



**Arkadiusz Kwaterczak**

**Kompleksy supramolekularne w elektroforezie  
związków chiralnych – zastosowanie w analizie  
substancji leczniczych**

**Promotor:**

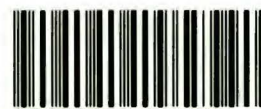
**Prof. dr hab. Janusz Lipkowski**

A-21-9

U-9-186

Biblioteka Instytutu Chemii Fizycznej PAN

**F-B.408/08**



80000000198390



Praca doktorska zrealizowana w ramach Międzynarodowych Studiów  
Doktoranckich w Zakładzie Fizykochemii Kompleksów  
Supramolekularnych Instytutu Chemii Fizycznej Polskiej Akademii Nauk

**Warszawa 2007**





3. 408/08

## **Podziękowania**

*Panu profesorowi Januszowi Lipkowskiemu*

*za pomoc i opiekę oraz udzielenie cennych rad i wskazówek podczas wykonywania  
i redakcji niniejszej pracy*

*Pani dr Annie Bielejewskiej*

*za wybór tematu, opiekę, pomoc oraz cenne dyskusje na temat niniejszej pracy.*

*Wszystkim koleżankom i kolegom z zakładu II*

*za stworzenie życzliwej i sympatycznej atmosfery w pracy.*



## **Spis treści**

<b>Spis treści.....</b>	<b>3</b>
-------------------------	----------

## **Część literaturowa**

<b>Wprowadzenie.....</b>	<b>7</b>
--------------------------	----------

### **Rozdział I**

<b>Znaczenie i metody rozdzielania związków chiralnych.....</b>	<b>7</b>
<b>I-1. Klasyfikacja izomerów.....</b>	<b>7</b>
<b>I-2. Stereoizomeria.....</b>	<b>8</b>
<b>I-3. Aktywność enancjomerów w układach biologicznych.....</b>	<b>15</b>
<b>I-4. Metody otrzymywania i analizy związków chiralnych.....</b>	<b>19</b>

### **Rozdział II**

<b>Metoda elektroforezy kapilarnej.....</b>	<b>22</b>
<b>II-1. Wprowadzenie.....</b>	<b>22</b>
<b>II-2. Aparatura.....</b>	<b>24</b>
<b>II-3. Przepływ elektroosmotyczny EOF .....</b>	<b>25</b>
<b>II-4. Ruchliwość elektroforetyczna związków.....</b>	<b>29</b>
<b>II-5. Rodzaje elektroforezy kapilarnej.....</b>	<b>31</b>
<b>II-6. Zastosowanie elektroforezy kapilarnej do rozdzielania enancjomerów.....</b>	<b>35</b>
<b>II-6.1. Stałe trwałości tworzenia diastereoizomerycznych kompleksów.....</b>	<b>37</b>
<b>II-6.2. Wyznaczanie stałych trwałości.....</b>	<b>39</b>
<b>II-6.3. Selektwność układu <math>\alpha</math> oraz współczynnik rozdzielania pików <math>R_s</math>.....</b>	<b>41</b>
<b>II-6.4. Wpływ stężenia selektora na selektwność.....</b>	<b>42</b>
<b>II-6.5. Wpływ różnicy ruchliwości elektroforetycznych na selektwność....</b>	<b>43</b>
<b>II-6.6. Wpływ EOF na selektwność.....</b>	<b>44</b>



<b>II-6.7. Różnice elektroforezy kapilarnej i chromatografii.....</b>	<b>44</b>
---	-----------

### **Rozdział III**

<b>Czynniki enancjoselektywne w CE.....</b>	<b>45</b>
<b>III-1. Cyklodekstryny.....</b>	<b>45</b>
<b>III-1.1. Budowa CD.....</b>	<b>46</b>
<b>III-1.2. Pochodne obojętnych cyklodekstryn.....</b>	<b>48</b>
<b>III-1.3. Tworzenie kompleksów inkluzyjnych.....</b>	<b>50</b>
<b>III-1.4. Zastosowanie CD w elektroforetycznym rozdzielaniu związków chiralnych.....</b>	<b>52</b>
<b>III-2. Surfaktanty.....</b>	<b>55</b>
<b>III-2.1. Surfaktanty pochodzenia naturalnego.....</b>	<b>56</b>
<b>III-2.2. Surfaktanty syntetyczne.....</b>	<b>60</b>
<b>III-2.3. Zastosowanie surfaktantów w enancjoseparacji.....</b>	<b>61</b>
<b>III-3. Etery koronowe.....</b>	<b>62</b>
<b>III-3.1. Zastosowanie eterów koronowych w enancjoseparacji.....</b>	<b>63</b>

## **CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA I SYMULACJE**

<b>Wprowadzenie.....</b>	<b>66</b>
--------------------------	-----------

### **Rozdział IV**

<b>Aparatura i warunki prowadzenia eksperymentu.....</b>	<b>66</b>
<b>IV-1. Aparatura.....</b>	<b>66</b>
<b>IV-2. Procedury kondycjonowania i mycia kapilary.....</b>	<b>67</b>
<b>IV-3. Odczynniki i badane związki.....</b>	<b>67</b>
<b>IV-4. Metoda wyznaczania stałych trwałości.....</b>	<b>70</b>

### **Rozdział V**

<b>Badania wstępne.....</b>	<b>71</b>
<b>V-1. Wpływ pH na przepływ elektroosmotyczny.....</b>	<b>71</b>

<b>V-2. Wpływ pH na ruchliwość elektroforetyczną badanych związków.....</b>	<b>72</b>
<b>V-3. Zachowanie się cyklodekstryn w układach elektroforetycznych.....</b>	<b>75</b>

## **Rozdział VI**

<b>Rozdzielanie enancjomerów w elektroforezie kapilarnej modyfikowanej cyklodekstrynami.....</b>	<b>78</b>
<b>VI-1. Opis układów elektroforetycznych.....</b>	<b>78</b>
<b>VI-1.1. Wybrane zagadnienia literaturowe dotyczące cyklodekstryn obojętnych.....</b>	<b>78</b>
<b>VI-1.2. Wybrane zagadnienia literaturowe dotyczące cyklodekstryn obdarzonych ładunkiem ujemnym.....</b>	<b>83</b>
<b>VI-1.3. Układ złożony z CD obojętnej i anionowej.....</b>	<b>87</b>
<b>VI-1.4. Porównanie enancjoselektywności w układzie pojedynczym i podwójnym.....</b>	<b>94</b>
<b>VI-2. Rozdzielanie enancjomerów w układach pojedynczych.....</b>	<b>99</b>
<b>VI-2.1. Cyklodekstryny obojętne.....</b>	<b>99</b>
<b>VI-2.1.1. Szacowanie stałych trwałości kompleksów.....</b>	<b>101</b>
<b>VI-2.1.2. Wpływ stężenia cyklodekstryny na <math>R_s</math> oraz selektywność.....</b>	<b>104</b>
<b>VI-2.2. Cyklodekstryna anionowa (<math>s\text{-}\beta\text{-CD}</math>).....</b>	<b>109</b>
<b>VI-2.2.1. Szacowanie stałych trwałości kompleksów z <math>s\text{-}\beta\text{-CD}</math>.....</b>	<b>112</b>
<b>VI-2.2.2. Wpływ stężenia cyklodekstryny na <math>R_s</math> oraz selektywność.....</b>	<b>114</b>
<b>VI-3. Rozdzielanie enancjomerów w układach podwójnych.....</b>	<b>119</b>
<b>VI-3.1. Zmiana selektywności oraz <math>R_s</math> w układzie dwóch cyklodekstryn....</b>	<b>121</b>

## **Rozdział VII**

<b>Optymalizacja rozdzielania enancjomerów.....</b>	<b>127</b>
<b>VII-1. Wybór parametrów do optymalizacji.....</b>	<b>128</b>
<b>VII-2. Obliczanie wpływu zmiennych na rozdzielanie.....</b>	<b>129</b>
<b>VII-3. Strategia rozdzielania związków zasadowych i obojętnych.....</b>	<b>138</b>
<b>VII-3.1. Weryfikacja skuteczności schematu .....</b>	<b>140</b>

## **Rozdział VIII**

<b>Inne układy supramolekularne stosowane w enancjoseparacji.....</b>	<b>142</b>
<b>VIII-1. Układ cyklodekstryna + kasy cholowe.....</b>	<b>142</b>
<b>VIII-1.1. Zastosowanie układów pojedynczych.....</b>	<b>143</b>
<b>VIII-1.1.1. Cyklodekstryny.....</b>	<b>145</b>
<b>VIII-1.1.2. Kwasy cholowe.....</b>	<b>145</b>
<b>VIII-1.2. Zastosowanie układów podwójnych.....</b>	<b>146</b>
<b>VIII-2. Układ cyklodekstryna + chiralny eter koronowy.....</b>	<b>151</b>
<b>Podsumowanie.....</b>	<b>159</b>
<b>Streszczenie.....</b>	<b>164</b>



# **CZĘŚĆ LITERATUROWA**

## **Wprowadzenie**

W pracy przedstawiono optymalizację rozdzielania związków chiralnych będących substancjami leczniczymi w różnych układach strefowej elektroforezy kapilarnej (CZE) oraz micelarnej elektrokinetycznej chromatografii (MECC) z wykorzystaniem kompleksów supramolekularnych. W związku z zakresem pracy opracowanie literaturowe składa się z następujących części:

1. *Rozdział I* poświęcony jest klasyfikacji izomerów, znaczeniu rozdzielania związków chiralnych oraz przedstawia przegląd metod wykorzystywanych w badaniu procesów rozróżnienia molekularnego.
2. W *rozdziale II* przedstawiono podstawowe parametry opisujące metodę elektroforezy kapilarnej.
3. *Rozdział III* przedstawia przegląd najczęściej wykorzystywanych selektorów chiralnych i ich wykorzystanie w elektroforezie kapilarnej.

## **Rozdział I**

### **Znaczenie i metody rozdzielania związków chiralnych**

#### **I-1. Klasyfikacja izomerów**

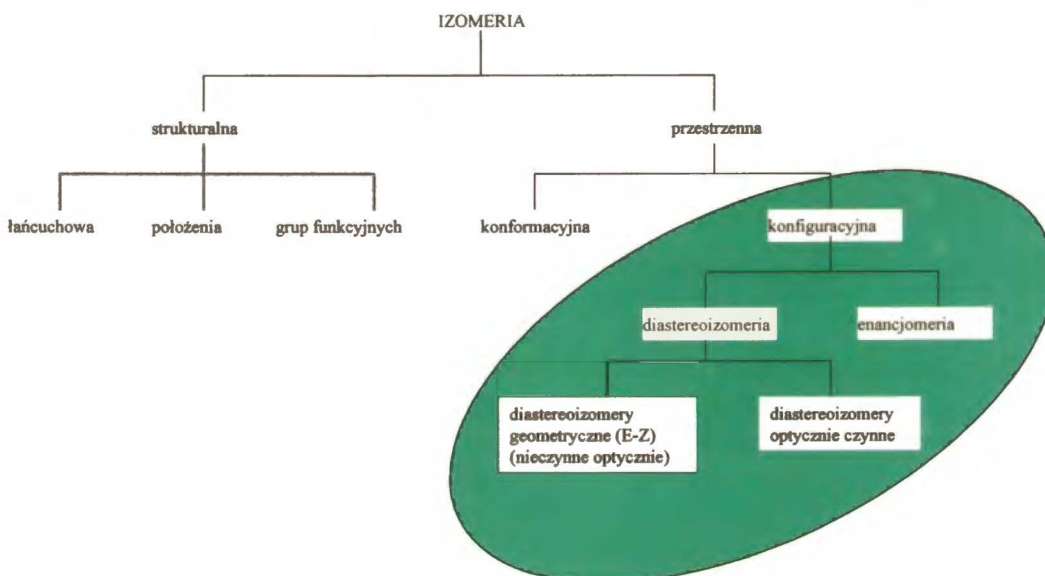
Izomery to związki chemiczne o takim samym wzorze lecz różnej budowie. Istotą izomerii jest odmienny sposób powiązania atomów w cząsteczce lub odmienny sposób ułożenia atomów w przestrzeni przy zachowaniu tego samego sposobu ich powiązania. Z tego względu izomerię dzieli się na:

1. *Izomerię konstytucyjną* – izomery różnią się sposobem i kolejnością wiązania atomów,



2. **Stereoizomerię** lub izomerię przestrzenną – izomery różnią się przestrzennym rozmieszczeniem atomów i układu wiązań.

Szczegółowy podział izomerii przedstawia poniższy schemat (rys. I-1): [1,2,3]



Rys. I-1. Podział izomerów

## I-2. Stereoizomeria

### **Enancjomery** (izomery optyczne)

Termin chiralność pochodzi od greckiego słowa *cheir* – ręka, gdyż relacja jaka istnieje pomiędzy przedmiotami chiralnymi przypomina relację pomiędzy prawą i lewą ręką. Lewa ręka jest zwierciadlanym odbiciem prawej i w żaden sposób nie można jej tak nałożyć na rękę prawą, aby nakrywały się ze sobą wszystkie palce obydwu rąk. Przedmiot chiralny (również cząsteczka) nie daje się nałożyć na swe odbicie lustrzane, podczas gdy dla przedmiotów achiralnych takie nałożenie jest możliwe w wyniku przeprowadzenia pewnych operacji translacji i/lub rotacji. Chiralność cząsteczek sprowadza się zatem do możliwości istnienia dwóch odmian wzajemnie nienakładalnych, zwanych enancjomerami [4].

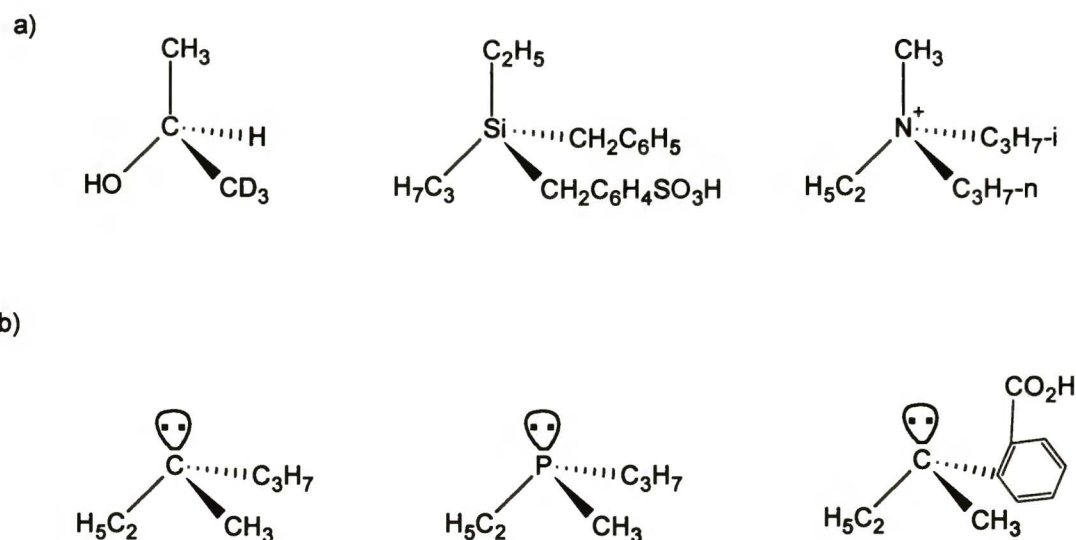
Z punktu widzenia symetrii, aby cząsteczka była achiralna, powinna posiadać środek symetrii lub płaszczyznę symetrii. Chiralnymi natomiast są cząsteczki, których jedynymi elementami symetrii są osie obrotu  $C_n$ . Wynika z tego, że do cząsteczek chiralnych należą nie tylko cząsteczki asymetryczne, których jedynym elementem symetrii jest oś symetrii  $C_1$ , ale także cząsteczki posiadające osie  $C$  wyższych rzędów lub ich kombinacje. Symetrię cząsteczek chiralnych i achiralnych można opisać za pomocą różnych grup punktowych, dla których Schoenflies zaproponował system notacji. Klasyfikację grup punktowych (zapisuje się wytłuszczonym drukiem) przedstawia *tabela I-1* [5].

*Tabela I-1. Symetria grup punktowych.*

<b>Grupy chiralne</b>	<b>Grupy achiralne</b>
<b><math>C_n</math></b> (tylko jedna oś $C_n$ )	<b><math>C_s</math></b> (tylko jedna $\sigma$ )
<b><math>D_n</math></b> ( $C_n + n \perp C_2$ )	<b><math>S_n</math></b> (brak $\sigma$ , $n$ parzyste)
<b><math>T</math></b> ( $4C_3 + 3C_2$ , brak $\sigma$ )	<b><math>C_{nv}</math></b> ( $C_n + n\sigma_v$ , brak $\sigma_h$ )
	<b><math>C_{nh}</math></b> ( $C_n + \sigma_h$ , brak $\sigma_v$ )
	<b><math>D_{nd}</math></b> ( $C_n + n \perp C_2 + n \sigma_v$ , brak $\sigma_h$ )
	<b><math>D_{nh}</math></b> ( $C_n + n \perp C_2 + n \sigma_v + \sigma_h$ )
	<b><math>T_d</math></b> ( $4C_3, 3C_2, 6\sigma$ )

Opisy sposobów rozmieszczenia podstawników w przestrzeni można odnieść do hipotetycznego punktu, osi, płaszczyzny lub helisy, co prowadzi do chiralności typu: centrycznego, osiowego, planarnego lub helisowego.

Najprostszym przypadkiem jest chiralność centryczna. własność ta istnieje w cząsteczkach organicznych, posiadających tzw. asymetryczne atomy. Mogą nimi być np. atomy węgla o hybrydyzacji  $sp^3$ , podstawione czterema różnymi atomami lub grupami. Taki asymetryczny atom nazywamy centrum chiralności cząsteczki. Nie tylko atomy węgla mogą stanowić centra chiralności w cząsteczkach. Mogą to być również atomy krzemu, cyny, czterowartościowego azotu w czwartorzędowych solach amoniowych i tlenkach trzeciorzędowych amin. W związkach tych centrum chiralności ma konfigurację tetraedryczną, podobnie jak asymetryczny atom węgla (*rys. I-2 a*).



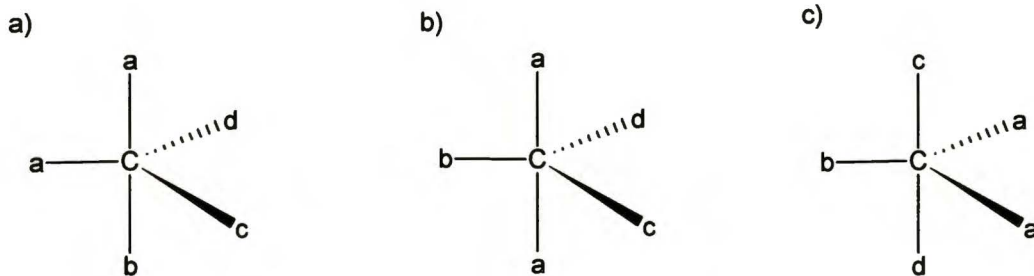
Rys. I-2. Związki chiralne o konfiguracji tetraedycznej a) oraz piramidy b).

Centra chiralności mogą wykazywać również konfigurację piramidy. Do optycznie czynnych związków tego typu należą określone pochodne trójwartościowego azotu, pochodne fosfiny, arsyny, stibiny i sulfotlenki. Jednak część związków trójkoordynacyjnych (np. trzeciorzędowe aminy) jest nietrwała konfiguracyjnie (rys. I-2 b).

Gdy liczba koordynacyjna jest większa niż cztery, stereoizomeria znacznie się komplikuje. Nawet dla najbardziej symetrycznego ugrupowania ligandów w związkach pięciokoordynacyjnych, tzn. w bipiramidzie trygonalnej o symetrii  $D_{3h}$  istnieje możliwość rozróżnienia dwóch geometrycznie odmiennych sytuacji, w których dwa ligandy zajmują oba końce osi  $C_3$  (pozycje apikalne), podczas gdy pozostałe trzy ligandy znajdują się w wyznaczonych kierunkiem osi  $C_2$  położeniach ekwatorialnych. Wynika stąd, że dla podstawienia typu  $X_{aaaab}$  powinny wystąpić dwa stereoizomery: jeden z ligandem b w położeniu apikalnym oraz drugi, w którym b znajduje się w położeniu ekwatorialnym. Dla acyklicznych związków pięciokoordynacyjnych uzyskuje się chiralność, jeśli cztery spośród pięciu ligandów są różne ( $X_{aabcd}$ ), przy czym jeden ligand a zajmuje położenie ekwatorialne, a drugi- apikalne (rys. I-3 a). Pozostałe ugrupowania na rys. I-3 zawierają płaszczyznę symetrii. Dla podstawienia typu  $X_{aabcd}$  można pokazać występowanie czterech achiralnych diastereoizomerów i trzech par enancjomerów. Jednakże gdy pięć ligandów różni się między sobą, każdy z dwudziestu stereoizomerów



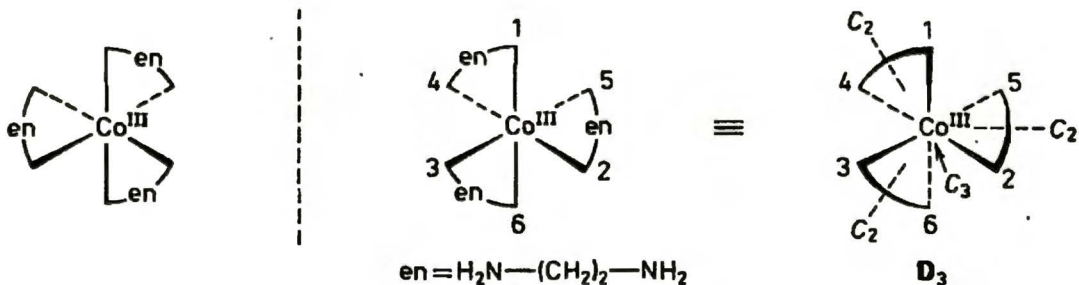
jest chiralny. W przypadku związków czterokoordynacyjnych, tam gdzie istnieje tylko jedno centrum chiralne, diastereoizomeria nie występuje.



Rys. I-3. Stereoizomeria związków pięciokoordynacyjnych; a) związek chiralny, b) i c) związki niechiralne.

Konfiguracja oktaedryczna jest typowa dla optycznie czynnych związków kompleksowych z centrum sześciokoordynacyjnym. Przykładem mogą być optycznie czynne związki kompleksowe kobaltu z etylenodiaminą. Znane są również optycznie czynne kompleksy o takiej konfiguracji z chromem, żelazem, glinem, rutenem, rodem, irydem, platyną i arsenem.

Warunkiem chiralności kompleksów oktaedrycznych z ligandami jednokleszczowymi jest posiadanie różniących się między sobą ligandów. Takie kompleksy występują jednak rzadko. Chiralność w przypadku dwukleszczowych lub wielokleszczowych ligandów wymaga mniejszego zróżnicowania ligandów. Niektóre kompleksy tego rodzaju odznaczają się zatem wysoką symetrią. Na przykład w jonie kompleksowym tris(etylenodiamino)kobaltu(III) o symetrii  $D_3$  z centrum chiralnym łączą się trzy identyczne ligandy (rys. I-4).

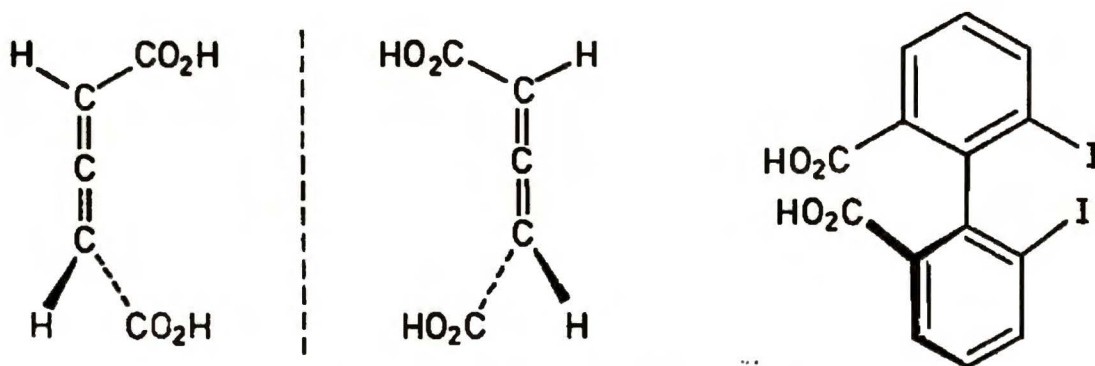


Rys. I-4. Chiralny kompleks kobaltu (III) z etylenodiaminą.



Cząsteczki zawierające jedno centrum asymetrii są zawsze asymetryczne ( $C_1$ ), podczas gdy cząsteczki zawierające kilka takich centrów mogą niekiedy być symetryczne lub nawet achiralne (związki mezo).

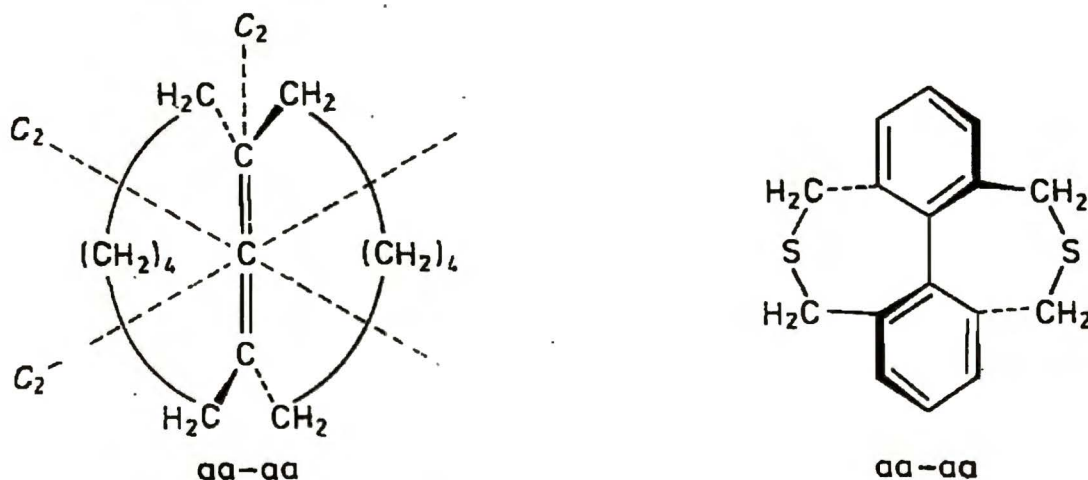
Izomeria optyczna może występować również przy braku chiralnych atomów. Ten warunek spełniają niektóre związki nienasycone i cykliczne. Geometrycznym elementem odniesienia wykorzystywanym do określenia konfiguracji jest oś. Ten rodzaj chiralności, czyli chiralność aksjalną spotykamy np. w chiralnych allenach lub bifenyloch (rys. I-5).



Rys. I-5. Chiralność w układach allenowych oraz bifenyloch.

W przypadku układów allenowych trzy (typ ab-ac) lub cztery różne podstawniki (ab-cd) prowadzą do cząsteczek asymetrycznych ( $C_1$ ). Do uzyskania cząsteczki chiralnej wystarczy, aby podstawniki na obu końcach osi różniły się między sobą (podstawienie typu ab-ab). Uzyskany model jest chiralny, lecz symetryczny i należy do grupy  $C_2$ . Z 1,3-dwupodstawionego modelu allenu można otrzymać kilka innych modeli poprzez rozwinięcie jednego lub obu wiązań podwójnych do symetrycznych pierścieni. Rozwinięcie jednego z wiązań podwójnych asymetrycznego allenu aż do uzyskania symetrycznego pierścienia sześcioczołowego dostarcza asymetrycznego alkilidenocykloheksanu, rozwinięcie obu wiązań podwójnych daje połączenia spiro. Ważną cechą tych wszystkich modeli jest to, że podstawniki leżą parami na dwóch wzajemnie prostopadłych płaszczyznach i są połączone z różnymi atomami centralnymi.

Chiralność można wytworzyć również w modelach typu aa-bb, a nawet aa-aa, tworząc mostki między podstawnikami zlokalizowanymi na przeciwnych końcach osi (rys. I-6). Struktura taka posiada symetrię  $D_2$ .



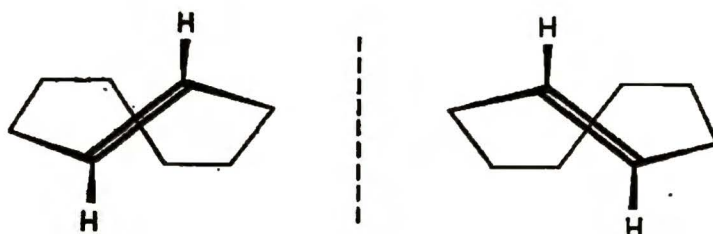
Rys. I-6. Chiralne cząsteczki o symetrii dwuosiennej  $D_2$ .

Chiralna grupa punktowa  $D_n$  zawiera główną oś symetrii  $n$ -tego rzędu i  $n$  prostopadłych do niej osi  $C_2$ . Typowe przykłady symetrii  $D_n$  to wielołopatkowe śmigła. Śmigła o dwóch łopatkach i ich analogi chemiczne, takie jak podwójnie mostkowany bifenyl, pokazany na rys. I-6 należą do grupy punktowej  $D_2$ . Trójłopatkowe śmigła i związki tego typu należą do grupy  $D_3$ . W rezultacie chiralności zmiana kierunku obrotu mechanicznych śmigieł sprawia odwrócenie kierunku ruchu.

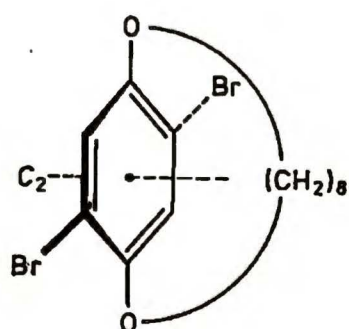
Innym rodzajem cząsteczek chiralnych są cząsteczki asymetrycznie podstawione względem wyróżnionej płaszczyzny, którą nazywa się płaszczyzną chiralności. Prosty model chiralności planarnej daje się łatwo zbudować z płaskiej figury położonej w płaszczyźnie osi symetrii oraz z punktu umieszczonego poza płaszczyznę. Lokalizacja punktu po prawej lub lewej stronie płaszczyzny generuje dwa nie dające się na siebie nałożyć odbicia lustrzane. Przykłady chiralności planarnej można odnaleźć wśród związków, w których dwa oddalone od siebie atomy należące do płaskiej struktury są połączone łańcuchem na tyle krótkim, aby uniemożliwić swobodną rotację wokół płaszczyzny. Najprostszą płaszczyzną molekularną stanowi wiązanie podwójne, a najprostszy związek w tej klasie to trans-cyklookten. Przykładem związków wykazujących tę cechę strukturalną są również polimetylenowe etery hydrochinonu,

istniejące w dwu enancjomerycznych odmianach. Płaszczyzna chiralności przechodzi w tym przypadku przez pierścień aromatyczny, atomy tlenu i podstawnik w pierścieniu. Obydwa wymienione związki należą do grupy punktowej  $C_2$  (rys. I-7).

a)



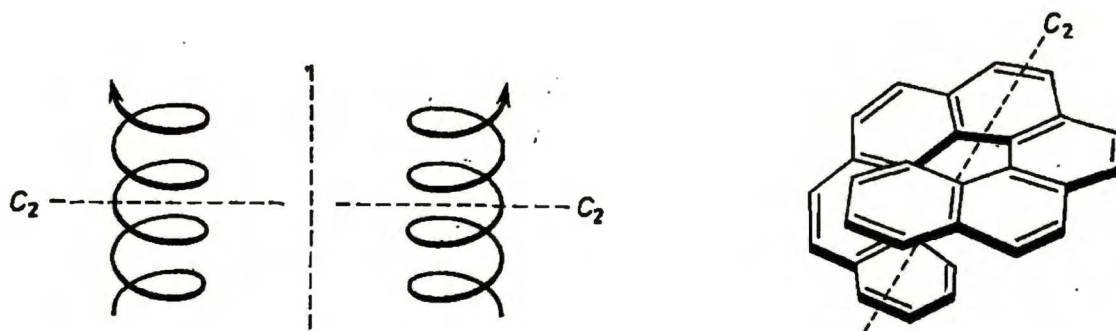
b)



Rys. I-7. Przykłady cząsteczek płaszczyzną chiralności; a) *trans*-cyklookten, b) polietylenowa pochodna hydrochinonu.

Specjalną formę chiralności stanowią helisy prawo i lewo skrętnie, często występujące w makrocząsteczkach takich jak biopolimery, proteiny, polisacharydy (rys. I-8a). Helikalne struktury występują np. w przypadku wielopierścieniowych układów aromatycznych, takich jak helicen (rys. I-8b). Powodem tworzenia się helikalnej struktury jest brak możliwości koplarnego rozmieszczenia skrajnych pierścieni aromatycznych układu. Nie skierowane cylindryczne helisy, takie jak helicen, należą do grupy symetrii  $C_2$ .





Rys. I-8. Cząsteczki chiralne o symetrii  $C_2$ : (a) odwracalne prawidłowe helisy, b) heptahelicen.

Skierowana podwójna helisa kwasów nukleinowych, czy też tzw.  $\alpha$ -helisa naturalnych polipeptydów są obie zarówno asymetryczne jak i dodatnie.

Do opisu konfiguracji enancjomerów stosuje się konwencję Cahn, Ingolda i Preloga [6].

**Diastereoizomery** – są to stereoizomery, które nie będąc wzajemnie odbiciami lustrzanymi nie są w stosunku do siebie enancjomerami. Diastereoizomerami są izomery geometryczne wiązania podwójnego cis-trans (E-Z) oraz izomery zawierające więcej niż jedno centrum stereogeniczne, przy czym jedno z tych centrów ma tą samą konfigurację. Diastereoizomery, w przeciwieństwie do enancjomerów różnią się właściwościami fizycznymi i chemicznymi, np. temperaturą wrzenia i topnienia, rozpuszczalnością, współczynnikiem załamania światła [1].

### **I-3. Aktywność enancjomerów w układach biologicznych**

W procesach, które odbywają się w komórkach żywych, współdziałają ze sobą wielkocząsteczkowe biopolimery, tzn. białka i kwasy nukleinowe, oraz substancje niskocząsteczkowe, pełniące rolę różnorodnych efektorów biologicznych: substratów reakcji enzymatycznych, aktywatorów i inhibitorów przemian, koenzymów itp. W trakcie

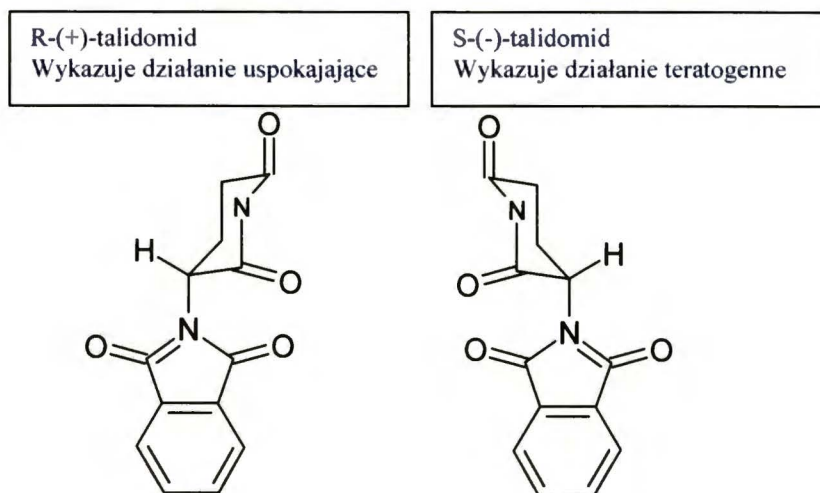
przemian zachodzących w żywych komórkach związki niskocząsteczkowe tworzą mniej lub bardziej trwałe kompleksy z biopolimerami.

Znaczenie, jakie ma stereochemia dla zrozumienia molekularnych oddziaływań i mechanizmów procesów komórkowych (metabolicznych), związane jest z asymetryczną budową niemal wszystkich chemicznych składników żywej komórki (aminokwasy, cukry, proteiny, kwasy nukleinowe, większość witamin).

Związki, które występują w ustrojach żywych cechuje bardzo wysoki stopień selekcji, np. z 256 teoretycznie możliwych izomerów konfiguracyjnych cholesterolu, żywe komórki syntezują i wykorzystują tylko jeden [7].

W 1933 r. Easson i Stedman wprowadzili model trypunktowego oddziaływania dla opisu zdolności chiralnego rozróżnienia przez receptory biologiczne, który pozwala zrozumieć stereo chemiczne różnice w aktywności farmakologicznej [8]. Autorzy opisują różnice w dopasowaniu poszczególnych enancjomerów do dostępnego miejsca na powierzchni enzymu lub receptora. W celu uzyskania rozróżnienia pomiędzy enancjomerami receptor lub enzym musi posiadać trzy nierównoważne miejsca oddziaływania. Enancjomer, który oddziałuje równocześnie z wszystkimi trzema punktami jest nazywany eutomerem (aktywny enancjomer), podczas gdy drugi oddziałujący z mniej niż trzema punktami jest nazywany distomerem (nieaktywny enancjomer) [9].

Metabolizm i procesy regulacji w układach biologicznych są czułe na stereochemię. Zróżnicowane odpowiedzi takich układów można zaobserwować porównując aktywność pary enancjomerów. Różnice te mogą wyrażać się w metabolizmie, w antagonistycznym działaniu odnoszącym się do każdego z nich, a nawet we własnościach toksykologicznych. Klasycznym przykładem różnego oddziaływania na organizm ludzki enancjomerów jest lek o nazwie talidomid (*rys. I-9*). Stosowany u kobiet w ciąży jako lek uspokajający. Enancjomer S powodował ciężkie uszkodzenie płodu [10].



Rys. I-9. Struktura i aktywność biologiczna enancjomerów talidomidu.

Różne właściwości biologiczne enancjomerów innych leków przedstawia Tabela I-2.

Tabela I-2. Właściwości fizjologiczne enancjomerów różnych leków [9].

Związek	Działanie	
	(+)-enancjomer	(-)-enancjomer
<b>Penicylamina</b>	<b>antyreumatyczne</b>	<b>silnie toksyczne</b>
<b>Propranolol</b>	<b>β-bloker</b>	<b>antykoncepcyjne</b>
<b>Propoksyfen</b>	<b>przeciwbólowe</b>	<b>przeciwkaszlowe</b>
<b>Etambutol</b>	<b>tuberkulostatyczne</b>	<b>osłabiające wzrok</b>
<b>Ketamina</b>	<b>silnie znieczulające</b>	<b>słabo znieczulające</b>

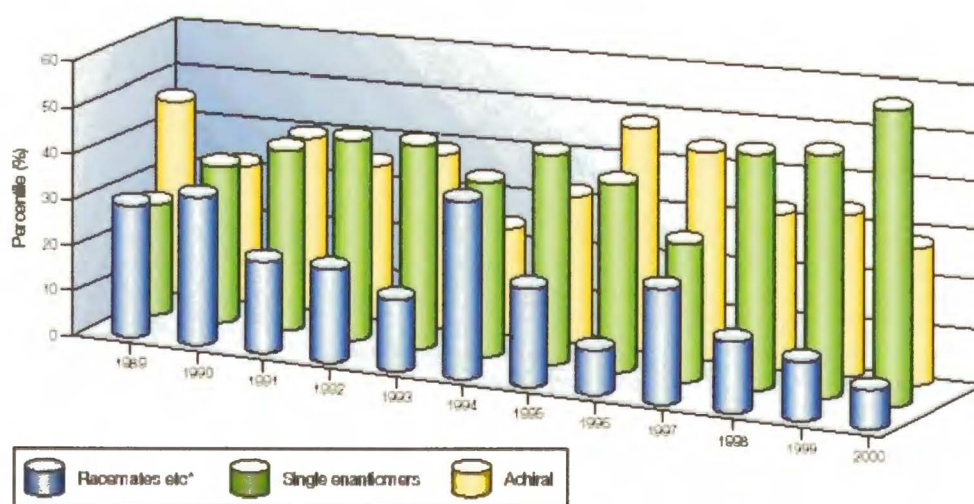
Chociaż izomery optyczne racemicznych leków mogą wykazywać różną aktywność farmakokinetyczną, część leków syntetycznych, które stanowią większość leków chiralnych jest w dalszym ciągu stosowana jako racemat. Wiele koncernów farmaceutycznych wykorzystuje natomiast przejście z racemicznej formy leku na pojedynczy enancjomer jako metodę do przedłużenia wyłączności patentowych. Metoda ta powszechnie nazywana jest „racemic switch”.



Najlepszy efekt terapeutyczny uzyskuje się stosując aktywny enancjomer. Jednak stosując pojedynczy enancjomer nie zawsze uniknie się efektów ubocznych, ponieważ mogą tworzyć się szkodliwe związki metabolitów, jak również może wystąpić chiralna inwersja albo racemizacja. Przykładu chiralnej inwersji bez negatywnych skutków dostarcza ibuprofen, gdzie nieaktywny R-enancjomer jest przekształcany w procesie enzymatycznej konwersji w aktywną formę S-enancjomeru [11]. Przedstawiony wcześniej talidomid, nawet stosowany jako nieszkodliwa forma (+) enancjomeru w wyniku konwersji *in vivo* przekształca się w teratogenną formę (–) izomeru.

Obecne przepisy podkreślają konieczność badań farmakologicznych i farmakokinetycznych dla obu enancjomerów. Instytucje kontrolujące wprowadzanie nowych leków wymagają odpowiednich informacji o właściwościach poszczególnych enancjomerów. Dodatkowo dokumentacja powinna zawierać dane dotyczące konwersji jednego enancjomeru w drugi.

W szybkim tempie rośnie ilość leków sprzedawanych w postaci jednego enancjomeru (rys. I-10). W 1999 r. ze sprzedaży leków w postaci pojedynczego enancjomeru uzyskano 52,9 miliardów dolarów, a w 2000 już 70 miliardów [9].



Rys. I-10. Procentowy udział w sprzedaży leków w postaci racematu, homochiralnych i niechiralnych w latach 1989–2000.

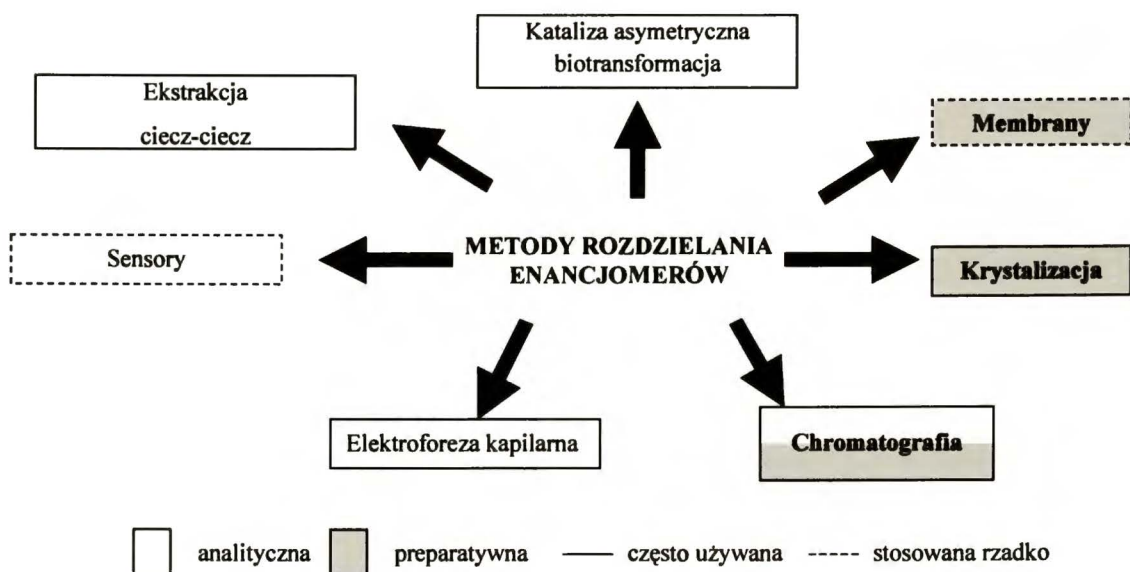


Coraz większe zapotrzebowanie na pojedyncze enancjomery wpływa na rozwój metod otrzymywania związków homochiralnych, jak również rozwój metod wykorzystywanych do kontroli czystości enancjomerycznej.

#### ***1-4. Metody otrzymywania i analizy związków chiralnych***

Substancje homochiralne można pozyskiwać ze źródeł naturalnych (np. z roślin pozyskuje się morfinę, atropinę, terpeny). Jednak większość farmaceutyków jest obecnie produkowana jako związki syntetyczne. Jedną z metod uzyskiwania pojedynczych enancjomerów jest synteza stereospecyficzna, która pozwala otrzymywać tylko jeden pożądaný enancjomer lub jego nadmiar w stosunku do drugiego. Za prace w tej dziedzinie w 2001 r. Barry Sharpless został uhonorowany wspólnie z Williamem Knowlsem i Ryōjkiem Noyorim Nagrodą Nobla.

Chociaż opracowano i zastosowano liczne syntezy stereospecyficzne do otrzymywania substancji enancjomerycznie czystych, relatywnie niewiele używanych jest na dużą skalę, szczególnie na początkowym etapie rozwoju nowego leku [12]. Ograniczenia czasowe na otrzymanie odpowiedniej ilości czystego enancjomerów do wstępnych badań farmakologicznych są zazwyczaj decydujące i na tym etapie wybiera się inne podejście - syntezę racematu, następnie jego rozdzielenie i analizę szeregiem dostępnych metod. Metody te zaprezentowane są na rys. I-11.



Rys I-11. Techniki używane do rozdzielania enancjomerów [12].

#### I-4.1. Metody chromatograficzne

W metodach chromatograficznych stosuje się dwa podejścia:

a) pośrednie, polegające na przekształceniu racemicznej mieszaniny za pomocą chiralnego czynnika pomocniczego (chiral derivatizing agent CDA) w diastereoizomery, które rozdziela się następnie metodami klasycznymi. Aby różnice we właściwościach fizykochemicznych diastereoizomerów były wystarczająco duże derywatywacja powinna wystąpić blisko atomu chiralnego. Technika ta ma swoje ograniczenia. Derywatywacja jest często trudna i czasochłonna a w przypadku prac preparatywnych należy dodatkowo usunąć czynnik derywatyzujący CDA.

b) metody bezpośrednie, które obejmują zarówno użycie chiralnych selektorów w fazie ruchomej (chiral mobile phase additive CMPA), lub chiralnych faz stacjonarnych (chiral stationary phase CSP). W drugim przypadku chiralny selektor jest chemicznie związany na nośniku lub na nim zaadsorbowany lub naniesiony.

Chiralne selektory stosowane jako dodatki do fazy ruchomej są używane na mniejszą skalę, ze względu na wysoki koszt przygotowania takiej fazy. Odzyskanie chiralnego selektora jest w większości przypadków niemożliwe. Ponadto wykorzystanie tej metody

do preparatywnego rozdzielania enancjomerów wiązałyby się z dodatkowym etapem usuwania selektora.

Chiralne fazy stacjonarne stały się podstawowym narzędziem do rozdzielania związków chiralnych. Można je podzielić na dwie grupy:

- fazy składające się z chiralnych selektorów unieruchomionych fizycznie lub chemicznie na podłożu, np. cyklodekstryny, etery koronowe, chiralne aminy i aminokwasy (chromatografia ligandowa), polisacharydy, antybiotyki, proteiny związane lub obsadzone na silikażelu.
- objętościowe wypełnienia chiralne, zalicza się tu polimery pochodzenia naturalnego (np. polisacharydy i ich pochodne, polimery cyklodekstryn, proteiny) oraz polimery syntetyczne (z chiralnymi podstawnikami lub z 'odciśniętą' luką)

Chiralne fazy stacjonarne są szeroko stosowane zarówno w skali analitycznej jak i preparatywnej.

## *1-4.2. Metody niechromatograficzne*

### *1. Krystalizacja*

Enancjomery tworzą z czystym enancjomerycznie składnikiem diastereoizomeryczne sole, które są mieszaniną kryształów składników optycznie czynnych. Sole te mogą być rozdzielone wg kilku technik [13, 14]:

- mechaniczne rozdzielanie kryształów (metoda raczej historyczna)
- krystalizacja frakcyjna,
- krystalizacja w optycznie czynnym rozpuszczalniku,
- selektywne szczepienie (selective seeding) racemicznego roztworu.

### *2. Biotransformacja*

O rozdziale decyduje biochemiczny proces, w trakcie którego jedna forma enancjomeru ulega degradacji.



### 3. *Chiralne membrany*

Zostały użyte na skalę preparatywną w 2001 r., ale technika ta nie została jeszcze rozwinięta na szerszą skalę [12].

### 4. *elektroforeza kapilarna* (zostanie przedstawiona w odrębnym punkcie).

Najpowszechniej stosowaną metodą zarówno do analizy składu enancjomerycznego mieszaniny, jak również do rozdzielania preparatywnego jest obecnie chromatografia. W ostatnich latach w bardzo szybkim tempie wzrasta znaczenie elektroforezy kapilarnej jako metody analizy, o czym świadczą liczne publikacje na ten temat [15,16].

## **Rozdział II**

### **Metoda elektroforezy kapilarnej**

#### **II-1. Wprowadzenie**

Elektroforeza to zjawisko elektrokinetyczne, w którym pod wpływem przyłożonego pola elektrycznego cząsteczki obdarzone ładunkiem elektrycznym zaczynają się poruszać. Prędkość poruszania się naładowanej elektrycznie cząsteczki zależy od jej rozmiaru, ładunku, kształtu oraz oporów ruchu środowiska. Zależności te pozwalają na szybką separację różnych cząsteczek przy zastosowaniu stosunkowo prostych urządzeń i przy niskim nakładzie kosztów. Te względy zadecydowały o powszechności zastosowań technik elektroforetycznych.

Głównym obszarem zastosowań elektroforezy są: biochemia białek i kwasów nukleinowych, biologia molekularna, farmakologia, medycyna sądowa, weterynaria, diagnostyka medyczna oraz kontrola jakości żywności. W analizie farmaceutycznej elektroforeza kapilarna pozwala na oznaczanie składu mieszanin, kontrolę czystości i rozdzielanie związków chiralnych. Należy również wspomnieć, że wykorzystanie technik elektroforetycznych umożliwiło uzyskanie pełnej sekwencji DNA człowieka



w projekcie genomiki (*ang. genomics*). Wszystkie powszechnie stosowane techniki sekwencjonowania DNA w końcowym swym etapie opierają się bowiem na elektroforezie.

Elektroforeza jako technika do rozdzielania mieszanin została wprowadzona przez Tiseliusa w 1937r. Odkrył on, że składniki mieszaniny protein, umieszczone w polu elektrycznym poruszają się, a ich ruchliwość uzależniona jest od ładunku [17]. Za swoje osiągnięcia Tiselius w roku 1948 został uhonorowany Nagrodą Nobla. Rozdzielanie związków w U-rurkach nastęczało wiele kłopotów w wyniku konwekcyjnego mieszania się składników. Aby to ominąć używano czynników stabilizujących: agarozę, azotan celulozy, poliakrylamid, bibuły. Zastosowanie porowatych nośników (agaroza, poliakrylamid) jest szczególnie korzystne, gdyż potęguje efekt separacji poprzez dodatkowe frakcjonowanie makrocząsteczek na zasadzie sita molekularnego.

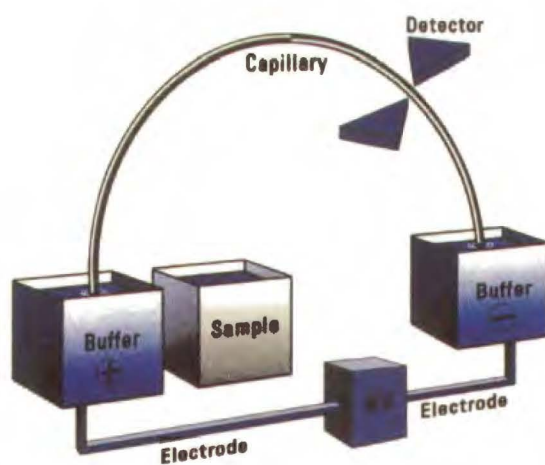
Pierwsze prace dotyczące elektroforezy w szklanych kapilarach zostały opisane przez Hjerténa w roku 1967 [18]. Hjerten użył do swoich prac kapilary o średnicy 3 mm. Kolejne prace wykonane przez Virtenena oraz Mikkersa z użyciem szklanych i teflonowych kapilar o wewnętrznych średnicach 200 $\mu\text{m}$  pokazały zalety stosowania kapilar o coraz mniejszych średnicach [19,20]. Na początku lat 80-tych Jorgenson i Lukacs rozwinęli technikę elektroforezy kapilarnej, wprowadzając krzemionkowe kapilary o wewnętrznych średnicach mniejszych niż 100 $\mu\text{m}$  oraz przedstawili teorię opisującą podstawy tej techniki. Ich zasługą jest zaprezentowanie wysokiej sprawności rozdzielń uzyskiwanej w elektroforezie jako wynik płaskiego profilu przepływu w cienkiej kapilarze [21]. Obecnie dostępne są kapilary o średnicach 25 $\mu\text{m}$ , a standardowo stosuje się kapilary o średnicy 50-75 $\mu\text{m}$ .

Technikę elektroforezy charakteryzuje wysoka sprawność ( $10^5$  -  $10^6$  pólk teoretycznych), krótki czas analiz (kilka do kilkunastu minut), zużycie małej objętości próbki (pojedyncze nl) oraz niewielkich ilości elektrolitów (kilka ml). Dodatkowo, CE umożliwia często szybszy rozwój metody analitycznej. Tak duży potencjał analityczny sprawia, że elektroforeza może stać się konkurentem dla wysokosprawnej chromatografii cieczowej. Mechanizmy odpowiedzialne za rozdzielenie w CE są inne od tych w chromatografii. Z tego powodu możliwe jest prowadzenie prac komplementarnych obydwoma technikami.

## II-2. Aparatura

Jak pokazano na *rys. II-1* zestaw do elektroforezy kapilarnej składa się z kapilary o wewnętrznej średnicy najczęściej 50-100  $\mu\text{m}$  wypełnionej elektrolitem, której końce są umieszczone w zbiornikach zawierających odpowiednie roztwory buforowe, najczęściej o składzie identycznym z roztworem znajdującym się wewnątrz kapilary (w niektórych metodach stosuje się bufor o różnym pH). Długość stosowanych kapilar wynosi od kilku do kilkudziesięciu centymetrów. Kapilara może być wypełniona tylko elektrolitem (elektroforeza swobodna) lub porowatym nośnikiem (elektroforeza na nośniku).

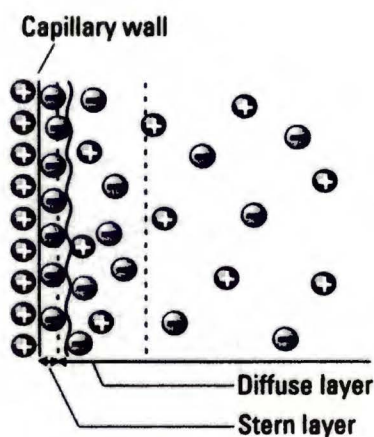
W zbiornikach znajdują się także elektrody połączone ze źródłem wysokiego napięcia, co skutkuje powstaniem wewnątrz gradientu pola elektrycznego. Próbka wprowadzana jest do kapilary najczęściej hydrodynamicznie. Jedną z najczęściej stosowanych metod detekcji jest absorpcja UV-VIS. Stosuje się również inne metody detekcji: fluorescencyjną [22], elektrochemiczną [23], spektrometrię masową [24]. Rozwinięte są również metody detekcji pośredniej [25, 26].



