

**UNIVERZITA KARLOVA**

**Přírodovědecká fakulta**

**Klinická a toxikologická analýza**



**Bc. Monika Martínková**

**Enantioselektivní separace vybraných analytů v systémech  
superkritické fluidní chromatografie a vysokoúčinné  
kapalinové chromatografie**

**Enantioselective separation of certain analytes using  
supercritical fluid chromatography and high performance  
liquid chromatography**

**Diplomová práce**

**Vedoucí práce: prof. RNDr. Eva Tesařová, CSc.**

**Praha, 2017**

## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 10. května 2017.

.....

podpis

## Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat především mé školitelce prof. RNDr. Evě Tesařové, CSc. za její trpělivost, ochotu a pevné vedení. Další poděkování patří všem z katedry fyzikální a makromolekulární chemie.

## **Abstrakt (CZ)**

Pro studium separací vybraných 24 analytů byla použita chirální stacionární fáze na bázi celulosy derivatizované tris(3,5-dimetylfenylkarbamátem). Enantioseparace byly realizovány ve dvou systémech, a to v systému vysokoúčinné kapalinové chromatografie a superkritické fluidní chromatografie. Hlavní proměnnou bylo složení mobilní fáze. Testováno bylo pět různých aditiv (izopropylamin, diethylamin, triethylamin, kyselina trifluoroctová, kombinace izopropylaminu a kyseliny trifluoroctové) a jejich vliv na enantioseparaci, v systému superkritické fluidní chromatografie také vliv dvou různých modifikátorů (methanol, propan-2-ol) v kombinaci s těmito aditivami. Cílem práce bylo nalézt složení mobilní fáze vhodné pro separaci vybraných analytů a porovnat separace v rámci různých mobilních fází a obou separačních systémů. Dle předpokladů se ukázalo, že systém superkritické fluidní chromatografie poskytuje poněkud lepší výsledky - lepší rozdělení v kratším čase, ale bylo možné najít dobré separační podmínky pro některé analyty též v systému vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Výsledek nebyl zcela jednoznačný.

## **Klíčová slova (CZ)**

Chiralita, enantiomery, enantioselektivní separace, chirální stacionární fáze, vysokoúčinná kapalinová chromatografie, superkritická fluidní chromatografie.

## **Abstract (EN)**

Cellulose tris-(3,5-dimethylphenylcarbamate) chiral stationary phase was used for separation of selected 24 analytes. Enantioseparations were realized using two systems, high performance liquid chromatography and supercritical fluid chromatography. Effect of mobile phase composition was studied. Five different additives (isopropylamine, diethylamine, triethylamine, trifluoroacetic acid, isopropylamine combined with trifluoroacetic acid) and their influence on enantioseparation were tested. Influence of two different modifiers (methanol, propan-2-ol) combined with all additives was also tested in supercritical fluid chromatography system. The aim of this work was to find optimized composition of mobile phase which was suitable for separation of the analytes studied and to compare separation potential among all mobile phases and also between used separations systems. The supercritical fluid chromatography was shown to yield better results, i.e. better resolution in shorter analysis time. However examples of analytes better resolved under optimized conditions in high performance liquid chromatography system have also been found.

## **Keywords (EN)**

Chirality, enantiomers, enantioselective separation, chiral stationary phase, high performance liquid chromatography, supercritical fluid chromatography.

# OBSAH

1. Seznam zkratk .....	- 6 -
2. Úvod.....	- 7 -
3. Teoretická část.....	- 8 -
3.1. Enantiomery, chiralita a další související pojmy .....	- 8 -
3.1.1. Chiralita a enantiomery obecně .....	- 8 -
3.1.2. Chiralita ve farmacii .....	- 9 -
3.2. Vysokoučinná kapalinová chromatografie .....	- 10 -
3.3. Superkritická fluidní chromatografie .....	- 10 -
3.3.1. Mobilní fáze v SFC .....	- 11 -
3.3.2. Stacionární fáze pro SFC .....	- 13 -
3.3.3. Aplikace SFC.....	- 14 -
3.4. Chirální stacionární fáze .....	- 15 -
3.4.1. Polysacharidové CSP.....	- 16 -
3.4.2. Cyklodextrinové CSP .....	- 17 -
3.4.3. Makrocyclické glykopeptidy .....	- 18 -
3.5. Analyzované látky .....	- 19 -
3.5.2. Fenothiaziny .....	- 19 -
3.5.3. Profeny .....	- 19 -
3.5.4. Thiazidová diuretika .....	- 20 -
4. Experimentální část.....	- 21 -
4.1. Přístroje a pomůcky .....	- 21 -
4.2. Použité chemikálie .....	- 22 -
4.3. Příprava vzorků a mobilních fází.....	- 22 -
4.4. Podmínky separace .....	- 22 -
4.4.1. HPLC systém.....	- 22 -
4.4.2. SFC systém.....	- 23 -
5. Výsledky a diskuze.....	- 25 -
5.1. Enantioselektivní separace v HPLC systému .....	- 25 -
5.1.1. Mobilní fáze s obsahem IPA jako aditiva.....	- 25 -
5.1.2. Mobilní fáze s obsahem DEA jako aditivem.....	- 26 -

5.1.3.	Mobilní fáze s TEA jako aditivem .....	- 27 -
5.1.4.	Mobilní fáze s TFA jako aditivem.....	- 28 -
5.1.5.	Mobilní fáze s IPA/TFA jako aditivou .....	- 29 -
5.2.	Enantioselektivní separace v SFC systému .....	- 34 -
5.2.1.	Mobilní fáze s modifikátorem MeOH .....	- 34 -
5.2.2.	Mobilní fáze s modifikátorem PrOH.....	- 46 -
5.3.	Porovnání vlivu modifikátorů MeOH a PrOH na separaci.....	- 56 -
5.3.1.	Vliv změny modifikátoru na rozlišení.....	- 57 -
5.3.2.	Vliv změny modifikátoru na retenci.....	- 58 -
5.4.	Porovnání separačních systémů HPLC a SFC .....	- 60 -
6.	Závěr.....	- 63 -
7.	Seznam použité literatury .....	- 64 -

## 1. SEZNAM ZKRATEK

BB	$\beta$ -Blokátory
CD	cyklodextriny
CS	chirální selektor
CSP	chirální stacionární fáze
DEA	diethylamin
GC	plynová chromatografie
HEX	hexan
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IPA	izopropylamin
k	retenční faktor
MeOH	methanol
MF	mobilní fáze
MG	makrocyclické glykopeptidy
PF	profeny
PH	fenothiaziny
PrOH	propan-2-ol
R	rozlišení
SF	stacionární fáze
SFC	superkritická fluidní chromatografie
TD	thiazidová diuretika
TEA	triethylamin
TFA	kyselina trifluoroctová
$t_M$	mrtvý čas
$t_R$	retenční čas
$\alpha$	selektivita

## 2. ÚVOD

Fakt, že rozdíl mezi enantiomery, může vyústit až v rozdíl mezi životem a smrtí, se stal i námětem detektivky Patricie Cornwellové. V její knize se vražedným nástrojem stal levometorfan obsažený v přípravku proti kašli, kde měl být přítomen pouze druhý enantiomer - dextrometorfan [1]. Přestože stereoizomerie sloučenin je známá více než 100 let, tak na poli farmacie byla až do nedávna opomíjeným tématem. S chiralitou se dnes setkáváme u více než poloviny vyráběných léčiv a ze skupiny syntetických chirálních léčiv je jich více než 80% vyráběno v podobě ekvimolárních směsí enantiomerů. Neúčinné enantiomery jsou tedy vlastně nečistoty, které by měly být limitovány a sledovány. Čistota farmaceutických přípravků je proto předmětem neustálého zájmu [2].

V dnešní době je nejčastěji aplikovanou metodou pro chirální separace kapalinová chromatografie, která využívá chirální stacionární fáze (CSP). Za posledních deset let došlo k obrovskému rozmachu ve vývoji nových CSP, které mohou zkrátit dobu potřebnou k eluci analytu či usnadnit jeho kvantifikaci [3].

Jednou z poměrně moderních metod využívaných k chirálním separacím je metoda, která je překvapivě stejně stará jako její všeobecně dobře známá kolegyně - vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) a nese název superkritická fluidní chromatografie (SFC) [4]. SFC by mohla nalézt využití také jako metoda pro kontrolu dopingových látek v moči u profesionálních sportovců, například pro anabolické androgenní steroidy [5].

Je nutno zmínit ještě další metodu, která také nalézá využití v oblasti enantioselektivních separací, a tou je kapilární elektroforéza [6].

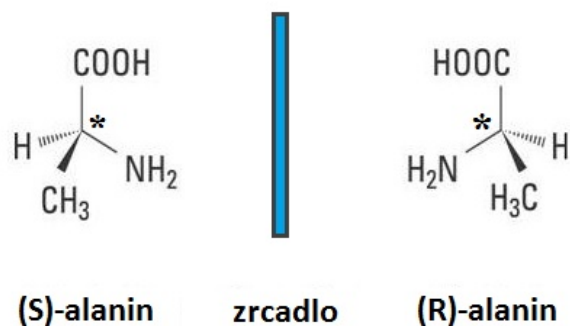
### 3. TEORETICKÁ ČÁST

#### 3.1. ENANTIOMERY, CHIRALITA A DALŠÍ SOUVISEJÍCÍ POJMY

##### 3.1.1. CHIRALITA A ENANTIOMERY OBECNĚ

Ve vědecké literatuře bylo pojmu chiralita využito poprvé fyzikem lordem Kelvinem [7]. Toto označení vzniklo z řeckého názvu pro ruku, dlaň- *chiros*. Chiralita je vlastností celé molekuly, ne pouze jejích částí. Abychom mohli molekulu označit za chirální, musí obsahovat alespoň jedno stereogenní centrum. Jedním z nečastějších stereogenních center bývá atom uhlíku, výjimkou nejsou ani atomy síry, křemíku fosforu nebo dusíku.

Enantiomery mohou mít shodné fyzikální, avšak rozdílné biologické vlastnosti. Projevem rozdílných biologických vlastností může být například odlišná vůně [8]. Za enantiomery označujeme sloučeniny, které se vzájemně liší absolutní konfigurací na stereogenních centrech a jsou tak svými přesnými zrcadlovými obrazy (viz obr. 3.1). Obecným způsobem vyjádření konfigurace na stereogenním centru je použití záznamu (*R*) a (*S*) před názvem sloučeniny [7].



Obr. 3.1 Struktura enantiomerů

### 3.1.2. CHIRALITA VE FARMACII

Biologické systémy, jako jsou proteiny nebo enzymy, mají trojrozměrnou strukturu, která vždy upřednostňuje interagovat pouze s jedním enantiomerem. Efekt těchto interakcí dává základ pro studium chiralit léčiv [9]. Důležitost chiralit nám také připomíná nechvalně proslulý případ thalidomidu [4].

Mnoho léčiv je distribuováno v podobě racemátu i přesto, že biologickou aktivitu vykazuje pouze jeden z přítomných enantiomerů. Druhý z enantiomerů je většinou biologicky méně aktivní, neaktivní, nebo dokonce může mít i toxické účinky. Enantiomery mohou vykazovat různé farmakokinetické a farmakodynamické vlastnosti. Zavedením prodeje enantiomerně čistých léčiv by s sebou neslo výhody jako je podávání nižších dávek pacientům, omezení vedlejších účinků či snížení interindividuální variability působení léčiv [10].

Všechna chirální léčiva můžeme rozdělit do tří kategorií i) požadovanou biologickou aktivitu vykazuje převážně jeden z enantiomerů, ii) oba dva enantiomery jsou stejně biologicky aktivní a mají tak shodné farmakodynamické vlastnosti, tato skupina má velice skromný počet zástupců, iii) skupina léčiv, u kterých v těle může docházet ke konverzi jednoho enantiomeru v druhý [9]. Do poslední skupiny patří i všeobecně známý ibuprofen. Ten má ve své molekule jedno stereogenní centrum, jeho S-enantiomer má protizánětlivé a analgetické účinky, ale druhý, R-enantiomer, je neaktivní. Přítomnost R-enantiomeru v léku dokonce značně snižuje nástup účinku S-enantiomeru [8].

V poslední době gradují snahy o výrobu enantiomerně čistých léčiv, namísto jejich racemických směsí tzv. „chiral switch“, které by zajistily podstatně vyšší kvalitu a bezpečnost distribuovaných léčiv [9]. Potenciální způsoby získání enantiomerně čistých léčiv jsou dva. Prvním je enantioselektivní syntéza požadovaného enantiomeru, druhým je oddělení požadovaného enantiomeru z racemátu [11].

### 3.2. VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE

Vznik chromatografických metod je připisován ruskému botanikovi M. S. Cvětovi, kterému se v roce 1903 podařilo na sloupci sorbentu uhličitanu vápenatého pomocí organických rozpouštědel separovat listová barviva (chlorofyly, karotenoidy) [12].

Metoda HPLC již po dlouhá desetiletí umožňuje separaci širokého spektra látek. Principem metody je rozdělit látky na základě jejich fyzikálních a chemických vlastností mezi dvě nemísitelné fáze. V průběhu separace se uplatňují jevy jako je rozpouštění, adsorpce, iontová výměna atd [13].

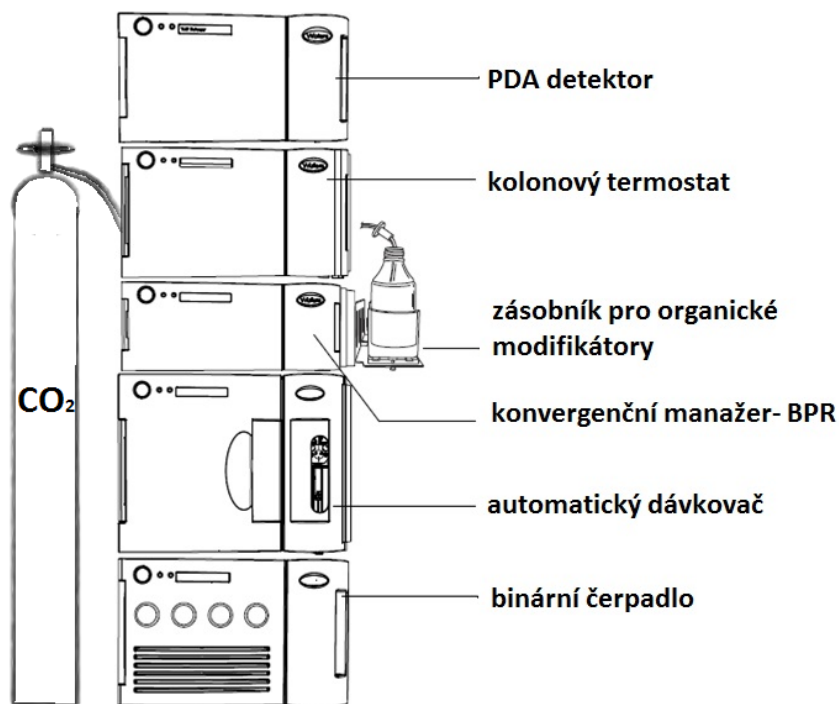
HPLC se dá používat v několika separačních módech, nečastější z nich jsou reverzní mód, normální mód a polárně-organický mód [14, 15, 16]. Normální mód využívá polární stacionární fáze (SF) a jako mobilní fáze (MF) nepolární nebo méně polární organická rozpouštědla. Reverzní mód to má s polaritou opačně, MF je polárnější než SF. Základem MF polárně-organického módu je nejčastěji organické rozpouštědlo acetonitril či methanol [17].

### 3.3. SUPERKRITICKÁ FLUIDNÍ CHROMATOGRAFIE

Za zrozením SFC stála potřeba rozšířit schopnosti plynové chromatografie (GC) a umožnit tak separaci látek, které ke své eluci potřebují vysoké teploty, jež ale zároveň mohou zapříčinit jejich rozklad [18]. Hlavním rozdílem mezi GC a SFC je role, kterou zastává mobilní fáze. Zatímco v GC je podíl MF na separaci analytu řekněme neutrální, v systému SFC hraje důležitou roli [19].

SFC je poměrně moderní metoda, která se v posledních letech stala atraktivní pro široké spektrum různých farmaceutických aplikací. Tato metoda nabývá na popularitě také díky své ekonomické stránce. Jelikož jako hlavní složka MF je používán oxid uhličitý, lze mluvit o tzv. „green chemistry“. SFC může být také považována za ortogonální k reverzní HPLC. Tato metoda je také vhodným nástrojem pro separaci malých molekul na farmaceutickém poli, jako jsou například syntetické intermediáty, aktivní složky,

nečistoty a produkty vzniklé degradací aktivních složek [20]. Přesnější by bylo uvádět místo označení superkritická pojmu subkritická, jelikož MF není složena pouze z plynu v superkritickém stavu, ale jsou tam i další složky [21]. Názorná instrumentace metody SFC je ukázána na obr. 3.2.

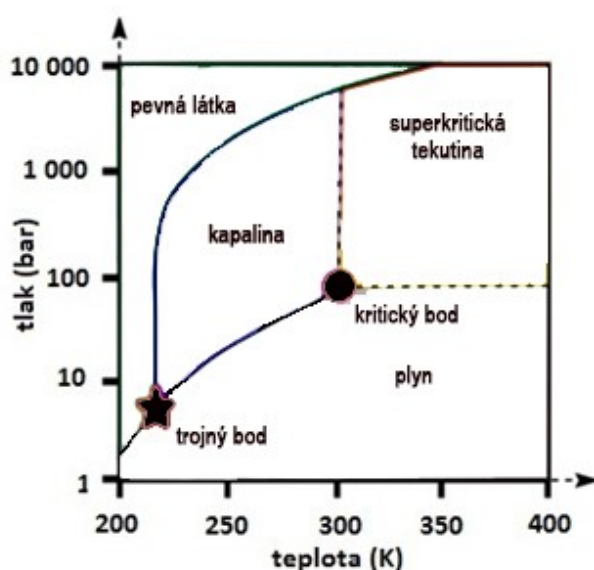


Obr. 3.2 Instrumentace SFC (vytvořeno dle citace [22]).

