

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Přírodovědecká fakulta

Katedra fyzikální a makromolekulární chemie



**Studium interkonverze lorazepamu v chirálním
prostředí cyklodextrinů**


Bakalářská práce
Chemie v přírodních vědách

Jana Svobodová

Praha 2006

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně, pod vedením školitele Prof. RNDr. Bohuslava Gaše, CSc. a že jsem všechny použité prameny řádně citovala.

V Praze dne 7.6.06


.....
podpis

Děkuji svému školiteli Prof. RNDr. Bohuslavu Gašovi, CSc. za odborné a obětavé vedení mé bakalářské práce.

Dále děkuji Doc. Evě Tesařové, Mgr. Pavlu Dubskému a Mgr. Vlastimilu Hruškovi za odborné připomínky a rady, které mi po celou dobu řešení bakalářské práce poskytovali.

Obsah

1. Seznam použitých symbolů.....	2
2. Úvod	4
3 Teoretický úvod	5
3.1. Základní elektroforetické principy	5
3.1.1 Elektroforetická mobilita.....	5
3.1.2 Elektroosmotický tok.....	6
3.1.3 Elektroforetické módy, základní experimentální uspořádání	6
3.1.3.1 Zónová elektroforéza.....	7
3.2 Chiralita	8
3.3 Chirální separace v elektroforetických systémech	8
3.3.1 Potřebné vztahy	9
3.3.2 Kinetika interkonverze chirálních látek.....	10
3.3.3 Termodynamika interkonverze chirálních látek.....	13
3.3.4 Praxe a modelování chirálních separací v elektroforetických systémech	14
3.3.4.1 Stopped flow metody.....	14
3.3.4.2 Program ChromWin	14
3.3.4.3 Program SimulChir.....	15
4 Cíl práce	16
5 Experimentální část.....	17
5.1 Instrumentace	17
5.2 Použité chemikálie.....	18
5.3 Příprava pufru a základních elektrolytů	18
5.4 Příprava vzorku	19
6 Výsledky měření	20
6.1 Základní charakteristiky interkonverze lorazepamu.....	20
6.2 Závislost selektivity separace na koncentraci chirálního selektoru.....	21
6.3 Závislost interkonverze lorazepamu na separační teplotě	22
6.4 Výpočet komplexačních konstant lorazepamu s CO – β – CD	24
7 Závěr	27
8 Seznam citované literatury.....	28

1. Seznam použitých symbolů

c_i^b - molární koncentrace komplexu analyt – ion pseudostacionární fáze

c_{CS}^0 - molární koncentrace volných iontů pseudostacionární fáze

c_i^0 - molární koncentrace volného analytu

c_{CS} - celková molární koncentrace iontů pseudostacionární fáze

$c_i^C(t)$ - molární koncentrace analytu v daném čase

$c_i^C(0)$ - molární koncentrace analytu na počátku separace

$\Delta_{RS}\Delta G^0$ - změna Gibbsovy energie

$\Delta_{RS}\Delta H$ - změna entalpie

$\Delta_{RS}\Delta S$ - změna entropie

e - elementární náboj elektronu

E - intenzita elektrického pole

F_C - coulombická síla

ΔG_i^{app} - zdánlivá aktivační energie interkonverze

h - Planckova konstanta

i - enantiomery R, S

K_i - komplexační konstanty

K_i' - distribuční konstanty enantiomerů R, S mezi volným roztokem a pseudostacionární fází

k_i^{app} - zdánlivá rychlostní konstanta interkonverze

k_i - obecná rychlostní konstanta interkonverze

k_i^0 - rychlostní konstanta interkonverze volného analytu

k_i^b - rychlostní konstanta interkonverze komplexu analyt – ion pseudostacionární fáze

k_b^{glob} - globální rychlostní konstanta interkonverze

k_b - Boltzmanova konstanta

L - délka kapiláry

L_D - délka kapiláry k detektoru

n_i^b - délková koncentrace komplexu analyt – ion pseudostacionární fáze
 n_i^0 - délková koncentrace volného analytu
 R - univerzální plynová konstanta
 t_{MIG} - migrační čas analytu
 T - teplota
 T_{ISO} - isotropická teplota
 U - aplikované napětí
 u_i - elektroforetická mobilita
 u_{EOF} - mobilita elektroosmotického toku
 u_i^{eff} - efektivní mobilita analytu
 u_i^b - vlastní mobilita komplexu analyt – ion pseudostacionární fáze
 u_i^{app} - zdánlivá mobilita analytu
 v_i - elektroforetická rychlost
 v_{EOF} - elektroforetická rychlost elektroosmotického toku
 v_i^{app} - zdánlivá elektroforetická rychlost analytu
 v_i^{eff} - efektivní elektroforetická rychlost analytu
 v_i^b - vlastní elektroforetické rychlost komplexu analyt – ion pseudostacionární fáze
 χ - transmisní faktor
CO – β – CD - β – cyklodextrin
CZE - kapilární zónová elektroforéza

2. Úvod

Chirální sloučeniny jsou běžnou součástí mnoha biologických látek. Ačkoliv se jejich dvě formy liší pouze svým prostorovým uspořádáním, mohou mít velmi odlišné vlastnosti. Příkladem takového chování mohou být látky jako *S*-limonem, který je obsažen v citrónu, kdežto jeho *R*-forma je přítomna v pomerančích. *S*-metachlor je znám jako herbicid, zatímco jeho zrcadlový obraz *R*-metachlor má fungicidní účinek. Nejznámějším případem, který varoval před rozdílným chováním dvou zrcadlových obrazů téže látky, byl lék Thalidomid, který se podával ženám ke zmírnění nevolností během těhotenství. Jeho *R*-forma působila jako sedativum, kdežto *S*-forma měla nevratné teratogenní účinky na plod. Z tohoto důvodu je nezbytné zkoumat vlastnosti jednotlivých enantiomerů a možnosti jejich separace.

Mnohé enantiomery mohou samovolně přecházet na své zrcadlové obrazy, dochází tedy k jejich vzájemné interkonverzi. Tento proces má značný vliv na průběh separace, proto je důležité jej studovat a snažit se porozumět jeho kinetice.

3 Teoretický úvod

3.1. Základní elektroforetické principy

Elektroforéza je separační metoda založená na migraci nabitých částic v roztoku v elektrickém poli. Elektroforetický lze separovat malé ionty, DNA, bílkoviny, chromosomy, dokonce i celé buňky. Výstižný přehled o elektroforetických systémech podávají především práce B. Gaše¹, V. Kašičky², či B.Chankevadzeho³.

3.1.1 Elektroforetická mobilita

Jestliže umístíme částici o náboji z_i do elektrického pole o intenzitě E , pak je tato částice urychlována coulombickou silou F_c ,

$$F_c = z_i e E. \quad (1)$$

Každá částice je ale zároveň brzděna frikční silou F_f , která je způsobena srážkami s ostatními částicemi v separačním prostředí. Po velmi krátkém čase se tyto síly vyrovnají a částice se pohybují průměrnou rychlostí která se označuje jako elektroforetická rychlost.

Odlíšné částice mají na základě výše uvedených faktů za daných podmínek a v daném prostředí různou rychlost, což umožňuje jejich separaci. Elektroforetická rychlost v_i je úměrná intenzitě elektrického pole podle vztahu

$$v_i = u_i E, \quad (2)$$

kde u_i ($[u_i] = \text{m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$) je konstanta úměrnosti, která byla nazvána elektroforetická mobilita. Její hodnoty jsou tabelovány pro různé ionty, při různých teplotách. Bylo konvenčně dohodnuto, že hodnota mobilit pro záporné ionty je záporná, pro kladné ionty kladná. Mobility iontů v nekonečně zředěném roztoku se nazývají limitní mobility a bývají tabelovány jako fyzikálně chemické konstanty iontů.

