

UNIVERZITA KARLOVA  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ  
KATEDRA FARMACEUTICKÉ CHEMIE A FARMACEUTICKÉ ANALÝZY

## DIPLOMOVÁ PRÁCE

Optimalizace chromatografických podmínek pro chirální separaci  
biologicky aktivních látek.

Bc. Martin Novák



Vedoucí diplomové práce: doc. PharmDr. Radim Kučera, Ph.D.  
Konzultant: Mgr. et Mgr. Rafael Doležal, Ph.D.  
HRADEC KRÁLOVÉ, 2018

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Hradci Králové dne 28. 8. 2018

.....  
Martin Novák

## **Poděkování**

Na tomto místě bych chtěl moc poděkovat **Mgr. et Mgr. Rafaelu Doležalovi, Ph.D.** a **Mgr. Lukáši Prchalovi, Ph.D.** za pomoc s naměřením a interpretací výsledků mojí práce. Dále pak velice děkuji **doc. PharmDr. Radimu Kučerovi, Ph.D.** za odborné vedení aodnětné připomínky při řešení této diplomové práce. Děkuji také PharmDr. Janu Korábečnému, Ph.D. a Mgr. Kataríně Špilovské za syntézu a dodání testované látky K 1277. V neposlední řadě bych chtěl poděkovat Centru biomedicínského výzkumu za poskytnutí laboratoří a jejich vybavení k naměření experimentálních dat.

Tato diplomová práce byla vypracována v rámci projektu SVV 260 401.

# OBSAH:

1.	ÚVOD .....	7
2.	TEORETICKÁ ČÁST .....	8
2.1	Chiralita .....	8
2.1.1	Optická aktivita sloučenin .....	8
2.1.2	Asymetrie molekuly .....	8
2.1.3	Chirální biologicky aktivní látky .....	9
2.2	Separační metody pro stanovení enantiomerů .....	10
2.2.1	Historie .....	10
2.2.2	Chromatografické metody separace chirálních látek .....	10
2.2.3	Elektromigrační metody separace chirálních látek .....	13
2.3	HPLC separace enantiomerů .....	13
2.3.1	Chirální stacionární fáze .....	14
2.3.2	Mobilní fáze .....	17
2.4	Alzheimerova nemoc .....	19
2.4.1	Historie Alzheimerovy nemoci .....	19
2.4.2	Vznik a patofyziologie Alzheimerovy nemoci .....	19
2.4.3	Klinické projevy .....	21
2.5	Léčba Alzheimerovy nemoci .....	22
2.5.1	Cíl léčby .....	22
2.5.2	Nefarmakologická opatření .....	22
2.5.3	Současná farmakologická terapie .....	22
2.5.4	Skupiny potenciálních léčiv Alzheimerovy nemoci .....	25
3.	ZADÁNÍ – CÍL PRÁCE .....	27
4.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	28
4.1	METODICKÁ ČÁST .....	28
4.1.1	Přístrojové vybavení .....	28
4.1.2	Chemikálie .....	28
4.1.3	Látka K 1277 .....	29
4.1.4	Příprava mobilních fází a zásobního roztoku vzorku K 1277 .....	29
4.1.5	Stacionární fáze .....	29
4.1.6	Výchozí nastavení systému .....	30
4.2	VÝSLEDKY A DISKUZE .....	31
4.2.1	Kolona Waters Atlantis dC18 2,1 x 100,0 mm/3 μm .....	31
4.2.2	Kolona Astec CHIROBIOTIC T 2,1 x 250,0 mm/5 μm .....	33
4.2.3	Kolona Lux Cellulose - 1 4,6 x 250,0 mm/5 μm .....	37
4.2.4	Optimalizace separační metody .....	46
4.2.5	Hodnocení parametrů optimální metody separace enantiomerů látky K 1277 .....	52
5.	ZÁVĚR .....	58
6.	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....	59
7.	SEZNAM TABULEK .....	60
8.	SEZNAM OBRÁZKŮ .....	61
9.	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....	62

# ABSTRAKT

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra:	Farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy
Student:	Bc. Martin Novák
Školitel:	doc. PharmDr. Radim Kučera, Ph.D.
Konzultant	Mgr. et Mgr. Rafael Doležal, Ph.D.
Název diplomové práce:	Optimalizace chromatografických podmínek pro chirální separaci biologicky aktivních látek

Diplomová práce se zaměřuje na vývoj HPLC - UV metody pro stanovení enantiomerů látky K 1277 se strukturním vzorcem *N* - (2 - ((6 - chlor - 1,2,3,4 - tetrahydroakridin - 9 - yl)amino)hexyl - 2 - amino - 3 - (1*H* - indol - 3 - yl) propylamid dihydro - chlorid, která je vybraným zástupcem ze skupiny hybridních sloučenin takrinu a tryptofanu. Hybridy syntetizované z molekul takrinu a tryptofanu je možné zařadit mezi velmi slibné kandidáty potenciálních léčiv působících v terapii Alzheimerovy choroby.

V teoretické části práce přináší seznámení se základní charakteristikou chiralit molekul, možnostmi a principy chirálních separačních metod, patofyziologií a klinickými projevy Alzheimerovy nemoci, možnostmi léčby Alzheimerovy nemoci a se stručnou charakteristikou hybridních sloučenin takrinu a tryptofanu. Cílem diplomové práce je nalezení vhodné metody separace enantiomerů vznikajících syntézou z takrinového skeletu a tryptofanové části.

Experimentální část práce se věnuje popisu vývoje metody chirální separace látky K 1277 s využitím HPLC. Na základě předchozích zkušeností byly testovány dva chirální selektory – makrocyclické antibiotikum teikoplanin a tris(3,5 - dimethylfenyl)karbamát celulóza. Úspěšné separace enantiomerů látky K 1277 bylo dosaženo v reverzním elučním módu na stacionární fázi obsahující modifikovanou celulózu.

V práci byla provedena optimalizace separačních podmínek s využitím chromatografu Dionex UltiMate 3000. U optimalizované metody byly hodnoceny následující parametry – přesnost kvantifikace, stabilita separace při opakování analýz a dále byla stanovena hodnota meze detekce metody. U optimalizované metody byla také hodnocena možnost analýzy enantiomerů látky K 1277 po její aplikaci do lidské plasmy.

# ABSTRACT

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of: Pharmaceutical Chemistry and Pharmaceutical Analysis  
Student: Bc. Martin Novák  
Supervisor: doc. PharmDr. Radim Kučera, Ph.D.  
Consultant: Mgr. et Mgr. Rafael Doležal, Ph.D.  
Title of diploma thesis: Optimization of chromatographic parameters for chiral separation of biologically active compounds.

The diploma thesis was focused on the development of a HPLC-UV method for the determination of K 1277 enantiomers of systematic name *N*-(2-((6-chloro-1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-yl)amino)hexyl-2-amino-3-(1H-indole-3-yl) propylamide dihydrochloride, which is one of the compounds from the tacrine-tryptophan hybrids group. These tacrine-tryptophan hybrids could be considered as promising candidates of potential drugs against Alzheimer's disease.

The thesis brings an explanation of basic characteristic of chiral molecules, principles of chiral separation, pathophysiology, clinical manifestation and treatment of Alzheimer's disease and short characteristic of tacrine-tryptophan hybrids in the theoretical section. The aim of my diploma thesis was to find the optimal chromatographic conditions for separation of K 1277 enantiomers synthesized from tacrine and tryptophan fragments.

The experimental part deals with the development of the chiral separation method of K 1277 using HPLC. Based on previous experience, two chiral stationary phases (CSPs) – macrocyclic antibiotic teicoplanin and *tris*(3,5-dimethylphenyl)carbamate cellulose were studied. The successful separation of the enantiomers of K 1277 was achieved in a reverse mode on a stationary phase containing modified cellulose.

The optimization of the separation conditions using the Dionex UltiMate 3000 chromatograph was performed. In the optimized method the following parameters - precision of quantification and stability of the separation during repetition of analyses were evaluated and the value of the limit of detection of the method was determined. In the optimized method, the possibility of analyzing the enantiomers of K1277 after application to human plasma was also evaluated.

# 1. ÚVOD

Existence chirálních látek a jejich enantiomerů je již známa po mnoho let. Zásadní rozdíly v biologické aktivitě chirálních molekul byly Pasteurem stanoveny již před více než stoletím. Mnoho struktur nacházejících se v lidském organismu obsahuje chirální centra. S výjimkou glycinu obsahují všechny molekuly aminokyselin alespoň jedno nebo dvě chirální centra. Aminokyseliny tvoří základní stavební jednotky proteinů, které jsou společně s nukleotidy, polysacharidy nebo lipidy nejdůležitějšími složkami živých organismů. Biologická aktivita enantiomerů jednotlivých látek se může velmi zásadně lišit. [1]

Také mnoho léčiv, obsahuje chirální centrum. Tyto léčivé látky jsou velmi často připravovány klasickou organickou syntézou, která poskytuje racemickou směs. Kvůli bezpečnosti, dosažení vyšších účinků a snížení nežádoucích účinků jsou ve farmaceutické výrobě stále více preferovány látky opticky čisté. Jelikož se neustále zvyšují požadavky na kvalitu a kontrolu léčiv, zásadně roste i význam chirálních separací. [2] [3]

Pro separaci enantiomerů mohou být využity dva základní analytické separační principy. Jedná se o metody chromatografické a elektroforetické. Nejoblíbenější a nejrozšířenější metodou používanou pro chirální separace je vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC). K rozvoji této metody však nedochází pouze v oblasti analýzy a kontroly léčiv, nýbrž i v oblasti bioanalytiky, biomedicíny nebo analýzy potravin. [2] [3]

Diplomová práce volně navazuje na bakalářskou práci vypracovanou v roce 2016. V této práci byla řešena chirální separace hybridní látky takrin - trolox s kódových označením 1 - AO - 43.1. Pro separaci enantiomerů byl využit stejný chromatografický přístroj a dokonce i shodné stacionární fáze. [4]

Teoretická část se věnuje chiralitě molekul, přehledu chirálních separačních technik a popisu úprav HPLC systému nutných pro chirální separaci. Jelikož kapitoly zabývající se principem a základní charakteristikou HPLC techniky byly velmi podrobně zpracovány v teoretické části již dříve zmíněné bakalářské práce, diplomová práce se těmito tématy nijak výrazně nezabývá. V diplomové práci je naopak věnován větší prostor kapitole řešící problematiku Alzheimerovy choroby (kapitola 2.4) a kapitole shrnující dosavadní i potenciální skupiny léčiv působících proti Alzheimerově chorobě (kapitola 2.5).

Experimentální část je věnována vývoji HPLC - UV (vysokoúčinná kapalinová chromatografie s detekcí v ultrafialové oblasti světelného spektra) metody pro chirální separaci látky K 1277. Pro studium chiralitě byla vybrána látka, která byla vyvinuta v rámci výzkumu potenciálních léčiv Alzheimerovy nemoci na Katedře farmakologie a vojenské farmacie Fakulty vojenského zdravotnictví Univerzity obrany v Hradci Králové. Tato látka je složena z fragmentů molekul takrinu a tryptofanu a podle jejích biochemických vlastností je ji možno definovat jako kompetitivní inhibitor acetylcholinesterázy (AChE) s potenciálem snížit agregaci  $\beta$  - amyloidu v mozkové tkáni. Z výše uvedených biochemických vlastností lze látku K 1277 zařadit mezi velmi slibné potenciální kandidáty na léčivo působící proti Alzheimerově chorobě. Látka K 1277 obsahuje jedno chirální centrum, díky kterému existují její dva optické izomery. [5]

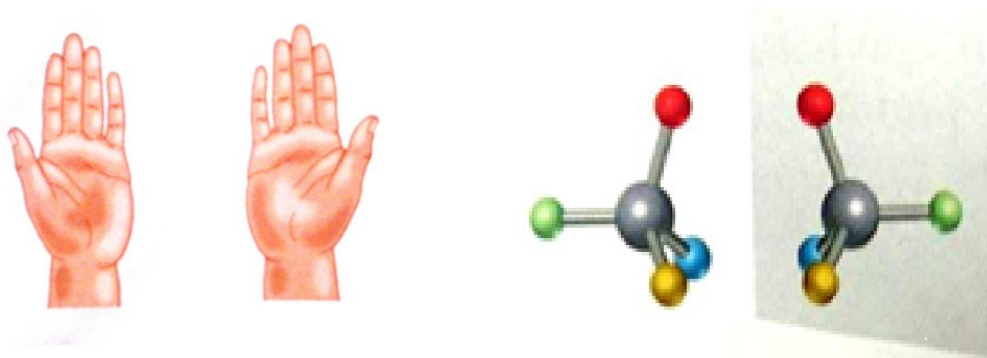
Hlavním cílem práce bylo stanovit a optimalizovat parametry metody pro separaci enantiomerů látky K 1277. V práci byly testovány dvě odlišné chirální stacionární fáze. První stacionární fáze obsahovala chirální selektor na bázi makrocyclického antibiotika teikoplaninu a druhá tris (3,5 - dimethylfenylkarbamát) celulózu.

## 2. TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Chiralita

#### 2.1.1 Optická aktivita sloučenin

Některé z chemických sloučenin dokáží stáčet rovinu polarizovaného světla o určitý, pro ně specifický, úhel. Tyto sloučeniny jsou nazývány jako **opticky aktivní** a jejich schopnost stáčet rovinu polarizovaného světla je označována jako **optická aktivita**. Důležitým předpokladem pro to, aby sloučenina byla opticky aktivní, je chiralita molekuly. Jako chirální se označují molekuly, které mají vůči sobě vztah jako předmět a jeho zrcadlový obraz – tedy jsou neztotožnitelné (pokud se neporuší vazba). Molekuly mající se k sobě jako předmět a obraz v zrcadle (Obr. 1), jsou nazývány jako **optické antipody** neboli **enantiomery**. [6] [7]



**Obr. 1 :** Vlevo: zrcadlové obrazy lidských rukou. Vpravo: porovnání zrcadlových obrazů tetraedrických uhlíků. [8]

Enantiomery stejné látky mají **identické fyzikální vlastnosti**, jako teplotu tání, teplotu varu, hustotu nebo například rozpustnost. Jejich spektrální vlastnosti (UV, IČ, NMR) jsou v achirálním prostředí rovněž identické. Také chemické reakce v achirálním prostředí probíhají u enantiomerů stejné látky obdobně. [6] [7]

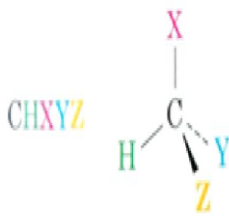
První z odlišných vlastností je, že jednotlivé enantiomery stejné látky stácejí rovinu polarizovaného světla o stejný úhel, ale v opačném směru. Pokud enantiomer stáčí rovinu polarizovaného světla doleva, tedy proti směru pohybu hodinových ručiček, jedná se o **levotočivý izomer**, označovaný jako (-), pokud po směru hodinových ručiček, jde o **pravotočivý izomer** (+). Absolutní konfigurace chirálních center je označována podle Cahn, Ingolda a Preloga, jako *R* – *rectus* (pravý) a *S* – *sinister* (levý). Další odlišnou vlastností je rozdílná rychlost interakce s jinými chirálními sloučeninami. Využití tohoto jevu je velmi důležité pro interakce molekul v živém organismu. Rozdílná rychlost interakce je dobře patrná i při dělení (separaci) enantiomerů. [6] [7]



## 2.1.2 Asymetrie molekuly

Nejčastější charakteristikou chirálních molekul je uhlík, vázající čtyři odlišné substituenty. Na tomto uhlíku vzniká asymetrické centrum, a proto je i tento uhlík označován jako uhlík **asymetrický** (Obr. 2). Asymetrické centrum může být vytvořeno i na jiných atomech, jako je například dusík, křemík, síra, fosfor a další. [9]

Pokud se u látky vyskytuje pouze jeden asymetrický atom, je možno nalézt dva její optické izomery, enantiomery. Mezi sebou se liší prostorovým uspořádáním v centru chiraloty a není možné tyto látky ztotožnit. [10]



**Obr. 2 :** Asymetrický uhlík. [9]

Má-li látka více než jeden asymetrický atom, pak je možné nalézt  $2^n$  jejich optických izomerů. Stereoizomery látek obsahujících více asymetrických atomů rozdělit na enantiomery a diastereomery. Enantiomery jsou látky, které mají ve všech svých chirálních centrech opačnou konfiguraci a jsou tedy dokonalými zrcadlovými obrazy. Diastereomery jsou konfigurační izomery látky, lišící se prostorovým uspořádáním v jednom nebo několika centrech chiraloty a zároveň nejsou svými dokonalými zrcadlovými obrazy. Diastereomery identické látky mají na rozdíl od enantiomerů odlišné fyzikální vlastnosti. [7]

Ekvimolární směs dvou enantiomerů je nazývána jako racemická směs (racemát). Je to opticky neaktivní směs skládající se z 50 % prvního enantiomeru a 50 % enantiomeru druhého. V porovnání s opticky čistými enantiomery se může racemická směs v některých fyzikálních vlastnostech výrazně lišit. [7] [10]

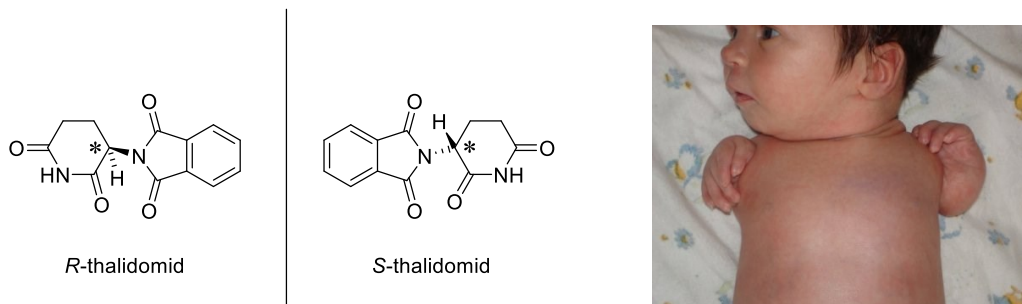
## 2.1.3 Chirální biologicky aktivní látky

Ve stereospecifických reakcích, probíhajících v živých organismech se může velmi dobře projevit schopnost enantiomerů odlišně reagovat s ostatními chirálními látkami (např. enzymy a receptory). Tyto reakce jsou často jedním z důležitých mechanismů účinku u chirálních léčiv. Biologická aktivita různých enantiomerů jedné substance se tedy může velmi zásadně lišit. Léčiva mohou odlišně působit, jak v rámci farmakodynamiky, tak v rámci farmakokinetiky. [10] [11]

Mezi odlišné farmakodynamické jevy patří různý kvalitativní a kvantitativní účinek. Kvantitou účinku se liší například enantiomery **isoprenalinu**, kdy (-) - izomer je 800× účinnější než jeho (+) - izomer. Také S - (-) izomer **methacholinu** je cholinomimeticky 250× účinnější než jeho izomer R. [10] [11]

Kvalitou účinku se odlišují izomery parenterálního anestetika **ketaminu**, kdy jeho S - izomer má výrazně méně vedlejších účinků po operaci pacienta. Historicky velmi nebezpečné bylo podávání racemické směsi **thalidomidu**, kdy jeho R - izomer je sedativem a S - izomer je teratogenem způsobujícím nedostatečný vývin končetin (fokomelii) (Obr. 3). Navíc i při použití čistého R - izomeru může *in vivo* docházet k jeho přeměně na S - izomer. Tato přeměna může

v živém organismu způsobit fatální následky. Odlišnou biologickou aktivitu prokazují také enantiomery **propoxyfenu**, kdy levopropoxyfen působí analgeticky, zatímco dextropropoxyfen je antitusikem. Izomery mohou mít ale i opačné účinky. Takovým příkladem je opioidní analgetikum **picenadol**. Jeho (+) - izomer je agonistou  $\mu$  - receptoru, (-) - izomer je naopak slabým antagonistou tohoto receptoru. [12] [13]



**Obr. 3 :** Thalidomid a fotografie dítěte s fokomelií. [14]

Enantiomery léčiv mohou mít také odlišné farmakokinetické chování. Příkladem je lišící se průběh odbourávání lokálního anestetika **prilokainu**. Jeho S - izomer je pomalu hydrolyzován amidázou, zatímco R - izomer je rychle hydrolyzován na toluidin. Dalším z příkladů je různá síla vazby proteinů u antiarytmika **dysopyramidu**, kdy S - dysopyramid váže proteiny daleko silněji než - li R - dysopyramid. U dvou enantiomerů stejného léčiva lze pozorovat i stereoselektivní inhibici metabolismu. Příkladem je (+) - izomer antilipidemika **fluvastatinu**, který inhibuje mnohem silněji enzym CYP 2C9 (Cytochrom P 2C9) než (-) - izomer. [11] [13]

Některé enantiomery léčiv působí odlišně i v závislosti na pacientově zdravotním stavu (interkonverze ibuprofenu), věku (odbourávání hexobarbitalu), pohlaví (odbourávání methylfenobarbitalu) a odlišných genetických faktorů (metoprolol) pacienta. [11]