### 3.3.1. MOBILNÍ FÁZE V SFC

Když byl vývoj SFC ještě na počátku, využívaly se jako mobilní fáze čisté látky jako je amoniak, oxid dusičitý a některé halogenované uhlovodíky. Avšak brzy bylo jasné, že CO<sub>2</sub> je tou správnou volbou, převážně díky jeho nízké toxicitě, nízké hořlavosti a v neposlední řadě dobře dostupným kritickým hodnotám. Další velkou výhodou CO<sub>2</sub> je jeho mísitelnost ve velkém rozmezí tlaků a teplot s mnoha organickými rozpouštědly [19].

CO<sub>2</sub> má oproti běžně používaným rozpouštědlům několik výhod. Jeho nízká viskozita umožňuje vysokou difuzivitu analytů, výhodou je možnost použití vysokých průtokových rychlostí mobilní fáze [20]. CO<sub>2</sub> se stává superkritickou tekutinou při dosažení teploty 31°C a tlaku 73,8 bar. Existenci superkritické tekutiny vysvětluje obr. 3.3. Její hustota zůstává srovnatelná s hustotou kapalin, ale vysoká difuzivita a nízká viskozita odpovídá spíše vlastnostem plynu [23]. Neopomenutelnou vlastností CO<sub>2</sub> je jeho acidita, jelikož reakcí alkoholu s CO<sub>2</sub> dochází ke vzniku alkytkarbonové kyseliny. Během separace tak může docházet k protonaci bazických látek a deprotonaci těch kyselých [24].



Obr. 3.3 Fázový diagram CO<sub>2</sub>.

Dnes se mobilní fáze pro SFC skládá převážně ze superkritického oxidu uhličitého, ten ale není pro většinu analytů dostatečně polární, a proto je smíchán s dalším rozpouštědlem. Pro toto minoritní rozpouštědlo se používá označení „modifikátor“. Modifikátorem je nejčastěji zástupce ze skupiny alkoholů, např. metanol (MeOH), ten díky své vysoké polaritě podporuje rozpustnost analytu v mobilní fázi [20]. Použití MeOH jako součásti MF může také podněcovat uplatnění ostatních interakcí, jako jsou vodíkové

vazby, dipól-dipól interakce, a také adsorpci rozpouštědla [25]. Mezi další používané modifikátory patří ethanol, propanol (PrOH), acetonitril atd. Testovány jsou i kombinace dalších méně obvyklých látek např. chloroformu v kombinaci s methanolem [26].

Třetí složkou mobilní fáze mohou být ještě další aditiva a to jak kyseliny, tak báze a soli [20]. Pro separaci vysoce polárních látek může být použita dokonce i voda [27]. Úkolem těchto aditiv je povětšinou vylepšit tvar píku, který je postižený v důsledku vedlejších interakcí analytu či jeho špatné rozpustnosti [20]. Separaci karboxylových kyselin podpoříme přidáním například kyseliny trifluoroctové, zatímco separaci bazických látek podpoří alifatické aminy, jako je izopropylamin, diethylamin či ethyldimethylamin. Aditiva také mohou vytvářet iontové páry s analytem, a tak přispět k jeho separaci [28]. Další z výhod použití aditiva může být obsazení volných silanolových skupin, a tím zabránění nežádoucím interakcím [29]. Bez použití aditiv by u některých vysoce polárních analytů nemuselo dojít ani k jejich eluci [27]. V této diplomové práci byla testována aditiva izopropylamin (IPA), diethylamin (DEA), triethylamin (TEA), kyselina trifluoroctová (TFA) a kombinace izopropylaminu a kyseliny trifluoroctové.

Dalším faktorem ovlivňujícím separaci je např. tlak, jelikož ovlivňuje hustotu mobilní fáze [25].

### 3.3.2. STACIONÁRNÍ FÁZE PRO SFC

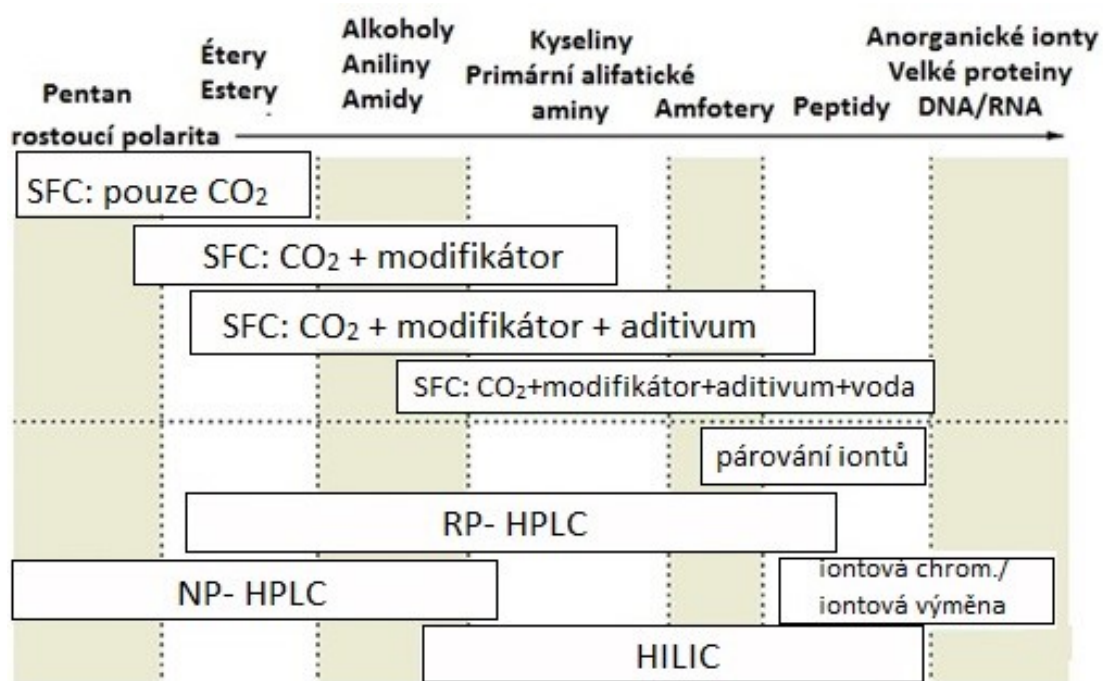
Volbě CO<sub>2</sub>, jako hlavní složky mobilní fáze, je nakloněno použití mnoha polárních i nepolárních SF [19]. Mezi nejběžněji používané SF pro chirální separace v systému SFC patří CSP na bázi derivatizovaných polysacharidů celulosy a amylosy, které jsou zakotveny nebo navázány na silikagelový nosič. Tyto CSP se dají připravit dvěma různými způsoby. Tzv. „coutingem“, kdy jsou chirální selektory (CS) zakotveny na nosiče fyzikálními interakcemi. Tyto CSP jsou ale náchylné na poškození různými rozpouštědly, jako je např. dichlormethan. Druhým postupem je imobilizace, která umožňuje pevnější vazbu a následně použití širší škály rozpouštědel. Další méně využívané CSP jsou na bázi makrocyclických glykopeptidů, cyklodextrinů, cyklofruktanů nebo různých

syntetických polymerů. Pro látky, které mají ve své molekule více jak jedno chirální centrum, se nabízí použití dvou CSP s komplementární selektivitou za sebou [20].

CSP lze obecně použít i pro separaci achirálních látek [30]. Počet kolon pro achirální separace specifické pro SFC systém se zdatelně zvyšuje [19].

### 3.3.3. APLIKACE SFC

SFC metoda má široké uplatnění, a to jak pro analytické, tak preparativní účely. Aplikační okruhy jsou znázorněny na obr. 3.4 [19].



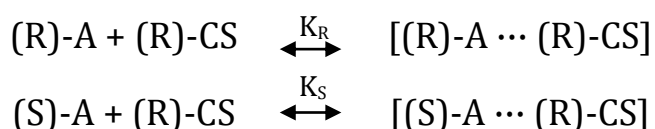
Obr. 3.4 Přehled rozsahu aplikací různých chromatografických systémů [19].

### 3.4. CHIRÁLNÍ STACIONÁRNÍ FÁZE

Za zrodem první komerčně dostupné CSP pro použití v HPLC stojí Pirkl a jeho spolupracovníci, kteří odstartovali vývoj nespočetného množství dalších CSP. Jako jedna z nejdůležitějších proměnných v oblasti enantioseparačních chromatografických metod se ukázala volba SF. V posledních letech je rozvoj SF na výsluní, zvláště pak těch chirálních, jelikož zisk čistých enantiomerů je žádán na poli farmacie, toxikologie i biologie [11].

Při průchodu enantiomerů kolonou dochází k jejich přechodné adsorpci na CSP, vytváří se tak komplexy s různou vazebnou energií, což je zásadní pro jejich separaci [11]. Nejpravděpodobněji jsou podmínkou úspěšné separace nejméně tři simultánní interakce mezi CSP a minimálně jedním z enantiomerů [31]. Formování těchto komplexů je řízeno interakcemi, jako jsou vodíkové vazby, van der Waalsovy síly,  $\pi$ - $\pi$  interakce, interakce iont-dipól, dipól-dipól a iont-iont. CS nemusí být ovšem nutně součástí pouze SF, může být přidán i do MF. Model chirálního rozpoznávání znázorňuje obr. 3.5 [32]. CSP existuje velké množství, z nichž některé jsou probrány na následujících stránkách.

Objev pomyslného „dokonalého“ chirálního selektoru, který by bylo možno aplikovat na jakoukoliv racemickou směs, je zatím stále příslibem budoucnosti [33].



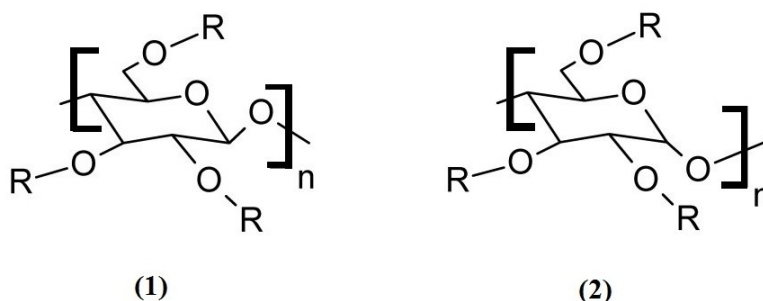
Obr. 3.5 Rovnice charakterizující tvorbu komplexu chirálního analytu ((R)/(S)-A) a chirálního selektoru (CS), předpokládající (R) konfiguraci selektoru [32].

### 3.4.1. POLYSACHARIDOVÉ CSP

Polysacharidové chirální stacionární fáze jsou dnes velice populární, jelikož umožňují separaci mnoha racemátů. Polysacharidová kolona byla použita i v této diplomové práci. Základem těchto CSP je nejčastěji celulóza či amyloza viz obr. 3.6 [34]. Tyto dva polysacharidy mají lineární helikální strukturu a jsou složeny z glukosových jednotek. Celulóza je propojena  $\beta$ -(1,4) glykosidickou vazbou a amyloza  $\alpha$ -(1,4) glykosidickou vazbou [32]. Není však zvykem tyto polysacharidy využívat v jejich nativním stavu, nýbrž až po následné derivatizaci na jejich hydroxylové skupině [34].

Nejširší enantiosektivitu prokázaly deriváty celulózy a amylozy jako jsou estery acetátu, benzoátu či fenylylkarbamát. Např. tris(3,5-dimethylfenylkarbamát) celulózy, tris(3,5-dimethylfenylkarbamát) amylozy a tris(4,5-methylbenzoát) celulózy [35]. Dimethylfenylkarbamát, jako derivatizační skupina, nabízí pro interakci s analytem vodíkové vazby na své karbonylové a NH skupině a díky přítomnému fenylu  $\pi$ - $\pi$  interakce [32].

CSP připravené imobilizací mohou být použity v kombinaci s širší škálou rozpouštědel než CSP připravené pokrytím. Pokrytí („coating“), je způsob přípravy CSP, kdy se např. derivatizované polysacharidy nechají adsorbovat na povrch silikagelového nosiče. Pro takto připravené CSP se doporučuje použití pouze rozpouštědel s nízkou polaritou. Oproti tomu imobilizované CSP jsou kovalentně navázány na silikagelový nosič a díky své větší stabilitě tak mohou být použity s více rozpouštědly. Zajímavým faktem je, že i když jsou imobilizované CSP stabilnější, jejich enantiosektivita je někdy nižší než u CSP připravených pokrytím [34].

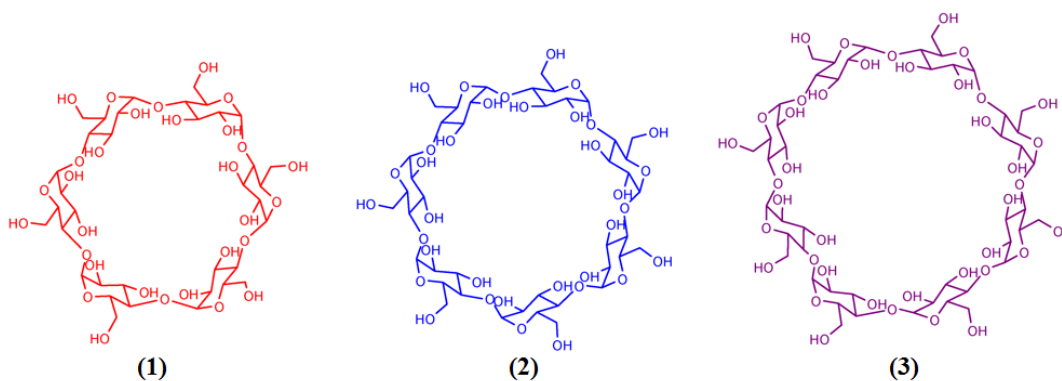


Obr. 3.6 Struktura celulózy (1) a amylozy (2).

### 3.4.2. CYKLODEXTRINOVÉ CSP

Mezi další SF, které na sebe strhují pozornost v oblasti enantioseparací, patří cyclodextriny (CD) [36]. CD jsou cyklické oligosacharidy čítající obvykle šest a více D-glukopyranosových jednotek [37]. Obecně rozdělujeme CD do tří hlavních skupin  $\alpha$ -,  $\beta$ - a  $\gamma$ -CD, které obsahují šest, sedm a osm stavebních jednotek viz obr. 3.7 [38].

Díky jejich kavitě může docházet k tvorbě inkluzních komplexů s mnoha organickými molekulami. Velikost CD kavity je určující pro chirální rozpoznání. Nejčastěji k tvorbě inkluzního komplexu dochází v poměru 1:1(hostitel-host), není ale výjimkou, že kavity pojme i více „hostujících“ molekul [37]. Vnější povrch CD kavity je hydrofilní, zatímco vnitřní část má povahu hydrofobní. Hydroxylové skupiny na okraji kavity jsou často cílem derivatizace. Hydrofobní skupiny, které jsou používány k modifikaci nativního CD, jsou např. alkyly, aryly a estery. Zástupcem hydrofilních substituentů je polární hydroxypropyl [36].

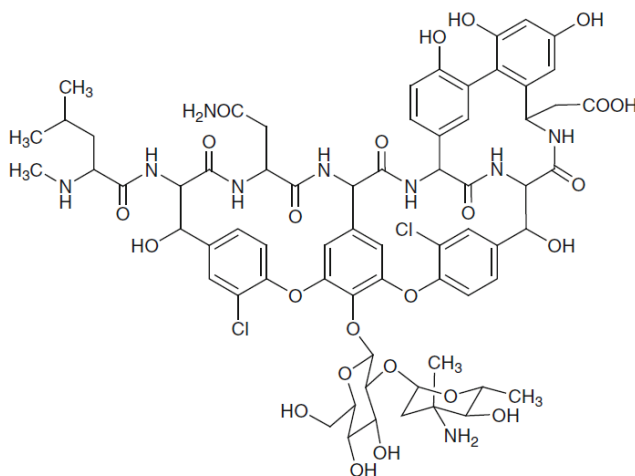


Obr. 3.7 Struktura cyclodextrinů,  $\alpha$ - cyclodextrin (1),  $\beta$ - cyclodextrin (2) a  $\gamma$ - cyclodextrin (3) [38].

### 3.4.3. MAKROCYKLICKÉ GLYKOPEPTIDY

Makrocyclické glykopeptidy (MG) ukázaly svůj separační potenciál pro dělení řady analytů v normálním, reverzním i polárně-organickém módu. MG, též označované jako makrocyclická antibiotika, byly uvedeny na pole chirálních separací Armstrongem a jeho skupinou, jimž se s využitím vankomycinu, rifamycinu B a thiostreptonu jako CS/CSP podařilo separovat značné množství látek [39].

Dnes mezi nejznámější CSP v této skupině patří ty na bázi vankomycinu, ristocetinu A, teikoplaninu a teikoplaninu aglykonu [32]. Tyto sloučeniny mají mnoho různých funkčních skupin a stereogenních center, které nabízí velké množství potencionálních interakcí, jako jsou např. vodíkové vazby, elektrostatické interakce či inkluzní efekt [40]. Pro názornost je na obr. 3.8 ukázána struktura vankomycinu. MG obsahují ve své struktuře ionizovatelné části např. karboxylovou či amino skupinu [32]. Skutečnost, že CS nemusí být pouze součástí SF, ale může být přidán do MF, popisuje studie, kde bylo k chirální separaci ketoprofenu využito achirální SF za přídavku vankomycinu do MF [40].