3.1.2 Elektroosmotický tok

Elektroosmotický tok doprovází většinu elektroforetických systémů, důvodem jeho vzniku je působení stejnosměrného napětí na elektrickou dvojvrstvu, která vzniká na rozhraní pevného a kapalného prostředí a způsobuje, že se veškerá kapalina pohybuje jako jeden celek. Z tohoto důvodu neumožňuje elektroosmotický tok separaci analytů, ale výrazně ovlivňuje separační selektivitu a dobu analýzy.

Celková elektromigrační rychlost látek v systému v^{app} je tedy dána rovnicí

$$v^{app} = v_i^{eff} + v_{EOF}, \quad (3)$$

kde v_i^{eff} je efektivní rychlost analytu a v_{EOF} je rychlost elektroosmotického toku, pro kterou platí

$$v_{EOF} = u_{EOF} E, \quad (4)$$

kde u_{EOF} je elektroosmotická mobilita.

Elektroosmotický tok hraje významnou roli zejména v kapilární zónové elektroforéze, jelikož kanál je zde tvořen křemennou kapilárou, jejíž vnitřní stěny jsou záporně nabitý díky disociaci silanolových skupin. Důsledkem je tedy elektroosmotický tok směrem ke katodě, který má plochý radiální rychlostní profil a tudíž téměř nepřispívá k disperzi analytů. Elektroosmotický tok se dá ovlivnit změnou pH v kapiláře, či pokrytím vnitřní stěny kapiláry látkou, která se snadno adsorbuje na povrch a může tak výrazně změnit mobilitu či směr elektroosmotického toku.

3.1.3 Elektroforetické módy, základní experimentální uspořádání

Uspořádání elektroforetického systému může významně ovlivnit separaci, proto jsou pro odlišné analytické úkoly užívána i odlišná elektroforetická uspořádání. Mezi nejznámější elektroforetické módy patří zónová elektroforéza, izotachoforéza, či izoelektrická fokusace.

3.1.3.1 Zónová elektroforéza

Mód zónové elektroforézy je jedním z nejvýznamnějších elektroforetických uspořádání. Ionogenní látky jsou separovány na základě rozdílných mobilit v homogenním prostředí základního elektrolytu. Analyzovaná látka je dávkována na jednom konci elektroforetické kolony. Zónová elektroforéza se obvykle provádí v tenkých křemenných kapilárách, takovéto uspořádání se nazývá kapilární zónová elektroforéza (CZE). Základem je tenká křemenná kapilára o vnitřním průměru obvykle menším než 100 μm a délce v rozmezí 30 – 100 cm, oba konce kapiláry jsou ponořeny do elektrodoových nádobek obsahujících nosný elektrolyt, jehož složení i pH musí být vhodné pro daný analyt. Takováto kapilára má velmi účinný odvod Joulova tepla, což umožňuje aplikovat napětí desítky kV, to zvyšuje rychlost a účinnost separace. Zároveň je objem kapiláry velmi malý, což snižuje požadované množství analyzované látky. Na počátku separace je krátký úsek kapiláry naplněn vzorkem a následně je aplikováno napětí. Složky analytu se začnou pohybovat různou rychlostí a do detektoru doputují v různých časech t_{mig} ,

$$v_i = \frac{L_D}{t_{mig}}, \quad (5)$$

kde L_D je délka kapiláry k detektoru, t_{mig} je migrační čas daného analytu. Zároveň platí

$$v_i = u_i E = u_i \frac{U}{L}, \quad (6)$$

kde U je aplikované napětí a L je celková délka kapiláry.

V důsledku odlišných mobilit směrem k detektoru se složky analytu oddělují. Celý obsah kapiláry se zároveň pohybuje elektroosmotickým tokem, který je u křemenných nepokrytých kapilár ve směru od anody ke katodě a má relativně vysokou rychlost. Na konci separačního systému je obvykle umístěn UV-VIS absorpční detektor, který umožňuje zaznamenávat signál v širokém rozmezí vlnových délek.

Výsledný časový záznam se nazývá elektroferogram a lze z něj získat jak kvalitativní, tak i kvantitativní výpověď o složení vzorku. Kvalitě analytu odpovídá jeho migrační čas a z něj vypočtená mobilita, kvantitě plocha daného píku. Ačkoliv je zóna analytu po nástřiku úzká, dochází během separace zejména díky difúzi k jejímu rozmývání,

výsledný pík tak získává Gaussovský tvar. Nelinearita elektroforetického systému způsobuje tzv. elektromigrační disperzi, která může mít za důsledek trojúhelníkovitý tvar píku.

3.2 Chiralita

Optická aktivita je vlastnost chirálních látek stáčet rovinu polarizovaného světla. Dvě rozdílné formy takovéto látky se nazývají enantiomery, odlišují se pouze svým prostorovým uspořádáním a nelze je ztotožnit pomocí žádné operace symetrie, jelikož jsou svými zrcadlovými obrazy. Je-li látka chirální, musí obsahovat, alespoň jedno centrum chiraloty, příkladem může být asymetrický uhlík (uhlík se čtyřmi různými substituenty) u organických molekul. Toto asymetrické centrum je nutnou, ale ne postačující podmínkou chiraloty. Opačné enantiomery jedné látky se obvykle označují *R* a *S*, ekvimolární směs enantiomerů *R* a *S* se nazývá racemát.

Mnohé chirální látky mají schopnost po dodání potřebné aktivační energie přecházet samovolně na svůj zrcadlový obraz. Tento proces můžeme vyjádřit zvratnou reakcí s příslušnými rychlostními konstantami. V achirálním prostředí od sebe enantiomery nejsme schopni oddělit, protože mají stejné termodynamické vlastnosti a jejich chemické potenciály si jsou rovny. Z tohoto důvodu si jsou v achirálním prostředí rovny také rychlostní konstanty interkonverze. V achirálním prostředí bývá zvratná reakce označována pojmem racemizace, jelikož díky shodným chemickým potenciálům vzniká vždy racemická směs, kdežto v prostředí chirálním se používá obecnější pojem izomerizace. Chiralitou a pojmy s ní souvisejícími se zabývá článek O. Červinky z roku 1999⁴

3.3 Chirální separace v elektroforetických systémech

Zónová kapilární elektroforéza na pseudostacionární fázi je nejužívanější elektroforetickou metodou určenou k separaci látek neutrálních či o velmi podobné mobilitě, tedy i látek chirálních. Chirálními separacemi v zónové kapilární elektroforéze se zabývá již citovaná práce B. Chankevadžeho³.

Kapilární zónová elektroforéza na pseudostacionární fázi je kombinovanou separační technikou, ve které se využívají jak principy chromatografické, tak elektrokinetické. Základem je rozdílná interakce analytů s pseudostacionární fází, která je tvořena chirálními selektory. Pohyb celého systému je zajištěn elektroosmotickým tokem, nabitě chirální selektory se pohybují proti jeho směru, ale podstatně nižší rychlostí, tudíž výsledný pohyb všech složek je jen ve směru elektroosmotického toku. V důsledku odlišné interakce analytů s pseudostacionární fází jsou separované složky zpomalovány různě a mají tedy různou migrační rychlost, což umožňuje jejich oddělení. Jako chirální selektory se užívají cykloextriny, ionogenní polymery, crownethery, či chirální surfaktanty, tvořící v základním elektrolytu chirální micely.

Díky pravoúhlému radiálnímu profilu elektroosmotického toku a rychlému ustavování rovnováh v homogenním prostředí se významně zvyšuje účinnost této separační metody.

