

## SEPARACE ENANTIOMERŮ KATHINONŮ KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZOU S VYUŽITÍM CYKLODEXTRINŮ JAKO CHIRÁLNÍCH SELEKTORŮ

MARTINA HEGROVÁ<sup>a\*</sup>, KLÁRA ŘEZANKOVÁ<sup>a</sup>,  
MARTIN KUCHAR<sup>b</sup> a PAVEL ŘEZANKA<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Ústav analytické chemie, <sup>b</sup> Laboratoř forenzní analýzy biologicky aktivních látek, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6  
Martina.Hegrova@vscht.cz

Došlo 18.3.15, přijato 1.9.15.

Klíčová slova: cykloextrin, chirální separace, kapilární elektroforéza, kathinon

### Úvod

Kathinon je alkaloid strukturně podobný amfetaminu vyskytující se v listech katy jedlé (*Catha edulis*). Je ale nestabilní a během stárnutí listů se důsledkem biotransformace redukuje na kathin<sup>1</sup>, jehož účinek na centrální nervovou soustavu je relativně slabý, a proto se pro dosažení stimulačního účinku žvýkají čerstvé listy katy<sup>2</sup>. Kathinon a kathin, stejně jako amfetamin, stimulují centrální nervovou soustavu<sup>3</sup> a způsobují uvolňování katecholaminů z presynaptických úložišť do oblasti centrální nervové soustavy a periferního nervového systému<sup>4,5</sup>. Klinické studie prokázaly vliv žvýkání katy na zvýšení krevního tlaku a tepové frekvence, euforii, bdělost a psychomotorickou aktivitu<sup>6</sup>. Chronické užívání však způsobuje nespavost, deprese a psychózy<sup>7</sup>.

Syntetické katinony jsou různorodou skupinou derivátů přírodního katinonu. V poslední době tvořily tyto látky nejčastěji složky legálně nepostižitelných drog, tzv. „legal highs“<sup>8</sup>. Za obměňováním struktury katinonu je snaha připravit deriváty se stejným nebo vyšším farmakologickým účinkem, a proto se tato skupina látek řadí k tzv. „designer drugs“. Tímto způsobem vznikl např. butylon, fletedron a mefedron. Na rozdíl od přírodního katinonu, který se vyskytuje pouze jako (*S*)-enantiomer<sup>3</sup>, však tyto deriváty obsahují oba dva enantiomery, protože syntézou vzniká racemát. Ačkoli je syntetických katinonů známo již několik desítek, existují jen dvě práce, které se zabývají

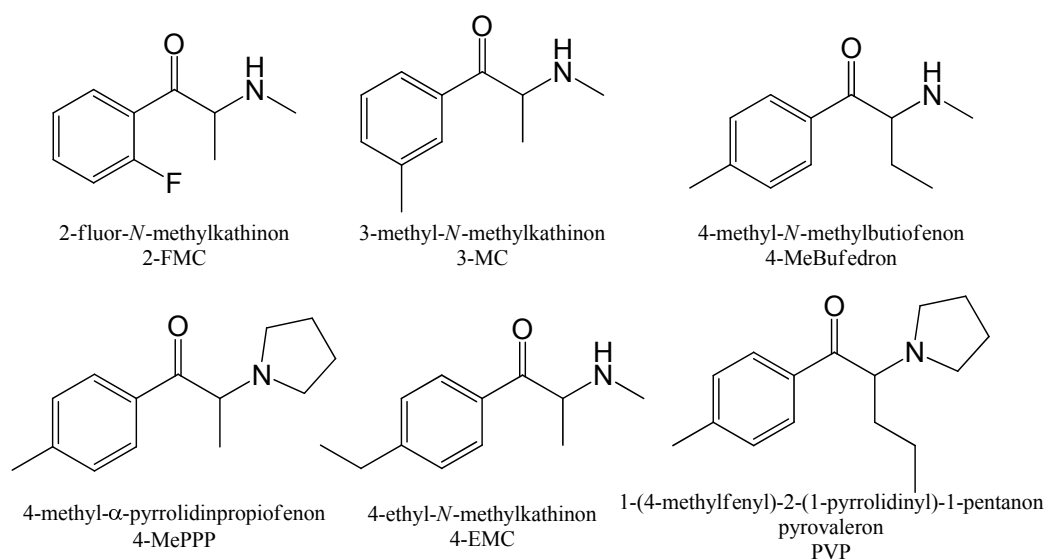
chirální separací několika katinonů kapilární elektroforézou s využitím cykloextrinů (CD) jako chirálních selektorů<sup>9,10</sup>. Kapilární elektroforéza poskytuje vysokou účinnost díky velkému počtu teoretických pater, kterých bývají řádově stovky tisíc. Tento fakt umožňuje enantioseparaci na základní linii i při separačním faktoru menším než 1,01. Vysoká účinnost těchto metod je dána profilem toku a transportními procesy probíhajícími v kapiláře. Velkou výhodou je i rychlá analýza, která je umožněna použitím krátkých kapilár a rychlým transportem hmoty. Další nezanedbatelnou výhodou je velice nízká spotřeba nejen činidel, ale i vzorku. CD se v elektromigračních metodách zprvu používaly jako achirální selektory a posléze i jako chirální selektory. Velkou výhodou těchto látek je možnost jejich derivatizace a pro úspěšné chirální separace v přítomnosti CD nejsou prakticky žádná striktní omezení týkající se struktury analytů. Další výhodou CD je jejich schopnost chirálně separovat enantiomery nejen s centrální symetrií, ale i s planární nebo axiální symetrií. Nejen tyto vlastnosti, ale i mnoho dalších, předurčuje CD k velkému využití nejen v kapilární elektroforéze<sup>11</sup>.