## 2.2 Separační metody pro stanovení enantiomerů

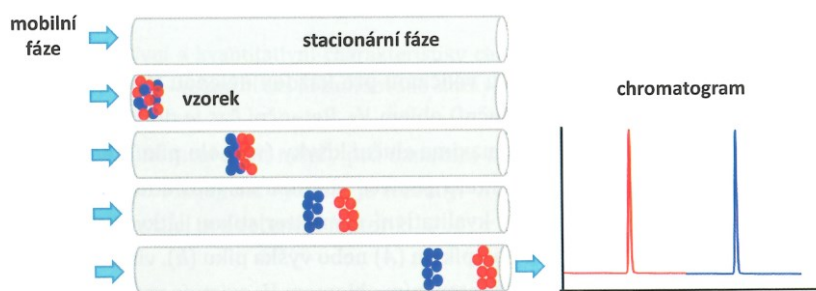
### 2.2.1 Historie

Při syntéze nových chirálních léčiv v minulosti vznikaly látky převážně ve formě racemických směsí. Hlavním důvodem tohoto trendu bylo nedostatečné technické vybavení laboratoří a z toho plynoucí problémy při syntéze čistých enantiomerů a zároveň také vysoké finanční náklady na asymetrickou syntézu. Technická vybavenost a znalosti o struktuře a funkci enantiomerů se v čase velmi zlepšovaly a postupně začala éra asymetrických syntéz. Dnes je komerčně možné nalézt velikou škálu chirálně čistých látek a reagensů. [11] [15]

Z důvodu tohoto vývoje, bylo nutné, aby se začaly dynamicky vyvíjet také analytické metody, zajišťující enantioselektivní separaci a dokazující tak správnost i efektivitu asymetrických syntéz. V současnosti se v analýze enantiomerů uplatňují převážně dva základní přístupy. Prvním z nich jsou metody chromatografické a druhým metody elektromigrační. [11] [15]

## 2.2.2 Chromatografické metody separace chirálních látek

Mezi základní chromatografické metody využívané k analýze chirálních látek patří TLC (Thin Layer Chromatography), GC (Gas Chromatography), HPLC (High Performance Liquid Chromatography), SFC (Supercritical Fluid Chromatography), SMB (Simulated Moving Bed) nebo také enantioselektivní membrány. Základním principem všech výše uvedených metod je opakované ustalování rovnováhy a rozdílná distribuce dělených látek mezi SF (stacionární fází) a MF (mobilní fází). [11] [15] Princip separace dělených látek je znázorněn na obrázku č. 4. [8]



**Obr. 4 :** Princip HPLC separace. [8]

### 2.2.2.1 Tenkovrstvá chromatografie

Jednou z možností chromatografických metod používaných pro separaci optických antipodů je tenkovrstvá chromatografie (TLC). U této techniky se mohou uplatnit dva základní přístupy k separaci a kvantitativnímu stanovení enantiomerů. [15]

Prvním přístupem je využití komerčně nebo nekomerčně vyrobených **chirálních stacionárních fází** (CSP, chiral stationary phases) v kombinaci s achirální mobilní fází. Jako CSP pro analýzu velmi polárních optických antipodů (např. aminokyseliny tryptofanu) lze využít modifikovanou mikrokrystalickou celulózu. [15] [16] [17] Pro separaci optických antipodů alkoholů a aminů obsahujících jednu nebo více aromatických skupin, nebo pro separaci antipodů obsahující karbonylovou skupinu v  $\alpha$ - nebo  $\beta$ -pozici je velmi vhodné využít triacetátem modifikovanou mikrokrystalickou celulózu (MTCA, microcrystalline cellulose triacetate). [15] [18] Dalšími z využívaných CSP pro tenkovrstvou chromatografii jsou molekulárně vtištěné polymery (MIP, molecularly imprinted polymers) s chirálními kavitami, nebo chirální stacionární fáze napuštěné komplexem různých chirálních selektorů. [19] [20]

Druhou z možností je využití kombinace achirální SF a **MF s přídavkem chirálního aditiva** (selektoru). Jako achirální stacionární fáze bývá velmi často využíván komerčně dostupný modifikovaný silikagel (C18). [21] Jako chirální selektor přidávaný do MF z důvodu úspěšné separace enantiomerů látek jako jsou alkoholy, aminokyseliny, flavonoidy a další, je velmi výhodné použít aditivum  $\beta$ -cyklodextrín. [15] [22] Jiným chirálním selektorem přidávaným do MF pro separaci enantiomerů je hovězí sérový albumin (BSA, bovine serum albumin). [23]

### 2.2.2.2 Plynová chromatografie

Další využitelnou chromatografickou technikou pro stereochemickou analýzu je plynová chromatografie (GC, gas chromatography). U této metody je SF ukotvena v kapilární koloně

a mobilní fáze je zde používána v plynném skupenství. Využití GC v praxi je však výrazně omezeno. [11]

Zde, u této techniky, lze pro separaci enantiomerů využít tři základní druhy CSP (Chiral Stationary Phases). První typ CSP je založen na tvorbě vícenásobných vodíkových vazeb a v praxi jsou často využívány diamidy aminokyselin. Druhý princip je založen na koordinační vazbě a tvorbě metalokomplexů. Třetí z využívaných SF jsou modifikované cyklodextríny. Modifikované dextríny lze jako CSP využít velmi dobře pro separační analýzu chirálních uhlovodíků jako jsou alkyly a cykloalkany. [15]

### **2.2.2.3 Vysokoučinná kapalinová chromatografie**

Nejčastěji v praxi využívanou chromatografickou technikou pro separaci enantiomerů je vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC, high performance chromatography). Možnosti jejího využití a základní charakteristiky jsou uvedeny v kapitole HPLC separace enantiomerů (kapitola 2.3).

### **2.2.2.4 Superkritická fluidní chromatografie**

Superkritická fluidní chromatografie (SFC, supercritical fluid chromatography) využívá k procesu separace mobilní fázi při teplotě a tlaku přesahujícím superkritický bod. Nejčastěji využívanou mobilní fáze je oxid uhličitý. [24] Velikou výhodou této techniky je nízká viskozita rozpouštědla v kombinaci s vysokým difuzním koeficientem. [25] Tento kombinovaný efekt vede k vyšší separační účinnosti a ke zkrácení času analýzy v porovnání s technikou HPLC. [26]

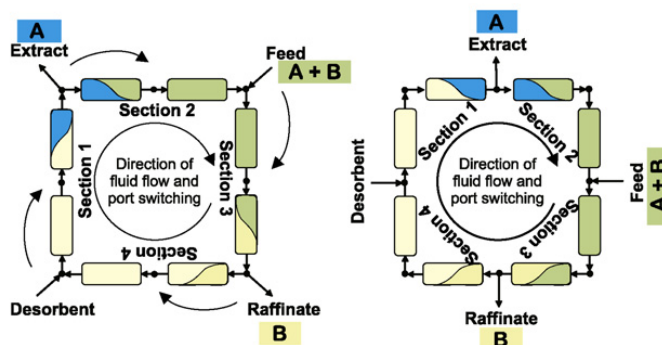
Při historicky první preparativní chirální separaci pomocí SFC, byl jako SF použit  $\gamma$ -mercaptopropylový silikagel, na který byl kovalentně navázaný (S) - N - (3,5 - dinitrobenzoyl) tyrosin. [11] Dalším z později využívaných typů SF je silikagel modifikovaný pomocí polysacharidů. [27]

### **2.2.2.5 Simulated moving bed**

Simulated moving bed (SMB) je kontinuální chromatografická separační technika, která k separaci enantiomerů využívá CSP stejné nebo velmi podobné těm, které jsou využívány v jiných chromatografických technikách. [11] Nejčastěji v praxi vyhledávanými CSP jsou polysacharidové CSP a dále také deriváty cyklodextrínu. [28] [29]

Největší odlišností této techniky v porovnání s HPLC je kontinuální proces separace (Obr. 5). Stacionární fáze je při aplikaci SMB pevně fixována na svém místě, v procesu separace však dochází k periodickým posunům přívodu a odtoku proudu mobilní fáze, které jsou umožněny díky rotujícímu ventilu. Právě tyto posuny simulují pohyb stacionární fáze v opačném směru, než proudí fáze mobilní a zapříčiňují tak kontinuální separaci analytů. Tato kontinuální separace slouží k efektivnějšímu rozdělení analytů, avšak instrumentace SMB techniky je velmi finančně nákladná. [11]

SMB je jednou z nejvíce využívaných chromatografických kontinuálních separačních technik, která má své důležité místo nejen v petrochemickém a v cukrářském průmyslu, ale také v aplikacích souvisejících s farmacií. [15] [30] Konkrétně ve farmacii se využívá menších rozměrů instrumentace, než tomu je v ostatních odvětvích průmyslu. [11]



Simulated Moving Bed (SMB) process

Obr. 5 : Kontinuální proces separace při využití SMB. [31]

### 2.2.2.6 Enantioselektivní membrány

Druhou z kontinuálních separačních metod enantiomerů je využití enantioselektivních membrán, které umožňují selektivní transport jednoho z enantiomerů. Enantioselektivního efektu může být dosaženo pomocí pevných nebo kapalných membrán. V obou případech je k separaci nutná přítomnost chirálního selektoru v membráně. [11]

V případě pevných membrán se jedná velmi často o imobilizaci chirálního selektoru na achirální rigidní struktuře membrány. Jako selektor bývá často využíván karbamát celulózy nebo různé aminokyseliny. [11] [32]

Výhodnější možností je však využití kapalných membrán, které umožňuje lepší modulaci a také optimalizaci separačních podmínek. Jako selektory jsou využívány chirální crown ethery nebo cyklodextríny. [11] [33] [34]

### 2.2.3 Elektromigrační metody separace chirálních látek

Mezi elektromigrační metody využívané k analýze chirálních látek patří především kapilární elektroforéza (CE), elektrokinetická chromatografie (EKČ) a micelární elektrokinetická chromatografie (MEKČ). Všechny tyto metody využívají principy kapilární elektroforézy. [11] [15]

Velmi často používaným chirálním selektorem v oblasti kapilární elektroforézy jsou makrocyclická antibiotika, především vankomycin. [35] Díky přidavku vankomycinu jako chirálního selektoru do základního elektrolytu bylo separováno velké množství chirálních látek. Mezi konkrétní příklady patří *N*-derivatizované aminokyseliny, analoga difenylbikarboxylátu, některých kyselých herbicidů nebo také léčiva loxiglumidu. [36] [37] [38] [32]

Často využívanými selektory v CE jsou i cyklodextríny. Jsou to látky velmi dobře komerčně dostupné, produkované především díky enzymům bakteriálního kmene *Bacillus*. [39] Cyklodextríny obsahují lipofilní kavitu, zatímco jejich vnější strana je hydrofilní. Tého vlastnosti je velmi dobře využívání při interakci cyklodextrínů s analytem. [40]

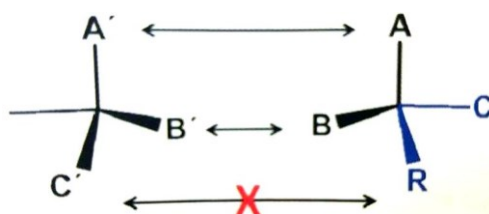
Dalšími selektory mohou být aminokyselinové polymerní surfaktanty, proteiny (BSA - Bovine Serum Albumine, HSA - Human Serum Albumine) nebo molekulárně vtištěné fáze (MIP). [41] [42] [43]

## 2.3 HPLC separace enantiomerů

HPLC technika je jednou z nejčastěji používaných metod sloužících k separaci enantiomerů. Separace enantiomerů je ale možná pouze po speciální úpravě stacionární nebo mobilní fáze. Pro realizaci tohoto procesu je v systému nutno zajistit chirální prostředí separace za použití chirálního selektoru. Chirální selektory jsou komerčně dostupné ve velmi širokém výběru. Mohou být syntetického, semisyntetického nebo přírodního původu. Mezi selektory syntetického (semisyntetického) původu se řadí chirální polyethery, methakrylátové polymery, derivatizované cyklodextríny, deriváty polysacharidů a modifikovaná makrocyclická antibiotika. Komerčně dobře dostupné jsou i chirální selektory přírodního původu, jako jsou cyklodextríny, makrocyclická antibiotika, proteiny nebo například polysacharidy. V praxi častěji využívanou variantou jsou semisyntetické a syntetické selektory z důvodu jejich vyšší selektivity v porovnání s přírodními. [8]

Existují dvě základní možnosti využití chirálních selektorů. Jedná se o přímý nebo nepřímý způsob separace enantiomerů.

**Přímá separace** je technika založená na tvorbě chirálního prostředí v systému pomocí přídavku chirálního selektoru (aditiva) do mobilní fáze nebo za použití chirálních stacionárních fází. Přídavek selektoru do mobilní fáze není způsobem příliš obvyklým. Hlavními důvody nižšího praktického využití jsou vysoké náklady na analýzu, snížená selektivita a účinnost separace a problémy spojené s možností rozkladu aditiv v mobilní fázi. Naopak využití chirálních stacionárních fází je principem velmi oblíbeným a v praxi nejvíce využívaným. Příklady využívaných CSP jsou uvedeny v kapitole 2.3.1. K dosažení separace dvou optických antipodů je zapotřebí třibodová interakce mezi analytem a stacionární fází s ukotveným chirálním selektorem. Tato interakce je znázorněna na obrázku 6. [8]



**Obr. 6 :** Znárodnění třibodové interakce analytu a stacionární fáze. [11]

**Nepřímá separace** je založena na principu derivatizace enantiomerů. Derivatizace probíhá chemickou reakcí mezi chirálním selektorem a párem enantiomerů. Důsledkem této reakce je vznik diastereoizomerů, které je možno separovat na běžných achirálních stacionárních fázích. Hlavní nevýhodou nepřímé separace je experimentální náročnost přípravy derivátů a nutnost využití téměř stoprocentně opticky čistého chirálního selektoru. Z tohoto důvodu je způsob nepřímé separace téměř zcela vytlačen jinými separačními technikami. [1] [8]

### 2.3.1 Chirální stacionární fáze

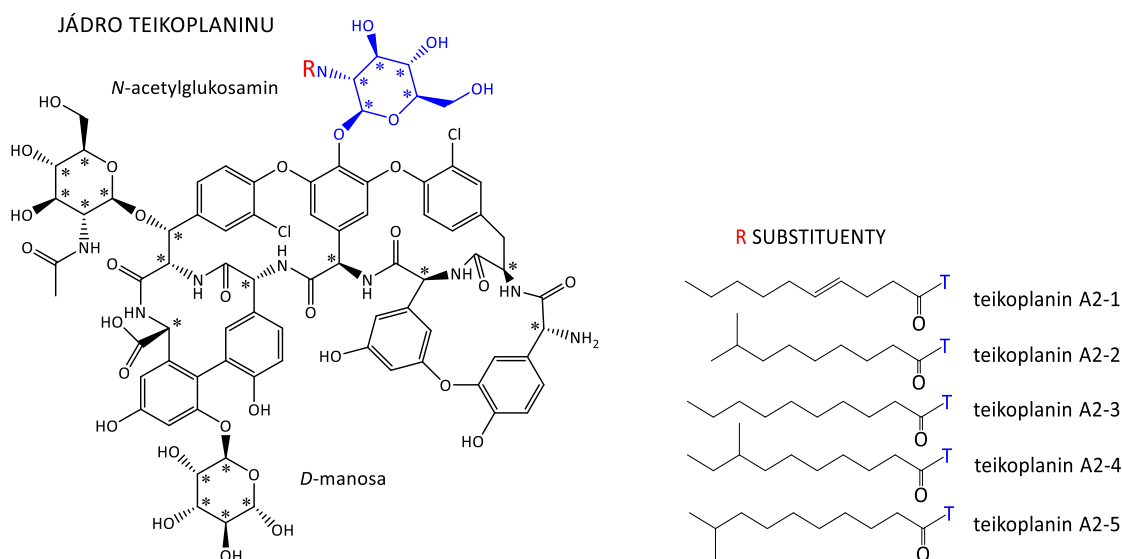
Jak již bylo zmíněno v předchozí kapitole, nejčastěji využívanou HPLC technikou pro chirální separaci je aplikace chirálních stacionárních fází. Jedná se o nejsnazší a zároveň nejoblíbenější způsob modifikace HPLC systému, který je nutné provést pro úspěšnou separaci enantiomerů. Správný výběr stacionární fáze je zásadní pro úspěšnost separace enantiomerů.

Mezi stacionárními fázemi se dnes vyskytuje velmi mnoho odlišných typů provedení. Jednou z nejčastěji používaných klasifikací chirálních stacionárních fází je rozdělení CSP podle jejich struktury na makrocyclická antibiotika, polysacharidy, cyklodextríny, chirální crown ethery a proteiny. Existuje ale i řada jiných v praxi méně využívaných stacionárních fází umožňujících separaci enantiomerů. Příkladem jsou glykoproteinové stacionární fáze spojené z řady L - aminokyselin, nebo selektory Pirklova typu, které je možno zařadit mezi donor - akceptorové stacionární fáze, nebo také molekulárně vtištěné polymery a mnoho dalších. [15] [44]

### 2.3.1.1 Makrocyclická antibiotika

První a velmi často využívanou skupinou stacionárních fází pro chirální HPLC separaci jsou makrocyclická antibiotika. Jako chirální stacionární fáze z této skupiny jsou využívány **teikoplanin**, **vankomycin** a **ristocetin A**. Tyto makrocyclická antibiotika jsou fermentačními produkty *Actinomyces teichomyceticus*, *Streptomyces orientalis* a *Nocardia lurida* a jsou kovalentně vázána na silikagel. Pro chirální separaci je velmi důležité, že obsahují velký počet chirálních center. Konkrétně teikoplanin obsahuje 23 chirálních center (Obr. 7), vankomycin 18 a ristocetin A 37 chirálních center. [8]

Všechna tři antibiotika se skládají z „aglykonové misky“ tvořené makrocyclickým kruhem a z peptidického řetězce s navázanými cukernými jednotkami. Aglykony vankomycinu a teikoplaninu, na rozdíl od ristocetinu A, obsahují dva chlórem substituované aromatické kruhy. Vankomycin je z výše uvedených antibiotik nejmenší a obsahuje tři makrocyclické kruhy, zatímco ristocetin a teikoplanin obsahují čtyři makrocyclické kruhy. Specifikací struktury teikoplaninu jsou tři monosacharidové jednotky (dvě jednotky glukosaminu a jedna jednotka manózy). Obě jednotky glukosaminu jsou N - acetylované. [11]



**Obr. 7 : Struktura teikoplaninu.**

Schopnost separace enantiomerů je u této skupiny chirálních selektorů umožněna díky různým mechanismům interakce analytu se stacionární fází. Mezi základní mechanismy uplatňující se při interakci analytů s makrocyclickými antibiotiky patří interakce dipól - dipól,

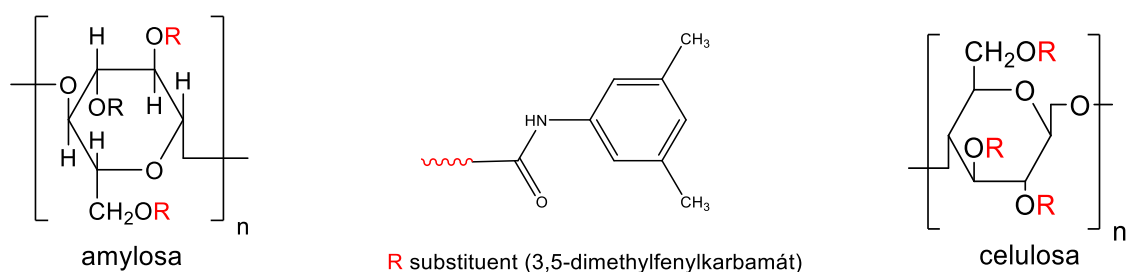


vodíkové můstky, van der Waalsovy interakce a sterické efekty. Velmi často dochází při interakci analytu se SF ke kombinaci výše uvedených mechanismů. [1]

Úspěšnost separace enantiomerů je rovněž ovlivněna složením a zvoleným pH mobilní fáze. Důležitou roli v procesu separace může hrát i přidavek organického modifikátoru do MF nebo nastavení hodnoty teploty kolonového termostatu [8]

### 2.3.1.2 Polysacharidové chirální stacionární fáze

V praxi často využívanými stacionárními fázemi jsou i přírodní polysacharidy. V této skupině nalezy uplatnění z důvodu vlastní optické aktivity převážně sacharidy amylosa a celulóza (Obr. 8). Polymer celulózy se skládá z 200 – 1400 jednotek glukosy spojených  $\beta$ -1,4-glykosidickou vazbou, zatímco polymer amylozy obsahuje 500 – 20000 glukosových jednotek spojených  $\alpha$ -1,4-glykosidickou vazbou. [8]



**Obr. 8 :** Struktury amylozy, celulózy a 3,5 – dimethylfenylkarbamátu.

Z důvodu nízké selektivity a problematické manipulace se samotnou celulózou a amylozou nalezy své široké uplatnění především chemické deriváty těchto sloučenin. Derivatizace probíhá na volných hydroxylových skupinách těchto polysacharidů. Existuje celá řada různých chemických derivátů celulózy a amylozy, které se využívají jako chirální selektory v HPLC. K vybraným příkladům patří estery jako je acetát, benzoát a 4-methylfenylbenzoát, dále fenylkarbamáty jako jsou fenylkarbamát, 4-methylfenylkarbamát, 3,5-dimethylfenylkarbamát (Obr. 8), 4-chlorofenylkarbamát a další. První možností ukotvení derivatizovaných polysacharidů je pouhé nanesení jejich vrstvy na silikagel (tzv. coating), druhou možností je ukotvení na silikagel pomocí kovaletní vazby. [8] [15] [45]

Správný výběr chemických derivátů celulózy a amylozy pro chirální separaci enantiomerů dané struktury je však velmi obtížný, protože na procesu interakce se stacionární fází se podílí velké množství aspektů. Často se jedná o interakci s pouze jednou funkční skupinou, jindy jde o geometrické uspořádání molekuly.