3.3.1 Potřebné vztahy

Za předpokladu, že interakce analytů s pseudostacionární fází je dostatečně rychlá a tyto ionty spolu interagují v poměru 1:1, pak pro ně platí vztah

$$K_i = \frac{c_i^b}{c_i^0 c_{CS}^0}, \quad (7)$$

kde K_i je komplexační konstanta analytu a iontu pseudostacionární fáze, c_i^b je koncentrace komplexu analyt - ion pseudostacionární fáze, c_{CS}^0 je koncentrace volných iontů pseudostacionární fáze, c_i^0 je koncentrace volného analytu. Je-li koncentrace komplexu analyt-ion pseudostacionární fáze vůči celkové koncentraci iontů pseudostacionární fáze c_{CS} zanedbatelná, pak pro celkovou koncentraci pseudostacionární fáze lze použít následující aproximaci

$$c_{CS} = c_{CS}^0 + c_i^b \cong c_{CS}^0. \quad (8)$$

Rovnici (7) tedy můžeme zjednodušit na tvar

$$\frac{c_i^b}{c_i^0} = \frac{n_i^b}{n_i^0} = K_i c_{CS}, \quad (9)$$

kde n_i^0 je délková koncentrace iontů volné pseudostacionární fáze, n_i^b je délková koncentrace komplexu analyt - ion pseudostacionární fáze. Rychlost analytu je dána molárním zlomkem komplexu analyt - ion pseudostacionární fáze podle rovnice

$$v_i = \frac{n_i^b}{n_i^0 + n_i^b} v_i^b, \quad (10)$$

kde v_i^b je vlastní rychlost komplexu analyt - ion pseudostacionární fáze. Kombinací vztahů (9) a (10) získáme pro mobilitu analytu konečný vztah

$$u_i^{eff} = \frac{K_i c_{CS}}{1 + K_i c_{CS}} u_i^b, \quad (11)$$

kde u_i^{eff} je efektivní mobilita analytu, u_i^b je mobilita komplexu analyt-ion pseudostacionární fáze. Tento vztah umožňuje z experimentálních dat, tedy vypočtených hodnot u_i^{eff} , určit K_i a μ_i^b pomocí nelineární regrese.

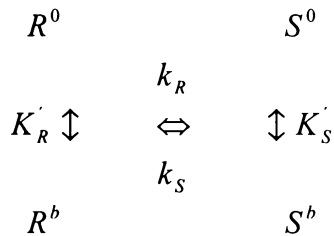
Ve výpočtech musíme také uvažovat mobilitu elektroosmotického toku u_{EOF} , jelikož vyhodnocením experimentálních dat získáváme tzv. zdánlivou (apparent) mobilitu u_i^{app} , pro kterou platí

$$u_i^{app} = u_i^{eff} + u_{EOF}. \quad (12)$$

3.3.2 Kinetika interkonverze chirálních látek

Interkonverze enantiomerů během separace má za důsledek vznik tzv. interkonverzní zóny, zvýšeného elučního profilu mezi píky enantiomerů, tato zóna bývá obvykle nazývána plato a její velikost je ovlivňována podmínkami během separace^{5,6}. Jelikož volný analyt se vyskytuje v achirálním prostředí, jsou si rychlostní konstanty jeho vzájemné interkonverze rovny.

Pro chirální separace v chromatografických systémech bylo roku 1960 R.A. Kellnerem a J.C. Gidingsem⁷ uvedeno schéma popisující interkonverzi obou enantiomerů jedinou zvratnou reakcí. Toto schéma lze upravit i pro elektroforetické systémy, viz Obrázek 1,



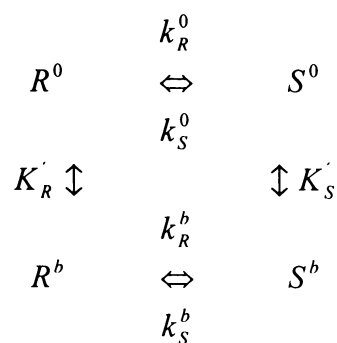
Obrázek 1 Rovnovážné interkonverzní schéma navržené Kellnerem a Gidingsem roku 1960, index ⁰ označuje volný analyt, index ^b označuje komplex analyt-ion pseudostacionární fáze

kde k_R , k_S jsou rychlostní konstanty interkonverze, K'_R , K'_S jsou distribuční konstanty enantiomeru mezi volným roztokem a pseudostacionární fází, pro které je za předpokladu nekonečně rychlé rovnováhy možno psát vztah

$$K'_i = \frac{c_i^b}{c_i^0}, \quad (13)$$

Toto schéma je ale příliš zjednodušené. V roce 1984 W. Bürkl, H. Karfunkel a V. Schurig⁸ diskutují podrobné schéma, viz Obrázek 2. Na rozdíl od Kellnera s Gidingsem⁷ je zde zahrnuta reverzibilní rovnováha jak analytů ve volném roztoku, tak i analytů vázaných v komplexu s pseudostacionární fází, současně je ale zachována nekonečně rychlá interakce analytu a pseudostacionární fází. Toto nezjednodušené schéma bylo využito Dubským a spol.⁹ k výpočtu skutečných rychlostních konstant

$k_R^0, k_S^0, k_R^b, k_S^b$:

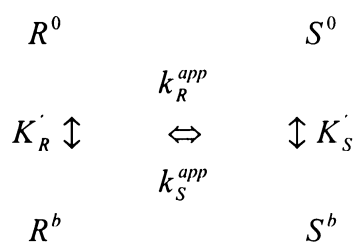


Obrázek 2 Rovnovážné interkonverzní schéma diskutované H. Karfunkelem, W. Bürklem, V. Schurigem⁸

Díky principu mikroskopické reverzibility¹⁰ a platnosti vztahu $k_R^0 = k_S^0$ platí následující rovnice

$$\frac{k_S^b}{k_R^b} = \frac{K_R'}{K_S'}$$

takže lze psát



Obrázek 3 Rovnovážné interkonverzní schéma zjednodušené Jungem a Schurigem roku 1992, které umožňuje zavést zdánlivé interkonverzní rychlostní konstanty

kde pro dvě zdánlivé (apparentní) rychlostní konstanty k_R^{app} , k_S^{app} platí

$$k_R^{app} = \frac{k_R^0}{1 + K_R'} + K_R' \frac{k_R^b}{1 + K_R'} \quad (14)$$

$$k_S^{app} = \frac{k_S^0}{1 + K_S'} + K_S' \frac{k_S^b}{1 + K_S'} \quad (15)$$

Toto schéma je velmi často používáno jak v pracích teoretických tak i praktických věnujících se kinetice chirálních separací, zejména Schurigem^{5,6,11}. Nevýhodou tohoto přístupu je ztráta všech původních rychlostních konstant. $k_R^0, k_S^0, k_R^b, k_S^b$.

Komplexní přehled o možnostech určování kinetických parametrů izomerizace chirálních látek podává práce Thunecka a spol.¹²

3.3.3 Termodynamika interkonverze chirálních látek

Odlišná interakce enantiomerů s pseudostacionární fází může být vyjádřena rozdílem Gibbsových energií $\Delta_{R,S}\Delta G^0$ pomocí vztahu

$$\Delta_{R,S}\Delta G^0 = RT \ln \left(\frac{K_R}{K_S} \right). \quad (16)$$

Využitím Gibbsovy-Helmholtzovy rovnice lze určit i entalpický $\Delta_{R,S}\Delta H^0$ a entropický příspěvek $\Delta_{R,S}\Delta S$

$$\Delta_{R,S}\Delta G^0 = -\Delta_{R,S}\Delta H^0 + T\Delta_{R,S}\Delta S^0. \quad (17)$$

Za jisté teploty T_{ISO} se entropický a entalpický příspěvek vyrovnají a enantiomery jsou vzájemně neseparovatelné. Při teplotách nižších než T_{ISO} je reakce kontrolována entalpicky a se zvyšující se teplotou dochází ke zhoršování separace, při teplotách vyšších než T_{ISO} je reakce entropicky kontrolována a se zvyšující se teplotou dochází k zlepšování separace, toto chování předpověděli již Koppenhöfer a Bayer roku 1984¹³. Těmito jevy se také zabývá článek Carrery a Lubdy z roku 1994¹⁴.

