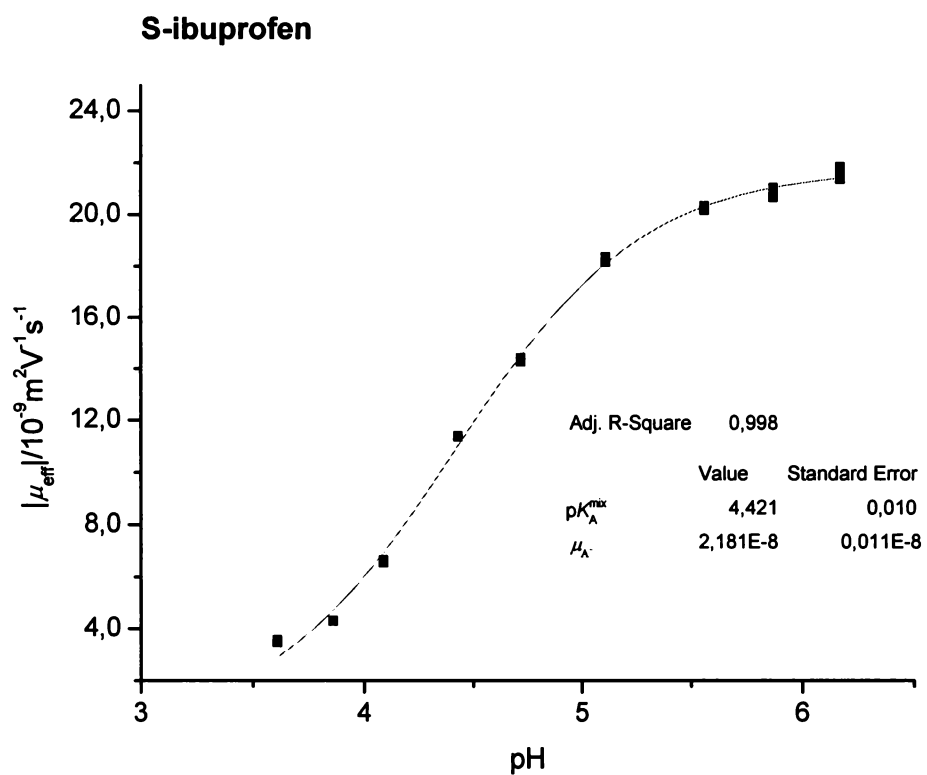
### S-naproxen



Obr. 7 Závislost efektivní elektroforetické pohyblivosti S-naproxenu na pH základních elektrolytů. Křivka znázorňuje regresní funkci dle vztahu (20). Symboly ■ odpovídají experimentálním hodnotám.



Obr. 8 Závislost efektivní elektroforetické pohyblivosti S-ketoprofenu na pH základních elektrolytů. Křivka znázorňuje regresní funkci dle vztahu (20). Symboly ■ odpovídají experimentálním hodnotám.



Obr. 9 Závislost efektivní elektroforetické pohyblivosti S-ibuprofenu na pH základních elektrolytů. Křivka znázorňuje regresní funkci dle vztahu (20). Symboly ■ odpovídají experimentálním hodnotám.

Smíšené disociační konstanty byly podle rovnice (16) přepočteny na disociační konstanty termodynamické. Z aktuálních pohyblivostí aniontů profenů byly podle rovnice (8) vypočteny hodnoty jejich limitních pohyblivostí. Výsledky jsou shrnuty v Tabulce 4.

**Tabulka 4** Výsledné hodnoty aktuálních pohyblivostí aniontu  $\mu_{A^-}$ , smíšených disociačních konstant  $pK_A^{\text{mix}}$ , limitních iontových pohyblivostí  $\mu_{\text{lim}, A^-}$  a termodynamických disociačních konstant  $pK_A$  stanovovaných profenů.

profen	$\frac{\mu_{A^-}}{10^{-9} \text{m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}}$	$pK_A^{\text{mix}}$	$\frac{\mu_{\text{lim}, A^-}}{10^{-9} \text{m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}}$	$pK_A$
S-flurbiprofen	$22,1 \pm 0,1$	$4,16 \pm 0,01$	$24,5 \pm 0,01$	$4,19 \pm 0,01$
R-flurbiprofen	$22,1 \pm 0,1$	$4,16 \pm 0,01$	$24,5 \pm 0,01$	$4,19 \pm 0,01$
S-naproxen	$22,7 \pm 0,1$	$4,30 \pm 0,01$	$25,1 \pm 0,01$	$4,33 \pm 0,01$
S-ketoprofen	$21,3 \pm 0,1$	$4,13 \pm 0,01$	$23,7 \pm 0,01$	$4,16 \pm 0,01$
S-ibuprofen	$21,8 \pm 0,1$	$4,42 \pm 0,01$	$24,2 \pm 0,01$	$4,45 \pm 0,01$

## 6. Diskuse

Stanovené smíšené disociační konstanty a aktuální pohyblivosti profenů vykazují vysokou přesnost. Hodnoty  $pK_A^{\text{mix}}$  byly stanoveny s přesností  $\pm 0,01$  jednotky  $pK$ , která odpovídá přesnosti hodnot pH pufrů použitých ke kalibraci pH-metru. Standardní chyba aktuálních pohyblivostí je u všech profenů nižší než 0,5%. Této vysoké přesnosti bylo dosaženo tím, že pro regresní analýzu byl použit velký počet experimentálních dat (minimálně 29 hodnot efektivních pohyblivostí při devíti různých hodnotách pH pufrů). Vysokou přesnost použité metody potvrzuje i vynikající shoda stanovených hodnot  $pK_A^{\text{mix}}$  a aktuálních pohyblivostí obou enantiomerů flurbiprofenu.