Obr. 3.8 Struktura vankomycinu [32].

## 3.5. ANALYZOVANÉ LÁTKY

### 3.5.1. $\beta$ -Blokátory

$\beta$ -Blokátory (BB) jsou léčiva patřící do skupiny sympatolytik. Hlavním projevem působení sympatolytik je potlačení účinku sympatického nervstva. Jak už jejich název vypovídá, působí na  $\beta$ -adrenergní receptory. Využití nalézají při léčbě anginy pectoris, arytmiích a hypertenzi. Nežádoucí účinky po užívání BB jsou např. nauzea, únava nebo parestézie [41].

V roce 1965 byl na trh uveden první BB s názvem propranolol [42]. Ten se podává preventivně u pacientů trpících migrénami. Jako další příklad lze uvést acebutolol, jež je hydrofilní kardioselektivní látka, která podléhá velice rychlé přeměně v játrech. Skupina BB se dá rozdělit na BB selektivní (atenolol) a neselektivní (alprenolol) a mimo jiné i na BB s vnitřní sympatomimetickou aktivitou (pindolol) a BB bez ní (propranolol) [41].

### 3.5.2. FENOTHIAZINY

Fenothiaziny (PH) jsou jedny z nejdéle známých neuroleptik. Neuroleptika jsou antipsychotické látky používané k terapii schizofrenie a dalších psychóz, u kterých jsou hlavními příznaky bludy a halucinace [41].

Typickým zástupcem této skupiny je thioridazin. Dalším z této skupiny je promethazin, který ale neřadíme do skupiny neuroleptik, nýbrž do skupiny antihistaminik. Promethazin má sedativní a antiemetické účinky [42].

### 3.5.3. PROFENY

Ibuprofen je nesteroidní, protizánětlivá, analgetická a antipyretická látka používaná např. při léčbě migrény, bolestí zubů či kloubních chorob. Jeho strukturním základem je kyselina propionová. Vlastnostmi velice blízký ibuprofenu je i indoprofen. Tia-

profenová kyselina má dokonce i ochranné účinky na kloubní chrupavky [41]. Dalším nesteroidním zástupcem profenů (PF) je ketoprofen, ten má vlastnosti analogické k ibuprofenu. Aktivním enantiomerem ketoprofenu je pouze jeho (S) forma, (R) forma je inaktivní [40].

#### *3.5.4. THIAZIDOVÁ DIURETIKA*

Diuretika, jinak též saluretika, jsou látky, které svým působením zvyšují tvorbu moči. Působí mechanismem inhibice zpětné resorpce chloridu sodného a vody [42]. Indikací jsou srdeční insuficience, edémy, intoxikace a hypertenze. Nežádoucími účinky thiazidových diuretik (TD) může být hypokalémie, hyperglykémie či hyperurikémie [41].

## 4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1. PŘÍSTROJE A POMŮCKY

System HPLC:

Pumpa Waters 1525 Binary HPLC pump (Milford, USA)

Detektor Waters 2487 Dual  $\lambda$  Absorbance Detector (Milford, USA)

Autosampler Waters 717<sub>plus</sub> Autosampler (Milford, USA)

Počítačový program Breeze (Milford, USA)

System SFC:

Waters Acquity Ultra Performance Convergence Chromatography™ (UPC<sup>2</sup>)

Binary Solvent Manager (Waters, Milford, USA)

Sample Manager- FL (Waters, Milford, USA)

Convergence Manager (Waters, Milford, USA)

Column Manager (Waters, Milford, USA)

PDA detector (Waters, Milford, USA)

Počítačový program Empower 3

Kolona: CHIRAL ART Cellulose-SB S-3 $\mu$ m, 150 x 3,0 mm I.D (Dinslaken, Germany)

Injekční stříkačka: objem 20 ml, P-LAB (Praha, Česká republika)

Jednorázová stříkačková fritra: Watrex (Praha, Česká republika)

Váhy: METTLER AE 240 (Greifensee, Švýcarsko)

Ultrazvuková lázeň: ELMASONIC, P-LAB (Praha, Česká republika)

## 4.2. POUŽITÉ CHEMIKÁLIE

Hexan (čistota  $\geq 97,0\%$ ), propan-2-ol (čistota 99,8%), kyselina trifluoroctová (99%), triethylamin (99%), diethylamin (99%), izopropylamin (99,9%), methanol (99,9%) vše od firmy Chromasolv®Riedel-de Haën, SIGMA-ALDRICH, St.Louis, USA.

Deionizovaná voda

## 4.3. PŘÍPRAVA VZORKŮ A MOBILNÍCH FÁZÍ

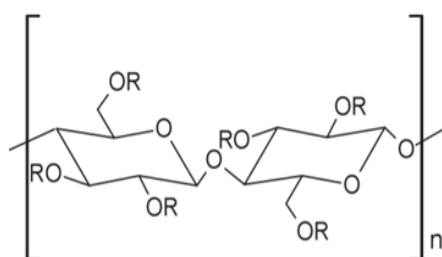
Všechny vzorky byly připraveny rozpuštěním 1mg vzorku v 1ml methanolu. Rozpuštění bylo podpořeno sonifikací v ultrazvukové lázni. Po rozpuštění byly vzorky přefiltrovány. Vzorky byly skladovány v lednici.

Pro přípravu MF, která byla určena pro měření v HPLC systému, bylo k jejímu odvzdušnění využito sonifikace v ultrazvukové lázni, a to vždy po dobu minimálně 20 minut. MF používaná k separacím v SFC systému takto odvzdušňována nebyla.

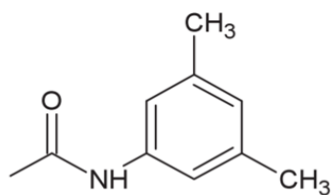
## 4.4. PODMÍNKY SEPARACE

### 4.4.1. HPLC SYSTÉM

Pro měření v HPLC systému byla použita kolona na bázi celulosy derivatizované tris(3,5-dimethylfenylkarbamátem) viz obr. 4.1. Kolona byla termostatována na teplotu 35 °C. Průtok mobilní fáze byl 1,8 ml/min. Tlak kolísal v rozmezí od 2730- 3240 psi (18,8- 22,3 MPa), dle druhu aktuální MF. Detekce analytů probíhala při vlnových délkách  $\lambda=254$  nm a  $\lambda=280$  nm. Hodnota mrtvého času ( $t_M$ ) byla určena pomocí methanolu. Složení MF ukazuje tabulka 4.1. Jako maximální doba eluce byla zvolena hranice 30 minut.



(1)



(2)

Obr. 4.1 Použitá CSP (1) struktura celulosy, (2) struktura použité derivatizační skupiny 3,5-dimethylfenylkarbamátu.

Tab. 4.1 Složení MF v HPLC systému.

HEX/PrOH/X				
X= IPA	X= DEA	X= TEA	X= TFA	X= IPA/TFA
80/20/0,1	80/20/0,1	80/20/0,1	80/20/0,1	80/20/0,1
90/10/0,1	90/10/0,1	90/10/0,1	90/10/0,1	90/10/0,1

#### 4.4.2. SFC SYSTÉM

Pro měření v systému SFC byla použita stejná kolona jako v HPLC, tedy kolona na bázi celulosy derivatizované tris(3,5-dimethylfenylkarbamátem). Kolona byla termostatována na teplotu 35 °C a vzorky byly termostatovány na 10 °C. Průtok mobilní fáze byl 2,5 ml/min. Tlak se pohyboval v rozmezí 3450- 3900 psi (23,8- 26,9 MPa), dle zvolené MF. K detekci analytů byly zvoleny vlnové délky  $\lambda=254$  nm a  $\lambda=280$  nm. Hodnota mrtvého času ( $t_M$ ) byla určena pomocí methanolu. Složení použitých MF ukazuje tabulka 4.2. Jako maximální doba eluce byla zvolena hranice 20 minut.

Tab. 4.2 Schéma měření v systému SFC

CO <sub>2</sub> /MeOH/X				
X= IPA	X= DEA	X= TEA	X= TFA	X= IPA/TFA
80/20/0,1	80/20/0,1	80/20/0,1	80/20/0,1	80/20/0,1
90/10/0,1	90/10/0,1	90/10/0,1	90/10/0,1	90/10/0,1
95/5/0,1	95/5/0,1	95/5/0,1	95/5/0,1	95/5/0,1
98/2/0,1	98/2/0,1	98/2/0,1	98/2/0,1	98/2/0,1

CO <sub>2</sub> /PrOH/X				
X= IPA	X= DEA	X= TEA	X= TFA	X=IPA/TFA
80/20/0,1	80/20/0,1	80/20/0,1	80/20/0,1	80/20/0,1
90/10/0,1	90/10/0,1	90/10/0,1	90/10/0,1	90/10/0,1
95/5/0,1	95/5/0,1	95/5/0,1	95/5/0,1	95/5/0,1
98/2/0,1	98/2/0,1	98/2/0,1	98/2/0,1	98/2/0,1

## 5. VÝSLEDKY A DISKUZE

Jedním z úkolů této diplomové práce bylo otestovat různá složení mobilní fáze a zhodnotit jejich vliv na separaci vybraných analytů. Dalším cílem bylo pokusit se najít optimální složení MF, které by bylo vhodné aplikovat pro rozdělení všech zvolených analytů. A závěrem se pokusit v rámci možností porovnat získané výsledky v HPLC systému s výsledky obdrženyými ze SFC systému, i když víme, že podmínky pro separace nebyly totožné.

### 5.1. ENANTIOSELEKTIVNÍ SEPARACE V HPLC SYSTÉMU

#### 5.1.1. MOBILNÍ FÁZE S OBSAHEM IPA JAKO ADITIVA

Jak je již patrné z tabulky 4.1, mobilní fáze s přidavkem IPA, byla testována ve dvou různých objemových poměrech HEX/PrOH. IPA je bazické aditivum, které bylo testováno samostatně a následně ještě v kombinaci s kyselým aditivem, TFA. Výsledky jsou uvedeny v tab. 5.1.

Většinu analytů ze skupiny  $\beta$ -blokátorů se podařilo rozdělit na základní linii už při objemovém zastoupení hexanu (HEX) 80%. Separace nebyly úspěšné pouze pro vzorky BB4, BB5 a BB9. Při zvýšení obsahu hexanu v MF na 90% se téměř podařilo rozdělit až na základní linii i analyt BB9, avšak BB4 a BB5 nejevily ani náznaky dělení. Ze skupiny profenů se podařilo separovat pouze enantiomery indoprofenu (PF2). Ze skupiny thiazidových diuretik byla separace na základní linii úspěšná pro dva vzorky a to TD1 a TD5. U fenothiazinů se neobjevily žádné náznaky dělení ani v jedné z testovaných MF.

Tab. 5.1 Výsledky měření v HPLC systému o složení MF HEX/PrOH/IPA.

analyty	80/20/0,1 (v/v/v)			90/10/0,1 (v/v/v)		
	k <sub>1</sub>	R <sub>1,2</sub>	α	k <sub>1</sub>	R <sub>1,2</sub>	α
ibuprofen (PF1)	0,11			0,07		
indoprofen (PF2)	2,34	1,85	1,48	7,46	2,12	1,56
flurbiprofen (PF3)	0,35			0,65		
tiaprofenová kyselina (PF4)	0,92			2,34	0,12	1,08
carprofen (PF5)	1,45	0,21	1,13	4,52	0,25	1,14
suprofen (PF6)	1,00			2,49	0,08	1,06
ketoprofen (PF7)	0,65			1,30		
fenoprofen (PF8)	0,30			0,59	0,14	1,26
propranolol (BB1)	0,51	1,88	1,56	1,08	4,04	1,71
oxprenolol (BB2)	0,24	5,03	4,88	-		
metoprolol (BB3)	0,18	1,89	2,46	0,48	3,83	2,38
metipranolol (BB4)	0,15			0,44		
acebutolol (BB5)	1,07			4,80		
pindolol (BB6)	1,42	13,10	4,76	-		
bopindolol (BB7)	1,93	18,96	7,21	-		
atenolol (BB8)	2,58	2,79	1,39	-		
alprenolol (BB9)	0,07	0,97	3,60	0,13	1,23	4,00
thioridazin (PH1)	0,10			0,14		
promethazin (PH3)	0,01			0,03		
butizid (TD1)	3,21	4,06	1,78	-		
mefrusid (TD2)	2,77			7,92		
chlorthalidon (TD3)	5,70	0,91	1,16	-		
trichlormethiazid (TD4)	9,21			-		
bendroflumethiazid (TD5)	4,70	1,78	1,25	25,15	1,69	1,27

### 5.1.2. MOBILNÍ FÁZE S OBSAHEM DEA JAKO ADITIVEM

Výsledky jsou uvedeny v tab. 5.2. Volba DEA jako aditiva se příznivě projevila na separaci vzorku BB9, který se podařilo oproti předchozímu aditivu, separovat až na základní linii. β-Blokátory se tedy podařilo separovat úspěšně až na vzorky BB4 a BB5. Jako nevhodný se DEA ukázal pro skupinu profenů, kde se na základní linii nerozdělil ani jeden z analytů. Thiazidová diuretika a fenothiaziny poskytly výsledky velice podobné předchozí MF s IPA jako aditivem.

Tab. 5.2 Výsledky měření v HPLC systému o složení MF HEX/PrOH/DEA.

analyty	80/20/0,1 (v/v/v)			90/10/0,1 (v/v/v)		
	k <sub>1</sub>	R <sub>1,2</sub>	α	k <sub>1</sub>	R <sub>1,2</sub>	α
ibuprofen (PF1)	-			0,76		
indoprofen (PF2)	2,37	0,12	1,09	2,99	0,48	1,07
flurbiprofen (PF3)	0,31			1,10		
tiaprofenová kyselina (PF4)	1,03			3,85		
carprofen (PF5)	1,35			6,09		
suprofen (PF6)	0,93			3,44		
ketoprofen (PF7)	0,41			1,69		
fenoprofen (PF8)	0,26			0,90		
propranolol (BB1)	0,56	2,10	1,58	-		
oxprenolol (BB2)	0,28	4,89	4,74	-		
metoprolol (BB3)	0,21	1,49	2,00	0,56	2,34	1,66
metipranolol (BB4)	0,18			0,53		
acebutolol (BB5)	1,24			5,25		
pindolol (BB6)	1,65	14,43	4,80	-		
bopindolol (BB7)	2,03	18,38	7,07	-		
atenolol (BB8)	2,57	2,73	1,40	-		
alprenolol (BB9)	0,07	1,04	3,60	0,18	1,92	3,33
thioridazin (PH1)	0,13			0,19		
promethazin (PH3)	0,04			0,07		
butizid (TD1)	3,19	4,01	1,79	-		
mefrusid (TD2)	2,56			8,32		
chlorthalidon (TD3)	5,09	0,70	1,14	-		
trichlormethiazid (TD4)	7,74	0,15	1,08	-		
bendroflumethiazid (TD5)	4,18	1,56	1,25	26,88	1,68	1,27

### 5.1.3. MOBILNÍ FÁZE S TEA JAKO ADITIVEM

Výsledky jsou uvedeny v tab. 5.3. Ze skupiny BB nebyly separace úspěšné pouze u analytů BB4, BB5 a BB8. Profeny nejeví ani nepatrné známky separace s výjimkou PF2. Vzorčky TD1 a TD5 se podařilo rozdělit na základní linii. TEA tedy nepřinesl žádné výhody oproti dvěma předchozím aditivům. U většiny analytů bylo také pozorováno prodloužení jejich retenčních časů v této MF.

Tab. 5.3 Výsledky měření v HPLC systému o složení MF HEX/PrOH/TEA.

analyty	80/20/0,1 (v/v/v)			90/10/0,1 (v/v/v)		
	k <sub>1</sub>	R <sub>1,2</sub>	α	k <sub>1</sub>	R <sub>1,2</sub>	α
ibuprofen (PF1)	0,06			0,18		
indoprofen (PF2)	2,65	0,28	1,14	9,60	0,18	1,17
flurbiprofen (PF3)	0,41			1,13		
tiaprofenová kyselina (PF4)	2,16			6,04		
carprofen (PF5)	1,69			6,43	0,14	1,07
suprofen (PF6)	1,38			4,10		
ketoprofen (PF7)	0,68			2,07		
fenoprofen (PF8)	0,34			0,88		
propranolol (BB1)	0,78	1,51	1,43	1,74	2,37	1,55
oxprenolol (BB2)	0,47	3,98	3,34	-		
metoprolol (BB3)	0,38	0,88	1,77	1,04	1,33	1,85
metipranolol (BB4)	0,35			1,04		
acebutolol (BB5)	2,19			10,76		
pindolol (BB6)	2,44	7,45	3,87	-		
bopindolol (BB7)	2,79	10,01	5,84	-		
atenolol (BB8)	3,81	1,40	1,32	18,40	1,32	1,34
alprenolol (BB9)	0,16	1,11	2,36	0,41	1,72	2,32
thioridazin (PH1)	0,18			0,26		
promethazin (PH3)	0,07			-		
butizid (TD1)	3,19	4,07	1,82	-		
mefrusid (TD2)	2,59			9,62		
chlorthalidon (TD3)	5,22	0,92	1,17	-		
trichlormethiazid (TD4)	6,71	0,30	1,14	-		
bendroflumethiazid (TD5)	4,16	1,70	1,26	-		

#### 5.1.4. MOBILNÍ FÁZE S TFA JAKO ADITIVEM

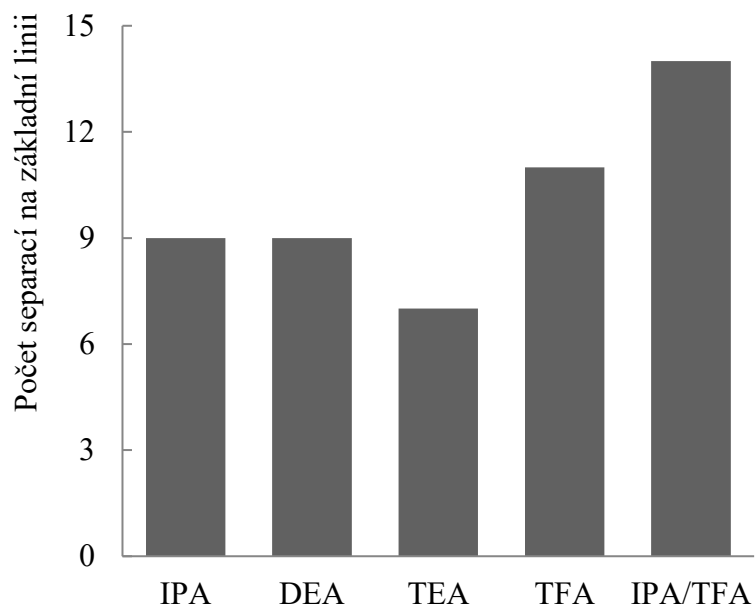
Výsledky jsou uvedeny v tab. 5.4. Aditivum TFA se ukázalo jako vhodné zvláště pro skupinu BB, kde napomohlo separaci většiny analytů kromě BB4 a BB5 a to již při zastoupení 80% hexanu. Mezi profeny se také poprvé podařilo úspěšně separovat kromě vzorku PF2 i vzorek PF5. Pro thiazidová diuretika jsou výsledky opět velice podobné předchozím měření. Za zmínku stojí náznak separace, který se objevil v MF s 90% hexanu u vzorku PH1 ze skupiny fenothiazinů. Je to jediný náznak separace u tohoto vzorku ze všech testovaných MF v systému HPLC.