*Rysunek II-1. Schemat aparatury do elektroforezy kapilarnej [17].*

### **II-3. Przepływ elektroosmotyczny EOF (z ang. *electroosmotic flow*)**

Podstawowym zjawiskiem związanym z elektroforezą kapilarną jest elektroosmoza, czyli przepływ elektrolitu w kapilarze powstający w wyniku przyłożonego do elektrod napięcia. Przepływ elektroosmotyczny jest związany z tworzeniem się na ściankach kapilary podwójnej warstwy elektrycznej.



*Rys.II-2. Podwójna warstwa elektryczna na powierzchni ścianek kapilary [17].*

Ujemnie naładowana i nieruchoma warstwa powierzchni kapilary oraz warstwa dyfuzyjna złożona z ruchliwych kationów przedstawione są na *rys. II-2*.

Powstawanie podwójnej warstwy elektrycznej na powierzchni ciał stałych w roztworach wodnych jest spowodowane nadmiarem ładunku ujemnego na ich powierzchni. Jest to wynikiem jonizowania powierzchni na zasadzie równowag kwasowo-zasadowych, jak również przebiegu procesów adsorpcji jonowych składników roztworu na ich powierzchni. W przypadku powierzchni krzemionkowej, liczne grupy krzemianowe (SiOH), które przy wysokich wartościach pH występują w formie anionowej (SiO<sup>-</sup>), mają decydujący wpływ na powstawanie EOF. Przyjmuje się, że EOF



jest znaczący już przy  $pH > 4$ . Materiały o budowie niejonowej, takie jak teflon, mają natomiast zdolność adsorpcji jonów, co również prowadzi do tworzenia EOF.

Kationy (w większości przypadków), które równoważą ładunek ujemny ścianek kapilary, tworzą blisko powierzchni kapilary warstwę podwójną, co prowadzi do wytworzenia bardzo blisko ściany różnicy potencjałów. Potencjał ten nazywany jest potencjałem dzeta ( $\zeta$ ) i wyrażany równaniem Helmholtza:

$$\zeta = \frac{4\pi\eta\mu^{EOF}}{\varepsilon}, \quad (II-1)$$

gdzie:

$\eta$  - lepkość elektrolitu,

$\varepsilon$  - stała dielektryczna elektrolitu,

$\mu^{EOF}$  - współczynnik przepływu elektroosmotycznego.

W wyniku działania pola elektrycznego ( $E$ ), ruchliwe kationy w warstwie dyfuzyjnej poruszają się w kierunku katody powodując ruch solwatujących je cząsteczek rozpuszczalnika w tym samym kierunku. Prędkość liniowa ( $v$ ) powstałego w ten sposób EOF-u dana jest równaniem:

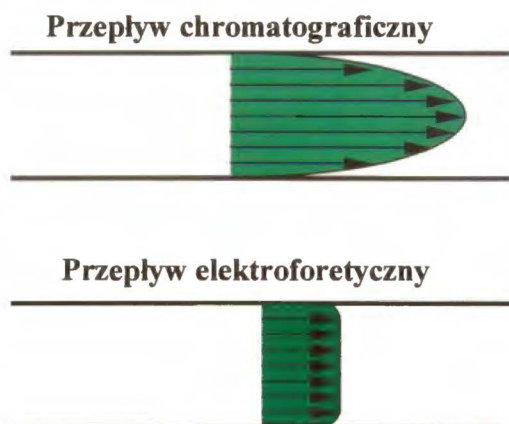
$$v = \frac{\varepsilon E \zeta}{4\pi\eta}, \quad (II-2)$$

gdzie:

$E$  – napięcie pola elektrycznego,

Podwójna warstwa elektryczna jest bardzo cienka (kilkaset nanometrów) w porównaniu do średnicy typowych kapilar (25-100  $\mu m$ ). Konsekwencją tego jest płaski profil przepływu, który nie powoduje bezpośrednio dyspersji związków i poszerzenia pików, co jest typowym zjawiskiem dla przepływów laminarnych, np. w chromatografii (rys. II-3). Przepływ elektroosmotyczny wpływa jednakże na czas potrzebny związkom do migracji przez kapilarę i w ten sposób może wpływać zarówno na sprawność jak i rozdzielanie w sposób pośredni poprzez dyfuzję wzdłużną [27].





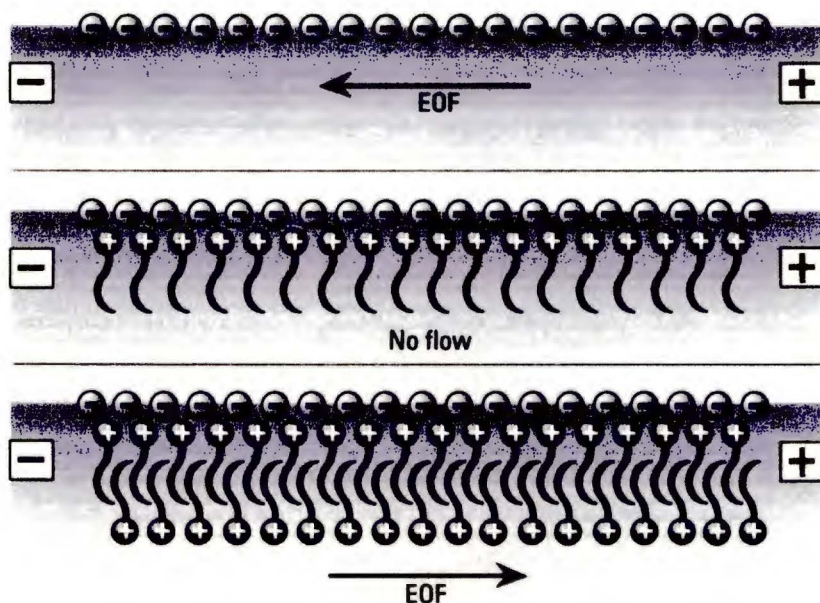
Rys. II-3. Porównanie profilu przepływu w chromatografii i elektroforezie.

Potencjał dzeta ( $\zeta$ ) określony jest przez ładunek na powierzchni kapilary i dlatego silnie zależy od pH elektrolitu. Wielkość EOF zmienia się ze zmianą pH w ten sposób, że przy wysokich wartościach pH, gdy grupy krzemianowe są w większości zdeprotonowane, EOF jest znacznie większy niż dla niskich pH, gdy grupy krzemianowe ulegają protonowaniu. Potencjał dzeta ( $\zeta$ ) jest również silnie zależny od siły jonowej roztworu buforowego. Zwiększanie siły jonowej powoduje zmniejszenie grubości warstwy podwójnej, przez co następuje zmniejszenie potencjału dzeta ( $\zeta$ ), a więc i redukcja EOF [28].

Równanie (II-2) wskazuje na parametry, od których zależy EOF. Znając je można kontrolować wielkość EOF. Na przykład, przy wysokich wartościach pH, EOF może okazać się zbyt duży, przez co związki migrują przez kapilarę zbyt szybko, aby doszło do ich rozdzielania. Odwrotnie, przy niskim lub pośrednim pH, ujemnie naładowane ścianki kapilary, mogą spowodować adsorpcję analizowanych kationów w wyniku oddziaływań kulombowskich. Z takim zjawiskiem mamy do czynienia np. w przypadku rozdzielania białek zasadowych. Niektóre techniki elektroforetyczne często wymagają redukcji EOF (np. elektroforeza żelowa).

Zmiany wielkości EOF można dokonać kilkoma sposobami. Najbardziej powszechną metodą jest zmiana potencjału ( $\zeta$ ) na powierzchni kapilary, bądź lepkości roztworu buforowego. Z praktycznego punktu widzenia, najbardziej znaczące zmiany w wartości EOF, powoduje zmiana pH roztworu buforowego, co wpływa również na ładunek i ruchliwość substancji rozpuszczonej. Zwiększenie stężenia roztworu

buforowego może być korzystne dla ograniczenia oddziaływań kulombowskich substancji rozpuszczonej ze ścianami kapilary poprzez zmniejszenie efektywnego ładunku na ścianie [29].



Rys. II-4. Eliminacja i odwracanie EOF za pomocą kationowego surfaktantu w elektroforezie [17].

Zmniejszenie EOF można uzyskać zmniejszając pole elektryczne, co może mieć wpływ na pogorszenie sprawności układu i wydłużenie czasu analizy. Możliwe są również zmiany przepływu elektroosmotycznego przez wprowadzenie do buforu dodatków. Dodając kationowe surfaktanty (np. bromek cetylotrimetyloamonowy), w układzie, w wyniku ich adsorpcji na ściankach kapilary w zależności od stężenia dodanej soli EOF ulega zmniejszeniu, a nawet może zostać odwrócony kierunek jego przepływu (rys. II-4) [30,31]. Dodatek rozpuszczalnika organicznego w znacznym stopniu zmniejsza EOF [32].

Innym sposobem regulowania wielkości przepływu elektroosmotycznego jest modyfikacja ściany kapilary poprzez substancje związane z nią kowalencyjnie [33].

#### **II-4. Ruchliwość elektroforetyczna związków**

Elektroforetyczne rozdzielanie związków bazuje na różnicach w ich prędkości poruszania się w polu elektrycznym. W warunkach, kiedy elektroosmoza nie występuje, prędkość poruszania się związku można wyrazić wzorem [34, 35]:

$$v = \mu^{eff} E = \frac{\mu^{eff} V}{L} \quad (II-3)$$

gdzie:

$\mu^{eff}$  – ruchliwość elektroforetyczna związku,

E- gradient pola elektrycznego (V/L),

V – napięcie przyłożone do kapilary,

L – długość kapilary.

Czas, jaki potrzebuje związek na pokonanie kapilary z jednego końca na drugi nazywany jest czasem migracji  $t_m$  i wyrażany równaniem:

$$t_m = \frac{L}{v} = \frac{L^2}{\mu^{eff} V} \quad (II-4)$$

Czas migracji oraz inne parametry wyznaczone eksperymentalnie pozwalają obliczyć ruchliwość elektroforetyczną związku wg równania:

$$\mu^{eff} = \frac{L_D L_t}{V} \left( \frac{1}{t_m} \right) \quad (II-5)$$

gdzie:

$L_t$  – całkowita długość kapilary,



$L_D$  – długość kapilary do okna detektora.

Ruchliwość elektroforetyczna związku jest w danym elektrolicie wartością dla tego związku charakterystyczną.

W przypadku obecności przepływu elektroosmotycznego mierzona ruchliwość związku nazywana jest ruchliwością wypadkową lub pozorną wyrażona jest wzorem:

$$\mu^{obs} = \mu^{eff} + \mu^{EOF} \quad (II-6)$$

gdzie:

$\mu^{eff}$  – elektroforetyczna ruchliwość związku,

$\mu^{obs}$  – pozorna elektroforetyczna ruchliwość związku,

$\mu^{EOF}$  – ruchliwość obojętnego markera.

Efektywna ruchliwość elektroforetyczna  $\mu^{eff}$  może być wyznaczona z ruchliwości pozornej przez niezależny pomiar EOF przy użyciu obojętnego markera (DMSO, DMF, aceton), poruszającego się z prędkością równą prędkości przepływu elektroosmotycznego wg równania:

$$\mu^{eff} = \mu^{obs} - \mu^{EOF} = \frac{L_D L_t}{V} \left( \frac{1}{t_m} - \frac{1}{t_{EOF}} \right) \quad (II-7)$$

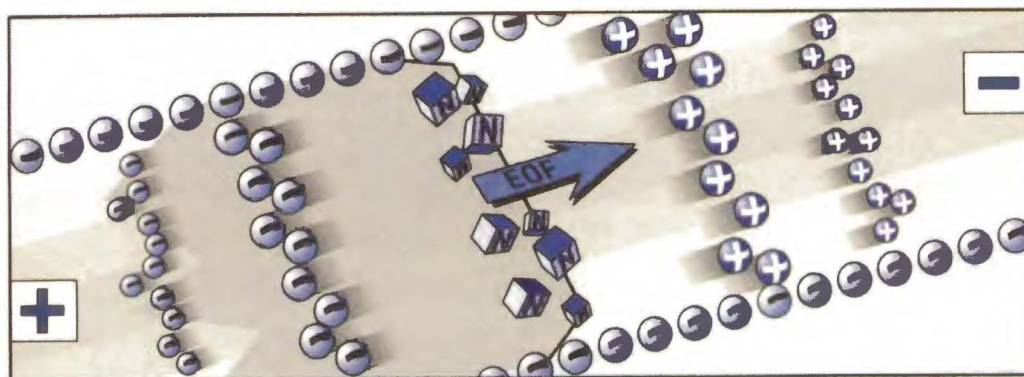
gdzie:

$t_{EOF}$  – czas migracji obojętnego markera.

Z powyższych równań wynika, że wszystkie jony będą poruszać się w tym samym kierunku, jeśli wielkość przepływu elektroosmotycznego będzie większa i skierowana w kierunku przeciwnym niż ruchliwość elektroforetyczna anionów obecnych w roztworze. Ponadto, składniki obojętne będą poruszać się razem z EOF. W normalnych warunkach, kiedy powierzchnia kapilary naładowana jest ujemnie, przepływ odbywa się w kierunku od anody do katody. Kationy poruszają się najszybciej, ze względu na ich elektroforetyczne przyciąganie w kierunku katody, zgodnie z EOF.



Cząsteczki obojętne przemieszczają się z prędkością EOF, ale nie są rozdzielane. Aniony migrują najwolniej ze względu na ich elektrokinetykę w kierunku anody, mimo tego EOF powoduje ich przemieszczanie w kierunku katody (rys. II-5).



Rys. II-5. Kolejność migracji związków w elektroforezie [17].

## II-5. Rodzaje elektroforezy kapilarnej

Używając standardowego instrumentu do elektroforezy kapilarnej można wykonywać analizy w kilku różnych rodzajach tej techniki [21, 36]. Wynika to z tego, że technika ta powstała z połączenia różnych metod elektroforetycznych i chromatograficznych. Zasadnicze rodzaje CE to:

1. **Strefowa elektroforeza kapilarna** (ang. Capillary Zone Electrophoresis: CZE), jest najczęściej stosowanym trybem pracy w tej technice analitycznej. Wykorzystywana jest szeroko w analizie aminokwasów i peptydów [37, 38], jonów nieorganicznych [39], rozdzielania enancjomerów [40], oraz licznych składników jonowych. Elektrolit nośny może zawierać dodatkowo substancje, posiadające własną ruchliwość elektroforetyczną, które pozwalają rozdzielać także związki obojętne.

Rozdzielanie opiera się głównie na różnicach ruchliwości elektroforetycznych, które powodują różną szybkość migracji związków przez kapilarę. Mechanizm rozdzielania jonowych związków bazuje na różnicach w stosunku ładunku do masy rozdzielanych składników przy danym pH. Najczęściej stosowane kapilary to kapilary szklane. Coraz częściej stosuje się również kapilary powlekane lub modyfikowane chemicznie w celu wyeliminowania EOF lub odwrócenia jego kierunku.

2. **Izotachoforeza (CITP)** – ten rodzaj elektroforezy charakteryzuje się tym, że próbka jest wprowadzana między dwa różne bufony. Makrojon separowanej próbki migrują w obszarze pomiędzy dwoma systemami elektrolitów o różnej wartości pH i różnej ruchliwości jonów elektrolitu. Elektrolit wiodący (*ang. leading electrolyte*) zawiera jony o dużej ruchliwości elektroforetycznej, znacznie przewyższającej ruchliwość makrojonów. Z kolei elektrolit zamykający (*ang. tailing electrolyte*) zawiera jony o bardzo niskiej ruchliwości elektroforetycznej, zwykle znacznie niższej od ruchliwości makrojonów. W obszarze pomiędzy tymi dwoma elektrolitami znajdują się separowane makrojon. Wszystkie jony - wiodące, zamykające oraz makrojon - migrują w tym obszarze w ściśle określonym porządku. Najpierw przemieszczają się jony wiodące, a za nimi najszybsze makrojon. Potem kolejno makrojon zgodnie z ich malejącą ruchliwością i w końcu jony zamykające. Wynikiem tego rodzaju elektroforezy jest uporządkowanie makrojonów zgodnie z ich malejącą ruchliwością elektroforetyczną, przy czym separacja ta zachodzi w bardzo małym obszarze będącym granicą dwóch systemów elektrolitów.

3. **Izoelektryczne ogniskowanie (CIEF)** – technika używana do rozdzielania peptydów i protein na podstawie różnych wartości punktu izoelektrycznego pI. Amfoteryczne substancje (białka, peptydy) migrują w polu elektrycznym w kierunku elektrod o znaku przeciwnym ich ładunkowi. Napotykając po drodze zmieniające się wartości pH elektrolitu zatrzymują się w miejscu, w którym  $pH=pI$ . W tym punkcie ładunek makrocząsteczek równy jest zeru a cała cząsteczka jest elektrycznie obojętna. W ten sposób uzyskuje się separację cząsteczek amfoterycznych zgodnie z ich wartościami pI [41].

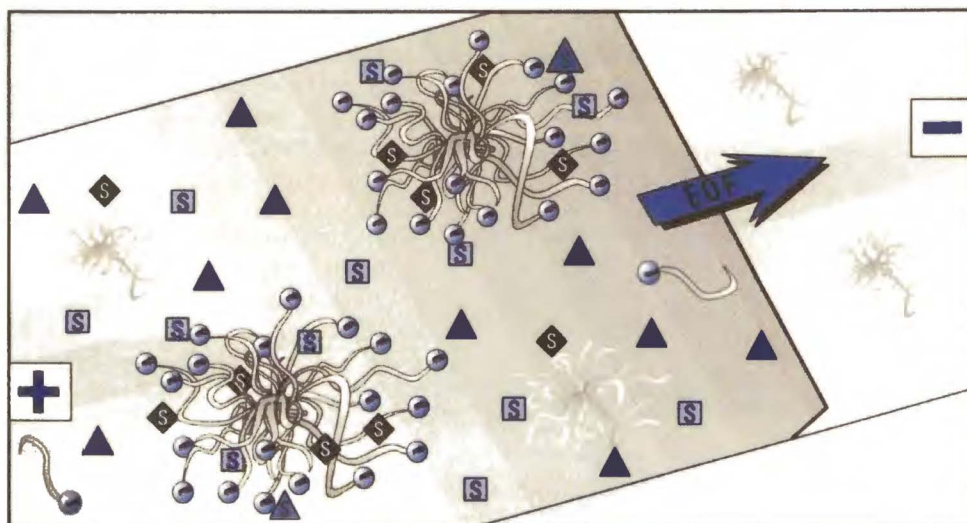


Gradient pH w kapilarze otrzymuje się stosując cząsteczki obojnacze posiadające w swojej budowie grupy kwaśne i zasadowe, tzw. amfolity.

Izoelektryczne ogniskowanie (CIEF) oraz izotachoforeza są znacznie rzadziej wykorzystywanymi technikami niż strefowa CZE, w szczególności do rozróżnienia chiralnego, gdzie ich zastosowanie jest marginalne.

4. **Micelarna elektrokinetyczna chromatografia** (ang. Micellar Electrokinetic Chromatography, MEKC lub MECC), została wprowadzona przez Terabe w roku 1984 [42]. W MEKC główny mechanizm rozdzielania polega na podziale związku pomiędzy roztwór a micela. Jej zaletą jest możliwość analizowania zarówno obojętnych, jak i jonowych substancji. Separacja obojętnych cząsteczek zostaje osiągnięta poprzez zastosowanie w buforze nośnym jonowych surfaktantów.

Micela tworzą się w roztworze, kiedy stężenie dodanego surfaktantu przekroczy wartość krytycznego stężenia micelnego (cmc). Najczęściej używanym surfaktantem jest siarczan dodecyłu sodu SDS (cmc=8-9 mM/dm<sup>3</sup>). Micela stanowią agregaty cząsteczek surfaktantu o czasie życia mniejszym niż 10 μs. Ich hydrofobowe ogony zwrócone są do wewnątrz tak, aby uniknąć oddziaływań z hydrofilowym buforem, natomiast jonowe głowy zorientowane są na zewnątrz. Cząsteczki surfaktantów, a więc i micela są zwykle w postaci jonowej, migrują zatem, w zależności od ich ładunku, z EOF, bądź też w kierunku przeciwnym. Surfaktanty anionowe, takie jak SDS, poruszają się w kierunku anody, czyli przeciwnie do EOF. W przypadku obojętnego lub zasadowego pH, EOF jest silniejszy niż prędkość poruszania się miceli, w efekcie czego przesuwane są one zgodnie z kierunkiem EOF. Podczas poruszania się micela mogą oddziaływać z cząsteczkami substancji rozpuszczonej, podobnie jak w przypadku rozdziału chromatograficznego, zarówno w wyniku hydrofobowych, jak i elektrostatycznych oddziaływań, dlatego micela często nazywane są fazą pseudostacjonarną. Im silniej substancja rozpuszczona oddziałuje z micelą, tym dłuższy jest jej czas migracji, wskutek tego, że micela transportuje ją w kierunku przeciwnym do EOF. Bardziej hydrofobowe substancje silniej oddziałują z micelami, przez co są „zatrzymywane” dłużej. Rozdzielanie związków w MEKC ilustruje rys. II-6.



Rys. II-6. Rozdzielanie związków w micelarnej elektrokinetycznej chromatografii [17].

Używane są różne surfaktanty: anionowe, kationowe lub niejonowe. Surfaktanty mogą ulegać adsorpcji na ścianie kapilary, wpływając na wartość EOF, ograniczając jednocześnie adsorpcję substancji rozpuszczonej.

Zastosowanie różnych surfaktantów, jak również organicznych dodatków do buforu może prowadzić do znaczących zmian w selektywności rozdzielania. Użycie surfaktantów często poprawia kształt pików, a także istotny jest ich wpływ na czasy migracji związków. Micele mogą również być stosowane z innymi czynnikami a przez to wpływać na ruchliwość analizowanych związków i ich rozdzielanie [43]. Zastosowanie surfaktantów chiralnych, zarówno pochodzenia naturalnego (kwasy cholowe) jak i syntetycznych do rozróżnienia chiralnego zostanie przedstawione w dalszej części.

##### 5. *Elektroforeza żelowa* (ang. capillary gel electrophoresis CGE)

Mechanizm rozdzielania w CGE oparty jest na różnicach w rozmiarach cząstek migrujących przez pory żelu będącego wypełnieniem kapilary.



Elektroforeza żelowa używana jest głównie w naukach biologicznych dla rozdzielania makrocząsteczek takich jak proteiny czy kwasy nukleinowe. Rozdzielenie uzyskuje się stosując jako wypełnienie odpowiedni polimer, który działa jako sito molekularne. Kiedy jonowe cząsteczki wędrują przez sieć polimeru zostają zatrzymywane, przy czym te o większym rozmiarze bardziej niż te mniejsze. Takie cząsteczki jak DNA nie mogą być rozdzielone bez żelu, ponieważ stosunek ich ładunku do masy jest ciągle stały niezależnie od rozmiaru cząsteczki.

Elektroforezę żelową można wykorzystywać do rozdzielania zarówno małych jak i dużych cząsteczek [44]. Zostały również wykonane badania ze zbieraniem poszczególnych frakcji celem ich oczyszczenia w skali mikropreparatywnej [45]. Zastosowanie GCE pozwala na zminimalizowanie dyfuzji związków, powodującej poszerzenie pików. Pozwala też ograniczyć adsorpcję związków na ściankach kapilary i zmniejszyć elektroosmozę. Osiąga się dzięki temu wysoką sprawność rozdzielania aż do 30mln póltek /metr [46].

#### **6. Elektrochromatografia kapilarna (ang. Capillary Electrochromatography)**

W elektrochromatografii kolumna jest wypełniona złożem chromatograficznym, które może zatrzymywać związki analogicznie jak ma to miejsce w chromatografii. Bufor jest w kontakcie ze ściankami kapilary, ale również z cząsteczkami wypełnienia. W wyniku tego pojawia się elektroosmoza, podobnie jak w CZE. Przepływ w upakowanych złożach jest mniej płaski niż w otwartych kapilarach z powodu różnych prędkości przepływu w poszczególnych przekrojach kapilary. Pomimo tego sprawność takich kolumn jest większa niż w tradycyjnej chromatografii.

### **II-6. Zastosowanie elektroforezy kapilarnej do rozdzielania enancjomerów**

Metody elektroforetyczne służą do rozdzielania związków obdarzonych ładunkiem (cząsteczek, stabilnych lub chwilowych kompleksów, asocjatów, agregatów) w polu elektrycznym, jeśli różnią się one prędkościami migracji, które z kolei zależą od ich

rozmiaru i kształtu (w formie solwatowanej cząsteczki) i / lub ich ładunku. Enancjomery nie różnicują się w ten sposób; rozdzielanie chiralne metodą elektroforezy wymaga utworzenia diastereoizomeru. Diastereoizomery mogą być związkami diastereoizomerycznymi, utworzonymi przez reakcje chemiczną pomiędzy cząsteczkami enancjomerów i optycznie czynnym reagentem derywatyzyjnym przed rozdzielaniem elektroforetycznym lub diastereoizomerycznym kompleksem tworzonym dynamicznie w trakcie elektroforezy, pomiędzy cząsteczkami enancjomerów a homochiralnym selektorem obecnym w elektrolicie podstawowym. Separacja polegająca na tworzeniu związków diastereoizomerycznych nazywana jest *metodą pośrednią*, natomiast kiedy tworzony jest odwracalny diastereoizomeryczny kompleks mówimy o *metodzie bezpośredniej* [47].

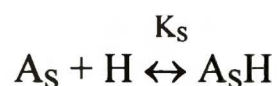
Z teoretycznego punktu widzenia podejście pośrednie jest w istocie rzeczą elektroforetycznym rozdzielaniem dwóch związków różniących się mniej lub bardziej ruchliwościami. Metodą do zwiększania tych różnic i poprawiania rozdzielania jest wprowadzenie dodatkowej równowagi z pseudofazą. Taką drugorzędową równowagą może być podział pomiędzy buforem a micelami [48] albo równowagowa adsorpcja na rozpuszczonym liniowym polimerze, z którym cząsteczki oddziałują [49].

Bezpośrednie rozdzielanie enancjomerów metodami elektroforetycznymi wykorzystujące dynamiczne równowagi może być znacznie elastyczniej optymalizowane. W metodzie bezpośredniej różne efektywne szybkości migracji enancjomerów w CZE oraz ITP wynikają zasadniczo z dwóch niezależnych, stereoselektywnych zjawisk:

- z różnic w sile oddziaływania pomiędzy enancjomerami i dodanym selektorem chiralnym (np. różne wartości stałych trwałości kompleksów),
- z różnic elektroforetycznych ruchliwości diastereoizomerycznych kompleksów w odniesieniu do ich różnych kształtów lub/i wartości  $pK_a$ .

### **II-6.1. Stałe trwałości tworzenia diastereoizomerycznych kompleksów**

Podstawą do chiralnego rozróżnienia metodą bezpośrednią jest różnica pomiędzy międzycząsteczkowymi oddziaływaniami enancjomerów  $A_R$  i  $A_S$  a cząsteczkami selektora  $H$ , który jest enancjomerycznie czysty lub przynajmniej enancjomerycznie wzbogacony. Te oddziaływania są powodem powstawania następujących równowag, wyrażonych stałymi trwałości  $K_R$  oraz  $K_S$ . Zakładając stechiometrię 1:1 możemy napisać:



Indeks R i S oznacza poszczególne enancjomery.

$$K_R = \frac{[A_RH]}{[A_R][H]} \quad (II-9)$$

$$K_S = \frac{[A_SH]}{[A_S][H]}$$

gdzie  $[A_R]$ ,  $[A_S]$ ,  $[H]$  oznaczają stężenia wolnych enancjomerów oraz selektora w stanie równowagi. Stałe trwałości  $K_R$  oraz  $K_S$  są związane z energią swobodną Gibbsa reakcji kompleksowania,  $\Delta G_R$  i  $\Delta G_S$  zgodnie z równaniem:

$$\Delta G_R = -RT \ln K_R \quad (II-10)$$

$$\Delta G_S = -RT \ln K_S$$



W każdym przypadku, gdzie  $\Delta G_R$  nie jest równe  $\Delta G_S$ , z powodu efektów entalpowych lub entropowych (w większości przypadków obydwu razem) stałe trwałości tworzenia diastereoizomerycznych kompleksów będą różne. Stosunek tych dwóch stałych trwałości może być zdefiniowany jako termodynamiczna selektywność układu [50, 51]:

$$\alpha_{RS} = K_R/K_S \quad (II-11)$$

Zależność stałej trwałości od temperatury może być wyrażona przez prostą formę równania Van't Hoffa (gdy nie ma zmian  $\Delta H$ ,  $\Delta S$  z temperaturą oraz nie występują zmiany w mechanizmie wiązania lub drugorzędowe równowagi związane ze zmianą temperatury) [52].

$$\ln K_R = -\Delta H_R/RT + \Delta S_R/R \quad (II-12)$$

$$\ln K_S = -\Delta H_S/RT + \Delta S_S/R$$

$\Delta H$ ,  $\Delta S$  – entalpia i entropia kompleksowania.

Wpływ temperatury na termodynamiczną selektywność wyraża się wzorem (II-13):

$$\ln(K_R/K_S) = -(\Delta\Delta^{RS}H/RT) + (\Delta\Delta^{RS}S/R) \quad (II-13)$$

gdzie  $\Delta\Delta^{RS}H$  i  $\Delta\Delta^{RS}S$  są różnicami entalpii i entropii kompleksowania pomiędzy enancjomerami definiowanymi w następujący sposób:

$$\Delta\Delta^{RS}H = \Delta H_R - \Delta H_S \quad (II-14)$$

oraz

$$\Delta\Delta^{RS}S = \Delta S_R - \Delta S_S \quad (II-15)$$

## II-6.2. Wyznaczanie stałych trwałości

Pozorne stałe trwałości tworzenia kompleksów mogą być wyznaczone różnymi technikami. W większości technik bada się zmiany, jakie występują w wyniku zwiększania stężenia ligandu. Odpowiedź systemu może być odniesiona do względnego stosunku stężenia związku, który został skompleksowany, do wolnego związku i dalej do stałej trwałości. Odpowiedź systemu musi być różna dla wolnego i skompleksowanego związku. W przypadku elektroforezy muszą wystąpić różnice ruchliwości elektroforetycznych dla obu form.

Efektywna ruchliwość związku jest wypadkową ruchliwości wszystkich form, w których on występuje [47]:

$$\mu_R^{eff} = \sum_n \mu_R^n \varphi_R^n \quad (II-16)$$

gdzie  $n$  oznacza różne formy danego związku,  $\varphi_R^n$  jest ilością poszczególnej formy (ułamek molowy) enancjomeru R a  $\mu_R^n$  to ruchliwość elektroforetyczna danej formy.

Rozważając przypadek, gdy związek istnieje tylko w dwóch formach, np. w postaci nieskompleksowanej oraz skompleksowanej z selektorem równanie (II-16) upraszcza się do postaci:

$$\mu_R^{eff} = \mu_R^{free} (1 - \beta_R) + \mu_R^{comp} \beta_R \quad (II-17)$$

$$\mu_S^{eff} = \mu_S^{free} (1 - \beta_S) + \mu_S^{comp} \beta_S$$

gdzie :

$\mu^{free}$  – ruchliwość związku w formie nieskompleksowanej,

$\mu^{comp}$  – ruchliwość kompleksu,

$\beta$  - stopień kompleksowania, zależny od stałych trwałości  $K_R$  i  $K_S$  oraz stężenia selektora [H].

Dla procesu kompleksowania:



$\beta$  można wyrazić wzorami:

$$\beta_R = \frac{[A_R H]}{[A_R] + [A_R H]} \quad \beta_S = \frac{[A_S H]}{[A_S] + [A_S H]} \quad (II-18)$$

Ponieważ stałe trwałości

$$K_R = \frac{[A_R H]}{[A_R][H]} \quad \rightleftharpoons \quad [A_R H] = K_R [A_R][H] \quad (II-19)$$

$$K_S = \frac{[A_S H]}{[A_S][H]} \quad \rightleftharpoons \quad [A_S H] = K_S [A_S][H]$$

Podstawiając wzór (II-19) do równania (II-18) otrzymujemy:

$$\beta_R = \frac{[H]K_R}{1 + [H]K_R} \quad \beta_S = \frac{[H]K_S}{1 + [H]K_S} \quad (II-20)$$

Podstawiając równanie (II-20) do równania (II-17) otrzymujemy korelację pomiędzy ruchliwością elektroforetyczną a stałą trwałości i ruchliwością elektroforetyczną kompleksu:

$$\mu_R^{eff} = \frac{(\mu_R^{free} + \mu_R^{comp} K_R [H])}{1 + K_R [H]} \quad (II-21)$$

$$\mu_S^{eff} = \frac{(\mu_S^{free} + \mu_S^{comp} K_S [H])}{1 + K_S [H]}$$

Z efektywnych ruchliwości  $\mu^{eff}$  wyznaczonych eksperymentalnie można wyznaczyć stałe trwałości  $K$  oraz ruchliwości kompleksów. Służą do tego celu nieliniowe metody dopasowania danych eksperymentalnych (fitting) oraz metody linearyzacji równania (II-21) [53, 54, 55, 56].



### II-6.3. Selektywność układu $\alpha$ oraz współczynnik rozdzielania pików $R_S$

Podstawowymi parametrami opisującymi zdolność układu elektroforetycznego do rozdzielania enancjomerów jest selektywność  $\alpha$  oraz współczynnik rozdzielania pików  $R_S$ .

Efektywna selektywność, definiowana jest jako iloraz efektywnych ruchliwości poszczególnych enancjomerów i wyraża się równaniem:

$$\alpha_{RS}^{eff} = \frac{\mu_R^{eff}}{\mu_S^{eff}} = \frac{(\mu^{free} + \mu_R^{comp} K_R[H])(1 + K_R[H])}{(\mu^{free} + \mu_S^{comp} K_S[H])(1 + K_S[H])} \quad (II-22)$$

przy założeniu, że  $\mu_R^{free} = \mu_S^{free} = \mu^{free}$

Jak wynika z tego równania na rozdzielanie chiralne wpływ mają dwa podstawowe czynniki: różnice kompleksowania poszczególnych enancjomerów (wyrażona przez różnicę w stałych trwałości  $K$ ) oraz różnice ruchliwości ich kompleksów. Te dwa czynniki mogą się sumować lub też przeciwdziałać sobie. W większości stosowanych warunków w CE rozdzielanie spowodowane kompleksowaniem przeważa nad rozdzielaniem wynikającym z różnic ruchliwości kompleksów [57].

Współczynnik rozdzielania  $R_S$  wyraża wzór:

$$R_S = \frac{2(t_2 - t_1)}{w_2 - w_1} \quad (II-23)$$

gdzie:

$t_1, t_2$ - czasy migracji,  $w_1, w_2$ -szerokości pików przy podstawie.

$R_S$  można powiązać z selektywnością następującym wyrażeniem:

$$R_S = \frac{1}{4}(N)^{1/2}(\alpha^*_{RS} - 1) \quad (II-24)$$

gdzie  $N$  oznacza liczbę pól teoretycznych kapilary, natomiast

$$\alpha_{RS}^* = \frac{\mu_R^{eff} + \mu^{EOF}}{\mu_S^{eff} + \mu^{EOF}} \quad (II-25)$$

We współczynniku rozdzielania pików  $R_S$  uwzględniona jest selektywność układu wynikająca z kompleksowania, a także sprawność układu (N) wynikająca z kinetyki procesu.

#### **II-6.4. Wpływ stężenia selektora na selektywność**

Stężenie selektora, dla którego otrzymuje się maksymalną selektywność, nazywane jest optymalnym stężeniem selektora  $[H]^{opt}$ . Z danych literaturowych wynika, że im wyższe są stałe trwałości, tym niższe jest optymalne stężenie selektora.

Wpływ stałych trwałości K na optymalne stężenie selektora  $[H]^{opt}$  może być wyznaczony metodą analityczną. Jako pierwsi uzyskali to Wren i Rowe, otrzymując po wprowadzeniu uproszczeń proste równanie [58]:

$$[H]_{\Delta\mu}^{opt} = \frac{1}{\sqrt{K_R K_S}} \quad (II-26)$$

Analogicznie postąpił Kresmer [59], co zaowocowało wyrażeniem:

$$[H]_{\Delta\mu}^{opt} = \frac{1}{\sqrt{K_R K_S}} \sqrt{\frac{\mu^{free}}{\mu^{comp}}} \quad (II-27)$$

Wyrażenie Kresmera lepiej zgadza się z uzyskiwanymi wynikami doświadczalnymi.

## **II-6.5. Wpływ różnicy ruchliwości elektroforetycznych na selektywność**

Z równania (II-22) wynika, że różnice ruchliwości elektroforetycznych związków mają duży wpływ na otrzymywaną selektywność. Z jednej strony przyczyną rozdzielenia może być różnica pomiędzy ruchliwościami  $\mu_R^{\text{comp}}$  i  $\mu_S^{\text{comp}}$ . Różnica ta wywołana jest różnym kształtem cząsteczek diastereoizomerycznych kompleksów, a także zmianą  $pK_a$  cząsteczki w wyniku kompleksowania, co prowadzi do zmiany jej ładunku. Zmiany  $pK_a$  w trakcie kompleksowania mogą wpływać na enancjoselektywność, szczególnie w przypadku cząsteczek amfifilowych (np. aminokwasy), dla których zaobserwowano zmiany kolejności migracji, gdy analizy prowadzi się przy pH bliskim  $pK_a$  związku [60]. Jednakże w większości przypadków bardziej znacząca jest różnica mobilności kompleksu  $\mu_R^{\text{comp}}$  i jego nieskompleksowanej postaci  $\mu_R^{\text{free}}$  i oczywiście analogicznie dla drugiego enancjomeru [47].

W przypadku, w którym mobilności kompleksów  $\mu^{\text{comp}}$  oraz wolnego związku  $\mu^{\text{free}}$  mają ten sam znak, efektywna selektywność jest wynikiem różnic w stałych trwałości. Z taką sytuacją mamy do czynienia w przypadku obojętnego selektora i jonowego związku i vice-versa, jak również, gdy związek i selektor są obdarzone ładunkiem tego samego znaku. Natomiast w przypadku, gdy mobilność kompleksu  $\mu^{\text{comp}}$  oraz wolnego związku  $\mu^{\text{free}}$  są różnego znaku w pewnych warunkach można uzyskać bardzo wysokie wartości selektywności, znacznie przewyższające selektywność wynikającą z różnic stałych trwałości. Opisywane jest to modelem „charged resolving agent migration CHARM”, który opisuje przypadek, gdy związek porusza się w wyniku kompleksowania z ruchliwością o przeciwnym znaku do ruchliwości własnej. Aby uzyskać taką przeciwną migrację potrzebny jest silnie przeciwnie naładowany selektor [61].

Więcej informacji na temat wpływu różnicy ruchliwości elektroforetycznych  $\mu^{\text{free}}$  i  $\mu^{\text{comp}}$  na selektywność będzie podane w *rozd. VI*.



## ***II-6.6. Wpływ EOF na selektywność***

Rozważając wpływ EOF potwierdzono, że jego wielkość oraz kierunek znacząco wpływają na selektywność w CE [47]. EOF poruszający się w tym samym kierunku co analizowane związki, przesuwają optymalne stężenie selektora nieco w kierunku mniejszych wartości, zaś słaby przeciwnie migrujący EOF do wartości nieco większych. Silny przeciwnie skierowany przepływ EOF prowadzi do zmiany kolejności migracji oraz obniża maksimum stężenia selektora.

W przypadku, kiedy EOF posiada wartość pośrednią pomiędzy mobilnością kompleksu  $\mu^{\text{comp}}$  oraz wolnego związku  $\mu^{\text{free}}$ , obserwujemy wysoką enancjoselektywność. Zwiększanie enancjoselektywności przez odpowiedni dobór wielkości EOF można otrzymać również w przypadkach, w których tylko jeden czynnik jest jonowy [62].

Bardziej szczegółowo wpływ poszczególnych czynników na enancjoseparację zostanie przedstawiony w rozdziale VI.

## ***II-6.7. Różnice elektroforezy kapilarnej i chromatografii***

Najważniejsze różnice elektroforezy kapilarnej w porównaniu do technik chromatograficznych to:

1. CE pozwala na bardzo szybki przesiew (screening) oddziaływań związek-CD w celu odnalezienia najbardziej interesującej pary z ogromnej ilości chiralnych związków i CDs.
2. Wysoka sprawność CE pozwala obserwować (enancjo)selektywne efekty oddziaływań selektor-selektand, które nie są widoczne w innych technikach. Niewielka selektywność rozpoznawania może być przełożona na wysoki współczynnik rozdzielania w CE, co może mieć zastosowanie w analizie czystości enancjomerycznej, np. substancji farmaceutycznych.
3. CE jest bardziej elastyczna od innych technik chromatograficznych w odniesieniu do optymalizacji enancjoseparacji (mała ilość zużywanych rozpuszczalników)

i szybka możliwość ich wymiany, łatwa zmiana selektora chiralnego i warunków analizy)

## **Rozdział III**

### **Czynniki enancjoselektywne w CE**

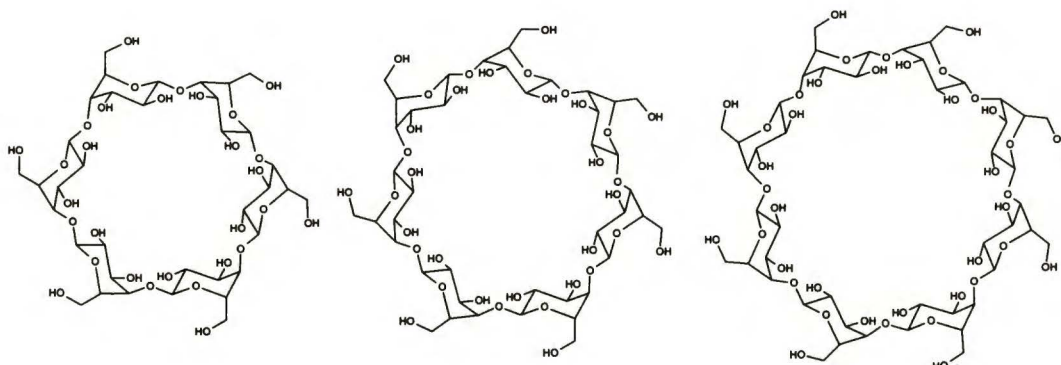
Lista czynników chiralnych wykorzystywanych w CE jest długa i obejmuje:

- ✓ Cyklodekstryny,
- ✓ Etery koronowe,
- ✓ Surfaktanty,
- ✓ Makrocykliczne antybiotyki,
- ✓ Proteiny,
- ✓ Oligo- i polisacharydy,
- ✓ Selektory oparte na wymianie jonowej oraz wymianie ligandu,
- ✓ Kaliksareny,

Ze względu na obszerność tematu, omówione zostaną jedynie najczęściej stosowane grupy selektorów.

#### **III-1. Cyklodekstryny**

Cyklodekstryny (CD) i tworzone przez nie kompleksy są szeroko wykorzystywane w różnych dziedzinach chemii supramolekularnej, a ich znaczenie wyraża ogromna ilość publikacji oraz liczne zastosowania praktyczne [63, 64, 65, 66, 67]. CD to cykliczne oligosacharydy zbudowane z pierścieni D-glukopiranozy, połączonych między sobą mostkami tlenowymi  $\alpha$ -(1,4). Otrzymuje się je poprzez enzymatyczną degradację skrobi. Największe znaczenie z CD mają te z 6, 7 i 8 pierścieniami glukopiranozowymi, oznaczone odpowiednio greckimi literami  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  (rys. III-1).



Rys. III-1. Struktura chemiczna kolejno  $\alpha$ -,  $\beta$ - i  $\gamma$ -CD.

Do niedawna uważano, że najmniejsza cyklodekstryna składa się z sześciu pierścieni glukopiranozy, a cyklodekstryny z mniejszą liczbą pierścieni nie tworzą się z powodów sterycznych [68], jak również ze względu na to, że helisa skrobiowa ma charakter sześciokrotny. Jednakże w 1994r. Nakagawa zsyntezował pięcioczłonową CD. Wyższe cyklodekstryny noszące nazwę  $\delta$ -  $\epsilon$ -  $\xi$ -CD zostały również wyodrębnione metodami chromatograficznymi. Są one otrzymywane w małych ilościach i nie mają znaczenia praktycznego, ze względu na wysoką cenę i stosunkowo mało poznane właściwości. Największa CD, której strukturę udało się wyznaczyć metodami rentgenowskimi jest zbudowana z 26 jednostek glukopiranozy, natomiast największa znaleziona cząsteczka ma takich grup ponad 100 [69].

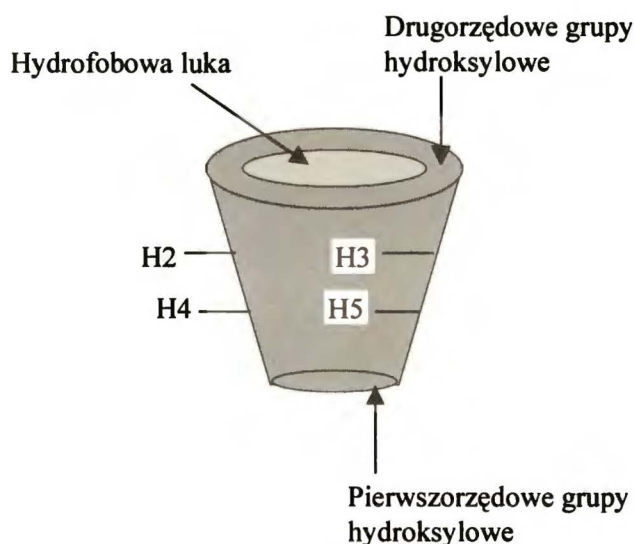
Opracowana została również metoda syntetycznego otrzymywania CDs [70]. Synteza składa się z 21 etapów a jej wydajności wynoszą 0,3% dla  $\alpha$ -CD oraz 0,02% dla  $\gamma$ -CD. Niektóre pochodne CD zostały również odkryte w przyrodzie [71].

### III-1.1. Budowa CD

Jednostki glukopiranozy mają klasyczną konformację krzesłkową C1. Budowa taka nadaje CD kształt ściętego stożka, z szerszą częścią otoczoną drugorzędowymi grupami hydroksylowymi i z częścią węższą otoczoną przez pierwszorzędowe grupy hydroksylowe. Liczba jednostek glukopiranozy decyduje o wielkości i kształcie wnętrza CD. Atomy wodoru i wolne pary elektronowe atomów tlenu wiązania glikozydowego



skierowane są do wnętrza luki, natomiast grupy hydroksylowe skierowane są na zewnątrz. W wyniku takiego ustawienia grup funkcyjnych wewnątrz CD jest względnie hydrofobowe w porównaniu do wody natomiast część zewnętrzna jest hydrofilowa, rys. III-2 [63].



Rys. III-2. Budowa cyklodekstryny.

Podstawowe właściwości  $\alpha$ - $\beta$  i  $\gamma$ -cyklodekstryny zostały zebrane w tabeli III-1 [72].

Tabela III-1. Wybrane właściwości  $\alpha$ - $\beta$  i  $\gamma$ -cyklodekstryny.

	$\alpha$ -CD	$\beta$ -CD	$\gamma$ -CD
Liczba pierścieni glukopiranozy	6	7	8
Masa molowa	972,86	1135,01	1297,15
Średnica luki [nm]	0,47-0,52	0,60-0,64	0,75-0,83
Średnica zewnętrzna [nm]	1,46±0,04	1,54±0,04	1,75±0,04
Wysokość stożka [nm]	0,79-0,8	0,79-0,8	0,79-0,8
Objętość luki [nm <sup>3</sup> ]	0,176	0,346	0,510
pK <sub>a</sub> grup hydroksylowych	12,1-12,6	12,1-12,6	12,1-12,6

Rozpuszczalność w wodzie g/100ml w temperaturze 25 °C	14,5	1,85	23,2
Skręcalność $[\alpha]_D^{25}$	+150±0,5	+162,5±0,5	+177,4±0,5
Liczba zainkludowanych cząsteczek wody (w roztworze)	6	11	17
Temperatura topnienia i rozkładu [K]	551	572	540

### **III-1.2. Pochodne obojętnych cyklodekstryn**

Cyklodekstryny są chemicznie stabilne, ale mogą być modyfikowane, w szczególności w miejscach licznych grup hydroksylowych: 18 ma  $\alpha$ -CD, 21  $\beta$ -CD i 24  $\gamma$ -CD. Modyfikacja poprzez całkowite lub selektywne podstawienie prowadzi do powstania związków o innych właściwościach. Pochodne cyklodekstryn mogą wykazywać inną:

- rozpuszczalność,
- temperaturę topnienia,
- zdolność tworzenia kompleksów inkluzyjnych [73].

Cyklodekstryny mogą ulegać różnym reakcjom obejmującym rozszczepienie wiązania OH, CO, CH lub CC. Ale przygotowanie CD o kilkunastu podstawnikach w ściśle określonej pozycji jest często bardzo trudne i wymaga oczyszczania chromatograficznego. Z drugiej strony całkowite podstawienie grupami metylowymi lub etylowymi nie sprawia trudności i takie pochodne CD są łatwo dostępne [63].

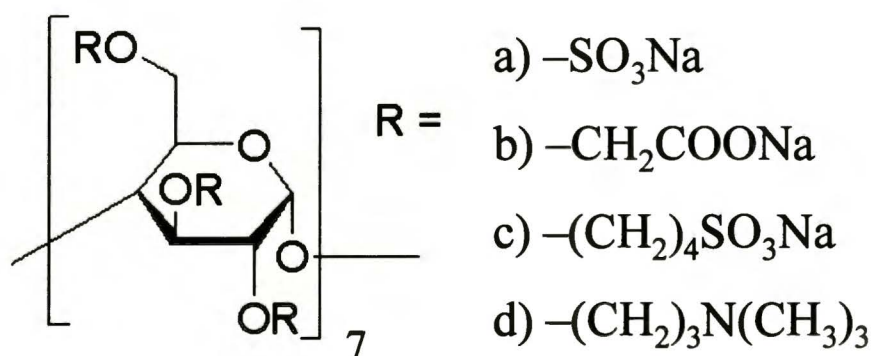
Poszczególne grupy hydroksylowe różnią się reaktywnością w zależności od środowiska i temperatury reakcji. W reakcjach substytucji tych grup uzyskuje się najczęściej mieszaniny cyklodekstryn różnie podstawionych [74]. To może powodować problemy z powtarzalnością wyników dla różnych partii produkcyjnych. Z tego powodu w ostatnim czasie zwrócono się w kierunku syntezy dobrze zdefiniowanych

pojedynczych izomerów pochodnych CD, np. heptakis(6-sulfato)- $\beta$ -CD [75, 76]. Stosowanie pojedynczych izomerów jest szczególnie istotne w przypadku badania mechanizmów rozpoznawania molekularnego. Jednakże, w praktyce ze względu na cenę i dostępność wykorzystuje się często mieszaniny CD. Takim przykładem jest ostatnio zsyntezowana wysoce podstawiona siarczanowana  $\beta$ -CD (highly-sulfated- $\beta$ -CD). Jak zostało pokazane przez kilku autorów może być ona wszechstronnie zastosowana jako chiralny selektor do rozdzielania związków zasadowych i obojętnych (również kwaśnych w formie obojętnej) [16, 77].

Szczególne znaczenie w technikach elektro-migracyjnych ma zastosowanie CD kationowych i anionowych. Zastosowanie CD, które w zależności od środowiska i budowy są obdarzone ładunkiem ujemnym lub dodatnim, rozszerza możliwości badań na rozdzielanie związków obojętnych. Poprawa selektywności rozdzielania poprzez stosowanie cyklodekstryn w formie jonowej (karboksymetylowe-, fosforowe-, metyloaminoalkilowe- i inne pochodne) obserwowana przez licznych badaczy jest przypisywana głównie ich zdolności do tworzenia trwalszych kompleksów oraz własnej ruchliwości elektroforetycznej.

W ciągu ostatnich dwóch lat nastąpił rozwój metod syntezy jak i zastosowania również kationowych CD. Ich zastosowanie do rozdzielania związków kwaśnych, pokazują jak istotne są oddziaływania jonowe w rozpoznawaniu molekularnym i chiralnym rozróżnieniu [78, 79]. Przykładowe jonowe CD przedstawiono na rys. III-3.

Rys. III-3. Struktury pochodnych  $\beta$ -CD: a) siarczanowa, b) karboksymetylowa, c)

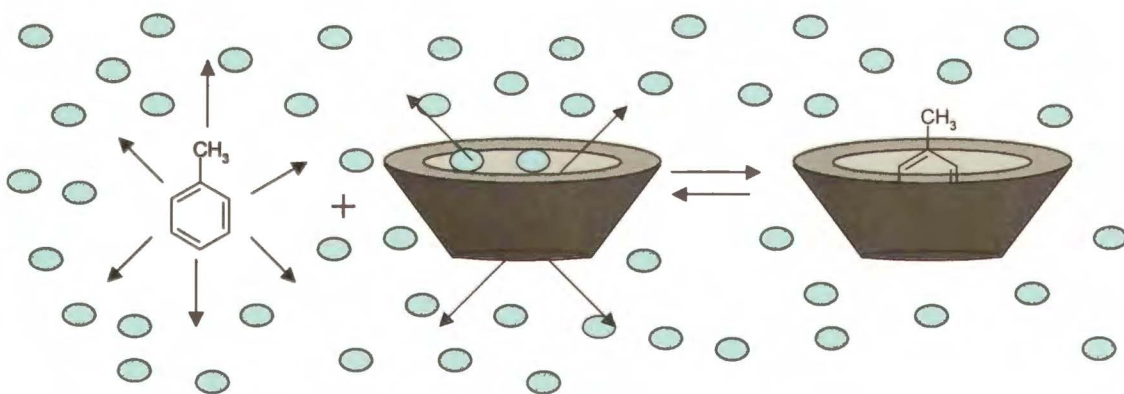




sulfobutylowa, d) trójmetyloaminopropylowa.

### III-1.3. Tworzenie kompleksów inkluzyjnych

Cyklodekstryny wykazują niezwykłą zdolność do tworzenia kompleksów inkluzyjnych ze związkami w fazie stałej, ciekłej i gazowej. Tworzenie kompleksów opiera się na licznych słabych oddziaływaniach i dopasowaniu przestrzennym gościa i gospodarza. Hydrofobowa luka cyklodekstrynowa stanowi mikrośrodowisko, do którego mogą wnikać niepolarne cząsteczki (lub tylko ich części) o odpowiednim rozmiarze tworząc kompleks inkluzyjny [80]. W procesie tworzenia kompleksu inkluzyjnego nie powstają ani nie rozrywają się żadne wiązania kowalencyjne. Siłą napędową tworzenia kompleksu może być wyparcie polarnych cząsteczek z hydrofobowej luki, np. cząsteczki wody są usuwane przez bardziej hydrofobowe cząsteczki gościa obecnego w roztworze, w wyniku czego powstaje stabilniejszy stan o niższej energii, co pokazano na rys. III-4 [81].



Rys. III-4. Tworzenie kompleksu inkluzyjnego.

Wiązanie się cząsteczki gościa z cyklodekstryną nie jest trwałe, lecz jest raczej dynamiczną równowagą. Siła wiązania zależy od tego jak dobrze gość i gospodarz pasują

do siebie i od specyficznych lokalnych oddziaływań pomiędzy atomami. Kompleksy mogą się tworzyć zarówno w roztworze jak i stanie krystalicznym, a najczęstszym rozpuszczalnikiem jest woda. Kompleksy inkluzyjne mogą tworzyć się również w mieszaninach rozpuszczalników lub w rozpuszczalnikach niewodnych.

Tworzenie kompleksów inkluzyjnych pomiędzy gospodarzem a gościem wpływa na wiele właściwości gościa, a także cyklodekstryn:

- na ogół wzrasta rozpuszczalność związków słabo rozpuszczalnych w miarę wzrostu stężenia cyklodekstryny. Z drugiej strony niektóre związki np. mocznik lub sole litu zwiększają rozpuszczalność cyklodekstryn,
- zmieniają się widma UV, NMR związków inkludowanych,
- zmienia się reaktywność związków inkludowanych. W większości przypadków reaktywność maleje, ale w niektórych przypadkach cyklodekstryna zachowuje się jak sztuczny enzym przyspieszający wybrane reakcje i wpływający na drogę tej reakcji,
- maleje dyfuzja, lotność i zdolność do sublimacji cząsteczek zainkludowanych.