Jsou-li známy zdánlivé rychlostní konstanty interkonverze k_i^{app} , můžeme zdánlivou aktivační energii ΔG_i^{app} počítat podle Eyringova vztahu

$$\ln \left(k_i^{app} \frac{h}{k_b T \chi} \right) = \frac{-\Delta G_i^{app}}{RT}, \quad (18)$$

kde h je Plankova konstanta, k_b je Boltzmanova konstanta, R je univerzální plynová konstanta, T je teplota separace, χ je transmisní faktor¹⁵.

Dynamice separací a určování aktivačních energií bylo od roku 1984 věnováno mnoho prací především Schuriga^{11,16}, ale i jiných autorů^{9,14}.

3.3.4 Praxe a modelování chirálních separací v elektroforetických systémech

Kinetické parametry chirálních separací mohou být stanovovány buď přímými, či nepřímými metodami. Mezi metody přímé patří například stopped flow metody¹⁵.

3.3.4.1 *Stopped flow metody*

Stopped flow metody jsou založeny na následujícím principu: za nízké teploty jsou enantiomery v první části kapiláry úplně separovány, následně je separace zastavena a zvýší se teplota, to způsobí opětovnou izomerizaci. Ve zbylé části kapiláry se enantiomery opět oddělí a z ploch získaných píků můžeme počítat rychlostní konstanty. Jelikož je v CZE v místě izomerizace přítomna i pseudostacionární fáze, umožňuje tato metoda stanovovat jen zdánlivé rychlostní konstanty.

Nepřímé metody jsou založeny na srovnání experimentálních dat se simulovanými elektroforegramy. K tomuto účelu byli vytvořeny simulační programy ChromWin^{6,5} či SimulChir^{9,17}.

3.3.4.2 *Program ChromWin*

Program ChromWin byl původně určen k simulacím chromatografických systémů a je schopen určovat rychlostní i dynamické parametry interkonverze. Program je určen pro běžné uživatele a je možné ho používat i na osobním počítači. Tento program umožňuje využití dvou modelů:

1. Model teoretických pater – tento model byl poprvé aplikován na chirální separace, včetně první počítačové simulace, roku 1984 Bürklem, Karfunklem a Schurigem⁸, následně byl zdokonalen roku 1992 Jungem a Schurigem¹⁰. Separační systém je rozdělen do N teoretických pater, které se chovají jako samostatné chemické reaktory. V každém patře kolony dochází k procesu separace, který je charakterizován třemi cyklickými kroky:

- (i) distribuce enantiomerů mezi volnou formou a komplexem analyt-ion pseudostacionární fáze,
- (ii) izomerizační proces,
- (iii) nastavení látkového množství enantiomerů v daném patře dle patra předchozího.

2. Stochastický model – byl navržen Kellerem a Giddingsem roku 1960⁷. Celkový eluční profil byl popsán pomocí pravděpodobnosti přeměny enantiomerů na svou opačnou formu během času. Enantiomery, které během separace přešly na svou inverzní formu, vytvářejí plato, což způsobí úbytek výšky píků separovaných enantiomerů (tedy úbytek koncentrace analytů v separační zóně), tento proces se řídí kinetikou prvního řádu a může být popsán rovnicí

$$c_i^C(t) = c_i^C(0) \exp[-k_i^{app} t_{MIG}], \quad (19)$$

kde $c_i^C(t)$ je celkové množství enantiomeru i v daném čase, v tomto případě v separované zóně čistého analytu, $c_i^C(0)$ je celková koncentrace enantiomeru i na počátku separace, t_{MIG} je migrační čas zóny čistého analytu.

3.3.4.3 Program SimulChir

Program SimulChir umožňuje studium dynamiky elektroforetických systémů. Je založen na řešení kompletní sady nelineárních rovnic popisujících elektroforetický systém. Výsledkem simulace je časově závislý koncentrační profil v místě detektoru a vypočtená globální rychlostní konstanta k^{glob} , pro kterou byl Dubským a spol.⁹ odvozen vztah

$$k^{glob} = k_R^0 + k_R^b K_R c_{CS}^0 = k_S^0 + k_S^b K_S c_{CS}^0. \quad (20)$$

Stanovení těchto globálních rychlostních konstant umožňuje určit všechny čtyři skutečné rychlostní konstanty.

4 Cíle práce

Cíle mé práce byly následující:

1. V rešeršní části práce podat přehled o stavu problematiky elektroforézy chirálních látek
2. Objasnění vlivu koncentrace chirálního selektoru na selektivitu separace lorazepamu
3. Studium vlivu teploty na interkonverzi lorazepamu
4. Výpočet komplexačních konstant obou chirálních forem lorazepamu

5 Experimentální část

V rámci této bakalářské práce byly provedeny separace lorazepamu v závislosti na koncentraci chirálního selektoru a separační teplotě.

5.1 Instrumentace

Měření bylo provedeno na přístroji 3DCE Agilent Technologies, s ovládáním programem ChemStation. Dále byla použita křemenná kapilára (CaCo, Bratislava, Slovenská republika).

Technická data

Délka kapiláry:	80,5 cm
Délka kapiláry k detektoru:	72,0 cm
Průměr kapiláry:	50 μm
Aplikované napětí:	15 kV
Dávkování:	30 mbar \times 10 s
Detekční vlnová délka:	210 nm, 228 nm, 250 nm
Separací teplota:	15, 17, 20, 23, 27, 30, 35°C
Počet opakování měření:	3 až 5

Proplach kapiláry:

před prvním měřením (proplach určený k dokonalému pročištění kapiláry)
20 min H₂O, 40 min acetonitril, 30 min H₂O, 20 min 1M HNO₃, 50 min H₂O,
10 min 1M NaOH, 10 min 0,1M NaOH, 50 min H₂O

před změnou koncentrace chirálního selektoru

5 min H₂O, 5 min 0,1M NaOH, 30 min H₂O, 5 min Na₂B₄O₇ · 10H₂O, 5 min
aktuální pufr

před každým měřením

10 min aktuální pufr

Všechny chemikálie byly před použitím přefiltrovány pomocí laboratorních filtrů o průměru pórů 0,2 μm a následně odvzdušněny v ultrazvukové lázni. K měření pH byl použit pH metr PHM220, Radiometr, Kopenhagen, Německo.

5.2 Použité chemikálie

K proplachu kapiláry byly použity

Kyselina dusičná	- Lach-Ner s.r.o., Neratovice, Česká republika
0,1 M hydroxid sodný	- Agilent Technologies, Waldbronn, Německo
1M hydroxid sodný	- Agilent Technologies, Waldbronn, Německo
Acetonitril	- Sigma–Aldrich, Německo

Analyt

Lorazepam	- SÚKL, Praha, Česká republika
-----------	--------------------------------

K přípravě pufru a základního elektrolytu byly použity

Tetraboritan disodný dekahydrát	- Lachema a.s., Brno, Česká republika
Polysulfatovaný β -cyklodextrin	- Sigma – Aldrich, Schnellsdorf, Německo

5.3 Příprava pufru a základních elektrolytů

Byl použit pufr skládající se pouze z tetraboritanu disodného (dále jen borátový pufr) o koncentraci 20 mM, jeho pH bylo teoreticky spočítáno pomocí programu PeakMaster a následně experimentálně změřeno.