Tab. 5.4 Výsledky měření v HPLC systému o složení MF HEX/PrOH/TFA.

analyty	80/20/0,1 (v/v/v)			90/10/0,1 (v/v/v)		
	k <sub>1</sub>	R <sub>1,2</sub>	α	k <sub>1</sub>	R <sub>1,2</sub>	α
ibuprofen (PF1)	0,01			0,03		
indoprofen (PF2)	1,46	2,16	1,30	-		
flurbiprofen (PF3)	0,07			0,25		
tiaprofenová kyselina (PF4)	0,35			0,88	0,40	1,12
carprofen (PF5)	0,60			2,22	1,77	1,29
suprofen (PF6)	0,46			1,24		
ketoprofen (PF7)	0,22			0,60		
fenoprofen (PF8)	0,09			0,25		
propranolol (BB1)	1,04	3,74	2,79	-		
oxprenolol (BB2)	0,78	9,64	5,43	-		
metoprolol (BB3)	1,03	2,39	3,80	-		
metipranolol (BB4)	1,26			3,15	0,51	1,22
acebutolol (BB5)	3,79	0,41	1,29	-		
pindolol (BB6)	4,75	12,51	6,00	-		
bopindolol (BB7)	5,43	15,74	6,66	-		
atenolol (BB8)	6,44	1,86	1,84	-		
alprenolol (BB9)	0,34	3,33	3,13	-		
thioridazin (PH1)	5,03			3,43	0,22	1,12
promethazin (PH3)	1,63			4,18		
butizid (TD1)	2,94	4,50	1,87	-		
mefrusid (TD2)	2,51			8,82		
chlorthalidon (TD3)	4,99	0,91	1,16	26,51	0,42	1,09
trichlormethiazid (TD4)	5,54	1,33	1,18	-		
bendroflumethiazid (TD5)	3,91	2,03	1,27	-		

### 5.1.5. MOBILNÍ FÁZE S IPA/TFA JAKO ADITIVY

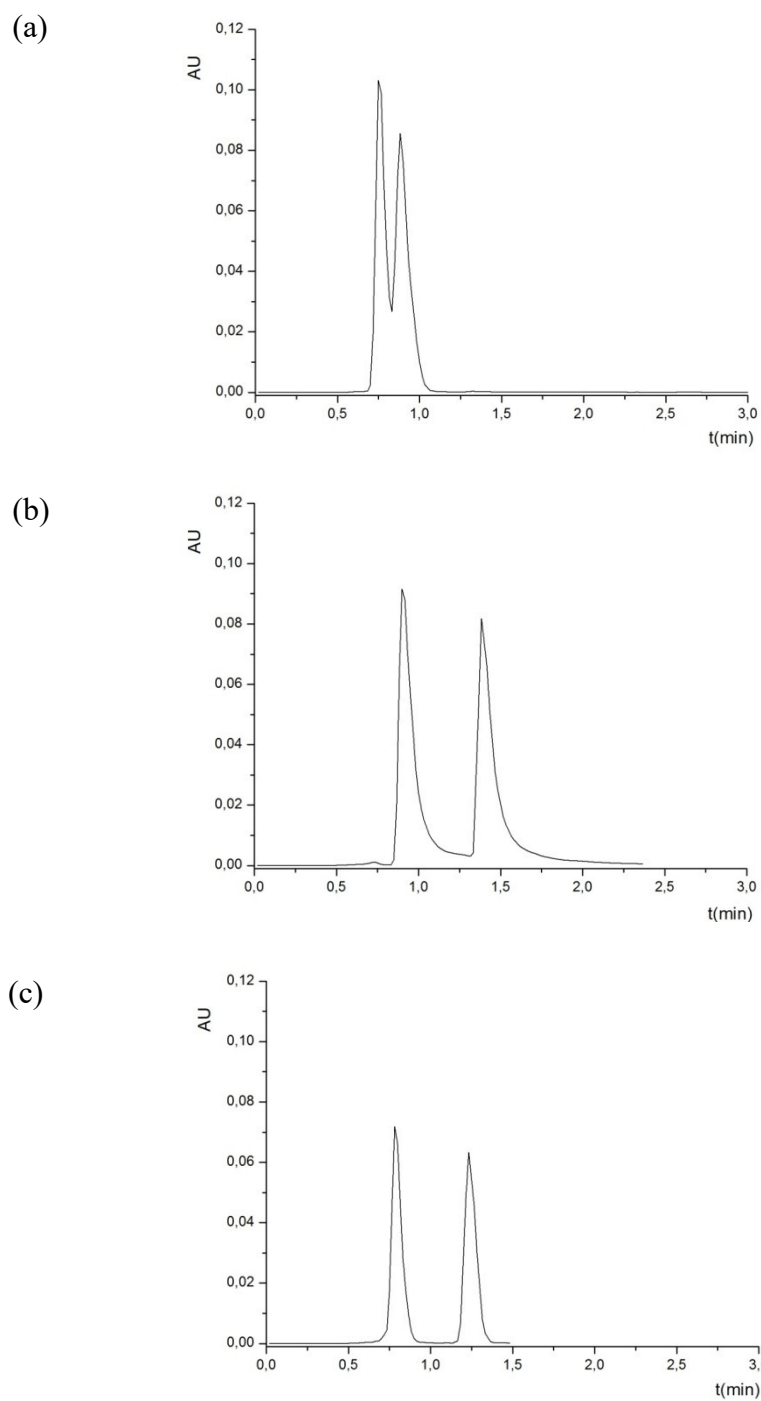
Jako poslední byla testována MF, kde byla použita kombinace bazického a kyselého aditiva a to IPA a TFA. Výsledky jsou uvedeny v tab. 5.5. Hodnoty rozlišení analytů, u kterých bylo dosaženo alespoň částečného rozdělení, jsou shrnuty v tab. 5.6. Tato kombinace se ukázala jako nejvhodnější, jelikož se separovalo na základní linii 14 z 24 analyzovaných látek. BB se podařilo separovat všechny bez výjimky, ze skupiny profenů pouze PF2 a PF5 a z thiazidových diuretik TD1 a TD5. Fenothiaziny neprojevily ani náznak dělení. Počty separovaných analytů v jednotlivých MF jsou vyobrazeny na obr. 5.1. Porovnání vlivu aditiva na separaci je vidět na obr. 5.2, kde jsou ukázány chromatogramy vzorku BB9.



Obr. 5.1 Graf znázorňující počet analytů separovaných na základní linii v MF s různými aditivy. Separace byly provedeny v HPLC systému, byla použita kolona na bázi celulosy derivatizované tris(3,5-dimethylfenylkarbamátem), termostatována na 35 °C. Průtok MF byl 1,8 ml/min.

Tab. 5.5 Výsledky měření v HPLC systému o složení MF HEX/PrOH/IPA/TFA.

analyty	80/20/0,1 (v/v/v)			90/10/0,1 (v/v/v)		
	k <sub>1</sub>	R <sub>1,2</sub>	α	k <sub>1</sub>	R <sub>1,2</sub>	α
ibuprofen (PF1)	-			0,03		
indoprofen (PF2)	1,42	1,84	1,29	2,84	0,57	1,07
flurbiprofen (PF3)	0,09			0,24		
tiaprofenová kyselina (PF4)	0,36			0,84	0,31	1,09
carprofen (PF5)	0,57	1,06	1,32	1,88	1,51	1,28
suprofen (PF6)	0,45			1,04	0,28	1,06
ketoprofen (PF7)	0,22			0,55		
fenoprofen (PF8)	0,10			0,25		
propranolol (BB1)	0,67	8,55	3,44	-		
oxprenolol (BB2)	0,45	10,66	8,17	-		
metoprolol (BB3)	0,36	9,63	7,50	1,10	13,32	6,57
metipranolol (BB4)	0,28	0,47	1,63	1,13	1,77	1,46
acebutolol (BB5)	2,01	1,39	1,33	10,10	2,10	1,30
pindolol (BB6)	2,90	19,56	8,49	-		
bopindolol (BB7)	3,94	19,67	8,24	-		
atenolol (BB8)	3,48	1,79	1,28	16,57	2,25	1,26
alprenolol (BB9)	0,18	3,78	4,75	-		
thioridazin (PH1)	1,07			2,76		
promethazin (PH3)	0,81			2,27		
butizid (TD1)	2,55	3,90	1,85	-		
mefrusid (TD2)	2,39			7,69		
chlorthalidon (TD3)	4,48	0,38	1,10	20,78	0,33	1,09
trichlormethiazid (TD4)	4,73	1,24	1,17	28,52	1,37	1,17
bendroflumethiazid (TD5)	3,46	1,85	1,27	20,28	2,26	1,29



Obr. 5.2 Chromatogramy separace vzorku BB9 v HPLC systému o složení MF 80/20/0,1 (v/v/v) HEX/PrOH/IPA (a), 80/20/0,1 (v/v/v) HEX/PrOH/TFA (b) a 80/20/0,1 (v/v/v) HEX/PrOH/IPA/TFA (c). Kolona termostatována na 35 °C, průtok MF byl 1,8 ml/min.

Tab. 5.6 Přehled rozlišení analytů, u kterých se objevily alespoň známky separace nebo se je podařilo separovat na základní linii. Separace byly provedeny v HPLC systému o složení MF HEX/PrOH/aditivum (v/v/v). Byla použita kolona na bázi celulosy derivatizované tris(3,5-dimethylfenylylkarbamátem), termostatována na 35 °C. Průtok MF byl 1,8 ml/min.

analyty	HEX/PrOH/IPA		HEX/PrOH/DEA		HEX/PrOH/TEA		HEX/PrOH/TFA		HEX/PrOH/IPA/TFA	
	R <sub>1,2</sub>	R <sub>1,2</sub>	R <sub>1,2</sub>	R <sub>1,2</sub>	R <sub>1,2</sub>	R <sub>1,2</sub>	R <sub>1,2</sub>	R <sub>1,2</sub>	R <sub>1,2</sub>	R <sub>1,2</sub>
ibuprofen (PF1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
indoprofen (PF2)	1,85	2,12	0,12	0,48	0,28	0,18	2,16	-	1,84	0,57
flurbiprofen (PF3)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
tiaprofenová kyselina (PF4)	-	0,12	-	-	-	-	-	0,40	-	0,31
carprofen (PF5)	0,21	0,25	-	-	-	0,14	-	1,77	1,06	1,51
suprofen (PF6)	-	0,08	-	-	-	-	-	-	-	0,28
ketoprofen (PF7)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
fenoprofen (PF8)	-	0,14	-	-	-	-	-	-	-	-
propranolol (BB1)	1,88	4,04	2,10	-	1,51	2,37	3,74	-	8,55	-
oxprenolol (BB2)	5,03	-	4,89	-	3,98	-	9,64	-	10,66	-
metoprolol (BB3)	1,89	3,83	1,49	2,34	0,88	1,33	2,39	-	9,63	13,32
metipranolol (BB4)	-	-	-	-	-	-	-	0,51	0,47	1,77
acebutolol (BB5)	-	-	-	-	-	-	0,41	-	1,39	2,10
pindolol (BB6)	13,10	-	14,43	-	7,45	-	12,51	-	19,56	-
bopindolol (BB7)	18,96	-	18,38	-	10,01	-	15,74	-	19,67	-
atenolol (BB8)	2,79	-	2,73	-	1,40	1,32	1,86	-	1,79	2,25
alprenolol (BB9)	0,97	1,23	1,04	1,92	1,11	1,72	3,33	-	3,78	-
thioridazin (PH1)	-	-	-	-	-	-	-	0,22	-	-
promethazin (PH3)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
butizid (TD1)	4,06	-	4,01	-	4,07	-	4,50	-	3,90	-
mefrusid (TD2)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
chlorthalidon (TD3)	0,91	-	0,70	-	0,92	-	0,91	0,42	0,38	0,33
trichlormethiazid (TD4)	-	-	0,15	-	0,30	-	1,33	-	1,24	1,37
bendroflumethiazid (TD5)	1,78	1,69	1,56	1,68	1,70	-	2,03	-	1,85	2,26

## 5.2. ENANTIOSELEKTIVNÍ SEPARACE V SFC SYSTÉMU

Detailněji bylo studováno retenční chování a separace v SFC systému, jelikož je to nová metoda v naší laboratoři a všeobecně méně prozkoumané prostředí. Při měření v SFC systému byly testovány MF, u kterých se měnil jak modifikátor, tak přidané aditivum. Všechny ostatní podmínky separačního systému zůstaly neměnné. Složení studovaných MF je již uvedeno v tabulce 4.2 na straně 24.

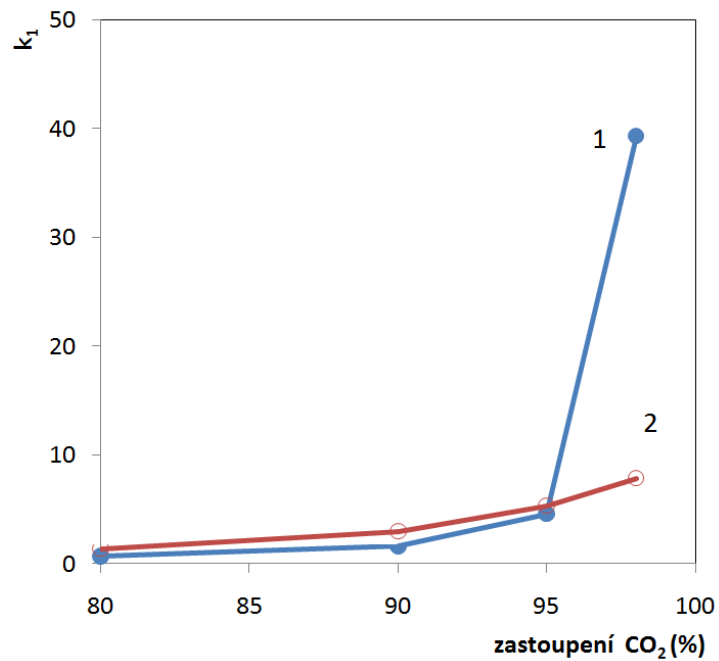
### 5.2.1. MOBILNÍ FÁZE S MODIFIKÁTOREM MEOH

#### 5.2.1.1. Mobilní fáze s IPA jako aditivem

Výsledky jsou shrnuty v tabulce 5.7. Pro skupinu BB se ukázalo použití IPA ve-lice vhodné. Už při nejnižším zastoupení MeOH v MF, tedy při 20%, se podařilo separovat sedm analytů s vysokými hodnotami rozlišení (1,63- 16,70). Zbývající dva analyty se následně separovaly na základní linii při snížení zastoupení MeOH na 10%.

Ze skupiny profenů se podařilo separovat pouze čtyři z osmi vzorků. Dva již při 20% zastoupení MeOH, jeden při snížení obsahu MeOH na 5% a poslední až při pouhých 2%. Posledním ze separovaných vzorků byl fenoprofen. Závislost jeho retenčního faktoru na obsahu MeOH resp. CO<sub>2</sub> v mobilní fázi v porovnání s promethazinem lze vidět na obr. 5.3.

Pro analyty ze skupiny thiazidových diuretik byly získány separace na základní linii pro všechny až na mefrusid, který nejevil žádné známky dělení ani při zastoupení MeOH v pouhých 2%. U fenothiazinů byly pozorovány náznaky dělení, avšak žádný z nich se nepodařilo separovat až na základní linii. Všeobecným trendem mezi analyty je zvyšování rozlišení se zvyšujícím se zastoupením CO<sub>2</sub> v MF. Výjimkou je zde promethazin, který poskytl nejvyšší rozlišení v MF se zastoupením 95% CO<sub>2</sub>. Avšak při zvýšení obsahu CO<sub>2</sub> na 98% rozlišení pokleslo, i když retence se prodloužila. Zhoršil se také tvar píku.



Obr. 5.3 Závislost retenčního faktoru na obsahu CO<sub>2</sub> v mobilní fázi pro zástupce fenopropfen (1) a zástupce fenothiazinů- promethazin (2). Separace probíhaly v SFC systému, byla použita kolona na bázi celulosy derivatizované tris(3,5-dimethylfenylkarbamátem), která byla termostatována na 35 °C. Průtok MF byl 2,5 ml/min.