Zdolność CD do tworzenia kompleksów inkluzyjnych z cząsteczkami gościa jest funkcją dwóch czynników:

- 1) sterycznego, który zależy od relacji wielkości cyklodekstryny do rozmiarów cząsteczki gościa jak też od grup funkcyjnych obecnych w gościu.
- 2) oddziaływania pomiędzy różnymi składnikami systemu: cyklodekstryna, gość, rozpuszczalnik. Aby utworzył się kompleks musi nastąpić preferencja energetyczna, która spowoduje wniknięcie gościa do CD, np.:
  - zastąpienie niekorzystnej energetycznie polarnej cząsteczki wody przez mniej polarną cząsteczkę gościa (efekt korzystny ze względu na bilans energii oddziaływania gość-CD, gość - woda i woda-woda),
  - oddziaływania van der Waalsa pomiędzy gospodarzem a gościem,
  - tworzenie wiązań wodorowych pomiędzy gościem a gospodarzem.

W zależności od typu gościa i cyklodekstryny oraz środowiska, w którym zachodzi kompleksowanie, udział poszczególnych efektów może być różny.

Wysokość luki cyklodekstryny jest taka sama dla  $\alpha$ - $\beta$ - i  $\gamma$ -cyklodekstryny. Rozmiar luki determinuje jej średnica wewnętrzna, uzależniona od liczby grup glukopiranozowych. Bazując na tych wymiarach  $\alpha$ -cyklodekstryna może kompleksować cząsteczki o małej masie molowej lub z alifatycznymi łańcuchami,  $\beta$ - cyklodekstryna będzie kompleksować związki z grupami aromatycznymi i heterocyklicznymi, zaś  $\gamma$ -cyklodekstryna większe cząsteczki, np. makrocykle i steroidy.

Przez wiele lat, na podstawie badań rentgenowskich uważano cyklodekstryny za cząsteczki o sztywnej strukturze. Badania prowadzone obecnie podkreślają, że duża zdolność cyklodekstryn do tworzenia kompleksów inkluzyjnych z różnymi rodzajami cząsteczek gościa może wynikać z ich niesztywnej budowy. Badania te prowadzi się głównie metodą NMR. Wykorzystuje się w nich również jądrowy efekt Overhausera (NOE-nuclear Overhauser effect), który pokazuje w jaki sposób cząsteczka gościa wnika do luki cyklodekstrynowej [82, 83].

Do badania kompleksów inkluzyjnych cyklodekstryn wykorzystuje się metody rentgenowskie, analizę spektralną, np.: spektroskopię protonowego rezonansu magnetycznego (NMR) lub spektroskopię UV, metody chromatograficzne, kalorymetryczne i polarograficzne. Metody badań kompleksów inkluzyjnych przedstawione są w następujących artykułach [84, 85, 86, 87, 88, 89].

### ***III-1.4. Zastosowanie CD w elektroforetycznym rozdzielaniu związków chiralnych***

Jednym z prekursorów wprowadzania cyklodekstryn do rozdzielania enancjomerów w metodach analitycznych była prof. D. Sybilska [90].

Pierwsze zastosowania CD jako chiralnych selektorów w CE zostały przedstawione przez Smolkową-Keulemansovą [91], Fanalego [92] i Terabe [93]. Każdy z tych autorów używał CD w innym typie elektroforezy. Smolkova-Keulemansova użyła CD jako chiralny selektor w izotachoforezie (CITP), Fanali w strefowej elektroforezie kapilarnej (CZE) a Terabe w micelarnej elektrokinetycznej chromatografii (MEKC).



Chociaż techniki były różne to zasady rozdzielania były te same. Oznacza to, że mechanizm enancjoseparacji polegał na enancjoselektywnym oddziaływaniu chiralnego związku z cyklodekstryną, a nie wynikał z zastosowanej metody [94].

Biorąc pod uwagę właściwości CD najbardziej istotnym w enancjoseparacji jest jej uniwersalność w zdolności do chiralnego rozpoznawania wielu różnych klas związków organicznych.

Cyklodekstryny mogą być używane pojedynczo lub w połączeniu z innymi chiralnymi, a także niechiralnymi czynnikami. Najczęściej stosowane są w tym celu siarczany dodecylu sodu (SDS) oraz chiralne surfaktanty (z grupy cholanów sodowych oraz syntetyczne). System ten został wprowadzony przez Terabe w 1990 [95]. Ujemnie naładowane micide poruszają się w kierunku przeciwnym do EOF, podczas gdy niejonowe CDs migrują z prędkością równą EOF. Na retencję związku wpływa podział hydrofobowego związku pomiędzy roztwór elektrolitu, cyklodekstrynę i fazę micelną. Ten sposób został wykorzystany do enancjoseparacji licznych związków [96, 97, 98]. Często dodanie do cyklodekstryny innego czynnika zmienia enancjoselektywność takiego układu, co może powodować zmianę kolejności migracji enancjomerów [99].

Chiralną CE z użyciem CD wykorzystano do określania czystości enancjomerycznej chiralnych związków chemicznych, agrochemicznych, dodawanych do żywności, jak również do badania związków endogennych, metabolizmu i farmakokinetyki enancjoselektywnych leków [100, 101].

CE pozwala na równoczesną detekcję chiralnego leku oraz jego metabolitów. Czasami chiralne selektory nieefektywne jako składniki chiralnych kolumn w HPLC mogą okazać się efektywne w enancjoseparacji tych samych związków w CE. Na przykład enancjomery chiralnego leku meptazolinu są słabo rozdzielone na  $\beta$ -CD-*ej* kolumnie w HPLC, a jego metabolity nie dzielą się wcale. Zastosowanie natomiast  $\beta$ -CD w CE pozwala na równoczesne rozdzielanie tych związków do linii bazowej.

CE pozwala również na porównanie wyników z innymi technikami dla lepszego zrozumienia mechanizmów enancjoselektywnych oddziaływań związek-CD.

Odwrócenie powinowactwa do poszczególnych enancjomerów jest najbardziej znaczącą zmianą, jaka może mieć miejsce z powodu chemicznej bądź strukturalnej

modyfikacji chiralnego selektora. Badając takie powinowactwo całego szeregu chiralnych związków do CD możemy stwierdzić, że powinowactwo może zmienić się w zależności od typu oraz położenia podstawnika na pierścieniu CD, a nawet zależeć od rozmiaru luki CD, przy czym przykłady odwrotnego powinowactwa w zależności od rozmiaru luki są raczej rzadkie [102].

W pracy [103] autorzy porównują wpływ dużej ilości podstawników na sposób rozpoznawania molekularnego CD. Zsyntezowana heptakis-(2-O-methyl-3,6-di-O-sulfo)- $\beta$ -CD (HMdiSu- $\beta$ -CD) z 14 obszernymi podstawnikami sulfonowymi na obydwu, zarówno pierwszorzędowym jak i drugorzędowym pierścieniu posiada utrudniony dostęp do wnętrza CD. Zbadano 27 kationowych związków chiralnych w CE używając  $\beta$ -CD oraz HMdiSu- $\beta$ -CD. Dla 12 z 16 związków podzielonych z obydwoma CDs kolejność migracji enancjomerów była przeciwna. Analiza struktury kompleksu związek-CD w roztworze wskazuje, że w przeciwieństwie do kompleksowania inkluzyjnego pomiędzy związkiem a  $\beta$ -CD, podczas kompleksowania z HMdiSu- $\beta$ -CD powstaje kompleks zewnętrzny.

Duży postęp w enancjoseparacji osiągnięto dzięki zastosowaniu anionowych cyklodekstryn (siarczanowanych, sulfoalkilowanych, karboksylowanych, fosforowanych itd.), które w zależności od środowiska mogą być obdarzone dużym ładunkiem ujemnym. Szerokie spektrum tych cyklodekstryn zostało użytych do badania leków, w szczególności zasadowych i obojętnych [15]. Wzmocnienie selektywności obserwowane dla jonowych CD w porównaniu do CD obojętnych odnosi się głównie do ich przeciwnej ruchliwości w stosunku do EOF [104].

Rodzina selektywnie podstawionych izomerów  $\beta$ -CD oraz  $\gamma$ -CD została wprowadzona przez Vigha [105]. Autor zsyntezował pochodne siarczanowe przez kompletne podstawienie pozycji nr 6. Pochodne te pozwoliły dokonać rozdzielania związków obojętnych, zasadowych a nawet kwasowych.

Z kolei kationowe CD oparte na podstawnikach aminowych lub amonowych stosowane są coraz częściej do rozdzielania związków kwaśnych i obojętnych [106, 107, 108, 109].



### **III-2. Surfaktanty**

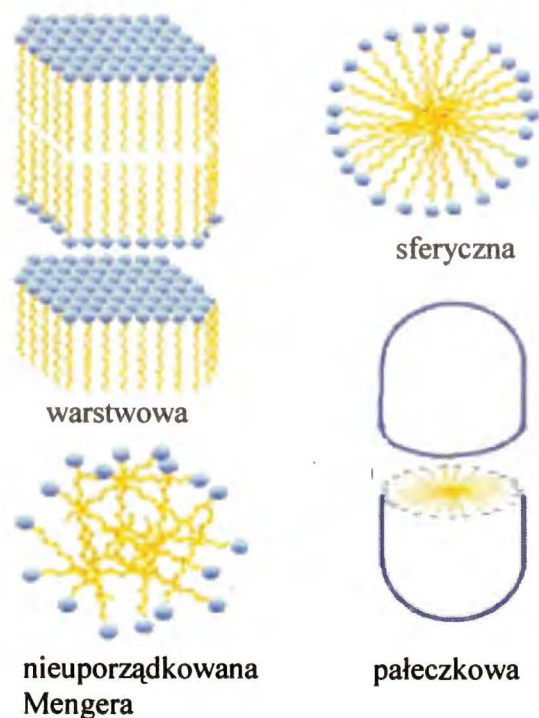
Surfaktanty są amfifilowymi cząsteczkami złożonymi z części polarnej tzw. głowy i hydrofobowego ogona. Taka budowa sprawia, że surfaktanty rozpuszczone w roztworach mają tendencję do tworzenia agregatów zwanych micelami. Tworzenie miceli polega na takim ułożeniu surfaktantu, aby hydrofobowa część cząsteczki nie musiała stykać się z wodą. Tworzenie miceli jest promowane przez niekorzystne oddziaływania na końcach prostych warstw podwójnych. Nie ma prostej teorii opisującej te oddziaływania, jednak zbadano, że tworzenie agregatów niepolarnych cząsteczek w wodzie jest wywołane przez efekt entropowy [63]. Powstałe micelle mają zupełnie inne właściwości niż ich wolne monomery w roztworze. Micelle powstają powyżej pewnego stężenia nazywanego krytycznym stężeniem micelarnym (cmc), które jest charakterystyczną cechą surfaktantu w danym rozpuszczalniku.

W rozpuszczalniku polarnym hydrofobowa grupa surfaktantu jest skierowana do środka, a polarna grupa jest skierowana w kierunku rozpuszczalnika. Micela pozostaje polarnym agregatem o dużej rozpuszczalności z hydrofobowym środkiem, w który mogą wnikać związki o niepolarniej budowie. Na przykład SDS solubilizuje benzen w wodzie, rozpuszczalność wynosi ok. 40 cząsteczek benzenu na micelę [110]. Podczas rozpuszczania surfaktantu w rozpuszczalniku niepolarnym następuje odwrotne uprządkowanie monomerów i otrzymuje się micelle odwrócone, gdzie wewnątrz miceli jest hydrofilowe.

Struktura miceli nie jest dokładnie zbadana. Zaproponowano między innymi sferyczny model miceli [111], model warstwowy [112], pałeczkowy (rod-like) [113]. Na podstawie badań NMR Menger stwierdził, że micelle mają strukturę nieuporządkowaną ze spletanymi ogonami. Według tego modelu micelle mają postrzępioną powierzchnię z kieszeniami wypełnionymi roztworem [114]. Jeszcze bardziej skomplikowany model helikalnej struktury miceli został zaproponowany dla sztywnych amfifili jak kwas



deoksycholowy. Model ten pokazuje niepolarną część cząsteczki zorientowaną w kierunku roztworu wodnego [115].



Rys III-7. Propozycje struktur miceli.

Surfaktanty mogą być używane jako fazy pseudostacjonarne w elektroforezie kapilarnej (MEKC). Chiralne rozróżnienie związków jest oparte na ich różnym współczynniku podziału pomiędzy chiralne micelle a fazę elektrolitu.

### III-2.1. Surfaktanty pochodzenia naturalnego

#### *Kwasy cholowe*

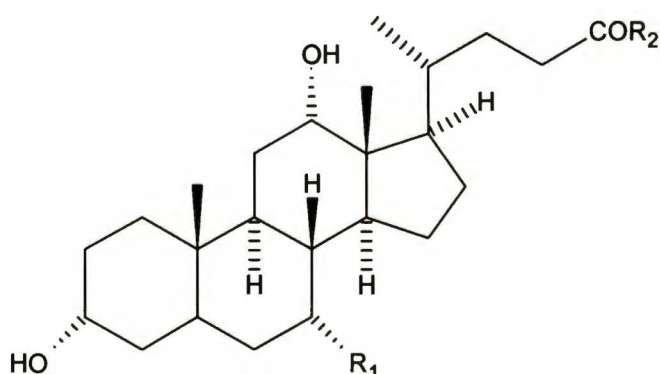
Kwasy cholowe są syntezowane z cholesterolu w wątrobie i odgrywają istotną rolę w usuwaniu cholesterolu z organizmu oraz solubilizacji i absorpcji lipidów. Są głównymi składnikami żółci. W żółci występują głównie cztery pochodne kwasu cholanowego:

- kwas cholowy (3,7,12-trihydroksycholanowy)
- kwas deoksycholowy (3,7-di trihydroksycholanowy)

- kwas chenodeoksycholowy (3,7-dihydroksycholanowy)
- kwas litocholowy (3-hydroksycholanowy),

które są chiralnymi surfaktantami anionowymi, tworzącymi helikalne micelle o odwróconej konformacji [116].

Jak wskazuje zamieszczony wzór (rys. III-8), podstawniki hydroksylowe w kwasie cholowym rozmieszczone są po jednej stronie, a podstawniki węglowodorowe po drugiej stronie płaszczyzny wyznaczonej przez skondensowane pierścienie cykloheksanowe. Prowadzi to do płaszczyznowej polaryzacji cząsteczek kwasu i jest źródłem wykazywanych przez nie tendencji do tworzenia agregatów (miceli). Cząsteczka kwasu cholowego zawiera 11 centrów chiralności.



Rys. III-8. Struktura chemiczna kwasów cholowych.

	Symbol	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	Cmc <sup>a</sup> (mM)
Cholan sodowy	SC	OH	ONa	13-15
Deoksycholan sodowy	SDC	OH	ONa	4-6
Taurocholan sodowy	STC	H	NHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> Na	10-15
Taurodeoksycholan sodowy	STDC	H	NHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> Na	2-6

<sup>a</sup>krytyczne stężenie micelarne w wodzie w 25°C [117].

Monomery kwasu cholowego posiadają w swojej budowie szkielet steroidowy, który może być podstawiony w pozycje R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> (rys. III-8). Monomery mogą również być połączone z tauryną lub glicyną w pozycji R<sub>2</sub>. Wolne cholany: sodowy i deoksycholowy mogą być użyte w CE w pH>5, podczas gdy połączone w pozycji R<sub>2</sub> cholan taurynowy tj. taurocholan sodowy oraz taurodeoksycholan sodowy może być stosowany w pH>3. Taurocholany posiadają dwie grupy hydroksylowe w związku z tym powinny być nieco bardziej hydrofilowe od trójhydroksylowych cholanów.

Uważa się, że micelle deoksycholuanu posiadają wydłużoną, helikalną strukturę ze skretem lewostronnym (left-handed twist). Naładowany boczny łańcuch znajduje się w środku tej helisy z przyłączonym kationem, a monomery układają się jeden nad drugim ze wszystkimi grupami hydroksylowymi skierowanymi w jednym kierunku.

Trójhydroksylowe kwasy cholowe wydają się formować inny typ struktury miceli. Przymuszcza się, że kwas cholowy tworzy warstwę podwójną z kanałami hydrofobowymi i hydrofilowymi utworzonymi przez nakładanie (stacking) monomerów choluanu [118, 119]. Podstawową jednostką tych miceli jest dimer, który może tworzyć łańcuchy. Model solubilizacji związków dla miceli taurocholuanu obejmuje uczestnictwo dimerów oraz wyżej uporządkowanych multimerów [120].

Zastosowanie kwasów cholowych w elektroforezie zostało omówione w rozdz. III-2.3.

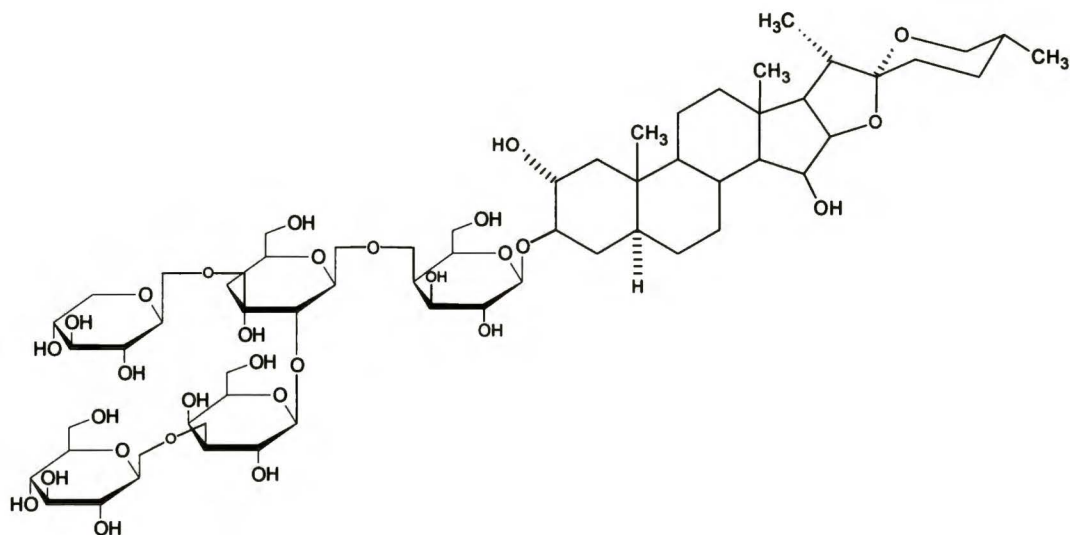
### ***Naturalnie występujące surfaktanty glikozydowe (SG)***

#### **Digitonina**

Digitonina jest glukozydem otrzymywanym z roślin *Digitalis purpurea*; aglikon stanowi digitogenina, która jest połączona z pięcioma grupami cukrowymi.

Digitonina jest związkiem elektrycznie obojętnym. Zazwyczaj dodaje się do niej jonowych miceli, aby utworzyć naładowane micelle, które tworzą fazę pseudostacjonarną (rys. III-9).





*Rys. III-9. Struktura chemiczna digitoniny.*

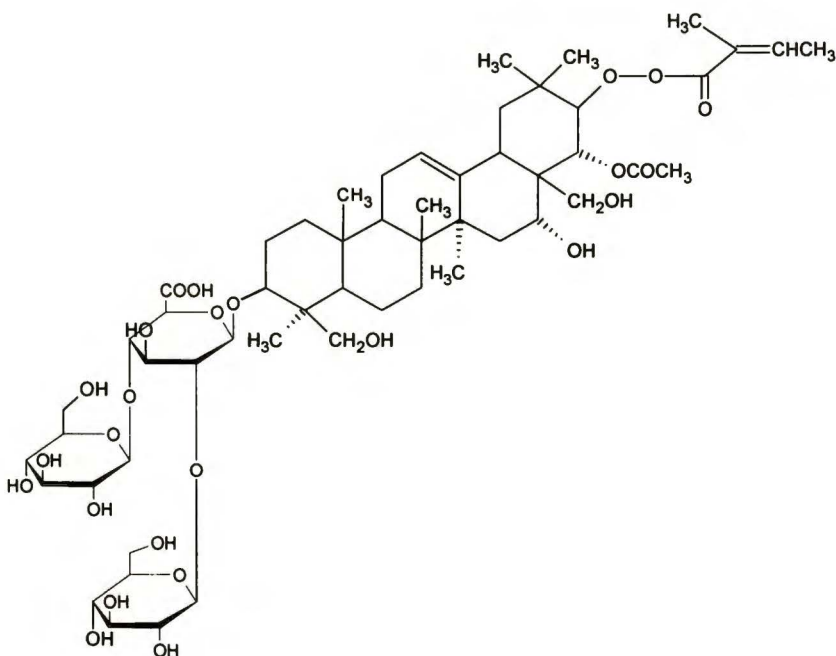
Stosując ten chiralny surfaktant w połączeniu z SDS w warunkach kwaśnych, rozdzielono enancjomery fenyltiohydantoino(PTH)-DL-aminokwasów [121].

### **saponiny**

Jest to grupa substancji roślinnych, których masa cząsteczkowa wynosi 600 - 1500. Składa się z dwóch części: aglikonu - sapogenina i glikonu – sacharyd. Saponiny dzielimy na dwie grupy:

- saponiny trójterpenowe - trójterpenowy charakter aglikonu,
- saponiny sterydowe - steroidowy charakter aglikonu.

Ishihama i Terabe [122] zastosowali szereg saponin (np.  $\beta$ -escynę (rys. III-10)) jako chiralne surfaktanty do rozdzielania dansylowych pochodnych aminokwasów. Bufor zawierający układ  $\beta$ -escyna - SDS w kwaśnych warunkach był szczególnie efektywny, podczas gdy przy pH obojętnych rozdzielanie było niewystarczające.



Rys. III-10. Struktura chemiczna  $\beta$ -escyny.

### III-2.2. Surfaktanty syntetyczne

Wiele chiralnych surfaktantów zostało w ostatnich latach zsyntezowanych i zastosowanych w enancjoseparacji. Wśród nich największą grupę stanowią syntetyczne surfaktanty glikozydowe (SG).

Surfaktanty glikozydowe różnią się znacznie w swojej budowie. Mogą więc wykazywać zróżnicowane właściwości enancjoselektywne. Większość z nich jest obojętnymi surfaktantami, które mogą zostać zjonizowane *in situ* przez kompleksowanie grup sacharydowych z jonami boranowymi tworząc naładowane micelle [123]. Tak więc SG mogą być używane jako obojętne selektory chiralne do rozdzielania jonowych stereoizomerów [124, 125] albo naładowane *in situ* chiralne micelle do rozdzielania obojętnych i jonowych enancjomerów [126].

Z pozostałych syntetycznych surfaktantów można również wymienić [123]:

- N-alkanoylo-L-aminokwasy,
- N-dodekoksykarbonylo-aminokwasy
- surfaktanty oparte na kwasie winowym i inne.

### **III-2.3. Zastosowanie surfaktantów w enancjoseparacji**

Micelarna elektrokinetyczna chromatografia (MEKC) może być realizowana na dwa sposoby. Pierwszy polega na użyciu chiralnych surfaktantów, drugi na zastosowaniu niechiralnego surfaktantu w obecności chiralnego selektora, np. cyklodekstryny.

W pierwszej z tych metod możemy wyróżnić:

- zastosowanie jonowych chiralnych surfaktantów jako enancjoselektywnych faz pseudostacjonarnych,
- zastosowanie obojętnych surfaktantów chiralnych łącznie z jonowymi surfaktantami niechiralnymi (micele mieszane).

Pierwszymi popularnymi surfaktantami chiralnymi były naturalne kwasy cholowe. Zostały one zastosowane do rozdzielania różnych racemicznych amin, alkoholoamin oraz aminokwasów [127, 128]. Mechanizm rozpoznawania enancjomerów nie został jeszcze dostatecznie wyjaśniony, ale przyjmuje się, że helikalna struktura miceli oddziałuje w różny sposób z enancjomerami, posiadającymi sztywną i płaską strukturę prawdopodobnie w skutek sztywnej struktury kwasów cholowych [129].

Rozdzielanie enancjomerów leków znieczulających miejscowo przez zastosowanie miceli mieszanych było badane przez Amini'ego [130]. Autorzy wykazali, że dodanie obojętnego surfaktantu może powodować z jednej strony nie tylko słabsze oddziaływanie fazy micelarnej z enancjomerami, ale również zmianę tych oddziaływań, w wyniku czego może nastąpić odwrócenie kolejności enancjomerów.

Z nielicznymi wyjątkami enancjoseparację w obecności surfaktantów glikozydowych uzyskiwano powyżej krytycznego stężenia micelarnego cmc, co wskazuje na to, że obecność chiralnego surfaktantu w formie miceli jest warunkiem koniecznym do chiralnego rozpoznawania. Dla poszczególnych enancjomerów optymalne stężenie surfaktantu zależy od jego budowy [131]. Dla przykładu dwa



surfaktanty OG (oktyl- $\beta$ -D-glukopiranoza) i NG (nonyl- $\beta$ -D-glukopiranoza) mające identyczną chiralną głowę, natomiast różny alkilowy ogon. Alkilowy łańcuch NG ma jeden atom węgla więcej niż OG a wartość cmc dla NG jest 4 razy niższa niż dla OG. W rezultacie stężenie NG potrzebne do uzyskania rozdzielania jest mniejsze niż dla OG. Jednakże zależność rozdzielania chiralnego w obydwu przypadkach wykazuje te same trendy. Na rozdzielanie chiralne wpływ mają również inne czynniki tj. pH, siła jonowa buforu, temperatura, dodatki organiczne.

Dynamizm związany z charakterem miceli ma ujemny wpływ na rozdzielanie chiralne. Micele nie zachowują ściśle zdefiniowanej konfiguracji, ale są w dynamicznej równowadze z monomerycznym surfaktantem pozostającym w roztworze. Ta równowaga asocjacyjno-dysocjacyjna może wpływać na rozróżnienie chiralne. Aby przebadać ten efekt Dobashi [132] porównał rozdzielanie estru izopropylowego aminokwasu 3,5-dinitrobenzolewego z polimerem poly I-SUV oraz zwykłymi micelami. Autor zaobserwował mniejszą enancjoselektywność w przypadku polimeru niż dla monomerycznego surfaktantu.

Często do enancjoseparacji używa się również surfaktantów niechiralnych, np. SDS w połączeniu z selektorem chiralnym, którym najczęściej jest cyklodekstryna. Ujemnie naładowane micidele poruszają się w kierunku przeciwnym do EOF, podczas gdy obojętna cyklodekstryna porusza się z EOF. Podział hydrofobowych związków pomiędzy roztwór, micidele oraz CD powoduje zróżnicowanie migracji ich enancjomerów i ich rozdzielanie [133]. Można również uzyskać odwrotną kolejność migracji enancjomerów niż dla samej CD [134, 135].

### **III-3. Etery koronowe**

Etery koronowe – są to związki zdefiniowane jako makrocycliczne etery zawierające w swojej strukturze pojedynczy, cykliczny szkielet polieterowy  $-(OCH_2CH_2)-$ . Definicję tę rozszerzono później, uwzględniając również obecność innych heteroatomów w pierścieniu. Badaczami eterów koronowych byli Donald J. Cram, Jean-Marie Lehn i Charles J. Pedersen, którzy w 1987 roku otrzymali Nagrodę Nobla.

Etery koronowe cechują się szczególnymi właściwościami:

- rozpuszczają się w licznych rozpuszczalnikach.
- są doskonałymi ligandami dla wielu jonów - łączą się one z jonami stosunkowo słabymi oddziaływaniami jon-dipol, które jednak po zsumowaniu wielu takich oddziaływań dają trwałe kompleksy.
- są bardzo selektywnymi ligandami - zmieniając rozmiar i topologię ich układów cyklicznych, można otrzymywać związki, które wiążą ściśle określone jony np.: wyłącznie  $K^+$  lub wyłącznie  $Mg^{2+}$ , z określoną siłą.
- w przypadku kryptandów i sferandów, skompleksowany jon staje się "niewidzialny" dla innych cząsteczek, gdyż jest otoczony ze wszystkich stron przez ligand.

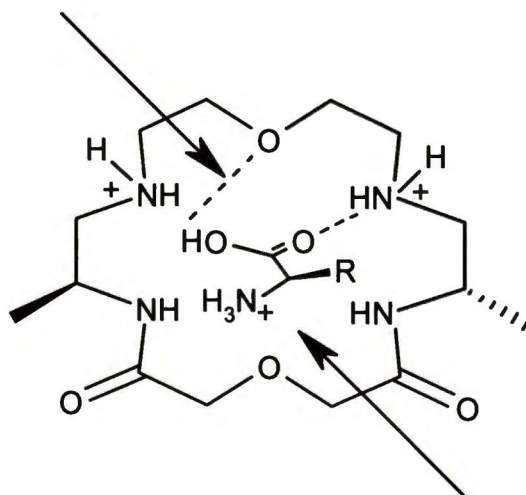
Cechą charakterystyczną eterów koronowych jest ich zdolność selektywnego i specyficznego oddziaływania z jonami metali [136, 137]. W stosunku do swych analogów niecyklicznych charakteryzują się wysokimi wartościami stałych trwałości kompleksów [138]. Energia, z jaką jony metalu wiązane są przez wnękę makropierścienia, zależy od jej rozmiarów, rodzaju wnęki i liczby atomów w pierścieniu, oraz od czynników stereochemicznych i konformacyjnych.

### **III-3.1. Zastosowanie eterów koronowych w enancjoseparacji**

Etery koronowe są cyklicznymi polieterami, zdolnymi do tworzenia kompleksów gość-gospodarz z jonami metali alkalicznych oraz pierwszorzędowymi kationami amonowymi. Chiralne etery koronowe potrafią enancjoselektywnie inkludować związki posiadające pierwszorzędową grupę aminową (rys. III-12). Najczęściej stosowany tetrakarboksylogowany eter 18-korona-6 ( $18C_6H_4$ ) został zsyntezowany przez Behra [139]. Tworzenie kompleksów z eterami koronowymi wynika z tworzenia wiązań wodorowych pomiędzy trzema wolnymi atomami wodoru w aminie a atomami tlenu makrocyklicznego eteru (tripod arrangement). Dodatkowo, grupy karboksylowe są ułożone prostopadle do płaszczyzny makrocyklicznego pierścienia, tworząc barierę

chiralną, która dzieli dostępną dla podstawników przestrzeń na dwie części. Poza wiązaniami wodorowymi, które mogą tworzyć się również pomiędzy grupami karboksylowymi a grupami polarnymi badanego związku występują oddziaływania jonowe oraz dipol-dipol [140].

Wiązanie wodorowe



Oddziaływanie jon-dipol

*Rys. III-12. Oddziaływanie eterów koronowych z pierwszorzędową grupą aminową.*

Chiralny eter koronowy (18C6H4) został wprowadzony przez Kuhna do rozdzielania chiralnych aminokwasów i ich pochodnych [141,142]. Znalazł on również zastosowanie w enancjoseparacji dipeptydów [143] oraz różnych leków zawierających pierwszorzędowe grupy aminowe [144].

Również niechiralne etery koronowe zostały zastosowane w połączeniu z cyklodekstrynami do rozdzielania związków chiralnych [145].



## **Cel pracy**

Coraz większe zapotrzebowanie na substancje czyste wpływa na rozwój metod otrzymywania związków homochiralnych, jak również rozwój metod wykorzystywanych do kontroli czystości enancjomerycznej. W ostatnich latach w bardzo szybkim tempie wzrasta znaczenie elektroforezy kapilarnej jako metody analizy, o czym świadczą liczne publikacje na ten temat [15,16].

Duży postęp w enancjoseparacji w elektroforezie kapilarnej osiągnięto dzięki zastosowaniu cyklodekstryn obdarzonych dużym ładunkiem ujemnym [104] np.  $s\text{-}\beta\text{-CD}$ .

Celem pracy było wykorzystanie układów elektroforetycznych złożonych z dwóch selektorów chiralnych do optymalizacji rozdzielania wybranych związków o właściwościach leczniczych. Określenie optymalnych warunków prowadzenia eksperymentu wymaga poznania mechanizmu odpowiedzialnego za rozdzielanie enancjomerów, jak również wskazania czynników krytycznych, mających największy wpływ na uzyskane rozdzielanie.

Badania wstępne i prosty model teoretyczny posłużyły do zaprojektowania układu podwójnego złożonego z  $s\text{-}\beta\text{-CD}$  i CD obojętnej, który został poddany weryfikacji eksperymentalnej.

Dodatkowo sprawdzono możliwość wykorzystania obok cyklodekstryn innych selektorów chiralnych takich jak kwasy cholowe i etery koronowe w celu sprawdzenia przydatności ich wykorzystania do rozdzielania enancjomerów w układach podwójnych.

## **CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA I SYMULACJE**

### **Wprowadzenie**

Część doświadczalna składa się z sześciu rozdziałów:

- *Rozdział IV* obejmuje opis wykorzystywanej aparatury, odczynników, procedur oraz substancji badanych.
- *Rozdział V* zawiera wyniki badań wstępnych; przedstawione są w nim różnice w zachowaniu się cyklodekstryn obojętnych oraz anionowej  $\alpha$ - $\beta$ -CD, wyznaczone podstawowe właściwości badanych związków, które mają wpływ na siłę kompleksowania gość-gospodarz.
- W *rozdziale VI* przedstawiono modele rozdzielania enancjomerów z jednym oraz dwoma selektorami oraz omówiono wyniki eksperymentalne otrzymane dla tych układów z różnymi cyklodekstrynami.
- *Rozdział VII* przedstawia metodę optymalizacji rozdzielania enancjomerów oraz prezentuje stworzoną strategię postępowania przy enancjoseparacji związków zasadowych i obojętnych.
- W *rozdziale VIII* przedstawione zostały możliwości zastosowania innych, podwójnych układów supramolekularnych do rozdzielania enancjomerów.
- *Rozdział IX* zawiera dyskusję otrzymanych wyników i wnioski końcowe.

### **Rozdział IV**

#### **Aparatura i warunki prowadzenia eksperymentu**

##### **IV-1. Aparatura**

Pomiary elektroforetyczne zostały wykonane przy użyciu aparatu do elektroforezy kapilarnej Sceptrophoresis Ultra firmy Thermo Separation Products (San Jose, California), wyposażonego w detektor spektrofotometryczny UV-VIS. Pomiary prowadzono przy dwóch długościach fali 220 oraz 254 nm. Używano kapilary szklanej o średnicy 75  $\mu\text{m}$ , długości 63 cm oraz długości efektywnej 58 cm (długość do okienka detektora). Jeśli nie zaznaczono inaczej analizy wykonano w następujących warunkach:

- napięcie przyłożone do elektrod:
  - a) dla normalnej polaryzacji elektrod 25 kV (pH=7;10;12)
  - b) dla polaryzacji odwróconej -25 kV (w pH=2,5 z wyjątkiem analiz z pojedynczymi układami cyklodekstryn obojętnych),
- temperatura 25 °C,
- próbki wprowadzono hydrodynamicznie przez 2s stosując ciśnienie 0,8psi.

Jako bufor podstawowy stosowano 18 mM buforowy roztwór trishydroksymetyloaminometanu (Tris), z dodatkiem kwasu ortofosforowego dla roztworów kwaśnych oraz NaOH dla roztworów zasadowych.

Jeśli była taka konieczność EOF był wyznaczany za pomocą tiomocznika.

Badane substancje były rozpuszczane w wodzie.

#### ***IV-2. Procedury kondycjonowania i mycia kapilary***

Nowa kapilara była przygotowywana do pracy wg następującej procedury:

1. mycie 0,1 M NaOH przez 10 min,
2. kondycjonowanie 0,1 M NaOH przez 20 min, przy napięciu 20 kV,
3. mycie wodą destylowaną przez 20min.

Pomiędzy każdą analizą kapilara była myta wodą przez 2 min a następnie buforem również przez 2 min.

#### ***IV-3. Odczynniki i badane związki***

Wszystkie obojętne cyklodekstryny:  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -CD, heptakis (2,6-di-O-metylo)- $\beta$ -cyklodekstryna (DM- $\beta$ -CD), 2-hydroksy-propylo  $\beta$ -cyklodekstryna (HP- $\beta$ -CD), per-



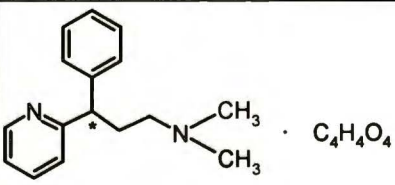
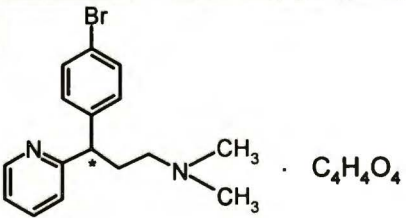
metylowana  $\beta$ -cyklodekstryna (TM- $\beta$ -CD) pochodziły z firmy Chinoin (Budapeszt, Węgry), natomiast siarczanowa  $\beta$ -CD (s- $\beta$ -CD) pochodziła z firmy Aldrich (St. Louis, USA). Pozostałe zastosowane odczynniki: Tris, NaOH, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (POCh Polska) miały czystość cz.d.a.

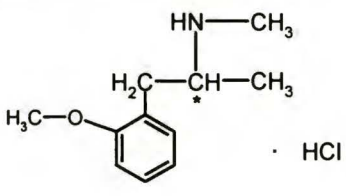
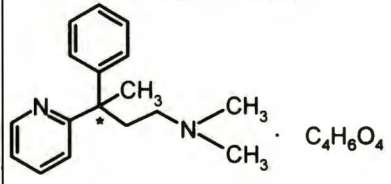
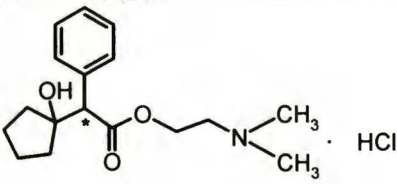
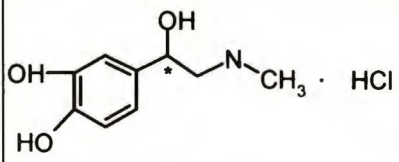
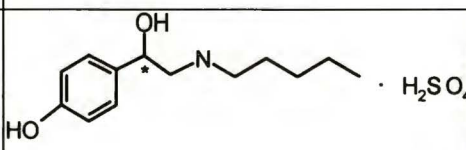
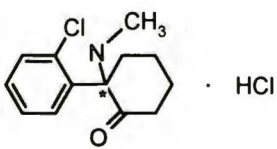
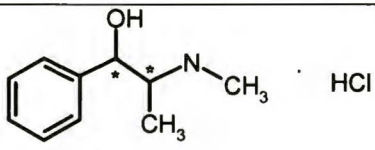
Badane związki: feniramina, bromfeniramina, metoksyfenamina, doksyamina, cyklopentolat, epinefryna, bamestan, ketamina oraz efedryna w postaci racemicznych soli pochodziły z firmy Sigma (Steinheim, Niemcy). Ponadto do sporządzania nieracemicznych mieszanin w celu zbadania, który z enancjomerów jest silniej kompleksowany przez poszczególne cyklodekstryny zakupiono (+)-bromfeniraminę oraz (-)-epinefrynę. Enancjomery (+) oraz (-) – efedryny zakupiono w firmie Fluka (Buchs, Niemcy). Nieracemiczną mieszaninę cyklopentolatu otrzymano przez mikropreparatywne rozdzielanie na kolumnie Chiracel OD [146].

Tabela IV-1 przedstawia nazwy badanych związków, ich wzory oraz zastosowanie jako substancji leczniczych [147].

Z punktu budowy chemicznej, wspólną cechą badanych związków jest posiadanie drugo- lub trzeciorzędowego atomu azotu aminowego oraz obecność pierścienia fenylowego.

Tabela IV-1. Struktura i działanie badanych związków.

Nazwa związku	Wzór	Działanie
Feniramina		antyalgiczne
Bromfeniramina		antyalgiczne

Metoksyfenamina		pobudzające, sympatykomimetyk
Doksylamina		antyalegiczne i przeciwwymiotne, również uspokajające
Cyklopentolat		parasympatykolityczne, rozszerza źrenice
Epinefryna		lek antyastmatyczny, sympatykomimetyk
Bametan		rozszerza naczynia obwodowe
Ketamina		znieczulające, antyastmatyczne
Efedryna		rozszerzające oskrzela, sympatykomimetyk

Wykorzystywane w pracy chiralne etery koronowe, których struktury przedstawiono w tabeli VIII-3 na stronie 153, zostały zsyntezowane w grupie prof. J. Jurczaka Instytucie Chemii Organicznej PAN [148].

#### **IV-4. Metoda wyznaczania stałych trwałości**

W celu wyznaczenia stałych trwałości wykonano eksperymenty dla sześciu różnych stężeń selektora w zakresie 0-0,015 [mol/dm<sup>3</sup>]. Ruchliwość elektroforetyczną dla danego stężenia selektora obliczono ze wzoru II-7:

$$\mu^{eff} = \mu^{obs} - \mu^{EOF} = \frac{L_D L_t}{V} \left( \frac{1}{t_m} - \frac{1}{t_{EOF}} \right)$$

Stałe trwałości kompleksów zostały wyznaczone metodą nieliniowej regresji danych eksperymentalnych korzystając z równania (II-21),:

$$\mu^{eff} = \frac{(\mu^{free} + \mu^{comp} K [H])}{1 + K [H]}$$

będącego korelacją pomiędzy ruchliwością elektroforetyczną związku a stałą trwałości jak również ruchliwością elektroforetyczną kompleksu.

Wartości  $\mu^{free}$  związków otrzymano eksperymentalnie wykonując analizę przy braku chiralnego selektora w buforze. Wartość  $t_{EOF}$  wyznaczono dodając do buforu neutralny marker DMF.



## Rozdział V

### Badania wstępne

Pozorną ruchliwość elektroforetyczną związku opisujemy zgodnie ze wzorem (II-6):

$$\mu^{obs} = \mu^{eff} + \mu^{EOF}$$

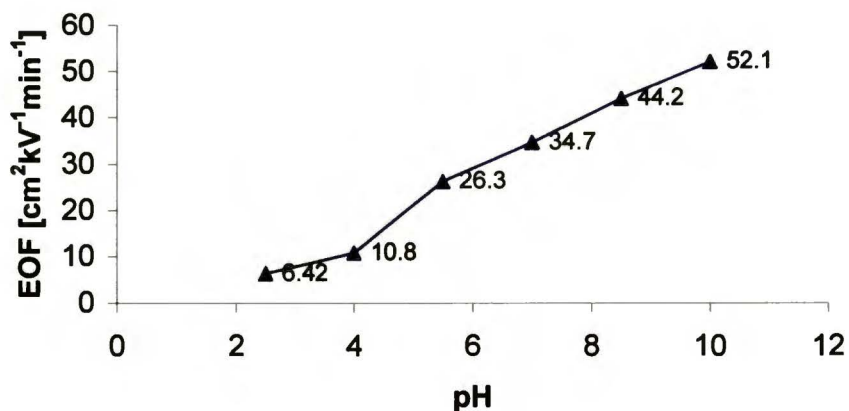
W przypadku normalnej polaryzacji detektor znajduje się przy katodzie. Aby związek mógł zmierzać do katody wielkość  $\mu_{obs}$  musi mieć wartością dodatnią. Warunek ten jest spełniony dla związków obdarzonych ładunkiem dodatnim, a także ujemnym, gdy moduł ujemnej ruchliwości elektroforetycznej  $|\mu^{eff}|$  jest mniejszy od EOF. Kiedy moduł ruchliwości elektroforetycznej związku obdarzonego ładunkiem ujemnym jest większy od przepływu elektroosmotycznego związku migrują w kierunku przeciwnym - do anody. W takim przypadku należy zmienić polaryzację elektrod na przeciwną, aby możliwa była detekcja po stronie anodowej (polaryzacja odwrócona).

Wynika z tego, że znajomość wielkości przepływu elektroosmotycznego, ruchliwości elektroforetycznych związków badanych, a także wpływu cyklodekstryn na obie wielkości mają istotne znaczenie na sposób przeprowadzenia eksperymentu.

#### V-1. Wpływ pH na przepływ elektroosmotyczny

Zależność wielkości EOF od pH w analizowanym układzie przedstawia rys. V-1. Wielkość EOF obliczono ze wzoru II-7 przyjmując, że ruchliwość  $\mu^{eff} = 0$  (obojętny marker). Wzór przyjmuje wtedy postać:

$$\mu^{obs} = \mu^{EOF} = \frac{L_D L_t}{V} \left( \frac{1}{t_{EOF}} \right)$$

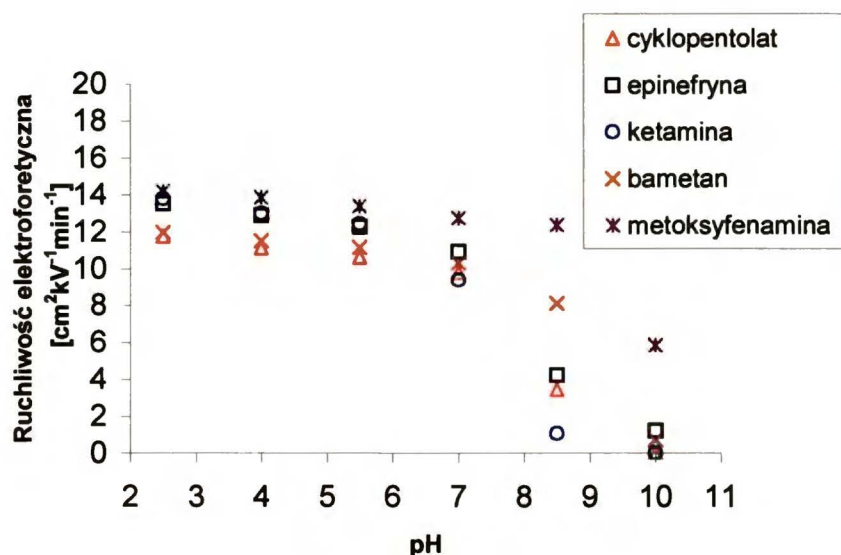


*Rys. V-1. Wpływ pH buforu na wartość przepływu elektroosmotycznego. Warunki: bufor Tris 18mM, temp. 25<sup>0</sup>C, napięcie 25kV, średnica kapilary 75 $\mu$ m.*

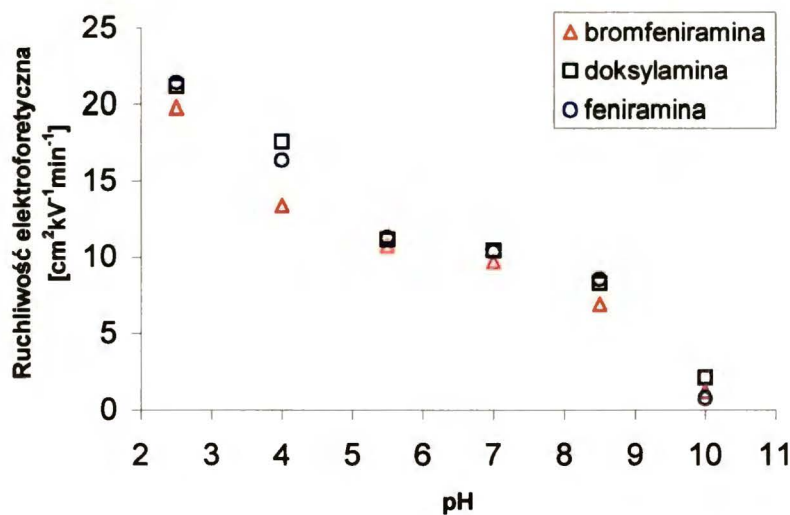
Jak wynika z wykresu, dla pH=4 przepływ elektroosmotyczny jest niewielki. Po przekroczeniu tej wartości zaczyna szybko rosnąć, co wynika z dysocjacji grup silanolowych szklanej kapilary. Dla pH=10 EOF osiąga wartość 52,1  $\text{cm}^2\text{kV}^{-1}\text{min}^{-1}$ .

### **V-2. Wpływ pH na ruchliwość elektroforetyczną badanych związków**

Ruchliwość elektroforetyczna związków zależy od stosunku ładunku do masy cząsteczki w warunkach eksperymentu i jest silnie związana z wartością pH buforu. Wyznaczone wg równania II-7 ruchliwości elektroforetyczne związków przedstawiono na rys. V-2 i rys. V-3.



Rys. V-2. Wpływ pH buforu na ruchliwość elektroforetyczną cyklopentolatu, epinefryny, ketaminy, bametanu i metoksyfenaminy. Warunki: bufor Tris 18mM, temp. 25<sup>0</sup>C, napięcie 25kV, średnica kapilary 75μm.



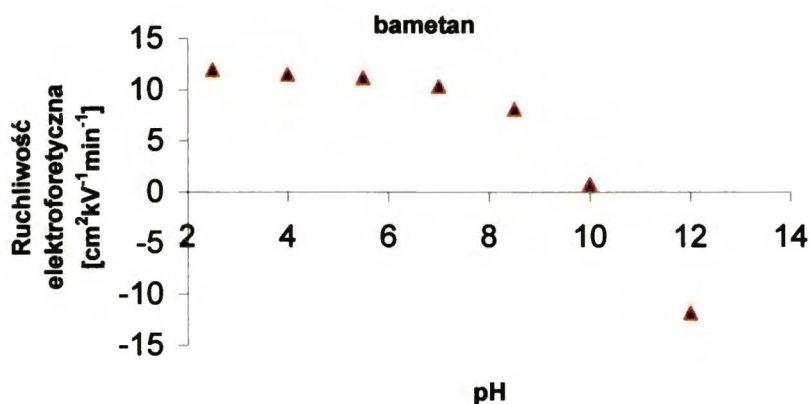
Rys. V-3. Wpływ pH buforu na ruchliwość elektroforetyczną feniramin i doksyfaminy. Warunki: bufor Tris 18mM, temp. 25<sup>0</sup>C, napięcie 25kV, średnica kapilary 75μm.



Uzyskane wyniki pozwalają podzielić badane związki na dwie grupy. Pierwszą stanowią związki, które posiadają jeden atom azotu zdolny do przyłączania protonu: cyklopentolat, bametan, ketamina, metoksyfenamina oraz epinefryna. Najłatwiej protonowaniu ulegają bametan oraz metoksyfenamina. Ich wartości  $pK_a$  są więc większe niż dla cyklopentalatu, epinefryny i ketaminy. Największe różnice w ruchliwościach elektroforetycznych dla tej grupy obserwujemy dla pH pomiędzy 8-9. W warunkach bardziej kwaśnych, kiedy przeważająca część cząsteczek jest już sprotonowana, obserwujemy brak wpływu pH na ruchliwość. Ponadto, ze względu na zbliżone masy cząsteczkowe i ładunek badanych związków, ich ruchliwości elektroforetyczne są podobne.

Drugą grupą związków są feniraminy. Z *rys. V-3* wynika, że w środowisku powyżej  $pH=7$  zachowują się podobnie do grupy pierwszej. Jedyna różnica polega na tym, że łatwiej ulegają protonowaniu. Natomiast w silnie kwaśnych roztworach, protonowaniu ulega dodatkowo pierścień pirydynowy ( $pK_a$  pirydyny wynosi 5,15 [149]). W związku z tym zmienia się gęstość ładunku tych związków i w warunkach elektroforetycznych poruszają się one znacznie szybciej.

W  $pH=12$  większość badanych związków jest w formie obojętnej, z wyjątkiem bametanu. Bametan wykazuje ujemną ruchliwość (wychodzi po EOF), wynikającą prawdopodobnie z silnej solwatacji jego cząsteczek przez cząsteczki rozpuszczalnika (*rys. V-4*).



Rys.V-4. Wpływ pH buforu na ruchliwość elektroforetyczną bametanu. Warunki prowadzenia eksperymentu podano w rozdz. IV.

### V-3. Zachowanie się cyklodekstryn w układach elektroforetycznych

Podstawową cechą odróżniającą obojętne cyklodekstryny od ich jonowych pochodnych w technikach elektromigracyjnych są ich odmienne ruchliwości elektroforetyczne. Obojętne CD nie posiadają własnej ruchliwości, więc poruszają się razem z EOF. S-β-CD jest obdarzona ładunkiem ujemnym a jej zmierzona ruchliwość elektroforetyczna przy pH=2,5 wynosi  $-27,29 \text{ [cm}^2\text{kV}^{-1}\text{min}^{-1}]^1$ . W zależności od ładunku własnego cyklodekstryny, w różny sposób wpływają one na ruchliwość analizowanych związków.

W przypadku obojętnej cyklodekstryny ruchliwość skompleksowanego związku może zmieniać się w skończonym zakresie, przy normalnej polaryzacji elektrod od ruchliwości wolnego związku, do ruchliwości z jaką porusza się EOF:

$$\mu^{\text{EOF}} < \mu^{\text{comp}} < \mu^{\text{free}} \quad (V-1)$$

<sup>1</sup> Ruchliwość elektroforetyczna s-β-CD została wyznaczona metodą detekcji pośredniej z wykorzystaniem kwasu p-toluenosulfonowego. Warunki eksperymentu były takie same jak podano w rozdziale IV. Bufor: 18mM Tris, 20mM kwas p-toluenosulfonowy, pH=2,5.

gdzie:  $\mu^{\text{free}}$  – ruchliwość elektroforetyczna wolnego związku,

$\mu^{\text{comp}}$  – ruchliwość elektroforetyczna kompleksu,

$\mu^{\text{EOF}}$  – przepływ elektroosmotyczny (ruchliwość związku obojętnego),

lub, gdy brak jest EOF:

$$0 < \mu^{\text{comp}} < \mu^{\text{free}} \quad (V-2)$$

Wypadkowa ruchliwość związku może zatem zmieniać się od ruchliwości wolnego związku do prędkości z jaką porusza się EOF.

Kiedy stosujemy cyklodekstryny jonowe, ruchliwość związku można wyrazić następująco:

$$\mu^{\text{SEL}} < \mu^{\text{comp}} < \mu^{\text{free}} \quad (V-3)$$

$\mu^{\text{SEL}}$  – ruchliwość elektroforetyczna selektora

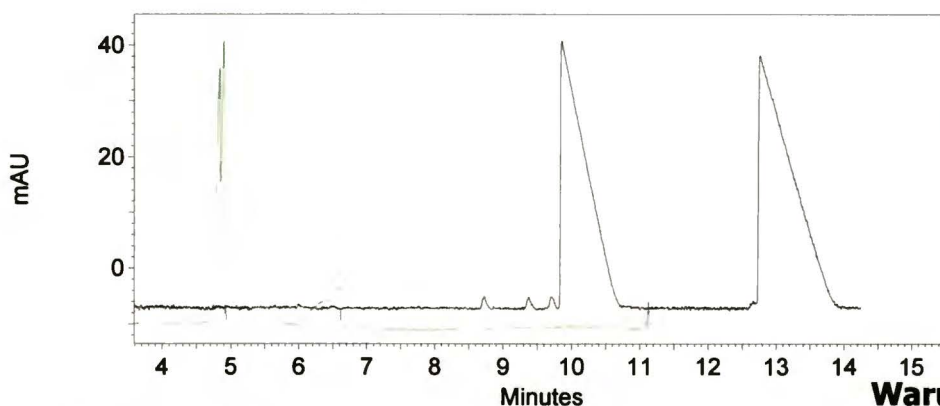
Z wyrażeń tych wynika, że w przypadku jonowych cyklodekstryn przedział ruchliwości może być znacznie szerszy niż dla cyklodekstryn obojętnych. Np. pierwsze próby zastosowania s- $\beta$ -CD w pH=2,5 do rozdzielania enancjomerów badanych związków wskazały, że analizowane związki zmieniają swoją dodatnią ruchliwość elektroforetyczną w formie nieskompleksowanej, na ujemną wypadkową ruchliwość w wyniku oddziaływania z silnie anionową s- $\beta$ -CD. W związku z tym przy bardzo małej wartości EOF poruszają się one w kierunku anody, co uniemożliwiło ich detekcję przy normalnej polaryzacji. Wyjściem z zaistniałej sytuacji była zmiana polaryzacji elektrod na odwrotną. Zastosowanie odwróconej polaryzacji elektrod sprawiło, że można było prowadzić analizy przy tak niskim pH.