Pro kvantitativní popis vznikajících komplexů CD-analyt lze využít zdánlivé konstanty stability. Jejich výpočet je založen na hodnotách elektroforetických mobilit analytu bez přítomnosti a v přítomnosti CD o různých koncentracích. Při obecném postupu výpočtu je potřeba zahrnout korekci na rozdílné teploty uvnitř kapiláry, rozdílnou viskozitu elektrolytů, a v neposlední řadě také na měnící se iontovou sílu<sup>12,13</sup>. Tyto korekce lze ale v některých případech zanedbat, např. pokud je kapilára termostátována a v průběhu experimentu nedochází ke změně proudu. Další zanedbání lze provést v případě, že jsou koncentrace přidaného selektoru dostatečně nízké a neovlivňují tak viskozitu elektrolytu. Pokud je selektor neiontové povahy anebo není při pH používaného elektrolytu nabitý, lze zanedbat i korekci na měnící se iontovou sílu elektrolytu.

### Experimentální část

Voda (Mili-Q, 18 MW cm<sup>-1</sup>), hydroxid sodný (tripur, Merck), kyselina fosforečná (50%, Fluka), kyselina sírová (96%, Lachner), β-cykloextrin (BCD, 97%, Sigma-Aldrich), sulfonovaný β-cykloextrin (HSBCD, 90%, počet substituovaných jednotek 7 až 11, Sigma-Aldrich), karboxymethylovaný β-cykloextrin (CMBCD, 90%, průměrný stupeň substituce 3, Sigma-Aldrich). Analyzované katinony: 2-fluor-*N*-methylkathinon (2-FMC), 3-methyl-*N*-methylkathinon (3-MC), 4-methyl-*N*-methylbutiofenon (4-MeBufedron), 4-methyl-α-pyrrolidinpropiofenon (4-MePPP), pyrovaleron (PVP), 4-ethyl-*N*-methylkathinon (4-EMC).

\* Martina Hegrová tuto práci prezentovala na soutěži o Cenu Karla Štulíka 2015 za nejlepší studentskou vědeckou práci v oboru analytická chemie v Ostravě ve dnech 4. – 5. 2. 2015.



Obr. 1. Struktury analyzovaných kathiionů spolu se systematickými a triviálními názvy a jejich zkratkami

Kathiiony byly přečištěnybleskovou chromatografií na přístroji CombiFlash Rf-200. Čistota byla stanovena na přístroji UHPLC/MS Agilent 6460 na více jak 95 % z poměru plochy analytu k součtu ploch všech detegovaných složek.