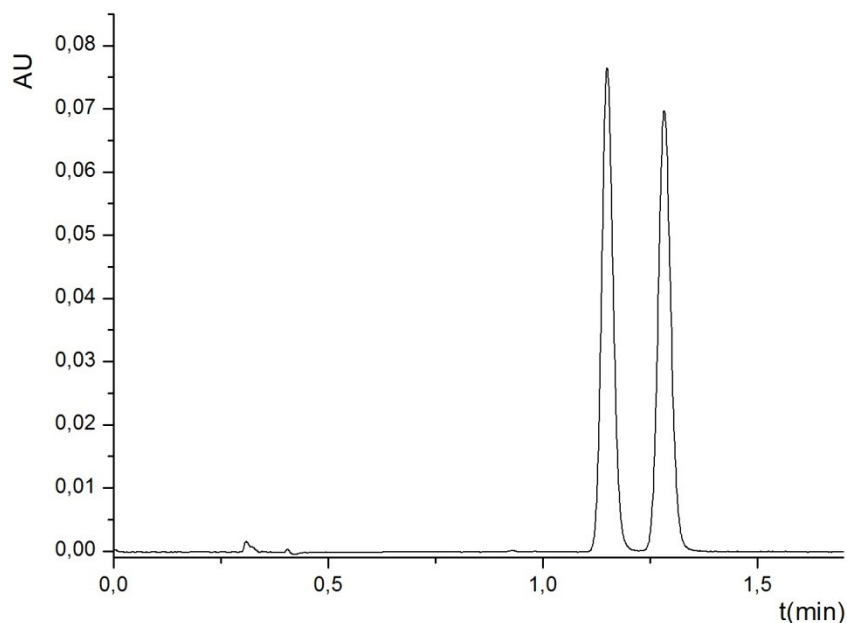
Tab. 5.7 Výsledky měření v SFC systému o složení MF CO<sub>2</sub>/MeOH/TPA.

analyty	80/20/0,1 (v/v/v)			90/10/0,1 (v/v/v)			95/5/0,1 (v/v/v)			98/2/0,1 (v/v/v)		
	k <sub>1</sub>	R <sub>1,2</sub>	α	k <sub>1</sub>	R <sub>1,2</sub>	α	k <sub>1</sub>	R <sub>1,2</sub>	α	k <sub>1</sub>	R <sub>1,2</sub>	α
ibuprofen (PF1)	0,33			0,71			1,83			12,67		
indoprofen (PF2)	2,79	2,95	1,17	10,79	5,10	1,24	45,81	7,02	1,32	-		
flurbiprofen (PF3)	0,75			1,82			5,26	0,83	1,04	45,16	1,34	1,06
tiaprofenová kyselina (PF4)	1,04			3,47	0,81	1,05	13,98	1,34	1,06	137,45	1,30	1,06
carprofen (PF5)	4,44	2,20	1,12	16,62	2,70	1,12	59,43	3,40	1,15	-		
suprofen (PF6)	1,27	0,39	1,05	3,94	1,40	1,07	14,56	1,91	1,08	135,86	1,29	1,07
ketoprofen (PF7)	0,75			2,09			6,97			65,76	0,21	1,01
fenoprofen (PF8)	0,68			1,62			4,57			39,30	1,56	1,27
propranolol (BB1)	2,14	6,01	1,56	6,72	6,67	1,49	23,63	5,79	1,44	-		
oxprenolol (BB2)	0,75	4,58	1,69	2,11	7,55	1,74	6,71	8,84	1,77	-		
metoprolol (BB3)	0,68	5,63	2,09	2,04	9,98	2,16	6,66	12,09	2,18	-		
metipranolol (BB4)	0,52	0,52	1,12	1,60	1,73	1,17	5,33	2,59	1,17	-		
acebutolol (BB5)	1,62	0,79	1,10	9,25	1,92	1,13	68,43	2,76	1,12	-		
pindolol (BB6)	3,53	16,70	3,17	18,33	18,16	2,95	-			-		
bopindolol (BB7)	2,27	3,54	1,43	10,06	4,78	1,29	35,23	5,47	1,32	-		
atenolol (BB8)	2,50	6,54	1,65	14,25	9,89	1,64	-			-		
alprenolol (BB9)	0,55	1,63	1,29	1,59	3,37	1,30	4,26	4,46	1,31	-		
thioridazin (PH1)	3,34	0,51	1,03	10,44	0,81	1,04	28,65	0,95	1,05	-		
promethazin (PH3)	1,39	0,43	1,05	2,99	0,98	1,05	5,34	1,22	1,06	7,84	1,07	1,06
butizid (TD1)	3,11	6,98	1,57	22,40	10,77	1,68	-			-		
mefrusid (TD2)	2,14			7,46			25,06			-		
chlorthalidon (TD3)	4,86	2,84	1,17	30,27	3,85	1,19	-			-		
trichlormethiazid (TD4)	5,57	2,45	1,15	41,39	3,56	1,16	-			-		
bendroflumethiazid (TD5)	3,98	1,48	1,10	27,28	1,90	1,09	-			-		

### 5.2.1.2. Měření v MF s DEA jako aditivem

Výsledky jsou shrnuty v tabulce 5.8. Skupinu BB se podařilo separovat na jednotlivé enantiomery u všech vzorků. Získané výsledky jsou velice podobné předchozím s aditivem IPA. Nejdelší retenci a nejvyšší rozlišení lze pozorovat u vzorku pindololu, naopak nejnižší afinitu k SF a též nejnižší rozlišení vykazoval vzorek metipranololu.

Pro skupinu profenů použití DEA nepřineslo tak dobré výsledky jako IPA. Na základní linii se separovaly pouze tři z osmi analytů. Lze také pozorovat značné snížení retenčních časů u většiny analytů oproti předchozímu aditivu. Příklad separace indoprofenu je vidět na obr. 5.4. Pro thiazidová diuretika jsou získané výsledky velice podobné výsledkům s IPA aditivem, nedošlo ani k výraznému prodloužení retenčních časů jako u profenů. Vzorky fenothiazinů se podařilo separovat s rozlišením 1,03-1,17.



Obr. 5.4 Chromatogram separace vzorku PF2 v SFC systému o složení MF 80/20/0,1 (v/v/v) CO<sub>2</sub>/MeOH/DEA. Kolona termostatována na 35 °C, průtok MF byl 2,5 ml/min.

Tab. 5.8 Výsledky měření v SFC systému o složení MF CO<sub>2</sub>/MeOH/DEA.

analyty	80/20/0,1 (v/v/v)			90/10/0,1 (v/v/v)			95/5/0,1 (v/v/v)			98/2/0,1 (v/v/v)		
	k <sub>1</sub>	R <sub>1,2</sub>	α	k <sub>1</sub>	R <sub>1,2</sub>	α	k <sub>1</sub>	R <sub>1,2</sub>	α	k <sub>1</sub>	R <sub>1,2</sub>	α
ibuprofen (PF1)	0,31			0,94			1,96			6,00		
indoprofen (PF2)	2,72	2,57	1,16	9,43	3,55	1,16	36,76	3,89	1,16	-		
flurbiprofen (PF3)	0,72			1,88			4,11	1,06	1,05	20,14	2,14	1,10
tiaprofenová kyselina (PF4)	0,94			2,86			9,78			59,15		
carprofen (PF5)	4,16	1,64	1,09	13,89	1,87	1,08	50,54	1,45	1,06	-		
suprofen (PF6)	1,20	0,32	1,06	3,44	1,09	1,06	11,22	1,31	1,06	73,33	0,95	1,04
ketoprofen (PF7)	0,71			1,85			5,41			29,47		
fenoprofen (PF8)	0,66			1,45			3,69			17,73		
propranolol (BB1)	2,06	5,63	1,53	7,07	7,01	1,53	25,03	6,21	1,46	-		
oxprenolol (BB2)	0,70	4,43	1,73	2,19	7,84	1,77	7,15	9,17	1,81	-		
metoprolol (BB3)	0,64	5,92	2,18	2,11	10,52	2,20	7,04	13,88	2,25	-		
metipranolol (BB4)	0,50	0,52	1,16	1,65	1,72	1,17	5,63	2,54	1,17	-		
acebutolol (BB5)	1,57	0,79	1,11	9,57	1,80	1,13	70,69	2,33	1,13	-		
pindolol (BB6)	3,50	15,39	3,04	19,26	18,59	3,09	-			-		
bopindolol (BB7)	2,50	3,42	1,26	10,17	4,91	1,30	36,00	5,44	1,32	-		
atenolol (BB8)	2,45	6,10	1,65	14,83	9,57	1,66	-			-		
alprenolol (BB9)	0,52	1,69	1,31	1,52	3,33	1,32	4,44	4,34	1,32	-		
thionidazin (PH1)	3,23	0,54	1,06	10,36	0,85	1,04	30,07	0,94	1,04	-		
promethazin (PH3)	1,32	0,40	1,05	2,93	1,01	1,06	5,47	1,29	1,06	-		
butizid (TD1)	3,06	6,88	1,60	21,56	10,63	1,68	-			-		
mefrusid (TD2)	2,08			7,43			25,80			-		
chlorthalidon (TD3)	4,87	2,94	1,18	30,18	4,00	1,19	-			-		
trichlormethiazid (TD4)	5,59	2,43	1,14	39,84	3,49	1,16	-			-		
bendroflumethiazid (TD5)	3,98	1,37	1,09	26,74	1,99	1,09	-			-		

### 5.2.1.3. Měření v MF s TEA jako aditivem

Výsledky jsou shrnuty v tabulce 5.9. TEA je prvním aditivem v systému SFC, při jehož použití nedošlo k separaci všech BB. Konkrétně v případě acebutololu se objevily náznaky dělení, ale ne až na základní linii. Ani pro profeny se TEA příliš neosvědčil. S jeho použitím se podařilo separovat pouze dva z osmi analytů. Pozorujeme zde také značné prodloužení retencí ovšem bez přínosu vyššího rozlišení.

Pro thiazidová diuretika jsou výsledky opět velice podobné předchozím aditivům, separovaly se čtyři z pěti analytů. Hodnoty rozlišení 1,42 se podařilo dosáhnout u promethazinu.

Tab. 5.9 Výsledky měření v SFC systému o složení MF CO<sub>2</sub>/MeOH/TEA.

analyty	80/20/0,1 (v/v/v)			90/10/0,1 (v/v/v)			95/5/0,1 (v/v/v)			98/2/0,1 (v/v/v)		
	k <sub>1</sub>	R <sub>1,2</sub>	α	k <sub>1</sub>	R <sub>1,2</sub>	α	k <sub>1</sub>	R <sub>1,2</sub>	α	k <sub>1</sub>	R <sub>1,2</sub>	α
ibuprofen (PF1)	0,35			0,72			1,78			7,58		
indoprofen (PF2)	3,00	2,33	1,14	11,06	2,84	1,13	47,61	2,54	1,11	-		
flurbiprofen (PF3)	0,82			2,00			5,41	0,85	1,05	28,13	1,57	1,07
tiaprofenová kyselina (PF4)	1,22			4,00			15,70			-		
carprofen (PF5)	4,63	1,29	1,08	16,99	1,25	1,06	73,30	0,42	1,02	-		
suprofen (PF6)	1,38	0,36	1,05	4,25	0,96	1,05	14,95	1,09	1,05	106,15	0,93	1,04
ketoprofen (PF7)	0,81			2,24			7,16			25,47		
fenoprofen (PF8)	0,73			1,73			4,63			23,92		
propranolol (BB1)	2,21	4,60	1,52	7,87	6,30	1,54	30,75	5,65	1,47	-		
oxprenolol (BB2)	0,76	3,79	1,68	2,39	6,77	1,75	7,96	8,19	1,79	-		
metoprolol (BB3)	0,71	4,95	2,11	2,35	9,61	2,22	8,22	11,82	2,27	-		
metipranolol (BB4)	0,50	0,61	1,28	1,86	1,47	1,16	6,67	2,30	1,17	-		
acebutolol (BB5)	1,75	0,36	1,09	10,80	1,11	1,12	-			-		
pindolol (BB6)	3,81	12,42	2,97	21,55	17,97	3,10	-			-		
bopindolol (BB7)	2,59	3,36	1,26	10,38	5,02	1,30	34,86	5,30	1,31	-		
atenolol (BB8)	2,71	4,07	1,61	2,71	4,07	1,61	-			-		
alprenolol (BB9)	0,59	1,39	1,29	1,71	2,89	1,32	5,18	3,91	1,32	-		
thioridazin (PH1)	3,27	0,37	1,03	10,30	0,86	1,04	29,49	0,99	1,04	-		
promethazin (PH3)	1,35	0,27	1,05	2,94	1,01	1,05	5,41	1,32	1,07	10,29	1,42	1,07
butizid (TD1)	3,13	6,68	1,59	22,56	10,81	1,67	-			-		
mefrusid (TD2)	2,09			7,46			26,31			-		
chlorthalidon (TD3)	4,98	2,89	1,18	31,96	3,89	1,19	-			-		
trichlormethiazid (TD4)	5,75	2,38	1,15	42,06	3,49	1,16	-			-		
bendroflumethiazid (TD5)	4,40	1,34	1,07	28,34	2,07	1,09	-			-		

#### 5.2.1.4. Měření v MF s TFA jako aditivem

Výsledky jsou shrnuty v tabulce 5.10. Jako jediné nebazické, tedy kyselé aditivum, byla použita kyselina trifluoroctová. Ze skupiny BB se podařilo na základní linii rozdělit pouze pět z devíti analytů. Dosažená rozlišení jsou znatelně nižší, než např. v MF s aditivem IPA. Na skupinu profenů nemělo použití TFA oproti předchozím aditivům také žádný kladný vliv. Podařilo se separovat pouze dva z osmi analytů a opět s nižšími hodnotami rozlišení než v MF s IPA.

Pro skupinu fenothiazinů se nepodařilo získat ani nejmenší náznaky dělení u žádného z analytů. Ze skupiny thiazidových diuretik se podařilo rozdělit pouze tři z pěti analytů.

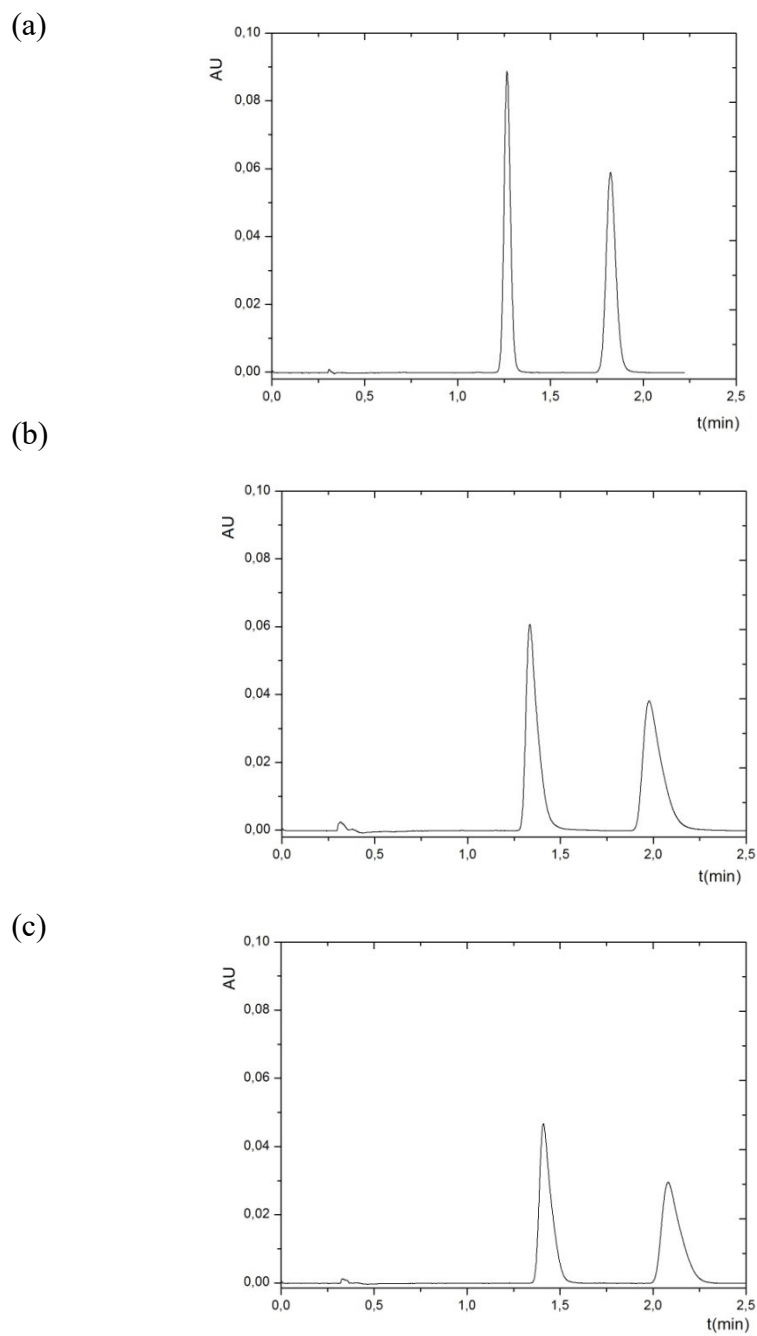
Tab. 5.10 Výsledky měření v SFC systému o složení MF CO<sub>2</sub>/MeOH/TFA.