Przy wyższych wartościach pH ( $\geq 7$ ) duży EOF daje możliwość detekcji związków przy normalnej polaryzacji elektrod.

Na rys. V-5 przedstawiono przykładowe rozdzielanie enancjomerów bromfeniraminu oraz metoksyfeniraminu w pH=7 oraz pH=2,5.

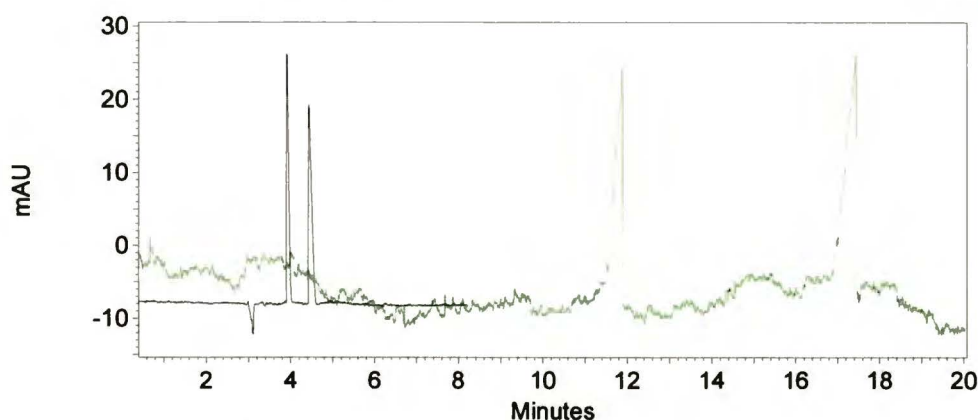


A) **Bromfeniramina**



Warunki: s- $\beta$ -CD 10mg/ml  
— 25kV, pH=7  
— -25kV, pH=2,5

B) **Metoksyfenamina**



Rys. V-5. Elektroferogram rozdzielania enancjomerów bromfeniraminy (A) oraz metoksyfenaminy (B) w pH=2,5 oraz pH=7 dla stężenia [s- $\beta$ -CD]=10 mg/ml. Warunki: bufor Tris 18mM, temp. 25<sup>0</sup>C, średnica kapilary 75 $\mu$ m.

Porównując przedstawione elektroferogramy dla bromfeniraminy oraz metoksyfenaminy stwierdzamy, że związki te różnie zachowują się przy różnych wartościach pH. Bromfeniramina w pH=7 dzieli się znacznie lepiej niż w pH=2,5, ale czas analizy jest dłuższy - wynosi powyżej 10 min. Metoksyfenamina lepiej dzieli się w pH=2,5, przy czym dla obu pH podziały są dobre. Odwrotnie niż dla bromfeniraminy czas analizy w pH=7 jest znacznie krótszy (5 min.) niż w pH=2,5 (18 min.). W związku z różnym zachowaniem się związków w zależności od pH dalsze badania przeprowadzono dla trzech reprezentatywnych wartości:

1. pH=12, w tych warunkach cząsteczki związków są obojętne (z wyjątkiem bametanu);
2. pH=7, gdzie związki są obdarzone ładunkiem dodatnim (protonowany azot w łańcuchu alifatycznym);
3. pH=2,5, w tych warunkach feniraminy posiadają protonowany pierścień pirydynowy.

## **Rozdział VI**

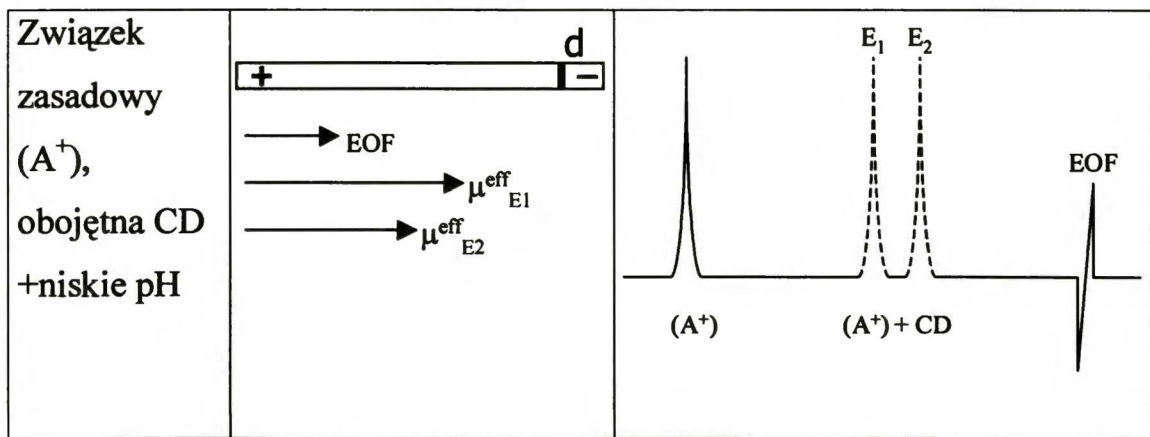
### **Rozdzielanie enancjomerów w elektroforezie kapilarnej modyfikowanej cyklodekstrynami**

#### **VI-1. Opis układów elektroforetycznych**

##### **VI-1.1. Wybrane zagadnienia literaturowe dotyczące cyklodekstryn obojętnych**

Strefowa elektroforeza kapilarna z zastosowaniem cyklodekstryn obojętnych (jak również innych obojętnych selektorów chiralnych), prowadzona w buforach nośnych o niskich wartościach pH pozwala na rozdzielanie związków o właściwościach zasadowych. Stosowane są najczęściej dostępne handlowo  $\alpha$ -,  $\beta$ - oraz  $\gamma$ -cyklodekstryny, jak również ich niektóre pochodne. Postulowany mechanizm rozdzielania z użyciem cyklodekstryn zakłada stereospecyficzne kompleksowanie cząsteczek gościa wewnątrz luki cyklodekstryny, przy czym jeden z enancjomerów kompleksowany jest silniej niż drugi [150]. Przy małych wartościach pH przepływ elektroosmotyczny jest minimalny i obojętna cyklodekstryna porusza się z EOF. W tych samych warunkach, związki o właściwościach zasadowych zostają protonowane i poruszają się w polu elektrycznym

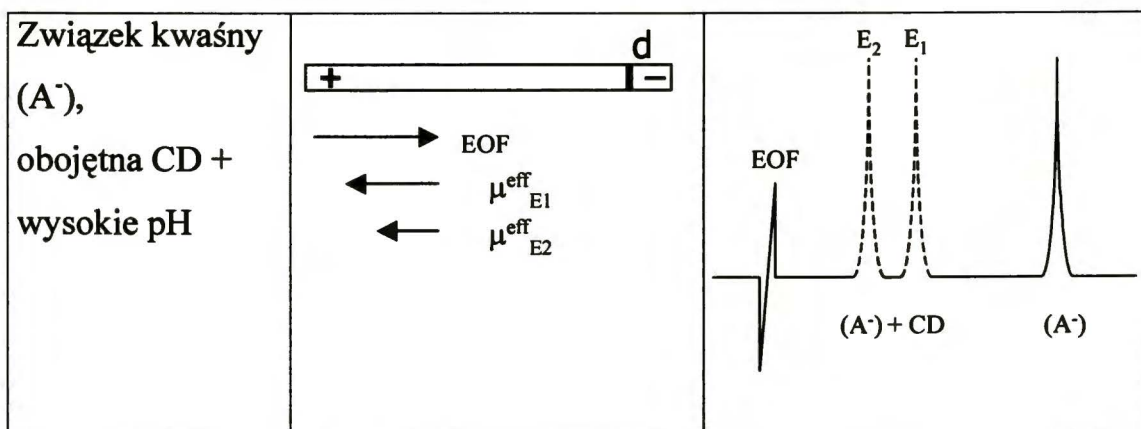
w kierunku detektora. Kiedy cząsteczka substancji rozpuszczonej wniknie do luki cyklodekstryny, jej mobilność znacznie spada i wówczas może nastąpić chiralne rozpoznanie *rys. VI-1* [151, 152].



*Rys. VI-1. Schemat rozdzielania cząsteczek zasadowych z obojętymi CDs. Czas migracji związku wydłuża się. Silniej kompleksowany enancjomer E<sub>2</sub> wychodzi jako drugi.*

CZE z zastosowaniem cyklodekstryny może być także prowadzona przy wysokich wartościach pH. Ten przypadek skuteczny jest np. dla związków, które w tych warunkach mają ładunek ujemny. Ujemny ładunek cząsteczek gościa powoduje, że jego przepływ elektroforetyczny ma kierunek przeciwny niż przepływ elektroosmotyczny. Obojętne cząsteczki cyklodekstryny poruszają się z EOF. Oddziaływanie cząsteczek analizowanego związku posiadających ładunek ujemny z cząsteczkami cyklodekstryny powoduje skrócenie czasu migracji. W ten sposób enancjomer, który oddziałuje najsilniej, jest wmywany najszybciej, odwrotnie niż dla związków obdarzonych ładunkiem dodatnim, co pokazano na *rys. VI-2* [153].





Rys. VI-2. Schemat rozdzielania cząsteczek o charakterze kwaśnym z obojętnymi CDs. Czas migracji związku skraca się. Silniej kompleksowany enancjomer  $E_2$  wychodzi jako pierwszy.

Jak wspomniano w badaniach wstępnych, cyklodekstryny obojętne mogą być stosowane jedynie do rozdzielania związków obdarzonych ładunkiem (pomijamy tu możliwość zastosowania dodatkowych czynników, np. surfaktantów). Ponieważ takie związki w pewnych warunkach pH również stają się obojętne, istotna staje się znajomość ich  $pK_a$ .

Związki badane w niniejszej pracy są aminami, ulegają one w środowisku kwaśnym protonowaniu i poruszają się w kierunku katody. Obojętna CD poruszająca się z EOF będzie ten proces zwalniać, a enancjomer silniej zatrzymywany będzie wychodził jako drugi. W wysokich wartościach pH związki te stają się obojętne i ich rozdzielanie z obojętnymi CDs jest niemożliwe.

Równanie (II-21) dla układu z cyklodekstryną można zapisać następująco:

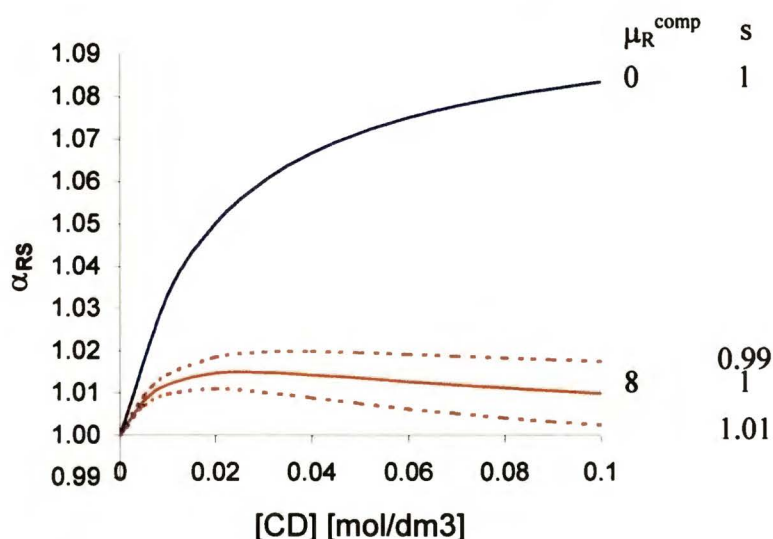
$$\mu_R^{eff} = \frac{\mu_R^{free} + \mu_R^{comp} K_R [CD]}{1 + K_R [CD]} \quad (VI-1)$$

$$\mu_S^{eff} = \frac{\mu_S^{free} + \mu_S^{comp} K_S [CD]}{1 + K_S [CD]}$$

Efektywny współczynnik selektywności wyraża się wzorem:

$$\alpha_{RS}^{eff} = \frac{(\mu^{free} + \mu_R^{comp} K_R [CD])(1 + K_S [CD])}{(\mu^{free} + \mu_S^{comp} K_S [CD])(1 + K_R [CD])} \quad (VI-2)$$

Na rys. VI-3 przedstawiono zależność efektywnej selektywności rozdzielania związku obdarzonego ładunkiem dodatnim od stężenia obojętnej cyklodekstryny obliczoną wg równania (VI-2). Przy obliczeniach założono stałe trwałości  $K_R=50$ ,  $K_S=55$ , ruchliwość elektroforetyczną wolnych enancjomerów  $\mu^{free} = 15 \text{ cm}^2 / \text{kV min}$ , ruchliwość kompleksów jest równa:  $\mu^{comp} = 0 \text{ cm}^2 / \text{kV min}$  oraz  $\mu^{comp} = 8 \text{ cm}^2 / \text{kV min}$ .

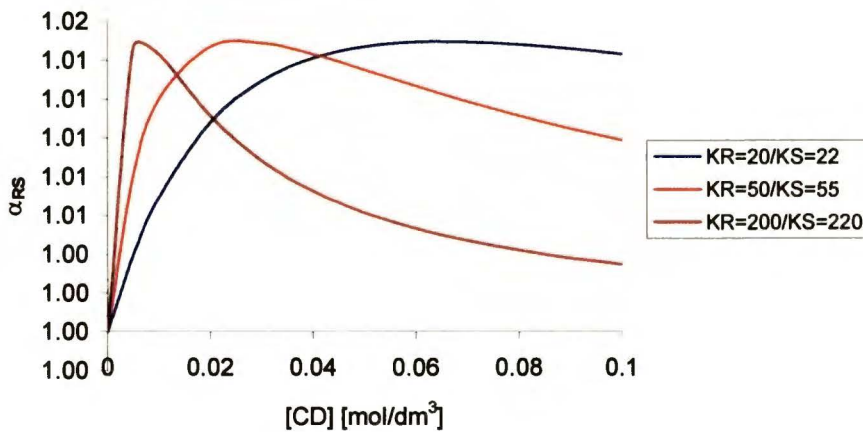


Rys. VI-3. Symulacja zależności selektywności rozdzielania  $\alpha_{RS}$  od stężenia cyklodekstryny dla przypadku kompleksowania związku obdarzonego ładunkiem dodatnim z obojętną cyklodekstryną. Założono stałe trwałości  $K_R=50$ ,  $K_S=55$ , ruchliwość elektroforetyczną wolnych enancjomerów  $\mu^{free} = 15 \text{ cm}^2 / \text{kV min}$ , ruchliwość kompleksów  $\mu^{comp} = 0 \text{ cm}^2 / \text{kV min}$  lub  $\mu^{comp} = 8 \text{ cm}^2 / \text{kV min}$ , selektywność migracji kompleksów  $s = \mu_S^{comp} / \mu_R^{comp}$ .

Z wykresu wynika, że im bardziej ruchliwości kompleksów zbliżone są do ruchliwości wolnego związku, tym gorsze uzyskuje się selektywności rozdzielania. Nie bez znaczenia jest również różnica w ruchliwości obu tworzonych kompleksów. Niewielkie różnice

w ruchliwościach, mogące wynikać z innego kształtu cząsteczki, mogą powodować różnice w selektywności.

Zależność enancjoselektywności od stężenia CD w zależności od wielkości stałych trwałości przedstawiono na rys. VI-4. Założono stały stosunek stałych trwałości  $K_S/K_R=1,1$ .



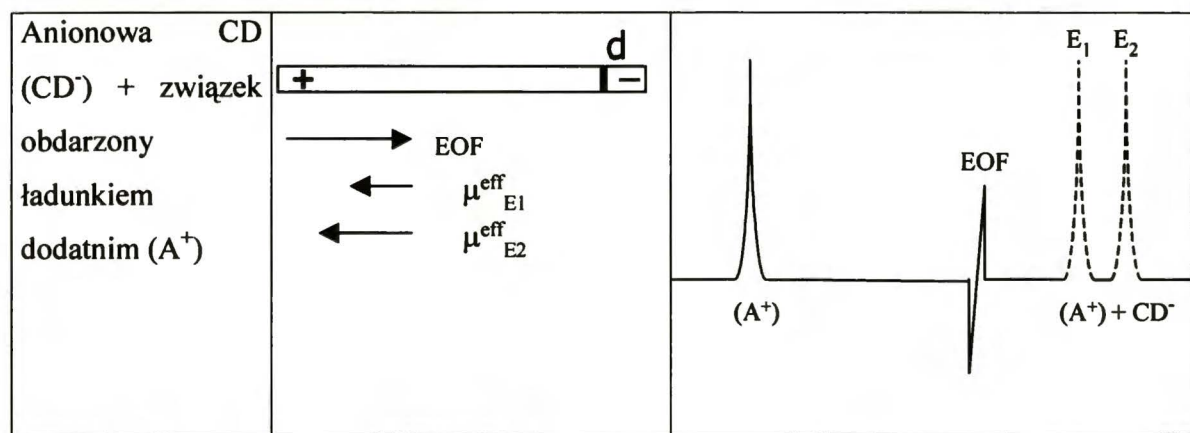
Rys. VI-4. Symulacja zależności selektywności rozdzielania  $\alpha_{RS}$  od stężenia cyklodekstryny dla przypadku kompleksowania związku obdarzonego ładunkiem dodatnim z obojętną cyklodekstryną dla różnych stałych trwałości pokazanych na wykresie. Założono ruchliwość elektroforetyczną wolnych enancjomerów  $\mu^{free} = 15 \text{ cm}^2 / \text{kV min}$ , ruchliwość kompleksów  $\mu^{comp} = 8 \text{ cm}^2 / \text{kV min}$ .

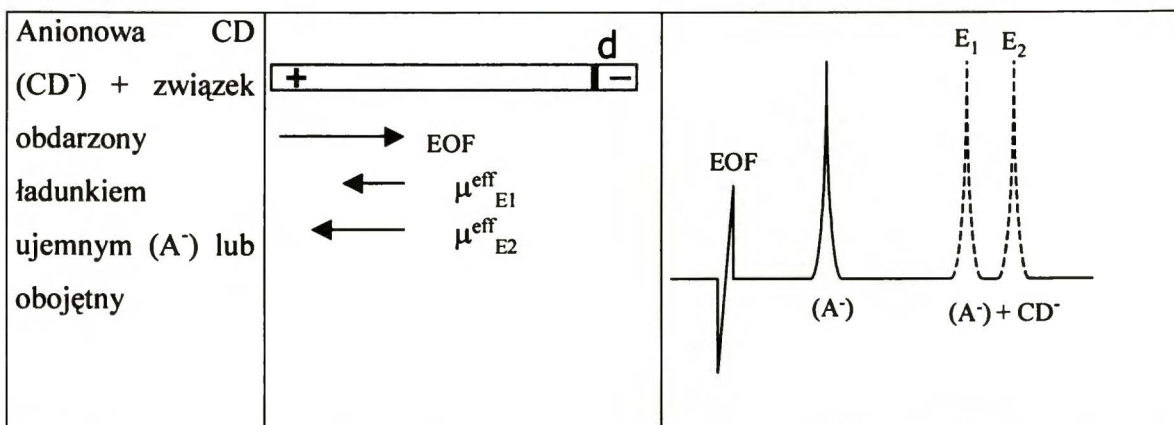
Wykres enancjoselektywności wykazuje maksimum selektywności przy pewnym stężeniu selektora. Stężenie to nazywane jest optymalnym stężeniem selektora. Im wyższe stałe trwałości, tym niższe stężenie selektora odpowiadające maksimum. Podobna zależność została uzyskana w pracach empirycznych przedstawionych w części literaturowej (patrz rozdz. II-6.4)



## VI-1.2. Wybrane zagadnienia literaturowe dotyczące cyklodekstryn obdarzonych ładunkiem ujemnym

S- $\beta$ -CD posiadająca duży ładunek ujemny (ok. 9 grup siarczanowych) jest przez katodę silnie odpychana. Jej ruchliwość elektroforetyczna wyznaczona w trakcie obecnych badań wynosi  $-27,29$  [ $\text{cm}^2\text{kV}^{-1}\text{min}^{-1}$ ] (sposób wyznaczenia podano w rozdziale V-3) jest większa od ruchliwości typowych anionowych związków małowczątkowych. Związki obdarzone ładunkiem dodatnim, kompleksowane przez s- $\beta$ -CD (jak również posiadające ładunek ujemny o ile z nią oddziałują) są w trakcie wędrówki przez kapilarę w kierunku katody opóźniane. Gdy badany związek jest obdarzony ładunkiem dodatnim, mamy do czynienia z podobnym przypadkiem, jak z obojętną CD. Różnica polega na tym, że kompleksując się z silnie anionową CD może zmienić się wypadkowa mobilność związku z dodatniej na ujemną. Powoduje to znaczne poszerzenie się okna detekcji, a poprzez to umożliwia lepsze rozdzielenie pików. Enancjomer silniej kompleksowany będzie miał dłuższy czas migracji (rys. VI-5).

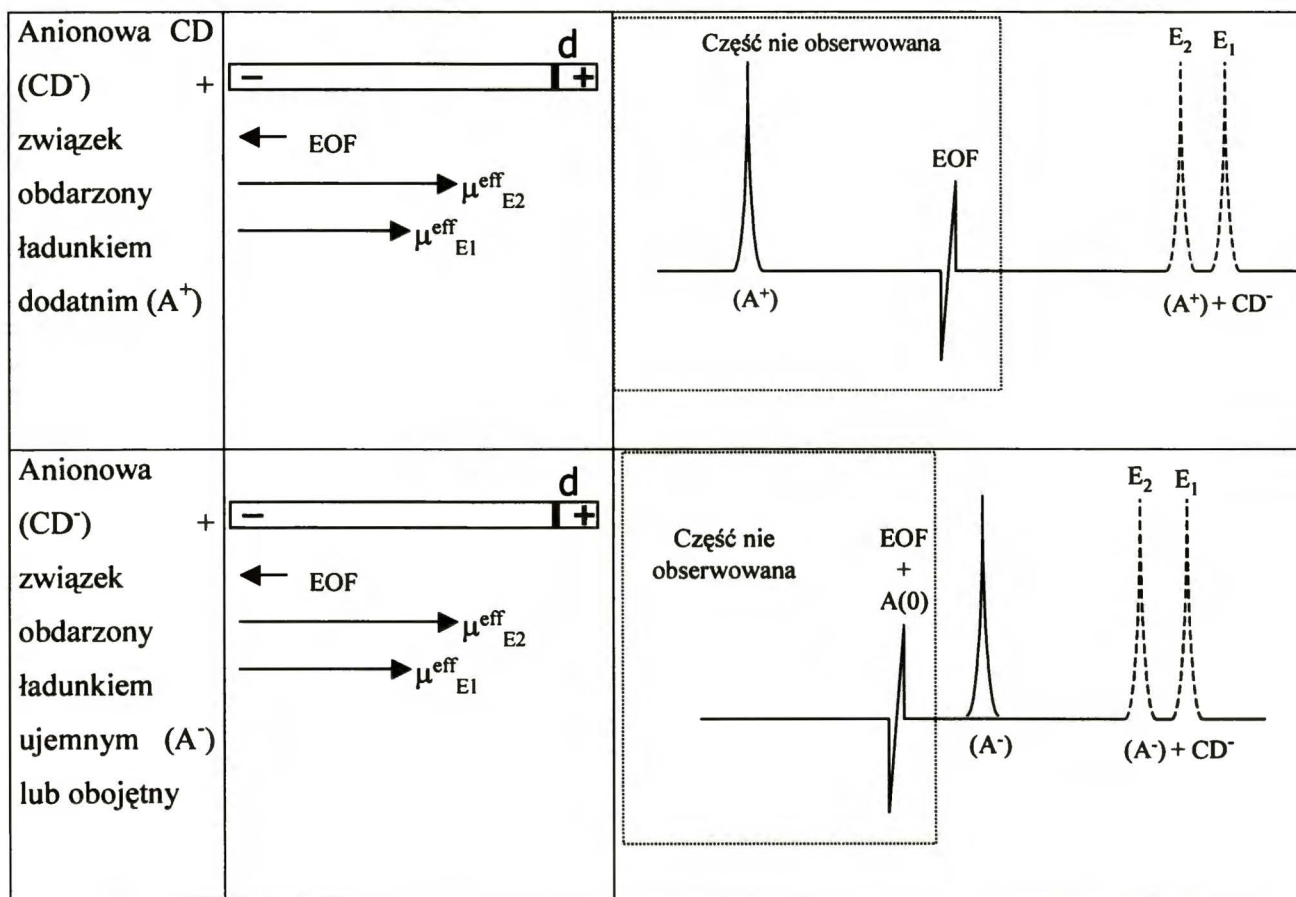




Rys. VI-5. Schemat rozdzielania cząsteczek z anionowymi CDs. Czas migracji związku wydłuża się. Silniej kompleksowany enancjomer  $E_2$  wychodzi jako drugi.

W przypadku, kiedy ujemna ruchliwość związku będzie większa niż przepływ elektroosmotyczny, związek będzie poruszać się do anody. Zmieniając polaryzację elektrod zmieniamy kierunek migracji związków. Ponieważ jednak ujemne ruchliwości dla związków kationowych, wynikające z kompleksowania z silnie ujemnym selektorem, są nietypowe i często trudno przewidywalne, lepiej pracować w warunkach kiedy EOF jako zmienną można pominąć. Wtedy szybkość migracji związku obdarzonego ładunkiem dodatnim do anody (dodatnia) jest wynikiem jedynie siły kompleksowania i ruchliwości kompleksu. Z dotychczasowych badań wynika jednak, że niewielki przeciwnie skierowany EOF warto zachować ze względu na jego pozytywny wpływ na rozdzielanie [47].

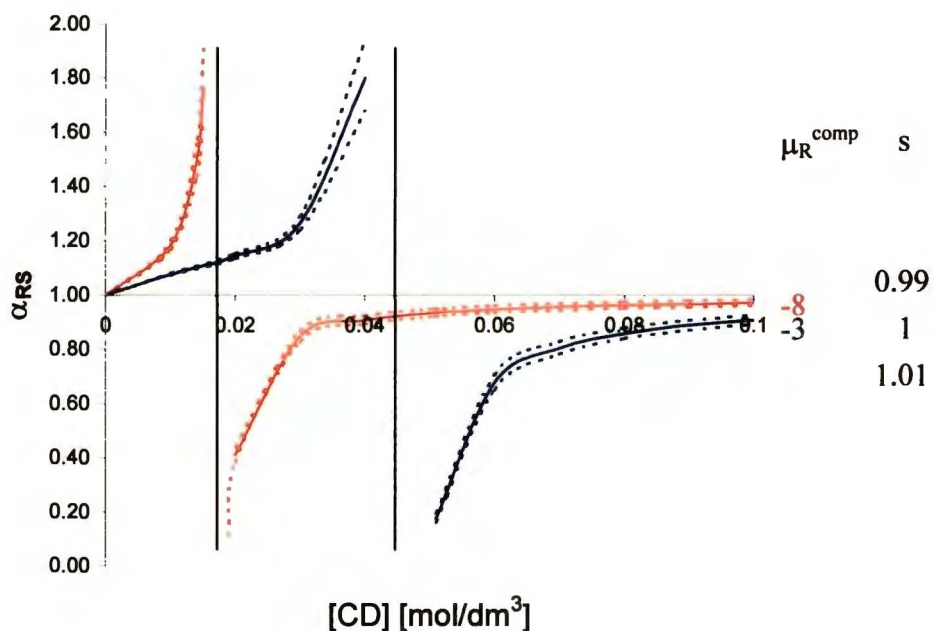
Z powodu odwróconej polaryzacji elektrod inny jest tutaj wpływ CD na ruchliwość związków. S- $\beta$ -CD przyspiesza enancjomery w związku z tym enancjomer kompleksowany silniej będzie wychodził jako pierwszy. Jest to więc prosty sposób na odwrócenie kolejności wymywanych enancjomerów (rys. VI-6)



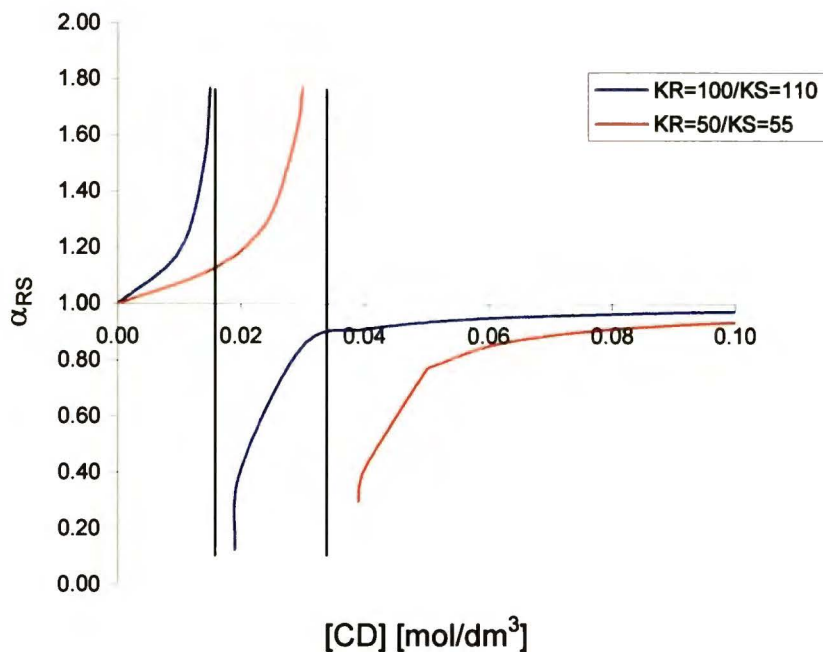
Rys. VI-6. Schemat rozdzielania cząsteczek z anionowymi CD w warunkach odwrotnej polaryzacji elektrod. Silniej kompleksowany enancjomer  $E_2$  wychodzi jako pierwszy.

Korzystając z równania (VI-2) wykreślono krzywe enancjoselektywności układu z anionową cyklodekstryną w zależności od stężenia tej cyklodekstryny dla różnych mobilności kompleksów (rys. VI-7) oraz różnych stałych trwałości (rys. VI-8). Założono stały stosunek stałych trwałości  $K_S/K_R=1,1$ .





Rys. VI-7. Symulacja zależności selektywności rozdzielania  $\alpha_{RS}$  od stężenia cyklodekstryny dla przypadku kompleksowania związku obdarzonego ładunkiem dodatnim z anionową cyklodekstryną. Założono stałe trwałości  $K_R=100$ ,  $K_S=110$ , ruchliwość elektroforetyczną wolnych enancjomerów  $\mu^{free} = 15 \text{ cm}^2 / \text{kV min}$ , ruchliwość kompleksów  $\mu^{comp} = -3 \text{ cm}^2 / \text{kV min}$  oraz  $\mu^{comp} = -8 \text{ cm}^2 / \text{kV min}$ , selektywność migracji kompleksów  $s = \mu_S^{comp} / \mu_R^{comp}$ .



Rys. VI-8. Symulacja zależności selektywności rozdzielania  $\alpha_{RS}$  od stężenia cyklodekstryny dla przypadku kompleksowania związku obdarzonego ładunkiem dodatnim z anionową cyklodekstryną dla różnych stałych trwałości pokazanych na wykresie. Założono ruchliwość elektroforetyczną wolnych enancjomerów  $\mu^{free} = 15 \text{ cm}^2 / \text{kV min}$ , ruchliwość kompleksów  $\mu^{comp} = -8 \text{ cm}^2 / \text{kV min}$ .

Z rysunków wynika, że istnieje pewne stężenie cyklodekstryny, dla którego otrzymuje się dużą selektywność [154]. Nieciągłość pokazana na rysunkach wskazująca nieskończoną selektywność osiągnięta jest dla określonego stężenia selektora, przy którym obydwa enancjomery poruszają się z ruchliwościami o przeciwnym znaku [155]. Nieciągłość ta jest osiągnięta dla tym mniejszych wartości stężenia selektora, im wyższe są stałe trwałości tworzonych kompleksów.

### VI-1.3. Układ złożony z CD obojętnej i anionowej

Kiedy stosujemy dwa czynniki selektywne, wypadkowy efekt takiego układu, przy założeniu, że obydwie CD działają niezależnie można opisać równaniem:

$$\Delta\mu^{eff} = i\Delta\mu_0 + j\Delta\mu^- \quad (VI-3)$$

gdzie wypadkowa różnica ruchliwości enancjomerów jest sumą wkładów pochodzącą od selektora obojętnego  $\Delta\mu_0$  z wkładem  $i$  oraz anionowego  $\Delta\mu^-$  z wkładem  $j$ . Wielkości  $i$  oraz  $j$  zależą od siły kompleksowania oraz stężenia poszczególnych selektorów.

Różny wpływ na mobilność związków może przekładać się na poprawę lub pogorszenie rozdzielania pików wg schematów pokazanych na rys. VI-9.

1. Obydwie CD posiadają ten sam wpływ na ruchliwość związku (przyspieszają lub opóźniają go) oraz:

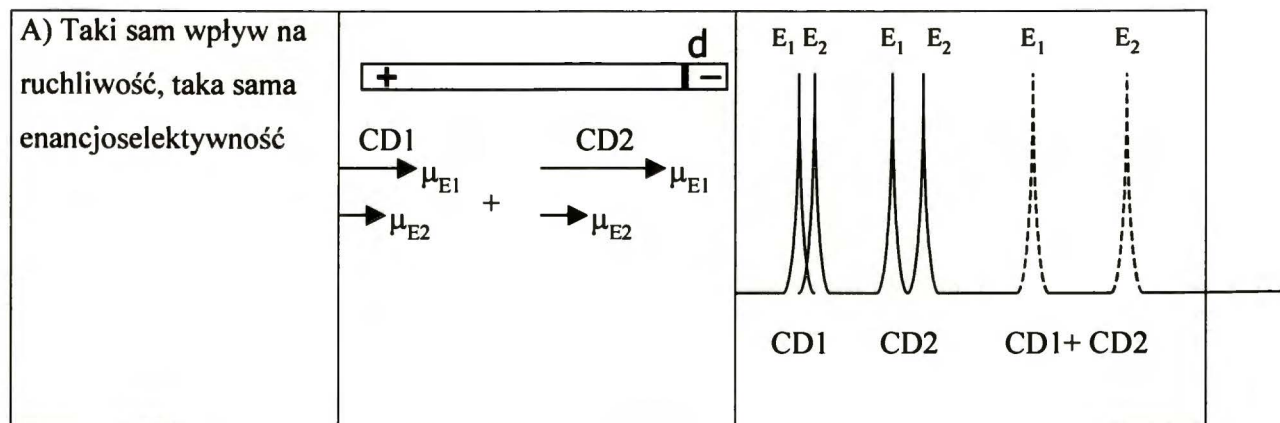
a) Obydwie CD posiadają tę samą enancjoselektywność, czyli silniej kompleksują ten sam enancjomer – **polepszenie rozdzielania**; (rys. VI-9A)

b) CD posiadają przeciwną enancjoselektywność, czyli każda kompleksuje silniej inny enancjomer - **pogorszenie rozdzielania**. (rys. VI-9B)

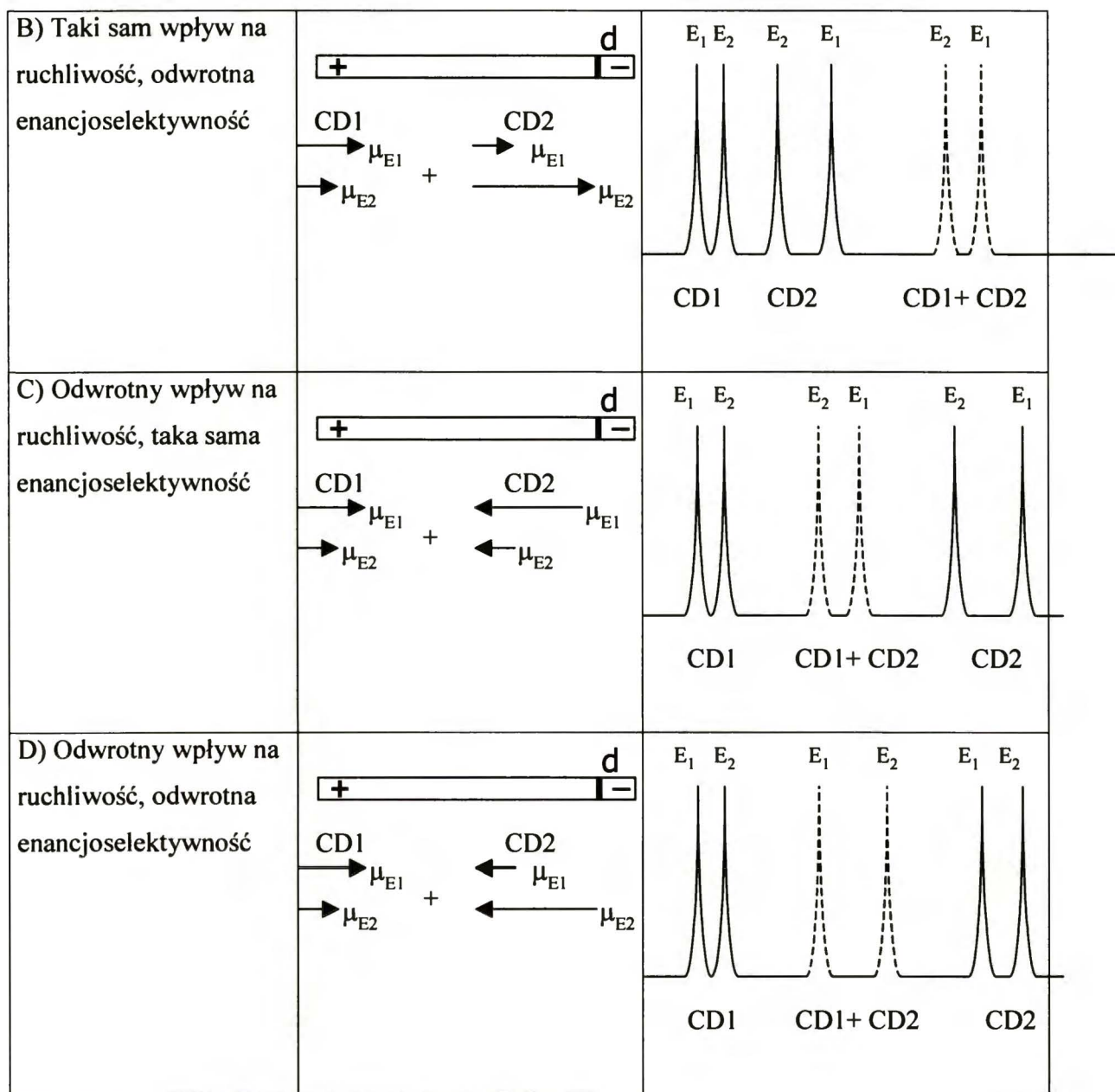
2. Obydwie CD posiadają różny wpływ na ruchliwość związku; jedna CD przyspiesza związek a druga go opóźnia oraz:

a) Obydwie CD posiadają tę samą enancjoselektywność – **pogorszenie rozdzielania**; (rys. VI-9C)

b) CD posiadają przeciwną enancjoselektywność – **polepszenie rozdzielania**. (rys. VI-9D)







Rys. VI-9. Przykładowe schematy rozdzielania cząsteczek w układzie złożonym z obojętnej oraz anionowej CD o przeciwnej i tej samej enancjoselektywności.

Wykorzystując model stworzony dla układów z zastosowaniem jednej cyklodekstryny, przedstawiony w rozdziałach VI-1.1 oraz VI-1.2, w niniejszej pracy rozszerzono go na układ z dwoma cyklodekstrynami. Oczywiście modele te są słuszne również dla selektorów innych niż cyklodekstryny, a mających tę samą charakterystykę elektroforetyczną (selektor obojętny i selektor obdarzony ładunkiem ujemnym).

Chcąc przedstawić dla rozważań przedstawionych powyżej opis matematyczny należy skorzystać z równania (II-16). Ponieważ w układzie mamy teraz dwie cyklodekstryny związek A będzie oddziaływał z każdą z nich. Zakładając, że obie cyklodekstryny działają niezależnie można napisać:



Efektywna mobilność związku określona jest teraz następująco:

$$\mu_R^{eff} = \mu^{free} (1 - \beta_R^{compl} - \beta_R^{complII}) + \mu_R^{compl} \beta_R^{compl} + \mu_R^{complII} \beta_R^{complII} \quad (VI-4)$$

$$\mu_S^{eff} = \mu^{free} (1 - \beta_S^{compl} - \beta_S^{complII}) + \mu_S^{compl} \beta_S^{compl} + \mu_S^{complII} \beta_S^{complII}$$

gdzie:

$$\beta_R^{compl} = \frac{[A_RCDI]}{[A_R] + [A_RCDI] + [A_RCDII]} \quad (VI-5)$$

$$\beta_S^{compl} = \frac{[A_S CDI]}{[A_S] + [A_S CDI] + [A_S CDII]}$$

$$\beta_R^{compl} = \frac{[A_R CDII]}{[A_R] + [A_R CDI] + [A_R CDII]}$$

$$\beta_S^{compl} = \frac{[A_S CDII]}{[A_S] + [A_S CDI] + [A_S CDII]}$$

Ponieważ

$$K_R^{compl} = \frac{[A_R CDI]}{[A_R][CDI]} \rightleftharpoons [A_R CDI] = K_R^{compl} [A_R][CDI] \quad (VI-5)$$

6)

$$K_S^{compl} = \frac{[A_S CDI]}{[A_S][CDI]} \rightleftharpoons [A_S CDI] = K_S^{compl} [A_S][CDI]$$

$$K_R^{compl} = \frac{[A_R CDII]}{[A_R][CDII]} \rightleftharpoons [A_R CDII] = K_R^{compl} [A_R][CDII]$$

$$K_S^{compl} = \frac{[A_S CDII]}{[A_S][CDII]} \rightleftharpoons [A_S CDII] = K_S^{compl} [A_S][CDII]$$

Podstawiając do wzoru (VI-5) otrzymujemy:

$$\beta_R^{compl} = \frac{K_R^{compl} [CDI]}{1 + K_R^{compl} [CDI] + K_R^{compl} [CDII]} \quad (VI-7)$$



$$\beta_S^{compl} = \frac{K_S^{compl} [CDI]}{1 + K_S^{compl} [CDI] + K_S^{complII} [CDII]}$$

$$\beta_R^{complII} = \frac{K_R^{complII} [CDII]}{1 + K_R^{compl} [CDI] + K_R^{complII} [CDII]}$$

$$\beta_S^{complII} = \frac{K_S^{complII} [CDII]}{1 + K_S^{compl} [CDI] + K_S^{complII} [CDII]}$$

Zależność efektywnych ruchliwości w zależności od stałych trwałości oraz stężenia cyklodekstryn można teraz wyrazić następująco:

$$\mu_R^{eff} = \frac{\mu^{free} + \mu_R^{compl} K_R^{compl} [CDI] + \mu_R^{complII} K_R^{complII} [CDII]}{1 + K_R^{compl} [CDI] + K_R^{complII} [CDII]} \quad (VI-8)$$

$$\mu_S^{eff} = \frac{\mu^{free} + \mu_S^{compl} K_S^{compl} [CDI] + \mu_S^{complII} K_S^{complII} [CDII]}{1 + K_S^{compl} [CDI] + K_S^{complII} [CDII]}$$

Przy założeniu, że  $\mu_R^{compl} = \mu_S^{compl} = \mu^{compl}$  oraz

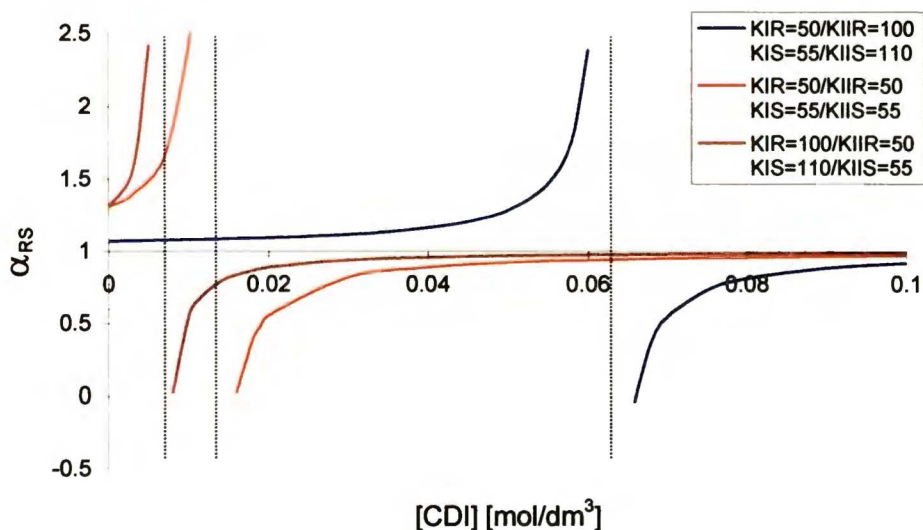
$$\mu_R^{complII} = \mu_S^{complII} = \mu^{complII}$$

efektywny współczynnik selektywności, można wyrazić wzorem:

$$\alpha_{RS}^{eff} = \frac{(\mu^{free} + \mu^{compl} K_R^{compl} [CDI] + \mu^{complII} K_R^{complII} [CDII])(1 + K_S^{compl} [CDI] + K_S^{complII} [CDII])}{(\mu^{free} + \mu^{compl} K_S^{compl} [CDI] + \mu^{complII} K_S^{complII} [CDII])(1 + K_R^{compl} [CDI] + K_R^{complII} [CDII])} \quad (VI-9)$$

Na rys. VI-10 przedstawiono wyniki symulacji zależności selektywności układu od stężenia jednej z cyklodekstryn otrzymane wg równania (VI-9). Aby uprościć model stężenie CDII założono na stałym poziomie  $0,05 \text{ mol/dm}^3$ .

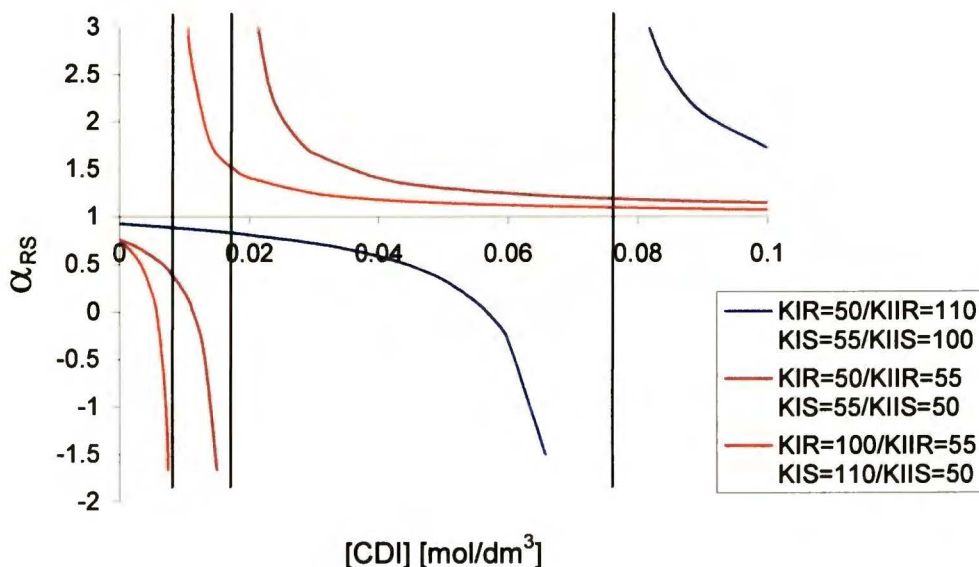
Przyjęto następujące założenia: stosunek stałych trwałości w każdym przypadku  $K_S/K_R=1,1$ , ruchliwość nieskompleksowanego związku  $\mu^{free} = 15 \text{ cm}^2 / \text{kV min}$ , ruchliwość kompleksów z CDI  $\mu^{compl} = 8 \text{ cm}^2 / \text{kV min}$  oraz z CDII  $\mu^{compl} = -8 \text{ cm}^2 / \text{kV min}$ .



Rys. VI-10. Symulacja zależności selektywności rozdzielania  $\alpha_{RS}$  od stężenia cyklodekstryny CDI. Stężenie CDII =  $0,05 \text{ mol/dm}^3$ . Założono stosunek stałych trwałości  $K_R/K_S=1,1$  dla obu cyklodekstryn. Ruchliwość elektroforetyczna wolnych enancjomerów  $\mu^{free} = 15 \text{ cm}^2 / \text{kV min}$ , ruchliwość kompleksów z CDI  $\mu^{compl} = 8 \text{ cm}^2 / \text{kV min}$  oraz z CDII  $\mu^{compl} = -8 \text{ cm}^2 / \text{kV min}$ .

Jak można zauważyć, przebieg wykresów jest taki sam jak dla anionowej cyklodekstryny. Obserwuje się również nieciągłość wskazującą na optymalne stężenie cyklodekstryny CDI, przy którym uzyskuje się najlepsze rozdzielenie enancjomerów.

Zmieniając stosunek stałych trwałości cyklodekstryny CDII na odwrotny, co ma sens fizyczny jako zmiana jej enancjoselektywności, otrzymujemy wykresy symetryczne względem osi X (rys. VI-11). Wskazuje to na zmianę kolejności migracji enancjomerów.



Rys. VI-11. Symulacja zależności selektywności rozdzielania  $\alpha_{RS}$  od stężenia cyklodekstryny CDI. Stężenie CDII=0,05 mol/dm<sup>3</sup>. Założono stosunek stałych trwałości  $K_R/K_S=0,9$  dla CDI oraz  $K_R/K_S=1,1$  dla CDII. Ruchliwość elektroforetyczna wolnych enancjomerów  $\mu^{free} = 15\text{cm}^2 / \text{kV min}$ , ruchliwość kompleksów z CDI  $\mu^{compl} = 8\text{cm}^2 / \text{kV min}$  oraz z CDII  $\mu^{compl} = -8\text{cm}^2 / \text{kV min}$ .

#### VI-1.4. Porównanie enancjoselektywności oraz ruchliwości elektroforetycznych w układzie pojedynczym i podwójnym

Porównując selektywności dla układu z obojętną cyklodekstryną (rozdział VI-1.1) oraz cyklodekstryną anionową (rozdział VI-1.2) przy tych samych wartościach stałych trwałości wziętych do symulacji zauważamy, że są one zdecydowanie wyższe dla cyklodekstryn anionowych. Maksymalne wartości dla cyklodekstryn obojętnych wynoszą 1,08 natomiast dla anionowych można osiągnąć wartości nieskończenie duże. Dlatego

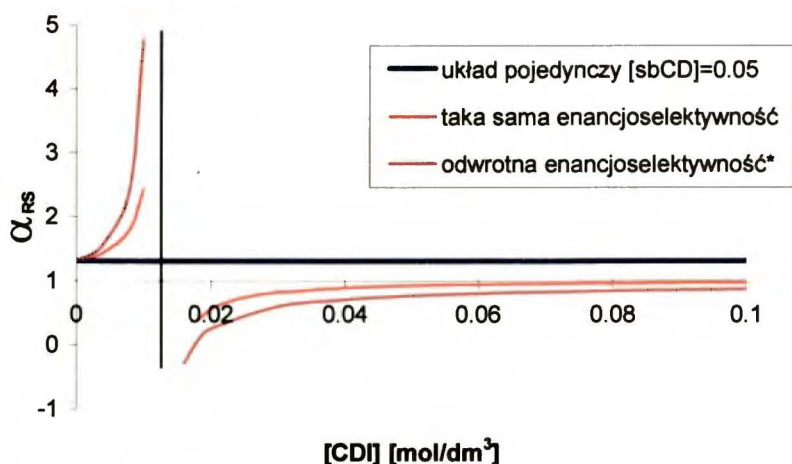
porównując układ złożony z dwóch cyklodekstryn jako odniesienie przyjęto pojedynczy układ z anionową cyklodekstryną.

W symulacji założono stałe trwałości dla CDI=50/55 oraz CDII=50/55. Wyniki prezentuje rys. VI-12. Ponieważ w symulacjach zawsze przyjmowano stałą wartość stężenia CDII=0,05 mol/dm<sup>3</sup>, na wykresie przedstawia ją pozioma linia przy wartości  $\alpha=1,31$ . Wartość ta uzyskana dla układu pojedynczego jest odnośnikiem dla układów podwójnych. Na wykresie VI-12 przedstawiono symulacje, w której zmieniano stężenie obojętnej cyklodekstryny w zakresie 0-0,1 [mol/dm<sup>3</sup>]. Przyjęto najpierw tę samą, a następnie odwrotną enancjoselektywność cyklodekstryn. Dla lepszego zilustrowania różnic, wyniki dla odwrotnej enancjoselektywności przedstawiono w postaci  $1/\alpha$ .

Z rysunku wynika, że w układzie dwóch cyklodekstryn selektywność rozdzielania enancjomerów jest w pewnym zakresie stężeń znacznie lepsza w porównaniu do układu pojedynczego. W szczególności dobre rezultaty uzyskuje się w przypadku, gdy cyklodekstryny posiadają przeciwne enancjoselektywności do związku. Co ciekawe, przy tej samej enancjoselektywności istnieje zakres stężeń, w którym następuje poprawa selektywności w porównaniu z układem pojedynczym.

Dla przyjętych założeń, maksymalne stężenie obojętnej cyklodekstryny, dla której widoczna jest poprawa selektywności przy tej samej enancjoselektywności cyklodekstryn wynosi 0,025 [mol/dm<sup>3</sup>] a dla odwrotnej enancjoselektywności 0,04 [mol/dm<sup>3</sup>]. Kiedy w roztworze zaczyna dominować obojętna CD, charakteryzująca się niższą selektywnością, selektywność staje się coraz gorsza.

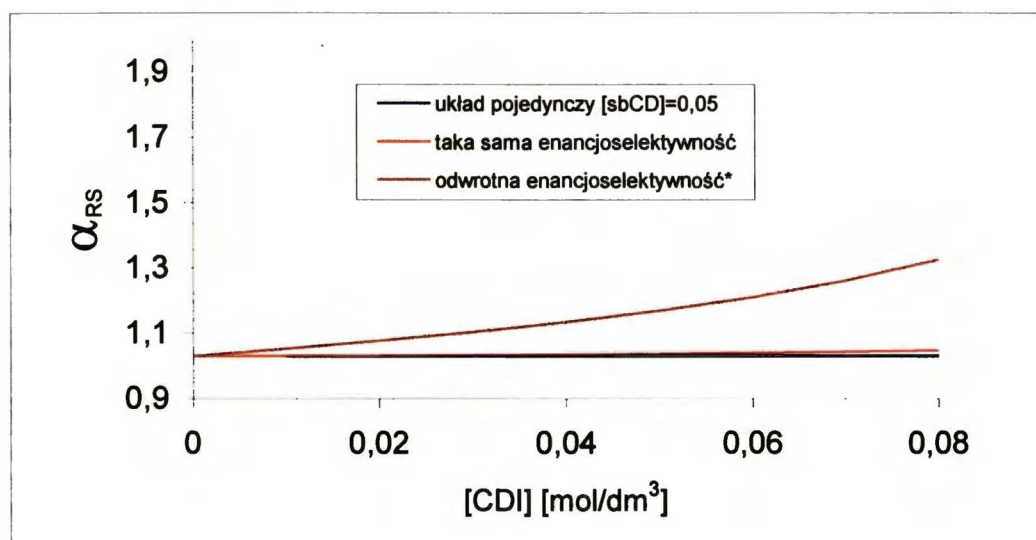




\*) Na wykresie przedstawiono  $1/\alpha$ .