Elektroforetická měření byla prováděna na přístroji Agilent 7100 CE s UV-VIS detekcí. K analýze byla použita křemenná kapilára potažená polyimidovou vrstvou s vnějším průměrem 375  $\mu\text{m}$ , vnitřním průměrem 75  $\mu\text{m}$ , efektivní délkou 50 cm a celkovou délkou 58,5 cm od firmy Polymicro Technologies (USA). Vzorky byly dávkovány tlakem 1,5 kPa po dobu 5 s. Při analýzách bylo použito napětí  $-10$  kV,  $-15$  kV a  $+20$  kV. Elektroforegramy byly zaznamenávány při vlnové délce 207 nm.

Základní elektrolyt byl připraven ředěním koncentrované kyseliny fosforečné vodou a následně bylo pH upraveno přidávkem hydroxidu sodného na hodnotu 2,5. Základní elektrolyty obsahovaly 20  $\text{mmol l}^{-1}$  fosfátový pufr, pH 2,5 a BCD o koncentracích 5, 10 nebo 14  $\text{mmol l}^{-1}$ . Dále byly použity elektrolyty s CMBCD o koncentracích 5 a 10  $\text{mmol l}^{-1}$  v 20  $\text{mmol l}^{-1}$  fosfátovém pufru a s 15  $\text{mmol l}^{-1}$  CMBCD v 50  $\text{mmol l}^{-1}$  fosfátovém pufru. Elektrolyty obsahující HSBCD o koncentracích 5 a 10  $\text{mmol l}^{-1}$  byly připraveny ve 20  $\text{mmol l}^{-1}$  fosfátovém pufru a dále byl připraven 5  $\text{mmol l}^{-1}$  HSBCD v 50  $\text{mmol l}^{-1}$  fosfátovém pufru. Před každým měřením analytu byla kapilára vždy propláchnuta nejprve 2 min NaOH (0,1  $\text{mmol l}^{-1}$ ), 2 min vodou a nakonec 2 min použitým elektrolytem. Pro jednotlivé analýzy byly použity roztoky kathiionů o koncentraci 1 nebo 2  $\text{mmol l}^{-1}$ .

Zdánlivé konstanty stability byly vypočteny pro komplex PVP-CD. Pro analýzy byl použit roztok PVP o kon-

centraci 2  $\text{mmol l}^{-1}$  ve vodě s přidávkem 1  $\text{mmol l}^{-1}$  thiomochoviny. Elektrolyty byly tvořeny fosfátovým pufrém o koncentraci 50  $\text{mmol l}^{-1}$ , pH 2,5, s přidávkou CMBCD, resp. BCD o koncentracích 0; 1,6; 1,8; 2,0; 2,3; 2,8; 3,5; 4,7; 7,0 a 14,0  $\text{mmol l}^{-1}$ .

## Výsledky a diskuse

Cílem práce bylo chirálně separovat šest kathiionů, které ještě nebyly analyzovány kapilární elektroforézou. Na základě publikovaných článků<sup>9,10</sup> byly jako chirální selektory použity cyklodextriny. Účinnost separace byla kvantifikovaná hodnotou rozlišení, která byla vypočtena z rovnice (1) (cit.<sup>14,15</sup>).

$$R_s = \frac{t_{R,B} - t_{R,A}}{0,85 \cdot (W_{0,5}(A) + W_{0,5}(B))} \quad (1)$$

kde  $t_{R,A}$  a  $t_{R,B}$  jsou migrační časy enantiomerů,  $W_{0,5}(A)$  a  $W_{0,5}(B)$  jsou šířky píků v polovině jejich výšky.