Úspěšnost separace je podobně jako u makrocyclických antibiotik velmi ovlivněna volbou složení mobilní fáze a konkrétní strukturou separovaných enantiomerů. Reverzní eluční mód (kapitola 2.3.2) vykazuje obecně lepší selektivitu separace v porovnání s normálním elučním módem, jelikož v normálním módu dochází k potlačení tvorby vodíkových vazeb mezi analytem a mobilní fází. Reverzní mód tedy vykazuje vyšší potenciál úspěšné chirální separace. [8]



### 2.3.1.3 Cyklodextrínové stacionární fáze

Další chirální stacionární fázi, jež vzniká enzymatickou hydrolýzou v bakteriích rodu *Bacillus*, jsou cyklodextríny. Cyklodextríny jsou cyklické oligosacharidy složené z D - glukosových jednotek, které jsou vzájemně propojeny  $\alpha$  - 1,4 - glykosidickou vazbou. Nejvýznamnějšími zástupci jsou  $\alpha$  - **cyklodextrín**, složený ze šesti glukosových jednotek,  $\beta$  - **cyklodextrín** se sedmi glukosovými jednotkami a  $\gamma$  - **cyklodextrín** obsahující dokonce osm glukosových jednotek. Velmi často dochází u cyklodextrínů také k derivatizaci, a tím ke zvýšení separační účinnosti těchto stacionárních fází. [46]

Pokud bychom se podívali na geometrické uspořádání glukosových jednotek, jedná se o dutý kužel (kavitu), kde se na vnějším širším okraji kavity nachází sekundární hydroxylové skupiny a na užším okraji jsou přítomny primární hydroxylové skupiny. Vnější část kavity je tedy hydrofilní a vnitřní část je částí lipofilnější, jelikož se zde nachází etherické kyslíky a vodíky. [8]

Principem interakce analytu se stacionární fází je nejčastěji vniknutí nepolární části molekuly do kavity a následný vznik inkluzního komplexu. Pro vznik komplexu je zásadní velikost kavity a velikost molekuly analytu. Tento jev probíhá velmi dobře v polárních rozpouštědlech, mezi které se řadí především voda a na úspěšnost separace má velký vliv i pH mobilní fáze. [8]

### 2.3.1.4 Chirální crown - ethery

Chirální crown - ethery jsou makrocyclické polyethery obsahující ethylenoxidový můstek (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-). Počet ethylenoxidových můstků určuje velikost kavity tvořené crown - ethery, podobně jako již dříve zmíněné cyklodextríny. Atomy kyslíků v molekule hrají roli donorových ligandů elektronů. Crown - ethery jsou sami o sobě molekulami achirálními. Chirálními se stávají až po začlenění některé z chirálních molekul do jejich struktury. Těchto molekul je celá řada, například 1,1 - binaftyl. [8]

Chirální crown - ethery bývají ve stacionární fázi často vázány na silikagel nebo na polystyren. Jako chirální stacionární fáze jsou úspěšně využívány (3,3,difenyl - 1,1, - binaftyl) - 20 - crown - 6 - ether, (+) - (18 - crown - 6) - 2,3,11,12 - tetrakarboxylová kyselina nebo i kombinace dvou výše zmíněných CSP. Interakce analytu s chirálními crown - ethery může být velmi zásadně ovlivněna složením mobilní fáze, volbou jejího pH a zvolenou teplotou kolonového termostatu. [8] [15]

## 2.3.2 Mobilní fáze

Jelikož je HPLC separace enantiomerů založena na principu interakce analytu se stacionární a mobilní fází, je při vývoji metody HPLC separace enantiomerů velmi důležitý nejen správný výběr chirální stacionární fáze, nýbrž i vhodná volba fáze mobilní. Dle výběru rozpouštědel použitých jako mobilní fáze, lze metody separace rozdělit do třech základních elučních módů. Jedná se o normální eluční mód, eluční mód polárně - organický a eluční mód reverzní. [8]

### 2.3.2.1 Eluční módy

Prvním z elučních módu je **mód reverzní**. Pro tento mód je typické využití mobilních fází obsahujících vodnou složku. Vodné pufry jsou velmi často používány ve směsi s acetonitrilem, methanolem, ethanolem nebo propanolem. Obvykle používané pufry lze rozdělit do dvou skupin. První skupinou jsou anorganické soli (fosforečnany, chloristany, sírany), zástupci druhé skupiny jsou organické soli (mravenčany, octany a další). V tomto módu nacházejí uplatnění především iontové interakce, sterické interakce a tvorba vodíkových můstků.

Druhým z elučních módu je **mód polárně organický**. V tomto módu jsou s oblibou využívána organická rozpouštědla (acetonitril a methanol), velmi často s přídavkem organických kyselin (octová, mravenčí, trifluoroctová) a organických bází jako je triethylamin. I zde stejně jako v módu reverzním nacházejí uplatnění jak iontové interakce, tvorba vodíkových můstků, tak sterické interakce. Důležitou výhodou polárně organického módu je snadné propojení s MS detekcí, protože výše uvedená rozpouštědla vyžítá jako MF lze velmi snadno v iontovém zdroji převést do plynného skupenství.

Třetím elučním módem je **mód nepolární** (někdy označovaný i jako normální). Zde nacházejí své uplatnění rozpouštědla nepolární (*n*-alkany) velmi často s přídavkem nižších alkoholů. Tato rozpouštědla ovlivňují především  $\pi - \pi$  interakce a dipólové interakce. [8]

Výběr elučního módu závisí velmi často na konkrétní rozpustnosti separovaných analytů. Pokud je analyt dobře rozpustný ve vodě, je vhodné zvolit mód reverzní. Pokud je však analyt lépe rozpustný v organickém rozpouštědla, pak jsou lepší volbou módy nepolární a polárně organický. Obecně úspěšnost separace klesá v pořadí reverzní mód > polárně organický mód > nepolární mód. [8]

### 2.3.2.2 Typy eluce

V HPLC separaci analytů je možno využít dva odlišné typy eluce: isokratická a gradientová eluce. Zatímco **isokratická eluce** probíhá za konstantního složení mobilní fáze a v průběhu celé analýzy nedochází tedy ke změně eluční síly MF, při **gradientové eluci** dochází k programové změně složení mobilní fáze ve prospěch silnější eluční složky. Isokratická eluce je vhodná pro analyty s podobnými fyzikálně - chemickými vlastnostmi, kdy je možno dosáhnout separace velmi podobných struktur různých analytů. Volba gradientové eluce je naopak výhodná při výrazně odlišných fyzikálně - chemických vlastnostech separovaných analytů a často vede ke zkrácení doby analýzy v porovnání s elucí isokratickou. [8] [47]

### 2.3.2.3 Chaotropní činidla

Pro chirální HPLC separaci enantiomerů je velmi výhodnou variantou využití přídavku tzv. chaotropních činidel do mobilní fáze. Jako chaotropní činidla jsou v HPLC separaci obvykle využívány malé anorganické ionty. Jejich přítomnost ve vodné mobilní fázi způsobí narušení vodíkových můstků a zároveň zavádí chaos do iontové struktury molekuly. Přídavek chaotropních činidel může rovněž způsobit snížení hodnoty chvostování píku nebo také způsobit kompresi píku a vylepšit tak celkovou symetrii píku. Přesný mechanismus působení chaotropních činidel je však velmi nejasný. Velikost vlivu přídavku chaotropních činidel do mobilní fáze při HPLC separaci analytů však velmi výrazně závisí na strukturách separovaných analytů a na konkrétní volbě HPLC stacionární fáze. [48]

## 2.4 Alzheimerova nemoc

### 2.4.1 Historie Alzheimerovy nemoci

Vše začalo v listopadu roku 1901, kdy byla na psychiatrickou kliniku ve Frankfurtu nad Mohanem přivezena pacientka, paní Auguste D., která byla svěřena do péče německému psychiatrovi Aloisi Alzheimerovi. Pacientka trpěla poruchami spánku, paranoidními představami a výpadky paměti. [49]

Alois Alzheimer se již od počátku hospitalizace paní Auguste D. velmi intenzivně věnoval studiu a dokumentaci zdravotního stavu své pacientky. Zdravotní stav pacientky se s postupem času velice zhoršoval, až 8. dubna roku 1906 Auguste umírá s diagnózou těžké demence. Po smrti pacientky objevil Alzheimer v jejím mozku senilní plaky a neuronální klubka. [49] Toto pozorování, které objevil, bylo odlišné od klinických změn při běžném stárnutí mozku, a proto jeho spolupracovníci navrhli, aby výše uvedené onemocnění neslo jméno právě Aloise Alzheimerera. [50]

První oficiální zmínka o Alzheimerově nemoci se datuje k listopadu roku 1906, kdy Alois Alzheimer zveřejnil výsledky svého pozorování pacientky Auguste D. na přednášce v Tübingenu. [49]

### 2.4.2 Vznik a patofyziologie Alzheimerovy nemoci

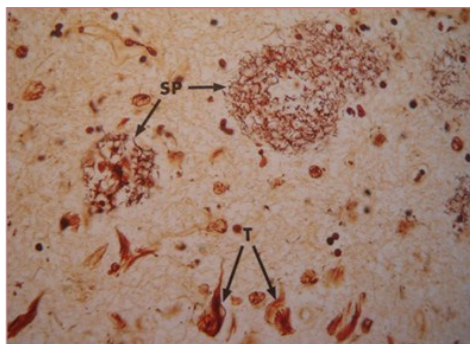
Alzheimerova nemoc je nejčastěji vyskytujícím se typem demence (latinsky: „*demens*“, *de* = mimo, od; *mens* = mysl, duch) a je současně s nemocí Parkinsonovou řazena mezi degenerativní onemocnění CNS. Společným projevem těchto nemocí je progresivní degenerace neuronů ve specifických oblastech mozku a míchy s následnými změnami v bílé hmotě mozkové. [51]

U degenerativních onemocnění často dochází k poškození pouze určité skupiny neuronů a svazků nervových drah. Tyto choroby lze tedy třídit dle převažujícího postižení na onemocnění míchy, mozkové kůry, mozečku, kmene mozkového a poškození bazálních ganglií. U Alzheimerovy nemoci se jedná převážně o poškození mozkové kůry, nemoc Parkinsonova se řadí mezi onemocnění postihující bazální ganglia. [52]

Na vzniku Alzheimerovy nemoci se pravděpodobně podílejí velkou mírou jak vlivy genetické, tak rovněž faktory prostředí. Mezi faktory, které pochází z prostředí a ovlivňují vznik a progresi tohoto onemocnění patří především viry, priony, toxiny vstupující do mozku cestou čichových nervů, stres a další faktory, se kterými se člověk během života setká. [51] [53]

U některých pacientů se na chromozomu 21 vyskytuje genetický defekt bílkovinného prekursoru  $\beta$ -amyloidu, který je odbouráván na amyloidové peptidy o délce 39 až 43 aminokyselinových zbytků. [53] [54] Vznikající peptidy se mohou spojovat v proteinová vlákna dlouhá 7 – 10  $\mu\text{m}$ . Tato vlákna poté agregují s ApoE4 (apoenzym E4), proteoglykany a s  $\alpha$ 1-antichymotrypsinem a následně vznikají senilní plaky o průměru desítek až stovek  $\mu\text{m}$ . Senilní plaky jsou velmi častým nálezem na mozku pacientů postižených Alzheimerovou chorobou. V placích jsou dále obsaženy deformované dendrity a axony s abnormálními intracelulárními neurofibrilami označovanými jako neuronální klubka. Tyto patofyziologické jevy

je možné vidět na obrázku 9, kde je zobrazena poškozená mozková kůra pacienta trpícího Alzheimerovou nemocí. [53]



**Obr. 9 :** SP – senile plaques (senilní plaky), T - tangles (neuronální klubka). [55]

Depozita  $\beta$  - amyloidu se vyskytují i u dalších onemocnění, spojených s genetickou odchylkou na 21 chromozomu. Příkladem takové odchylky je trisomie 21. chromozomu, která se velmi úzce pojí s Downovým syndromem. [53]

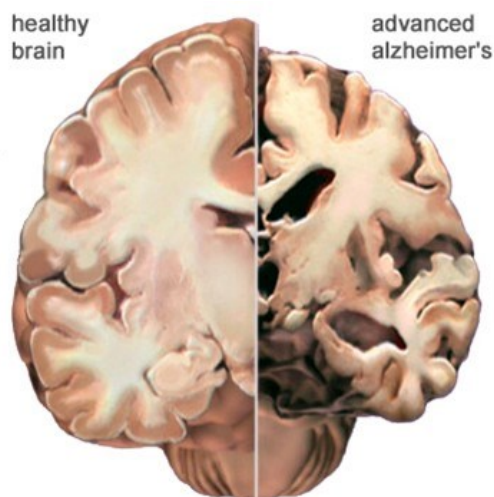
Zajímavé je i porovnání fyzikálních a biochemických parametrů  $\beta$  - amyloidu nalezeného v lidském mozku s  $\beta$  - amyloidem nalezených v mozku modelových zvířat. Například u šimpanzů byl nalezen výrazně lépe rozpustný  $\beta$  - amyloid, než je  $\beta$  - amyloid nacházející se u pacientů trpících Alzheimerovou nemocí. [56]

Výše uvedené  $\beta$  - amyloidové peptidy mohou také reagovat s receptory na povrchu buněk. Po reakci dojde k porušení buněčné membrány a následně se z buňky uvolní volné kyslíkové radikály, které prostřednictvím depolarizace buněčné membrány mohou zvyšovat neuronální intracelulární koncentraci  $\text{Ca}^{2+}$ . Kyslíkové radikály společně s vyšší koncentrací vápenatých iontů zapříčiňují hromadnou buněčnou smrt neuronů s následně vznikajícím zánětem, který významně poškozuje další neurony v okolí. [54]

Společně se zánikem neuronů klesá i koncentrace cholin - acetyltransferázy, enzymu nutného pro syntézu jednoho z nejdůležitějších neurotransmiterů v mozku, acetylcholinu. S přibývajícím počtem poškozených neuronů klesá nejen koncentrace acetylcholinu, ale i koncentrace dalších neurotransmiterů, jako je noradrenalin, serotonin, neuropeptid Y a další. [53]

Dalším ze zásadních patofyziologických jevů vyskytujících se u Alzheimerovy choroby je hromadění tau ( $\tau$ ) proteinu v mozkové tkáni. U člověka postiženého Alzheimerovou nemocí je na rozdíl od zdravého jedince tento protein hyperfosforylován. Z důvodu hyperfosforylace dochází tedy k shlukování a hromadění  $\tau$  - proteinu v neuronálních buňkách a k chybnému přenosu nervového vzruchu. [57]

Často se vyskytujícím příznakem Alzheimerovy nemoci je i atrofie mozku a atrofie korových nervů (Obr. 10). Ke změnám dochází v různé míře v celé kůře mozkové. Nejvíce však bývají postiženy frontální, parietální a temporální laloky. [51] [52]

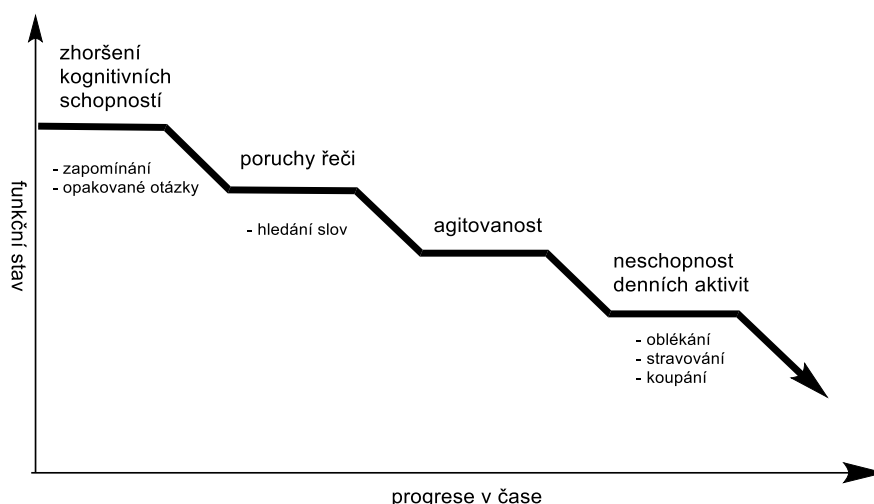


**Obr. 10 :** Porovnání zdravé mozkové kůry (vlevo) s atrofovanou mozkovou kůrou (vpravo). [55]

### 2.4.3 Klinické projevy

Klinicky se u pacientů objevuje zánik duševních schopností a progresivní chátrání těla. [52] Z počátku nemoci se vyskytují pomalé výpadky paměti, zmatenost a chybná rozhodnutí. S rozvojem nemoci dochází velmi často k anterográdní amnézii. S rostoucí progresí nemoci dochází k motorickým výpadkům, jako např. poruchy řeči, ataxie, anomálie svalového tonu a hyperkineze, později dochází k nedbalosti při oblékání a osobní hygieně (Obr. 11) [53] Závažnost klinického stavu pacienta velmi dobře koreluje s nalezenou koncentrací  $\beta$  - amyloidu. [56]

Dále se u pacientů vyskytují poruchy kognitivních funkcí, halucinace a případně i ztráta sebekontroly. Těchto změn s rostoucím věkem přibývá. V průběhu onemocnění může dojít u pacientů i k úplné dezorientaci a k nemožnosti komunikace s ostatními lidmi. [51] [58]. Choroba ve své finální fázi způsobí většinou smrt pacienta. [59]



**Obr. 11 :** Obvyklý průběh Alzheimerovy choroby v čase. [59]

V roce 2014 byl počet pacientů s diagnostikovanou Alzheimerovou chorobou odhadován na 35 milionů. Dle odhadů odborníků by se do roku 2050, v souvislosti se zvyšujícím se věkem populace, mohl počet diagnostikovaných pacientů s touto nemocí až ztrojnásobit. [58]

## **2.5 Léčba Alzheimerovy nemoci**

### **2.5.1 Cíl léčby**

Při rozhodování o léčbě je kladen důraz na etiologii demence, její pokročilost, závažnost poruch chování a na současný výskyt komorbidit. Léčebný plán je volen vždy individuálně a ve spolupráci s nemocným i jeho rodinou.

Z počátku onemocnění je velmi důležitým faktorem přesná diagnostika. Hlavním cílem je tedy snaha zahájit správnou léčbu již v počáteční fázi onemocnění a vylepšovat deficit kognitivních funkcí.

V pozdější fázi onemocnění je cílem léčby zpomalit progresi choroby a pokusit se o co nejdelší udržení soběstačnosti pacienta. Při hodnocení vhodnosti nasazené léčby se hodnotí nejen kognitivní funkce ale i schopnost pacienta pečovat o sebe sama, schopnost vykonávat běžné činnosti a v neposlední řadě i zátěž, kterou pacient přináší svému pečovateli. Klinicky se hodnotí specifické biomarkery a díky emisní tomografii i aktuální množství amyloidových plaků v mozku.

Ve finální fázi je kladen důraz na paliativní postupy a pečovatelskou službu. [59]

### **2.5.2 Nefarmakologická opatření**

Při nefarmakologickém přístupu k léčbě demence je třeba sledovat a případně i léčit faktory, které průběh tohoto onemocnění zhoršují. Mezi tyto faktory patří metabolické poruchy (diabetes), infekce různé etiologie, hypertenze, či např. malnutrice. Je doporučován denní příjem 35 kcal/kg, příjem vitamínů skupiny B, kyseliny listové a selenu. [59]

Důležité je také udržovat pravidelný denní režim a omezit radikální změny. Rutina napomáhá udržení samostatnosti a soběstačnosti pacienta. Velmi prospěšná je i pravidelná fyzická aktivita. Pečovatel by měl poskytovat pouze nejnutnější péči, která odpovídá stupni postižení pacienta. [59]

### **2.5.3 Současná farmakologická terapie**

Jelikož velmi významným rysem Alzheimerovy choroby je nedostatečná cholinergní aktivita CNS, způsobená výrazným snížením hladiny jednoho z hlavních neuromediátorů, acetylcholinu, je současná farmakoterapie zaměřena především na skupinu cholinergik. Hlavní příčinou poklesu koncentrace acetylcholinu v synapsích je snížená aktivita cholinacetyltransferázy, enzymu zodpovědného za syntézu acetylcholinu.