Rys. VI-12. Symulacja zależności selektywności rozdzielania  $\alpha_{RS}$  od stężenia obojętnej cyklodekstryny. Stężenie  $CDII=0,05 \text{ mol/dm}^3$ . Założono stałe trwałości dla  $CDI=50/55$  oraz  $CDII=50/55$ . Ruchliwość elektroforetyczna wolnych enancjomerów  $\mu^{free} = 15 \text{ cm}^2 / \text{kV min}$ , ruchliwość kompleksów z  $CDI \mu^{compl} = 8 \text{ cm}^2 / \text{kV min}$  oraz z  $CDII \mu^{compl} = -8 \text{ cm}^2 / \text{kV min}$ .

Bardziej typowy przypadek dla oddziaływań związków obdarzonych ładunkiem dodatnim z ujemnie naładowanym selektorem otrzymamy przy założeniu, że stałe trwałości są na poziomie 1000/1100. Stałe trwałości dla  $CDI$  pozostawiono na poprzednim poziomie 50 i 55. Wykorzystując symulacje dla układu pojedynczego wybrano stężenie  $CDII$  ( $s\text{-}\beta\text{-CD}$ ) na poziomie  $0,01 \text{ mol/dm}^3$ , przy którym w układzie pojedynczym  $\alpha$  wynosi 1,03 (dla mniejszych stężeń selektora  $\alpha$  dąży do nieskończoności, jednak nie jest to wartość optymalna z punktu widzenia analizy enancjomerycznej związku). Symulacje dla tych warunków przedstawia rys. VI-13. Dodając do takiego układu drugi selektor, który posiada odwrotną enancjoselektywność w stosunku do pierwszego, a jednocześnie dużo słabiej oddziałuje z rozdzielanym związkiem (dużo mniejsze stałe trwałości) widzimy ciągłą poprawę selektywności układu w analizowanym zakresie stężeń:  $0\text{-}0,1 \text{ [mol/dm}^3\text{]}$ .

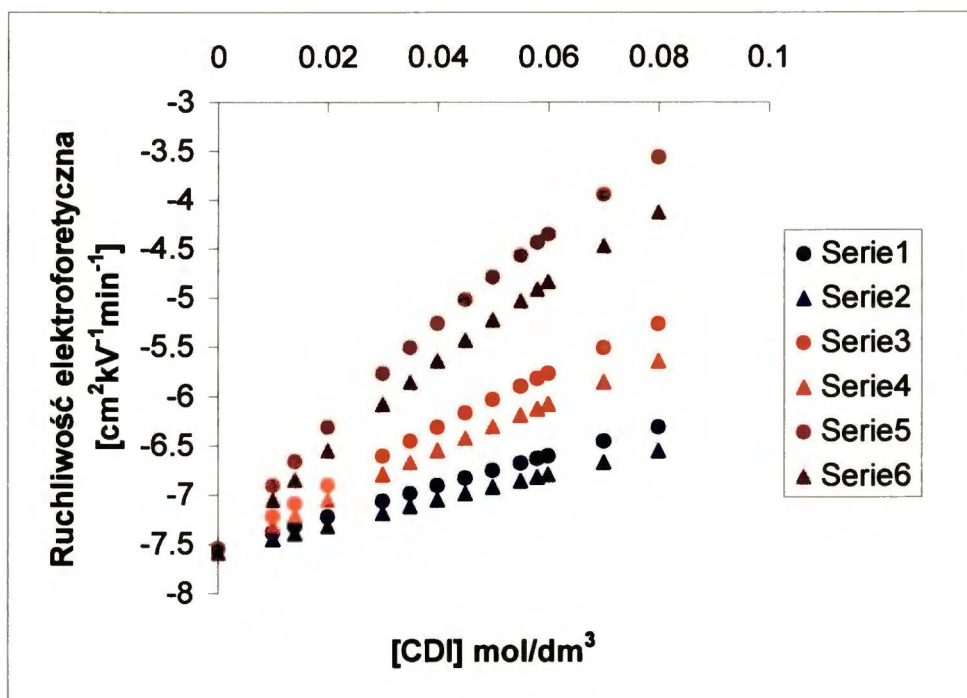


\*) Na wykresie przedstawiono  $1/\alpha$ .

*Rys. VI-13. Symulacja zależności selektywności rozdzielania  $\alpha_{RS}$  od stężenia obojętnej cyklodekstryny. Stężenie  $CDII=0,01 \text{ mol/dm}^3$ . Założono stałe trwałości dla  $CDI=50/55$  oraz  $CDII=1000/1100$ . Ruchliwość elektroforetyczna wolnych enancjomerów  $\mu^{free} = 15 \text{ cm}^2 / \text{kV min}$ , ruchliwość kompleksów z  $CDI$   $\mu^{compl} = 8 \text{ cm}^2 / \text{kV min}$  oraz z  $CDII$   $\mu^{compl} = -8 \text{ cm}^2 / \text{kV min}$ .*

Dla tej samej enancjoselektywności niewielka poprawa widoczna jest przy wysokich stężeniach obojętnej selektora. Poprawa ta wynika prawdopodobnie z przesunięcia w kierunku optymalnego stężenia dla danego selektora.

Wprowadzenie do układu z anionową cyklodekstryną cyklodekstryny obojętnej wpływa również na zmianę ruchliwości elektroforetycznej związków. Zmiany te przedstawia rys. VI-14.



Rys. VI-14. Symulacja zależności ruchliwości elektroforetycznej enancjomerów  $\mu^{eff}$  od stężenia obojętnej cyklodekstryny dla różnych stałych trwałości CDI. Stężenie  $CDI=0,05 \text{ mol/dm}^3$ . Założono stałą trwałości dla  $CDI=1000/1100$ . Ruchliwość elektroforetyczna wolnych enancjomerów  $\mu^{free} = 15 \text{ cm}^2 / \text{kV min}$ , ruchliwość kompleksów z CDI  $\mu^{compl} = 8 \text{ cm}^2 / \text{kV min}$  oraz z  $CDI \mu^{compl} = -8 \text{ cm}^2 / \text{kV min}$ .

Po dodaniu obojętnej CD moduł ruchliwości elektroforetycznej maleje. Zmiany te są tym większe, im większe są stałe trwałości kompleksów związku z dodaną cyklodekstryną. Mniejsze ruchliwości elektroforetyczne oznaczają z kolei krótsze czasy migracji i w konsekwencji szybsze analizy.

Jak wynika z powyższych przykładów dodanie do anionowej cyklodekstryny cyklodekstryny obojętnej powoduje poprawę selektywności takiego układu, przynajmniej w pewnym zakresie stężeń oraz skrócenie czasów analiz.

## **VI-2. Rozdzielanie enancjomerów w układach pojedynczych**

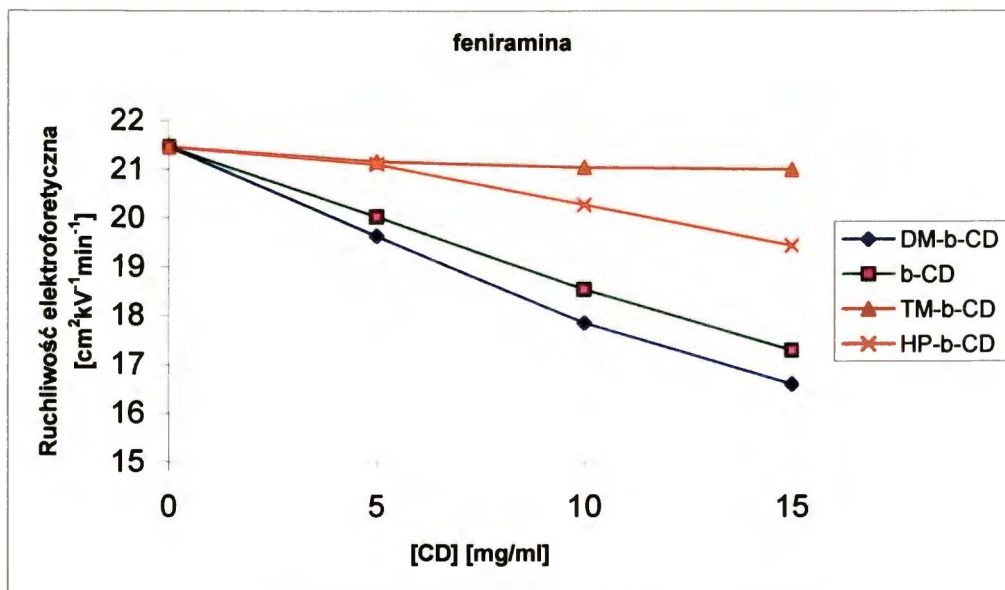
Na podstawie rozważań z poprzedniego rozdziału stwierdzamy, że można tak zaprojektować układ elektroforetyczny, aby uzyskać optymalną enancjoselektywność układu z zastosowaniem dwóch cyklodekstryn. Wymaga to w pierwszym etapie przebadania wpływu poszczególnych czynników na rozdzielanie w układach z pojedynczą CD, w celu uzyskania takich podstawowych informacji jak:

- stałe trwałości kompleksów,
- ruchliwości elektroforetyczne związków.

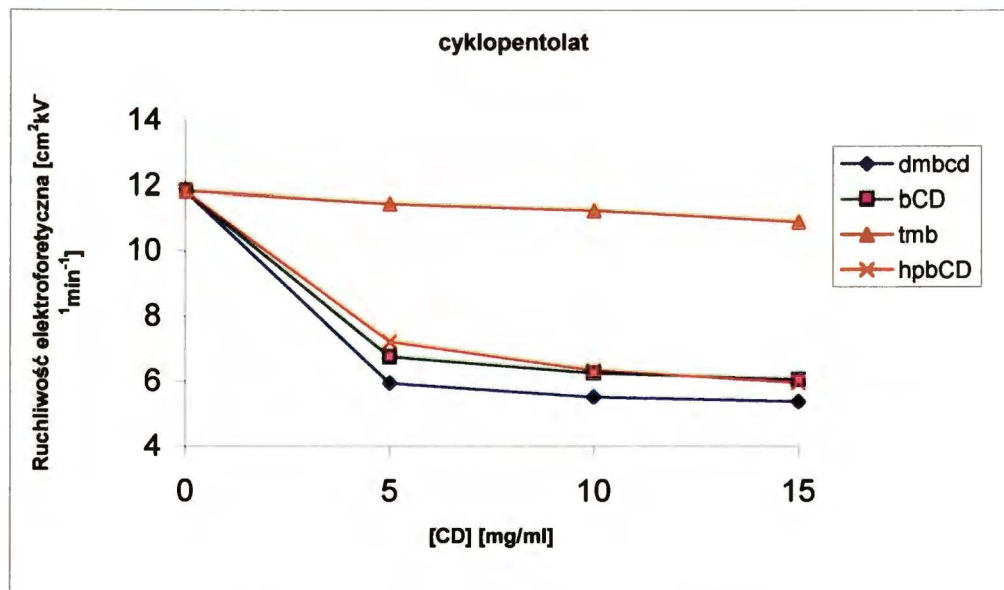
### **VI-2.1. Cyklodekstryny obojętne**

Z szeregu dostępnych obojętnych CD do badań wybrano  $\beta$ -CD, DM- $\beta$ -CD, HP- $\beta$ -CD oraz TM- $\beta$ -CD. Podjęto również próby rozdzielania z  $\alpha$ - oraz  $\gamma$ -CD, ale żadna z nich nie powodowała rozróżnienia chiralnego badanych związków w wybranych warunkach. Z kolei  $\beta$ -CD oraz jej pochodne wykazują z analizowanymi związkami różne oddziaływania; w różny sposób wpływają na ich ruchliwości, a także rozróżnienie chiralne. Na *rys. VI-15* i *rys. VI-16* pokazano przykładowy wpływ wzrostu stężenia obojętnych cyklodekstryn na ruchliwość amin.





Rys. VI-15. Wpływ stężenia cyklodekstryn na ruchliwość elektroforetyczną feniraminę dla  $pH=2,5$  przy normalnej polaryzacji elektrod. Warunki: bufor Tris  $18mM$ , temp.  $25^{\circ}C$ , napięcie  $25kV$ , średnica kapilary  $75\mu m$ .



Rys. VI-16. Wpływ stężenia cyklodekstryn na ruchliwość elektroforetyczną cyklopentolatu (dla pierwszego enancjomeru) dla  $pH=2,5$  przy normalnej polaryzacji elektrod. Warunki: bufor Tris  $18mM$ , temp.  $25^{\circ}C$ , napięcie  $25kV$ , średnica kapilary  $75\mu m$ .

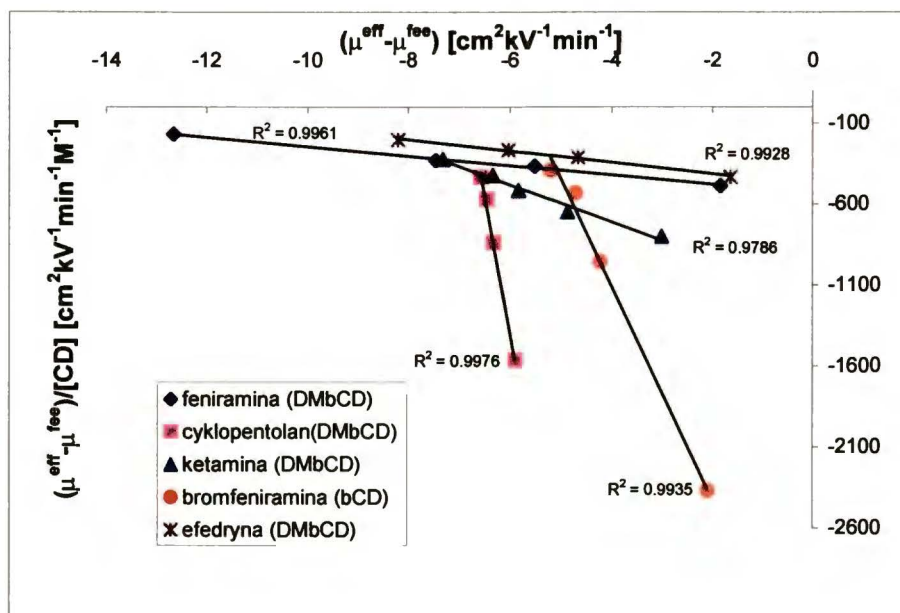
Zgodnie z rozważaniami teoretycznymi, na podstawie przedstawionych wyników widzimy, że obojętne cyklodekstryny powodują zmniejszenie ruchliwości elektroforetycznych badanych amin w przebadanym zakresie stężeń 0-15 [mg/ml]. Największy wpływ, a więc i najsilniejsze kompleksowanie obserwujemy dla DM-β-CD, natomiast najslabiej kompleksuje TM-β-CD. β-CD oraz HP-β-CD wykazują pośrednią tendencję do kompleksowania. Chcąc określić zmiany ilościowe, w dalszej części pracy wyznaczono stałe trwałości kompleksów.

### **VI-2.1.1. Wyznaczanie stałych trwałości kompleksów**

Ponieważ przedstawione w części literaturowej równanie (II-21) dotyczy tworzenia się kompleksów o stechiometrii 1:1, należało sprawdzić czy można je zastosować do badanych kompleksów. W tym celu wykorzystano metodę linearyzacji powyższego równania do postaci VI-10 [156]:

$$\frac{\mu^{eff} - \mu^{free}}{[CD]} = -K(\mu^{eff} - \mu^{free}) + K(\mu^{comp} - \mu^{free}) \quad (VI-10)$$

Na wykresie (rys. VI-17) przedstawiono zależność  $(\mu^{eff} - \mu^{free})/[CD]$  w funkcji  $(\mu^{eff} - \mu^{free})$  dla wybranych związków. Ponieważ dla badanych amin zależność ta jest liniowa ( $R^2 \geq 0.97$ ), można obliczyć wartości stałych K wg modelu o stechiometrii 1:1.



Rys. VI-17. Zależność  $(\mu^{eff} - \mu^{free})/[CD]$  w funkcji  $(\mu^{eff} - \mu^{free})$  dla wybranych związków.

Stałe trwałości wyznaczone metodą nieliniowej regresji danych eksperymentalnych oraz najlepsze wartości  $R_S$  uzyskane dla danej CD zestawione są w Tabeli VI-1.

Tabela VI-1. Stałe trwałości kompleksów badanych związków z obojętnymi cyklodekstrynami (K1-z enancjomerem wychodzącym jako pierwszy, K2- enancjomerem wychodzącym jako drugi), stosunek ruchliwości oraz najlepszy uzyskany współczynnik rozdzielenia pików.

		K1 [l/mol]	K2/K1	$\mu_1/\mu_2$	$R_S^{max}$
Epinefryna	$\beta$ -CD	13,4 $\pm$ 0,072	1,00	1,00	0
	DM- $\beta$ -CD	26,3 $\pm$ 2,87	1,12	1,07	1,93
	HP- $\beta$ -CD	15,0 $\pm$ 0,459	1,11	1,02	0,86
	TM- $\beta$ -CD	5,6 $\pm$ 0,287	1,00	1,00	0
Cyclopentolat	$\beta$ -CD	1035,8 $\pm$ 21,7	1,32	1,04	0,53
	DM- $\beta$ -CD	1769,2 $\pm$ 14,99	1,00	1,00	0
	HP- $\beta$ -CD	590,1 $\pm$ 10,2	1,45	1,04	1,15
	TM- $\beta$ -CD	7,93 $\pm$ 0,362	1,26	1,03	1,18
Brom-feniramina	$\beta$ -CD	137,1 $\pm$ 0,40	1,07	1,02	0,52
	DM- $\beta$ -CD	252,6 $\pm$ 4,73	1,00	1,00	0
	HP- $\beta$ -CD	40,8 $\pm$ 0,325	1,06	1,02	0,55
	TM- $\beta$ -CD	12,6 $\pm$ 0,075	1,00	1,00	0,2
Doksylamina	$\beta$ -CD	19,7 $\pm$ 0,122	1,09	1,02	1,76
	DM- $\beta$ -CD	28,5 $\pm$ 0,282	1,05	1,01	1,05
	HP- $\beta$ -CD	9,82 $\pm$ 0,619	1,07	1,01	0,79
	TM- $\beta$ -CD	2,97 $\pm$ 0,109	1,00	1,00	0
Bametan	$\beta$ -CD	20,6 $\pm$ 0,158	1,00	1,00	0
	DM- $\beta$ -CD	37,5 $\pm$ 1,11	1,16	1,04	1,44
	HP- $\beta$ -CD	18,5 $\pm$ 0,642	1,07	1,02	0,49
	TM- $\beta$ -CD	4,12 $\pm$ 0,45	1,07	1,00	0
Feniramina	$\beta$ -CD	17,9 $\pm$ 0,328	1,00	1,00	0
	DM- $\beta$ -CD	25,8 $\pm$ 0,99	1,00	1,00	0
	HP- $\beta$ -CD	8,68 $\pm$ 0,821	1,00	1,00	0
	TM- $\beta$ -CD	2,19 $\pm$ 0,191	1,00	1,00	0
Metoksyfenamina	$\beta$ -CD	14,4 $\pm$ 0,532	1,08	1,01	0,82
	DM- $\beta$ -CD	30,1 $\pm$ 0,641	1,07	1,02	1,07
	HP- $\beta$ -CD	11,8 $\pm$ 0,736	1,08	1,01	0,96
	TM- $\beta$ -CD	3,73 $\pm$ 0,084	1,00	1,00	0
Efedryna	$\beta$ -CD	21,6 $\pm$ 0,393	1,00	1,00	0
	DM- $\beta$ -CD	35,8 $\pm$ 0,666	1,04	1,01	0,24
	HP- $\beta$ -CD	16,5 $\pm$ 0,747	1,00	1,00	0
	TM- $\beta$ -CD	3,1 $\pm$ 0,077	1,00	1,00	0
Ketamina	$\beta$ -CD	87,4 $\pm$ 0,392	1,07	1,02	0,62
	DM- $\beta$ -CD	106,1 $\pm$ 2,13	1,01	1,02	0,83
	HP- $\beta$ -CD	27,2 $\pm$ 0,136	1,10	1,01	0
	TM- $\beta$ -CD	4,27 $\pm$ 0,223	1,01	1,00	0,23

Warunki: Bufor Tris 18mM, pH=2,5, temp 25°C, napięcie 25kV, stężenie XCD 15mg/ml, średnica kapilary 75 $\mu$ m.



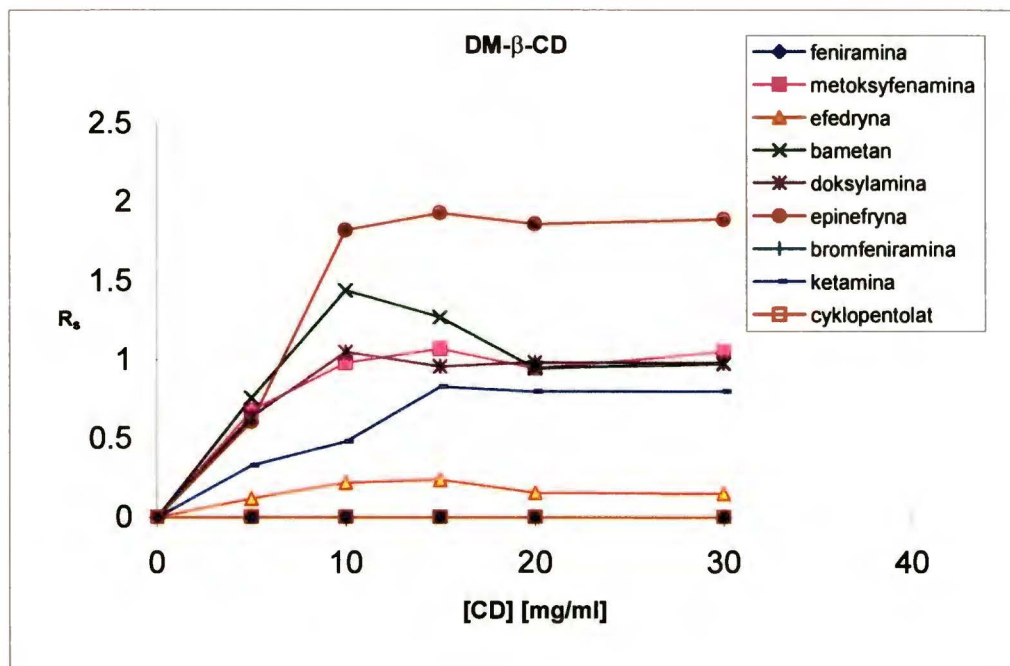
Na podstawie wyników przedstawionych w tabeli możemy zauważyć, że:

1. Wszystkie badane aminy tworzą kompleksy inkluzyjne z obojętnymi cyklodekstrynami,
2. Najtrwalsze kompleksy tworzą się z DM- $\beta$ -CD, zaś najmniej trwałe z TM- $\beta$ -CD. Stałe trwałości kompleksów z  $\beta$ -CD i HP- $\beta$ -CD mają wartości pośrednie, przy czym dla  $\beta$ -CD są one nieco wyższe (z wyjątkiem epinefryny),
3. Cyklopentolat tworzy z  $\beta$ -CD, DM- $\beta$ -CD oraz HP- $\beta$ -CD kilkadziesiąt razy trwalsze kompleksy od innych związków. Stała trwałości z TM- $\beta$ -CD, porównywalna z wartością dla innych związków może wskazywać, że za siłę kompleksowania odpowiedzialne są wiązania wodorowe, mogące się tworzyć pomiędzy cyklodekstrynowymi grupami hydroksylowymi i karboksylową cyklopentolatu,
4. Wysokie stałe trwałości kompleksów są obserwowane dla  $\beta$ -CD i DM- $\beta$ -CD z ketaminą oraz bromfeniraminą,
5. W badanym zakresie stężeń jedynie w dwóch przypadkach uzyskano współczynnik rozdzielania enancjomerów do podstawy ( $R_S \geq 1,5$ ); dla epinefryny oraz doksyliny,
6. Najwięcej związków dzieli się z DM- $\beta$ -CD oraz HP- $\beta$ -CD, a najmniej z TM- $\beta$ -CD. Jak widać niesymetryczne podstawienie grup hydroksylowych w DM- $\beta$ -CD, a więc mniejsza jej symetria ma dodatkowy wpływ na rozróżnienie chiralne.

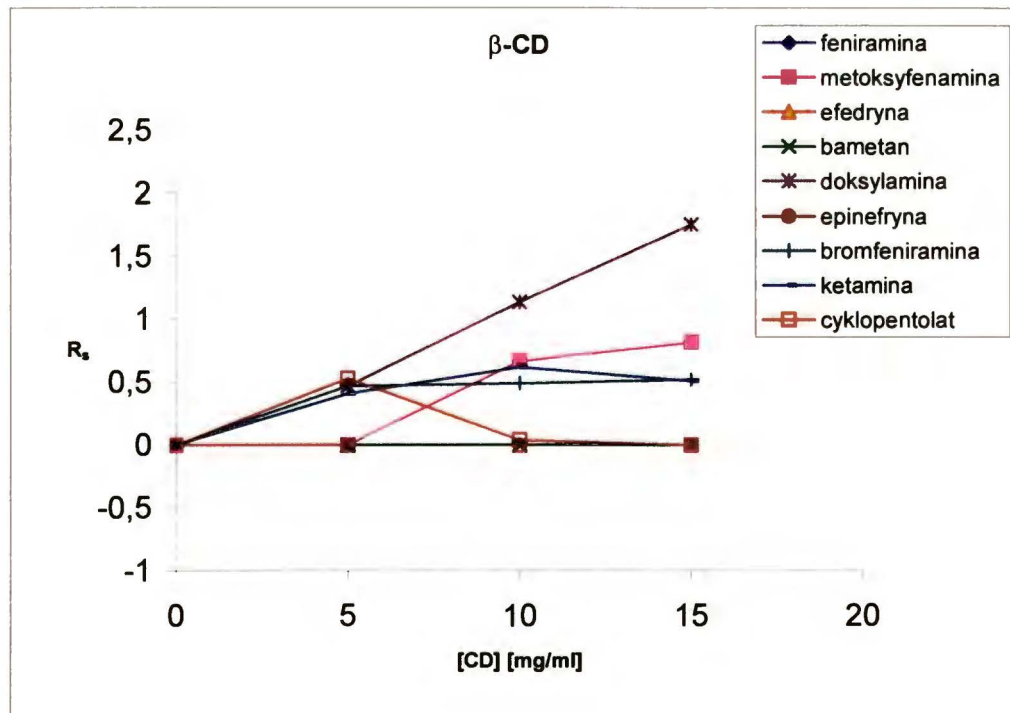
### **VI-2.1.2. Wpływ stężenia cyklodekstryny na $R_S$ oraz selektywność**

Ponieważ ze względów analitycznych najważniejszym parametrem opisującym rozdzielanie pików jest rozdzielczość ( $R_S$ ), na poniższych rysunkach przedstawiono wpływ stężenia cyklodekstryn zarówno na selektywność układu jak i  $R_S$  dla badanych związków.

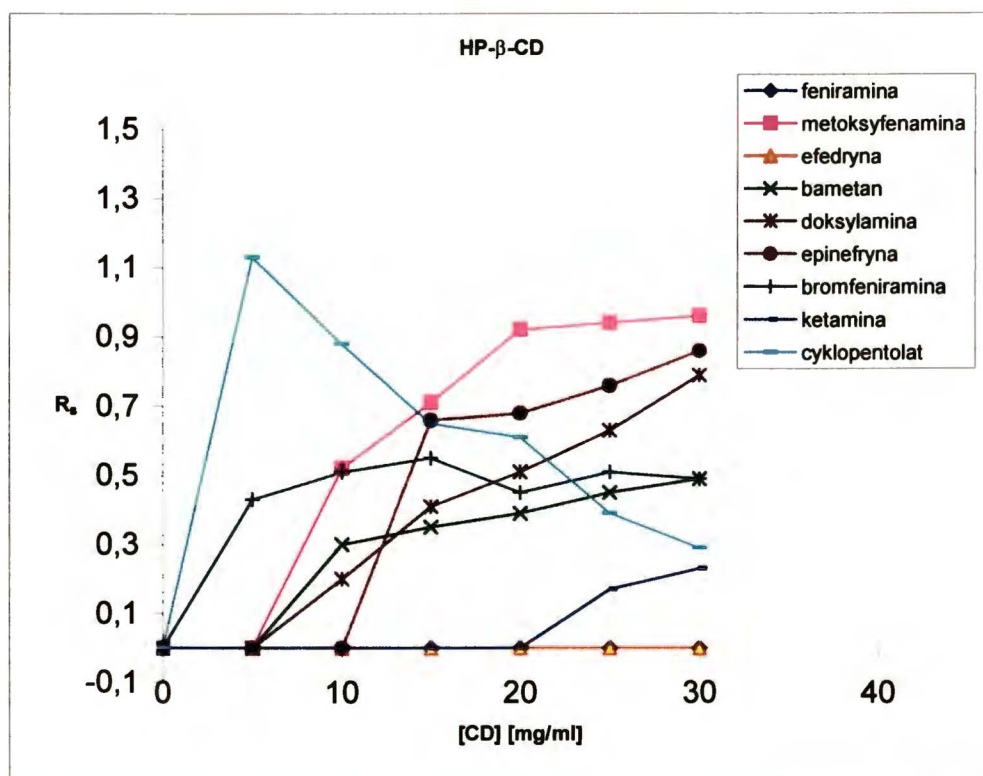
A)



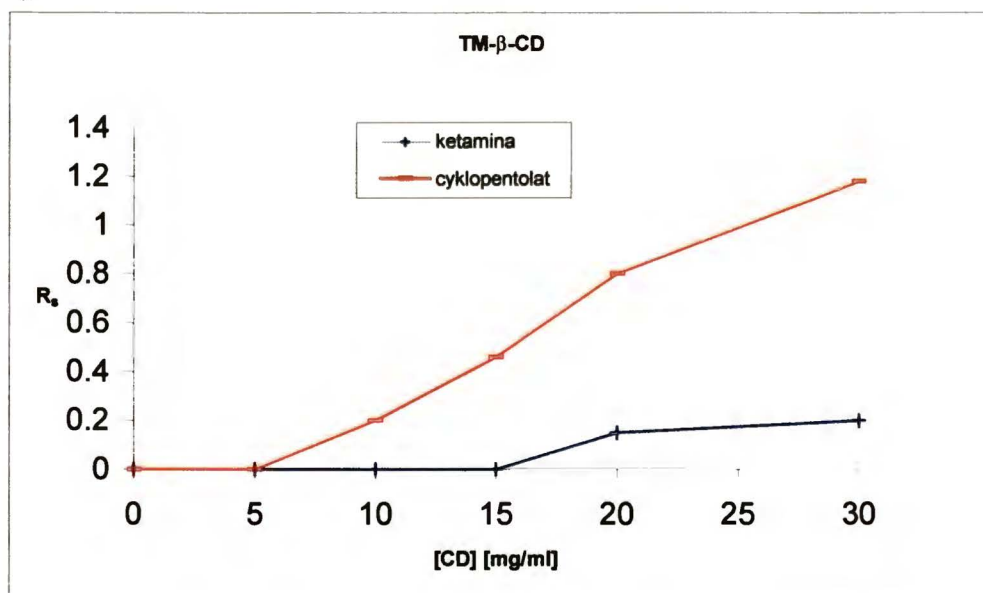
B)



C)



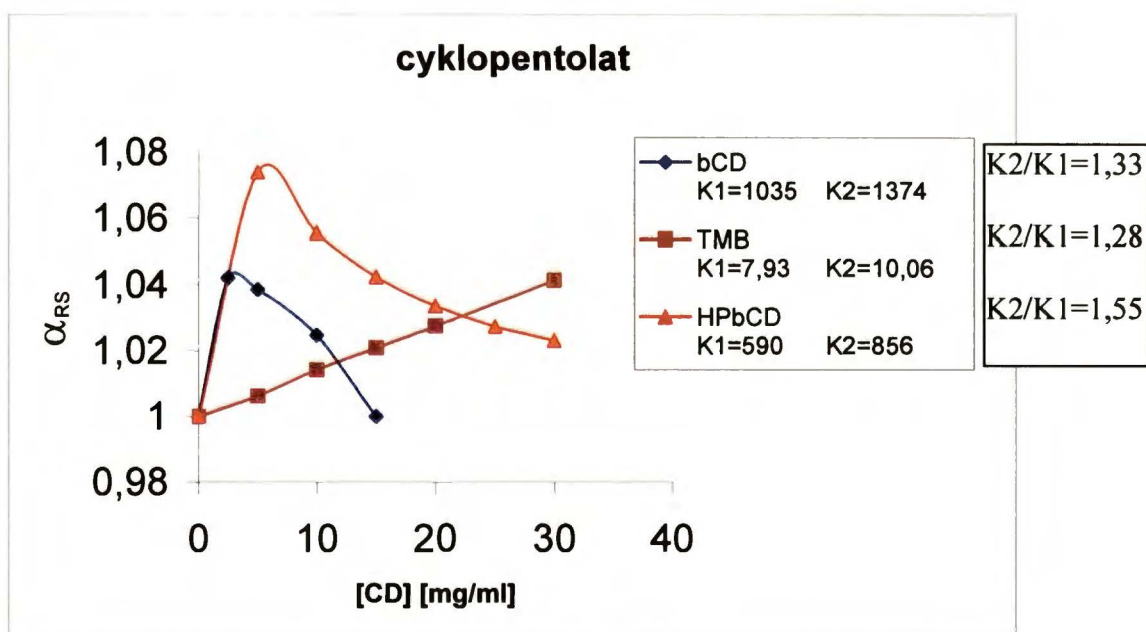
D)



Rys. VI-18. Wpływ stężenia cyklodekstryny na współczynnik rozdzielania  $R_S$  enancjomerów z: A) DM-β-CD, B) β-CD, C) HP-β-CD, D) TM-β-CD. Warunki: bufor Tris 18mM, pH=2,5, temp. 25<sup>0</sup>C, napięcie 25kV, średnica kapilary 75μm.

Wyniki przedstawione na rys. VI-18 wskazują, że dla różnych związków i różnych cyklodekstryn rozdzielczości pików osiągają maksymalną wartość przy innym stężeniu selektora. Najlepsze współczynniki rozdzielania uzyskano dla DM- $\beta$ -CD przy jednocześnie najniższym jego stężeniu. Wzrost stężenia DM- $\beta$ -CD powyżej 15-20 [mg/ml] w większości przypadków nie powoduje poprawy rozdzielania. W przeciwieństwie do DM- $\beta$ -CD, w przypadku TM- $\beta$ -CD rozróżnienie uzyskuje się przy dużych stężeniach selektora. Zgodnie z rozważaniami, (str. 82) im mniejsze są stałe trwałości, tym wyższe optymalne stężenie selektora wymagane do rozdzielania enancjomerów.

Najlepiej można to prześledzić dla cyklopentolatu, który tworzy silne kompleksy z DM- $\beta$ -CD, HP- $\beta$ -CD,  $\beta$ -CD oraz słaby kompleks z TM- $\beta$ -CD – rys. VI-19. Na rysunku przedstawiono wpływ stężenia różnych cyklodekstryn na selektywność układu.



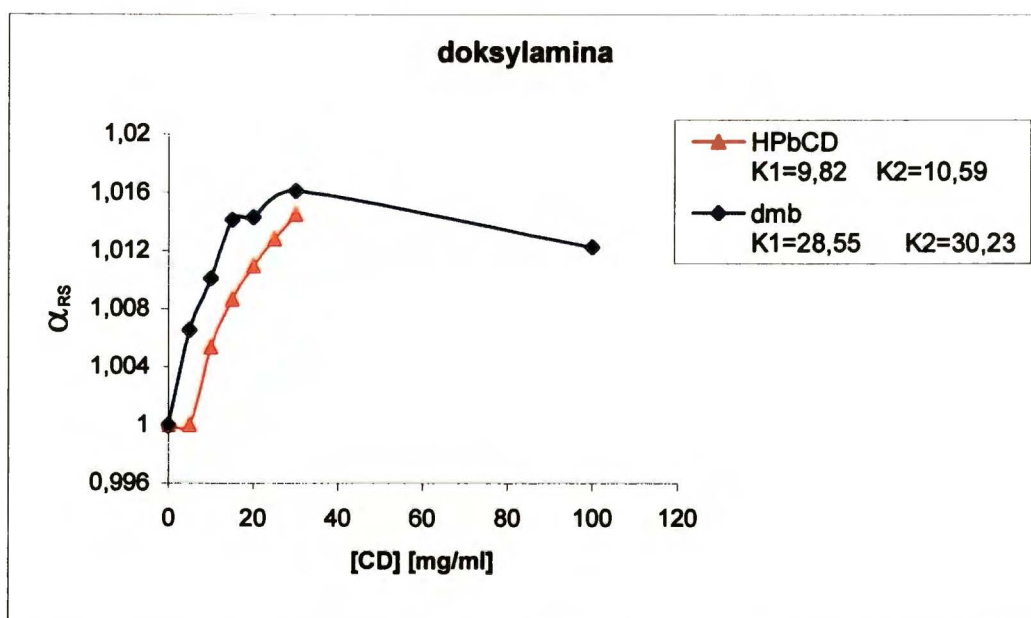
Rys. VI-19. Wpływ stężenia obojętnych cyklodekstryn na selektywność układu dla cyklopentolatu. Warunki: bufor Tris 18mM, pH=2,5, temp. 25<sup>0</sup>C, napięcie 25kV, średnica kapilary 75 $\mu$ m.



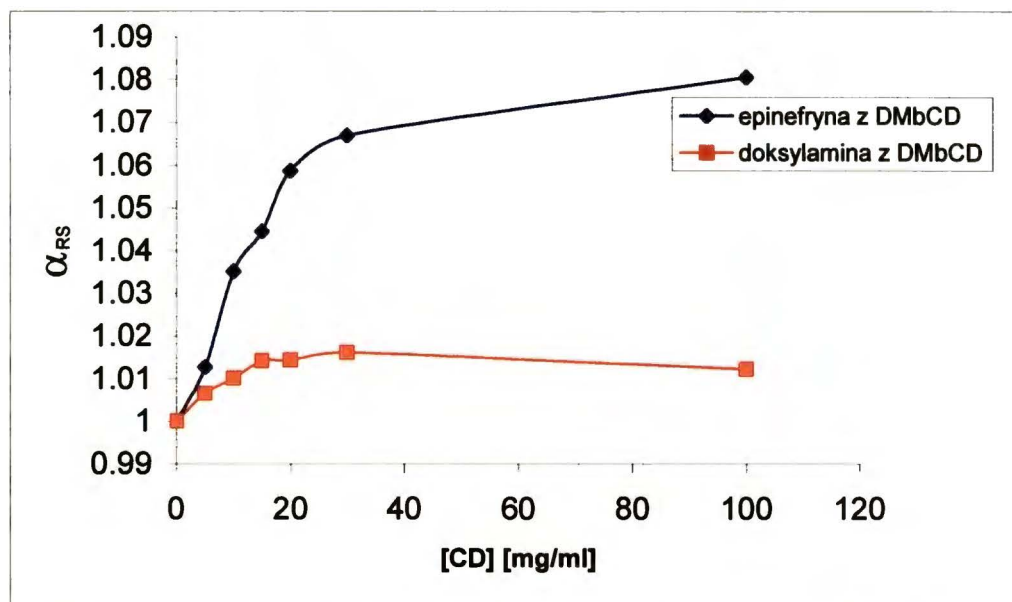
Jak widać na *rys. VI-19*, zgodnie z rozważaniami teoretycznymi (*rys. VI-4*), im wyższe stałe trwałości tym niższe optymalne stężenie chiralnego selektora. Po przekroczeniu tego optimum selektywność maleje. W przypadku  $\beta$ -CD zakres stężeń, dla których otrzymujemy rozdzielanie enancjomerów jest wąski. Po przekroczeniu stężenia 15 mg/ml rozdzielanie pików zanika. Ma to związek ze skompleksowaniem całej ilości cyklopentolatu. Stanowi to również potwierdzenie wcześniejszego stwierdzenia, że różnica mobilności kompleksów nie ma tu wpływu na enancjoseparację. Gdyby było inaczej, tzn. cały związek był skompleksowany a ruchliwości kompleksów różniłyby się musiałoby to owocować ich rozdzielaniem.

Dla TM- $\beta$ -CD stałe trwałości są kilkadziesiąt razy mniejsze ( $K_1=7,93$  [l/mol]). W badanym zakresie stężeń selektywność rośnie ze wzrostem stężenia. Optimum stężenia przesunięte jest w kierunku wyższych wartości.

Wydaje się, że dla pośrednich wartości stałych trwałości (np. dla doksyliny z DM- $\beta$ -CD  $K_1=28,55$  [l/mol]) optimum stężenia osiąga szeroki zakres, w którym selektywność układu niewiele się zmienia (*rys. VI-20* i *rys. VI-21*). Ponadto niewielkie zmiany selektywności mogą wynikać ze zmiany ruchliwości związku i kompleksów na skutek zmian lepkości buforu przy dużym stężeniu cyklodekstryny.



*Rys. VI-20. Wpływ stężenia DM- $\beta$ -CD oraz HP- $\beta$ -CD na selektywność układu dla doksyliny. Warunki: bufor Tris 18mM, pH=2,5, temp. 25<sup>0</sup>C, napięcie 25kV, średnica kapilary 75 $\mu$ m.*



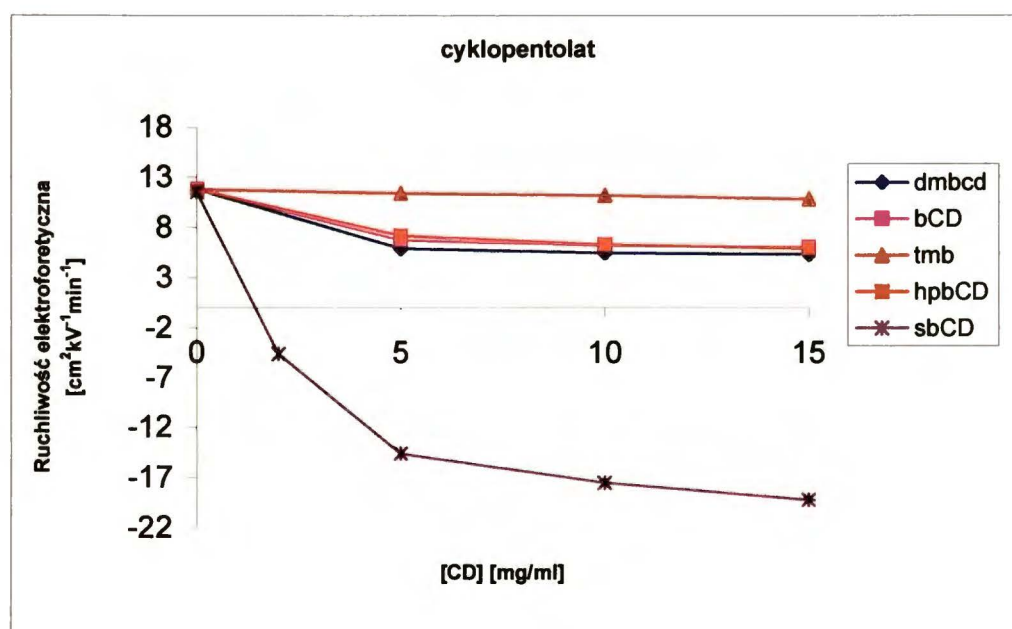
Rys. VI-21. Wpływ stężenia DM- $\beta$ -CD na selektywność układu dla doksylaminy i epinefryny. Warunki: bufor Tris 18mM, pH=2,5, temp. 25<sup>0</sup>C, napięcie 25kV, średnica kapilary 75 $\mu$ m.

Podobnie jak dla cyklopentolatu kształty krzywych są jakościowo zgodne z rysunkami pokazanymi w części teoretycznej.

### VI-2.2. Cyklodekstryna anionowa (*s*- $\beta$ -CD)

S- $\beta$ -CD w zakresie od pH=2,5 do pH=12 wykazuje ruchliwość ujemną. Badane aminy natomiast nie wykazują własnej ruchliwości elektroforetycznej w pobliżu pH=12, a poniżej tego pH charakteryzują się ruchliwością dodatnią. W badaniach wstępnych pokazano, że część związków, posiadających pierścień pirydynowy zostaje dodatkowo sprotonowanych w pH=2,5, przez co zmienia się ich ruchliwość w porównaniu do pH=7. W związku z tym badania prowadzono w warunkach, kiedy związki są cząsteczkami obojętnymi (pH=12), kiedy są sprotonowane (pH=7) oraz kiedy protonowaniu ulega również pierścień pirydynowy (pH=2,5).

Rys. VI-22 przedstawia porównanie wpływu stężenia cyklodekstryn na ruchliwość cyklopentolatu w pH=7. Widzimy, że kompleksowanie z s-β-CD w znacznie większym stopniu wpływa na zmianę ruchliwości amin niż kompleksowanie z cyklodekstrynami obojętymi. Już przy niewielkim stężeniu s-β-CD cyklopentolat uzyskuje przeciwny kierunek migracji; porusza się wolniej niż EOF.



Rys. VI-22. Porównanie wpływu stężenia cyklodekstryn obojętnych i s-β-CD na ruchliwość elektroforetyczną cyklopentolatu w pH=7 (dla pierwszego enancjomeru). Warunki: bufor Tris 18mM, temp. 25°C, napięcie 25kV, średnica kapilary 75μm.

Ruchliwość przeciwna do tej wynikającej z ładunku cząsteczki jest możliwa do uzyskania jedynie w przypadku kompleksowania z silnie przeciwnie naładowanym selektorem. Z przeprowadzonych eksperymentów wynika, że wszystkie badane aminy są silnie kompleksowane przez s-β-CD. Silniejsze kompleksowanie w porównaniu z obojętymi cyklodekstrynami wynika z oddziaływań elektrostatycznych.

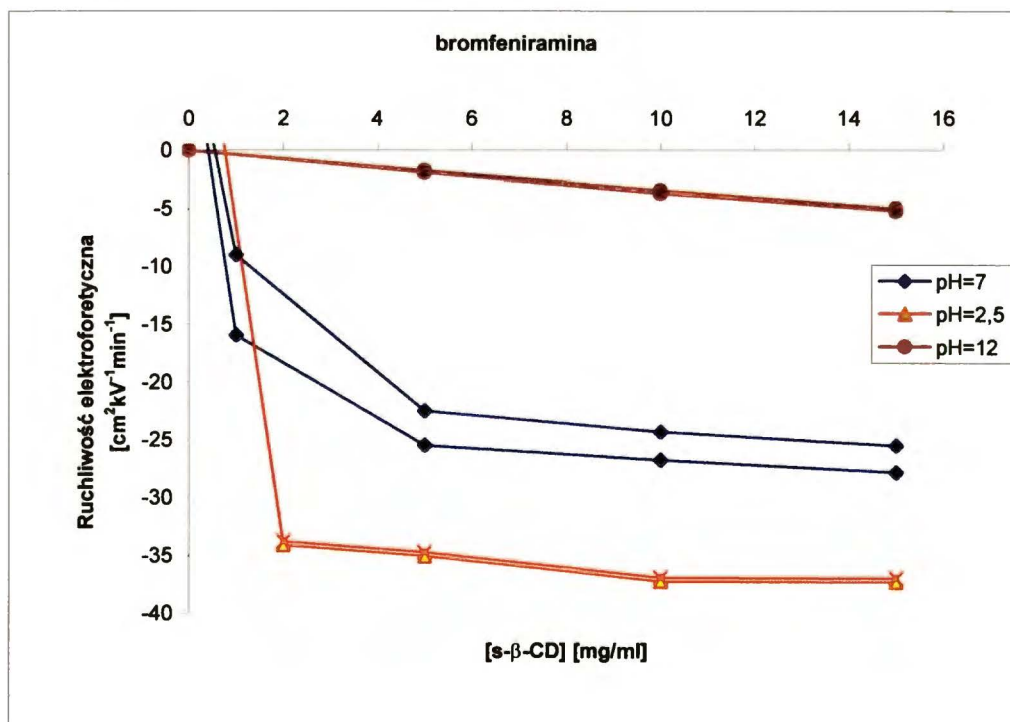
Na rys. VI-23 pokazano wpływ stężenia s-β-CD na ruchliwość elektroforetyczną enancjomerów bromfeniraminu oraz epinefryny w różnych pH.



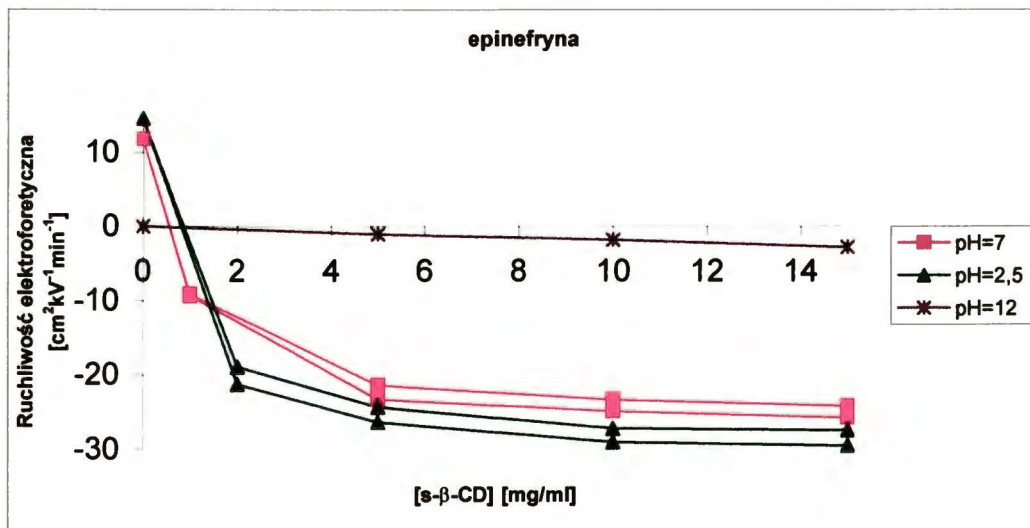
Wynika z nich, że w pH=12 s-β-CD słabo kompleksuje związki będące w postaci cząsteczek obojętnych. Widzimy, że ruchliwości elektroforetyczne wymienionych związków zmieniają się nieznacznie. Inny wpływ kompleksowania obserwujemy w pH=7 i pH=2,5. W obu przypadkach wystarczy stężenie 1 [mg/ml], aby enancjomery uzyskały ujemną ruchliwość.

Dla bromfeniraminy obserwujemy różnice w ruchliwościach w pH=7 oraz pH=2,5. Potwierdza to słuszność stwierdzenia, że pomiędzy cząsteczkami dochodzi do silnych oddziaływań elektrostatycznych, związanych z różnym ładunkiem cząsteczek w różnym pH. Takich różnic nie zaobserwowano dla epinefryny i pozostałych związków nie posiadających pierścienia pirydynowego.

Na wykresach widać również, że dla bromfeniraminy w pH=7 ruchliwości elektroforetyczne jej enancjomerów różnią się, podczas gdy w pH=2,5 ta różnica jest niewielka. W przypadku epinefryny natomiast nie ma dużych różnic dla obydwu pH. Zarówno ruchliwości elektroforetyczne jak i różnice w ruchliwościach pomiędzy poszczególnymi enancjomerami są podobne.



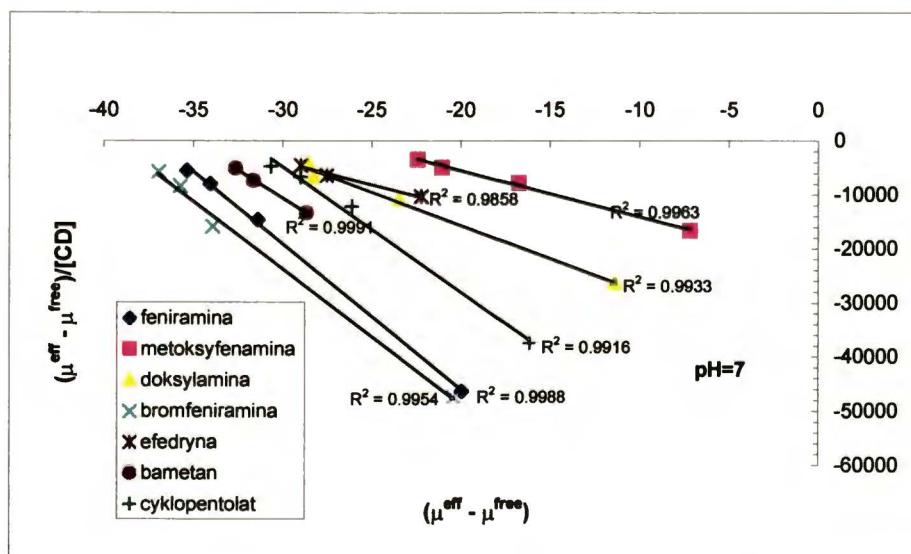




Rys. VI-23. Wpływ stężenia  $s\text{-}\beta\text{-CD}$  na ruchliwość elektroforetyczną: bromfeniraminę (A) oraz epinefryny (B) dla różnych wartości pH. Warunki: bufor Tris 18mM, temp. 25°C, średnica kapilary 75μm, napięcie 25kV dla pH=7 i 12 oraz -25kV dla pH=2,5.

### VI-2.2.1. Szacowanie stałych trwałości kompleksów z $s\text{-}\beta\text{-CD}$

Postępując analogicznie jak w punkcie VI-2.1.1. na rys. VI-24 przedstawiono zależność  $(\mu^{\text{eff}} - \mu^{\text{free}})/[\text{CD}]$  w funkcji  $(\mu^{\text{eff}} - \mu^{\text{free}})$  dla badanych związków. Ponieważ zależności te są liniowe, do oszacowania stałych trwałości przyjęto stechiometrię kompleksów 1:1. Wyniki zebrano w tabeli VI-2.



Rys. VI-24. Zależność  $(\mu^{\text{eff}} - \mu^{\text{free}})/[\text{CD}]$  w funkcji  $(\mu^{\text{eff}} - \mu^{\text{free}})$  dla  $s\text{-}\beta\text{-CD}$ .

Tabela VI-2. Stałe trwałości kompleksów badanych związków z  $s$ - $\beta$ -CD (K1-z enancjomerem wychodzącym jako pierwszy, K2-enancjomerem wychodzącym jako drugi). Stosunek ruchliwości oraz uzyskany współczynnik rozdzielania enancjomerów podano dla stężenia  $c=10\text{mg/ml}$ .

		Epinferyna	Cyklopentolat	Brom-feniramina	Doksylamina	Bametan	Feniramina	Metoksyfenamina	Efedryna	Ketamina
pH=12	K1[l/mol]	-	15,8 ( $\pm 0,359$ )	24,1 ( $\pm 0,186$ )	90,4 ( $\pm 3,00$ )	23,9 ( $\pm 0,237$ )	149,5 ( $\pm 4,39$ )	172,2 ( $\pm 10,3$ )	148,2 ( $\pm 6,28$ )	47,0 ( $\pm 0,268$ )
	K2/K1	-	1,11	1,07	1,20	1	1,16	1,25	1	1
	$\mu_2/\mu_1$	-	1,12	1,05	1,18	1	1,14	1,20	1	1
	$R_s$	-	0,29	0	0,64	0	0,49	0,58	0	0
pH=7	K1[l/mol]	3626,9 ( $\pm 55,9$ )	1639,2 ( $\pm 161,0$ )	3462,1 ( $\pm 143,0$ )	1218,3 ( $\pm 69,2$ )	2053,9 ( $\pm 10,3$ )	2323,3 ( $\pm 37,2$ )	753,4 ( $\pm 14,6$ )	852,6 ( $\pm 23,7$ )	619,0 ( $\pm 1,07$ )
	K2/K1	1,20	1,32	1,44	1,09	1,26	1,07	1,16	1,05	1,10
	$\mu_2/\mu_1$	1,07	1,12	1,10	1,07	1,10	1,02	1,44	1,02	1,12
	$R_s$	2,14	2,14	2,96	1,26	2,15	0,86	4,26	0,13	1,09
pH=2,5	K1[l/mol]	3594,3 ( $\pm 71,8$ )	1320,6 ( $\pm 32,4$ )	18396,9 ( $\pm 771$ )	18421,7 ( $\pm 1,07$ )	1510,4 ( $\pm 79,5$ )	56454,1 ( $\pm 1184,2$ )	960,1 ( $\pm 67,7$ )	-	681,0 ( $\pm 5,36$ )
	K2/K1	1,15	1,38	1,01	1	1,31	1,01	1,79	1,15	1,11
	$\mu_2/\mu_1$	1,06	1,08	1,01	1	1,08	1,01	1,29	1,02	1,08
	$R_s$	2,44	2,54	0,56	0	1,86	0,58	10,66	0,22	2,16

Warunki: bufor Tris 18mM, temp. 25°C, średnica kapilary 75 $\mu\text{m}$ , napięcie 25kV dla pH=7 i 12 oraz -25kV dla pH=2,5.