analyty	80/20/0,1 (v/v/v)			90/10/0,1 (v/v/v)			95/5/0,1 (v/v/v)			98/2/0,1 (v/v/v)		
	k <sub>1</sub>	R <sub>1,2</sub>	α	k <sub>1</sub>	R <sub>1,2</sub>	α	k <sub>1</sub>	R <sub>1,2</sub>	α	k <sub>1</sub>	R <sub>1,2</sub>	α
ibuprofen (PF1)	0,33			0,78			1,62			4,94		
indoprofen (PF2)	3,21	1,86	1,19	13,30	2,58	1,20	-			-		
flurbiprofen (PF3)	0,81			2,07			4,53			15,16	0,15	1,03
tiaprofenová kyselina (PF4)	1,27			3,92	0,13	1,05	11,36	0,13	1,05	56,94	0,84	1,06
carprofen (PF5)	5,41	1,37	1,12	24,44	1,62	1,12	-			-		
suprofen (PF6)	1,39	0,11	1,07	4,53	0,85	1,08	13,05	1,04	1,09	62,76	1,44	1,10
ketoprofen (PF7)	0,81			2,37			6,15			27,62		
fenoprofen (PF8)	0,72			1,88			4,21			16,45		
propranolol (BB1)	1,82	1,83	1,62	11,03	3,17	1,54	-			-		
oxprenolol (BB2)	0,65	1,64	1,70	3,43	1,63	1,56	13,30	2,36	1,70	-		
metoprolol (BB3)	0,62	2,67	2,20	3,50	2,52	2,12	14,63	3,44	1,89	-		
metipranolol (BB4)	0,52			2,79	0,14	1,17	11,33	0,14	1,22	-		
acebutolol (BB5)	1,59			17,34	0,42	1,24	-			-		
pindolol (BB6)	3,95	3,98	2,45	-			-			-		
bopindolol (BB7)	4,44	2,55	2,48	-			-			-		
atenolol (BB8)	2,98	1,38	1,48	8,53	0,23	1,25	-			-		
alprenolol (BB9)	0,52	0,08	1,19	2,40	0,82	1,26	8,03	1,31	1,35	-		
thioridazin (PH1)	3,63			17,80			-			-		
promethazin (PH3)	1,72			7,38			30,75			-		
butizid (TD1)	3,34	4,45	1,62	27,58	6,07	1,71	-			-		
mefrusid (TD2)	2,14			8,61			33,40			-		
chlorthalidon (TD3)	5,28	1,82	1,18	37,83	2,32	1,20	-			-		
trichlormethiazid (TD4)	6,25	1,47	1,15	52,59	1,96	1,16	-			-		
bendroflumethiazid (TD5)	4,37	0,74	1,08	34,50	1,09	1,09	-			-		

#### 5.2.1.5. Měření v MF s IPA/TFA jako aditivy

Výsledky jsou shrnuty v tabulce 5.11. Jako poslední varianta byla testována kombinace bazického a kyselého aditiva v MF. V této MF se podařilo separovat na základní linii všechny analyty ze skupiny BB, i když některé až v MF se zastoupením CO<sub>2</sub> 90%. Profeny se podařilo separovat pouze dva a u jednoho dosáhnout téměř separace na základní linii.

U promethazinu bylo dosaženo pouze částečné separace. Ze skupiny TD se separovat podařilo pouze tři z pěti zástupců. V porovnání s MF, kde aditivem byl pouze IPA, se tato kombinace nejeví přínosnější. Výsledky a porovnání separace vzorku butizidu v MF s aditivem IPA, TFA a kombinací IPA/TFA lze vidět na obr. 5.5.



Obr. 5.5 Porovnání separace butizidu (TD1) s aditivou IPA (a), TFA (b), a IPA/TFA (c). Měření v SFC systému o složení MF 80/20/0,1 (v/v/v)  $\text{CO}_2/\text{MeOH}/\text{X}$ . Kolona termostavována na 35 °C, průtok MF byl 2,5 ml/min.

Tab. 5.11 Výsledky měření v SFC systému o složení MF CO<sub>2</sub>/MeOH/TPA/TFA.

analyty	80/20/0,1 (v/v/v)			90/10/0,1 (v/v/v)			95/5/0,1 (v/v/v)			98/2/0,1 (v/v/v)		
	k <sub>1</sub>	R <sub>1,2</sub>	α	k <sub>1</sub>	R <sub>1,2</sub>	α	k <sub>1</sub>	R <sub>1,2</sub>	α	k <sub>1</sub>	R <sub>1,2</sub>	α
ibuprofen (PF1)	0,44			0,89			1,80			4,93		
indoprofen (PF2)	3,62	1,98	1,18	14,11	2,91	1,20	54,47	3,34	1,23	-		
flurbiprofen (PF3)	0,98			2,24			5,01			15,83		
tiaprofenová kyselina (PF4)	1,49			4,22	0,52	1,04	12,24	0,67	1,05	51,30	0,23	1,04
carprofen (PF5)	5,95	1,44	1,11	25,24	1,87	1,12	108,72	1,94	1,11	-		
suprofen (PF6)	1,64	0,69	1,06	4,88	0,98	1,07	13,89	1,23	1,09	56,15	1,25	1,08
ketoprofen (PF7)	0,98			2,59			6,65			24,54		
fenoprofen (PF8)	0,90			2,04			4,79			14,45		
propranolol (BB1)	1,55	4,81	1,73	5,39	7,56	1,85	18,05	8,67	1,90	-		
oxprenolol (BB2)	0,61	2,60	1,67	1,84	5,85	1,84	5,51	8,49	1,99	-		
metoprolol (BB3)	0,56	3,86	2,25	1,84	8,54	2,53	5,59	13,76	2,81	-		
metipranolol (BB4)	0,42	0,79	1,23	1,41	1,73	1,25	4,30	2,80	1,30	-		
acebutolol (BB5)	1,15	0,72	1,15	7,01	2,03	1,19	47,64	2,67	1,22	-		
pindolol (BB6)	2,94	12,00	3,24	16,46	1,65	3,61	-			-		
bopindolol (BB7)	2,61	1,20	1,13	13,77	2,66	1,22	62,96	5,15	1,46	-		
atenolol (BB8)	2,14	4,55	1,68	14,04	8,25	1,78	-			-		
alprenolol (BB9)	0,43	1,08	1,45	1,29	2,77	1,50	3,39	4,72	1,54	-		
thioridazin (PH1)	2,76			9,51			34,04	0,51	1,04	-		
promethazin (PH3)	1,31			3,83	0,64	1,03	11,94	0,97	1,03	-		
butizid (TD1)	3,57	4,48	1,61	26,60	6,55	1,71	-			-		
mefrusid (TD2)	2,39			8,73			33,31			-		
chlorthalidon (TD3)	5,72	1,81	1,18	37,26	2,60	1,20	-			-		
trichlormethiazid (TD4)	6,67	1,49	1,14	51,33	2,19	1,17	-			-		
bendroflumethiazid (TD5)	4,72	0,76	1,08	34,22	1,22	1,08	-			-		

### 5.2.2. MOBILNÍ FÁZE S MODIFIKÁTOREM PROH

V systému SFC byly testovány nejen mobilní fáze s různými aditivami, ale také s dvěma různými modifikátory. Těmito modifikátory byly MeOH a PrOH. Pro každý z těchto modifikátorů byla provedena měření se všemi variacemi aditiv.

#### 5.2.2.1. Měření v MF s IPA jako aditivem

Výsledky jsou shrnuty v tabulce 5.12. Toto složení MF se již při prvních výsledcích zdálo jako velice vhodné. Ve skupině BB se podařilo rozdělit na základní linii sedm z devíti analytů v zastoupení CO<sub>2</sub> v MF při pouhých 80%. Retence analytů v porovnání s retencemi v MF, kde byl jako modifikátor použit MeOH, jsou značně zvýšené.

Ze skupiny profenů byly separace úspěšné u čtyř z osmi analytů. Dva vzorky se separovaly při zastoupení CO<sub>2</sub> 80%, jeden při jeho zvýšení na 90% a poslední analyt dosáhl základní linie až při zvýšení obsahu CO<sub>2</sub> na 95%. V porovnání s MF, kde byl modifikátorem MeOH, se vzorky podařilo separovat snáze, nebylo zapotřebí zvyšovat zastoupení CO<sub>2</sub> na 98% a čelit tak s tím spojeným nárůstem retence.

Thiazidová diuretika se podařilo separovat na základní linii tři z pěti a to již při zastoupení 80% CO<sub>2</sub>. Jeho zvyšování nepřineslo žádné pozitivní výsledky s ohledem na separaci této skupiny analytů. Oproti MF s MeOH se zde nepodařilo rozdělit vzorek TD3, který dosáhl rozlišení pouze na hodnotu 1,04. Co se fenothiazinů týká, nejlepší separace bylo dosaženo pro promethazin, který při 90% zastoupením CO<sub>2</sub> vykazoval rozlišení 1,19.

Všeobecným trendem u všech analytů je zvyšování retence s rostoucím zastoupením CO<sub>2</sub> jako nepolární složky MF. Zvyšování retence je většinou doprovázeno i nárůstem rozlišení, stejně jako u předchozího modifikátoru, nemusí tomu však být vždy (např. v případě BB1).

Tab. 5.12 Výsledky měření v SFC systému o složení MF CO<sub>2</sub>/PrOH/IPA.

analyty	80/20/0,1 (v/v/v)			90/10/0,1 (v/v/v)			95/5/0,1 (v/v/v)			98/2/0,1 (v/v/v)		
	k <sub>1</sub>	R <sub>1,2</sub>	α	k <sub>1</sub>	R <sub>1,2</sub>	α	k <sub>1</sub>	R <sub>1,2</sub>	α	k <sub>1</sub>	R <sub>1,2</sub>	α
ibuprofen (PF1)	0,42			1,71			8,46			-		
indoprofen (PF2)	6,64	4,95	1,34	-			-			-		
flurbiprofen (PF3)	1,06			4,50	1,09	1,07	25,43	1,63	1,09	-		
tiaprofenová kyselina (PF4)	2,82	1,01	1,09	4,53	1,15	1,07	-			-		
carprofen (PF5)	6,91	2,62	1,18	9,94	1,65	1,06	-			-		
suprofen (PF6)	2,33	1,04	1,08	12,24	4,50	1,00	-			-		
ketoprofen (PF7)	1,36			6,56			38,74	0,79	1,04	-		
fenoprofen (PF8)	0,97			4,15			22,43	1,05	1,06	-		
propranolol (BB1)	3,39	4,30	1,41	12,35	4,24	1,40	-			-		
oxprenolol (BB2)	1,21	8,82	2,50	3,88	9,65	2,64	-			-		
metoprolol (BB3)	1,12	7,93	2,51	3,79	8,76	2,62	-			-		
metipranolol (BB4)	0,91	1,28	1,17	3,15	2,00	1,19	-			-		
acebutolol (BB5)	5,76	1,37	1,13	-			-			-		
pindolol (BB6)	8,06	10,31	3,11	-			-			-		
bopindolol (BB7)	10,48	14,32	4,07	-			-			-		
atenolol (BB8)	8,48	6,55	1,66	-			-			-		
alprenolol (BB9)	0,82	4,19	1,59	2,47	5,73	1,63	-			-		
thioridazin (PH1)	3,97	0,31	1,03	10,56	0,85	1,04	-			-		
promethazin (PH3)	1,36	0,34	1,04	2,65	1,19	1,07	-			-		
butizid (TD1)	9,45	8,02	1,80	-			-			-		
mefrusid (TD2)	3,42			14,15			-			-		
chlorthalidon (TD3)	12,39	1,04	1,09	-			-			-		
trichlormethiazid (TD4)	15,64	2,63	1,19	-			-			-		
bendroflumethiazid (TD5)	9,39	2,44	1,18	-			-			-		

#### 5.2.2.2. Mobilní fáze s DEA jako aditivem

Výsledky jsou shrnuty v tabulce 5.13. Jako další aditivum byl zvolen stejně jako u předchozího modifikátoru (MeOH) DEA. Při separaci BB se podařilo rozdělit také sedm z devíti analytů. Pro vzorek BB4 bylo dosaženo rozlišení 1,47, tj. téměř na základní linii.

Kde se užití DEA nejeví jako nejvhodnější, je skupina profenů. Separovat enantiomery se podařilo pouze u vzorku PF2. Další analyty se se zvyšujícím se obsahem CO<sub>2</sub> začínaly separovat, ale byl překročen určený maximální čas eluce.

Výsledky pro thiazidová diuretika jsou velice podobné těm s IPA jako aditivem, a to jak vzhledem k retencím, tak k rozlišením. Separovat se podařilo tři z pěti analytů. Ani jeden z fenothiazinů se nepodařilo separovat na základní linii.

Tab. 5.13 Výsledky měření v SFC systému o složení MF CO<sub>2</sub>/PROH/DEA.

analyty	80/20/0,1 (v/v/v)			90/10/0,1 (v/v/v)			95/5/0,1 (v/v/v)			98/2/0,1 (v/v/v)		
	k <sub>1</sub>	R <sub>1,2</sub>	α	k <sub>1</sub>	R <sub>1,2</sub>	α	k <sub>1</sub>	R <sub>1,2</sub>	α	k <sub>1</sub>	R <sub>1,2</sub>	α
ibuprofen (PF1)	0,52			1,59			6,06					
indoprofen (PF2)	6,70	2,83	1,19	-			-			-		
flurbiprofen (PF3)	1,21			4,09	0,80	1,06	-			-		
tiaprofenová kyselina (PF4)	2,79			11,97	0,24	1,03	-			-		
carprofen (PF5)	6,97	1,28	1,09	-			-			-		
suprofen (PF6)	2,48	0,22	1,05	10,68	0,81	1,05	-			-		
ketoprofen (PF7)	1,48			5,76			26,85			-		
fenoprofen (PF8)	1,09			3,71			15,52			-		
propranolol (BB1)	3,55	4,16	1,41	12,79	3,75	1,36	-			-		
oxprenolol (BB2)	1,27	8,50		-			-			-		
metoprolol (BB3)	1,15	8,28		-			-			-		
metipranolol (BB4)	0,94	0,49		3,12	1,47	1,14	11,73	1,05	1,01	-		
acebutolol (BB5)	5,88	0,96		-			-			-		
pindolol (BB6)	8,06	9,60		-			-			-		
bopindolol (BB7)	10,82	13,91		-			-			-		
atenolol (BB8)	8,39	5,63		-			-			-		
alprenolol (BB9)	0,85	4,31		2,44	5,80	1,63	-			-		
thioridazin (PH1)	3,85	0,32	1,03	10,09	0,79	1,04	24,27	1,03	1,02	-		
promethazin (PH3)	1,33	0,38	1,05	2,62	1,17	1,06	-			-		
butizid (TD1)	9,24	7,90	1,78	-			-			-		
mefrusid (TD2)	3,39			14,35			-			-		
chlorthalidon (TD3)	12,36	0,94	1,07	-			-			-		
trichlormethiazid (TD4)	15,30	2,62	1,19	-			-			-		
bendroflumethiazid (TD5)	9,30	2,53	1,18	-			-			-		

### 5.2.2.3. Mobilní fáze s TEA jako aditivem

Výsledky jsou shrnuty v tabulce 5.14. Ve skupině BB se podařilo separovat sedm z devíti analyzovaných vzorků již v prvním objemovém zastoupení CO<sub>2</sub>, tj. 80%. Výměna DEA za TEA s sebou přinesla i prodloužení retenčních časů. Toto prodloužení je více znatelné u analytů s vyšším retenčním časem. U vzorku BB4 se podařilo dosáhnout rozlišení 1,05 a to v MF s obsahem CO<sub>2</sub> 95%. U vzorku BB5 se nepodařilo zaznamenat ani náznak separace.

Ze skupiny profenů proběhla separace na základní linii u dvou vzorků (PF2, PF5) a částečná separace také u dvou vzorků (PF3, PF6). I zde můžeme, stejně jako u předchozí skupiny BB, pozorovat prodloužení retenčních časů analytů oproti hodnotám v MF s DEA. Zajímavé je, že oproti separaci v MF s DEA, se u vzorku PF2 rozlišení téměř o jednotku snížilo, avšak u vzorku PF5 přibližně o jednotku zvýšilo.

Thiazidová diuretika se na základní linii separovala pouze tři z pěti. Z výsledků vyplývá, že změna aditiva zde žádný značný nárůst retence nepodmiňuje.

Pozitivní výsledky jsou vidět u separace promethazinu, který v MF se zastoupením CO<sub>2</sub> 98% dosáhl separace až na základní linii. Nejblíže tomuto rozdělení byla separace s modifikátorem MeOH a aditivem TEA. Lze tedy konstatovat, že TEA má pozitivní vliv na separaci promethazinu.