Pro výpočet zdánlivých konstant stability komplexu PVP-CD byla použita rovnice (2) (cit.<sup>16</sup>).

$$\mu_{ep}^L - \mu_{ep,f} = \frac{(\mu_{ep,PVP-CD} - \mu_{ep,f}) \cdot K_{11} \cdot [CD]}{1 + K_{11} \cdot [CD]} \quad (2)$$

kde  $\mu_{ep}^L$  elektroforetická mobilita PVP v přítomnosti cyklodextrinu o koncentraci  $[CD]$ ,  $\mu_{ep,f}$  je elektroforetická mobilita PVP bez přítomnosti CD,  $K$  je zdánlivá konstanta stability a  $\mu_{ep,PVP-CD}$  je elektroforetická mobilita kom-

Tabulka I

Vypočtené hodnoty rozlišení jednotlivých enantiomerů kationů v závislosti na typu a koncentraci přidaného cyclodextrinu do základního elektrolytu

Vzorek	Chirální selektor o koncentraci $c$ [ $\text{mmol l}^{-1}$ ]								
	BCD			CMBCD			HSBCD		
	5	10	14	5	10	15	5 <sup>a</sup>	5 <sup>b</sup>	10
2-FMC	< 0,5	< 0,5	< 0,5	2,0	3,4	3,9	–	–	–
3-MC	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	0,6	0,9	–	3,4	–
4-EMC	< 0,5	< 0,5	0	0,7	1,0	0,9	2,5	3,7	–
4-MeBufedron	0	0	0	0	0	0	4,0	–	–
PVP	0,7	0,5	< 0,5	0,8	1,4	1,3	< 0,5	1,8	1,3
4-MePPP	< 0,5	< 0,5	0	0,7	0,7	0,8	–	–	–

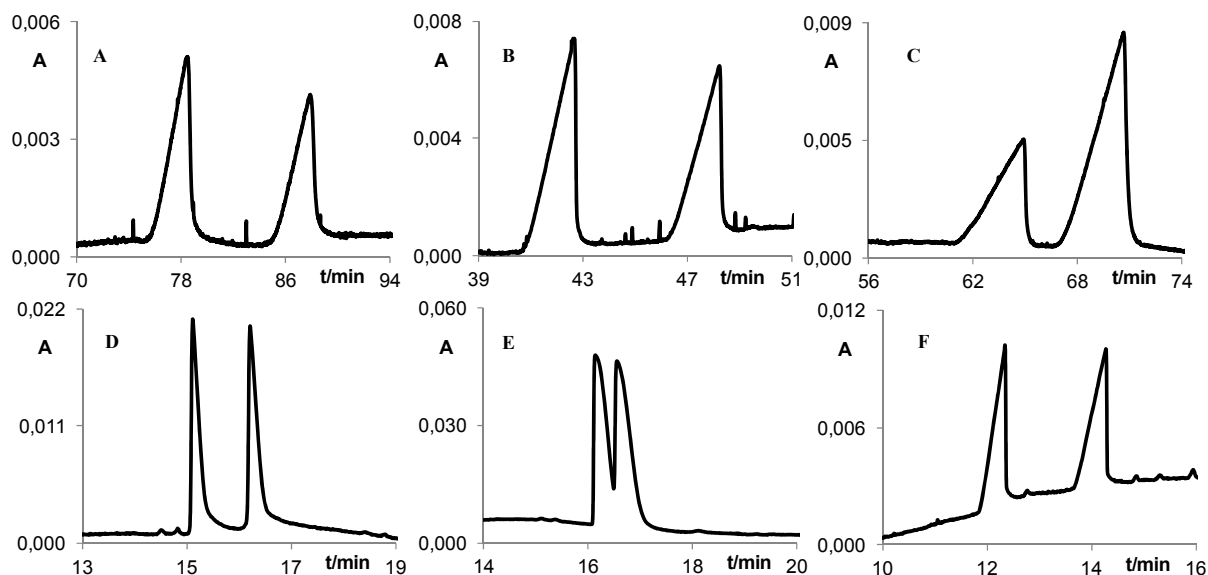
<sup>a</sup> Fosfátový pufr o koncentraci  $20 \text{ mmol l}^{-1}$ ; <sup>b</sup> fosfátový pufr o koncentraci  $50 \text{ mmol l}^{-1}$

plexu. Vzhledem k termostátované kapiláře a neměnnému proudu v průběhu experimentu jsme do výpočtu nezahrnuli korekci na změnu teploty. Rovněž jsme zanedbali změnu viskozity, neboť její změna vypočtená dle publikovaného postupu<sup>17</sup> byla srovnatelná s nejistotou opakovaných měření viskozity a činila 1 %. Korekci na změnu iontové síly jsme rovněž mohli při výpočtu zanedbat, neboť  $\text{pK}_a$  karboxylové skupiny v CMBCD nabývá hodnoty 3,6 (cit.<sup>18</sup>) a při pH elektrolytu 2,5 je tudíž CMBCD z většiny nenabitý.