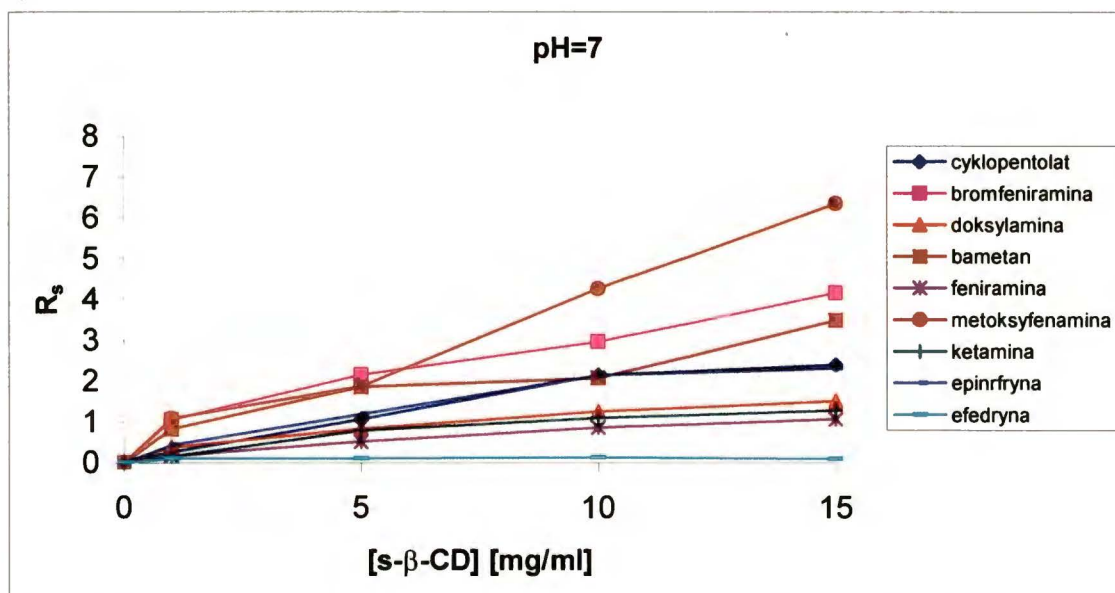
Na podstawie wyników zebranych w tabeli możemy stwierdzić, że:

1. Stałe trwałości kompleksów cząsteczek obojętnych (pH=12) z s- $\beta$ -CD są znacznie mniejsze, niż dla kompleksów tworzonych przez przeciwnie naładowane jony.
2. Im większy stosunek ładunku do masy cząsteczki, tym silniejsze tworzą się kompleksy. Np. bromfeniramina tworzy w pH=7 z s- $\beta$ -CD kompleks o stałej trwałości  $K_1=3462,1$  podczas gdy znacznie silniej skompleksowana cząsteczka w pH=2,5 posiada stałą trwałości  $K_1=18396,9$ .
3. Rozdzielenie enancjomerów z s- $\beta$ -CD jest lepsze niż w przypadku obojętnych cyklodekstryn dla wszystkich badanych związków.
4. Dla związków z jednym atomem azotu stałe trwałości w pH=7 i pH=2,5 są porównywalne. Bardzo silne kompleksowanie feniramin w pH = 2,5 skutkuje utratą selektywności układu.

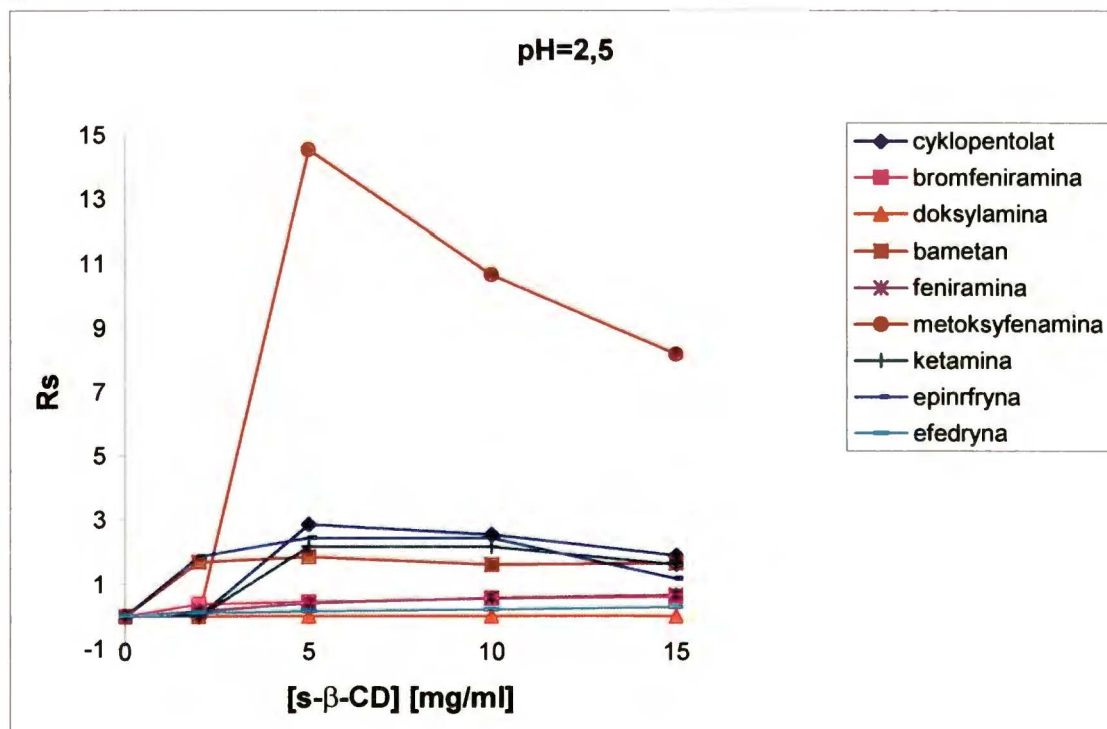
#### **VI-2.2.2. Wpływ stężenia cyklodekstryny na $R_S$ oraz selektywność**

Wpływ stężenia s- $\beta$ -CD na  $R_S$  przedstawia rys. VI-25.

A)



B)



Rys. VI-25. Wpływ stężenia  $s\text{-}\beta\text{-CD}$  na współczynnik rozdzielania enancjomerów badanych związków w  $\text{pH}=7$  (A) oraz  $\text{pH}=2,5$  (B). Warunki: bufor Tris 18mM, temp.  $25^{\circ}\text{C}$ , średnica kapilary  $75\mu\text{m}$ , napięcie  $25\text{kV}$  dla  $\text{pH}=7$  oraz  $-25\text{kV}$  dla  $\text{pH}=2,5$ .



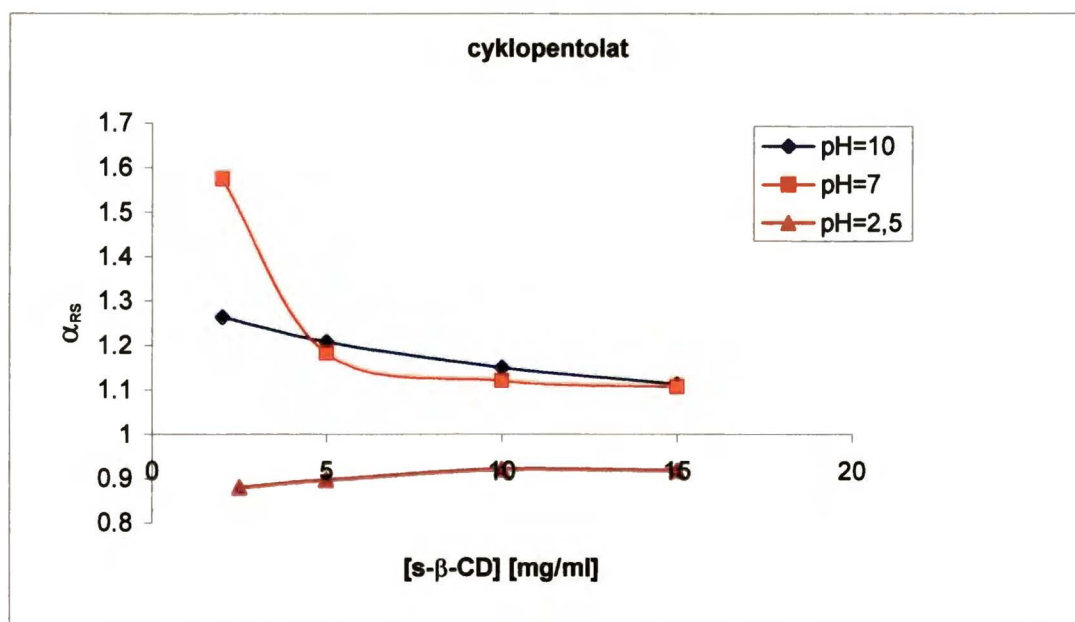
W pH=7 obserwujemy wzrost  $R_S$  ze wzrostem stężenia cyklodekstryny. Większe stężenie cyklodekstryny powoduje jednak wydłużanie czasów analiz, aż do momentu, kiedy ujemna ruchliwość związku będzie większa niż EOF i zmieni się kierunek poruszania związku (w kierunku anody).

Dla pH=2,5 (odwrócona polaryzacja elektrod) stężenie s- $\beta$ -CD osiąga wartość optymalną w granicach 5-10 mg/ml. Dalsze zwiększanie stężenia powoduje skracanie czasów analizy, równocześnie zauważono zmniejszanie się sprawności kapilary.

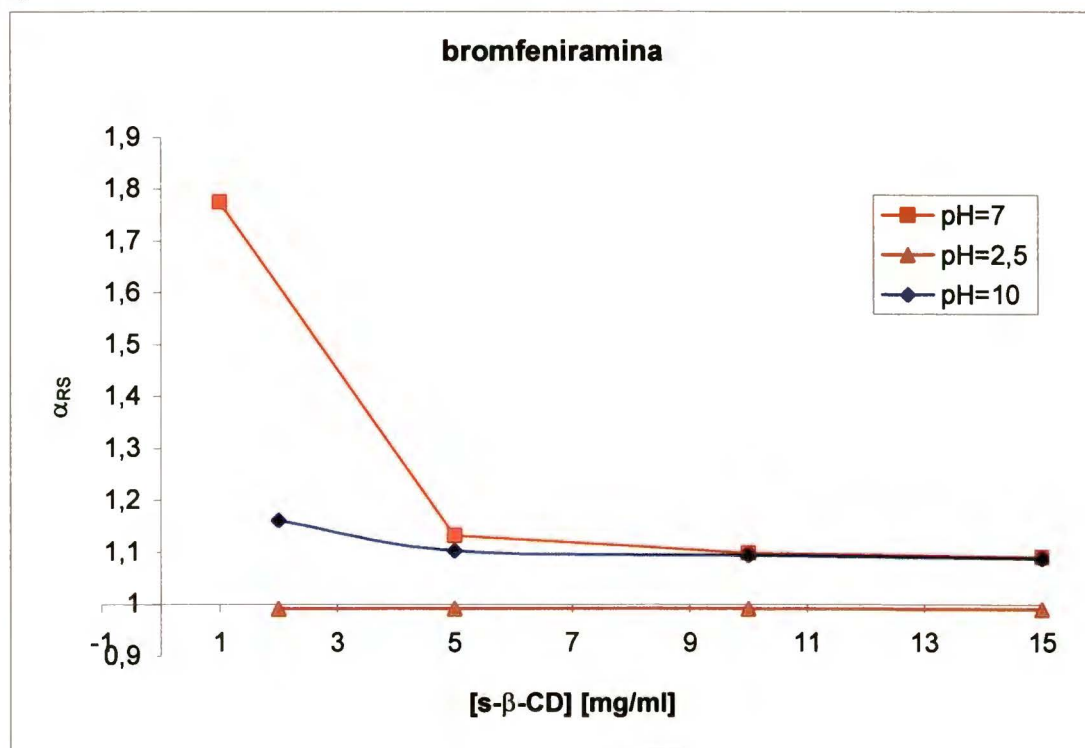
Stosując s- $\beta$ -CD uzyskano bardzo dobre rozdzielanie enancjomerów badanych związków. Np. dla metoksyfenaminy max  $R_S$  osiąga dla stężenia 5mg/ml wartość 14,54. Stosując s- $\beta$ -CD podzielono epinefrynę, cyklopentolat, bromfeniraminę, bamestan, metoksyfenaminę w pH=7 oraz epinefrynę, cyklopentolat, bamestan, metoksyfenaminę i ketaminę w pH=2,5 z  $R_S > 1,5$ . Nie podzieliły się do podstawy jedynie efedryna oraz feniramina w związku z czym należy zoptymalizować warunki ich rozdzielania.

Największą selektywność w badanych układach osiągnięto dla małych stężeń s- $\beta$ -CD, co pokazano na przykładowych rys. VI-26 A, B, C.

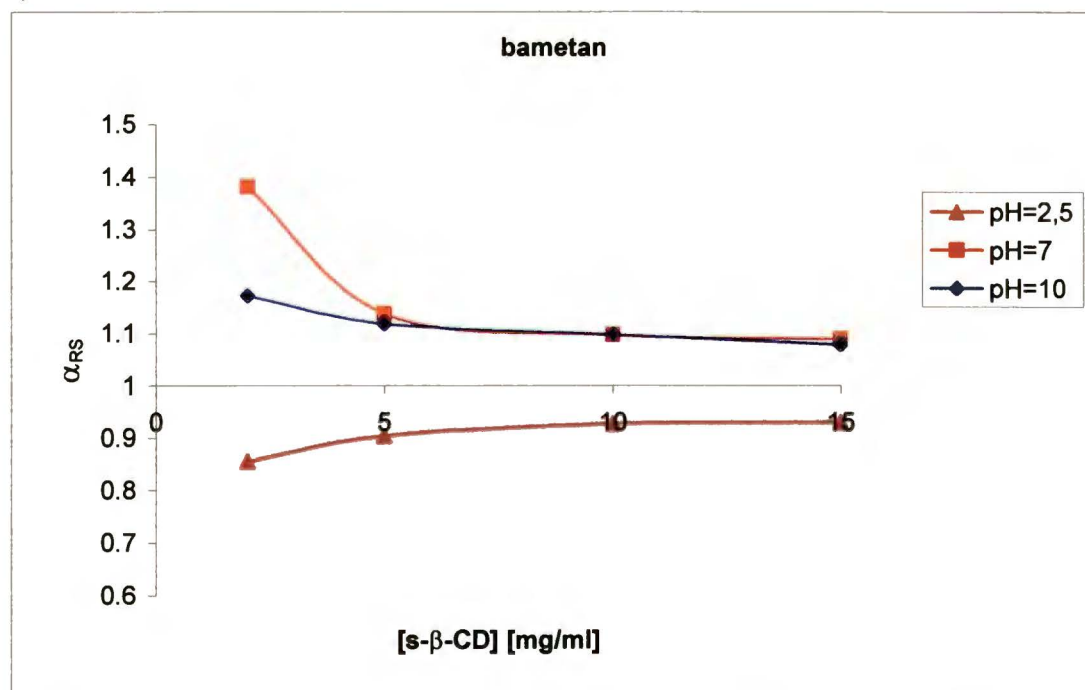
A)



B)



C)



Rys.VI-26. Wpływ stężenia s-β-CD na selektywność układu dla cyklopentalatu (A), bromfeniraminy (B) oraz bametanu (C). Warunki: bufor Tris 18mM, temp. 25<sup>0</sup>C, średnica kapilary 75μm, napięcie 25kV dla pH=7 i 10 oraz -25kV dla pH=2,5.

Dla wszystkich badanych związków ze wzrostem stężenia cyklodekstryny selektywność maleje. Porównując selektywność w pH=10 oraz 7 widzimy, że jest ona wyższa w pH=7. Może to mieć związek z tym, że w pH=7 wszystkie cząsteczki są sprotonowane i silniej oddziałują z s-β-CD.

W pH=2,5 selektywność została przedstawiona jako wartości poniżej jedności, co wynika z odwrotnej kolejności poruszania się enancjomerów w tych warunkach. Selektywności w pH=2,5 są mniejsze w przypadku silnie kompleksowanych związków (bromfeniramina, feniramina oraz doksyamina). Najlepszą selektywnością charakteryzują się roztwory o pH=7.

Duża selektywność nie zawsze przekłada się na dużą wartość  $R_S$ . Jest to powodowane znacznym poszerzeniem pików czyli obniżeniem sprawności kapilary. Przyczyną takiego zjawiska, szczególnie widocznym przy wysokich pH jest możliwość adsorpcji sprotonowanych amin na ściankach kapilary.

Uzyskane wyniki zgadzają się z teorią podaną w punkcie VI-1.2. Potwierdzają one, że stosując anionowe selektory do rozdzielania enancjomerów związków obdarzonych ładunkiem dodatnim uzyskuje się bardzo dobre selektywności i rozdzielczości pików. Jest to zasługą tworzenia się w większości przypadków trwałych kompleksów o ruchliwości elektroforetycznej przeciwnej do ruchliwości wolnego związku. W związku z dużą różnicą ruchliwości wolnego związku i formy skompleksowanej, znacznie większej niż dla cyklodekstryn obojętnych, poszerza się „okno separacji”. Wysokie stałe trwałości pozwalają na stosowanie małych stężeń selektorów, natomiast duża różnica stałych trwałości z poszczególnymi enancjomerami umożliwia ich dobre rozdzielanie. Ponadto wpływ na rozdzielanie ma tutaj kierunek poruszania się EOF przeciwny do ruchliwości kompleksów.

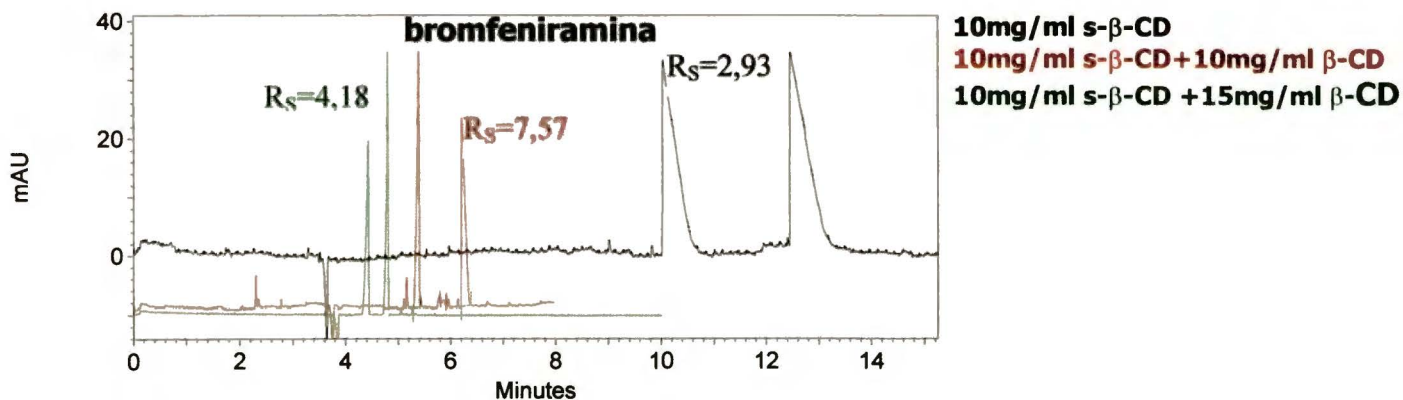
Zgodnie z opisem ze strony 86, rozdz. VI-1.2. można oczekiwać przypadku, kiedy jeden z enancjomerów, słabiej wiązany będzie miał dodatnią ruchliwość (czyli porusza się szybciej niż EOF), a silniej wiązany ujemną (porusza się wolniej niż EOF). Pomimo uzyskania wysokich wartości selektywności takiego przypadku nie zaobserwowano.

### VI-3. Rozdzielanie enancjomerów w układach podwójnych

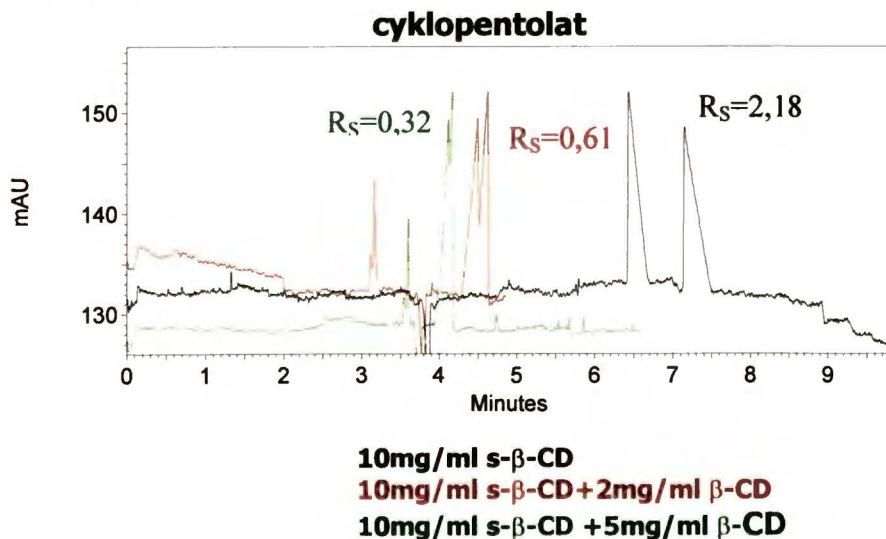
W punkcie VI-1.3 oraz VI-1.4 przedstawiono teoretyczny opis zmian enancjoselektywności i ruchliwości elektroforetycznej dla układów z dwoma czynnikami chiralnymi. Ponieważ eksperymentalnie dużo lepsze wyniki otrzymano dla s- $\beta$ -CD w układzie pojedynczym, w dalszej części badań s- $\beta$ -CD potraktowano jako podstawową dodając do niej różne ilości innych cyklodekstryn.

Kilka przykładowych elektroferogramów otrzymanych dla układów podwójnych w pH=7 przedstawiono poniżej (rys. VI-27).

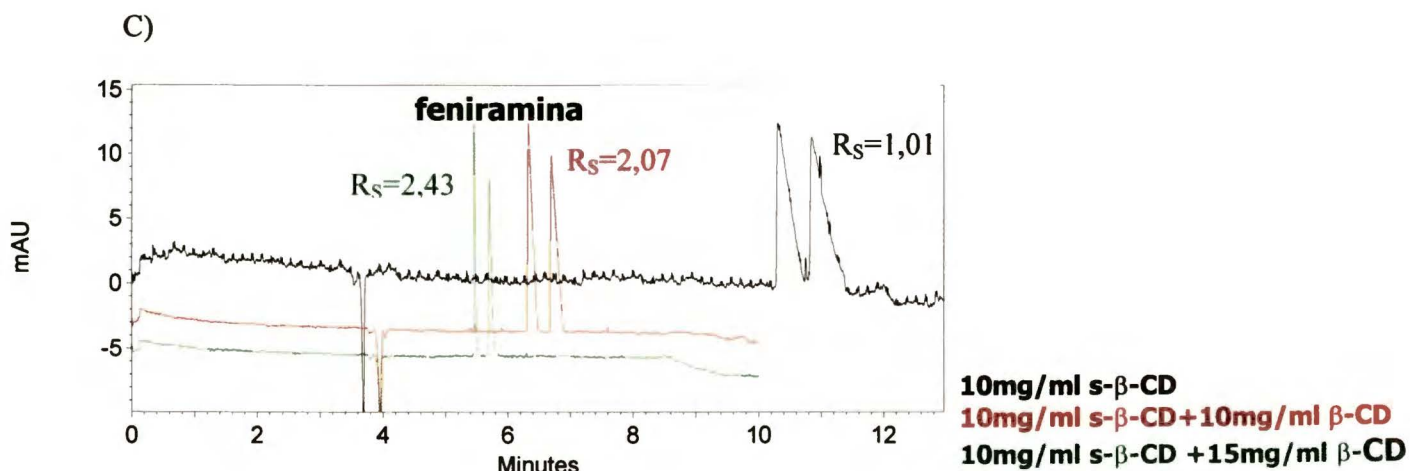
A)



B)







Rys.VI-27. Przykładowe elektroferogramy rozdzielania enancjomerów bromfeniraminy (A), cyklopentolatu (B) oraz feniraminy (C) w układzie dwóch cyklodekstryn w pH=7. Warunki: bufor Tris 18mM, temp. 25<sup>0</sup>C, średnica kapilary 75 $\mu$ m, napięcie 25kV.

Jak wynika z przedstawionych wykresów (oraz wyników zamieszczonych w tab. VI-3) w większości przebadanych przypadków (z wyjątkiem cyklopentolatu) po dodaniu  $\beta$ -CD otrzymujemy poprawę rozdzielania enancjomerów. Zastosowanie dodatkowego selektora powoduje również:

1. skrócenie czasów analizy
2. poprawę kształtu pików

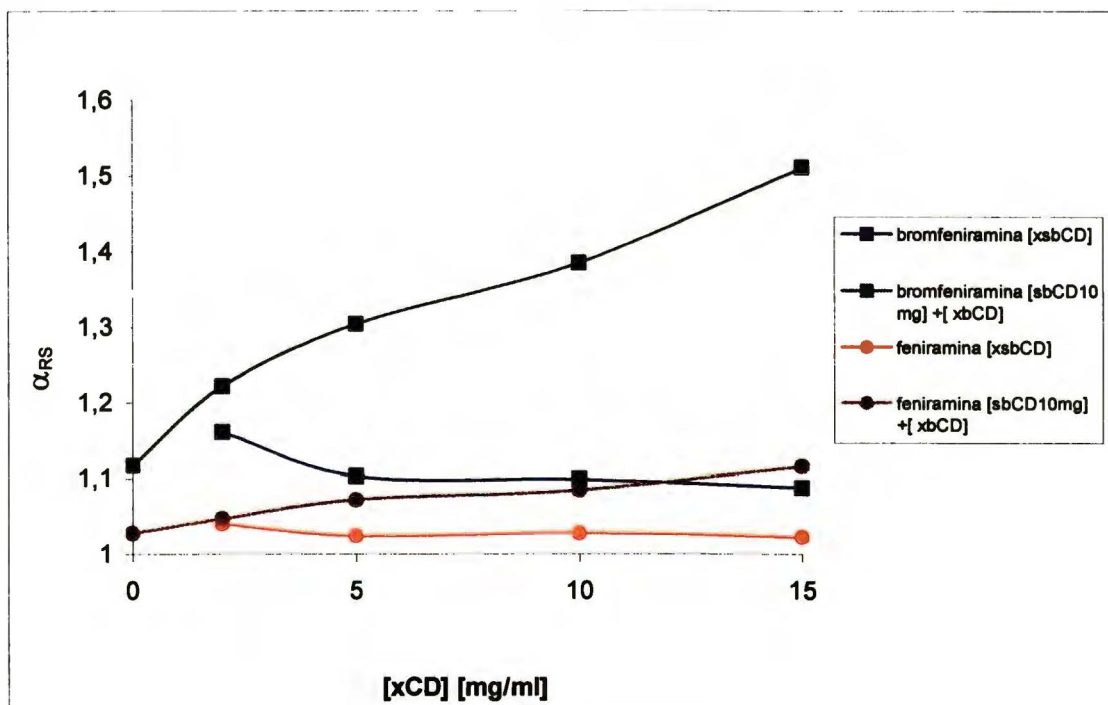
Ponieważ w roztworze znajdują się dwa czynniki selektywne, utworzone zostają dwa kompleksy o różnej ruchliwości elektroforetycznej. Kompleks z s- $\beta$ -CD porusza się z ruchliwością ujemną, natomiast z cyklodekstryną obojętną z ruchliwością dodatnią. Stałe trwałości z s- $\beta$ -CD są znacznie większe, dlatego wypadkowe ruchliwości badanych związków pozostają ujemne a wpływ obojętnej cyklodekstryny powoduje zmniejszenie ruchliwości elektroforetycznej enancjmerów i w rezultacie skrócenie czasów analizy.

Bardzo widoczny wpływ na poprawę kształtu pików jest trudny do wyjaśnienia i wymaga dodatkowych badań.

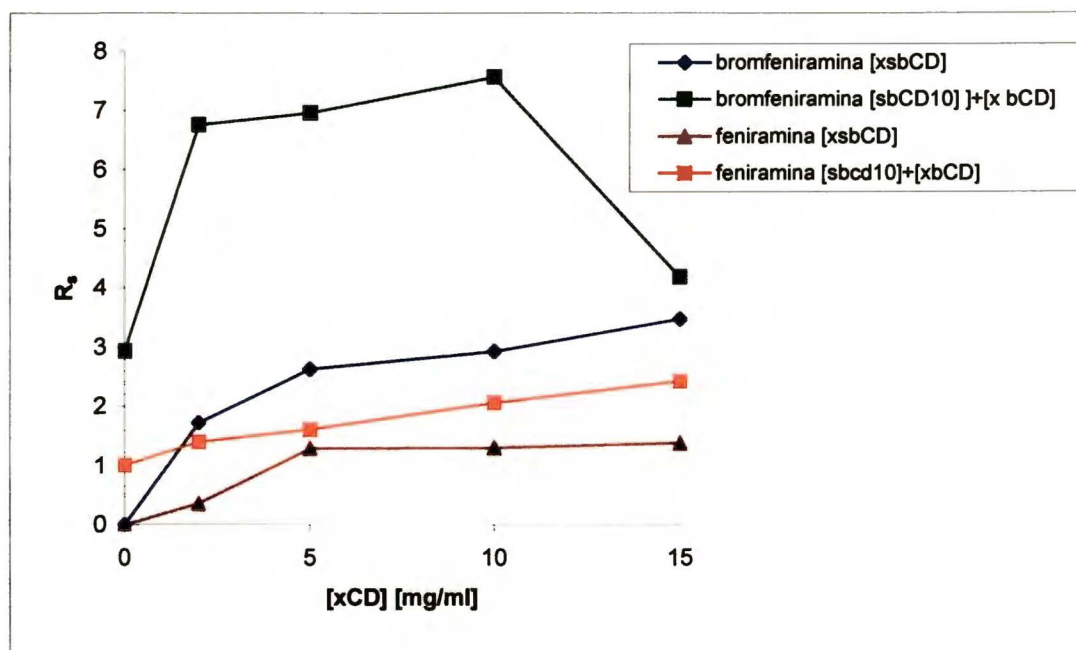
### VI-3.1. Zmiana selektywności oraz $R_S$ w układzie dwóch cyklodekstryn

Na wykresach (rys. VI-28) pokazano zmiany selektywności oraz  $R_S$  w układzie dla s- $\beta$ -CD oraz dla układu o stężeniu 10mg/ml s- $\beta$ -CD oraz różnej ilości  $\beta$ -CD dla bromfeniraminy i feniraminy dla pH=7.

A)



B)



Rys. VI-28. Wpływ stężenia obojętnej  $\beta$ -CD na selektywność (A) oraz współczynnik rozdzielania pików (B) w układzie z  $s$ - $\beta$ -CD w  $pH=7$ . Warunki: bufor Tris 18mM, temp.  $25^{\circ}C$ , średnica kapilary  $75\mu m$ , napięcie 25kV.

Można zauważyć, że selektywność układu złożonego z dwóch cyklodekstryn znacznie przewyższa selektywność układu pojedynczego zarówno dla bromfeniraminy jak i feniraminy. Takie same wyniki uzyskano dla pozostałych związków. Wyjątek stanowi cyklopentolat, którego rozdzielanie pogarsza się. Wyniki dla pozostałych związków przedstawia tabela VI-3.

Również współczynniki rozdzielania  $R_s$  uzyskiwane dla układów podwójnych są większe, niż dla układów pojedynczych. Szczególnie widoczne jest to w przypadku bromfeniraminy i metoksyfenaminy, dla których  $R_s$  wzrasta dwukrotnie.

Tabela VI-3. Wyniki rozdzielania uzyskane dla układu podwójnego. W tabeli przedstawiono czasy migracji ( $t$ ), ruchliwości elektroforetyczne  $\mu$ , selektywność  $\alpha$  oraz współczynnik rozdzielania  $R_S$  dla  $pH=7$ .

		$t_1$	$t_2$	$\mu_1$	$\mu_2$	$\alpha=\mu_2/\mu_1$	$R_S$
Cyklopentolat	s- $\beta$ -CD10	6,43	7,14	-15,22	-17,52	1,151	<b>2,18</b>
	s- $\beta$ -CD10 $\beta$ -CD5	4,11	4,17	-3,43	-3,89	1,132	0,32
	s- $\beta$ -CD10 $\beta$ -CD10	3,99	3,99	-0,74	-0,74	1,00	0
	s- $\beta$ -CD10 $\beta$ -CD15	4,02	4,02	0,00	0,00	0,00	0
Bromfeniramina	s- $\beta$ -CD10	9,81	12,23	-25,50	-28,48	1,116	2,93
	s- $\beta$ -CD10 $\beta$ -CD5	5,44	6,28	-11,95	-15,6	1,305	6,27
	s- $\beta$ -CD10 $\beta$ -CD10	5,02	5,64	-8,38	-11,62	1,385	<b>7,57</b>
	s- $\beta$ -CD10 $\beta$ -CD15	4,52	4,92	-5,21	-7,88	1,511	4,18
Doksylamina	s- $\beta$ -CD10	6,04	6,49	-16,08	-17,77	1,105	1,39
	s- $\beta$ -CD10 $\beta$ -CD5	4,99	5,19	-9,17	-10,33	1,126	<b>2,3</b>
	s- $\beta$ -CD10 $\beta$ -CD10	4,65	4,78	-6,23	-7,07	1,134	1,76
	s- $\beta$ -CD10 $\beta$ -CD15	4,45	4,54	-4,18	-4,82	1,155	1,02
Bametan	s- $\beta$ -CD10	7,84	8,82	-21,24	-23,32	1,098	2,08
	s- $\beta$ -CD10 $\beta$ -CD5	7,88	8,9	-20,35	-22,49	1,104	2,01
	s- $\beta$ -CD10 $\beta$ -CD10	6,15	6,77	-15,19	-17,39	1,144	<b>3,65</b>
Feniramina	s- $\beta$ -CD10	10,08	10,58	-24,88	-25,57	1,028	1,01
	s- $\beta$ -CD10 $\beta$ -CD5	6,62	7,02	-17,4	-18,65	1,072	1,62
	s- $\beta$ -CD10 $\beta$ -CD10	6,68	7,09	-15,02	-16,29	1,084	2,07
	s- $\beta$ -CD10 $\beta$ -CD15	5,45	5,7	-10,28	-11,47	1,115	<b>2,43</b>
Metoksyfenamina	s- $\beta$ -CD10	5,36	6,12	-12,03	-15,42	1,281	2,79
	s- $\beta$ -CD10 $\beta$ -CD5	5,28	5,99	-10,74	-14,02	1,305	2,97
	s- $\beta$ -CD10 $\beta$ -CD10	5,00	5,59	-9,96	-13,06	1,311	5,3
	s- $\beta$ -CD10 $\beta$ -CD15	4,87	5,44	-9,28	-12,34	1,329	<b>7,69</b>
Efedryna	s- $\beta$ -CD10	6,32	6,38	-16,51	-16,75	1,014	0,052
	s- $\beta$ -CD10 $\beta$ -CD5	6,27	6,34	-14,61	-14,9	1,019	0,064
	s- $\beta$ -CD10 $\beta$ -CD10	6,2	6,31	-13,58	-14,0	1,030	0,13
	s- $\beta$ -CD10 $\beta$ -CD15	6,15	6,22	-15,54	-15,77	1,015	<b>0,16</b>

Warunki: Bufor Tris 18mM, temp 25<sup>0</sup>C, napięcie 25kV, pH=7, średnica kapilary 75 $\mu$ m.

Analizując przedstawione wyniki stwierdzamy, że:

1. Współczynnik rozdzielania pików w większości przypadków jest lepszy w układach podwójnych. Z obserwacji wynika, że jest on dwukrotnie wyższy, niż dla s- $\beta$ -CD w układzie pojedynczym.
2. Cyklopentolat, którego  $R_S$  w układzie podwójnym maleje wykazuje silne kompleksowanie z  $\beta$ -CD (rozdz. VI-2.1.1.). Stała trwałości z  $\beta$ -CD wynosi 1035,8 [l/mol] i jest przeszło 10-cio krotnie wyższa w porównaniu do pozostałych związków. Wynika z tego że dla cyklopentolatu wybrany zakres stężeń jest powyżej zakresu optymalnego.
3. W niektórych przypadkach (bromfeniramina, doksylamina) stężenie  $\beta$ -CD, dla którego uzyskuje się najlepszy  $R_S$  wykazuje optimum. Dalszy wzrost stężenia obojętnej cyklodekstryny wpływa już negatywnie na uzyskiwane rezultaty.



4. W każdym przypadku wzrost stężenia  $\beta$ -CD powoduje zmniejszenie ruchliwości elektroforetycznej badanych związków. W wyniku tego następuje skrócenie czasów ich migracji. Wpływ obojętnej  $\beta$ -CD na ruchliwość elektroforetyczną związków jest tym silniejszy, im trwalsze tworzy ona z nimi kompleksy. Najtrwalsze kompleksy tworzy cyklopentolat i bromfeniramina, w związku z czym ich ruchliwości maleją najbardziej.

W tabelach VI-4A i B zestawiono wyniki uzyskane dla układów podwójnych w pH=7 oraz pH=2,5 dla różnych obojętnych cyklodekstryn w układzie z s- $\beta$ -CD.

Tabela VI-4. Wyniki rozdzielania uzyskane dla układu podwójnego. W tabeli przedstawiono ruchliwości elektroforetyczne  $\mu$ , oraz współczynnik rozdzielania  $R_s$ .

A)

Związek	pH=7											
	<i>s</i> - $\beta$ -CD10mg/ml $\beta$ -CD 10mg/ml			<i>s</i> - $\beta$ -CD10mg/ml DM- $\beta$ -CD 10mg/ml			<i>s</i> - $\beta$ -CD10mg/ml HP- $\beta$ -CD 10mg/ml			<i>s</i> - $\beta$ -CD10mg/ml TM- $\beta$ -CD 10mg/ml		
	$\mu_1$	$\mu_2$	$R_s$	$\mu_1$	$\mu_2$	$R_s$	$\mu_1$	$\mu_2$	$R_s$	$\mu_1$	$\mu_2$	$R_s$
Epinefryna	-21,3	-23,1	2,6	-21,2	-22,0	<b>5,04</b>	-21,5	-21,7	4,26	-22,7	-24,5	1,68
Cyklopentolat	-0,74	-0,74	0	0	0	0	-5,83	-6,05	<b>0,8</b>	-16,9	-16,9	0
Bromfeniramina	-8,38	-11,62	<b>7,57</b>	-3,23	-6,91	6,53	-13,9	-17,8	5,37	-18,7	-18,8	0,38
Doksylamina	-6,23	-7,07	1,76	-4,04	-4,36	0,9	-10,3	-11,4	1,38	-14,2	-15,9	<b>1,94</b>
Bametan	-15,19	-17,39	3,65	-16,6	-18,2	2,42	-17,9	-19,7	<b>3,69</b>	-19,3	-21,4	2,3
Feniramina	-15,02	-16,29	<b>2,07</b>	-12,2	-13,7	1,15	-18,1	-18,9	1,25	-21,2	-21,6	1,7
Metoksyfenamina	-9,96	-13,06	5,30	-5,09	-7,81	3,2	-6,81	-9,91	<b>7,33</b>	-6,74	-9,91	3,8
Efedryna	-13,58	-14,0	0,13	-11,1	-11,3	0,24	-12,5	-12,9	<b>0,42</b>	-14,4	-14,6	0,36
Ketamina	-5,02	-5,71	1,4	-3,39	-4,42	<b>1,52</b>	-6,99	-7,88	1,15	-9,44	-10,4	1,18

Warunki: bufor Tris 18mM, temp. 25°C, średnica kapilary 75 $\mu$ m, napięcie 25kV.

B)

Związek	pH=2,5											
	<i>s</i> - $\beta$ -CD10mg/ml $\beta$ -CD 10mg/ml			<i>s</i> - $\beta$ -CD10mg/ml DM- $\beta$ -CD 10mg/ml			<i>s</i> - $\beta$ -CD10mg/ml HP- $\beta$ -CD 10mg/ml			<i>s</i> - $\beta$ -CD10mg/ml TM- $\beta$ -CD 10mg/ml		
	$\mu_1$	$\mu_2$	$R_s$	$\mu_1$	$\mu_2$	$R_s$	$\mu_1$	$\mu_2$	$R_s$	$\mu_1$	$\mu_2$	$R_s$
Epinefryna	30,9	29,1	2,7	30,1	28,3	2,03	31,4	29,8	3,21	29,6	28,1	<b>3,13</b>
Cyklopentolat	9,01	8,85	0,9	-	-	-	-	-	-	22,4	20,4	<b>2,66</b>
Bromfeniramina	38,7	38,3	0,7	35,6	34,6	<b>1,28</b>	36,7	36,4	0,78	35,1	34,7	0,65
Doksylamina	35,8	35,8	0	35,1	34,7	0	36,1	35,8	0	34,4	34,4	0
Bametan	29,7	27,4	2	26,3	24,1	3,68	27,8	25,7	<b>4,05</b>	28,3	26,2	3,30
Feniramina	38,6	38,2	<b>0,7</b>	36,2	35,4	0,61	36,6	36,2	0,59	35,5	35,1	0,57
Metoksyfenamina	16,8	13,2	<b>18</b>	-	-	-	17,1	13,7	15,22	17,0	13,7	17,3
Efedryna	24,1	23,5	<b>1,2</b>	20,1	19,2	0,31	21,2	20,7	0,43	22,1	21,5	0,56
Ketamina	17,0	16,3	2,4	12,6	11,8	<b>5,44</b>	15,8	15,0	3,57	16,9	16,0	2,74

Warunki: bufor Tris 18mM, temp. 25°C, średnica kapilary 75 $\mu$ m, napięcie -25kV.

Rozpatrując wpływ stężenia  $\beta$ -CD stwierdzono, że zmniejsza ona ruchliwość elektroforetyczną związków ze wzrostem stężenia oraz wzrostem trwałości tworzących się kompleksów. Wyniki przedstawione w *tabeli IV* w  $\text{pH}=7$  potwierdzają i rozszerzają te spostrzeżenia na inne cyklodekstryny. DM- $\beta$ -CD, dla której stwierdzono najwyższe stałe trwałości z badanymi związkami, w układzie podwójnym powoduje też największe zmniejszenie ich ruchliwości elektroforetycznych. Najmniejszym wpływem na ruchliwość związków charakteryzuje się TM- $\beta$ -CD. Ta ostatnia cyklodekstryna wykazuje również najmniejszy wpływ na poprawę współczynników rozdzielania pików. Wyjątek stanowi tylko doksylamina, dla której  $R_S=1,94$ . Z 9 analizowanych związków rozdzielanie do linii bazowej otrzymano dla 7 związków. Nie uzyskano rozdzielania cyklopentolatu i efedryny.

Uzyskane wyniki są zgodne z modelem układu podwójnego, przedstawionego w rozdz. *VI-1.3*.

W  $\text{pH}=2,5$  w wyniku zmiany polaryzacji obserwujemy odwrócony wpływ cyklodekstryn na ruchliwość związków. Anionowa cyklodekstryna powoduje ich przyspieszenie (ruch w kierunku okienka detektora), obojętna cyklodekstryna, poruszająca się z EOF jego opóźnianie. Wzrost stężenia obojętnej cyklodekstryny powoduje zmniejszenie ruchliwości elektroforetycznej związków, jednak w tym przypadku wpływa to na wydłużenie czasów migracji (analizy).

W *rozdz. VI-2.2* przedstawiono rezultaty, z których wynika, że przypuszczalnie bardzo silne kompleksowanie feniramin w  $\text{pH} = 2,5$  powoduje utratę selektywności układu. Stosowanie dodatku obojętnej cyklodekstryny jest dla tych związków mniej skuteczne niż w  $\text{pH}=7$ , ponieważ w roztworach kwaśnych oddziaływania elektrostatyczne pomiędzy s- $\beta$ -CD a związkami obdarzonymi ładunkiem dodatnim znacznie przeważają nad supramolekularnym oddziaływaniem tych związków z obojętnymi cyklodekstrynami. W wyniku tego wpływ obojętnych cyklodekstryn jest słabszy, co przedstawia *tabela VI-4*. Współczynnik rozdzielania enancjomerów feniraminy, bromfeniraminy oraz doksylaminy jest w układzie podwójnym zawsze mniejszy niż 1,5. Porównując te wyniki z wynikami dla układu pojedynczego zawarte w *tabeli VI-2* widzimy natomiast, że i tak są lepsze niż w układzie pojedynczym. Dla pozostałych związków współczynnik  $R_S$



również osiąga większe wartości niż w układzie pojedynczym z wyjątkiem cyklopentolatu, podobnie jak w pH=7.

W pH=2,5 zwraca uwagę bardzo dobre rozdzielenie enancjomerów metoksyfenaminy. Z samą s-β-CD współczynnik rozdzielania wynosi 10,66 podczas gdy dla układów podwójnych w każdym przypadku jest wyższy niż  $R_S \geq 15$ .

Wzrost stężenia obojętnej cyklodekstryny powoduje zmniejszenie ruchliwości elektroforetycznej związków i wydłużenie czasów analizy. W przypadku silnie kompleksowanego przez DM-β-CD oraz HP-β-CD cyklopentolatu w pH=2,5 w czasie 60 min. nie zarejestrowano jego pików. Dla pozostałych związków wpływ ten jest mniejszy, a w przypadku feniraminy, bromfeniraminy i doksyłaminy niewielki.

W pH=7 w układzie podwójnym udało się podzielić 8 z analizowanych związków a w pH=2,5 tylko 5.

Jedynym związkiem, którego nie udało się podzielić do linii bazowej w żadnym z układów jest efedryna.

## **Rozdział VII**

### **Optymalizacja rozdzielania enancjomerów**

W poprzednich rozdziałach przedstawiono wpływ stałych trwałości na selektywność układu oraz współczynnik rozdzielania pików. Pokazano, że pH buforu może istotnie wpływać na ruchliwość elektroforetyczną związków oraz kompleksowanie. Przedstawiono wyniki pokazujące, że umiejętne zaprojektowanie układu z dwoma selektorami pozwala uzyskać lepsze rozdzielanie niż stosowanie cyklodekstryny pojedynczo.

Na rozdzielanie enancjomerów mogą mieć wpływ również inne czynniki, których nie obejmował model przedstawiony w *rozdz. VI*, np.: temperatura, napięcie elektrod, wielkość zastrzyku. Do zbadania wpływu tych czynników, wykorzystano rozkład Placketta-Burmana (PB). Rozkład (PB) został wybrany ze względu na minimalizację liczby eksperymentów w metodzie optymalizacji.



## VII-1. Wybór parametrów do optymalizacji

- 1) Temperatura, w której prowadzi się analizy wpływa na szybkość oraz równowagę procesów tworzenia kompleksów inkluzyjnych. Zmienia ona również ruchliwość cząsteczek i EOF zmieniając lepkość elektrolitów.
- 2) Siła jonowa buforu może modyfikować równowagę tworzenia kompleksów. Może również wpływać na wielkość EOF oraz ruchliwość cząsteczek oraz sprawność procesu.
- 3) Gradient pola elektrycznego ma wpływ na sprawność oraz wielkość EOF.
- 4) Wielkość zastrzyku determinuje szerokość zastrzykniętej do kapilary próbki i może zmieniać sprawność oraz rozdzielanie.

W dalszych badaniach sprawdzono wpływ 7-miu zmiennych. Wybrane zmienne i ich wartości przedstawia *tabela VII-1*.

*Tabela VII-1. Wartości wybranych zmiennych w metodzie optymalizacji rozdzielania. Poziom „0” oznacza wartość nominalną.*

Zmienna	Poziom	Wartość
1 Stężenie buforu [Tris]	-1	16,2 mM
	0	18 mM
	+1	19,8 mM
2. pH	-1	7,7
	0	7
	+1	6,3
3. [s-β-CD]	-1	9 mg/ml
	0	10 mg/ml
	+1	11 mg/ml
4. [β-CD]	-1	9 mg/ml
	0	10 mg/ml
	+1	11 mg/ml
5. Wielkość zastrzyku	-1	1,8 s
	0	2 s
	+1	2,2 s
6. Napięcie elektrod	-1	22,5 kV
	0	25 kV
	+1	27,5 kV
7. Temperatura	-1	22,5°C
	0	25 °C
	+1	27,5°C

Do badania 7-miu zmiennych służy 12-to eksperymentowy rozkład Placketta – Burmana przedstawiony w tabeli VII-2. Poziomy +1 oraz –1 oznaczają zmianę danego parametru o pewną wartość na większą (+1) lub mniejszą (-1) od wartości wybranej za podstawową (nominalną).

*Tabela VII-2. Rozkład Placketta – Burmana dla 11-tu zmiennych.*

Nr eksperymentu	zmiennie							zmiennie pozorne			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1
2	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1
3	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1
4	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1
5	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1
6	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1
7	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1
8	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1
9	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1
10	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1
11	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1

Rozkład ten pozwala na badanie maksymalnie 11 zmiennych. Ponieważ liczba badanych zmiennych jest mniejsza (7 zmiennych) pozostałe określa się jako zmienne pozorne. Nie reprezentują one żadnych własności fizycznych, ich wpływ powinien więc być zerowy. Wartości niezerowe wskazują na błędy eksperymentalne.

## **VII-2. Obliczanie wpływu zmiennych na rozdzielanie**

Wpływ każdej ze zmiennych na rozdzielanie pików został wyliczony ze wzoru:

$$E_{x[+1,-1]} = \frac{\sum Y(+1)}{n} - \frac{\sum Y(-1)}{n} \quad (VII-2)$$

gdzie:

$E_x$  - efekt wpływu zmiennych

$\Sigma Y(+1)$  - suma odpowiedzi układu na poziomie (+1),

$\Sigma Y(-1)$  - suma odpowiedzi układu na poziomie (-1),

$n$  - liczba eksperymentów na poszczególnym poziomie.

Do lepszej interpretacji i graficznej ilustracji wartości  $E$  można znormalizować do średniej wartości odpowiedzi układu ( $\bar{Y}$ )

$$\%E_x = \frac{E_x}{\bar{Y}} \times 100 \quad (VII-3)$$

Obliczony efekt jest zmianą odpowiedzi układu wynikającą ze zmiany poszczególnych parametrów w zakresie od poziomu (+1) do poziomu (-1).

Z każdego eksperymentu został obliczony  $R_S$  a następnie wyznaczono wpływ poszczególnych zmiennych na jego wartość. Można tą metodą oczywiście optymalizować inne parametry, np. selektywność układu czy czasy migracji.

Wyniki przedstawiono w tabeli VII-3.

Tabela VII-3. Współczynniki rozdzielenia  $R_S$  badanych związków dla 12-tu różnych eksperymentów, stosując rozkład Placketta-Burmana.

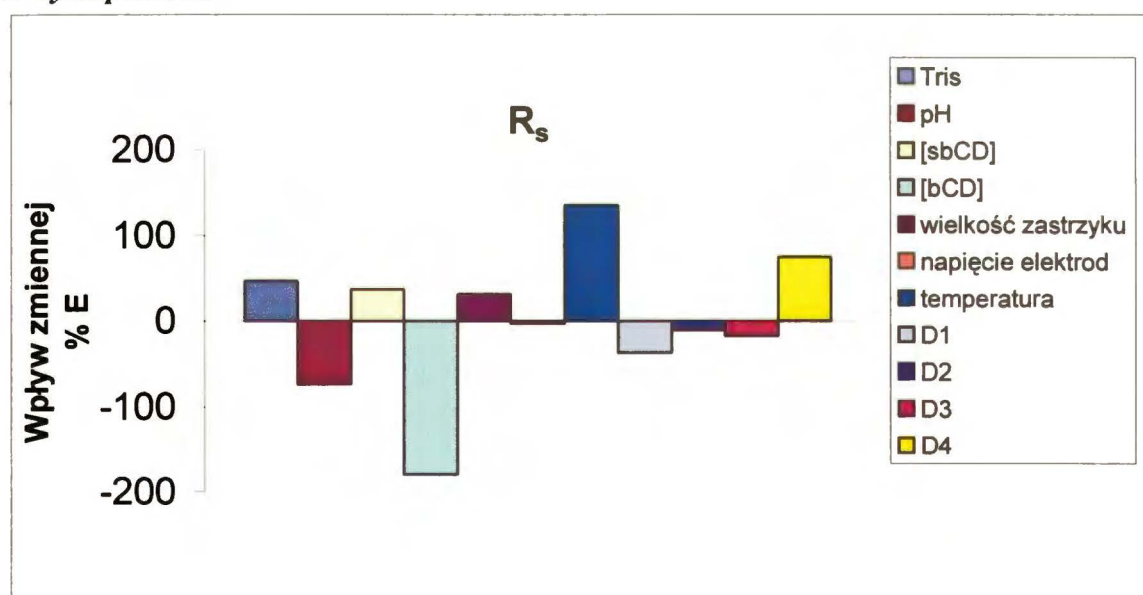
Nr eksp.	Cyklo-pentolat	Epinefryna	Brom-feniramina	Doksylamina	Bametan	Feniramina	Metoksyfenamina	Efedryna	Ketamina
1	0	2,86	6,07	2,12	2,89	1,45	6,22	0,22	<b>0,84</b>
2	<b>0,44</b>	3,01	7,26	1,99	2,81	1,46	6,48	0,23	1,07
3	0	<b>3,94</b>	<b>7,75</b>	1,11	3,38	1,12	<b>7,49</b>	0,36	1,75
4	0,07	<b>2,76</b>	5,37	1,25	<b>2,69</b>	1,28	<b>5,89</b>	<b>0,21</b>	1,11
5	0	3,92	6,94	0,94	3,21	<b>0,89</b>	6,59	0,21	1,90
6	0	3,42	5,61	1,05	3,24	1,095	7,28	0,37	1,63
7	0,26	3,75	6,14	1,06	2,85	1,10	6,09	0,24	0,91
8	<b>0,21</b>	3,01	<b>4,68</b>	1,67	2,98	1,43	6,41	0,27	1,15
9	0,34	3,42	7,32	1,90	<b>3,43</b>	1,50	7,25	0,31	1,09
10	0	3,1	6,98	<b>2,16</b>	3,33	<b>1,53</b>	7,34	0,34	1,36
11	0	3,31	6,92	1,12	2,99	1,09	6,49	0,26	<b>2,08</b>
12	0	3,24	7,24	<b>0,91</b>	2,92	1,02	6,69	<b>0,41</b>	1,98

Kolorem czerwonym oznaczono wartość największą, kolorem czarnym najmniejszą.

Jak wynika z tabeli, przeprowadzając eksperyment mający na celu określenie wpływu poszczególnych czynników na rozdzielanie enancjomerów widzimy, że w większości przypadków rozdzielanie może ulegać znacznym zmianom. W tabeli zaznaczono dla każdego związku wartości najmniejszą oraz największą. Określając i analizując wpływ poszczególnej zmiennej na uzyskany współczynnik rozdzielania pików można znaleźć warunki, w których możliwe będzie uzyskanie jeszcze lepszej separacji, jeśli otrzymana dotychczas nie jest zadowalająca.