Acetylcholinesteráza je naopak enzym, jehož hlavní funkcí je rozklad acetylcholinu v synapsích. Z důvodu navýšení koncentrace acetylcholinu v synapsích byly do praxe zavedeny centrální inhibitory acetylcholinesterázy. První skupinou léčiv používanou v klinické praxi jsou tedy centrální inhibitory acetylcholinesterázy (AChE). [58] [60] Mezi zástupce registrované v České republice patří rivastigmin, galantamin, 7 - methoxytakrin a donepezil. [61] [62]

Druhou, ze skupin léčiv uplatňujících se ve farmakoterapii Alzheimerovy choroby, jsou inhibitory *N* - methyl - *D* - aspartátových (NMDA) receptorů. Registrovaným zástupcem této skupiny léčiv je memantin. K aktivaci NMDA receptorů dochází při zvýšené hladině excitotoxicky působící kyseliny glutamové, která je přítomna v mozku při Alzheimerově nemoci. Memantin brání této aktivaci navázáním své molekuly uvnitř kanálu receptoru. [58] [59] [60] [61] [62]

### 2.5.3.1 Strategie léčby

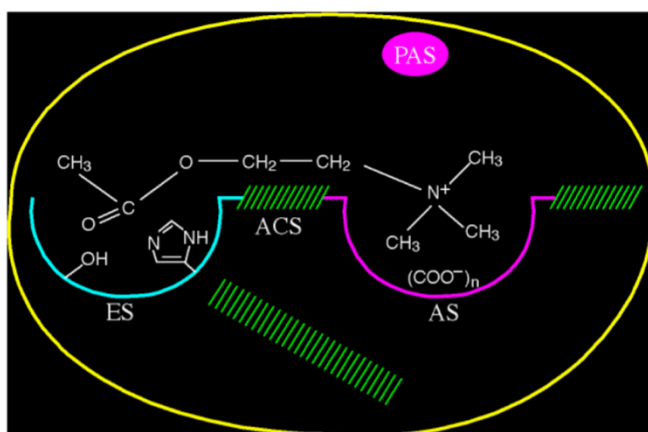
I strategie léčby se odvíjí převážně dle aktuálního stavu pacienta. Pokud se pacient nachází v počáteční či středně těžké fázi progresu onemocnění, jsou klíčbě indikovány centrální inhibitory cholinesterázy, jako např. rivastigmin, či galantamin. Při těžké demenci bývá od lékaře většinou předepisován memantin. [59]

Účinek všech léčiv, která jsou prozatím uvedená do praxe, je pouze symptomatický a neřeší ani etiologii, ani progresi Alzheimerovy choroby. Uvedená léčiva slouží převážně ke zlepšení kvality života pacientů. [58]

### 2.5.3.2 Centrální inhibitory acetylcholinesterázy

Mechanismus účinku této skupiny léčiv spočívá v centrální inhibici enzymu AChE. Díky inhibici enzymu je acetylcholinesteráza bráněna v rozkladu neuromediátoru acetylcholinu, a ten je následně v synaptických spojích přítomen v dostatečném množství pro účinný přenos signálu v CNS. Pokud by acetylcholinesteráza inhibována nebyla, došlo by k okamžitému rozkladu acetylcholinu na cholin a acetát, a tedy i k výraznému nedostatku acetylcholinu v nervových synapsích. [58] [59] [60]

Molekula AChE se skládá ze dvou proteinových řetězců, řetězce  $\alpha$  a  $\beta$ . V  $\beta$ -řetězci se nachází  $\beta$ -anionické místo a  $\gamma$ -anionické místo, které je oblastí hydrofobních interakcí. V  $\alpha$ -řetězci se nachází aktivní místo enzymu, kde dochází k rozkladu acetylcholinu. Aktivní místo je tvořeno  $\alpha$ -anionickým místem (karboxylem aspartátové nebo glutamové kyseliny) a **estratickým centrem** (hydroxylem aminokyseliny serinu). Na obrázku 12 je znázorněno strukturální uspořádání molekuly AChE. [60] [63]



**Obr. 12** : Strukturální uspořádání AChE (ES: estratické centrum, AS: anionické místo) [63]

Nejpravděpodobnější teorií je, že při interakci acetylcholinu s AChE nejprve dochází k tvorbě iontové vazby mezi amoniovou skupinou acetylcholinu a  $\alpha$ -anionickým místem enzymu, nelze však vyloučit, že pro vazbu jsou důležitější hydrofobní interakce mezi molekulami. Acetylcholin, který je vázán k molekule AChE, je poté degradován na cholin a zbytek kyseliny octové. Cholin se velmi snadno uvolní a zbytek kyseliny octové se naváže na hydroxyl serinu v estratickém centru. Vzniká teda acetylovaná AChE, která je během zlomků vteřiny reaktivována hydrolytickým odštěpením kyseliny octové. [60]

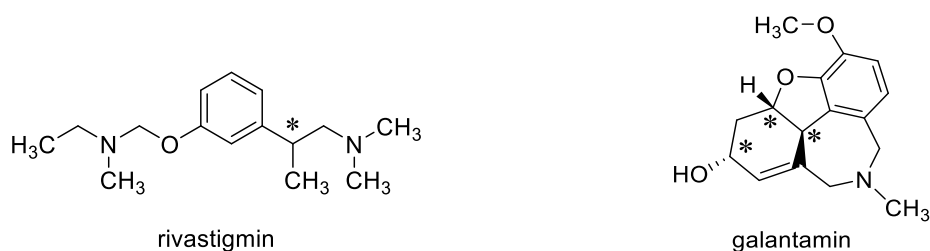
Centrální inhibitory AChE lze rozdělit dle způsobu interakce s aktivním místem AChE do dvou podskupin. Kompetitivní inhibitory AChE reagují přímo s aktivním místem AChE. Nekompetitivní inhibitory AChE interagují s jinou částí molekuly, ovlivňují však konformaci aktivního místa a tím znemožňují přístup substrátu do aktivního místa. [58]

### 2.5.3.2.1 Kompetitivní inhibitory AChE

Nejdůležitějšími a klinicky užívanými zástupci této skupiny jsou rivastigmin a galantamin.

**Rivastigmin** (Obr. 13 vlevo) je účinná látka, zavedená do praxe roku 2000. Jeho formou použití je z důvodu lepší rozpustnosti převážně sůl (tartarát). Základem struktury je kyselina karbamová a terciární aminoskupina, která umožňuje přestup léčiva přes hemato - encefalickou bariéru a z toho plynoucí působení v CNS. [58] Toto léčivo blokuje funkci AChE po dobu 10 hodin způsobem reverzibilní inhibice (karbamylace) jejího aktivního místa na řetězci  $\alpha$ . Rivastigmin je zástupcem stabilizované, efektivní a dlouhotrvající symptomatické léčby Alzheimerovy nemoci. [64]

**Galantamin** (Obr. 13 vpravo) je účinná látka zavedená do praxe roku 2001, ale k její izolaci došlo již v 50. letech 20. století ze sněženky Woronovy (*Galanthus woronowii*). [65] Jeho hlavní výhodou je dobré vstřebávání po perorálním podání, nevýhodou je však tvorba zásobního depa v tukové tkáni. [58] Galantamin patří nejen do skupiny inhibitorů AChE, ale jeho účinek zvyšuje také alosterická modulace nikotinových receptorů, která zapříčiní zvýšení efektivity přenosu nervového vzruchu. [66] Galantamin účinkuje také na periferní nervový systém, z čehož plynou vedlejší gastrointestinální potíže. Tyto potíže je však možné odstranit současným podáním prokinetika itopridu. [59]



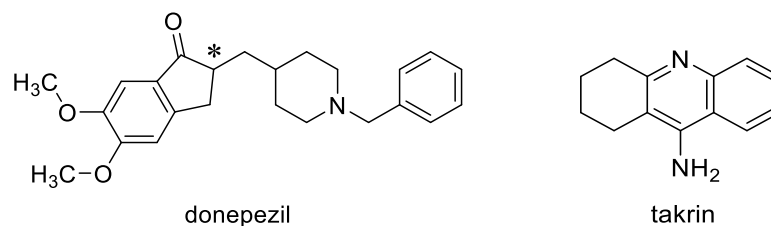
**Obr. 13 :** Struktury kompetitivních inhibitorů AChE.

### 2.5.3.2.2 Nekompetitivní inhibitory AChE

Prvním ze zavedených nekompetitivních inhibitorů AChE byl v roce 1993 **takrin** (Obr. 14 vpravo). Velmi brzo po zavedení léčiva do praxe dochází i k jeho stažení z trhu z důvodu hepatotoxicity a vedlejších gastrointestinálních potíží. Základem jeho struktury je akridinový skelet. Kromě AChE působí takrin také na nikotinové a muskarinové receptory na monoaminoxidázy nebo také na zpětné vstřebávání (reuptake) serotoninu. [58]

V roce 1996 je do praxe zaváděn **donepezil** (Obr. 14 vlevo) a dodnes platí, že je jedním z neúčinnějších centrálních inhibitorů AChE. Jeho stabilita, účinnost a prospěch při léčbě byl dokázán na mnoha výsledcích různých testů. Donepezil má antioxidační aktivitu a zabraňuje také ukládání  $\beta$  - amyloidu v CNS. Při jeho použití je výhodou dobrá biologická dostupnost, dlouhý poločas účinku a téměř žádné vedlejší účinky. [58] [67]

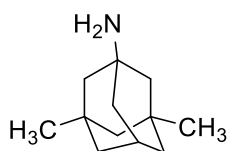




**Obr. 14 :** *Struktury nekompetitivních inhibitorů AChE.*

### 2.5.3.3 Inhibitory NMDA receptorů

Jedinou v České republice registrovanou účinnou látkou patřící do skupiny inhibitorů NMDA receptorů, používaných jako léčiva na Alzheimerovu nemoc, je **memantin** (Obr. 15). Tato molekula je derivátem adamantanu a byla zavedena na trh v roce 2002. [58] Užívání memantinu slouží jako prevence k patologickému nárůstu koncentrace vápenatých iontů a ke snížení hladiny oxidačního stresu v postsynaptických neuronech. [68] Léčba memantinem vede ke zlepšení kognitivních funkcí a ke zpomalení progresu Alzheimerovy choroby. [59]



**Obr. 15 :** *Struktura memantinu.*

## 2.5.4 Skupiny potenciálních léčiv Alzheimerovy nemoci

Z výše uvedených kapitol vyplývá, že aktuálně klinicky zavedená léčiva působí pouze na kognitivní funkce a zpomalují progresi Alzheimerovy nemoci. Z tohoto důvodu jsou v různých fázích výzkumu velmi intenzivně testována nová léčiva, která by zasahovala do patogenetického mechanismu Alzheimerovy nemoci. [59] [69]

Jedním z přístupů při syntéze nových molekul je MTDL (Multi - Targed - Directed - Ligand). Principem tohoto přístupu je kombinace více různých terapeutických účinků u jedné molekuly léčiva. V praxi se může tento způsob promítnout například spojením dvou odlišných molekul, kdy každá má svůj terapeutický benefit a vzájemným propojením těchto molekul poté vzniká molekula hybridní. Po spojení molekul je nutno otestovat, zda jsou i v hybridní sloučenině zachovány jejich původně zamýšlené účinky. [69] [70]

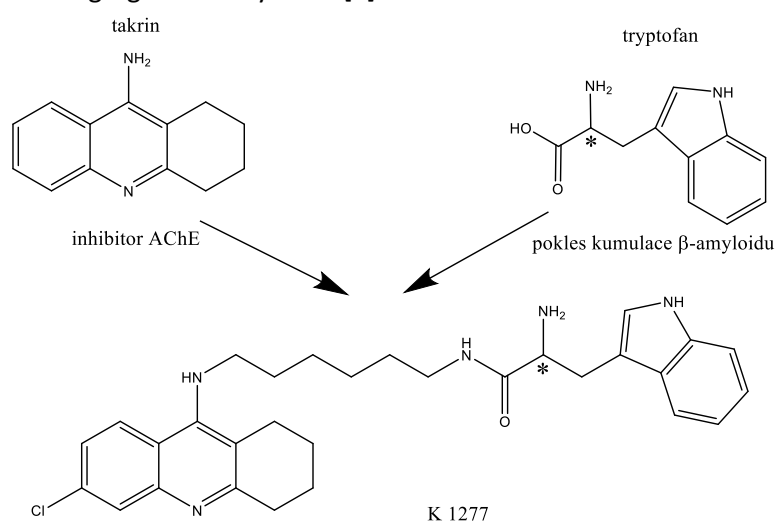
### 2.5.4.1 Hybridní molekuly takrinu

Jednou z konkrétních možností MTDL při organické syntéze je propojení molekuly takrinu, léčiva Alzheimerovy choroby staženého z trhu z důvodu toxicity a molekuly, která má jiný podpůrný účinek při zásahu do léčby Alzheimerovy nemoci (např. antioxidační účinky). Tímto spojením molekul vznikají sloučeniny označované jako hybridní sloučeniny takrinu. Příkladem takto syntetizovaných hybridních sloučenin působících jako potenciální léčiva proti Alzheimerově chorobě jsou hybridy takrin - tryptofan, takrin - trolox, takrin - donepezil, takrin - kumarin, takrin - amantadin, takrin - adamantylamin, takrin - chinon, takrin - kyselina ferulová a další. [69 - 76]

### 2.5.4.2 Hybridní molekuly takrin - tryptofan

Mezi nově testované hybridní molekuly patří také hybridní sloučeniny **takrin - tryptofan**. Tento typ molekul byl syntetizován v roce 2016 na Katedře toxikologie a vojenské farmacie Fakulty vojenského zdravotnictví Univerzity obrany v Hradci Králové. Syntéza spočívala ve spojení dvou odlišných struktur takrinu a tryptofanu pomocí dlouhého více uhlíkatého řetězce (Obr. 16). Molekula **takrinu** do hybridní molekuly vnáší schopnost inhibovat acetylcholinesterázu a molekula **tryptofanu** umožňuje pokles akumulace  $\beta$  - amyloidových plaků. Tryptofan způsobuje rovněž vylepšení paměťových funkcí. [5]

V laboratořích organické syntézy bylo syntetizováno 20 hybridních sloučenin, které byly následně postupně testovány jako inhibitory lidské acetylcholinesterázy (butyrylcholinesterázy), tedy i jako potenciální léčiva Alzheimerovy choroby. Sloučeniny takrin - tryptofan vykazují *in vitro* přestup přes simulovanou hematoencefalickou bariéru a dále u nich byla prokázána schopnost inhibovat agregaci  $\beta$  - amyloidu. [5]



**Obr. 16 :** Schéma syntézy molekul takrin - tryptofan.

Po mnoha provedených testech byl jako nejúspěšnější kandidát na léčivo působící v terapii Alzheimerovy choroby vybrán *S* – izomer látky K 1277. Tato látka vykazovala nejvyšší schopnost inhibovat enzymy acetylcholinesterázu ( $IC_{50} = 6,31 \pm 0,24$  nM) a butyrylcholinesterázu ( $IC_{50} = 9,07 \pm 0,27$  nM). Chemický název této sloučeniny je *N*-(2-((6-chlor - 1,2,3,4 – tetra - hydroakridin - 9 - yl)amino)hexyl - 2 - amino - 3 -(1*H* – indol - 3 - yl) propylamid dihydrochlorid. V části molekuly, která vznikla z tryptofanu se na druhém uhlíku, který je asymetrický, nachází chirální centrum molekuly. Díky tomuto centru tedy existují dva enantiomery této molekuly, enantiomer *R* a *S*. Možnost chirální separace této molekuly nebyla prozatím nijak studována, proto se experimentální část diplomové práce zabývá právě chirální HPLC separací látky K 1277. [5]

### 3. ZADÁNÍ – CÍL PRÁCE

Zadání diplomové práce bylo stanoveno v níže uvedeném rozsahu. Hodnocení naměřených výsledků a jejich diskuse jsou uvedeny v kapitole 4.2.

#### Zadání práce:

- Stanovte čistotu látky K 1277 metodou normalizace a ověřte strukturu látky K 1277 pomocí vysokorozlišovací hmotnostní spektrometrie.
- Vyberte vhodnou stacionární fázi a vhodný mód separace pro chirální separaci enantiomerů látky K 1277.
- Ověřte vliv experimentálních podmínek pro separaci enantiomerů (např. přidavek vybraných kyselin do mobilní fáze, testování různých chaotropních činidel).
- Optimalizujte chromatografické podmínky pro chirální separaci látky K 1277 (složení a průtok mobilní fáze, teplota, velikost nástřiku, vliv rozpouštědla).
- U optimalizované chromatografické metody stanovte limit detekce, přesnost opakování nástřiků a zhodnoťte, zda je možné metodu využít pro separaci enantiomerů látky K 1277 ve vzorcích lidské plasmy.

## 4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 METODICKÁ ČÁST

#### 4.1.1 Přístrojové vybavení

**Analytické váhy Sartorius CPA225D-OCE**

**Přístroj Barnstead Smart2Pure 3 UV/UF** (ThermoFisher Scientific, Německo)

**Pipety Eppendorf® Reference** (0,5 – 10 µl, 10 – 100 µl, 100 – 1000 µl)

**Třepačka Labdancer IKA** pro usnadnění rozpuštění vzorku

**Ultrazvuková lázeň Elma S 40** pro odplynění mobilních fází

**Kapalinový chromatograf: Dionex UltiMate 3000** (ThermoFisher Scientific, Německo)

Binární vysokotlaké čerpadlo HPG-3400RS spojené s vakuovým odplyňovačem  
Kolonový termostat TCC-3000

Kolona **Waters Atlantis<sup>R</sup> dC18 2,1 x 100,0 mm/3 µm**

Kolona **Astec CHIROBIOTIC<sup>TM</sup> T 2,1 x 250,0 mm/5 µm**

Kolona **Lux<sup>R</sup> 5 µm Cellulose – 1 4,6 x 250,0 mm/5 µm**

Automatický dávkovač WTS-3000 s nástřikovou smýčkou o objemu 25 µl

Čtyřkanálový ultrafialový detektor VWD-3000 RS

Detektor diodového pole DAD 3000

Programy Chromeleon 6.80 a Microsoft Excel 2013

**Hmotnostní spektrofotometr: Q Exactive Plus** (ThermoFisher Scientific, Německo)

Ionizace elektrosprejem (HESI - Heated ElectroSpray Ionization)

Program Xcalibur 3.0.63 pro vyhodnocování hmotnostních spekter

**pH metr Hanna edge** (HI 2020) pro měření pH mobilních fází

**Třepačka** (Třepačka Multi Bio RS 24, Biosan) pro liquid - liquid extrakci

**Centrifuga** (Universal 320 R, Hettich Zentrifugen)

Lednice

Laboratorní sklo, vialky s víčky, mikrozkuhavky a filtrační mikrozkuhavky.

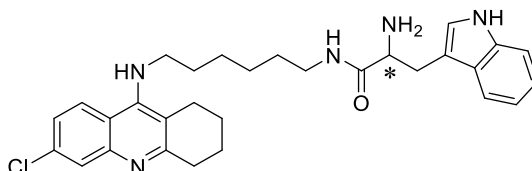
#### 4.1.2 Chemikálie

Při přípravě mobilních fází byla použita následující rozpouštědla a aditiva zakoupená u firmy Sigma Aldrich: methanol, acetonitril, hexan, heptan, propan - 2 - ol, butan - 2 - ol, triehtylamin, kyselina trihydrogenfosforečná, kyselina mravenčí, kyselina sírová, kyselina chlorovodíková, kyselina dusičná, kyselina octová, kyselina trifluoroctová, kyselina chloristá, dihydrogenfosforečnan sodný, mravenčan sodný, methansulfonát sodný, chlorid sodný, dusičnan sodný, trifluorocetan sodný, tetrafluoroborát sodný, chloristan sodný a hexafluorofosfát sodný, dimethylsulfoxid, hydroxid sodný, dichlormethan, ethylacetát a kyselina trichloroctová. Použitá rozpouštědla a aditiva dosahovala stupně čistoty LC - MS, HPLC, popř. GC. Voda stupně kvality ASTM typ I (18.2MΩ.cm při 25°C) pro chromatografické analýzy byla připravena pomocí přístroje Barnstead Smart2Pure 3 UV/UF.

Pro přípravu vzorků lidské plasmy byla použita lidská poolovaná plasma (Human plasma pooled, Biowest, S 4180100). Jako standardy enantiomerů látky K 1277 byly využity *R* a *S* enantiomer, které byly syntetizovány enantioselektivní syntézou na Katedře toxikologie a vojenské farmacie v Hradci Králové.

### 4.1.3 Látka K 1277

Diplomová práce se zabývá chirální separací látky K 1277. Struktura látky K 1277 se skládá z takrinové části a části tryptofanové (Obr. 17).