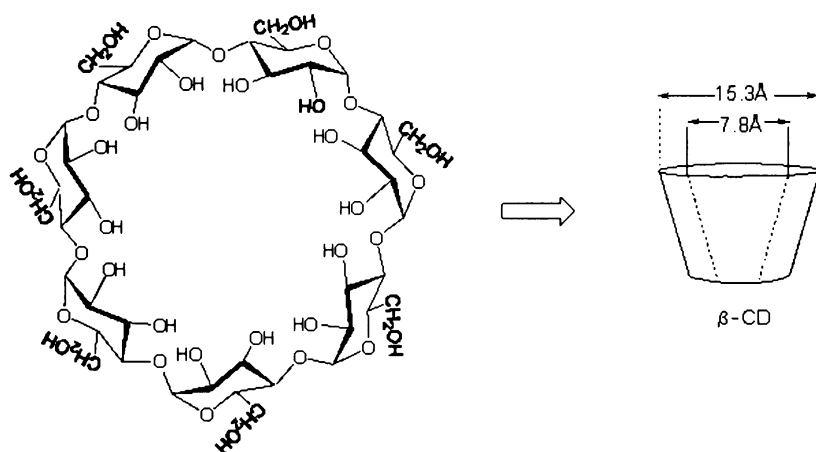
pH (teoretické)	– 9,065
pH (skutečné)	– 9,21

Jako chirální selektor byl zvolen polysulfatovaný β -cyklodextrin (dále jen CO – β – CD). Byl připraven jeho zásobní roztok o koncentraci 60 g/l v pufru a jeho ředěním roztoky o nižších koncentracích 15, 20, 25, 30, 35, 40 a 50 g/l. Vzorec a prostorové schéma molekuly β -cyklodextrinu je na Obrázku 4.

Bohužel nebylo možno určit teoretické pH těchto roztoků, jelikož výrobce neuvádí přesný počet sulfátových skupin na cyklodextrinu, pouze rozmezí 7 – 11 sulfátových skupin na jednu molekulu CO – β – CD, ani jiné k tomuto výpočtu potřebné údaje.

Pro výpočet molární hmotnosti byla použita průměrná molekula CO – β – CD, obsahující 9 sulfátových skupin: $M_r = 1856 \text{ g/mol}$

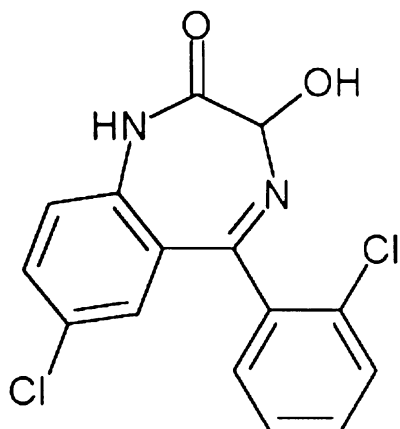
Elektrolyty byly skladovány v chladu a temnu, aby nemohlo dojít k jejich degradaci.



Obrázek 4 Vzorec a prostorové schéma molekuly β -cyclodextrinu.

5.4 Příprava vzorku

1 mg lorazepamu, jehož vzorec je na Obrázku 5, byl rozpuštěn v 1 ml metanolu a 4 ml borátového pufru, důkladně promíchán a přefiltrován.



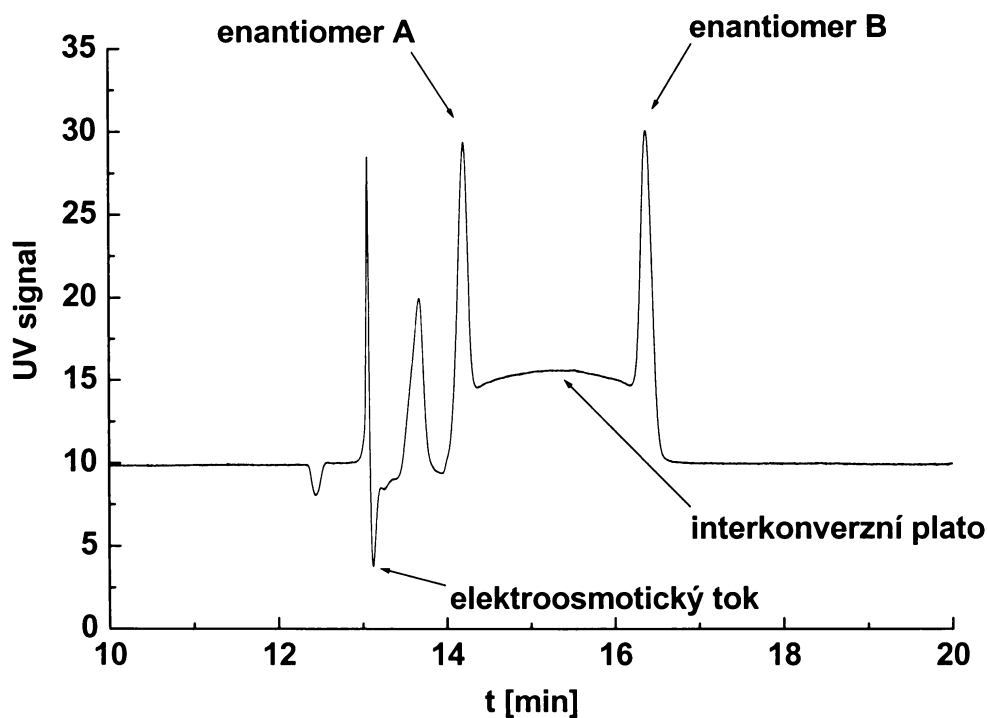
Obrázek 5 Vzorec molekuly lorazepamu

6 Výsledky měření

6.1 Základní charakteristiky interkonverze lorazepamu

Byly proměřeny teplotní závislosti interkonverze lorazepamu pro všechny připravené koncentrace. Typický elektroferogram získaný během těchto měření je znázorněn na Obrázku 6. Píky s nejvyšší absorbancí jsou zóny dvou chirálních forem analytu. Plochu mezi nimi představuje tzv. interkonverzní plato. To je tvořeno analytem, který se během separace přeměnil na svou opačnou formu.

Protože nebyl použit žádný marker elektroosmotického toku z důvodu jeho možné interakce s CO – β – CD, byl ke stanovení migračního času elektroosmotického toku použit druhý negativní systémový pík, který měl při vlnové délce 210 nm, kdy absorbuje CO – β – CD, podstatně větší signál než při jiných vlnových délkách, na rozdíl od ostatních systémových píků. To je důkazem, že jedině tento pík mohl být způsoben poruchou během dávkování a má nulovou elektroforetickou mobilitu.



Obrázek 6 Interkonverzní schéma lorazepamu při koncentraci CO – β – CD 15 g/l, teplotě 27°C, detekční vlnová délka 210 nm

U všech získaných elektroforegramů byly pomocí integrační funkce programu ChemStation odečteny elektromigrační časy analytů a elektroosmotického toku. Následně byly pomocí vztahů (5), (6) vypočteny mobility obou enantiomerů. Jelikož nebylo možno rozlišit, který z píků patří *R* a který *S* formě, zavedli jsme pro formu s vyšší mobilitou označení A a pro formu s mobilitou nižší B.