Tab. 5.14 Výsledky měření v SFC systému o složení MF CO<sub>2</sub>/PrOH/TEA.

analyty	80/20/0,1 (v/v/v)			90/10/0,1 (v/v/v)			95/5/0,1 (v/v/v)			98/2/0,1 (v/v/v)		
	k <sub>1</sub>	R <sub>1,2</sub>	α	k <sub>1</sub>	R <sub>1,2</sub>	α	k <sub>1</sub>	R <sub>1,2</sub>	α	k <sub>1</sub>	R <sub>1,2</sub>	α
ibuprofen (PF1)	0,25			0,29			0,56			-		
indoprofen (PF2)	8,13	1,76	1,14	42,62	1,66	1,13	-			-		
flurbiprofen (PF3)	1,53			5,06	0,13	1,04	20,28	0,70	1,06	-		
tiaprofenová kyselina (PF4)	4,66			22,76			-			-		
carprofen (PF5)	8,94	2,11	1,06	-			-			-		
suprofen (PF6)	3,38			13,82	0,26	1,04	-			-		
ketoprofen (PF7)	1,91			7,26			-			-		
fenoprofen (PF8)	1,31			4,24			16,66			-		
propranolol (BB1)	4,25	1,71	1,34	15,12	1,38	1,22	-			-		
oxprenolol (BB2)	1,50	4,68	2,29	4,32	5,02	2,20	-			-		
metoprolol (BB3)	1,47	3,63	2,26	-			-			-		
metipranolol (BB4)	1,34			3,82	0,35	1,12	14,00	1,05	0,91	-		
acebutolol (BB5)	8,22			-			-			-		
pindolol (BB6)	9,84	5,45	2,77	-			-			-		
bopindolol (BB7)	12,47	11,00	3,62	-			-			-		
atenolol (BB8)	10,38	1,83	1,56	-			-			-		
alprenolol (BB9)	1,09	1,94	1,43	2,82	2,20	1,48	-			-		
thioridazin (PH1)	3,94	0,22	1,03	10,12	0,45	1,04	24,00	0,85	1,05	-		
promethazin (PH3)	1,38	0,37	1,05	2,62	1,11	1,06	5,19	1,41	1,08	11,44	1,63	1,11
butizid (TD1)	9,84	7,83	1,78	-			-			-		
mefrusid (TD2)	3,56			14,62			-			-		
chlorthalidon (TD3)	13,28	0,90	1,07	-			-			-		
trichlormethiazid (TD4)	16,38	2,70	1,20	-			-			-		
bendroflumethiazid (TD5)	9,97	2,60	1,18	-			-			-		

#### 5.2.2.4. Mobilní fáze s TFA jako aditivem

Výsledky jsou shrnuty v tabulce 5.15. Použití toho kyselého aditiva má za následek separaci pouze pěti vzorků ze skupiny BB v MF s obsahem CO<sub>2</sub> 80%. Další dva analyty z této skupiny se podařilo separovat až při zvýšení obsahu CO<sub>2</sub> na 90% a u vzorku BB4 bylo dosaženo rozlišení 1,44. Porovnáme-li retence v této MF oproti předchozí MF s TEA, je vidět, že došlo k jejich dalšímu zvýšení. TFA tedy podporuje afinitu těchto analytů ke SF.

U skupiny profenů pozorujeme ohledně retence jev opačný. Všechny profeny mají v prostředí s TFA nižší retence v porovnání s bazickým TEA. To ukazuje na skutečnost, že potlačení disociace těchto kyselých analytů, vede k omezení jejich interakce s CSP. Nárůst retence je spojen s nárůstem rozlišení, což ukazuje na stereoselektivní interakce. V diskutované MF se podařilo separovat celkem 4 vzorky, z čehož 2 v MF s obsahem CO<sub>2</sub> 80%, jeden další při jeho zvýšení na 90% a poslední při dalším zvýšení na 95%.

Změna aditiva měla pozitivní efekt na separaci promethazinu. Již při měření s MF obsahující 80% CO<sub>2</sub> se podařilo separovat promethazin s vysokým rozlišením 8,54. Je však patrné, že jeho retence je oproti MF s TEA více než dvojnásobná.

Ve skupině thiazidových diuretik nedošlo k nárůstu retence, ani k zásadnímu zvýšení hodnot rozlišení. Separace bylo docíleno pouze u tří z pěti vzorků.

Tab. 5.15 Výsledky měření v SFC systému o složení MF CO<sub>2</sub>/PrOH/TFA.

analyty	80/20/0,1 (v/v/v)			90/10/0,1 (v/v/v)			95/5/0,1 (v/v/v)			98/2/0,1 (v/v/v)		
	k <sub>1</sub>	R <sub>1,2</sub>	α	k <sub>1</sub>	R <sub>1,2</sub>	α	k <sub>1</sub>	R <sub>1,2</sub>	α	k <sub>1</sub>	R <sub>1,2</sub>	α
ibuprofen (PF1)	0,34			0,76			0,94		-1,07			
indoprofen (PF2)	5,38	4,96	1,30	23,00	5,80	1,35	-					
flurbiprofen (PF3)	0,78			1,91	1,06	1,06	6,47	1,81	1,09			
tiaprofenová kyselina (PF4)	1,50	1,32	1,08	4,62	2,31	1,11	-					
carprofen (PF5)	5,47	3,81	1,21	-			-					
suprofen (PF6)	1,69	1,27	1,09	5,24	2,22	1,10	-					
ketoprofen (PF7)	0,97			2,74			-					
fenoprofen (PF8)	0,81			2,00	0,54	1,04	6,78	1,24	1,06			
propranolol (BB1)	4,66	1,16	1,99	15,38	4,33	2,23	-					
oxprenolol (BB2)	2,06	1,77	2,83	7,88	5,45	2,51	-					
metoprolol (BB3)	2,19	1,90	3,60	-			-					
metipranolol (BB4)	1,72			5,41	1,44	1,48	-					
acebutolol (BB5)	17,44			-			-					
pindolol (BB6)	14,00	3,77	2,98	-			-					
bopindolol (BB7)	17,19	6,23	3,31	-			-					
atenolol (BB8)	20,25	2,66	1,62	-			-					
alprenolol (BB9)	1,59	1,11	1,65	3,91	3,96	2,18	-					
thioridazin (PH1)	-			-			-					
promethazin (PH3)	4,22	8,54	1,70	-			-					
butizid (TD1)	10,03	7,92	1,82	-			-					
mefrusid (TD2)	3,66			15,82			-					
chlorthalidon (TD3)	13,47	0,98	1,08	-			-					
trichlormethiazid (TD4)	16,47	3,17	1,22	-			-					
bendroflumethiazid (TD5)	10,22	2,67	1,19	-			-					

#### 5.2.2.5. Mobilní fáze s kombinací IPA/TFA jako aditivu

Výsledky jsou shrnuty v tabulce 5.16. Posledním testovaným aditivem byla stejně jako v předchozích případech MF s přísadkou IPA i TFA. Co se skupiny BB týče, je z výsledků patrné, že tato volba přináší nejlepší výsledky. Již v prvním poměru s 80% CO<sub>2</sub> došlo k separaci všech vzorků ze skupiny, a to s extrémně vysokými hodnotami rozlišení, se kterými ovšem nepřichází žádný masivní nárůst retence. Separace tedy byly rychlé a účinné.

Pro separaci profenů nepřinesla tato kombinovaná aditiva žádné výjimečné výsledky. Tyto separace jsou velice podobné separacím s použitím samotné TFA, a to jak retencí, tak rozlišením. Rozdělit se podařilo čtyři z osmi vzorků.

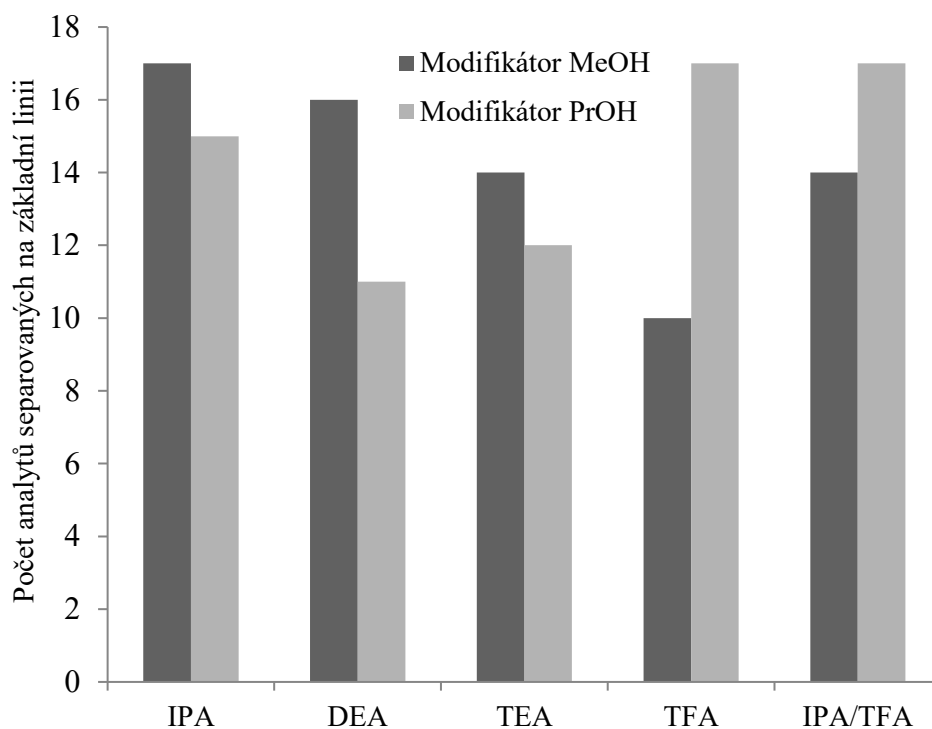
Výsledky pro skupinu thiazidových diuretik jsou opět velice podobné těm, které byly získány i pro předchozí aditivum. Separace na základní linii byla úspěšná pro tři z pěti analytů. Ze skupiny fenothiazinů se nepodařilo rozdělit žádný ze vzorků. Analýza promethazinu nebyla vůbec uspokojivá, jelikož vzorek se ve velké míře rozmýval.

Tab. 5.16 Výsledky měření v SFC systému o složení MF CO<sub>2</sub>/PrOH/IPA/TFA.

analyty	80/20/0,1 (v/v/v)			90/10/0,1 (v/v/v)			95/5/0,1 (v/v/v)			98/2/0,1 (v/v/v)		
	k <sub>1</sub>	R <sub>1,2</sub>	α	k <sub>1</sub>	R <sub>1,2</sub>	α	k <sub>1</sub>	R <sub>1,2</sub>	α	k <sub>1</sub>	R <sub>1,2</sub>	α
ibuprofen (PF1)	0,25			0,82			0,94			-		
indoprofen (PF2)	5,34	4,86	1,30	25,12	5,84	1,38	-			-		
flurbiprofen (PF3)	0,78			2,41	0,91	1,06	6,47	1,81	1,09	20,31	1,77	1,07
tiaprofenová kyselina (PF4)	1,47	1,21	1,11	8,32	1,75	1,11	-			-		
carprofen (PF5)	5,22	3,62	1,20	-			-			-		
suprofen (PF6)	1,66	1,19	1,09	6,62	1,83	1,10	-			-		
ketoprofen (PF7)	0,97			3,47			-			-		
fenoprofen (PF8)	0,78			2,26	0,37	1,04	6,78	1,24	1,06	19,09	1,30	1,05
propranolol (BB1)	2,13	14,00	2,65	-			-			-		
oxprenolol (BB2)	0,97	16,30	3,94	-			-			-		
metoprolol (BB3)	0,81	17,30	5,19	-			-			-		
metipranolol (BB4)	0,66	1,98	1,33	2,35	3,45	1,34	-			-		
acebutolol (BB5)	4,56	2,64	1,23	-			-			-		
pindolol (BB6)	6,13	22,67	4,99	-			-			-		
bopindolol (BB7)	7,97	22,22	5,66	-			-			-		
atenolol (BB8)	6,69	13,29	2,39	-			-			-		
alprenolol (BB9)	0,63	7,72	2,40	-			-			-		
thioridazin (PH1)	5,53	0,92	1,05	20,15	1,03	1,05	-			-		
promethazin (PH3)	2,72			-			-			-		
butizid (TD1)	9,13	8,22	1,81	-			-			-		
mefrusid (TD2)	3,50			14,12			-			-		
chlorthalidon (TD3)	12,53	1,02	1,08	-			-			-		
trichlormethiazid (TD4)	15,06	3,17	1,22	-			-			-		
bendroflumethiazid (TD5)	9,44	2,62	1,19	-			-			-		

### 5.3. POROVNÁNÍ VLIVU MODIFIKÁTORŮ MeOH A PrOH NA SEPARACI

Všechna použitá aditiva byla testována v kombinaci s dvěma modifikátory, a to MeOH a PrOH. Lze tedy kromě vlivu aditiv posuzovat také vliv těchto modifikátorů. Skupinou analytů, která reagovala nejvýrazněji na tyto změny MF, byly BB. Naopak nejmenší výkyvy v získaných hodnotách byly zjištěny u skupiny thiazidových diuretik. Celkový počet analytů separovaných na základní linii v MF s oběma modifikátory je ilustrován na obr. 5.6. Z tohoto obrázku je patrné, že bazická aditiva (IPA, DEA, TEA) přinášejí lepší výsledky v kombinaci s modifikátorem MeOH. Tento modifikátor má větší tendenci k odštěpení  $H^+$  iontu, než PrOH, což podporuje protonizaci bazických aditiv a jejich následné interakce ovlivňující enantioseparaci. Naopak aditiva kyselé povahy (TFA, IPA/TFA) mají kladný vliv na separaci enantiomerů za přítomnosti modifikátoru PrOH.



Obr. 5.6 Graf znázorňující počty separovaných analytů v závislosti na druhu použitého modifikátoru v kombinaci s různými aditivy v SFC systému.

### 5.3.1. VLIV ZMĚNY MODIFIKÁTORU NA ROZLIŠENÍ

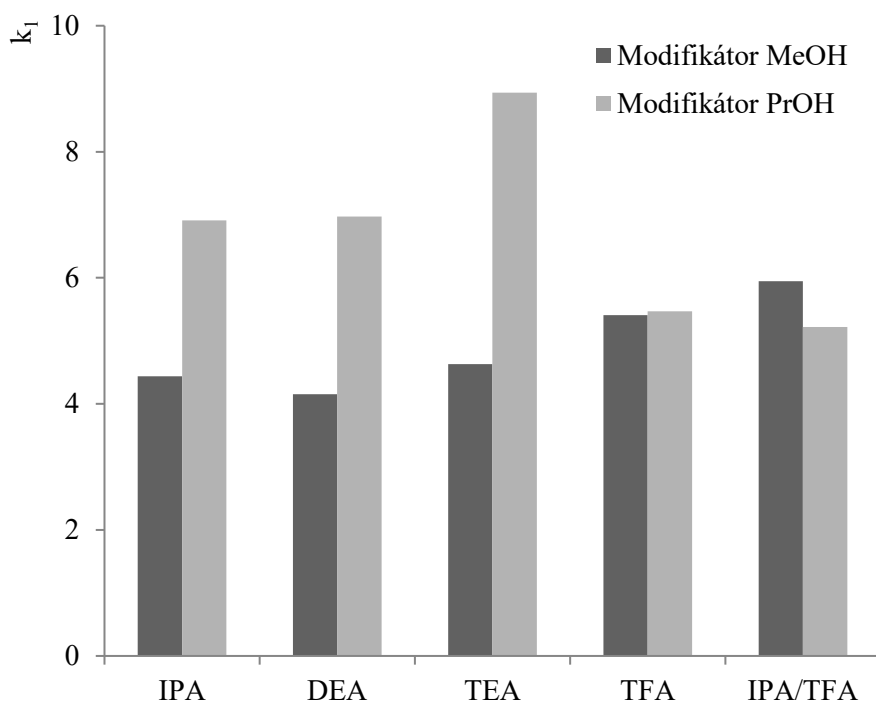
Není možné říci, že jeden modifikátor je lepší pro celou skupinu analytů, než druhý. Odlišnosti se projevují taktéž v rámci použitých aditiv. Rozlišení získaná pro skupiny BB v MF s rozdílným modifikátorem jsou znázorněny v tabulce 5.17. Hned u vzorků BB1 a BB2 můžeme vidět, že v MF s aditivem IPA se u BB1 rozlišení po změně modifikátoru na PrOH sníží, avšak u BB2 se zvýší. V MF s kombinací aditiv IPA/TFA došlo ke zvýšení rozlišení u vzorků BB1, ale i BB2. Modifikátor PrOH poskytl nejlepší výsledky v kombinaci s aditivou TFA resp. IPA/TFA, kdy došlo k rozdělení 17 analytů na základní linii (viz obr. 5.6). Stejný počet analytů se podařilo separovat i při použití modifikátoru MeOH v kombinaci s aditivem IPA. Nejméně vhodné složení MF je kombinace modifikátoru MeOH s aditivem TFA, kdy došlo k separaci na základní linii pouze u 10 vzorků (viz obr. 5.6). Zde je opět vidět negativní vliv MeOH na disociaci TFA, a tudíž i následného dělení enantiomerů v této MF.

Tab. 5.17 Porovnání hodnot rozlišení ( $R_{1,2}$ ) pro všechny vzorky ze skupiny BB, v MF s aditivou, které byly následně vyhodnoceny jako nejvhodnější pro tyto separace. Všechny uvedené hodnoty  $R_{1,2}$  jsou z MF o složení  $\text{CO}_2/\text{modifikátor/aditivum}$  80/20/0,1 (v/v/v). Separace probíhaly v SFC systému, průtok MF byl 2,5 ml/min a teplota kolony 35°C.