Označení: K 1277

Sumární vzorec:  $C_{30}H_{36}ClN_5O$

Přesná hmotnost:  $[M]= 517.26084$ ;

$[M+H]^+$  = 518.26811 (100.0%), 519.27147 (32.4%), 520.26516 (32.0%), 521.26852 (10.4%), 520.27482 (5.1%),  
519.26515 (1.8%), 522.27187 (1.6%)

Zastoupení prvků: C, 69.41; H, 7.18; Cl, 6.83; N, 13.49; O, 3.08

**Obr. 17** : Separovaná látka K 1277.

### 4.1.4 Příprava mobilních fází a zásobního roztoku vzorku K 1277

Pro různé metody separace látky K 1277 byla připravena řada mobilních fází (kapitola 4.2). Po přípravě mobilní fáze z daných složek bylo provedeno odplynění MF na ultrazvukové lázni v poměru 15 minut sonifikace na 200 ml roztoku. Pro přípravu byly využity 4 možnosti složení mobilní fáze:

- Čisté rozpouštědlo bez aditiva
- Rozpouštědlo s přidaným aditivem
- Směs více rozpouštědel
- Směs více rozpouštědel s přidaným aditivem

Příprava zásobního roztoku vzorku spočívala v rozpuštění přibližně 1 mg látky K 1277 v 1 ml vody (při optimalizaci metody byl z důvodu kompatibility rozpouštědla vzorku a mobilní fáze zvolen 50% ACN) ve vialce s víčkem. Rozpuštění bylo provedeno na třepačce. Vzorky byly uchovány při teplotě 5°C v automatickém dávkovači, aby nedocházelo k vypařování rozpouštědla, popř. ke krystalizaci vzorku.

### 4.1.5 Stacionární fáze

V experimentální části práce byly využity tři různé stacionární fáze. V následujících podkapitolách budou tyto použité stacionární fáze stručně charakterizovány.

### **Kolona Waters Atlantis dC18 2,1 x 100,0 mm/3 µm**

První z využitých stacionárních fází byla kolona **Waters Atlantis<sup>R</sup> dC18 3,0 µm** od výrobce Waters. Kolona je naplněna modifikovaným silikagelem s oktadecylovými řetězci a dvojitým endcappingem. Základní charakteristika kolony Waters Atlantis je uvedena v tabulce 1. [77]

**Tab. 1 :** Charakteristika kolony Waters Atlantis dC18 2,1 x 100,0 mm/3 µm [77]

Kolona	Rozměry	Póry (Å)	Standard pro separaci
Waters Atlantis	2,1 mm * 100 mm; 3,0 µm	100	Acenaften

### **Kolona Astec CHIROBIOTIC T 2,1 x 250,0 mm/5 µm**

Druhou použitou stacionární fází byla kolona **Astec CHIROBIOTIC<sup>TM</sup> T 2,1 mm x 250,0 mm/5 µm**, vyrobená firmou Sigma - Aldrich. Základní charakteristika kolony je uvedena v tabulce 2.

**Tab. 2 :** Charakteristika kolony Astec CHIROBIOTIC T 2,1 x 250,0 mm/5 µm. [78]

Kolona	Rozměry	Póry (Å)	Standard pro separaci	Průtok MF (ml/min)	Teplota (°C)	Max. tlak (bar)	pH meze	Rozpouštědla
Astec CHIROBIOTIC T	2,1 mm * 250 mm; 5,0 µm	100	5 - methyl - 5 - fenyl hydanthoin	0,2 – 3	0 – 50	40	2,7 – 7	všechna známá HPLC rozpouštědla lze použít jako MF pro tuto SF

### **Kolona Lux Cellulose 1 4,6 x 250,0 mm/5 µm**

Třetí ze stacionárních fází byla kolona **Lux<sup>R</sup> 5 µm Cellulose – 1 4,6 x 250,0 mm/5 µm**, vyrobená firmou Phenomenex. Chirální separace na této stacionární fází je umožněna díky obsahu modifikátoru tris(3,5 - dimethylfenylkarbamát)celulóza. Základní charakteristika kolony Lux Cellulose - 1 je uvedena v tabulce 3. [79]

**Tab. 3 :** Charakteristika kolony Lux Cellulose - 1 4,6 x 250,0 mm/5 µm. [79]

Kolona	Rozměry	Póry (Å)	Standard pro separaci	Teplota (°C)	Max. tlak (bar)	pH rozmezí	Rozpouštědla
Lux Cellulose 1	4,6 mm * 250 mm; 5,0 µm	1000	Trans - stilben - oxid	0 - 50	300	2 - 9	všechna známá HPLC rozpouštědla lze použít jako MF pro tuto SF *

\* Výjimky tvoří tetrahydrofuran, pyridin, aceton, chlorované uhlovodíky, dimethylsulfoxid, dimethylformamid, N - methylformamid a ethylacetát.

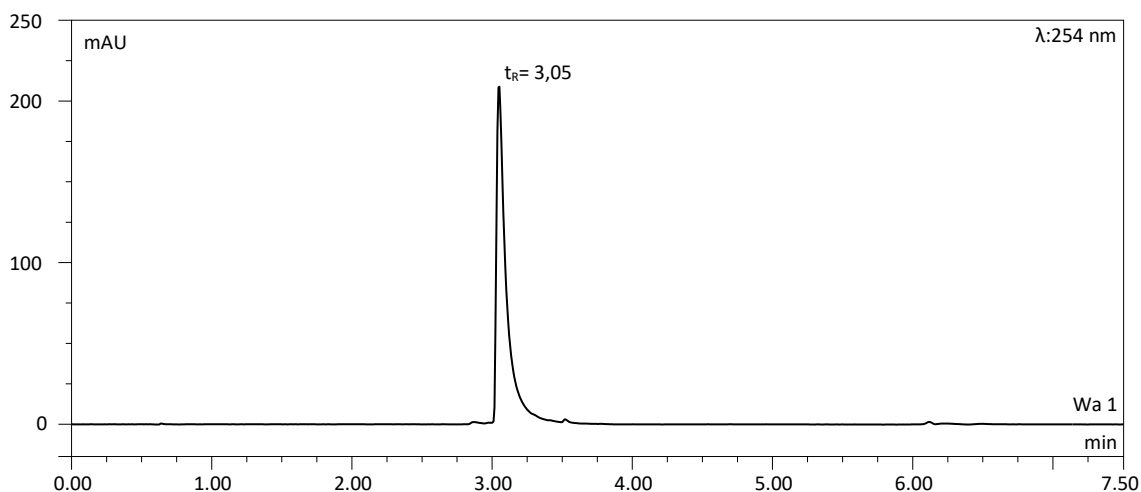
## 4.1.6 Výchozí nastavení systému

Chirální separace látky K 1277 byla provedena na přístroji **Dionex UltiMate 3000**. Teplota v autosampleru pro uchování vzorku byla zvolena na 10°C. Teplota kolonového termostatu byla pro hledání vhodných podmínek separace nastavena převážně na 27°C. Volba této teploty je arbitrární. Při optimalizaci teploty se teplota termostatu pohybovala v rozmezí od 15°C do 40°C. Průtok mobilní fáze byl volen v závislosti na typu kolony a pohyboval se v rozmezí od 0,3 ml/min do 1,2 ml/min. Nástřik vzorku byl upravován na hodnoty od 0,1 µl do 25 µl. Byly provedeny jak metody isokratické, tak metody gradientové. Složení mobilních fází při gradientových metodách je uvedeno vždy pod příslušnou tabulkou. Detekce probíhala u všech metod při čtyřech vlnových délkách: 210 nm, 254 nm, 270 nm a 290 nm (frekvence sběru dat: 2,4 Hz, časová konstanta detektoru 0,6 s). Jelikož při vlnové délce 254 nm byla na chromatografických záznamech odečtena nejvyšší intenzita signálu, byla tato vlnová délka zvolena jako nejvíce reprezentativní a všechny chromatografické záznamy uvedené v diplomové práci jsou naměřeny při této vlnové délce.

## 4.2 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 4.2.1 Kolona Waters Atlantis dC18 2,1 x 100,0 mm/3 µm

První využitou stacionární fází byla kolona **Waters Atlantis<sup>R</sup> dC18**, kde byla na této stacionární fázi stanovena čistota látky K 1277 metodou normalizace. Chromatografické podmínky (Tab. 4) pro stanovení čistoty látky K 1277 jsou v textu označeny jako **Wa 1** (Obr. 18).



**Obr. 18** : Chromatografický záznam, ze kterého byla stanovena čistota látky K 1277.

**Tab. 4** : Zvolené chromatografické podmínky Wa 1 na koloně Waters Atlantis<sup>R</sup> dC18.

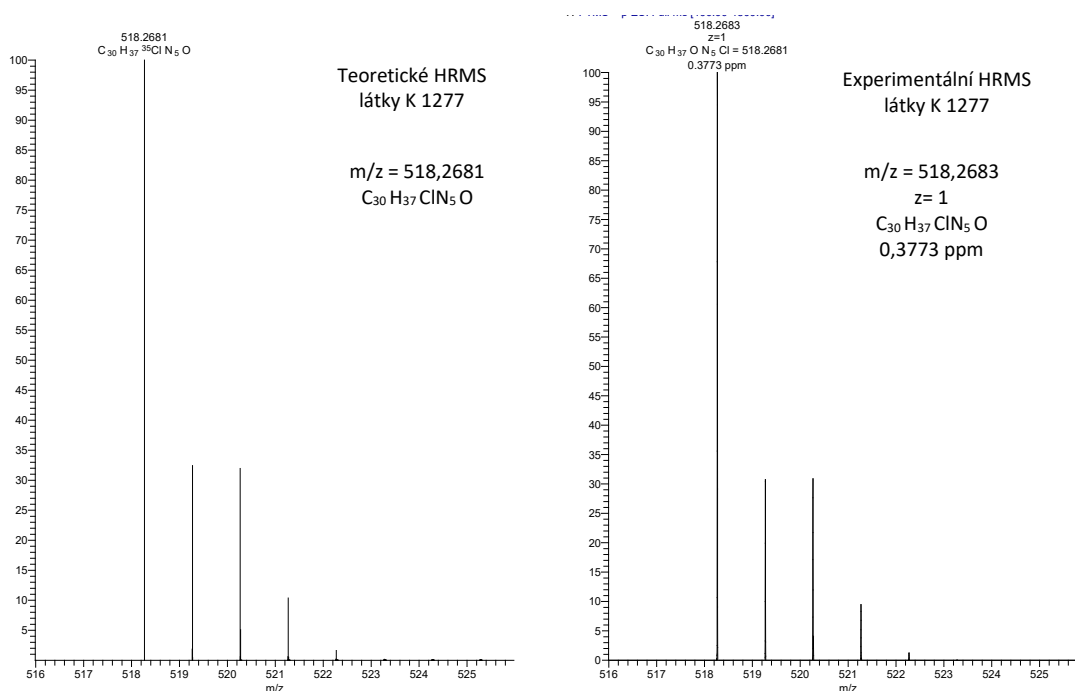
Označení	Doba analýzy (min)	Průtok (ml/min)	Teplota (°C)	Nástřik (µl)	Mobilní fáze (v/v)	Hodnocení t <sub>R</sub> (min)
Wa 1	7,5	0,4	27	5	MFA (H <sub>2</sub> O) + MFB (ACN) GRADIENT*	t <sub>R</sub> = 3,05

\* GRADIENT: Eluce probíhala za použití lineárního gradientu v systému MFA a MFB s vývojem: 0 - 1 min 10% MFB, 1 - 4 min 10 - 100% MFB lineárně, 4 - 5 min 100% MFB, 5 min 10% MFB skokem, 5 - 7,5 min 10% MFB.

Při zvolených chromatografických podmínkách **Wa 1** (Tab. 4) došlo k eluci analytu v retenčním čase 3,05 minut. Čistota látky K 1277 při vlnové délce 254 nm byla metodou normalizace stanovena na hodnotu 98,91 %. Pro stanovení čistoty byl od chromatografického záznamu látky K 1277 odečten signál blanku a byl stanoven procentuální podíl plochy píku látky K 1277 a plochy všech ostatních detekovaných píků.

#### 4.2.1.1 Hmotnostně spektrometrická analýza látky K 1277

Při zvolených chromatografických podmínkách **Wa 1** byl chromatografický systém propojen s **hmotnostně spektrometrickým (MS) detektorem**. Pro kontrolu identity látky K 1277 byla využita metoda full-scan, v pozitivním módu v rozsahu 100 – 1500 m/z. Parametry iontového zdroje byly nastaveny takto: průtok obalového plynu (sheath gas) 50 arbitrárních jednotek, průtok rozptylového plynu (spare gas) 2,5 arbitrární jednotky, průtok pomocného plynu (aux gas) 12,5 arbitrárních jednotek, teplota kapiláry 262,5°C, teplota pomocného plynu 350°C, napětí 3,5 kV, S čočky RF 50, počet mikroskenů 1, maximální doba injektáže 100 ms, automatická kontrola zisku (automatic gain control) 3e6 a rozlišení 140 000.



**Obr. 19** : Experimentálně stanovené HRMS látky K 1277 (vlevo) a predikované HRMS pro její předpokládanou chemickou strukturu (vpravo).

V MS analýze byl stanoven poměr m/z, který velmi dobře odpovídá teoretickému poměru m/z pro látku K 1277 (Obr. 19). Stanovená přesná hmotnost (HRMS - High Resolution Mass Spectrometry) činila pro jednonásobně protonizovaný ion látky K 1277  $[M + H]^+ = 518,26830$ . U látky K 1277 dochází v analytickém systému LC - MS také k dvojnásobně protonizaci s hodnotou  $[M + 2H]^{2+} = 259,63776$ . Hodnota m/z jednou nabitého iontu látky K 1277 velmi dobře koreluje s predikovanou teoretickou hodnotou m/z = 518,26810 pro předpokládanou strukturu (Obr. 19).



## 4.2.2 Kolona Astec CHIROBIOTIC T 2,1 x 250,0 mm/5 µm

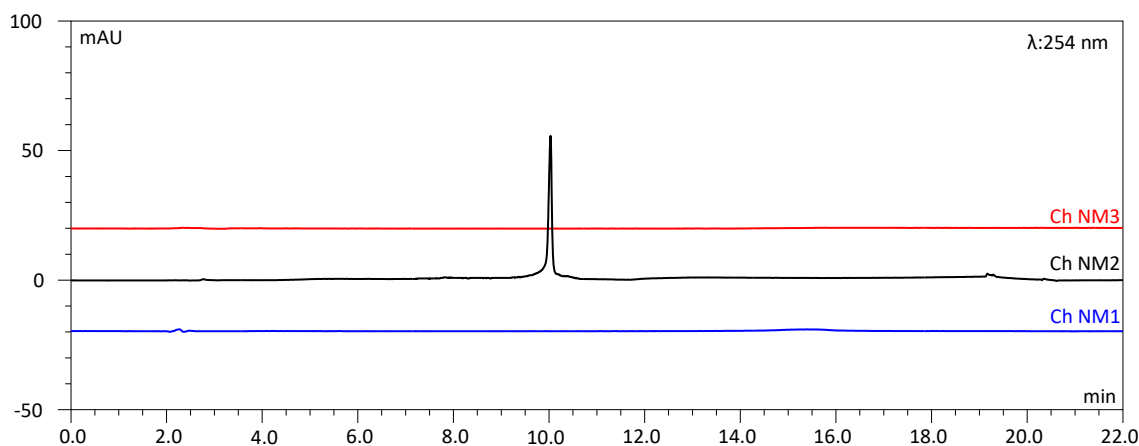
Druhou z použitých stacionárních fází byla kolona **Astec CHIROBIOTIC™ T**. V literatuře byla na této stacionární fázi prokázána separace mnoha chirálních chemických struktur (např.  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  aminokyselin, cyklických aminokyselin, esenciálních aminokyselin, *N*-derivatizovaných aminokyselin, aj.), které jsou svou strukturou velmi podobné analytu (K 1277) separovanému v diplomové práci. Chirální centrum K1277 se nachází v molekule tryptofanu, který je rovněž jednou z esenciálních aminokyselin. Z tohoto důvodu byla stacionární fáze Astec CHIROBIOTIC T s ukotveným makrocyclickým antibiotikem teikoplaninem považována za jednu z nejslibnějších možností volby stacionární fáze pro chirální separaci látky K 1277. [80]

Na této chirální stacionární fázi bylo provedeno hledání vhodných podmínek separace enantiomerů ve třech různých elučních módech. Všechny výsledky měřené na koloně Astec CHIROBIOTIC™ T mají označení **Ch**. Následuje označení jednoho ze tří elučních módů (**NM** = normální mód; **PO** = polárně - organický mód; **RM** = reverzní mód) a poté číselné pořadí testovaných podmínek.

### 4.2.2.1 Hledání vhodných podmínek separace enantiomerů látky K 1277

#### *Nepolární eluční mód*

Při hledání optimálního složení mobilní fáze pro separaci enantiomerů látky K 1277 byly na koloně Astec CHIROBIOTIC™ T 2,1 x 250 mm/5 µm **v nepolárním elučním módu** testovány 4 různé mobilní fáze (viz tab. č. 5) a jejich chromatografické záznamy jsou uvedeny na obrázku 20.



**Obr. 20** : Chromatografické záznamy na koloně Astec CHIROBIOTIC™ T v nepolárním elučním módu.

**Tab. 5 :** Testované chromatografické podmínky na koloně Astec CHIROBIOTIC™ T v nepolárním elučním módu.

Označení	Doba analýzy (min)	Průtok (ml/min)	Teplota (°C)	Nástřik (μl)	Mobilní fáze (v/v)	Hodnocení $t_R$ (min)
Ch NM1	22,5	0,3	27	5	95% HEX + 5% 2-butanol	Silná interakce se SF
Ch NM2	22,5	0,3	27	5	MFA (HEX) + MFB (IPA) GRADIENT*	$t_R = 10,03$
Ch NM3	22,5	0,3	27	5	95% HEX + 5% IPA	Silná interakce se SF
Ch NM4	22,5	0,3	27	5	MFA (HEX) + MFB (butanol) GRADIENT*	Silná interakce se SF

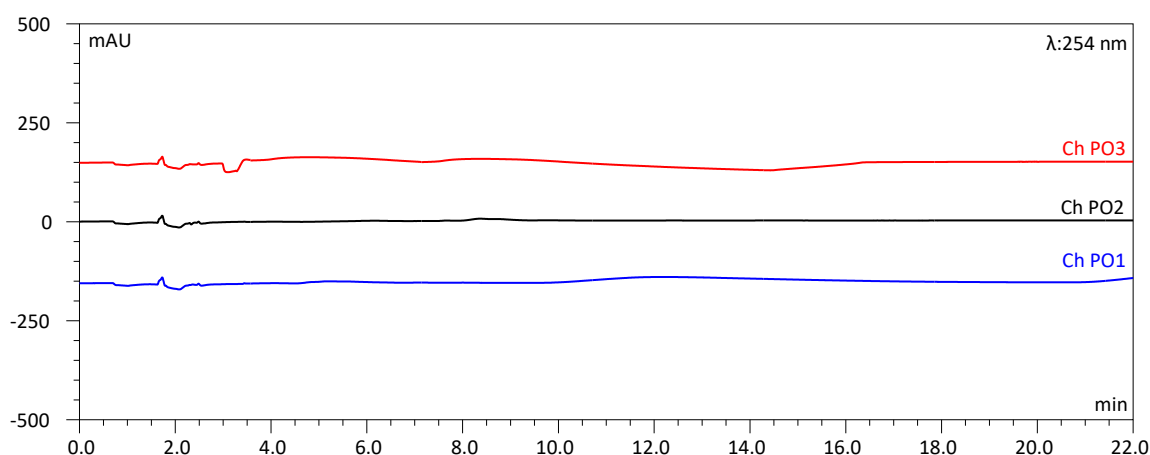
\* GRADIENT: Eluce probíhala za použití lineárního gradientu v systému MFA a MFB s vývojem: 0 - 1 min 5% MFB, 1 - 16 min 5 - 100% MFB lineárně, 16 - 17 min 100% MFB, 17 min 5% MFB skokem, 17 - 22,5 min 5% MFB.

Při hledání optimálního složení mobilní fáze pro separaci enantiomerů láky K 1277 byla jako první mobilní fáze v nepolárním elučním módu testovaná mobilní fáze se složením 95% hexan a 5% 2 - butanol (**Ch NM1**). Druhými z testovaných podmínek byla gradientová metoda **Ch NM4** využívající mobilní fázi složenou z hexanu (MFA – mobilní fáze A) a 2 - butanolu (MFB – mobilní fáze B). V obou výše uvedených případech dochází k poměrně silné interakci analytu se stacionární fází, což dokazuje i přiložený chromatogram (Obr. 20). Z chromatografického záznamu **Ch NM3** se složením mobilní fáze 95 % hexanu a 5 % isopropanolu je patrné, že dochází rovněž k silné interakci látky K 1277 se stacionární fází.

Dalšími testovanými podmínkami byla gradientová metoda **Ch NM2** se složením mobilní fáze z hexanu (MFA) a isopropanolu (MFB), kde došlo k eluci látky K 1277 v retenčním čase  $t_R = 10,03$  minut, avšak nebyla zaznamenána žádná separace enantiomerů (Obr. 20).