6.2 Závislost selektivity separace na koncentraci chirálního selektoru

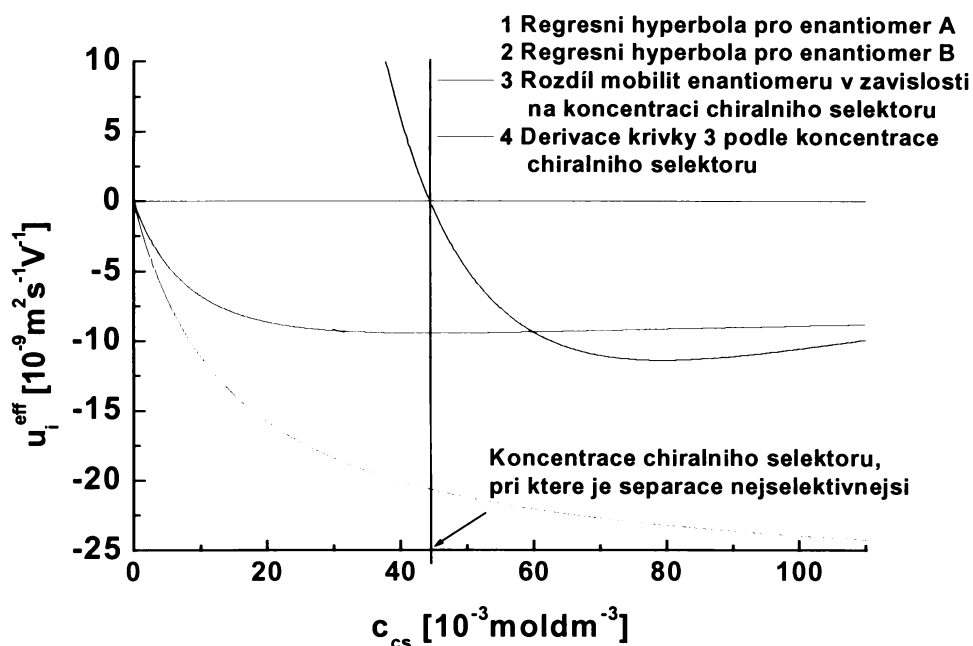
Vyšší koncentrace chirálního selektoru umožňuje lepší separaci dvou chirálních forem lorazepamu, tedy výraznější oddělení píků. Potvrzení tohoto konstatování je uvedeno v Tabulce 1, kde je možno si tuto skutečnost (tedy zvyšující se průměrný rozdíl mezi mobilitami obou forem) ověřit pro všechny teploty a koncentrace chirálního selektoru. Přirozeně, se zvyšující se koncentrací CO – β – CD se rozšiřuje i interkonverzní plato.

Tabulka 1 Průměrný rozdíl mezi mobilitami obou enantiomerů v závislosti na koncentraci chirálního selektoru a teplotě

	T °C						
	15	17	20	23	27	30	35
$\Delta\bar{u}_{cCO-\beta-CD\ 15g/l}$	-5,32	-5,40	-5,86	-5,80	-6,00	-6,27	-6,27
$\Delta\bar{u}_{cCO-\beta-CD\ 20g/l}$	-5,86	-6,11	-6,36	-6,68	-7,02	-7,14	-7,42
$\Delta\bar{u}_{cCO-\beta-CD\ 25g/l}$	-6,41	-6,59	-6,94	-7,38	-7,63	-8,15	-8,26
$\Delta\bar{u}_{cCO-\beta-CD\ 30g/l}$	-6,80	-6,99	-7,24	-7,54	-8,08	-8,59	-8,86
$\Delta\bar{u}_{cCO-\beta-CD\ 35g/l}$	-7,04	-7,65	-7,55	-8,41	-8,62	-8,90	-9,49
$\Delta\bar{u}_{cCO-\beta-CD\ 40g/l}$	-7,26	-7,51	-7,74	-8,34	-8,91	-8,27	
$\Delta\bar{u}_{cCO-\beta-CD\ 50g/l}$	-7,65	-8,03	-8,38	-8,70	-9,15	-9,48	-9,94
$\Delta\bar{u}_{cCO-\beta-CD\ 60g/l}$	-7,82	-7,81	-8,33	-8,80	-9,29	-9,60	

Pozn. $[\Delta\bar{u}_{cCO-\beta-CD}] = 10^{-9} m^2V^{-1}s^{-1}$

Na Obrázku 7 jsou znázorněny regresní hyperboly enantiomerů A, B dle vztahu (11) pro teplotu 27 °C a křivka závislosti rozdílů mobilit enantiomerů na koncentraci chirálního selektoru. Je zřejmé, že tato křivka nabývá minima, jehož x-ová souřadnice odpovídá takové koncentraci chirálního selektoru, při které je separace nejselektivnější. Dalším zvyšováním koncentrace chirálního selektoru se separace bude zhoršovat. Polohu minima křivky rozdílů mobilit jsme počítali využitím první derivace funkce podle koncentrace chirálního selektoru, v Tabulce 2 jsou uvedeny vypočtené koncentrace pro všechny použité teploty.



Obrázek 7 Regresní hyperboly dle vztahu (11) pro oba enantiomery a teplotu 27°C, jejich rozdíl a křivka první derivace této funkce podle koncentrace

Tabulka 2 Hodnoty koncentrací chirálního selektoru, při kterých je separace nejselektivnější, pro všechny použité teploty

T [°C]	15	17	20	23	27	30	35
c_{cs}^{lim} [g/l]	75,9	77,5	80,0	81,3	82,4	87,0	129,4

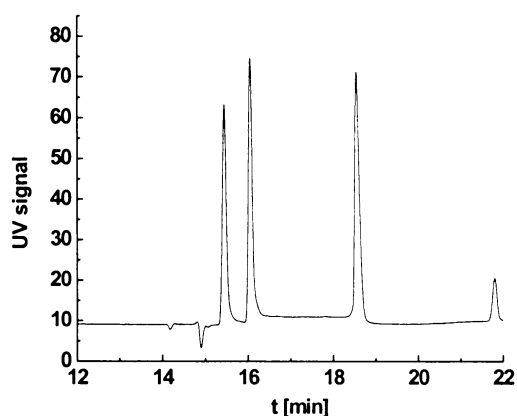
Tímto výpočtem jsme ověřili, že námi použité koncentrace chirálního selektoru jsou vždy nižší než koncentrace, při které je separace nejselektivnější, tudíž zvýšení koncentrace chirálního selektoru opravdu způsobí růst selektivity separace, odchylky od tohoto chování při vyšších teplotách a koncentracích jsou pravděpodobně způsobeny chybou měření.

6.3 Závislost interkonverze lorazepamu na separační teplotě

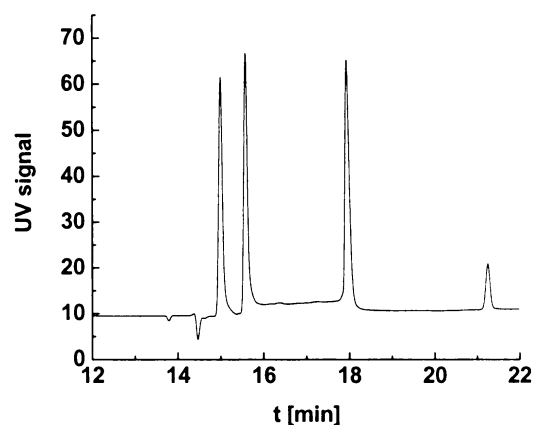
Na Obrázcích 8 až 14 jsou znázorněny elektroferogramy pro koncentraci CO – β – CD 15 g/l v teplotním rozmezí 15 °C – 35 °C. Z těchto obrázků je patrné, že se zvyšující se separační teplotou dochází k růstu interkonverzního plata, tedy k zhoršování separace.

Při teplotě 35 °C a koncentraci 40 g/l, Obrázek 15, dokonce dochází k sloučení obou píků s interkonverzním platem a separace je tedy znemožněna.