Wpływ poszczególnych zmiennych na rozdzielanie enancjomerów badanych związków przedstawiono graficznie poniżej:

### 1. Cyklopentolat



Rys. VII-1. Wpływ wybranych zmiennych na współczynnik rozdzielania enancjomerów cyklopentolatu. Warunki standardowe: bufor Tris 18mM, pH=7, temp. 25<sup>0</sup>C, napięcie 25kV, średnica kapilary 75μm. Pozostałe warunki przedstawia tabela VII-1.

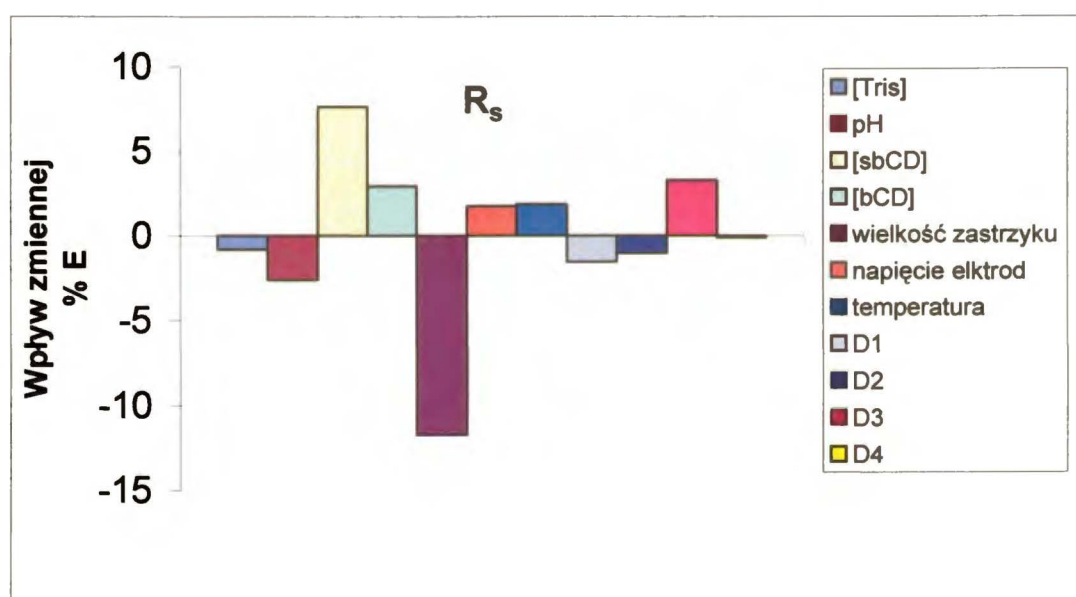
Dla cyklopentolatu zaobserwowano duży wpływ stężenia β-CD oraz temperatury na rozdzielanie enancjomerów (rys. VII-1). Stężenie β-CD ma ujemny efekt, co oznacza, że wzrost jej stężenia powoduje pogorszenie rozdzielania, co zaobserwowano już w badaniach wcześniejszych. Z kolei temperatura wykazuje efekt dodatni, czyli że



wzrostem temperatury następuje polepszenie rozdzielania. Tworzenie kompleksów inkluzyjnych z obojętnymi cyklodekstrynami jest preferowane w temp. niższych [157]. W tym przypadku polepszenie rozdzielania wynika z osłabienia kompleksowania enancjomerów cyklopentolatu z  $\beta$ -CD na korzyść kompleksowania z s- $\beta$ -CD, której efekt rozdzielania jest lepszy.

Pozostałe zmienne wpływają na rozdzielanie w znacznie mniejszym stopniu.

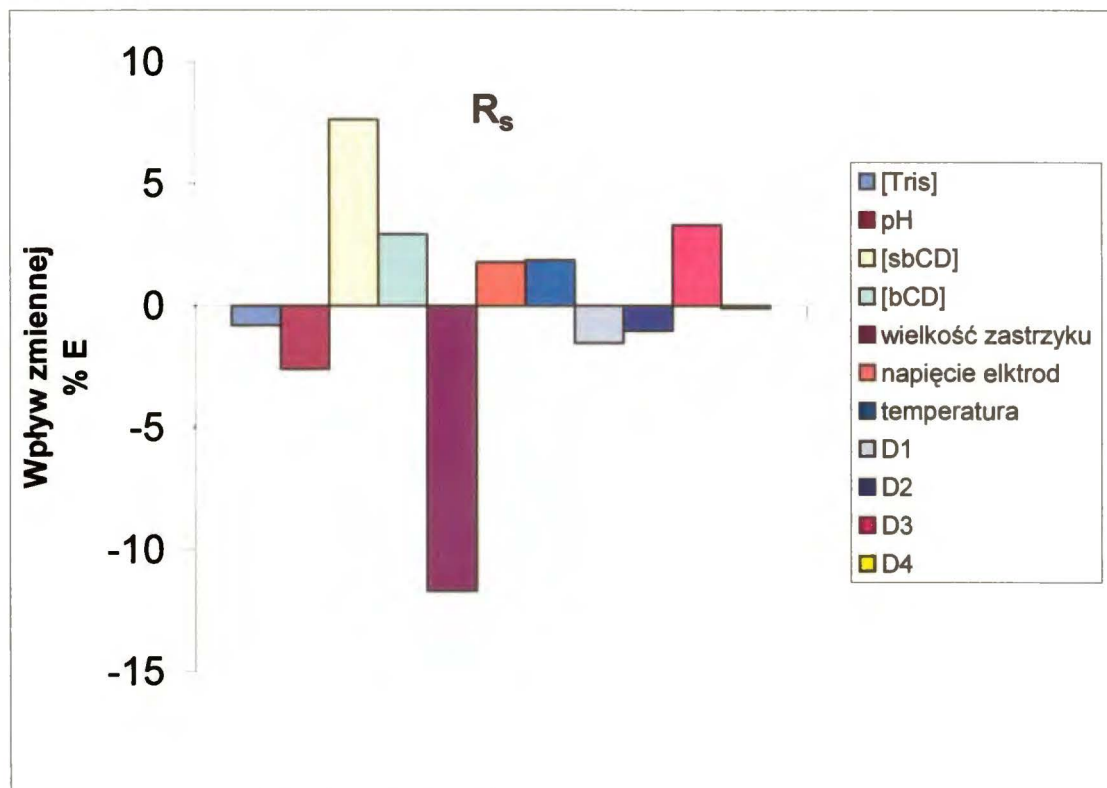
## 2. Metoksyfenamina



Rys. VII-2. Wpływ wybranych zmiennych na współczynnik rozdzielania enancjomerów metoksyfenaminy. Warunki standardowe: bufor Tris 18mM, pH=7, temp. 25<sup>0</sup>C, napięcie 25kV, średnica kapilary 75 $\mu$ m. Pozostałe warunki przedstawia tabela VII-1.

Czynnikami wpływającymi na rozdzielanie enancjomerów metoksyfenaminy jest stężenie selektorów oraz wielkość zastrzyku (rys. VII-2). Zmniejszając wielkość zastrzyku i zwiększając stężenie s- $\beta$ -CD, a w mniejszym stopniu również  $\beta$ -CD możemy uzyskać lepsze rozdzielanie, które w przypadku metoksyfenaminy jest i tak znaczne.

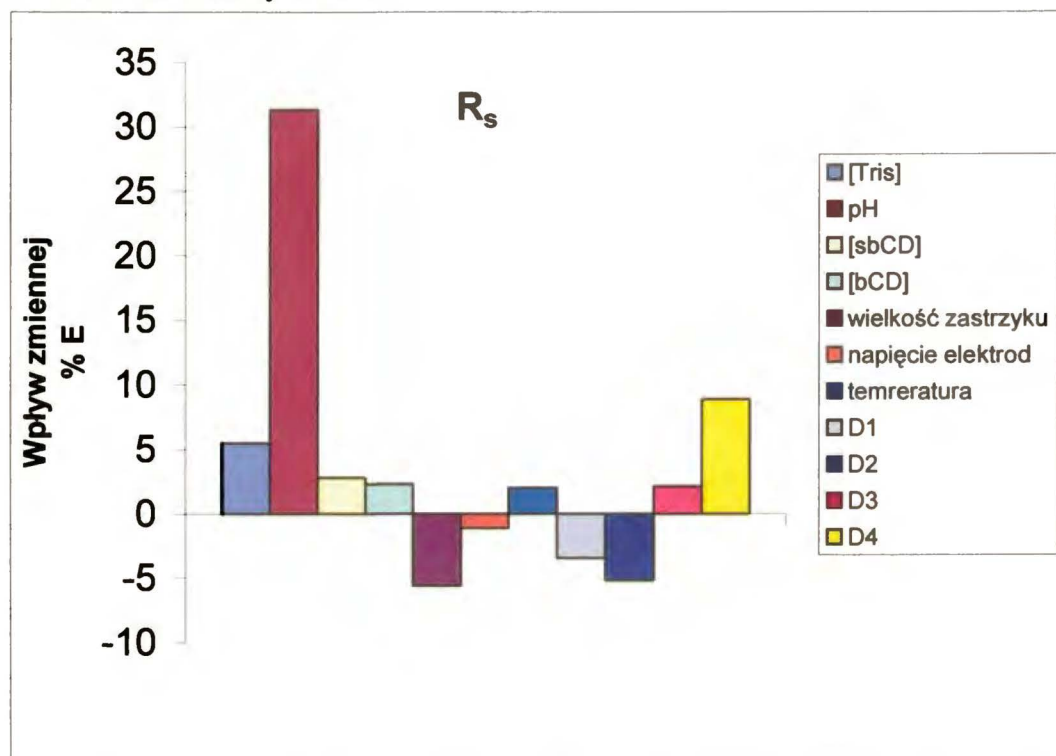
### 3. Bametan



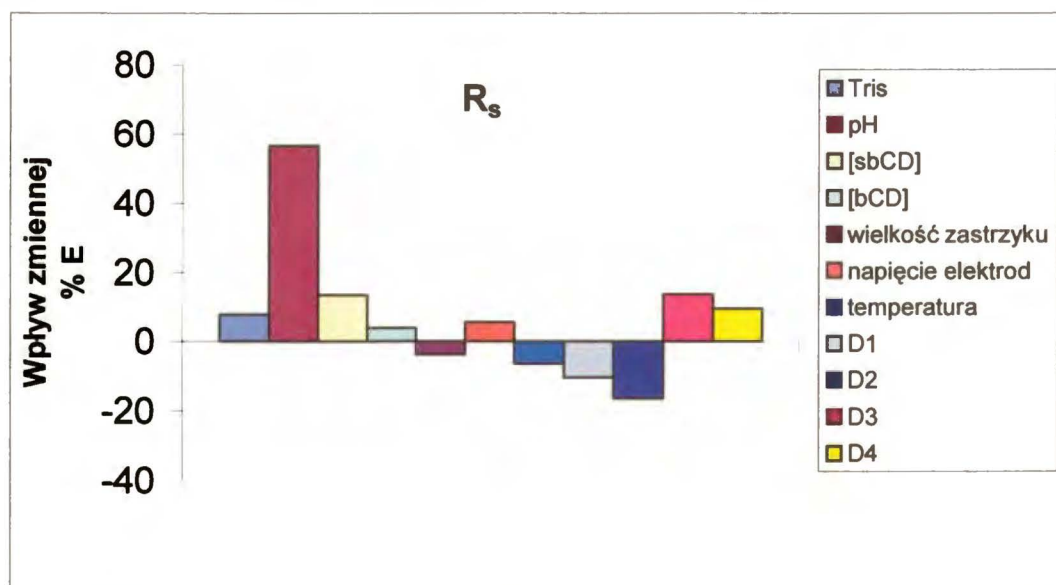
Rys. VII-3. Wpływ wybranych zmiennych na współczynnik rozdzielania enancjomerów bametanu. Warunki standardowe: bufor Tris 18mM, pH=7, temp. 25<sup>0</sup>C, napięcie 25kV, średnica kapilary 75μm. Pozostałe warunki przedstawia tabela VII-1.

Współczynnik rozdzielania enancjomerów bametanu w każdym przypadku był wyższy od 2,5 (rys. VII-3). Kształt pików, które są szerokie, wskazuje, że najlepszym rozwiązaniem do jeszcze lepszego rozdzielania jest zmniejszenie wielkości zastrzyku. Podobnie jak w przypadku metoksyfenaminy, również wzrost stężenia selektorów poprawia rozdzielanie pików.

#### 4. Feniramina i doksyamina



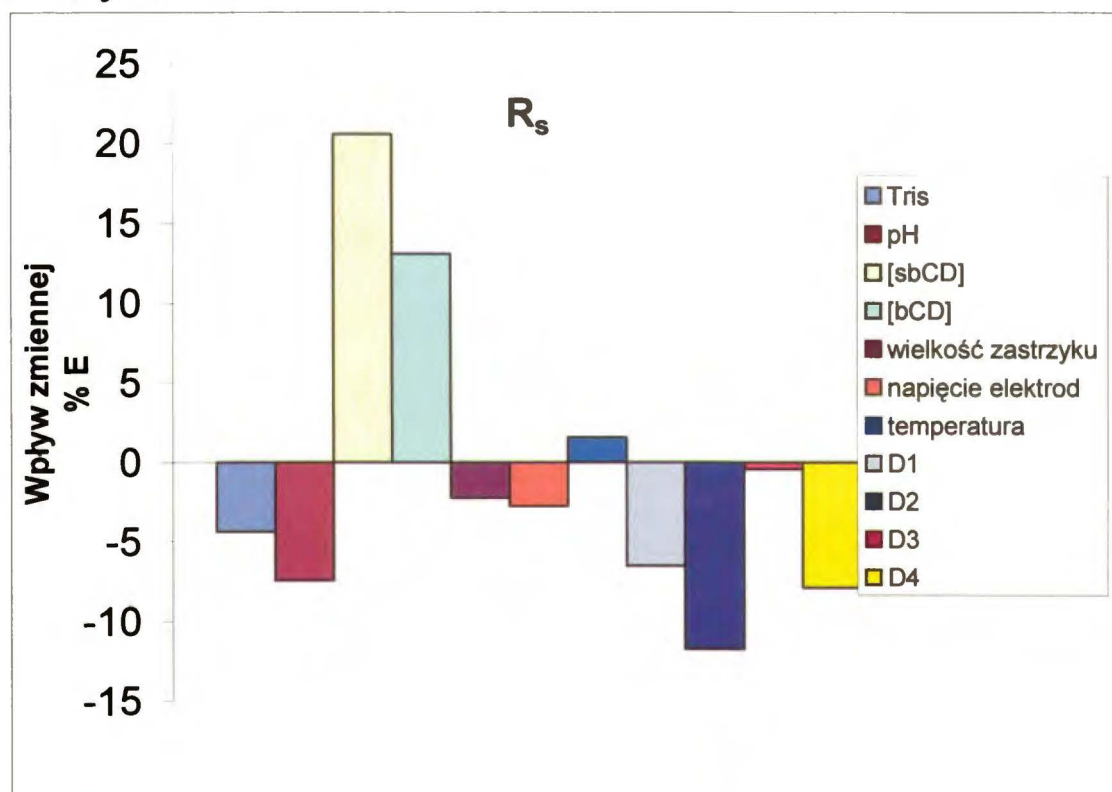
Rys. VII-4. Wpływ wybranych zmiennych na współczynnik rozdzielania enancjomerów feniraminy. Warunki standardowe: bufor Tris 18mM, pH=7, temp. 25°C, napięcie 25kV, średnica kapilary 75µm. Pozostałe warunki przedstawia tabela VII-1.



Rys. VII-5. Wpływ wybranych zmiennych na współczynnik rozdzielania enancjomerów doksylaminy. Warunki standardowe: bufor Tris 18mM, pH=7, temp. 25°C, napięcie 25kV, średnica kapilary 75µm. Pozostałe warunki przedstawia tabela VII-1.

Feniramina tworzy bardzo trwałe kompleksy z s- $\beta$ -CD. Jak wykazano wcześniej, bardzo silne kompleksowanie, w którym uczestniczą oddziaływania elektrostatyczne pomiędzy feniraminami a s- $\beta$ -CD w pH=2,5 jest mało selektywne (tabela VI-2). Dlatego wzrost pH buforu, a więc i osłabienie tych oddziaływań przyczynia się do lepszego rozróżnienia chiralnego (rys. VII-4). W ten sam sposób zachowuje się doksylicyna (rys. VII-5).

### 5. Bromfeniramina

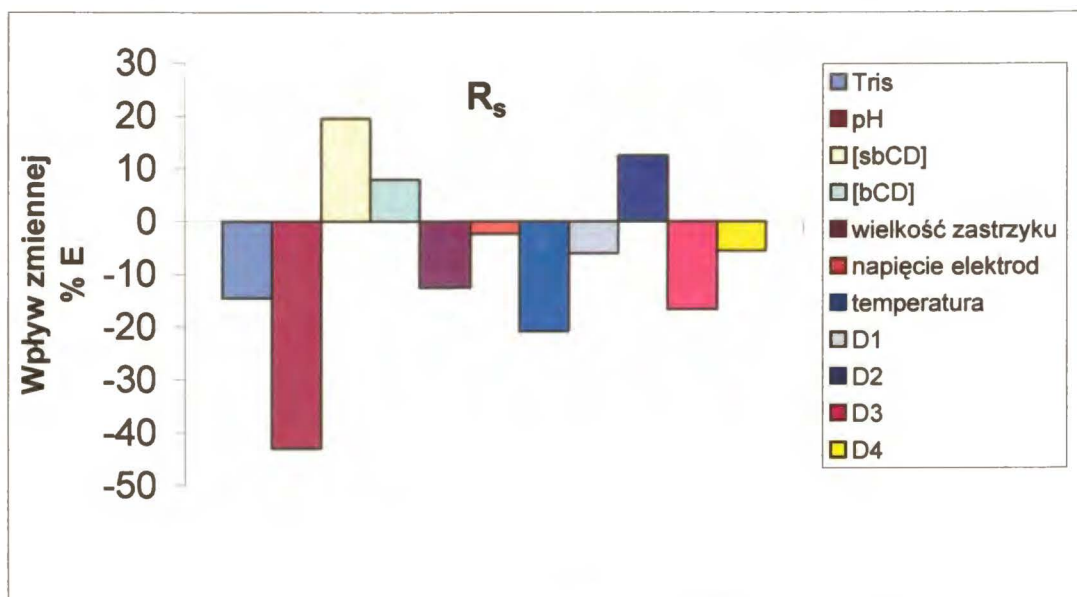


Rys. VII-6. Wpływ wybranych zmiennych na współczynnik rozdzielania enancjomerów bromfeniraminy. Warunki standardowe: bufor Tris 18mM, pH=7, temp. 25<sup>0</sup>C, napięcie 25kV, średnica kapilary 75 $\mu$ m. Pozostałe warunki przedstawia tabela VII-1.

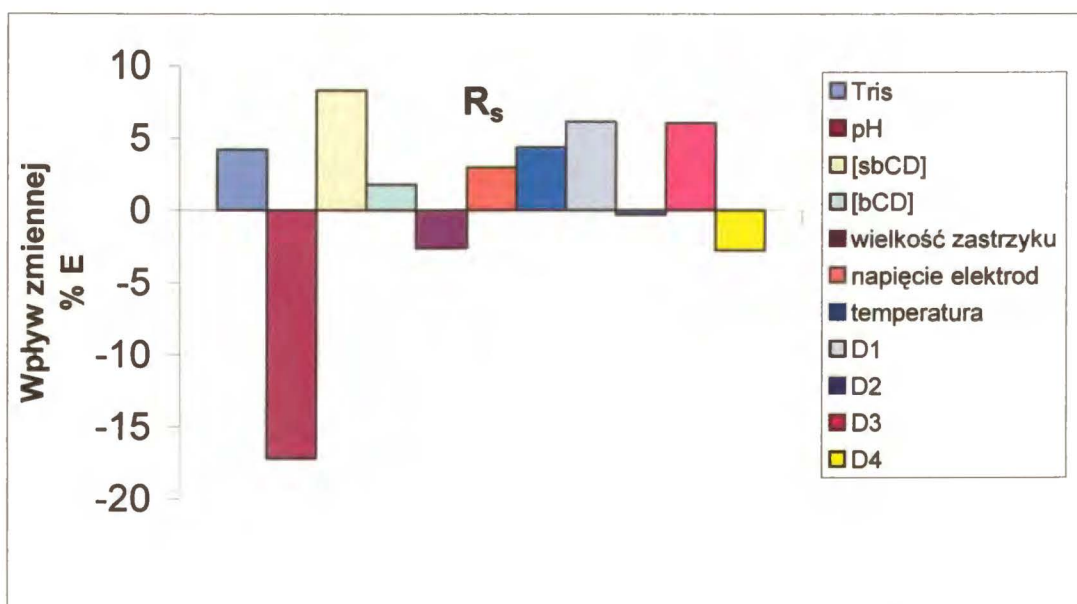
Bromfeniramina podobnie jak inne feniraminy tworzy trwałe kompleksy z s- $\beta$ -CD, jednak dodatkowo tworzy silne kompleksy również z  $\beta$ -CD. Ta równowaga w sile kompleksowania obu cyklodekstryn sprawia, że czynnik pH nie ma aż takiego znaczenia (rys. VII-6). Zwiększając proporcjonalnie stężenia obu cyklodekstryn można oczekiwać poprawy rozdzielania.



## 6. Ketamina i epinefryna



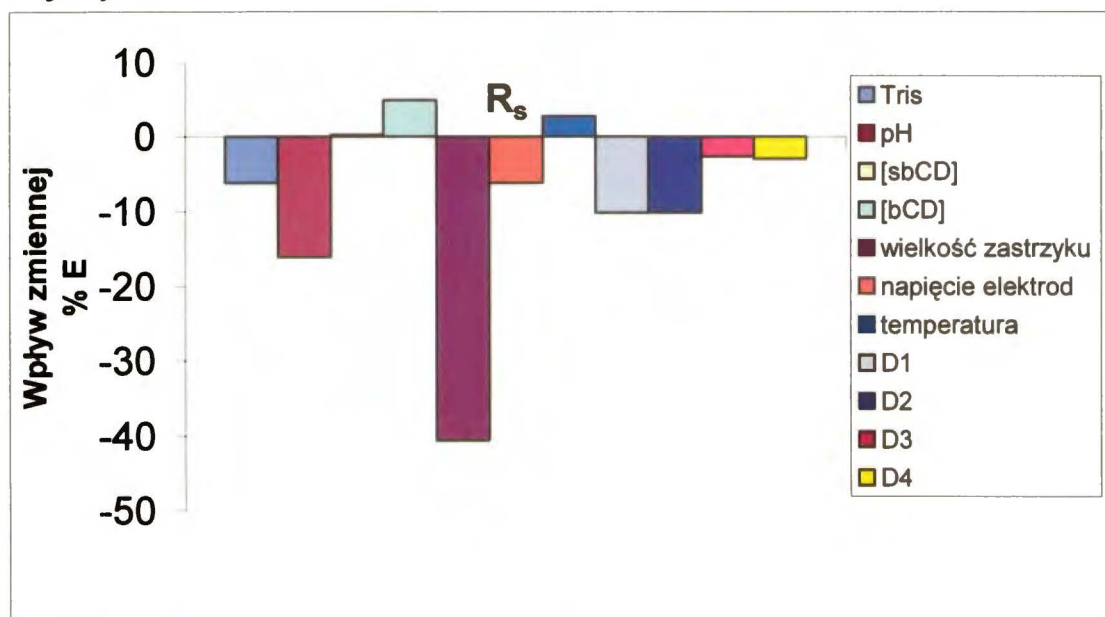
Rys. VII-7. Wpływ wybranych zmiennych na współczynnik rozdzielania enancjomerów ketaminy. Warunki standardowe: bufor Tris 18mM, pH=7, temp. 25<sup>0</sup>C, napięcie 25kV, średnica kapilary 75μm. Pozostałe warunki przedstawia tabela VII-1.



Rys. VII-8. Wpływ wybranych zmiennych na współczynnik rozdzielania enancjomerów epinefryny. Warunki standardowe: bufor Tris 18mM, pH=7, temp. 25<sup>0</sup>C, napięcie 25kV, średnica kapilary 75μm. Pozostałe warunki przedstawia tabela VII-1.

Czynnikami decydującymi o polepszeniu rozdzielania ketaminy są: pH, stężenie s- $\beta$ -CD oraz temperatura (rys. VII-7). Szczególnie istotne jest obniżenie pH. Bardzo podobnie zachowuje się epinefryna (rys. VII-8).

### 7. Efedryna



Rys. VII-9. Wpływ wybranych zmiennych na współczynnik rozdzielania enancjomerów cyklopentolatu. Warunki standardowe: bufor Tris 18mM, pH=7, temp. 25<sup>0</sup>C, napięcie 25kV, średnica kapilary 75 $\mu$ m. Pozostałe warunki przedstawia tabela VII-1.

Efedryna jest najtrudniejszym związkiem do rozdzielania. Ponieważ selektywność rozróżniania jej enancjomerów jest niewielka najlepszym rozwiązaniem jest zmniejszenie wielkości zastrzyku, co potwierdziło obecne badanie (rys. VII-9). W odróżnieniu od innych związków zmiany stężenia selektorów nie mają prawie żadnego znaczenia.

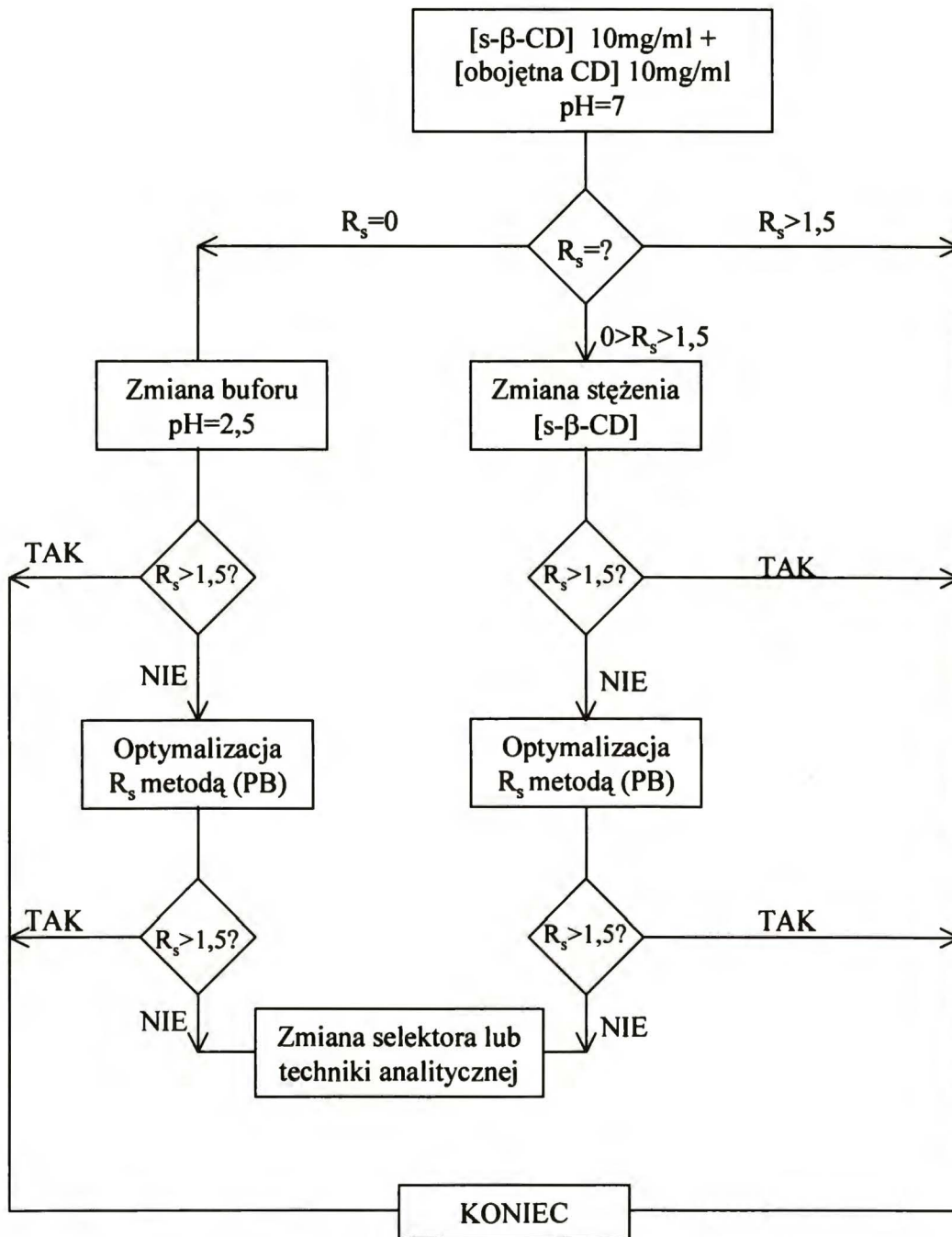
Wyniki prezentowane w tym rozdziale pokazują, że rozkład Placketta-Burmana może być z powodzeniem stosowany do poszukiwania warunków sprzyjających polepszeniu rozdzielania, jak też do przewidywania zmian, jakie zajądą w układzie pod wpływem zmian różnych parametrów.

Statystyczna ocena parametrów wskazuje, że zgodnie ze wcześniejszymi rozważaniami czynnikami mającymi decydujący wpływ na rozróżnienie enancjomerów są: stężenie selektorów i pH buforu. Okazało się również, że istotnym parametrem może być wielkość zastrzyku, jak również zmiana temperatury nawet w bardzo wąskim zakresie. Pozostałe czynniki powodują zmiany w niewielkim stopniu.

Warto też zauważyć, że z wyjątkiem cyklopentolatu polepszeniu rozdzielania sprzyja równoczesny wzrost stężenia s- $\beta$ -CD oraz  $\beta$ -CD, co potwierdza słuszność stosowania dwóch cyklodekstryn.

### ***VII-3. Strategia rozdzielania związków zasadowych i obojętnych***

Na podstawie przeprowadzonych w poprzednich rozdziałach analiz został zaproponowany ogólny schemat rozdzielania związków o charakterze zasadowym. Schemat ten przedstawiony na *rys. VII-10* jest słuszny również dla związków obojętnych, choć skuteczność ich rozdzielania będzie mniejsza ze względu na mniejszą siłę oddziaływań tych związków z s- $\beta$ -CD.



Rys. VII-10. Schemat rozdzielania z zastosowaniem układu złożonego z *s*-β-CD oraz obojętnej cyklodekstryny związków zasadowych i obojętnych.



### VII-3.1. Weryfikacja skuteczności schematu

Weryfikacji przedstawionego schematu (rys. VII-10) dokonano rozdzielając 12 różnych związków. Wyniki przedstawiono w tabeli VII-4.

Tabela VII-4. Współczynniki rozdzielania  $R_S$  uzyskane wg schematu przedstawionego na rys. VII-10 dla wybranych związków.

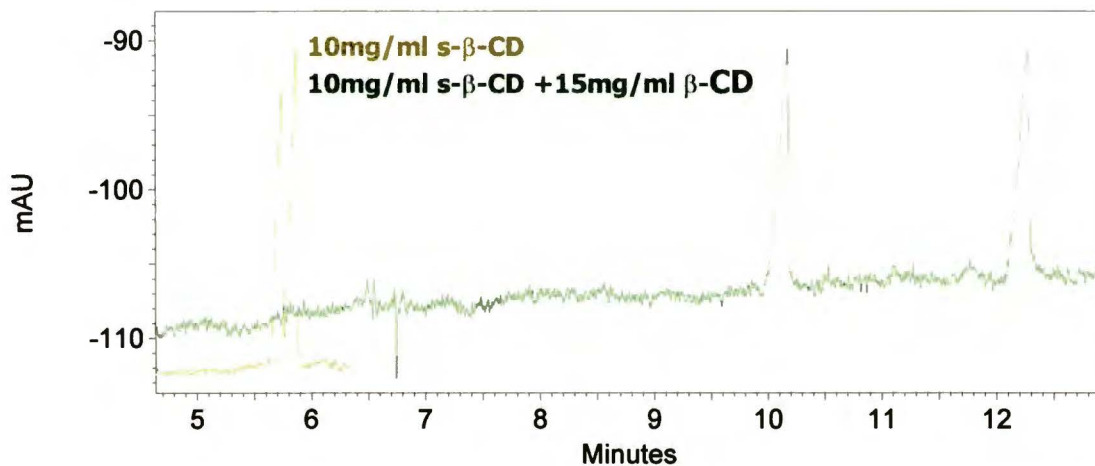
	pH=7		pH=2,5		
	[s-β-CD] 10 mg/ml [β-CD] 10 mg/ml	[s-β-CD] 10 mg/ml	[s-β-CD] 10 mg/ml [β-CD] 10 mg/ml	[s-β-CD] 10 mg/ml	[s-β-CD] 25 mg/ml
Kloperastyna	2,75	t>60min	12,14	0,82	-
Diperodon	5,67	4,67	20,17	1,39	-
Homochlorcyklozyna	3,12	t>60min	0	0	-
Hydroksyzyna	5,04	t>60min	1,59	0	-
Benfluoreks	0	0	t>60min	0	-
Propiomazyna	0,24	0,12	0,41	0	-
Oksybutynin	0	0	0	3,88	-
Bromek oksyfenonu	0	0,46	-	0	-
Tyrozyna	0	0	t>60min	9,19	-
Tryptofan	0	0	t>60min	9,96	-
Feniloalanina	0	0	-	t>60min	9,85
Fenyloglicyna	0	0	-	t>60min	3,08

Stężenia selektorów [mg/ml]

Z 12-tu rozdzielanych związków całkowicie udało się podzielić 9 z nich a 2 dzieli się częściowo. Dlatego można przypuszczać, że w wyniku optymalizacji metodą PB uda się je rozdzielić do podstawy. W przypadku benfluoreksu wydaje się słuszne zastosowanie innej metody analitycznej.

Można zauważyć, że aminokwasy: tyrozyna, tryptofan, feniloalanina oraz fenyloglicyna nie ulegają podziałowi w pH=7. W tych warunkach są one w postaci cząsteczek obojętnych i słabo oddziałują z cyklodekstrynami. Natomiast w pH=2,5 posiadają ładunek dodatni i kompleksują z s-β-CD słabo, przez co czas analizy jest bardzo długi. Nie byłoby celowe dodanie obojętnej cyklodekstryny, gdyż spowoduje to zanik pików. Współczynniki rozdzielania, jakie otrzymuje się z samą s-β-CD są powyżej  $R_S=3$ .

Biorąc pod uwagę pozostałe związki widzimy, że lepsze rozdzielanie obserwujemy w układzie z dwoma cyklodekstrynami (w pH=7 podzieliły się enancjomery kloperastyny, diperodonu, homochlorcyklozyny oraz hydroksyzyny), niż w układzie pojedynczym (w pH=7 dzieli się jedynie diperodon). W przypadku hydroksyzyny, jedynie w układzie podwójnym może dojść do rozdzielania enancjomerów. Wyjątek stanowi oksybutynin, który dzieli się z s- $\beta$ -CD. Na rys. VII-11 przedstawiono przykładowy elektroferogram rozdzielania enancjomerów kloperastyny w pH=2,5.



Rys.VII-11. Przykład rozdzielania enancjomerów kloperastyny w pH=2,5. Warunki: bufor Tris 18mM, temp. 25<sup>0</sup>C, średnica kapilary 75 $\mu$ m, napięcie -25kV.

## Rozdział VIII

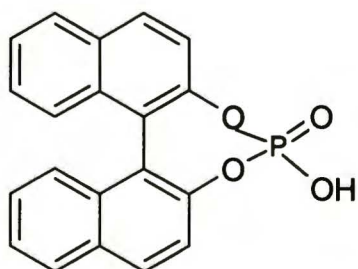
### Inne układy supramolekularne stosowane w enancjoseparacji

#### VIII-1. Układ cyklodekstryna + kasy cholowe

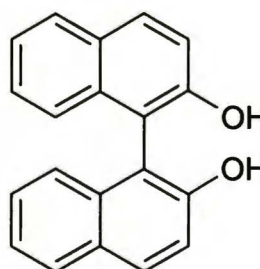
Chiralne surfaktanty znalazły szerokie zastosowanie w enancjoseparacji. Właściwości tych selektorów zostały omówione w części literaturowej. Ich użycie w układach mieszanych jest o tyle ciekawe, że tworzone przez nie micelle z natury są obiektami dynamicznymi. Dzięki temu możliwa jest taka aranżacja w przestrzeni, że anionowe micelle mogą służyć do rozdzielania związków anionowych. W przypadku  $s\text{-}\beta\text{-CD}$ , posiadającej liczne grupy anionowe, oddziaływanie ze związkami anionowymi jest bardzo ograniczone odpychającym efektem elektrostatycznym, co potwierdzono eksperymentalnie (nie zaobserwowano efektu wskazującego na kompleksowanie binaftalenu).

Jako związków modelowych do badania enancjoseparacji w układach micelarnych użyto atropoizomerów binaftalenu oraz binaftolu, przedstawione na rys. VIII-1.

**Binaftalen BNP**



**Binaftol BN**



Rys. VIII-1. Struktura chemiczna binaftalenu (BNP) oraz binaftolu (BN).

### **VIII-1.1.Zastosowanie układów pojedynczych**

Wyniki dla pojedynczych układów są przedstawione w *tabeli VIII-1* [135]. Badania przeprowadzono w pH=11. W tych warunkach BNP oraz BN są zdeprotonowane i posiadają ujemne ruchliwości elektroforetyczne. Zastosowano szereg stężeń cholanu sodowego (CHASS) oraz taurodeoksyholanu sodowego (TDCHASS), przy czym wszystkie są powyżej krytycznego stężenia micelnego [158] oraz różne stężenia CD.



Tabela VIII-1. Wyniki elektroforetyczne dla binaftalenu i binaftolu dla układu z pojedynczym selektorem.

Bufor	BNP							BN						
	$t_{EOF}$	$t_1/t_2$	$\mu_1$	$\mu_2$	$\alpha=\mu_2/\mu_1$	pierwszy enancjomer	$R_s$	$t_{EOF}$	$t_1/t_2$	$\mu_1$	$\mu_2$	$\alpha=\mu_2/\mu_1$	pierwszy enancjomer	$R_s$
<b>bez chiralnego selektora</b>														
	3,8	5,4/5,4	-14,4	-14,4	1			3,8	5,1/5,1	-13,2	-13,2	1		
<b>cyklodekstryny</b>														
20mM $\beta$ -CD	4,8	6,0/6,0	-7,3	-7,3	1		0	4,9	6,0/6,0	-6,7	-6,7	1		0
20mM $\beta$ -CD +5%EtOH	6,1	7,77/7,82	-6,5	-6,7	1,02	S	0,18	6,1	7,67/7,67	-6	-6	1		0
20mM $\beta$ -CD	5,4	6,89/6,89	-7	-7	1		0	5,4	6,49/6,49	-6,4	-6,4	1		0
20mM HP- $\beta$ -CD	5,3	6,41/6,46	-6,3	-6,6	1,04	S	0,22	5,3	6,2/6,2	-5,3	-5,3	1		0
20mM TM- $\beta$ -CD	4,6	5,39/5,51	-6	-6,7	1,12	S	2,17	4,7	5,24/5,28	-4,1	-4,4	1,06	S	0,38
5mM TM- $\beta$ -CD	4,5	5,50/5,72	-7,9	-9,2	1,16	S	2,08	4,5	5,49/5,59	-7,3	-7,9	1,08	S	1,04
1mM TM- $\beta$ -CD	4,4	5,75/5,93	-10	-11	1,1	S	0,71							
<b>kwasy cholowe</b>														
20mM chass	5,5	9,48/9,87	-14,3	-15,1	1,05	R	4,6	5,7	8,58/8,75	-10,9	-11,4	1,03*	R	0,37
30mM chass	5,5	9,71/9,92	-14,8	-15,2	1,03	R	1,53	5,5	9,14/9,23	-13,6	-13,8	1,01	R	0,16
50mM chass	6,9	17,41/18,03	-16	-16,4	1,02	R	1,51	6,5	13,7/13,7	-14,7	-14,7	1		0
80mM chass	7,4	18,62/19,0	-15,1	-15,3	1,01	R	0,22	7,7	19,3/19,3	-14,3	-14,3	1		0
20mM tdchass	5	9,05/9,61	-16,5	-17,7	1,07	R	3,2	5	9,41/9,6	-17	-17,4	1,02	R	0,28
80mM tdchass	6,4	16,46/16,97	-17,7	-18,1	1,02	R	1,17	6,8	19,5/19,5	-17,7	-17,7	1		0

Warunki: Kapilara szklana długości 63cm (58 cm do okienka detektora)  $\times$  75 $\mu$ m. Bufor: 18mM Tris z odpowiednią ilością selektora, pH=11.

Napięcie na elektrodach 20kV, temp. 25°C.

\* brzydki kształt pików

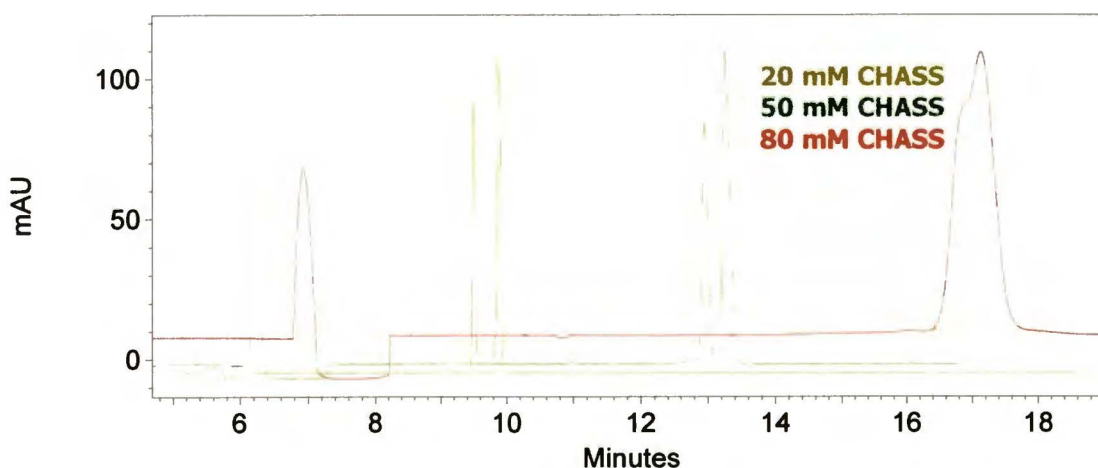
### VIII-1.1.1. Cyklodekstryny

Zgodnie z oczekiwaniami dodanie obojętnej cyklodekstryny zmniejsza ruchliwość binaftalenu i binaftolu. W przebadanych warunkach rozdzielanie enancjomerów binaftalenu otrzymano dla TM- $\beta$ -CD oraz HP- $\beta$ -CD. Rozdzielenie z  $\beta$ -CD otrzymano, kiedy do roztworu dodano niewielką ilość (5%) etanolu, natomiast dla  $\gamma$ -CD nie zaobserwowano rozróżnienia enancjomerów binaftalenu. W przypadku enancjomerów binaftolu jedynie TM- $\beta$ -CD wykazuje się enancjoselektywnością.

Kolejność migracji enancjomerów binaftalenu dla  $\beta$ -CD, HP- $\beta$ -CD oraz TM- $\beta$ -CD jest taka sama: S wychodzi przed R, tak więc posiadają one tą samą enancjoselektywność. Silniej kompleksowany jest enancjomer S.

### VIII-1.1.2. Kwasy cholowe

Micelle kwasów cholowych poruszają się w warunkach elektroforezy z ujemną ruchliwością a zarazem większą od ruchliwości binaftalenu i binaftolu. Powoduje to, że ich wpływ na mobilność badanych związków jest odmienny w porównaniu z cyklodekstrydami. Kwasy cholowe powodują opóźnianie binaftalenu i binaftolu.



Rys. VIII-2. Wpływ stężenia kwasu cholowego na rozróżnienie chiralne enancjomerów binaftalenu.

Pierwszy jest wymywany enancjomer R. Ponieważ jednak, silniej kompleksowany enancjomer jest zatrzymywany dłużej kwasy cholowe wykazują tę samą enancjoselektywność co cyklodekstryny, tzn. silniej kompleksują enancjomer S.

Te wyniki są zgodne z pracami Szoko [159], który zbadał, że rozpoznawanie jest wynikiem kompleksowania przez tetramery TDCHASS, a enancjomer S binaftalenu jest dwa razy silniej wiązany niż enancjomer S.

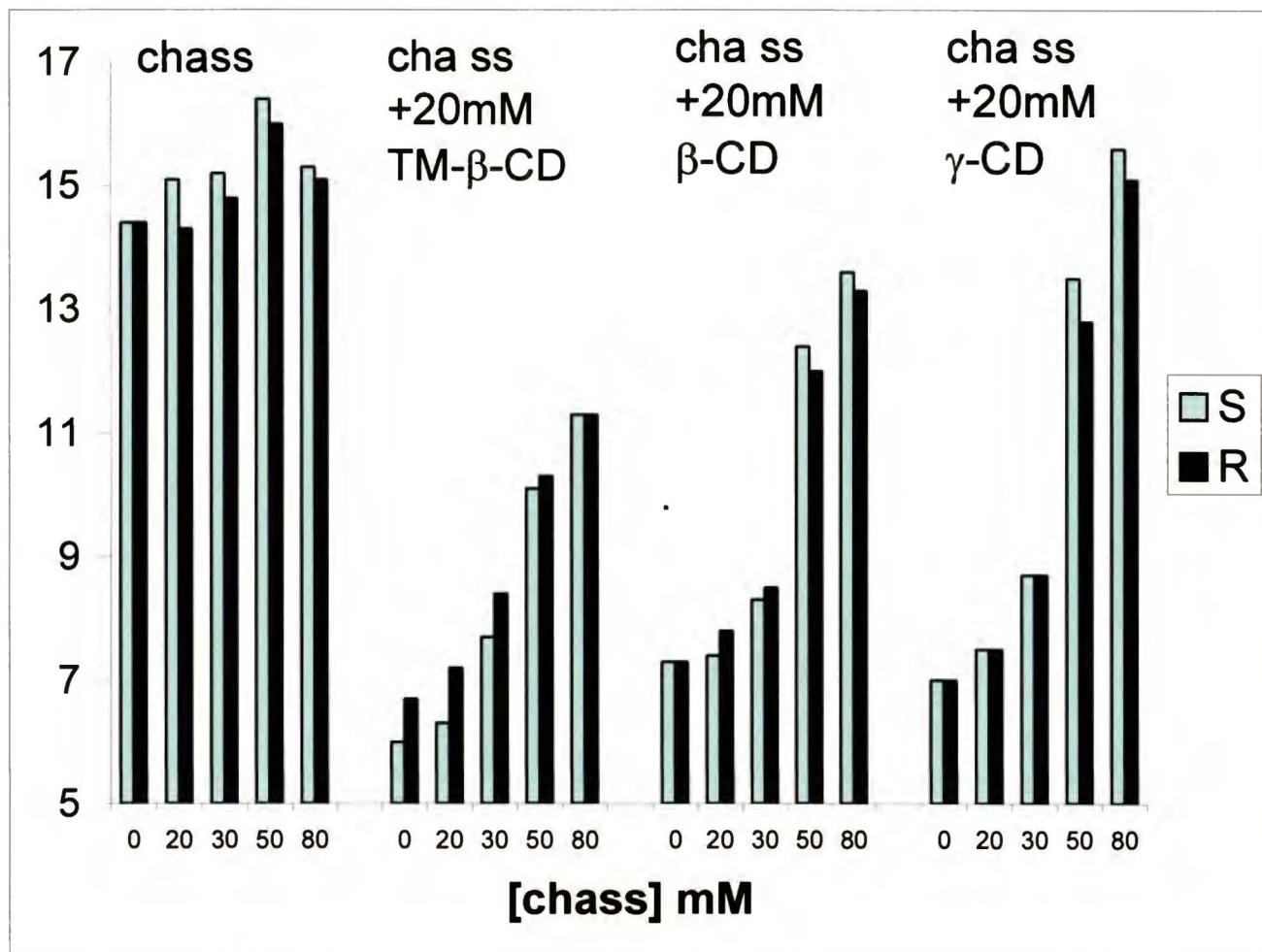
Najlepsze rozdzielanie pików obserwuje się dla mniejszych stężeń kwasów cholowych (rys. VIII-2). Dla stężenia 80mM rozdzielanie enancjomerów zanika, co może wskazywać, że w tych warunkach oba enancjomery związku w całości znajdują się w fazie micelarnej.

### **VIII-1.2. Zastosowanie układów podwójnych**

Ponieważ kwasy cholowe są surfaktantami anionowymi można je porównywać biorąc pod uwagę zachowanie się w układach elektroforetycznych do anionowej s- $\beta$ -CD. Jednak wyniki niniejszej pracy wskazują na to, że porównanie należy ograniczyć do wpływu na ruchliwość, ponieważ mechanizmy rozdzielania komplikują się w układzie złożonym z cyklodekstryny i kwasów cholowych.

Wpływ stężenia kwasów cholowych na ruchliwości i rozdzielanie binaftalenu i binaftolu zostało zbadane przy niezmiennym stężeniu cyklodekstryn ( $\beta$ -CD, HP- $\beta$ -CD i TM- $\beta$ -CD) równym 20mM. Stężenie CHASS zmieniano w zakresie 0-80mM. Ruchliwości elektroforetyczne enancjomerów binaftalenu z CHASS oraz w układach podwójnych z cyklodekstrynami porównano na rys. VIII-3. Wyniki te są zależne od natury cyklodekstryny.





Rys. VIII-3. Ruchliwości elektroforetyczne enancjomerów BNP poruszających się w kierunku katody: A) z CHASS i w układzie podwójnym: B) z 20 mM TM-β-CD C) z 20mM β-CD oraz D) 20mM γ-CD, stężenie CHASS zmienia się w zakresie od 0 do 80 mM. Warunki: Kapilara szklana długości 63cm (58 cm do okienka detektora) × 75 μm. Bufor: 18mM Tris z odpowiednią ilością selektora, pH=11. Napięcie na elektrodach 20kV, temp. 25°C.

Wyniki uzyskane dla układów podwójnych przedstawiono w tabeli VIII-2.



Tabela VIII-2. Wyniki elektroforetyczne dla binaftalenu i binaftolu dla układu podwójnego.

BNP							BN							
Bufor	$t_{EOF}$	$t_1/t_2$	$\mu_1$	$\mu_2$	$\alpha=\mu_2/\mu_1$	pierwszy enancjomer	$R_s$	$t_{EOF}$	$t_1/t_2$	$\mu_1$	$\mu_2$	$\alpha=\mu_2/\mu_1$	pierwszy enancjomer	$R_s$
<b>Cyklodekstryna + kwas cholowy</b>														
20mM $\beta$ -CD +20mM chass	6,7	9,25/9,41	-7,5	-7,8	1,05	S	1,86							
20mM $\beta$ -CD +30mM chass	6,5	9,23/9,32	-8,3	-8,5	1,02	S	1,47	6,5	7,72/7,77	-4,4	-4,6	1,03*	R	0,56
20mM $\beta$ -CD +50mM chass	8,3	17,86/18,61	-12	-12,4	1,03	R	2,68	8,4	17,95/18,55	-11,8	-12,1	1,03	R	0,36
20mM $\beta$ -CD +80mM chass	8,3	20,47/21,21	-13,3	-13,6	1,02	R	1,09	8,5	19,89/20,15	-12,3	-12,4	1,01	R	0,21
20mM $\beta$ -CD +20mM tdchass	6	7,96/7,96	-7,9	-7,9	1		0	6	7,93/7,93	-7,3	-7,3	1		0
20mM $\beta$ -CD +80mM tdchass	7,3	16,10/16,74	-13,8	-14,2	1,03	R	2,21	7,5	18,38/18,82	-14,6	-14,9	1,02	R	0,67
20mM TM- $\beta$ -CD +20mM chass	6,5	8,38/8,77	-6,3	-7,2	1,15	S	7,68	6,6	7,51/7,59	-3,4	-3,7	1,08*	S	0,74
20mM TM- $\beta$ -CD +30mM chass	6,3	8,48/8,77	-7,7	-8,4	1,09	S	4,19	6,4	7,95/8,05	-5,7	-6	1,05	S	1,55
20mM TM- $\beta$ -CD +50mM chass	8	14,05/14,37	-9,9	-10,2	1,03	S	1,63	8,1	12,81/13,08	-8,4	-8,7	1,04	S	0,91
20mM TM- $\beta$ -CD +80mM chass	8,4	17,4/17,4	-11,3	-11,3	1		0	8,5	16,83/16,83	-10,3	-10,3	1		0
20mM TM- $\beta$ -CD +20mM tdchass	6,6	9,21/9,45	-8,1	-8,6	1,06	S	1,8	6,7	8,89/9,04	-6,8	-7,2	1,05	S	0,92
20mM TM- $\beta$ -CD +80mM tdchass	9,7	26,94/27,62	-12,2	-12,3	1,01	S	0,85	10	28,9/28,9	-11,9	-11,9	1		0
20mM $\gamma$ -CD+20mM chass	6	7,89/7,89	-7,5	-7,5	1		0							
20mM $\gamma$ -CD+30mM chass	6,7	9,87/9,87	-8,7	-8,7	1		0	6,4	8,25/8,25	-6,4	-6,4	1		0
20mM $\gamma$ -CD+50mM chass	6,9	13,40/14,05	-12,9	-13,6	1,05	R	1,87	6,9	12,40/12,69	-11,9	-12,3	1,03	R	0,97
20mM $\gamma$ -CD+80mM chass	7	16,66/17,33	-15,1	-15,6	1,03	R	1,1	7,1	14,95/14,95	-13,7	-13,7	1		0
20mM HP- $\beta$ -CD +20mM chass	7,1	9,58/9,89	-6,9	-7,5	1,09	S	2,93	7,3	9,07/9,07	-5,1	-5,1	1		0
20mM HP- $\beta$ -CD +80mM chass	8,8	21,44/22,35	-12,3	-12,7	1,03	R	2,22	8,9	20,21/20,51	-11,6	-11,7	1,01		0,22
20mM HP- $\beta$ -CD +20mM tdchass	7,1	9,58/9,58	-6,9	-6,9	1		0	7,3	9,15/9,31	-5	-5,4	1,07*	S	0,37
20mM HP- $\beta$ -CD +80mM tdchass	9	26,69/28,21	-13,5	-13,8	1,03	R	3,52	9,4	29,57/30,68	-13,4	-13,7	1,02	R	1,12

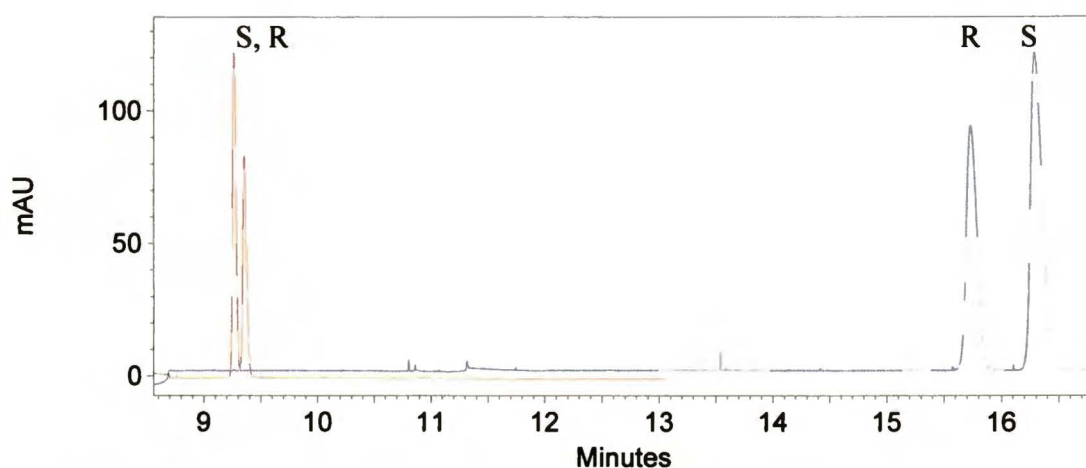
$t_{EOF}$ - czas migracji EOF-u,  $t_1, t_2$ -czas migracji (min) enancjomeru wymywanego jako pierwszy/drugi,  $\mu_1, \mu_2$  ruchliwość elektroforetyczna [ $\text{cm}^2\text{kV}^{-1}\text{min}^{-1}$ ] enancjomerów pierwszego/drugiego

Warunki: Kapilara szklana długości 63cm (58 cm do okienka detektora)  $\times$  75 $\mu\text{m}$ . Bufor: 18mM Tris z odpowiednią ilością selektora, pH=11. Napięcie na elektrodach 20kV, temp. 25°C.