### **Polárně - organický eluční mód**

Při hledání vhodných podmínek pro separaci enantiomerů látky K 1277 na koloně Astec CHIROBIOTIC™ T v **polárně - organickém elučním módu** byly testovány 3 mobilní fáze (viz. Tab. č. 6.) a chromatografické záznamy při těchto podmínkách jsou uvedeny na obrázku 21.



**Obr. 21 :** Chromatografické záznamy na koloně Astec CHIROBIOTIC™ T v polárně - organickém elučním módu.

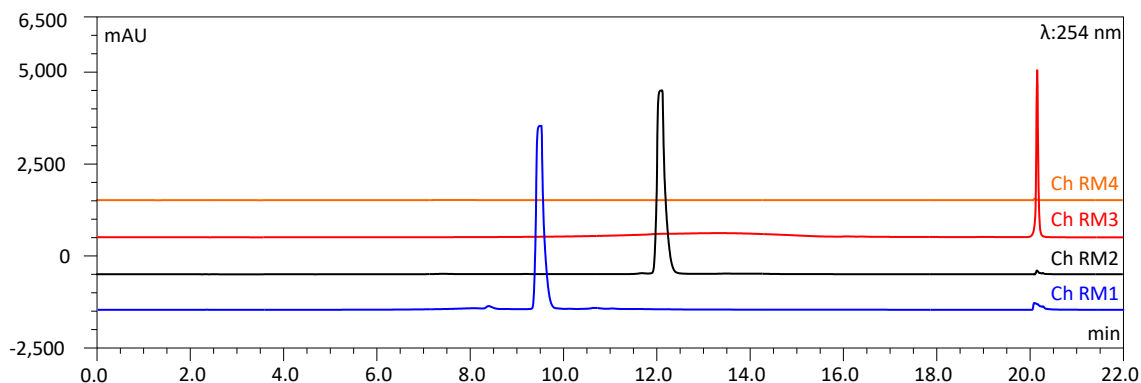
**Tab. 6 :** Testované chromatografické podmínky na koloně Astec CHIROBIOTIC™ T v polárně - organickém elučním módu.

Označení	Doba analýzy (min)	Průtok (ml/min)	Teplota (°C)	Nástřik (μl)	Mobilní fáze (v/v)	Hodnocení t <sub>R</sub> (min)
Ch PO1	22,5	0,3	27	5	MeOH + 0,1% AA + 0,1% TEA	Silná interakce se SF
Ch PO2	22,5	0,3	27	5	MeOH + 0,1%FA+0,1%TEA	Silná interakce se SF
Ch PO3	22,5	0,3	27	5	95% ACN + 5% MeOH + 0,3% AA + 0,1% TEA	Silná interakce se SF

Při hledání vhodných podmínek separace enantiomerů látky K 1277 v polárně - organickém elučním módu byl jako první mobilní fáze použit methanol s přidavkem 0,1% kyseliny octové (v/v) a 0,1% triethylaminu (v/v) (**Ch PO1**). Při separačních podmínkách označených jako **Ch PO2** byl testován vliv přidavku 0,1% kyseliny mravenčí (v/v) a 0,1% triethylaminu (v/v). Mobilní fáze využitá při separačních podmínkách **Ch PO3** byla složená z 95 % acetonitrilu a 5 % methanolu s přidavkem 0,3% octové kyseliny (v/v) a 0,1% triethylaminu (v/v). Z chromatografického záznamu na obrázku 21 vyplývá, že při všech výše zmíněných chromatografických podmínkách (Ch PO1 - Ch PO3) dochází k silné interakci analytu se stacionární fází.

### Reverzní eluční mód

Při hledání optimálního složení mobilní fáze pro separaci enantiomerů látky K 1277 bylo na koloně Astec CHIROBIOTIC™ T v **reverzním elučním módu** testováno 12 různých složení mobilních fází. Přehled vybraných chromatografických podmínek v reverzním elučním módu je uveden v tabulce č. 7 a přehled ostatních testovaných podmínek je uveden v tabulce č. 8. Vybrané chromatografické záznamy při těchto podmínkách jsou uvedeny na obrázku 22.



**Obr. 22 :** Vybrané chromatografické záznamy na koloně Astec CHIROBIOTIC™ T v reverzním elučním módu.

**Tab. 7 :** Vybrané chromatografické podmínky na koloně Astec CHIROBIOTIC™ T v reverzním elučním módu.

Označení	Doba analýzy (min)	Průtok (ml/min)	Teplota (°C)	Nástřik (μl)	Mobilní fáze (v/v)	Hodnocení t <sub>R</sub> (min)
Ch RM1	22,5	0,3	27	5	MFA (H <sub>2</sub> O) + MFB (ACN) + 25 mM H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> GRADIENT *	t <sub>R</sub> = 9,46
Ch RM2	22,5	0,3	27	5	MFA (H <sub>2</sub> O) + MFB (ACN) + 100 mM NaClO <sub>4</sub> GRADIENT *	t <sub>R</sub> = 12,08
Ch RM3	22,5	0,3	27	5	MFA (H <sub>2</sub> O) + MFB (MeOH) + 50 mM NaClO <sub>4</sub> GRADIENT *	t <sub>R</sub> = 20,15
Ch RM4	22,5	0,3	27	5	MFA (H <sub>2</sub> O) + MFB (ACN) GRADIENT *	Silná interakce se SF

\* GRADIENT: Eluce probíhala za použití lineárního gradientu v systému MFA a MFB s vývojem: 0 - 1 min 5% MFB, 1 - 16 min 5 - 100% MFB lineárně, 16 - 17 min 100% MFB, 17 min 5% MFB skokem, 17 - 22,5 min 5% MFB.

Při hledání optimálního složení mobilní fáze pro separaci enantiomerů láky K 1277 v reverzním elučním módu byla u gradientové metody **Ch RM4** jako MFA použita voda a jako MFB acetonitril. Při takto zvolených separačních podmínkách došlo k silné interakci analytu se stacionární fází. Pokud byla do mobilní fáze přidána 25 mM kyselina sírová (**Ch RM1**), látka K 1277 se eluovala v retenčním čase 9,46 minut. Když byl místo kyseliny sírové použit přídatek 100 mM chloristanu sodného (**Ch RM2**), eluovala se látka K 1277 v retenčním čase t<sub>R</sub> = 13,17 minut. Při separačních podmínkách **Ch RM3** byl testován vliv změny B složky mobilní fáze. Namísto acetonitrilu byl jako MFB použit methanol, ale tato změna vedla pouze k posunu retenčního času analytu směrem k vyšší hodnotě.

**Tab. 8 :** Ostatní testované chromatografické podmínky na koloně Astec CHIROBIOTIC™ T v reverzním elučním módu.

Označení	Doba analýzy (min)	Průtok (ml/min)	Teplota (°C)	Nástřik (μl)	Mobilní fáze (v/v)	Hodnocení t <sub>R</sub> (min)
Ch RM5	22,5	0,3	27	5	MFA (H <sub>2</sub> O) + MFB (ACN) + 100 mM AA + 100 mM TEA GRADIENT *	Silná interakce se SF
Ch RM6	22,5	0,3	27	5	MFA (H <sub>2</sub> O) + MFB (ACN) + 100 mM AA + 50 mM TEA GRADIENT *	Silná interakce se SF
Ch RM7	22,5	0,3	27	5	MFA (H <sub>2</sub> O) + MFB (ACN) + 0,1% FA GRADIENT *	t <sub>R</sub> = 9,72
Ch RM8	22,5	0,3	27	5	MFA (H <sub>2</sub> O) + MFB (ACN) + 100 mM NaClO <sub>4</sub> GRADIENT *	t <sub>R</sub> = 12,08
Ch RM9	22,5	0,3	27	5	MFA (H <sub>2</sub> O) + MFB (ACN) + 25 mM NaClO <sub>4</sub> GRADIENT *	t <sub>R</sub> = 15,06
Ch RM10	22,5	0,3	27	5	MFA (H <sub>2</sub> O) + MFB (ACN) + 50 mM TFA + 50mM TEA GRADIENT *	t <sub>R</sub> = 10,78
Ch RM11	22,5	0,3	27	5	MFA (H <sub>2</sub> O) + MFB (ACN) + 50 mM TFA GRADIENT *	t <sub>R</sub> = 10,08

\* GRADIENT: Eluce probíhala za použití lineárního gradientu v systému MFA a MFB s vývojem: 0 - 1 min 5% MFB, 1 - 16 min 5 - 100% MFB lineárně, 16 - 17 min 100% MFB, 17 min 5% MFB skokem, 17 - 22,5 min 5% MFB.

Mezi další testované chromatografické podmínky na koloně Astec CHIROBIOTIC™ T v reverzním elučním módu patří **Ch RM5** a **Ch RM6**, kde dochází k silné interakci látky K 1277 se stacionární fází. Při podmínkách **Ch RM7 – Ch RM11** dochází k eluci látky K 1277 v různých retenčních časech v závislosti na konkrétním složení mobilní fáze (viz tab. 8). Při porovnání chromatogramů Ch RM8, Ch RM3 a Ch RM9, u kterých dochází k postupnému snižování koncentrace přidaného chloristanu sodného do mobilní fáze, lze z hodnocení retenčních časů odvodit, že s klesající koncentrací chloristanu dochází k nárůstu retenčních časů látky K 1277.

#### **4.2.2.2 Diskuse výsledků na koloně Astec Chirobiotic T**

Na základě naměřených chromatografických dat se volba stacionární fáze Astec Chirobiotic T ukázala jako nevhodná pro separaci enantiomerů látky K 1277. I přestože obsahuje kolona Astec CHIROBIOTIC T ve stacionární fází 23 chirálních center ve čtyřech kavitách, v žádném ze tří elučních módů nedošlo ani k náznaku separace enantiomerů látky K 1277. Ke stereospecifické reakci mezi analytem a stacionární fází nedochází pravděpodobně z důvodu přítomnosti objemného takrinového skeletu, který se k chirálnímu centru v tryptofanovém fragmentu váže přes hexylový linker a amidickou skupinu. Tyto sterické vlastnosti látky K 1277 zřejmě brání chirální separaci na této CSP.

#### **4.2.3 Kolona Lux Cellulose - 1 4,6 x 250,0 mm/5 µm**

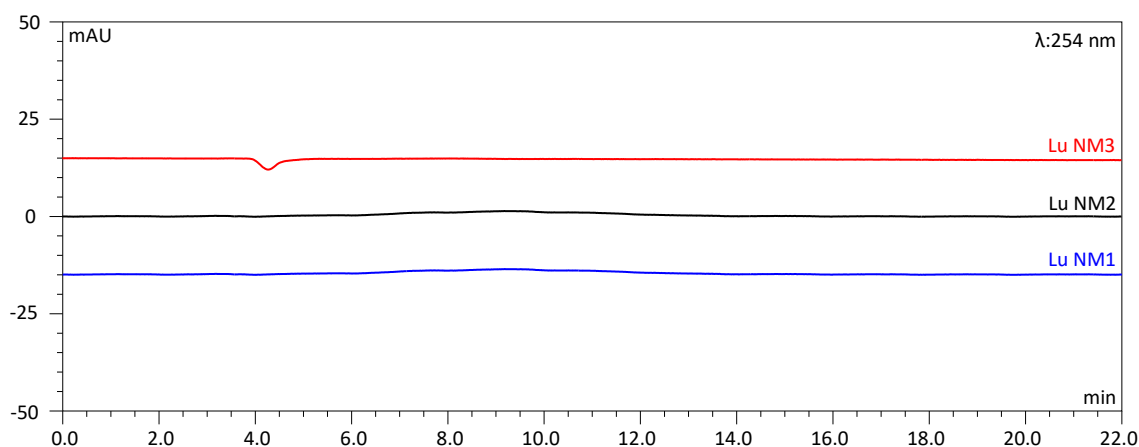
Třetí z využitých stacionárních fází byla kolona **Lux Cellulose - 1**. Na této chirální stacionární fází s ukotveným modifikátorem tris (3,5 - dimethylfenylkarbamát) celulózu bylo také provedeno hledání vhodných podmínek separace enantiomerů ve třech elučních módech analogicky, jako na koloně Astec CHIROBIOTIC™ T. Výsledky měřené na koloně **Lux Cellulose – 1** mají označení **Lu**.

Na této stacionární proběhla také optimalizace vybrané separační metody, byl stanoven vliv velikosti nástřiku vzorku, vliv rozpouštědla vzorku, byla hodnocena opakovatelnost metody, určen limit detekce metody a stanoven vliv plasmu jako biologické matrice.

##### **4.2.3.1 Hledání vhodných podmínek separace enantiomerů látky K 1277**

###### ***Nepolární eluční mód***

Při hledání optimálního složení mobilní fáze pro separaci enantiomerů látky K 1277 byly na koloně Lux Cellulose - 1 **v nepolárním elučním módu** testovány 3 různé složení mobilních fází (viz tabulka č. 9) a jejich chromatografické záznamy jsou uvedeny na obrázku 23.



**Obr. 23 :** Chromatografické záznamy na koloně Lux Cellulose - 1 v nepolárním elučním módu.

**Tab. 9 :** Testované chromatografické podmínky na koloně Lux Cellulose - 1 v nepolárním elučním módu.

Označení	Doba analýzy (min)	Průtok (ml/min)	Teplota (°C)	Nástřik (μl)	Mobilní fáze (v/v)	Hodnocení $t_R$ (min)
Lu NM1	22,5	0,8	27	5	95% HEX + 5% butanol	Silná interakce se SF
Lu NM2	22,5	0,8	27	5	MFA (HEX) + MFB (IPA) GRADIENT *	Silná interakce se SF
Lu NM3	22,5	0,8	27	5	95% HEX + 5% IPA	Silná interakce se SF

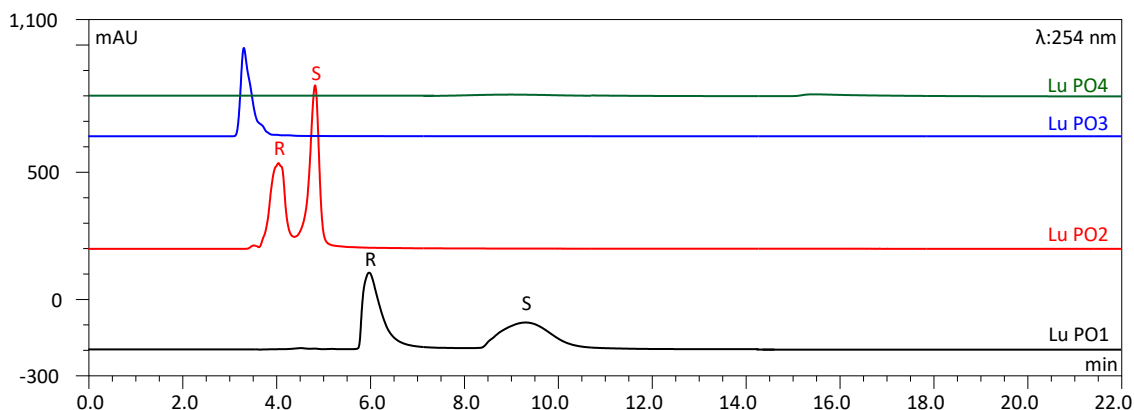
\* GRADIENT: Eluce probíhala za použití lineárního gradientu v systému MFA a MFB s vývojem: 0 - 1 min 5% MFB, 1 - 16 min 5 - 100% MFB lineárně, 16 - 17 min 100% MFB, 17 min 5% MFB skokem, 17 - 22,5 min 5% MFB

Při testování optimálního složení mobilní fáze pro separaci enantiomerů látky K 1277 byla jako mobilní fáze v nepolárním elučním módu použita mobilní fáze se složením: 95 % hexan a 5 % 2 - butanol (**Lu NM1**). Při chromatografických podmínkách **Lu NM3** došlo v mobilní fázi k záměně 2 -butanolu za isopropanol. Při obou výše uvedených chromatografických podmínkách došlo k silné interakci analytu se stacionární fází. Také u gradientové metody **Lu NM2**, kde byla mobilní fáze složená z hexanu (MFA) a isopropanolu (MFB) došlo k silné interakci se stacionární fází, což je patrné z obrázku 23.

V nepolárním elučním módu nebyly nalezeny žádné podmínky vedoucí k separaci enantiomerů látky K 1277. Vzhledem ke struktuře látky K 1277, která obsahuje jak polární funkční skupiny, tak alifatické, aromatické či heteroaromatické fragmenty, lze předpokládat silnější interakci s chirální stacionární fází než s nepolární MF. Pokud by byla zvýšena polarita MF, např. přidáním alkoholu, bylo by možné předpokládat eluci analytu ze stacionární fáze. Ukázalo se ale, že při použití gradientové eluce kombinující hexan a 2 - propanol nedošlo během 22,5 minutové analýzy k vymytí analytu ani tehdy, když byl v gradientovém programu nastaven vzrůst koncentrace 2 - propanolu na 100 %. To svědčí o velmi silné interakci analytu se stacionární fází.

### Polárně - organický eluční mód

Při hledání optimálního složení mobilní fáze pro separaci enantiomerů látky K 1277 byly na koloně Lux Cellulose - 1 4,6 x 250,0 mm/5  $\mu$ m v polárně - organickém elučním módu testovány 4 různé složení mobilních fází (viz tabulka č. 10) a jejich chromatografické záznamy jsou uvedeny na obrázku 24.



**Obr. 24 :** Chromatografické záznamy na koloně Lux Cellulose - 1 v polárně - organickém elučním módu.

**Tab. 10 :** Testované chromatografické podmínky na koloně Lux Cellulose - 1 v polárně - organickém elučním módu.

Označení	Doba analýzy (min)	Průtok (ml/min)	Teplota (°C)	Nástřik ( $\mu$ l)	Mobilní fáze (v/v)	Hodnocení $t_R$ (min)
Lu PO1	22,5	0,8	27	5	MeOH	$t_{R1} = 5,98$ ; $t_{R2} = 9,34$ $R = 2,42$
Lu PO2	22,5	0,8	27	5	MeOH + 0,1% AA + 0,1% TEA	$t_{R1} = 4,05$ ; $t_{R2} = 4,83$ $R = 1,67$
Lu PO3	22,5	0,8	27	5	MeOH + 0,1% FA + 0,1% TEA	$t_R = 3,31$
Lu PO4	22,5	0,8	27	5	95% ACN + 5% MeOH + 0,3% AA + 0,2% TEA	Silná interakce se SF
Lu PO5	22,5	0,8	27	5	95% ACN + 5% MeOH + 0,3% AA + 0,2% TEA GRADIENT *	$t_R = 11,33$

\* GRADIENT: Eluce probíhala za použití lineárního gradientu v systému MFA a MFB s vývojem: 0 - 1 min 5% MFB, 1 - 16 min 5 - 100% MFB lineárně, 16 - 17 min 100% MFB, 17 min 5% MFB skokem, 17 - 22,5 min 5% MFB

Při hledání vhodných separačních podmínek v polárně - organickém elučním módu byl jako mobilní fáze použit methanol (Lu PO1). Při využití této mobilní fáze došlo k separaci enantiomerů látky K 1277 s rozlišením  $R = 2,42$ , avšak tvar a symetrie píků enantiomerů nebyly zvoleny jako vhodné pro další optimalizaci.

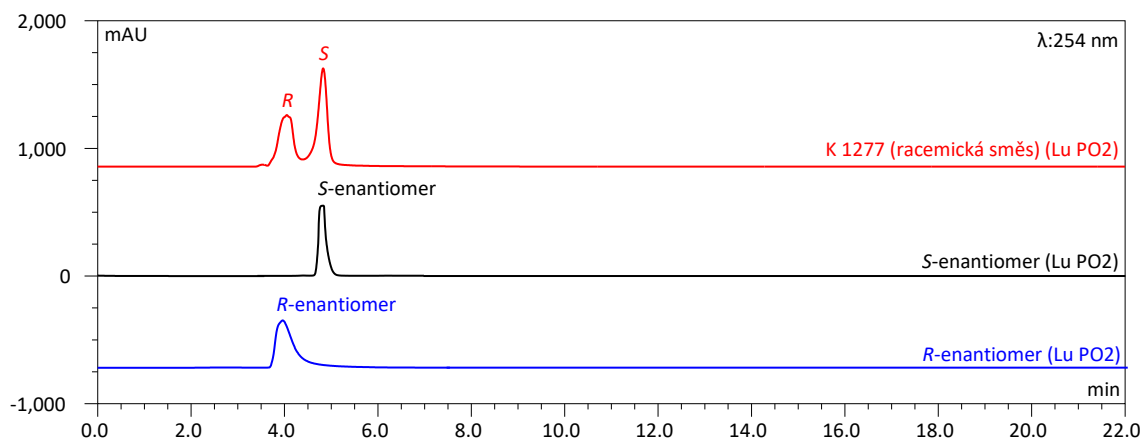
Po přidavku 0,1% kyseliny mravenčí (v/v) a 0,1% triethylaminu (v/v) (Lu PO3) do mobilní fáze nedošlo k separaci enantiomerů a analyt se eluuje v retenčním čase 3,31 minut. Při podmínkách Lu PO2 se poměrně výraznou změnou v chromatografickém záznamu projevila změna přidavku 0,1% kyseliny mravenčí (v/v) za 0,1% kyselinu octovou (v/v). Při použití výše

uvedeného složení mobilní fáze dochází k separaci enantiomerů na *R* - enantiomer v retenčním čase  $t_{R1} = 4,05$  minut a *S* - enantiomer v retenčním čase  $t_{R2} = 4,83$  minut. Pokud porovnáme mobilní fáze Lu PO1 a Lu PO2, je zřejmé, že přítomnost polárních aditiv vede ke snížení retence enantiomerů, ale také ke snížení rozlišení. Tento jev lze jednoduše vysvětlit zvýšením afinity K 1277 k mobilní fázi. Za povšimnutí stojí též skutečnost, že Lu PO2 využívá MF s ionty, avšak prostředí je stále aprotické, které prakticky nemění ionizační stupeň látky K 1277. Rozlišení enantiomerů ( $R = 1,67$ ) při podmínkách Lu PO2 však nedosahovalo základní linie.