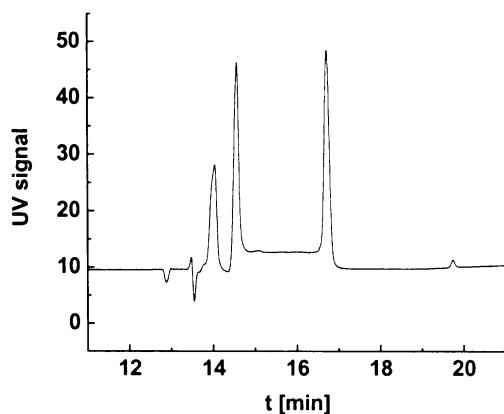
Využitím tohoto poznatku a faktů uvedených v kapitole 3.3.3 je možno konstatovat, že interkonverze lorazepamu při těchto podmínkách je entalpicky kontrolována. Všechny použité separační teploty jsou tedy nižší než teplota isotropická.



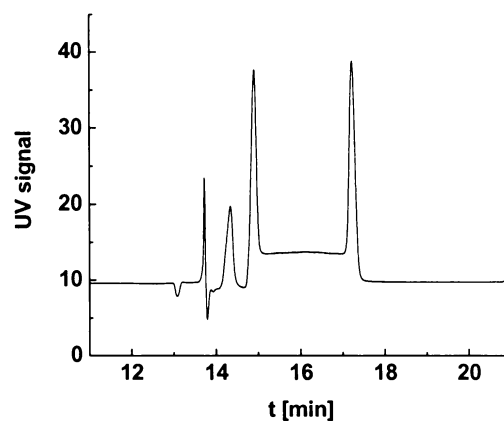
Obrázek 8 Elektroferogram separace lorazepamu pro teplotu 15 °C a koncentraci CO – β – CD 15 g/l



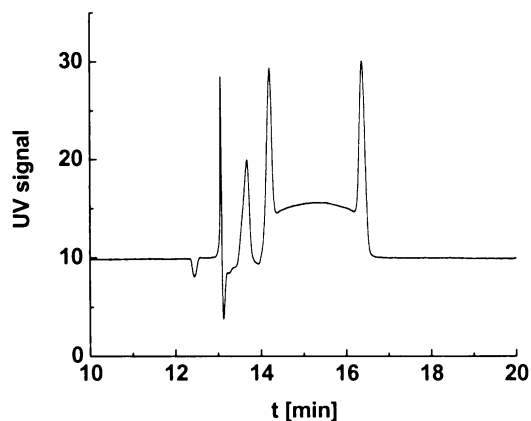
Obrázek 9 Elektroferogram separace lorazepamu pro teplotu 17 °C a koncentraci CO – β – CD 15 g/l



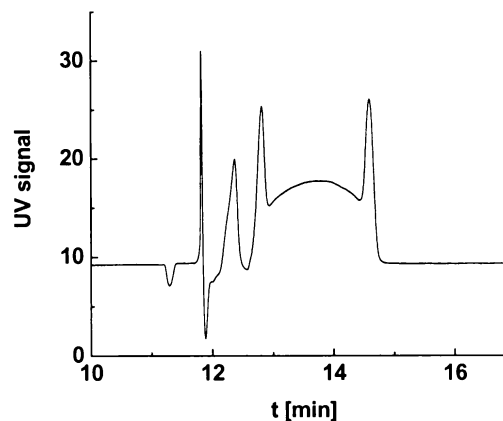
Obrázek 10 Elektroferogram separace lorazepamu pro teplotu 20 °C a koncentraci CO – β – CD 15 g/l



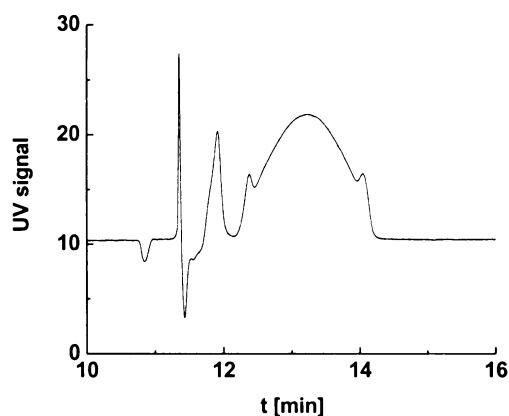
Obrázek 11 Elektroferogram separace lorazepamu pro teplotu 23 °C a koncentraci CO – β – CD 15 g/l



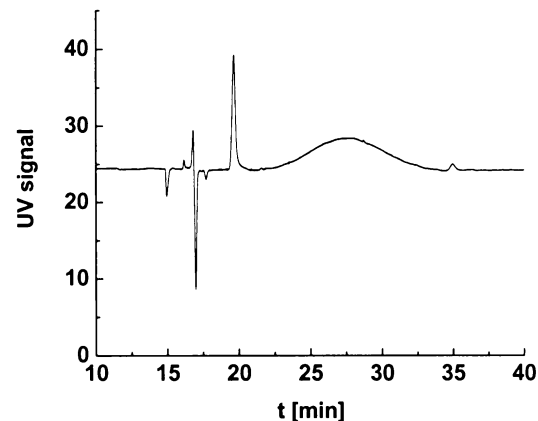
Obrázek 12 Elektroferogram separace lorazepamu pro teplotu 27 °C a koncentraci CO – β – CD 15 g/l



Obrázek 13 Elektroferogram separace lorazepamu pro teplotu 30 °C a koncentraci CO – β – CD 15 g/l



Obrázek 14 Elektroferogram separace lorazepamu pro teplotu 35 °C a koncentraci CO – β – CD 15 g/l

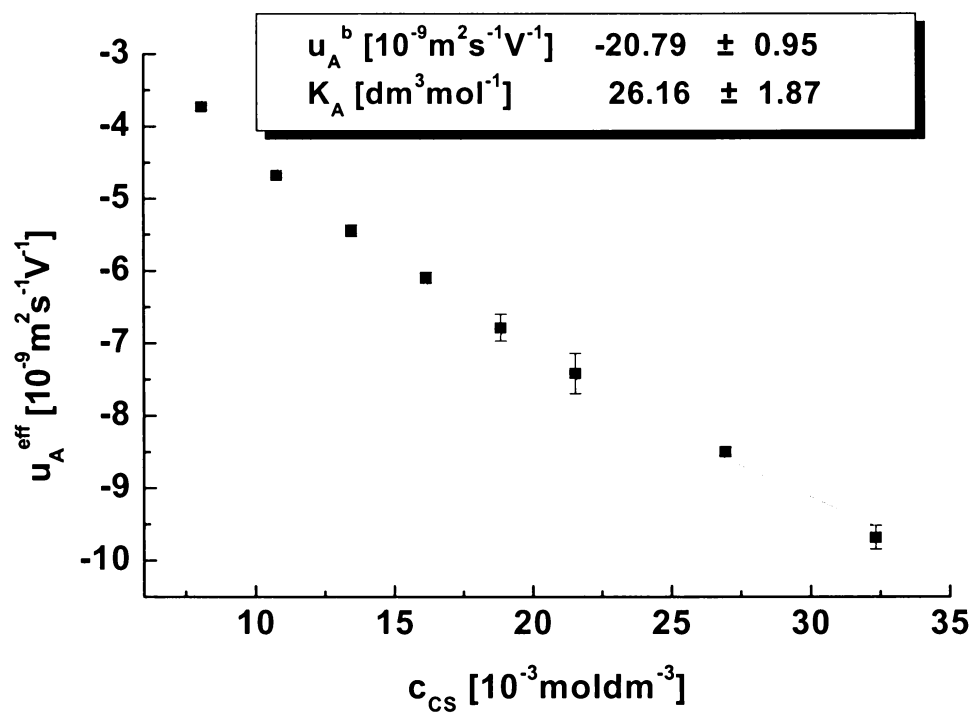


Obrázek 15 Elektroferogram separace lorazepamu pro teplotu 35 °C a koncentraci CO – β – CD 40 g/l