\* brzydki kształt pików

Interesujący wynik otrzymano dla mieszaniny 20mM  $\beta$ -CD i 20mM CHASS. Kolejność migracji enancjomerów binaftalenu jest typowa dla  $\beta$ -CD a  $R_S=1,86$ . W układzie pojedynczym z samą  $\beta$ -CD obserwuje się jedynie niewielkie rozdzielenie ( $R_S \approx 0$ ).

Ze wzrostem stężenia CHASS, gdy jest ono większe od  $\beta$ -CD kolejność migracji enancjomerów binaftalenu stopniowo zmienia się z S na R, która to kolejność jest typowa dla CHASS. Zmieniając stężenie kwasu cholowego z 30mM na 50mM można zmienić kolejność migracji enancjomerów binaftalenu, co pokazuje rys. VIII-4.



Rys. VIII-4. Zmiana kolejności migracji enancjomerów binaftalenu.

Dla binaftalenu i binaftolu z CHASS i TM- $\beta$ -CD kolejność migracji dla wszystkich stężeń kwasu cholowego przy stałym stężeniu TM- $\beta$ -CD jest specyficzna dla cyklodekstryny; enancjomer S wychodzi jako pierwszy.

Dla  $\gamma$ -CD i CHASS rozdzielenie enancjomerów binaftalenu uzyskano jedynie przy stężeniach 50mM oraz 80mM CHASS, podczas gdy dla binaftolu rozdzielenie miało miejsce dla 50mM CHASS, z kolejnością migracji typową dla kwasów cholowych.

Z badań nad enancjoselektywnością wynika, że zarówno  $\beta$ -CD, TM- $\beta$ -CD jak i CHASS posiadają tę samą enancjoselektywność w stosunku do enancjomerów binaftalenu. Z powodu różnego mechanizmu działania ich wpływ na ruchliwość elektroforetyczną enancjomerów jest w przeciwnym kierunku. Posiadający ujemny ładunek kwas cholowy



wykazuje elektroforetyczny ruch w kierunku przeciwnym do przepływu elektroforetycznego i dlatego nazywany jest fazą pseudo-stacjonarną. Obojętna cyklodekstryna porusza się z EOF jako chiralna faza ruchoma. Kiedy oba te selektory działają niezależnie, zgodnie z rozważaniami z punktu *VI-1.3*, w układzie podwójnym można oczekiwać zmniejszenia selektywności takiego układu. Jednakże takiego efektu nie zaobserwowano. Biorąc pod uwagę fakt, że kwasy cholowe i cyklodekstryny mogą tworzyć własne kompleksy [160], nie można wykluczyć powstawania selektora chiralnego złożonego z tych dwóch związków i tworzenia się kompleksów potrójnych związek-cyklodekstryna-kwas cholowy.

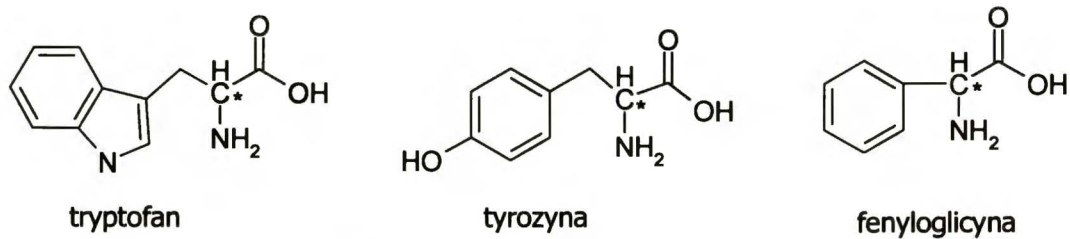
## ***VIII-2. Układ cyklodekstryna + chiralny eter koronowy***

W części literaturowej podano liczne przykłady zastosowania chiralnych eterów koronowych oraz niechiralnych jako czynnika uczestniczącego w procesie rozdzielania związków chiralnych. Najbardziej przebadany został tetrakarboksylogowany eter 18-korona-6 ( $C_{18}H_{34}O_6$ ) jako chiralny selektor peptydów [161].

W ramach niniejszej pracy przebadano grupę związków z rodziny chiralnych tetraazakoronandów pochodnych L-alaniny, różniących się wielkością pierścienia makrocyklu jako czynniki kompleksujące trzy aminokwasy: tryptofan, tyrosnę oraz fenyloglicynę, a w szczególności:

1. wyznaczono stałe trwałości kompleksów azakoronand-aminokwas,
2. przebadano selektywność badanych azakoronandów do aminokwasów,
3. zdefiniowano zależności pomiędzy rozmiarem oraz budową przestrzenną makrocyklu a siłą oddziaływań gość-gospodarz,
4. zbadano możliwość zastosowania chiralnych azakoronandów do rozdzielów chiralnych.

Struktury aminokwasów przedstawiono na *rys. VIII-5*.

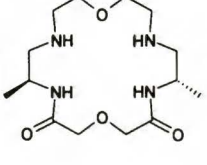
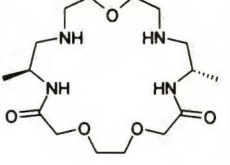
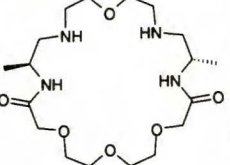
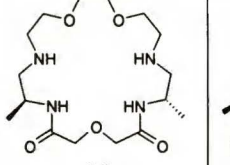
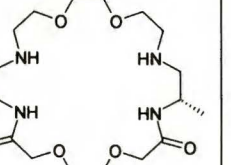
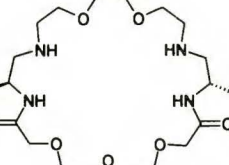


Rys. VIII-5. Struktury chemiczne tryptofanu, tyrozyny i fenyloglicyny.

Wzory strukturalne badanych azakoronandów oraz wyniki badań zawiera *tabela VIII-3* [148].



Tabela VIII-3. Stałe trwałości oraz ruchliwości elektroforetyczne badanych kompleksów azakoronandów z aminokwasami.

AZAKORONAND							
		13	14	15	16	17	18
tryptofan	$\mu_{\text{free}}$	3,03	3,03	3,00	3,04	3,03	3,02
	$\mu_{\text{comp}}$	-0,08 (0)	0,72	1,49	1,15	1,68	0,48
	K[l/mol]	662±79	440±41	1564±207	896±103	1440±199	454±77
tyrosyna	$\mu_{\text{free}}$	2,48	2,48	2,45	2,49	2,48	2,48
	$\mu_{\text{comp}}$	-0,06 (0)	0,52	1,15	0,86	1,32	-0,26 (0)
	K[l/mol]	729±82	457±43	1580±214	910±105	1454±201	354±58 (541)
fenyloglicina	$\mu_{\text{free}}$	1,37	1,37	1,35	1,37	1,37	1,36
	$\mu_{\text{comp}}$	0,11 (0)	0,37	0,61	0,45	0,78	0,04
	K[l/mol]	956±94	566±55	1698±241	962±112	1852±271	449±72

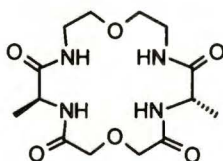
Warunki: Kapilara szklana długości 63cm (58 cm do okienka detektora) × 75µm. Bufor: 18mM Tris z odpowiednią ilością azakoronandu, pH=3. Napięcie na elektrodach 20 kV, temperatura rozdzielu 25 °C. EOF był wyznaczany używając DMSO jako marker.

Na podstawie wyników można stwierdzić, że

- Otrzymane stałe trwałości były w zakresie 500-2000 l/mol,
- 24-członowy azakoronand wykazuje najsilniejsze oddziaływanie z aminokwasami, 18- oraz 21-członowe azakoronandy wiążą aminokwasy znacznie słabiej, zaś najslabsze oddziaływania występują w przypadku 27-członowego azakoronandu 18, co jest prawdopodobnie spowodowane zbyt dużym rozmiarem makrocyklu,
- Izomery demonstrują podobne stałe trwałości do tych samych aminokwasów,
- Wzrost liczby elektrodonorowych atomów tlenu wpływa na stałe trwałości,
- Po wprowadzeniu podstawnika metylowego do makrocykla nie uzyskano rozróżnienia chiralnego.

Pomimo obecności chiralnych atomów węgla i oddziaływań pomiędzy azakoronandami oraz aminokwasami nie zaobserwowano rozróżnienia chiralnego dla badanych związków.

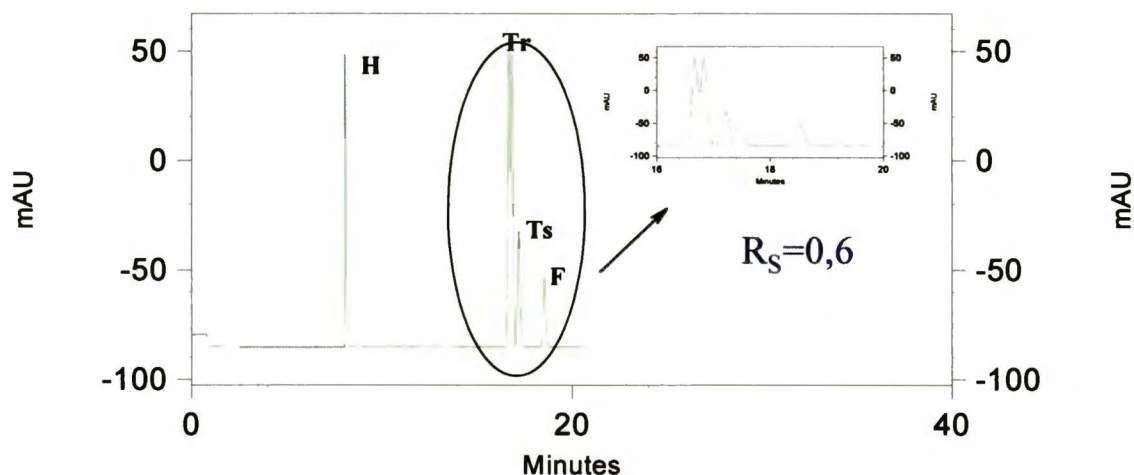
Zdolnością do wspomagania chiralnego rozróżnienia wykazał się natomiast inny tetrazakoronand (1), którego strukturę pokazano poniżej (*rys. VIII-6*):



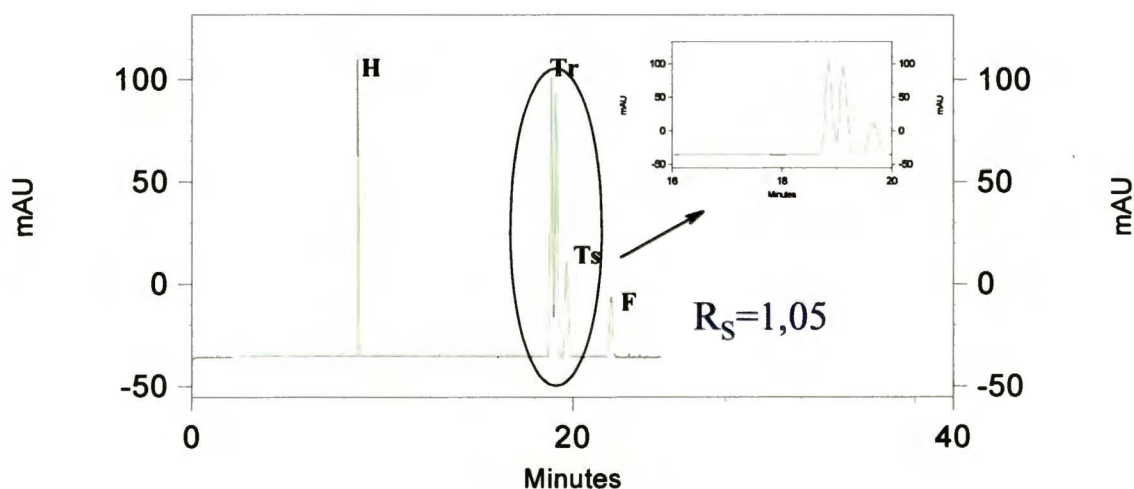
*Rys. VIII-6. Struktura chemiczna chiralnego tetraazakoronandu (1).*

Związek ten, w kombinacji z  $\alpha$ -cyklodekstryną umożliwia rozdzielenie racemicznej mieszaniny tryptofanu. Pomiary prowadzono w temperaturach 15, 20 oraz 25°C, przy pH=3. Kolejność wymywania aminokwasów była następująca: histydyna, tryptofan, tyrozyna, fenyloglicyna. W temperaturze 25°C, użycie samej  $\alpha$ -cyklodekstryny, prowadziło jedynie do częściowego podziału tryptofanu (*rys. VIII-7*). Zastosowanie w tych samych warunkach, jako dyskryminatora chiralnego, kombinacji  $\alpha$ -cyklodekstryna

– tetraamid 1, prowadziło natomiast do całkowitego rozdzielenia racemicznej mieszaniny tryptofanu, przy czym czas retencji był dłuższy (rys. VIII-8).

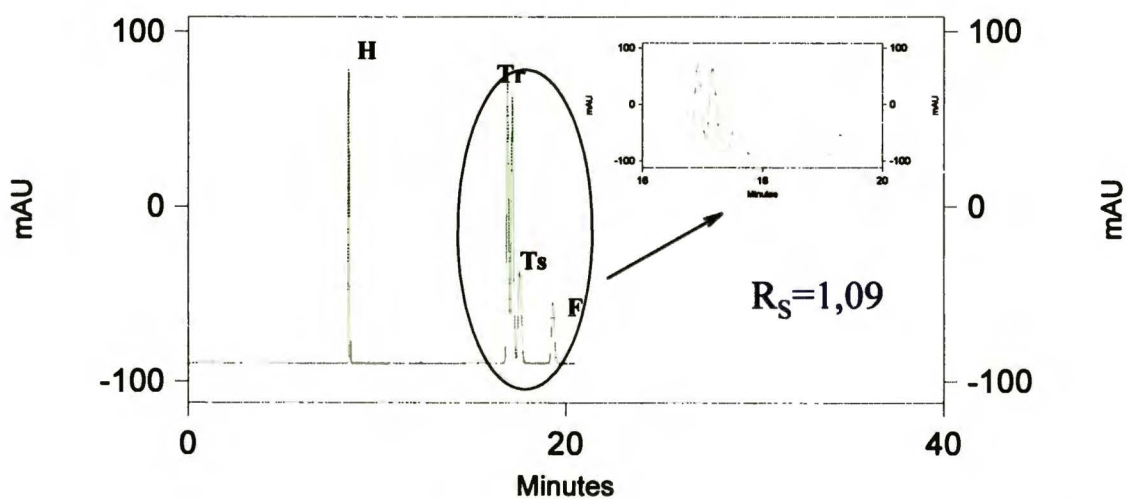


Rysunek VIII-7. Elektroferogram rozdzielenia mieszaniny racemicznych aminokwasów w kolejności migracji: histydyny (H), tryptofanu (Tr), tyrozyny (Ts) i fenyloglicyny (F) z użyciem  $\alpha$ -cyklodekstryny; 25°C, pH=3, c=20mM.



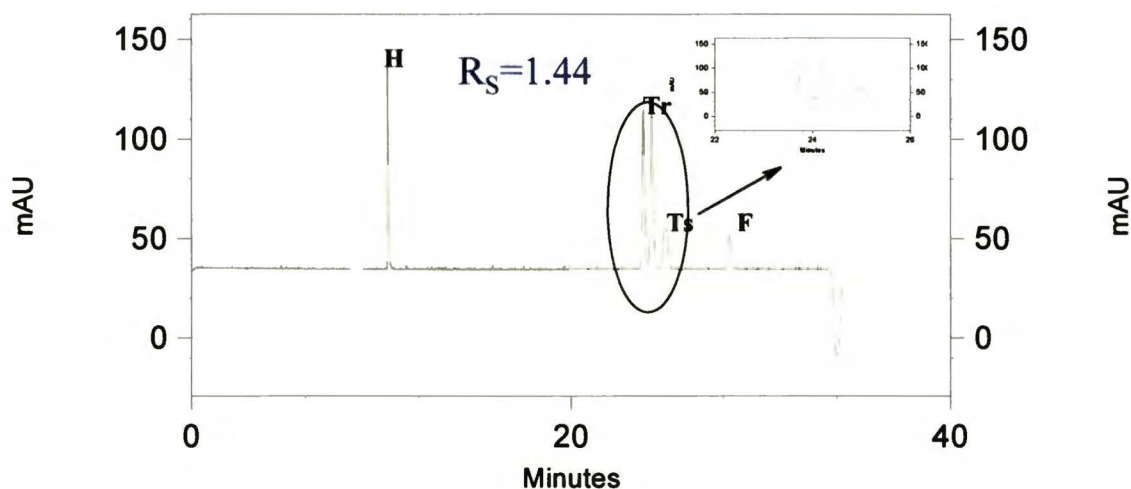
Rys. VIII-8. Elektroferogram rozdzielenia mieszaniny racemicznych aminokwasów w kolejności migracji: histydyny (H), tryptofanu (Tr), tyrozyny (Ts) i fenyloglicyny (F) z użyciem układu  $\alpha$ -cyklodekstryna – tetraazakoronand (1); 25°C, pH=3, c=20mM

W temperaturze 20°C również zaobserwowano rozdzielanie racemicznej mieszaniny tryptofanu, stosując zarówno  $\alpha$ -cyklodekstrynę, jak i układ  $\alpha$ -cyklodekstryna – tetraamid 1. Użycie makrocyklicznego tetraamidu wpływało na wyraźną poprawę rozdzielania racemicznego tryptofanu. Ponadto zaznaczał się rozdział tyrozyny, co nie miało miejsca w przypadku zastosowania samej  $\alpha$ -cyklodekstryny. Czas retencji w 20°C był odpowiednio dłuższy niż w temperaturze 25°C (rys. VIII-9 i rys. VIII-10).



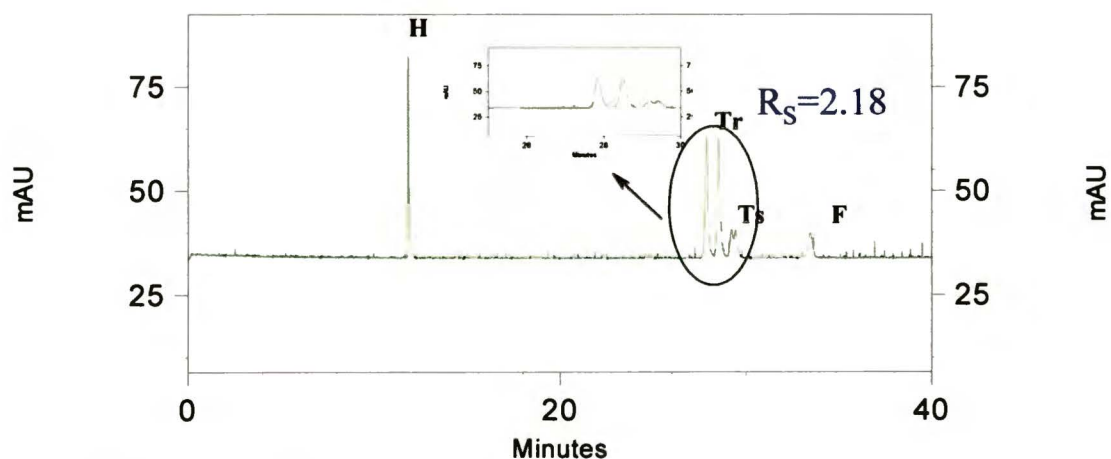
Rys. VIII-9. Elektroferogram rozdzielenia mieszaniny racemicznych aminokwasów w kolejności migracji: histydyny (H), tryptofanu (Tr), tyrozyny (Ts) i fenyloglicyny (F) z użyciem  $\alpha$ -cyklodekstryny; 20°C, pH=3, c=20mM.





Rys. VIII-10. Elektroferogram rozdzielenia mieszaniny racemicznych aminokwasów w kolejności migracji: histydyny (H), tryptofanu (Tr), tyrozyny (Ts) i fenyloglicyny (F) z użyciem układu  $\alpha$ -cyklodekstryryna – tetraazakoronand (1); 20°C, pH=3, c=20mM.

W temperaturze 15°C uzyskano jeszcze lepszy rozdział racemicznej mieszaniny tryptofanu i tyrozyny, jak również wydłużenie czasu retencji (rys. VIII-11). Obniżanie temperatury znacząco wpływało na poprawę rozdzielania aminokwasów, prawdopodobnie przez zwiększenie znaczenia oddziaływań pomiędzy cząsteczkami cyklodekstryryny, aminokwasu oraz teraamidu.



Rys. VIII-11. Elektroferogram rozdzielenia mieszaniny racemicznych aminokwasów w kolejności migracji: histydyny (H), tryptofanu (Tr), tyrozyny (Ts) i fenyloglicyny (F) z użyciem układu  $\alpha$ -cyklodekstryryna – tetraazakoronand (1); 15°C, pH=3, c=20mM.

Wyniki zaprezentowane w tym rozdziale potwierdzają, podobnie jak w przypadku innych układów podwójnych przedstawionych wcześniej, że łączenie dwóch selektorów może poprawiać rozdzielanie związków. Przebadane tetraazakoronandy pomimo tego, że same nie są w stanie rozróżnić enancjomerów aminokwasów, wpływają na enancjoselektywność układu prowadząc do uzyskiwania lepszych wyników.

## **Podsumowanie**

Celem pracy było wykorzystanie układów elektroforetycznych złożonych z dwóch selektorów chiralnych do optymalizacji rozdzielania wybranych związków o właściwościach leczniczych. Określenie optymalnych warunków prowadzenia eksperymentu wymagało poznania mechanizmu odpowiedzialnego za rozdzielanie enancjomerów, jak również wskazania czynników krytycznych, mających największy wpływ na uzyskane rozdzielanie.

Do realizacji tego celu wybrano różne selektory chiralne, przede wszystkim cyklodekstryny, jonowe i obojętne, jak również kwasy cholowe i chiralne etery koronowe.

Na podstawie wyników badań podstawowych obejmujących wpływ pH na ruchliwość związków badanych, różne zachowanie cyklodekstryn obdarzonych ładunkiem i obojętnych w pojedynczych układach elektroforetycznych oraz sprawdzeniu enancjoselektywności układów pojedynczych sformułowano następujące wnioski, będące podstawą dalszych rozważań:

### *a) układy z obojętymi cyklodekstrynami (tabela VI-1)*

1. Wszystkie badane aminy tworzą kompleksy inkluzyjne z obojętymi cyklodekstrynami, co przejawia się w wydłużeniu czasów migracji ze wzrostem stężenia cyklodekstryny w buforze,
2. Stechiometria tworzonych kompleksów jest 1:1,
3. Najtrwalsze kompleksy tworzą się z DM- $\beta$ -CD, zaś najmniej trwałe z TM- $\beta$ -CD. Stałe trwałości kompleksów z  $\beta$ -CD i HP- $\beta$ -CD mają wartości pośrednie, przy czym dla  $\beta$ -CD są one nieco wyższe (z wyjątkiem epinefryny). Siła kompleksowania wpływa na zmianę czasów migracji w ten sposób, że silniej kompleksowane związki poruszają się wolniej, enancjomer silniej kompleksowany wychodzi jako drugi

4. W badanym zakresie stężeń jedynie w dwóch przypadkach uzyskano całkowite rozdzielanie enancjomerów do podstawy, czyli z  $R_S \geq 1,5$ ; dla epinefryny oraz doksyliny,
5. Im mniejsze są stałe trwałości, tym wyższe optymalne stężenie selektora wymagane do rozdzielania enancjomerów. Natomiast różnice w stałych trwałości dla poszczególnych enancjomerów przekładają się bezpośrednio na wartości enancjoselektywności.

*b) układy z anionową cyklodekstryną (tabela VI-2)*

1. Stałe trwałości kompleksów cząsteczek obojętnych (pH=12) z s- $\beta$ -CD są znacznie mniejsze, niż dla kompleksów tworzonych przez przeciwnie naładowane jony.
2. Im większy stosunek ładunku do masy cząsteczki tym silniejsze tworzą się kompleksy. Np. bromfeniramina tworzy w pH=7 z s- $\beta$ -CD kompleks o stałej trwałości  $K_1=3462,1$ [l/mol podczas gdy w pH=2,5 stałą trwałości wynosi  $K_1=18396,9$ [l/mol. W wyniku silnego oddziaływania elektrostatycznego z posiadającą liczne grupy anionowe cząsteczką cyklodekstryny, związki badane uzyskują ujemne ruchliwości elektroforetyczne. Wpływ s- $\beta$ -CD na ruchliwość związków jest znacznie większy niż cyklodekstryn obojętnych.
3. Rozdzielenie enancjomerów z s- $\beta$ -CD jest lepsze niż w przypadku obojętnych cyklodekstryn dla wszystkich badanych związków.
4. Dla związków z jednym atomem azotu stałe trwałości w pH=7 i pH=2,5 są porównywalne. Bardzo silne kompleksowanie feniramin w pH = 2,5 skutkuje utratą selektywności układu.
5. W badanym zakresie stężeń ze wzrostem stężenia cyklodekstryny selektywność układu maleje a czasy analizy wydłużają się.



Na podstawie modelu teoretycznego dla układu z pojedynczym selektorem [47], w ramach obecnej pracy wyprowadzono równanie (VI-9) na enancjoselektywność układu z dwoma selektorami chiralnymi:

$$\alpha_{RS}^{eff} = \frac{(\mu^{free} + \mu^{compl} K_R^{compl} [CDI] + \mu^{compl} K_R^{compl} [CDII])(1 + K_S^{compl} [CDI] + K_S^{compl} [CDII])}{(\mu^{free} + \mu^{compl} K_S^{compl} [CDI] + \mu^{compl} K_S^{compl} [CDII])(1 + K_R^{compl} [CDI] + K_R^{compl} [CDII])}$$

Porównując selektywność uzyskaną dla modelu z dwoma cyklodekstrynami do układu pojedynczego z s-β-CD stwierdzono, że szczególnie dobre rezultaty uzyskuje się w przypadku, gdy cyklodekstryny posiadają przeciwne enancjoselektywności do enancjomerów związku, przy tej samej enancjoselektywności również istnieje zakres stężeń, w którym następuje poprawa selektywności w porównaniu z układem pojedynczym. Dodanie cyklodekstryn obojętnych powoduje skrócenie czasów analizy w pH = 7, a wydłużenie w pH=2,5.

Na podstawie eksperymentalnej weryfikacji modelu ustalono, że:

1. Współczynnik rozdzielenia pików w układach podwójnych jest lepszy niż w układach pojedynczych (wyjątek cyklopentolat). Z obserwacji wynika, że  $R_S$  jest dwukrotnie wyższy, niż dla s-β-CD w układzie pojedynczym.
2. Cyklopentolat, którego  $R_S$  w układzie podwójnym maleje, wykazuje silne kompleksowanie z β-CD (rozdz. VI-2.1.1.). Stała trwałości z β-CD wynosi 1035,8 [l/mol] i jest przeszło 10-cio krotnie wyższa w porównaniu do pozostałych związków. Wynika z tego, że dla cyklopentolatu wybrany zakres stężeń jest powyżej zakresu optymalnego.
3. W pH=7 wzrost stężenia β-CD powoduje zmniejszenie ruchliwości elektroforetycznej badanych związków. W wyniku tego następuje skrócenie czasów analizy. Wpływ obojętnej β-CD na ruchliwość elektroforetyczną związków jest tym silniejszy, im trwalsze tworzą się kompleksy. Najtrwalsze kompleksy tworzy cyklopentolat i bromfeniramina, w związku z czym ich ruchliwości maleją najbardziej.
4. Wpływ dodatku CD obojętnych bardziej widoczny jest w pH wysokim. Ma to związek ze stałymi trwałości. W pH kwaśnym silne oddziaływania

elektrostatyczne z anionowym selektorem dominują (w przypadku feniramin). Wydaje się słuszne stosowanie w tym przypadku wyższego stężenia cyklodekstryny obojętnej.

Przedstawiona w rozdz. VII metoda optymalizacji rozdzielania rozszerza dotychczasowe badania o inne parametry oraz je systematyzuje. Do zbadania wpływu tych czynników, wykorzystano rozkład Placketta-Burmana (PB), ze względu na minimalizację liczby eksperymentów w metodzie optymalizacji.

W badaniach sprawdzono wpływ 7-miu zmiennych: stężenie buforu, pH, wielkość zastrzyku, temperaturę oraz stężenia selektorów (zmienne i ich wartości przedstawia *tabela VII-1*).

Uzyskane wyniki wskazują, że najważniejszymi parametrami decydującymi o rozdzielaniu chiralnym są: stężenia chiralnych selektorów (zależne od stałych trwałości), pH buforu (pKa związków i selektorów), temperatura, a czasami również wielkość dozowanej próbki.

Zebrane doświadczenia pozwoliły na stworzenie schematu (*rys. VII-10*) pozwalającego na stosunkowo szybkie sprawdzenie, czy metoda CE z cyklodekstrynami jako selektory chiralne pozwoli na uzyskanie dobrego rozdzielania badanego związku, czy należałoby zastosować inną metodę lub inny selektor. Weryfikacji przedstawionego schematu dokonano rozdzielając 12 innych związków: 8 amin oraz 4 aminokwasów (wyniki przedstawiono w *tabeli VII-4*).

Z 12-tu rozdzielanych związków całkowicie udało się podzielić 9 z nich a 2 dzielić się częściowo. Dlatego można przypuszczać, że w wyniku dalszej optymalizacji metodą PB udałoby się je rozdzielić do podstawy. W przypadku benfluoreksu wydaje się słuszne zastosowanie innej metody analitycznej. Biorąc pod uwagę 8 badanych amin widzimy, że lepsze rozdzielanie obserwujemy w układzie z dwoma cyklodekstrynami (w pH=7 podzieliły się enancjomery kloperastyny, diperodonu, homochlorcyklozyny oraz hydroksyzyny), niż w układzie pojedynczym (w pH=7 dzieli się jedynie diperodon). W przypadku hydroksyzyny, jedynie w układzie podwójnym może dojść do rozdzielania

enancjomerów. Wydaje się, że zaproponowany schemat ma charakter uniwersalny do związków zasadowych i obojętnych.

W rozdziale VIII rozszerzono badania na inne selektory chiralne. Pokazano, że kwasy cholowe oraz etery koronowe mogą być skutecznie stosowane w układach z cyklodekstrynami.

Kwasy cholowe wraz z cyklodekstrynami okazały się bardzo selektywne w stosunku do binaftalenów w układach podwójnych, jednak mechanizm rozdzielania jest tutaj bardziej skomplikowany ze względu na fakt, że kwasy cholowe i cyklodekstryny mogą tworzyć kompleksy między sobą. Nie można wykluczyć powstawania selektora chiralnego złożonego z tych dwóch związków i tworzenia się kompleksów potrójnych związek-cyklodekstryna-kwas cholowy.

Jako przykład synergii dwóch selektorów chiralnych przedstawiono również wyniki enancjoseparacji tryptofanu i tyrozyny stosując etery koronowe z  $\alpha$ -CD. Zaprezentowane wyniki potwierdzają, podobnie jak w przypadku innych układów podwójnych, że łączenie dwóch selektorów może poprawiać rozdzielenie związków. Przebadane tetraazakoronandy pomimo tego, że same nie są w stanie rozróżnić enancjomerów aminokwasów, wpływają na enancjoselektywność układu prowadząc do uzyskiwania lepszych wyników.



## Streszczenie

Celem pracy było wykorzystanie układów elektroforetycznych złożonych z dwóch selektorów chiralnych do optymalizacji rozdzielania wybranych związków o właściwościach leczniczych. Określenie optymalnych warunków prowadzenia eksperymentu wymagało poznania mechanizmu odpowiedzialnego za rozdzielanie enancjomerów, jak również wskazania czynników krytycznych, mających największy wpływ na uzyskane rozdzielanie.

W badaniach wstępnych lepsze niż dla cyklodekstryn obojętnych rozdzielanie enancjomerów uzyskano dla cyklodekstryny siarczanowanej (*s*-β-CD). Wiąże się to z mechanizmem rozróżnienia enancjomerów. W przypadku cyklodekstryn obojętnych enancjoselektywność wynika głównie z różnic w stałych trwałości pomiędzy enancjomerami. W przypadku cyklodekstryny jonowej odwrotna ruchliwość formy skompleksowanej i nieskompleksowanej przy tej samej różnicy w stałych trwałości potęguje efekt rozdzielania enancjomerów.

Na podstawie modelu teoretycznego dla układu z pojedynczym selektorem [47], w ramach obecnej pracy wyprowadzono równanie na enancjoselektywność układu z dwoma selektorami chiralnymi:

$$\alpha_{RS}^{eff} = \frac{(\mu^{free} + \mu^{compl} K_R^{compl} [CDI] + \mu^{compl} K_R^{compl} [CDII])(1 + K_S^{compl} [CDI] + K_S^{compl} [CDII])}{(\mu^{free} + \mu^{compl} K_S^{compl} [CDI] + \mu^{compl} K_S^{compl} [CDII])(1 + K_R^{compl} [CDI] + K_R^{compl} [CDII])}$$

Porównując selektywność uzyskaną dla modelu z dwoma cyklodekstrynami do układu pojedynczego stwierdzono, że szczególnie dobre rezultaty uzyskuje się w przypadku, gdy cyklodekstryny posiadają przeciwne enancjoselektywności do związku, przy tej samej enancjoselektywności również istnieje zakres stężeń, w którym następuje poprawa selektywności w porównaniu z układem pojedynczym. Ponadto dodanie cyklodekstryny obojętnej do układu z *s*-β-CD w pH=7 powoduje skrócenie czasu analizy.

Na podstawie badań wstępnych i rozważań teoretycznych zaprojektowano układ podwójny, pozwalający uzyskać lepsze rozdzielanie enancjomerów w krótszym czasie.



Eksperymenty przeprowadzone w układzie podwójnym w różnych warunkach potwierdziły, że:

- Selektywność w układzie z dwoma cyklodekstrynami w większości przypadków jest lepsza niż w układach pojedynczych.
- Zastosowanie obojętnej CD powoduje znaczne skrócenie czasów analiz przy normalnej polaryzacji elektrod,
- Dodatek obojętnej CD ma duży wpływ na sprawność układu elektroforetycznego. Uzyskuje się piki o znacznie lepszym kształcie (wyższe  $R_S$ ).

Przedstawiona metoda optymalizacji rozdzielania (rozkład Placketta-Burmana), rozszerza wcześniejsze badania o inne parametry oraz je systematyzuje. Uzyskane wyniki wskazują, że najważniejszymi parametrami decydującymi o rozdzielaniu chiralnym są stężenia chiralnych selektorów (zależne od stałych trwałości), pH buforu ( $pK_a$  związków i selektorów), temperatura, a czasami również wielkość dozowanej próbki.

Zebrane doświadczenia pozwoliły na stworzenie schematu pozwalającego na stosunkowo szybkie sprawdzenie, czy metoda CE z cyklodekstrynami jako selektorami chiralnymi pozwoli na uzyskanie dobrego rozdzielania badanego związku, czy należałoby zastosować inną metodę lub inny selektor.

Skuteczność schematu sprawdzono, stosując go do rozdzielania szeregu innych związków o podobnym charakterze. Wydaje się, że ma on charakter uniwersalny do związków zasadowych i obojętnych.

W rozdziale VIII rozszerzono badania na inne selektory chiralne. Pokazano, że kwasy cholowe oraz etery koronowe mogą być skutecznie stosowane w układach z cyklodekstrynami. Kwasy cholowe wraz z cyklodekstrynami okazały się bardzo selektywne w stosunku do binaftalenów, a etery koronowe z  $\alpha$ -CD do rozdzielania enancjomerów tryptofanu i tyrozyny.

- 
- 1 W. M. Potapow, *Stereochemia*, PWN Warszawa, 1986.
  - 2 T. E. Beesley, R. P. W. Scott, *Chiral Chromatography*, John Wiley & Sons, Chichester, England, 1998.
  - 3 P. S. Kalsi, *Stereochemistry – conformation and mechanism*, Wiley Eastern Limited, New Delhi, India, 1990.
  - 4 E. Eliel, S. H. Wilen, *Stereochemistry of Organic Compounds*, John Wiley & Sons, 1994.
  - 5 M. Nogradi, *Stereochemia, podstawy i zastosowania*, PWN Warszawa, 1988.
  - 6 R. S. Cahn, C. K. Ingold, V. Prelog, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 5 (1966) 358, 511.
  - 7 I. Z. Siemion, *Biostereochemia*, PWN Warszawa, 1985.
  - 8 E. H. Easson, E. Stedman, *Biochem. J.* 27 (1933) 1257.
  - 9 H. Y. Aboul-Enein, I. Ali, *Chiral Separation by Liquid Chromatography and Related Technologies*, Marcel Dekker, Inc., New York, 2003.
  - 10 S. Fabro, R. L. Smith, R. T. Williams, *Nature*, 215 (1967) 296.
  - 11 B. Testa, *Trends Pharmacol. Sci.* 60 (1986).
  - 12 N. M. Maier, P. Franco, W. Lindner, *J. Chromatogr. A* 906 (2001) 3-33.
  - 13 R. W. Souter, *Chromatographic Separations of Stereoisomers*, CRC Press, Inc., Boca Raton, USA.
  - 14 H. Lorenz, A. Perlberg, D. Sapoundjiev, M. Elsner, A. Morgenstern, *Chemical Engineering and Processing* 45 (2006) 863–873.
  - 15 G. Gúbitz, M. Schmid, *Electrophoresis*, 21 (2000) 4112-4135.
  - 16 M. Fillet, Ph. Hubert, J. Crommen, *J. Chromatogr. A* 875 (2000) 123-134.
  - 17 D.N. Heiger, *High Performance Capillary Electrophoresis-An Introduction*, Hewlett-Packard Company, 1992.
  - 18 S. Hjerten, *Chromatogr. Rev.*, 9 (1967) 122.
  - 19 R. Viertenen, *Acta Polytech. Scand.*, 123 (1974) 1.
  - 20 F. Mikkers, F. M. Everaerts and T. P. E. M. Verheggen, 196 (1979) 11.
  - 21 S. F. Y. Li, *Capillary electrophoresis; principles, practise and applications*, Elsevier Science B. V., 1992.
  - 22 X. Zhang, J. Stuart, J. Sweedler, *Anal. Bioanal. Chem.*, 373 (2002) 332–343.

- 
- 23 T. Kappes, B. Galliker, M. Schwarz, P. Hauser, *Trends in analytical chemistry*, 20 (2001) 133-139.
- 24 B. Michalke, *Electrophoresis*, 26 (2005) 1584-1597.
- 25 A. Padarauskas, *Anal. Bioanal. Chem.*, 384 (2006) 132-144.
- 26 W. Buchberger, *J. Chromatog. A*, 884 (2000) 3-22.
- 27 R. Wallingford, A. Ewing, *Adv. Chromatogr.*, 29 (1989) 1.
- 28 S. Fujiwara, S. Honda, *Anal. Chem.*, 58 (1986) 166.
- 29 H. Lauer, D. MacManigill, *Anal. Chem.*, 587 (1986) 166.
- 30 A. Diress, C. Lucy, *J. Chromatogr. A*, 1027 (2004) 185-191.
- 31 J. Melanson, N. Baryla, C. Lucy, *Trends in analytical chemistry*, 20 (2001) 365-374.
- 32 J. Muzikar, T. Goor, B. Gas, E. Kenndler, *J. Chromatogr. A*, 960 (2002) 199-208.
- 33 T. Kaneta, T. Ueda, K. Hata, T. Imasaka, *J. Chromatogr. A*, 1106 (2006) 52-55.
- 34 J. Jorgenson, K. Lukacs, *Anal. Chem.*, 53 (1981) 1298.
- 35 J. Jorgenson, K. Lukacs, *J. Chromatogr.*, 218 (1981) 209.
- 36 Z. Witkiewicz, *Podstawy Chromatografii*, Wydawnictwa Naukowo-Techniczne, Warszawa 2000.
- 37 W. Tang, I. Muderawan, T. Ong, S. Ng, *Analytica Chimica Acta*, 546 (2005) 119-125.
- 38 L. Yang, Z. Yuan, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 365 (1999) 541-544.
- 39 Z. Chen, G. Owens, R. Naidu, *Anal. Bioanal. Chem.*, 375 (2003) 182-187.
- 40 B. Chankvetadze, G. Blaschke, *J. Chromatogr. A*, 906 (2001) 309-363.
- 41 T. Huang, Z. Liu, J. Pawliszyn, *Anal. Bioanal. Chem.*, 382 (2005) 783-788.
- 42 S. Terabe, K. Otsuka, K. Ichikawa, A. Tsuciya, T. Ando, *Anal. Chem.*, 56 (1984) 111.
- 43 A. Dobashi, T. Ono, S. Harada, J. Yamaguchi, *J. Chromatogr.*, 480 (1989) 413.
- 44 S. Hjerten, M. Zhu, *J. Chromatogr.*, 327 (1985) 157.
- 45 A. Cohen, A. Paulus, B. Carger, *Chromatografia*, 24 (1987) 14.
- 46 A. Cohen, B. Karger, *J. Chromatogr.*, 397 (1987) 409.
- 47 A. Rizzi, *Electrophoresis*, 22 (2001) 3079-3106.
- 48 A. Tran, T. Blank, E. Leopold, *J. Chromatogr.*, 516 (1990) 241-249.
- 49 W. Schutzner, A. Rizzi, E. Kenndler, *Anal. Chem.*, 67 (1995) 3866-3870.



- 
- 50 B. Chankvetadze, *J. Chromatogr. A* 792 (1997) 269-295.
- 51 F. Lelievre, P. Gareil, A. Jardy, *Anal. Chem.*, 69 (1997) 385.
- 52 J. Reijenga, B. Ingelse, F. Everaerts, *J. Chromatogr. A* 792 (1997) 371-378.
- 53 Y. Tanaka, S. Terabe, *J. Chromatogr B*, 768 (2002) 81-92.
- 54 K. Rundlett, D. Armstrag, *J. Chromatogr. A* 721 (1996) 173.
- 55 S. Penn, E. Bergstrom, D. Goodall, J. Loran, *Anal. Chem.*, 66 (1994) 2866.
- 56 K. A. Connors, *Binding constants: The measurement of molecular complex stability*, John Wiley & Sons, New York, 1987.
- 57 R. Vespalec, P. Bocek, *Chem. Rev.*, 100 (2000) 3715-3753.
- 58 S. A. C. Wren, R. C. Rowe, *J. Chromatogr.*, 603 (1992) 235-241.
- 59 L. Kresmer, *Master Thesis*, University of Vienna, Faculty of Sciences 1998.
- 60 A. M. Rizzi, L. Kremser, *Electrophoresis*, 20 (1999) 2715-2722.
- 61 B. Williams, G. Vigh, *J. Chromatogr. A* 777 (1997) 295-309.
- 62 B. Chankvetadze, N. Burjanadze, D. Bergenthal, G. Blasche, *Electrophoresis*, 20 (1999) 2680-2685.
- 63 H. Dodziuk, *Introduction to Supramolecular Chemistry*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Hollandia, 2002.
- 64 . Bender, M. Komiyama, *Cyclodextrin Chemistry*, Springer-Verlag, Berlin, Niemcy 1978.
- 65 M. Martin Del Valle, *Process Biochemistry*, 39 (2004) 1033-1046.
- 66 M. Singh, R. Sharma, U. Banerjee, *Biotechnology Advances*, 20 (2002) 341-359.
- 67 E. Schneiderman, A. Stalcup, *J. Chromatogr B*, 745 (2000) 83-102.
- 68 K. Fromming, J. Szejtli, *Cyclodextrins in Pharmacy*, Kluwer Academic Publisher 1994.
- 69 T. Takaha, M. Yanase, S. Takata, S. Okada, S. Smith, *J. Biol. Chem.*, 271 (1996) 2902.
- 70 Y. Takahashi, T. Ogawa, *Carbohydr. Res.*, 164 (1987) 277.
- 71 M. Usha, R. Witteborg, *J. Am. Chem. Soc.*, 114 (1992) 1541.
- 72 T. Ward, D. Armstrong, *Chromatographic Chiral Separations*, Marcel Dekker, New York, 1988.



- 
- 73 L. Jicsinsky, E. Fenyvesi, H. Hashimoto, A. Ueno, *Comprehensive Supramolecular Chemistry*, 3 (1998) 58.
- 74 Y. Tanaka, Y. Koshimoto, S. Terabe, *Anal. Sci.*, 14 (1998)383-388.
- 75 M. Busby, G. Vigh, *Electrophoresis*, 26 (2005) 3849-3860.
- 76 W. Zhu, G. Vigh, *Anal. Chem.* 72 (2000) 310-317.
- 77 E. Yanes, S. Gratz, R. Sutton, A. Stalcup, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 369 (2001) 412–417.
- 78 W. Tang, W. Muderawan, S. Ng, H. Chan, *Anal. Chim. Acta*, 554 (2005) 156-162.
- 79 D. Lee, S. Shamsi, *Electrophoresis*, 23 (2002) 1314-1319.
- 80 T. Loftsson, M. Brewster, *J. Pharm. Sci.*, 85 (1996) 1017-1025.
- 81 J. Szejtli, *Chem. Rev.*, 98 (1998) 1743-1753.
- 82 H. Dodziuk, *J. Molecular Structure*, 614 (2002) 33-45.
- 83 C. Dignam, L. Randall, R. Blacken, P. Cunningham, S. Lester, M. Brown, S. French, S. Aniagyei, T. Wenzel, *Tetrahedron: Asymmetry*, 17 (2006) 1199–1208.
- 84 B. Chankvetadze, N. Burjanadze, G. Pintore, D. Bergenthal, K. Bergander, C. Muhlenbrock, J. Breitkreuz, G. Blaschke, *J. Chromatogr. A*, 875 (2000) 471–484.
- 85 R. Gelb, L. Schwartz, B. Cardelino, H. Fuhrman, R. Johnson, D. Laufer, *J. Am. Chem. Soc.*, 103 (1981) 1750.
- 86 G. Tarkanyi, *J. Chromatogr. A* 961 (2002) 257–276.
- 87 A. Grandeur, S. Petit, G. Gouhier, V. Agassea, and G. Coquerela, *Tetrahedron: Asymmetry* 14 (2003) 2143–2152.
- 88 N. Dupuy, D. Barbry, M. Bria, S. Marquis, L. Vrielynck, J. Kister, *Spectrochimica Acta Part A* 61 (2005) 1051–1057.
- 89 Y. Ishizuka, M. Fujiwara, K. Kanazawa, T. Nemoto, K. Fujita, H. Nakanishi, *Carbohydrate Research* 337 (2002) 1737–1743.
- 90 D. Sybilska, J. Żukowski, *Chiral Separations by HPLC*, A. M. Krstulovic, Ed., John Wiley & Sons, New York 1989, rozdz.7 str. 147.
- 91 J. Snopek, I. Jelinek, E. Smolkova-Keulemansova, *J. Chromatogr.*, 438 (1989) 211–218.
- 92 S. Fanali, *J. Chromatogr.*, 474 (1989) 441-446.

- 
- 93 S. Terabe, *Trends Anal. Chem.*, **8** (1989) 129-134.
- 94 H. Dodziuk, *Cyclodextrins and Their Complexes; Chemistry, Analytical Methods, Applications*, John Wiley & Sons, Weinheim 2006.
- 95 S. Terabe, Y. Miyashita, O. Shibata, E. Bernhart, L. Alexander, D. Patterson, B. Karger, K. Hosoya, N. Tanaka, *J. Chromatogr.*, **516** (1990) 23-31.
- 96 S. Fanali, *J. Chromatogr. A*, **792** (1997) 227-267.
- 97 G. Gübitz, M. Schmid, *J. Chromatogr. A*, **792** (1997) 179-225.
- 98 K. Verleysen, P. Sandra, *Electrophoresis*, **19** (1998) 2798-2833.
- 99 H. Katayama, Y. Ishihama, N. Asakawa, *J. Chromatogr. A* **764** (1997) 151-156.
- 100 G. Scriba, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **26** (2002) 373-399.
- 101 G. Blaschke, B. Chankvetadze, *J. Chromatogr. A*, **875** (2000) 3-25.
- 102 B. Chankvetadze, *Electrophoresis*, **23** (2002) 4022-4035.
- 103 B. Chankvetadze, N. Burjanadze, K. Maynard, K. Bergander, D. Bergenthal, G. Blaschke, *Electrophoresis*, **23** (2002) 3027-3034.
- 104 N. Matthijs, S. Hemelryck, M. Maftouh, D. Massart, Y. Heyden, *Anal. Chim. Acta*, **525** (2004) 247-263.
- 105 H. Cai, T. Nguyen, G. Vigh, *Anal. Chem.*, **70** (1998) 580-589.
- 106 W. Tang, I. Muderawan, T. Ong, S. Ng, *J. Chromatogr. A*, **1091** (2005) 152-157.
- 107 W. Tang, I. Muderawan, S. Ng, H. Chan, *Anal. Chim. Acta* **554** (2005) 156-162.
- 108 W. Tang, I. Muderawan, S. Ng, H. Chan, *Analytica Chimica Acta* **555** (2006) 63-67.
- 109 A. Bunke, T. Jira, *J. Chromatogr. A*, **798** (1998) 275-280.
- 110 F. M. Menger, *Acc. Chem. Res.*, **1979**, **12**, 111.
- 111 K. A. Dill, P. J. Flory, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1981**, **78**, 676.
- 112 P. Fromherz, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.*, **1981**, **85**, 981.
- 113 P. Debye, E. Anacker, *J. Phys. Colloid. Chem.*, **55** (1951) 644.
- 114 F. M. Menger, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **30** (1991) 1086.
- 115 G. Esposito, E. Giglio, N. V. Pavel, A. Zanobi, *J. Phys. Chem.*, **1987**, **91**, 356.
- 116 A. Campanelli, S. De Sanctis, E. Chiessi, M. Alagni, E. Giglio, L. Scaramuzza, *J. Phys. Chem.*, **1989**, **93**, 1536-1542.
- 117 K. Otsuka, S. Terabe, *J. Chromatogr.* **875** (2000) 163-178.

- 
- 118 S. Barnes, *Hepatology* 4 (1984) 988,
- 119 A. Hogan, S.E. Ealick, C.E. Bugg, *J. Lipid Res.* 25 (1984) 791
- 120 G. Li, L.B. McGown, *J. Phys. Chem.* 98 (1994) 13711
- 121 K. Otsuka, S. Terabe, *J. Chromatogr.* 515 (1990) 221-226.
- 122 Y. Ishihama, S. Terabe, *J. Liq. Chromatogr.* 16 (1993) 933-944.
- 123 Z. El Rassi, *J. Chromatogr. A* 875 (2000) 207-233.
- 124 P. L. Desbene, C. E. Fulchic, *J. Chromatogr. A* 749 (1996) 247.
- 125 Y. Mechref, Z. El Rassi, *Chirality* 8 (1996) 515.
- 126 Y. Mechref, Z. El Rassi, *Electrophoresis* 18 (1997) 220.
- 127 H. Nishi, T. Fukuyama, M. Mastuo, *Anal. Chim. Acta*, 236 (1990) 281.
- 128 S. Terabe, M. Shibata, Y. Miyashita, *J. Chromatogr.*, 480 (1989) 403.
- 129 H. Nishi, T. Fukuyama, M. Mastuo, S. Terabe, *J. Microcol. Sep.*, 1 (1989) 234.
- 130 A. Amini, I. Beijersten, C. Pettersson, D. Westerlund, *J. Chromatogr. A*, 737 (1996) 301-313.
- 131 Y. Mechref, Z. El Rassi, *J. Chromatogr. A*, 757 (1997) 263.
- 132 A. Dobashi, M. Hamada, Y. Dobashi, J. Yamaguchi, *Anal. Chem.*, 67 (1995) 3011-3017.
- 133 S. Fanali, *J. Chromatogr. A*, 792 (1997) 227-267.
- 134 B. Chankvetadze, G. Schulte, G. Blaschke, *Enantiomer* 2 (1997) 157-179.
- 135 A. Bielejewska, K. Duszczak, A. Kwarczak, D. Sybilska, *J. Chromatogr. A*, 977 (2002) 225-237.
- 136 C. J. Pedersen, *J. Chem. Soc.*, 89 (1997) 2495.
- 137 C. J. Pedersen, *J. Chem. Soc.*, 89 (1997) 7017.
- 138 G. Ercolani, L. Mandolini, B. Masci, *J. Am. Chem. Soc.*, 103 (1981) 7484.
- 139 J. Behr, J. Girodeau, R. Heyward, J. Lehn, J. Sauvage, *Helv. Chim. Acta*, 63 (1980) 2096-2111.
- 140 R. Kuhn, F. Erni, T. Bereuter, J. Hausler, *Anal. Chem.*, 64 (1992) 2815-2820.
- 141 R. Kuhn, F. Stöcklin, F. Erni, *Chromatografia*, 33 (1992) 23-36.
- 142 K. Verleysen, T. Van den Bosch, P. Sandra, *Electrophoresis*, 20 (1999) 2650-2655.
- 143 M. Schmid, G. G. Gübitz, *J. Chromatogr. A*, 709 (1995) 81-88.



- 
- 144 H. Nishi, K. Nakamura, H. Nakai, T. Sato, J. Chromatogr. A, 757 (1997) 225-235.
- 145 D.W. Armstrong, L.W. Chang, S.S.C. Chang, J. Chromatogr. A, 793 (1998) 115.
- 146 A. Bielejewska, K. Duszczak, J. Zukowski, J. Chromatogr. A, 1083 (2005) 133-140.
- 147 J.K. Podlewski, A. Chwalibogowska-Podlowska, Leki współczesnej terapii, PJB 1996.
- 148 A. Szczepańska, A. Bielejewska, A. Kwarczak, J. Jurczak, J. Supramolecular Chemistry, 2 (2002) 271-277.
- 149 Poradnik fizykochemiczny, Wydawnictwa Naukowo-Techniczne, Warszawa 1974.
- 150 K. Kano, R. Nishiyabu, J. Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry, 44 (2002) 355-359.
- 151 C. Lin, K. Chen, J. Chromatogr. A, 930 (2001) 155-163.
- 152 E. Rudzinska, P. Dzygiel, P. Wiczorek, P. Kafarski, J. Chromatogr. A, 979 (2002) 115-122.
- 153 A. Bielejewska, K. Duszczak, A. Kwarczak, D. Sybilska, J. Chromatogr. A, 977 (2002) 225-237.
- 154 B.A. Williams, G. Vigh, J. Chromatogr. A, 777 (1997) 295-309.
- 155 B. Chankwetadze, G. Schulte, G. Blasche, Enantiomer, 2 (1997) 157-179.
- 156 Y. Tanaka, S. Terabe, J. Chromatogr. B, 767 (2002) 81-92.
- 157 M. Paleologou, S. Li, W. Purdy, J. Chromatogr. Sci., 28 (1990) 311.
- 158 A. Navas Diaz, F. Garcia Sanchez, A. Garcia Pareja, Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects 142 (1998) 27.
- 159 E. Szoko, J. Gyimesi, Z. Szakacs, M. Tarnai, Electrophoresis, 20 (1999) 2754.
- 160 Z. J. Tang, X.X. Zhu, G. Brown, Langmuir 10 (1994) 1034.
- 161 R. Kuhn, D. Riester, B. Fleckenstein, K. Wiesmüller, J. Chromatogr. A, 716 (1995) 371-379.

B. 408/08



Biblioteka Instytutu Chemii Fizycznej PAN

**F-B.408/08**



80000000198390