Pro určení, který z enantiomerů látky K 1277 je *R* izomer a který *S* izomer, byly do sekvence měření zařazeny i opticky čisté *R* a *S* izomery. Shrnutí chromatografických záznamů při podmínkách Lu PO2 je uvedeno na obrázku 25. Retenční čas  $t_{R1} = 4,05$  minut odpovídá tedy *R* - enantiomeru a  $t_{R2} = 4,83$  minut odpovídá *S* - enantiomeru. Stejným způsobem byly rozlišovány enantiomery látky K 1277 i při ostatních testovaných podmínkách ve všech elučních módech.

Při zvolených testovaných podmínkách **Lu PO4** byla mobilní fází směs 95 % acetonitrilu a 5 % methanolu s přidavkem 0,3 % kyseliny octové (v/v) + 0,2 % triethylaminu (v/v) Při těchto podmínkách došlo k silné interakci látky K 1277 se stacionární fází. V případě podmínek **Lu PO5** došlo k eluci analytu v retenčním čase  $t_R = 11,33$  minut.

I když bylo v polárně - organickém módu dosaženo separace enantiomerů, nebyly výše testované podmínky zvoleny jako vhodné pro vývoj optimální metody z hlediska nedostatečného rozlišení a nevhodné symetrie píků. Na druhé straně lze mobilní fáze z tohoto elučního módu po optimalizaci využít v případě použití MS detekce.

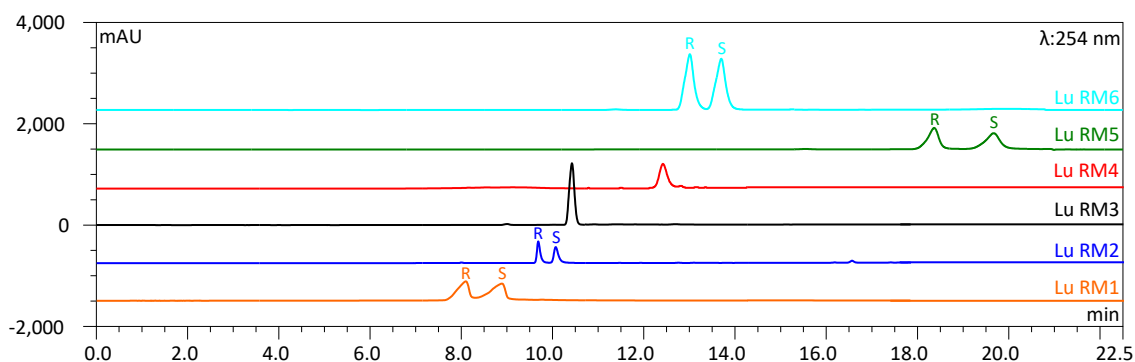


**Obr. 25 :** Chromatografické záznamy testovaných podmínek Lu PO2.

### **Reverzní eluční mód**

Při hledání optimálního složení mobilní fáze pro separaci enantiomerů látky K 1277 bylo na koloně Lux Cellulose – 1 v **reverzním elučním módu** testováno 7 různých složení mobilních fází. Přehled zvolených separačních podmínek je uveden v tabulce č. 11 a jejich chromatografické záznamy jsou uvedeny na obrázku 26. Dále byl v reverzním módu na koloně Lux Cellulose - 1 sledován vliv přidavku různých kyselin do mobilní fáze (Obr. 27) a také stanoven vliv chaotropních činidel na separaci enantiomerů látky K 1277 (Obr. 28).





**Obr. 26 :** Chromatografický záznam na koloně Lux Cellulose - 1 v reverzním elučním módu.

**Tab. 11 :** Testované separační podmínky na koloně Lux Cellulose - 1 v reverzním elučním módu.

Označení	Doba analýzy (min)	Průtok (ml/min)	Teplota (°C)	Nástřik (μl)	Mobilní fáze (v/v)	Hodnocení $t_R$ (min)
Lu RM1	22,5	0,8	27	5	MFA (H <sub>2</sub> O) + MFB (ACN) GRADIENT *	$t_{R1} = 8,09$ ; $t_{R2} = 8,88$ R = 1,47
Lu RM2	22,5	0,8	27	5	MFA (H <sub>2</sub> O) + MFB (ACN) + 100 mM AA + 50 mM TEA GRADIENT *	$t_{R1} = 9,68$ ; $t_{R2} = 10,07$ R = 2,52
Lu RM3	22,5	0,8	27	5	MFA (H <sub>2</sub> O) + MFB (ACN) + 50 mM TFA + 50mM TEA GRADIENT *	$t_R = 10,42$
Lu RM4	22,5	0,8	27	5	MFA (H <sub>2</sub> O) + MFB (ACN) + 100 mM AA + 100 mM TEA GRADIENT *	$t_R = 12,42$
Lu RM5	22,5	0,8	27	5	MFA (H <sub>2</sub> O) + MFB (MeOH) + 100 mM NaClO <sub>4</sub> GRADIENT *	$t_{R1} = 18,37$ ; $t_{R2} = 19,67$ R = 2,28
Lu RM6 (pH = 5,76)	22,5	0,8	27	5	MFA (H <sub>2</sub> O) + MFB (ACN) + 50 mM NaClO <sub>4</sub> GRADIENT *	$t_{R1} = 13,01$ ; $t_{R2} = 13,70$ R = 1,80
Lu RM6 (pH = 5,5)	22,5	0,8	27	5	MFA (H <sub>2</sub> O) + MFB (ACN) + 50 mM NaClO <sub>4</sub> + 0,001% FA GRADIENT *	$t_R = 12,55$
Lu RM6 (pH = 5,0)	22,5	0,8	27	5	MFA (H <sub>2</sub> O) + MFB (ACN) + 50 mM NaClO <sub>4</sub> + 0,01% FA GRADIENT *	$t_R = 12,54$
Lu RM6 (pH = 4,0)	22,5	0,8	27	5	MFA (H <sub>2</sub> O) + MFB (ACN) + 50 mM NaClO <sub>4</sub> + 0,1% FA GRADIENT *	$t_R = 12,53$
Lu RM6 (pH = 8,4)	22,5	0,8	27	5	MFA (H <sub>2</sub> O) + MFB (ACN) + 50 mM NaClO <sub>4</sub> + NaOH (pH=8,4) GRADIENT *	$t_{R1} = 13,07$ $t_{R2} = 13,98$ R = 2,07
Lu RM7	50	1,0	35	5	45% H <sub>2</sub> O + 55% MeOH + 100 mM NaClO <sub>4</sub>	Silná interakce se SF

\* GRADIENT: Eluce probíhala za použití lineárního gradientu v systému MFA a MFB s vývojem: 0 - 1 min 5% MFB, 1 - 16 min 5 - 100% MFB lineárně, 16 - 17 min 100% MFB, 17 min 5% MFB skokem, 17 - 22,5 min 5% MFB.

Prvními testovanými separačními podmínkami na koloně Lux Cellulose – 1 v reverzním módu byly podmínky **Lu RM1**, kdy byla jako MFA použita voda a jako MFB byl použit acetonitril. Při těchto podmínkách bylo dosaženo separace enantiomerů látky K 1277 v retenčních časech  $t_{R1} = 8,09$  minut a  $t_{R2} = 8,88$  minut s rozlišením R = 1,47. Podmínky Lu RM1 se však ukázaly jako

poměrně málo stabilní, protože při opakování analýzy byly zaznamenány kolísající retenční časy enantiomerů látky K 1277. Pokud byla do této mobilní fáze přidána kyselina octová a triethylamin došlo k nárůstu rozlišení na  $R = 2,52$  (**Lu RM2**). Při podmínkách Lu RM2 byl v mobilní fázi dvojnásobný molární nadbytek kyseliny octové ve srovnání s triethylaminem, což nepochybně vedlo k protonizaci látky K 1277, ale i přesto nedošlo ke snížení retenčních časů enantiomerů K 1277, nýbrž k jejich zvýšení. Pokud byla zvýšena koncentrace triethylaminu v MF na 100 mM, pak, jak lze vidět na chromatografickém záznamu **Lu RM4** (Obr. 26), nedochází k separaci enantiomerů a analyt se eluuje v retenčním čase 12,42 minut. Za podmínek **Lu RM3** byl testován vliv záměny přídavku kyseliny octové za kyselinu trifluouroctovou. Tato záměna však nevede k separaci enantiomerů.

Při ostatních zvolených podmínkách (Lu RM5 – Lu RM7) byl testován vliv přídavku chloristanu sodného jako aditiva do různých mobilních fází. [81] Chloristanový anion lze zařadit mezi řadu chaotropních činidel, která velmi výrazně působí na interakci chirálních látek se stacionární a mobilní fází. Vliv těchto činidel na chirální separaci látky K 1277 je hodnocen v kapitole 2.3.2.3. [48]

Pokud byla jako MFA využita voda s přídavkem 100 mM chloristanu sodného a jako MFB methanol s přídavkem 100 mM chloristanu sodného (**Lu RM5**), bylo dosaženo separace enantiomerů s rozlišením  $R = 2,28$ , kdy se *R*-izomer eluoval v retenčním čase  $t_{R1} = 18,37$  minut a *S*-izomer v retenčním čase  $t_{R2} = 19,67$  minut. Retenční časy obou enantiomerů jsou poměrně vysoké vzhledem k naprogramování gradientové metody (GRADIENT\*). Eluční čas obou enantiomerů tedy odpovídá složení mobilní fázi s velmi vysokým zastoupením složky MFB (MeOH + 100 mM NaClO<sub>4</sub>). Tato predikce se potvrdila nastavením separačních podmínek **Lu RM7**, kdy při poměrovém zastoupením 45 % MFA a 55 % MFB došlo k velmi silné interakci analytu se stacionární fází a analyt se neeluoval z kolony ani po padesáti minutách. Pro eluci analytů v nižších retenčních časech by bylo nutné výrazně zvýšit procentuální zastoupení složky MFB.

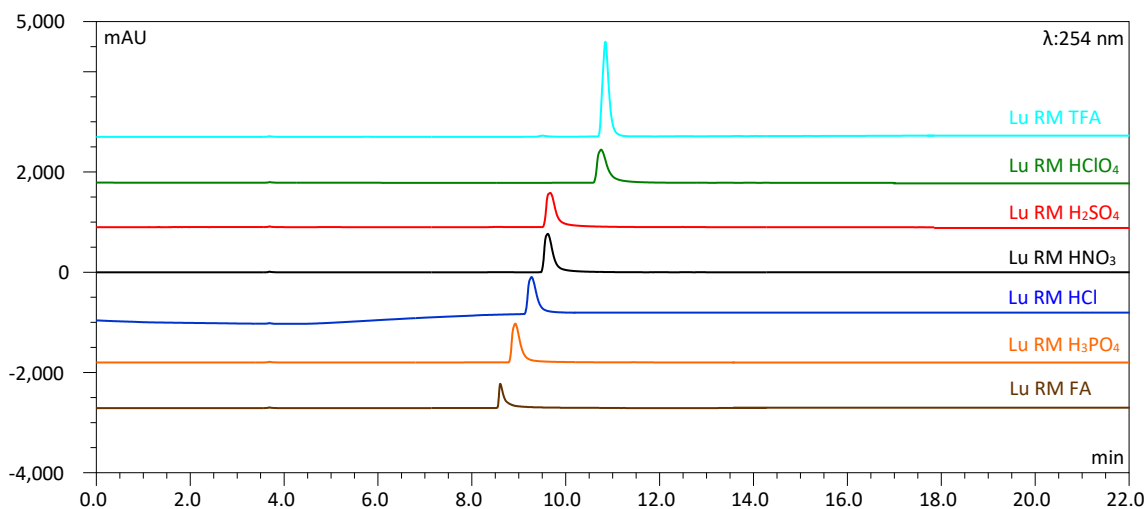
Při podmínkách **Lu RM6 (pH = 5,76)** byla jako MFA využita rovněž voda s přídavkem 100 mM chloristanu sodného, ale jako MFB byl využit acetonitril s přídavkem 100 mM chloristanu sodného. Při takto zvoleném složení MF dochází k eluci *R*-enantiomeru látky K 1277 v retenčním čase  $t_{R1} = 13,01$  minut a *S*-enantiomeru v retenčním čase  $t_{R2} = 13,70$  minut s rozlišením  $R = 1,80$ .

U nastavených podmínek Lu RM 6 (pH = 5,76) byl také testován vliv změny pH mobilní fáze. Pokud byla do mobilní fáze přidána kyselina mravenčí a došlo tedy ke snížení pH mobilní fáze, byla chirální separace enantiomerů látky K 1277 narušena a eluoval se pouze jeden pík látky K 1277. K narušení selektivity interakce enantiomerů s CSF dochází zřejmě díky protonizaci primární aminoskupiny látky K 1277 a následné solvataci vodou. Tento jev je doložen příklady **Lu RM6 (pH = 5,5)**, **Lu RM6 (pH = 5)** a **Lu RM6 (pH = 4)**, u kterých byla do mobilní fáze přidávána kyselina ve třech různých koncentracích.

Při podmínkách Lu RM 6 byl také testován vliv zvýšení hodnoty pH mobilní fáze pomocí přídavku 2M roztoku hydroxidu sodného. Hydroxid byl přidán v množství odpovídajícím výslednému pH mobilní fáze s hodnotou 8,4 (**Lu RM 6 (pH = 8,4)**). Při HPLC analýze takto upraveného pH mobilní fáze nebyl pozorován žádný zásadní rozdíl ve změně retenčních časů a rozlišení enantiomerů látky K 1277 v porovnání s podmínkami Lu RM6 (pH = 5,76), u kterých nebylo pH mobilní fáze nijak upravováno.

### Vliv přidavku kyselin do mobilní fáze v reverzním elučním módu

Na koloně Lux Cellulose - 1 bylo v reverzním elučním módu provedeno hodnocení vlivu přidavku řady sedmi různých kyselin do mobilní fáze. Jejich přehled je uveden v tabulce č. 12. a výsledné chromatografické záznamy jsou uvedeny na obrázku 27.



**Obr. 27 :** Vliv přidavku kyselin do mobilní fáze v reverzním elučním módu

**Tab. 12 :** Vliv přidavku kyselin do mobilní fáze v reverzním elučním módu

Označení	Doba analýzy (min)	Průtok (ml/min)	Teplota (°C)	Nástřik (μl)	Mobilní fáze (v/v)	Hodnocení $t_R$ (min)
Lu RM FA	22,5	0,8	27	5	MFA (H <sub>2</sub> O) + MFB (ACN) + 0,1% FA (99%) GRADIENT *	$t_R = 8,53$
Lu RM H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	22,5	0,8	27	5	MFA (H <sub>2</sub> O) + MFB (ACN) + 0,05% H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (85 - 90%)** GRADIENT *	$t_R = 8,93$
Lu RM HCl	22,5	0,8	27	5	MFA (H <sub>2</sub> O) + MFB (ACN) + 0,05% HCl (36%) GRADIENT *	$t_R = 9,27$
Lu RM HNO <sub>3</sub>	22,5	0,8	27	5	MFA (H <sub>2</sub> O) + MFB (ACN) + 0,05% HNO <sub>3</sub> (65%) GRADIENT *	$t_R = 9,61$
Lu RM H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	22,5	0,8	27	5	MFA (H <sub>2</sub> O) + MFB (ACN) + 0,05% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (96%) GRADIENT*	$t_R = 9,67$
Lu RM HClO <sub>4</sub>	22,5	0,8	27	5	MFA (H <sub>2</sub> O) + MFB (ACN) + 0,05% HClO <sub>4</sub> (70%) GRADIENT *	$t_R = 10,73$
Lu RM TFA	22,5	0,8	27	5	MFA (H <sub>2</sub> O) + MFB (ACN) + 50 mM TFA GRADIENT *	$t_R = 10,84$

\* GRADIENT: Eluce probíhala za použití lineárního gradientu v systému MFA a MFB s vývojem: **0 - 1 min 5% MFB, 1 - 16 min 5 - 100% MFB lineárně, 16 - 17 min 100% MFB, 17 min 5% MFB skokem, 17 - 22,5 min 5% MFB.**

\*\* Na zásobní lahvi s kyselinou fosforečnou je od výrobce uvedeno koncentrační rozmezí, proto se i v tabulce vyskytuje koncentrační rozmezí.

Chromatogramy uvedené na obrázku 27 zobrazují vliv přidavku různých kyselin do mobilní fáze. Ze všech záznamů vyplývá, že pokud je v mobilní fázi o složení voda (MFA) a acetonitril (MFB) sníženo pH přidavkem kyseliny, pak dochází ke ztrátě enantioseparace. V závislosti

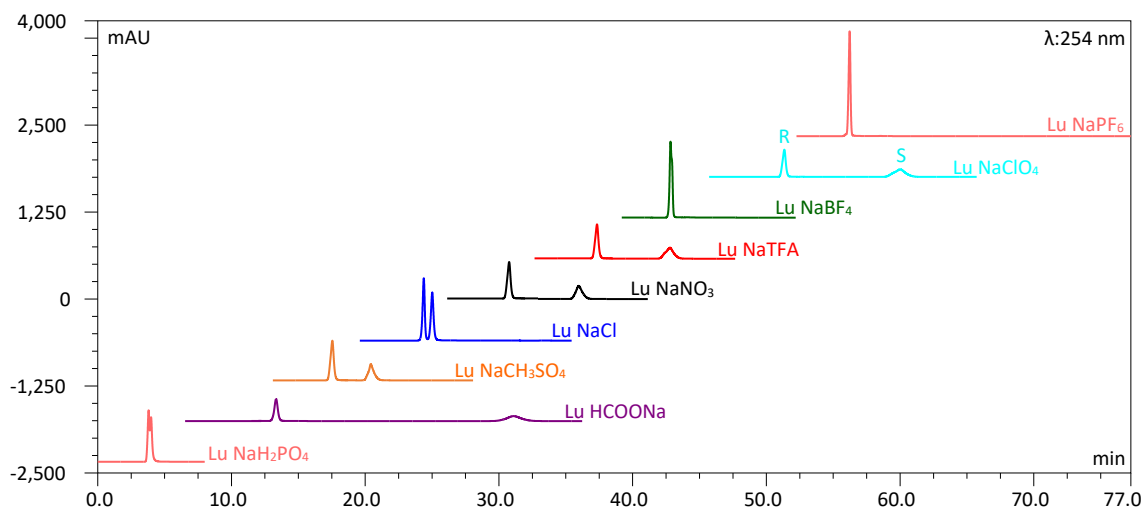
na druhu, síle a koncentraci přidávané kyseliny, a tedy pH mobilní fáze, dochází ke změnám retenčního času tohoto píku. Snížení pH mobilní fáze podporuje protonizaci látky K 1277, což má pravděpodobně negativní vliv na chirální separaci. Je třeba dodat, že látka K 1277 obsahuje primární aminoskupinu vázanou na chirální centrum, která se snadno protonizuje v kyselém prostředí. Zvýšení polarizace v tomto místě chemické struktury látky K 1277 má tedy zřejmě silný vliv na její interakci s CSF v koloně Lux Cellulose - 1.

#### 4.2.3.2 Vliv chaotropních činidel na separaci látky K 1277

Dalším z cílů diplomové práce bylo zhodnocení vlivu přídavku různých chaotropních činidel do mobilní fáze na separaci enantiomerů látky K 1277. Výběr řady chaotropních činidel byl proveden dle Hofmeisterovy řady aniontů uvedené v publikaci Kazakevich, 2005. V této řadě jsou anionty seřazeny dle jejich narůstajícího chaotropního efektu:  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ,  $\text{HCOO}^-$ ,  $\text{CH}_3\text{SO}_3^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{CF}_3\text{COO}^-$  (TFA $^-$ ),  $\text{BF}_4^-$ ,  $\text{ClO}_4^-$ ,  $\text{PF}_6^-$ . [48]

Pro testování vlivu chaotropních činidel v diplomové práci byly použity sodné soli výše uvedených aniontů. Vliv chaotropních činidel na separaci enantiomerů látky K 1277 byl sledován v mobilní fázi: 70 % acetonitrilu + 30 % vody + 50 mM (25 mM) chaotropního činidla (Tab. 13). Procentuální zastoupení složek v mobilní fázi bylo stanoveno v tomto poměru z důvodu rozpustnosti chaotropních činidel v MF. Některá činidla se totiž v acetonitrilu rozpouštěla jen velmi neochotně.