Použitím BCD o koncentracích 5, 10 a  $14 \text{ mmol l}^{-1}$  bylo dosaženo částečné enantioseparace pěti kationů

s rozlišením nižším než 0,5 a 4-MeBufedron nebyl chirálně separován (tab. I). Přidávky CMBCD o koncentracích 5, 10 a  $15 \text{ mmol l}^{-1}$  vedly k chirální separaci pěti kationů, avšak enantioseparace na základní linii se podařila pouze u 2-FMC a 4-MeBufedron nebyl ani částečně chirálně separován.

Nejlépeších výsledků enantioseparace bylo dosaženo přidávkem  $5 \text{ mmol l}^{-1}$  HSBCD do fosfátového pufru o koncentraci  $20 \text{ mmol l}^{-1}$ , neboť se podařila částečná chirální separace PVP a enantioseparace 4-MeBufedronu a 4-EMC na základní linii. Přidávkem  $5 \text{ mmol l}^{-1}$  HSBCD



Obr. 2. Elektroforegramy směsí enantiomerů A: 3-MC, B: 4-EMC, C: PVP s přidávkem  $5 \text{ mmol l}^{-1}$  HSBCD do  $50 \text{ mmol l}^{-1}$  fosfátového pufru, pH 2,5, napětí  $-10 \text{ kV}$ ; D: 2-FMC, E: 4-MePPP s přidávkem  $15 \text{ mmol l}^{-1}$  CMBCD do  $50 \text{ mmol l}^{-1}$  fosfátového pufru, pH 2,7, napětí  $+20 \text{ kV}$ ; F: 4-MeBufedronu s přidávkem  $5 \text{ mmol l}^{-1}$  HSBCD do  $20 \text{ mmol l}^{-1}$  fosfátového pufru, pH 2,4, napětí  $-15 \text{ kV}$ ; kapilára o vnitřním průměru  $75 \mu\text{m}$  o délce  $58,5 \text{ cm}$  a efektivní délce  $50 \text{ cm}$

do fosfátového pufru o koncentraci  $50 \text{ mmol l}^{-1}$  bylo dosaženo chirální separace na základní linii třech kathinonů, a to 3-MC, 4-EMC a PVP, další tři kathinony nebyly detegovány. Při přidavku  $10 \text{ mmol l}^{-1}$  HSBCD byl enantioseparován pouze PVP, ostatní kathinony nebyly detegovány. Elektroforegramy analýz kathinonů, pro které byly získány nejvyšší hodnoty rozlišení, jsou uvedeny na obr. 2.

Pro stanovení zdánlivých konstant stability kathinonu s cyklodextrinem byl zvolen PVP, jehož enantiomery se podařilo pomocí BCD i CMBCD enantioseparovat. Vyšší hodnoty průměrných zdánlivých konstant stability byly získány při analýze v přítomnosti CMBCD ( $335 \pm 10$  pro první migrující enantiomer a  $384 \pm 11$  pro druhý migrující enantiomer) a nižších hodnot zdánlivých konstant stability bylo dosaženo analýzou v přítomnosti BCD ( $205 \pm 12$  pro první migrující enantiomer a  $249 \pm 15$  pro druhý migrující enantiomer). Ze získaných výsledků lze odvodit, že se na interakci PVP s cyklodextrinem podílí nejen samotná glukosová část cyklodextrinu, ale i karboxylová skupina CMBCD.

## Závěr

V této práci bylo studováno šest kathinonů, dosud neanalyzovaných kapilární elektroforézou, s využitím přídatků tří komerčně dostupných cyklodextrinů do základního elektrolytu tvořeného fosfátovým pufrem. Nejlepších hodnot rozlišení bylo dosaženo přidávkem  $5 \text{ mmol l}^{-1}$  sulfonovaného  $\beta$ -cyklodextrinu do základního elektrolytu. V těchto analýzách bylo dosaženo chirálních separací čtyř kathinonů na základní linii. Pátý a šestý studovaný kathinon se podařilo úspěšně enantioseparovat s přidávkem  $15 \text{ mmol l}^{-1}$  karboxymethylovaného  $\beta$ -cyklodextrinu do základního elektrolytu. Pro jeden z analyzovaných kathinonů byly vypočteny zdánlivé konstanty stability se dvěma použitými cyklodextriny, přičemž bylo zjištěno, že vzniká stabilnější komplex, pokud se na interakci podílí i karboxylová skupina derivátu cyklodextrinu.