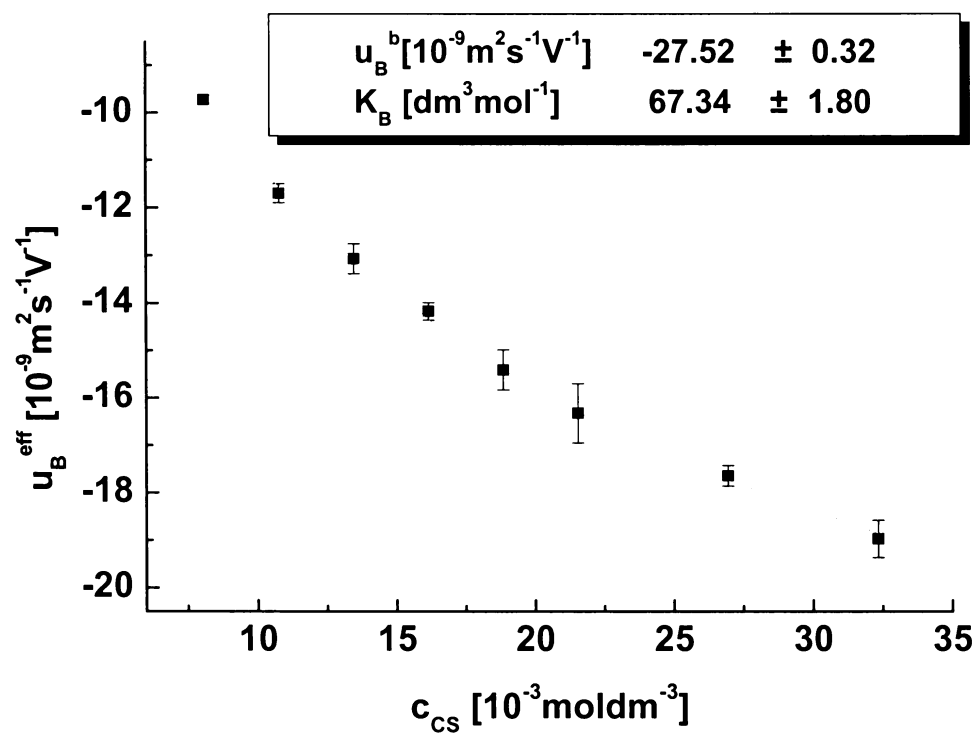
6.4 Výpočet komplexačních konstant lorazepamu s CO – β – CD

Komplexační konstanty byly počítány pomocí vztahu (11). Do programu Origin verze 6.1 byla zadána vstupní data, tedy efektivní mobility analytu při jedné teplotě a příslušné molární koncentrace CO – β – CD. Pomocí funkce nelineární regrese byly vypočítány komplexační konstanty a vlastní mobility komplexu analyt-ion předstacionární fáze. Graf nelineární regrese pro teplotu 27 °C je znázorněn na Obrázku 16 pro enantiomer A a na Obrázku 17 pro enantiomer B.

Kompletní souhrn komplexačních konstant při všech teplotách obsahuje Tabulka 3.



Obrázek 16 Regresní hyperbola dle vztahu (11) pro enantiomer A a teplotu 27°C



Obrázek 17 Regresní hyperbola dle vztahu (11) pro enantiomer B a teplotu 27°C

Tabulka 3 Kompletní přehled komplexačních konstant pro oba enantiomery při všech použitých teplotách

T [°C]	15	17	20	23	27	30	35
K_A [dm ³ mol ⁻¹]	26,05	27,31	27,04	27,32	26,16	27,85	30,43
	± 1,09	± 1,19	± 1,26	± 1,27	± 1,87	± 1,08	± 1,45
K_B [dm ³ mol ⁻¹]	73,47	74,25	71,65	70,83	67,34	68,56	64,36
	± 2,28	± 4,86	± 3,26	± 2,86	± 1,80	± 2,47	± 2,77

7 Závěr

1. Podala jsem přehled o stavu problematiky elektroforézy chirálních látek.
2. Vznik interkonverzního plata, které můžeme pozorovat na získaných elektroferogramech, potvrzuje skutečnost, že lorazepam má schopnost samovolně přecházet na svůj zrcadlový obraz. Lorazepam tedy patří mezi interkonvertující chirální látky.
3. Z výsledků měření je možno konstatovat, že se zvyšující se koncentrací chirálního selektoru, v tomto případě CO – β – CD, se zvyšuje i selektivita separace lorazepamu, a to pro všechny námi použité koncentrace chirálního selektoru. Toto ovšem neplatí obecně, po dosažení jisté koncentrace chirálního selektoru se selektivita separace začne zhoršovat.
4. Důsledkem zvýšení separační teploty je růst interkonverzní zóny, což zhoršuje separaci. Zvyšování teploty tedy urychluje vzájemnou přeměnu enantiomerů, způsobuje růst rychlostních konstant interkonverze. Interkonverze lorazepamu je v rozmezí teplot 15 °C – 35 °C entalpicky kontrolována, použité teplotní rozmezí je tedy pod T_{ISO} .
5. Vypočítala jsem komplexační konstanty analytu s iontem pseudostacionární fáze, jejich hodnoty se pohybují v rozmezí 25 až 35 dm³mol⁻¹ pro enantiomer A a 60 až 75 dm³mol⁻¹ pro enantiomer B. Výsledná chyba výpočtu byla vždy menší než 10 %, což je velmi dobrý výsledek pro toto experimentální stanovení.

8 Seznam citované literatury

- ¹ B. Gaš, *Electrophoresis: Electrophoresis - Principles*, Chapter in the book: P. J. Worsfold, A. Townshend, C. F. Poole, (Eds.), *Encyclopedia of Analytical Science*, 2nd Edition, Elsevier, Amsterdam 2004.
- ² V. Kašička, *Chem. listy*, 1997, 91, 320
- ³ B. Chankevadze, *Capillary Electrophoresis Chiral Analysis*, John Wiley & Sons Ltd, 1997
- ⁴ O. Červinka, *Chem. Listy*, 1999, 93, 294
- ⁵ O. Trapp, V. Schurig, *J. Chromatogr. A* 2001, 911, 167
- ⁶ O. Trapp, V. Schurig, *Computers and Chemistry* 2001, 25, 187
- ⁷ R. A. Kellner, J. C. Giddings, *J. Chromatogr.* 1960, 3, 205
- ⁸ W. Bürkel, H. Karfunkel, V. Schurig, *J. Chromatogr.* 1984, 288, 1
- ⁹ P. Dubský, E. Tesařová, B. Gaš, *Electrophoresis* 2004, 25, 733
- ¹⁰ M. Jung, V. Schurig, *J. Am. Chem. Soc.* 1992, 114, 259
- ¹¹ G. Schoetz, O. Trapp, V. Schurig, *Electrophoresis*, 2001, 22, 3185
- ¹² F. Thuncke, A. Kálmán, F. Kálmán, S. Ma, A. S. Rathore, C. Horvát, *J. Chromatogr. A* 1996, 744, 259
- ¹³ B. Koppenhöfer, E. Bayer, *Chromatografia* 1984, 19, 123
- ¹⁴ K. Cabrera, D. Lubda, *J. Chromatogr. A* 1994, 666, 433
- ¹⁵ S. Reich, O. Trapp, V. Schurig, *J. Chromatogr. A* 2001, 13, 403
- ¹⁶ G. Schoetz, O. Trapp, V. Schurig, *Electrophoresis* 2001, 22, 2409
- ¹⁷ P. Dubský, *Diplomová práce*, Katedra fyzikální chemie Univerzity Karlovy, Praha 2003
- ¹⁷ J. Vohlídal, A. Julák, K. Štuhlík, *Chemické a analytické tabulky*, Grada 1999
- ¹⁸ Program PeakMaster, verze 5.2
- ¹⁹ O. Červinka, V. Dědek, M. Ferles, *Organická chemie*, SNTL 1980