	IPA		TFA		IPA/TFA	
	MeOH	PrOH	MeOH	PrOH	MeOH	PrOH
	$R_{1,2}$	$R_{1,2}$	$R_{1,2}$	$R_{1,2}$	$R_{1,2}$	$R_{1,2}$
propranolol (BB1)	6,01	4,30	1,83	1,16	4,81	14,00
oxprenolol (BB2)	4,58	8,82	1,64	1,77	2,60	16,30
metoprolol (BB3)	5,63	7,93	2,67	1,90	3,86	17,30
metipranolol (BB4)	0,52	1,28	-	-	0,79	1,98
acebutolol (BB5)	0,79	1,37	-	-	0,72	2,64
pindolol (BB6)	16,70	10,31	3,98	3,77	12,00	22,67
bopindolol (BB7)	3,54	14,32	2,55	6,23	1,20	22,22
atenolol (BB8)	6,54	6,55	1,38	2,66	4,55	13,29
alprenolol (BB9)	1,63	4,19	0,08	1,11	1,08	7,72

### 5.3.2. VLIV ZMĚNY MODIFIKÁTORU NA RETENCI

Vedle změny rozlišení pozorujeme u některých analytů také větší či menší změny retenčních časů. Zvýšení retence s sebou často přináší i zlepšení rozlišení, není to však pravidlem. Např. u vzorku BB1 v MF CO<sub>2</sub>/MeOH/TFA o zastoupení 80/20/0,1 (v/v/v) je retence nižší, ale rozlišení je vyšší než na základní linii. Oproti tomu v MF CO<sub>2</sub>/PrOH/TFA o zastoupení 80/20/0,1 (v/v/v) je retence přibližně dvojnásobná, avšak rozlišení nedosáhlo na základní linii. Rozdíly mezi retencemi s různými modifikátory jsou uvedeny na příkladu carprofenu (PF5) na obr. 5.7. Z obrázku je patrné, že retence carprofenu jsou značně zvýšené v MF, kde je přítomen modifikátor PrOH a bazické aditivum. Pro aditiva TFA a IPA/TFA jsou hodnoty retencí carprofenu podobné u obou modifikátorů. Tento trend se vyskytl i u řady dalších analytů. Změna modifikátoru může být parametrem vedoucím k rozdílu mezi úspěšnou a neúspěšnou separací. Jako příklad lze uvést vzorek ze skupiny thiazidových diuretik chlorthalidon (TD3). Při měření v mobilní fázi CO<sub>2</sub>/MeOH/DEA o zastoupení 80/20/0,1 (v/v/v) byla jeho retence 1,81 min a rozlišení 2,93. Avšak v MF s modifikátorem PrOH byla retence 4,41 min ale rozlišení pouze 0,94. Přehled retenčních faktorů pro skupinu profenů porovnávající výsledky pro oba modifikátory je uveden v tab. 5.18.



Obr. 5.7 Porovnání hodnot retenčních faktorů ( $k_1$ ) u vzorku carprofenu (PF5), v MF se všemi testovanými aditivy. Separace probíhaly v SFC systému, složení MF bylo CO<sub>2</sub>/modifikátor/aditivum 80/20/0,1 (v/v/v), teplota kolony 35 °C a průtok MF 2,5 ml/min.

Tab. 5.18 Porovnání hodnot retenčních faktorů ( $k_1$ ) pro všechny vzorky ze skupiny profenů, v MF s aditivy, které byly následně vyhodnoceny jako nejvhodnější pro tyto separace. Separace probíhaly v SFC systému, složení MF bylo CO<sub>2</sub>/modifikátor/aditivum 80/20/0,1 (v/v/v), teplota kolony 35°C a průtok MF 2,5 ml/min.

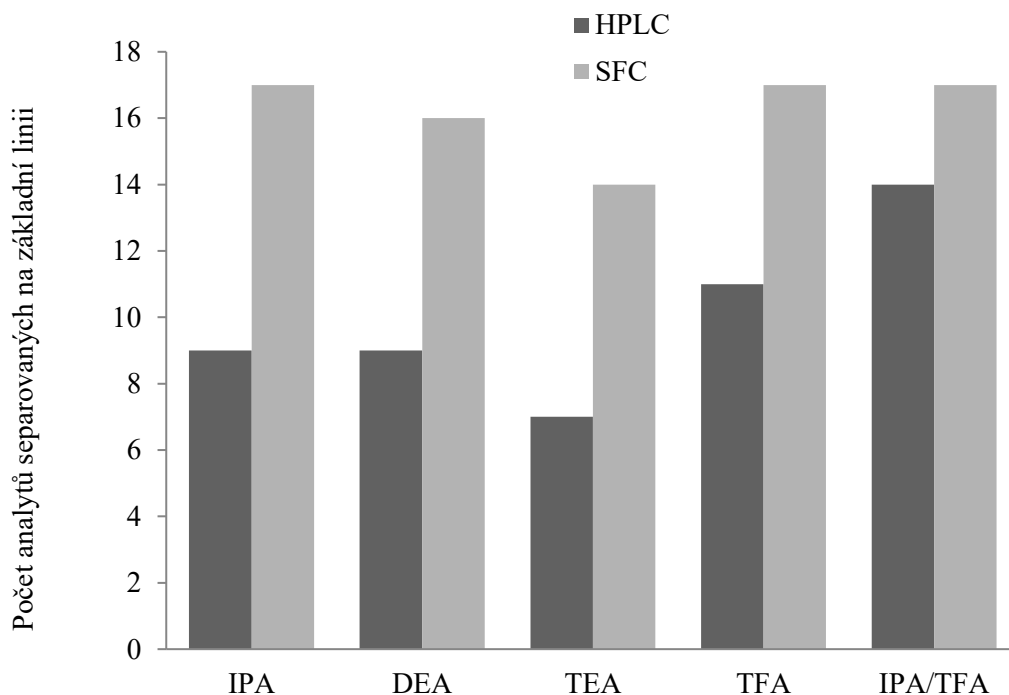
	IPA		TFA		IPA/TFA	
	MeOH	PrOH	MeOH	PrOH	MeOH	PrOH
	$k_1$	$k_1$	$k_1$	$k_1$	$k_1$	$k_1$
ibuprofen (PF1)	0,33	0,42	0,33	0,34	0,44	0,25
indoprofen (PF2)	2,79	6,64	3,21	5,38	3,62	5,34
flurbiprofen (PF3)	0,75	1,06	0,81	0,78	0,98	0,78
tiaprofenová kyselina (PF4)	1,04	2,82	1,27	1,50	1,49	1,47
carprofen (PF5)	4,44	6,91	5,41	5,47	5,95	5,22
suprofen (PF6)	1,27	2,33	1,39	1,69	1,64	1,66
ketoprofen (PF7)	0,75	1,36	0,81	0,97	0,98	0,97
fenoprofen (PF8)	0,68	0,97	0,72	0,81	0,90	0,78

#### 5.4. POROVNÁNÍ SEPARAČNÍCH SYSTÉMŮ HPLC A SFC

Je zřejmé, že není možné jednoznačně říci, který separační systém je „lepší“. Vždy záleží na tom, jaké analyty chceme separovat a jestli je chceme např. i kvantifikovat.

Ani v rámci této diplomové práce nemůžeme objektivně zhodnotit, který systém je nejlepší pro zvolené analyty, jelikož podmínky separací nebyly shodné. Rozdíly byly např. v průtoku MF, což však představuje zanedbatelný efekt. Přesto se však pokusím o určité srovnání.

Nejobecnější informací, která se dá porovnat, a která je vlastně záměrem každé separace, je počet rozdělených analytů. Počty separovaných analytů v závislosti na využitém separačním systému a rozdělení dle jednotlivých aditiv jsou znázorněny na obr. 5.8. Z toho obrázku je patrné, že v SFC systému se podařilo separovat 17 analytů na základní linii, zatímco v HPLC systému pouze 14. Nejvhodnějším aditivem pro separace v HPLC systému je kombinace IPA/TFA, což je analogické SFC systému. Na tomto místě je třeba podotknout, že separacím v SFC systému byla věnována větší pozornost- provedeno více měření.



Obr. 5.8 Znárodnění počtu separovaných analytů v jednotlivých separačních systémech s dalším rozdělením dle použitých aditiv. V SFC jsou zahrnuty oba modifikátory.

Dalším z důležitých parametrů, který by byl zajisté brán v potaz při výběru separační metody, je délka analýzy (retenční čas). Je zřejmé, že čím kratší je retenční čas, tím metoda získává větší potenciál k dalšímu využití v praxi. V tabulce 5.19 jsou shrnuty retenční faktory a hodnoty rozlišení všech analytů v MF s aditivou IPA/TFA. Z tabulky lze usuzovat, že v SFC systému za použití ProH jako modifikátoru má větší na analytů nejdelsí retence. Vysoké retence jsou také spojeny s vyššími hodnotami rozlišení, a tudíž vysokým počtem analytů separovaných na základní linii. V HPLC systému dochází ke zvýšení hodnot rozlišení při zvýšení zastoupení nepolárního HEX v MF, ale také k značnému prodloužení retencí. Pro dosažení vyšších hodnot rozlišení v kratším retenčním čase je tedy vhodnější SFC metoda.

Tab. 5.19 Porovnání hodnot retenčních faktorů ( $k_1$ ) a hodnot rozlišení ( $R_{1,2}$ ) pro všechny vzorky.

analyty	HPLC		SFC		SFC	
	HEX/PrOH/IPA/TFA		CO <sub>2</sub> /MeOH/IPA/TFA		CO <sub>2</sub> /PrOH/IPA/TFA	
	80/20/0,1 (v/v/v)		80/20/0,1 (v/v/v)		80/20/0,1 (v/v/v)	
	$k_1$	$R_{1,2}$	$k_1$	$R_{1,2}$	$k_1$	$R_{1,2}$
ibuprofen (PF1)	-		0,44		0,25	
indoprofen (PF2)	1,42	1,84	3,62	1,98	5,34	4,86
flurbiprofen (PF3)	0,09		0,98		0,78	
tiaprofenová kyselina (PF4)	0,36		1,49		1,47	1,21
carprofen (PF5)	0,57	1,06	5,95	1,44	5,22	3,62
suprofen (PF6)	0,45		1,64	0,69	1,66	1,19
ketoprofen (PF7)	0,22		0,98		0,97	
fenoprofen (PF8)	0,10		0,90		0,78	
propranolol (BB1)	0,67	8,55	1,55	4,81	2,13	14,00
oxprenolol (BB2)	0,45	10,66	0,61	2,60	0,97	16,30
metoprolol (BB3)	0,36	9,63	0,56	3,86	0,81	17,30
metipranolol (BB4)	0,28	0,47	0,42	0,79	0,66	1,98
acebutolol (BB5)	2,01	1,39	1,15	0,72	4,56	2,64
pindolol (BB6)	2,90	19,56	2,94	12,00	6,13	22,67
bopindolol (BB7)	3,94	19,67	2,61	1,20	7,97	22,22
atenolol (BB8)	3,48	1,79	2,14	4,55	6,69	13,29
alprenolol (BB9)	0,18	3,78	0,43	1,08	0,63	7,72
thioridazin (PH1)	1,07		2,76		5,53	0,92
promethazin (PH3)	0,81		1,31		2,72	
butizid (TD1)	2,55	3,90	3,57	4,48	9,13	8,22
mefrusid (TD2)	2,39		2,39		3,50	
chlorthalidon (TD3)	4,48	0,38	5,72	1,81	12,53	1,02
trichlormethiazid (TD4)	4,73	1,24	6,67	1,49	15,06	3,17
bendroflumethiazid (TD5)	3,46	1,85	4,72	0,76	9,44	2,62

## 6. ZÁVĚR

Pro enantioselektivní separace vybraných čtyř skupin analytů byly testovány dva separační systémy. První zvolenou metodou byl systémem HPLC, ve kterém byla provedena sada měření za konstantních podmínek (teplota, průtok MF) pouze s proměnlivým složením MF. Druhou použitou metodou byl systém SFC. Zde byly také zachovány konstantní podmínky (teplota, průtok MF) pro všechna měření, pouze složení MF se měnilo. Všechny separace byly prováděny na totožné stacionární fázi, kterou byla SF na bázi celulosy derivatizované tris(3,5-dimethylfenylkarbamátem).

V systému SFC dochází se zvyšováním obsahu CO<sub>2</sub> v MF k výraznému prodlužování retencí. Stejný jev je vidět také na výsledcích poskytnutých HPLC systémem při zvyšování obsahu nepolární složky MF, tj. hexanu. Většinou je prodlužování retencí spojeno také se zvyšujícími hodnotami rozlišení. Není to však pravidlem.

Pro všechny MF v obou separačních systémech bylo testováno celkem pět aditiv. Podle počtu analytů, které se podařilo separovat na základní linii, se pro HPLC systém jeví jako nejvhodnější aditivum kombinace IPA/TFA. Pro systém SFC s modifikátorem MeOH bylo nejvhodnější aditivum IPA, avšak s modifikátorem PrOH se nejvíce analytů podařilo separovat s použitím aditiv TFA a kombinace IPA/TFA. Přídavky DEA a TEA neměly na dělení enantiomerů příliš pozitivní vliv.

Závěrem lze konstatovat, že v HPLC systému se podařilo separovat 14 z 24 analytů, zatím co v SFC systému o tři analyty více. Výhodou SFC systému jsou kratší retence pro většinu analytů, dosažení separací na základní linii u více analytů, a také radikálně nižší spotřeba rozpouštědel potřebných jako složky MF.

## 7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. P. Anzenbacher, J. Jezdinský, *Klin. farmakol. farm.* 17 (2003) 148-150.
2. M. Doležalová, M. Tkaczyková, *Chem. Listy* 94 (2000) 994-1002.
3. D. C. Patel, M. F. Wahab, D. W. Armstrong, Z. S. Breitbach, *J. Chromatogr., A* 1467 (2016) 2-18.
4. D. Speybrouck, E. Lipka *J. Chromatogr., A* 1467 (2016) 33-55.
5. V. Desfontaine, L. Nováková, F. Ponzetto, R. Nicoli, M. Saugy, J. L. Veuthey, D. Guillarme, *J. Chromatogr., A* 1451 (2016) 145-155.
6. I. Ali, Z. A. Al-Othman, A. Al-Warthan, L. Asnin, A. Chudinov, *J. Sep. Sci.* 37 (2014) 2447-2466.
7. O. Červinka, *Chem. Listy* 93 (1999) 294-305.
8. J. McMurry, *Organická chemie* Vutium Brno (2007).
9. T. Jalink, T. Farrand, C. Herdes, *Chem. Cen. J.* 10 (2016) 2-6.
10. A. Ribeiro, A. Maia, Q. Cass, M. Tiritan, *J. Chromatogr. B.* 968 (2014) 8-21.
11. C. Fernandes, M. E. Tiritan, M. Pinto, *Chromatographia* 76 (2013) 871-897.
12. J. Sobotníková, Z. Bosáková, R. Čabala, P. Coufal, V. Pacáková, K. Štulík, *Chem. Listy* 104 (2010) 1226-1231.
13. V. Pacáková, K. Štulík *Vysokoučinná kapalinová chromatografie* SPN Praha (1986).
14. P. Hemström, K. Irgum, *J. Sep. Sci.* 29 (2006) 1784-1821.
15. M. Taschwer, J. Grascher, M. G. Schmid, *Forensic Sci. Int.* 270 (2017) 232-240.
16. M. Moskaľová, O. Kozlov, T. Gondová, M. Budovská, D. W. Armstrong, *Chromatographia* 80 (2017) 53-62.
17. K. Tachibana, A. Ohnishi, *J. Chromatogr., A* 906 (2001) 127-154.
18. E. Klesper, A.H. Corwin, D.A. Turner, *J. Org. Chem.* 27 (1962) 700.
19. A. Tarafder *Trends Analyt. Chem.* 81 (2016) 3-10.
20. E. Lemasson, S. Bertin, C. West, *J. Sep. Sci.* 39 (2016) 212-233.

21. L. Nováková, A. G. Perrenoud, I. Francois, C. West, E. Lesellier, D. Guillaume, *Anal. Chim. Acta.* 824 (2014) 18-35.
22. L. Nováková, *Superkritická fluidní chromatografie, základní pojmy a instrumentace* (2015).
23. Ch. Wang, Y. Zhang, *J. Chromatogr., A* 1281 (2013) 127-134.
24. J. L. Gohres, A. T. Marin, J. Lu, Ch. L. Liotta, Ch. A. Eckert, *Ind. Eng. Chem. Res.* 48 (2009) 1302-1306.
25. E. Tyteca, V. Desfontaine, G. Desmet, D. Guillaume, *J. Chromatogr., A* 1381 (2015) 219-228.
26. J. O. Da Silva, B. Coesa, L. Freya, I. Mergelsberga, R. McClainb, L. Noglec, Ch. J. Welch, *J. Chromatogr., A* 1328 (2014) 98-103.
27. L. T. Taylor, *J. Chromatogr., A* 1250 (2012) 196-204.
28. A. Cazenave-Gassiot, R. Boughtflower, J. Caldwell, L. Hitzel, C. Holyoak, S. Lane, P. Oakley, F. Pullend, S. Richardsong, G. J. Langley, *J. Chromatogr., A* 1216 (2009) 6441-6450.
29. J. Zheng, L. T. Taylor, J. D. Pinkston, *Chromatographia.* 63 (2006) 267-276.
30. E. L. Regalado, Ch. J. Welch, *Trends Analyt. Chem.* 67 (2015) 74-81.
31. R. Kafri, D. Lancet, *Chirality* 16 (2004) 369-378.
32. G. K. E. Scriba, *Chromatographia* 75 (2012) 815-838.
33. A. A. Younes, D. Mangelings, Y. V. Heyden, *J. Chromatogr., A* 1269 (2012) 154-167.
34. I. Ali, H. Y. Aboul-Enein, *J. Sep. Sci.* 29 (2006) 762-769.
35. A. A. Younes, D. Mangelings, Y. V. Heyden, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 55 (2011) 414-423.
36. L. Li, M. Zhang, Y. Wang, W. Zhou, Z. Zhou, *J. Sep. Sci.* 39 (2016) 4136-4146.
37. I. W. Muderawan, T. Ong, S. Ng, *J. Sep. Sci.* 29 (2006) 1849-1871.
38. M. Vinodh, F. H. Alipour, A. A. Mohamod, T. F. Al-Azemi, *Molecules.* 17 (2012) 11763-11799.
39. D. W. Armstrong, Y. Tang, S. Chen, Y. Zhou, Ch. Bagwell, J. Chen, *Anal. Chem.* 66 (1994) 1473-1484.

40. D. Gherdaoui, H. Bekdouche, S. Zerkout, R. Fegas, M. Righezza, *J. Iran. Chem. Soc.* 13 (2016) 2319-2323.

41. S. Hynie, *Farmakologie v kostce* Triton Praha (2001).

42. H. Lüllmann, K. Mohr, L. Hein, *Barevný atlas farmakologie* Grada Publishing, a.s. Praha (2012).