*Práce byla realizována za podpory grantového projektu Bezpečnostního výzkumu MVČR (VG20122015075).*

## LITERATURA

1. Gambaro V., Arnoldi S., Colombo M. L., Dell'Acqua L., Guerrini K., Roda G.: *Forensic Sci. Int.* 217, 87 (2012).
2. Odenwald M., Klein A., Warfa N.: *EMCDDA* 2011, 1.
3. Coppola M., Mondola R.: *Toxicol. Lett.* 211, 144 (2012).
4. Schechter M. D.: *Pharmacol. Biochem. Be.* 36, 817 (1990).

5. Kalix P., Geissshusler S., Brenneisen R., Koelbing U., Fisch H. U.: *NIDA Res. Mg.* 105, 289 (1990).
6. Brenneisen R., Fisch H. U., Koelbing U., Geissshusler S., Kalix P.: *Brit. J. Clin. Pharmacol.* 30, 825 (1990).
7. Colzato L. S., Ruiz M. J., van den Wildenberg W. P., Hommel B.: *PLoS One* 6, e20602 (2011).
8. Zuba D.: *TrAC, Trends Anal. Chem.* 32, 15 (2012).
9. Mohr S., Pilaj S., Schmid M. G.: *Electrophoresis* 33, 1624 (2012).
10. Merola G., Fu H., Tagliaro F., Macchia T., McCord B. R.: *Electrophoresis* 35, 3231 (2014).
11. Rezanka P., Navratilova K., Rezanka M., Kral V., Sykora D.: *Electrophoresis* 35, 2701 (2014).
12. Dvorak M., Svobodova J., Benes M., Gas B.: *Electrophoresis* 34, 761 (2013).
13. Jiang C., Armstrong D. W.: *Electrophoresis* 31, 17 (2010).
14. Navratilova K., Rezanka P., Rezanka M., Sykora D., Jindrich J., Kral V.: *J. Sep. Sci.* 36, 1270 (2013).
15. Rezanka P., Rokosova L., Rezankova K., Blahova M., Rezanka M., Sykora D., Jindrich J., Kral V.: *J. Sep. Sci.* 37, 2779 (2014).
16. Parker K. M., Stalcup A. M.: *J. Chromatogr. A* 1204, 171 (2008).
17. Karakasyan C., Taverna M., Millot M.-C.: *J. Chromatogr. A* 1032, 159 (2004).
18. Rezanka M., Rezanka P., Sykora D., Jindrich J., Kral V.: *J. Sep. Sci.* 35, 811 (2012).

**M. Hegrová, K. Řezanková, M. Kuchař, and P. Řezanka** (*University of Chemistry and Technology, Prague, Czech Republic*): **Separation of Enantiomers of Cathinones by Capillary Electrophoresis Using Cyclodextrins as Chiral Selectors**

This paper deals with a chiral separation of six cathinones using three commercially available cyclodextrins as additives to the background electrolyte consisting of a phosphate buffer at pH 2.5. The best resolution values were obtained by the addition of sulfated  $\beta$ -cyclodextrin at  $5 \text{ mmol L}^{-1}$  concentration in the background electrolyte. Four complete chiral separations of racemic cathinones were achieved. Other two racemic cathinones were successfully enantioseparated by addition of carboxymethylated  $\beta$ -cyclodextrin at  $15 \text{ mmol L}^{-1}$  concentration in the background electrolyte. For one of the cathinones analyzed, the apparent stability constants of  $\beta$ -cyclodextrin and the average apparent stability constants of carboxymethylated  $\beta$ -cyclodextrin were calculated and it was found that a more stable complex is formed for carboxymethylated  $\beta$ -cyclodextrin.