Správnost stanovovaných veličin se zpravidla posuzuje na základě srovnání s literárními údaji. Pro elektroforetické pohyblivosti profenů v odborné literatuře žádná data nalezena nebyla. U disociačních konstant by k porovnání měly sloužit termodynamické disociační konstanty, které teoreticky závisejí pouze na teplotě. Porovnání termodynamických disociačních konstant nabízí Tabulka 5. Rozdíly mezi hodnotami získanými různými metodami se pohybují v setinách až desetínách jednotek  $pK$ . Z odstavce 3.4, kde je uveden stručný popis metod použitých v nalezených literárních pramenech, však vyplývá, že získané hodnoty lze považovat spíše za odhady těchto konstant.

Tabulka 5 Hodnoty  $pK_A$  zkoumaných profenů stanovených v této práci v porovnání s hodnotami z literatury

látka	$pK_A$			
	tato práce CZE, 25 °C	<sup>(3)</sup> CE, 26–27 °C	<sup>(15)</sup> spektrofotometrická pH- titrace (3D), 25 °C	<sup>(19)</sup> PACE, 25 °C
Flurbiprofen	4,19	4,13	4,17	3,91
Naproxen	4,33	4,26	-	4,20
Ketoprofen	4,16	4,03	4,07	4,14
Ibuprofen	4,45	-	4,38	4,27



V Tabulce 6 jsou porovnány hodnoty disociačních konstant  $pK_A^{\text{mix}}$  stanovených v této práci s hodnotami, které byly použity v práci J. Skokanové <sup>(1)</sup>. Porovnání těchto hodnot vysvětluje rozdíly, které byly zjištěny mezi experimentálně stanovenými efektivními pohyblivostmi u stanovovaných profenů při pH = 3,61 a teoretickými hodnotami vypočtenými s použitím  $pK_A$  hodnot převzatých z literárních zdrojů. Největší odchylka byla zjištěna u ibuprofenu. Zvýšení hodnoty  $pK_A$  o 0,3 jednotky znamená u této látky při hodnotě pH 3,6 snížení stupně disociace a tím i efektivní pohyblivosti téměř o 50%.

**Tabulka 6** Porovnání hodnot disociačních konstant stanovených v této práci s hodnotami použitými v citované diplomové práci

látka	$pK_A^{\text{mix}}$	
	tato práce	z literatury
Flurbiprofen	4,16	4,13 <sup>(3)</sup>
Naproxen	4,30	4,26 <sup>(3)</sup>
Ketoprofen	4,13	4,03 <sup>(3)</sup>
Ibuprofen	4,42	4,12 <sup>(2)</sup>

## 7. Závěr

Vytyčené cíle této bakalářské práce byly splněny. Byly stanoveny smíšené disociační konstanty a aktuální iontové pohyblivosti zkoumaných profenů při iontové síle  $5 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ . Tyto hodnoty budou použity pro přehodnocení konstant stability vybraných profenů stanovených v diplomové práci J. Skokanové. Dále byly určeny termodynamické disociační konstanty a limitní pohyblivosti profenů, což jsou hodnoty patřící mezi základní fyzikálně-chemické charakteristiky látek.

## Citovaná literatura

1. Skokanová J.: *Diplomová práce*. UK Praha, 2008.
2. Hergert L.A., Escandar G.M.: *Talanta* 2003, 60, 235-246.
3. Lelièvre F., Gareil P.: *Journal of Chromatography A* 1996, 735, 311-320.
4. Štulík K. a kolektiv.: *Analytické separační metody*, Karolinum, Praha 2005.
5. Opekar F. a kolektiv.: *Základní analytická chemie*, Karolinum, Praha 2005.
6. Kašička V.: *Chemické listy* 1997, 91, 320-329.
7. Včeláková K., Zusková I., Kenndler E., Gaš B.: *Electrophoresis* 2004, 25, 309-317.
8. Koval D., Kašička V., Zusková I.: *Electrophoresis* 2005, 26, 3221-3231.
9. Williams B., Vigh G.: *Analytical Chemistry* 1996, 68, 1174-1180.
10. Williams B., Vigh G.: *Analytical Chemistry* 1997, 69, 4445-4451.
11. Zusková I., Novotná A., Včeláková K., Gaš B.: *Journal of Chromatography B* 2006, 841, 129-134.
12. Šlampová A., Křivánková L., Gebauer P., Boček P.: *Journal of Chromatography A* 2008, 1213,25-30.
13. Bhushan R., Martens J.: *Biomed. Chromatography* 1998, 12, 309-316.
14. Bunaciu A., Grasu, A., Aboul-Enein H.: *Analytica Chimica Acta* 1995, 311, 193-197.
15. Meloun M., Bordovská S., Galla L.: *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2007, 45, 552-564.
16. Leipold D., Kantoci D., Murray D., Quiggle D.: *Chirality* 2004, 16, 379-387.
17. Bancos S., Bernard M., Topham D., Phipps R.: *Cellular Immunology* 2009, 258, 18-28.
18. <[http:// www.sigma-aldrich.com](http://www.sigma-aldrich.com)> [31.5.2009].
19. Ishihama Y., Nakamura M., Miwa T., Kajima T.: *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2002, 91, 933-942.
20. Poole S., Patel S., Dehring K., Workman H.: *Journal of Chromatography A* 2004, 1037, 445-454.
21. Shalaeva M., Kenseth J., Lombardo F., Bastin A.: *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2008, 97, 2581-2606.
22. Dvořák J., Koryta J.: *Elektrochemie*, Academia, Praha 1983, 3.vydání, str. 54.
23. <<http://www.natur.cuni.cz/~gas>> [31.5.2009].