Ve dvou případech bylo nutné přistoupit k použití 25 mM chaotropního činidla. V případě dihydrogenfosforečnanu sodného z důvodu špatné rozpustnosti tohoto chaotropního činidla v acetonitrilu a v případě methansulfonátu sodného z důvodu nedostatečného množství tohoto činidla na pracovišti, kde byla analýza prováděna.



**Obr. 28 :** Chromatografické záznamy po využití řady chaotropních činidel. (Z důvodu lepší přehlednosti chromatografického záznamu jsou záznamy pro jednotlivá chaotropní činidla posunuty na osách x a y směrem k vyšším hodnotám. Skutečná doba analýzy je uvedena v tab. 13).

**Tab. 13 : Přehled využitých chaotropních činidel.**

Označení	Doba analýzy (min)	Průtok (ml/min)	Teplota (°C)	Nástřik (μl)	Mobilní fáze (v/v)	Hodnocení $t_R$ (min)
Lu NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH = 5,54)	8	0,8	27	5	70% ACN+ 30% H <sub>2</sub> O + 25 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	$t_{R1} = 3,80$ ; $t_{R2} = 3,99$ R = nelze určit
Lu COONa (pH = 7,95)	30	0,8	27	5	70% ACN+ 30% H <sub>2</sub> O + 50 mM HCOONa	$t_{R1} = 6,81$ ; $t_{R2} = 24,57$ R = 14,37 $As_1 = 1,01$ ; $As_2 = 1,06$
Lu NaCH <sub>3</sub> SO <sub>4</sub> (pH = 5,58)	15	0,8	27	5	70% ACN+ 30% H <sub>2</sub> O + 25 mM NaCH <sub>3</sub> SO <sub>4</sub>	$t_{R1} = 4,26$ ; $t_{R2} = 7,35$ R = 6,05 $As_1 = 1,03$ ; $As_2 = 1,22$
Lu NaCl (pH = 5,26)	12	0,8	27	5	70% ACN+ 30% H <sub>2</sub> O + 50 mM NaCl	$t_{R1} = 3,59$ ; $t_{R2} = 4,07$ R = 1,91 $As_1 = 0,91$ ; $As_2 = 1,0$
Lu NaNO <sub>3</sub> (pH = 5,40)	15	0,8	27	5	70% ACN+ 30% H <sub>2</sub> O + 50 mM NaNO <sub>3</sub>	$t_{R1} = 4,73$ ; $t_{R2} = 9,84$ R = 8,34 $As_1 = 0,98$ ; $As_2 = 1,18$
Lu NaTFA (pH = 5,32)	15	0,8	27	5	70% ACN+ 30% H <sub>2</sub> O + 50 mM NaTFA	$t_{R1} = 4,78$ ; $t_{R2} = 10,13$ R = 6,89 $As_1 = 0,92$ ; $As_2 = 1,00$
Lu NaBF <sub>4</sub> (pH = 5,02)	13	0,8	27	5	70% ACN+ 30% H <sub>2</sub> O + 50 mM NaBF <sub>4</sub>	$t_{R1} = 3,64$
Lu NaClO <sub>4</sub> (pH = 5,33)	20	0,8	27	5	70% ACN+ 30% H <sub>2</sub> O + 50 mM NaClO <sub>4</sub>	$t_{R1} = 5,62$ ; $t_{R2} = 14,29$ R = 8,20 $As_1 = 0,95$ ; $As_2 = 1,00$
Lu NaPF <sub>6</sub> (pH = 3,76)	15	0,8	27	5	70% ACN+ 30% H <sub>2</sub> O + 25 mM NaPF <sub>6</sub>	$t_{R1} = 3,97$

Všechna využitá chaotropní činidla byla rozpuštěna ve směsi mobilní fáze se složením: 30 % voda + 70 % acetonitril. V analýzách využívajících chaotropní činidla jako modifikátor mobilní fáze pro chirální separaci látky K 1277 velmi závisí na zvoleném pH, protože pokud byly namísto solí chaotropních činidel využity kyseliny obsahující chaotropní anionty byla ve všech případech enantioseparace narušena (viz kapitola 4.2.3.1).

Prvním z využitých chaotropních činidel je 50 mM **dihydrogenfosforečnan sodný**. V této mobilní fázi bylo naměřeno pH = 5,54 (**Lu NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>**) a došlo zde k náznačce separace enantiomerů látky K 1277. K eluci R - izomeru došlo v čase 3,80 minut a S - izomer se eluoval v čase 3,99 minut. Jelikož se retenční časy obou enantiomerů nacházejí velmi blízko u sebe, není možné stanovit hodnotu rozlišení těchto dvou píků. Případná optimalizace metody Lu NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pro lepší separaci enantiomerů látky K 1277 by byla pravděpodobně možná pomocí změny koncentrace chaotropního činidla nebo změnou poměru mezi ACN a H<sub>2</sub>O v MF, případně pomocí výraznějšího snížení teploty kolonového termostatu.

Druhým použitým chaotropním činidlem byl 50 mM **mravenčan sodný**. U této mobilní fáze bylo pH = 7,95 (**Lu HCOONa**) a z chromatogramu na obrázku 28 lze odečíst retenční čas R - izomeru 6,81 minut a S - izomeru 24,57 minut. Za těchto podmínek bylo dosaženo nejvyššího rozlišení (R = 14,37) obou enantiomerů, avšak délka trvání analýzy byla více jak 25 minut. Optimalizace metody Lu HCOONa by byla opět možná pomocí změny poměrů mezi ACN a H<sub>2</sub>O v MF, případně zvýšením teploty v kolonovém termostatu.

Dalším činidlem v pořadí je 25 mM **methansulfonát sodný (Lu NaCH<sub>3</sub>SO<sub>4</sub>)** s pH = 5,58. V tomto případě bylo rozlišení enantiomerů 6,05. Problémem při využití tohoto činidla je zhoršená hodnota symetrie píku S - izomeru ( $As_2 = 1,22$ ). Zhoršení symetrie může být způsobeno jak nežádoucím vlivem efektu methansulfonátu sodného, tak vlivem snížené koncentrace tohoto činidla v porovnání s činidly ostatními z důvodu nedostatečného množství tohoto činidla.

V případě využití **chloridu sodného** (pH = 5,26) jako chaotropního činidla došlo k separaci enantiomerů s rozlišením  $R = 1,91$  (**Lu NaCl**).

Testován byl také vliv **dusičnanu sodného** (**Lu NaNO<sub>3</sub>**) s pH = 5,4. V případě využití tohoto činidla došlo k eluci *R* - enantiomeru v retenčním čase 4,73 minut a *S* - enantiomeru v retenčním čase 9,84. Symetrie prvního píku byla spočítána softwarem na hodnotu 0,98, u druhého píku se jednalo o hodnotu 1,18. Výsledná hodnota rozlišení enantiomerů byla 9,84.

Velmi dobré separace enantiomerů bylo také dosaženo za použití 50 mM **triflouroctanu sodného** (**Lu NaTFA**) s pH = 5,32. Z hodnocení v tabulce č. 13 je patrné, že symetrie obou píků enantiomerů se velmi blížila hodnotě jedna, čili píky jsou téměř symetrické a jejich rozlišení bylo 6,89.

Z chromatogramu na obrázku 28 je patrné, že při využití **tetrafluoroborátu sodného** (**Lu NaBF<sub>4</sub>**) s pH = 5,02 nedochází k separaci enantiomerů látky K 1277 a analyt se eluuje v retenčním čase 3,64 minut. Ze zkušeností při testování tetrafluoroborátu sodného jako aditiva v MF je patrné, že pokud bychom chtěli dosáhnout separace enantiomerů látky K 1277, bylo by nutné zvýšit pH mobilní fáze a případně optimalizovat teplotu kolonového termostatu.

V případě využití **chloristanu sodného** (**Lu NaClO<sub>4</sub>**) s pH mobilní fáze 5,33 došlo k eluci *R* - izomeru v retenčním čase 5,62 minut a *S* - izomeru v retenčním čase 14,29 minut s dostatečně vysokou hodnotou rozlišení ( $R = 8,2$ ). Symetrie *S* - izomeru byla softwarem spočítána jako  $As_2 = 1,00$  a symetrie *R* - izomeru jako  $As_1 = 0,95$ . Chloristan sodný byl zvolen jako nejvhodnější chaotropní činidlo, jelikož v jeho přítomnosti došlo k výborné separaci enantiomerů látky K 1277 s dostatečným rozlišením a zároveň bylo dosaženo nejlepších hodnot symetrie obou píků. Výhodou chloristanu sodného v porovnání s ostatními činidly je navíc jeho dobrá rozpustnost v acetonitrilu. Mobilní fáze s obsahem chloristanu sodného byla vybrána jako velmi výhodná k následné optimalizaci podmínek pro vývin nejvhodnější metody separace enantiomerů látky K 1277.

Posledním testovaným činidlem byl **hexafluorofosfát sodný** (**Lu NaPF<sub>6</sub>**). Při použití Na PF<sub>6</sub> s pH = 3,76 nebylo dosaženo separace enantiomerů a analyt se eluoval v retenčním čase 3,97 minut. Ze zkušeností při práci s tímto činidlem by bylo pro případnou separaci enantiomerů nutné výrazně snížit koncentraci přidávaného chaotropního činidla.

#### 4.2.4 Optimalizace separační metody

Pro optimalizaci byly vybrány podmínky separace **Lu NaClO<sub>4</sub>** (viz tab. č. 13) probíhající v reverzním elučním módu na koloně Lux Cellulose - 1. Jako hodnotící kritéria vhodnosti analytických podmínek pro optimalizaci byla zvolena krátkost metody, levnost a snadnost přípravy MF, její bezpečnost a toxicita, rozlišení a symetrie enantiomerů.

Jako mobilní fáze byla použita směs 70 % acetonitrilu a 30 % vody s přidavkem 50 mM chloristanu sodného. Velmi dobrou výhodou chloristanu sodného v porovnání s ostatními chaotropními činidly je jeho dobrá rozpustnost v acetonitrilu. Výsledkem této analýzy byla separace enantiomerů látky K 1277 s dostatečným rozlišením ( $R = 8,2$ ). Identita *R* a *S* izomerů byla určena díky porovnání se standardy *R* a *S* enantiomerů, pocházejícími z enantioselektivní syntézy. Retenční čas *R* - enantiomeru byl 5,62 minut a *S* - enantiomeru 14,29 minut. Symetrie u prvního píku byla spočítána na hodnotu 0,95, u druhého píku měla hodnotu 1,00, z čehož vyplývá, že oba píky jsou téměř symetrické. Hodnota symetrie píku byla softwarem vypočítána

dle rovnice na obr. 29.

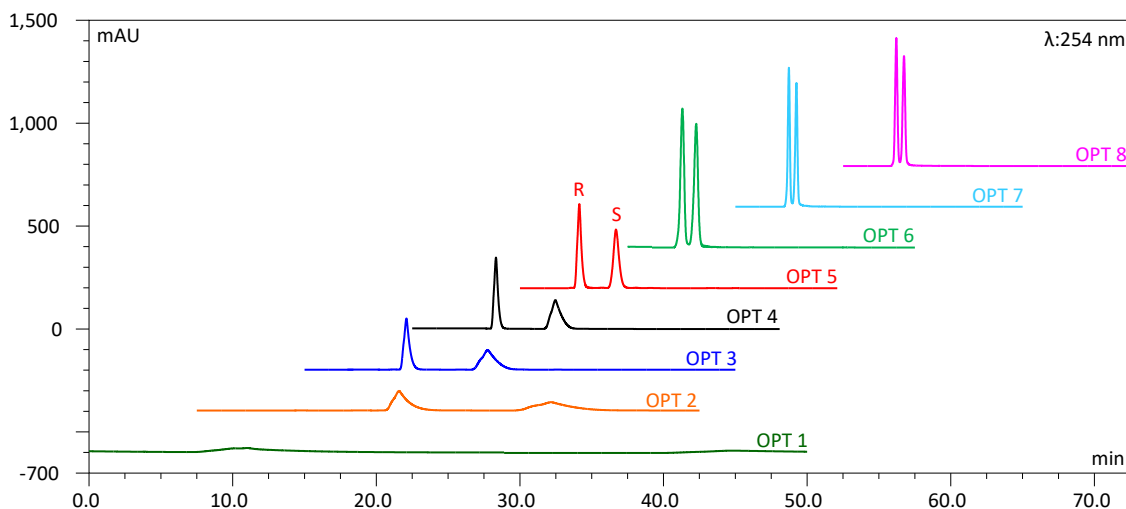
$$A_s = \frac{RW_{5\%} + LW_{5\%}}{2 * LW_{5\%}}$$

**Obr. 29 :** Vzorec pro výpočet symetrie píku, kde  $A_s$  značí symetrii píku,  $RW_{5\%}$  značí pravou polovinu šířky píku v 5% jeho výšky a  $LW_{5\%}$  značí levou polovinu šířky píku.

Při optimalizaci metody docházelo vždy ke změně pouze jednoho parametru. Jednalo se tedy o univariantní optimalizaci vybrané metody separace. Optimalizace spočívala ve stanovení nejvhodnějšího procentuálního zastoupení složek mobilní fáze, v určení vhodné koncentrace chloristanu sodného v mobilní fázi, v nastavení optimální teploty kolonového termostatu a ve stanovení vhodného průtoku mobilní fáze. Poté byl testován vliv velikosti nástřiku vzorku a vliv různých rozpouštědel vzorku. Výsledná metoda je kombinací všech nejlepších hodnot sledovaných parametrů. Jako kritérium pro výběr nejlepší hodnoty daného optimalizačního parametru bylo zvoleno rozlišení, symetrie a absolutní výška píků, dále pak krátkost metody a dostatečná rozpustnost chaotropního činidla v MF.

#### 4.2.4.1 Vliv změny složení mobilní fáze

Prvním optimalizovaným parametrem bylo procentuální zastoupení složek mobilní fáze. Mobilní fáze byla pomocí vysokotlakého čerpadla nasávána ze dvou zásobních lahví, kde se v první láhvi nacházela voda s obsahem 50 mM chloristanu sodného, a ve druhé láhvi byl acetonitril s obsahem 50 mM chloristanu sodného. Složení mobilní fáze se postupně měnilo od hodnoty 30 % ACN a 70 % H<sub>2</sub>O až po hodnotu 90 % ACN a 10 % H<sub>2</sub>O (viz tabulka č. 14 a Obr. 30).



**Obr. 30 :** Chromatografické záznamy různého procentuálního zastoupení složek mobilní fáze. (Z důvodu lepší přehlednosti chromatografického záznamu jsou záznamy pro jednotlivé změny složení mobilních fází posunuty na osách x a y směrem k vyšším hodnotám. Skutečná doba analýzy je uvedena v tab. 14).

**Tab. 14 :** Optimalizace procentuálního zastoupení složek mobilní fáze.

Označení	Doba analýzy (min)	Průtok (ml/min)	Teplota (°C)	Nástřik (μl)	Mobilní fáze (v/v)	Hodnocení $t_R$ (min); R
OPT 1	50	0,8	27	5	30% ACN + 70% H <sub>2</sub> O + 50 mM NaClO <sub>4</sub>	$t_{R1} = 11,03$ ; $t_{R2} = 44,68$ $AS_1 = 2,12$ ; $AS_2 = 1,12$ $R = 4,59$
OPT 2	35	0,8	27	5	40% ACN + 60% H <sub>2</sub> O + 50 mM NaClO <sub>4</sub>	$t_{R1} = 14,08$ ; $t_{R2} = 24,67$ $AS_1 = 1,66$ ; $AS_2 = 1,33$ $R = 3,47$
OPT 3	30	0,8	27	5	50% ACN + 50% H <sub>2</sub> O + 50 mM NaClO <sub>4</sub>	$t_{R1} = 7,10$ ; $t_{R2} = 12,75$ $AS_1 = 1,33$ ; $AS_2 = 1,34$ $R = 4,47$
OPT 4	25	0,8	27	5	<b>55% ACN + 45% H<sub>2</sub>O + 50 mM NaClO<sub>4</sub></b>	<b><math>t_{R1} = 5,83</math>; <math>t_{R2} = 9,97</math></b> <b><math>AS_1 = 1,18</math>; <math>AS_2 = 1,32</math></b> <b><math>R = 4,67</math></b>
OPT 5	25	0,8	27	5	60% ACN + 40% H <sub>2</sub> O + 50 mM NaClO <sub>4</sub>	$t_{R1} = 4,82$ ; $t_{R2} = 6,72$ $AS_1 = 1,06$ ; $AS_2 = 1,29$ $R = 4,19$
OPT 6	20	0,8	27	5	70% ACN + 30% H <sub>2</sub> O + 50 mM NaClO <sub>4</sub>	$t_{R1} = 4,05$ ; $t_{R2} = 4,86$ $AS_1 = 0,91$ ; $AS_2 = 1,00$ $R = 2,67$
OPT 7	20	0,8	27	5	80% ACN + 20% H <sub>2</sub> O + 50 mM NaClO <sub>4</sub>	$t_{R1} = 3,73$ ; $t_{R2} = 4,25$ $AS_1 = 0,88$ ; $AS_2 = 0,90$ $R = 1,93$
OPT 8	10	0,8	27	5	90% ACN + 10% H <sub>2</sub> O + 50 mM NaClO <sub>4</sub>	$t_{R1} = 3,71$ ; $t_{R2} = 4,24$ $AS_1 = 0,98$ ; $AS_2 = 0,93$ $R = 1,67$

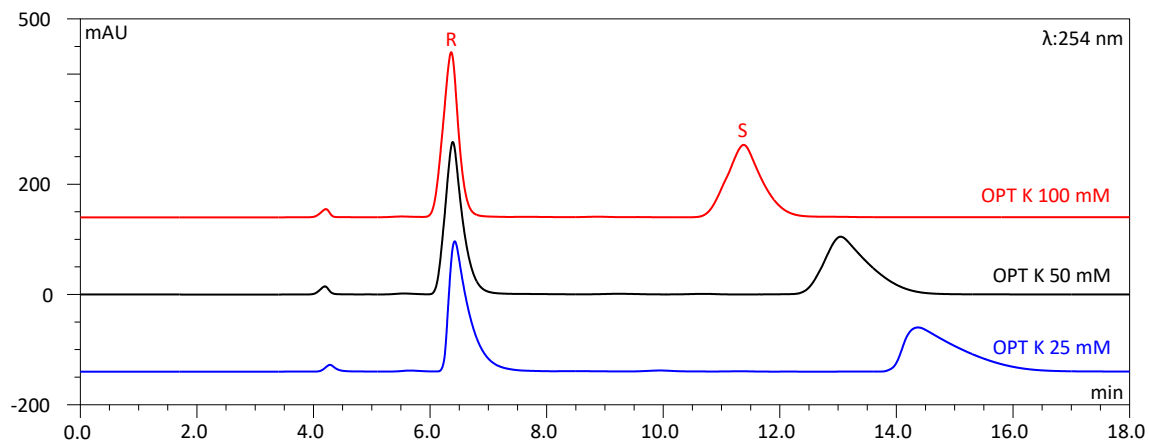
Složení mobilní fáze se postupně měnilo od hodnoty 30 % ACN a 70 % H<sub>2</sub>O (OPT 1) až po hodnotu 90 % ACN a 10 % H<sub>2</sub>O (OPT 8). Nárůst procentuálního zastoupení acetonitrilu byl vždy o 5 %. V tabulce č. 14 a na záznamu č. 30 jsou uvedeny pouze vybrané výsledky a chromatogramy.

Při nižších koncentracích acetonitrilu v MF byly zaznamenány vysoké retenční časy enantiomerů se zhoršenou hodnotou symetrie píků. Se zvyšujícím se poměrem acetonitrilu v MF dochází k poklesu retenčních časů, ale zároveň také ke snížení hodnoty rozlišení píků enantiomerů látky K 1277. Nejvyššího rozlišení (**R = 4,67**) bylo dosaženo za podmínek **OPT 4**, kde procentuální složení mobilní fáze bylo **55 % ACN + 50 mM NaClO<sub>4</sub> a 45 % H<sub>2</sub>O + 50 mM NaClO<sub>4</sub>**. Symetrie obou píků byla v tomto případě dostačující.



#### 4.2.4.2 Vliv změny koncentrace chloristanu sodného

Druhým z optimalizovaných parametrů byla koncentrace chloristanu sodného přidávaného do mobilní fáze jako chaotropní činidlo. Přehled výsledků optimalizace koncentrace je uveden v tabulce č. 15 a naměřené chromatogramy jsou uvedeny na obrázku 31. Koncentrace chaotropního činidla byla měněna v rozsahu od 25 mM do 100 mM NaClO<sub>4</sub>.



**Obr. 31 :** Chromatografické záznamy optimalizace koncentrace chloristanu sodného.

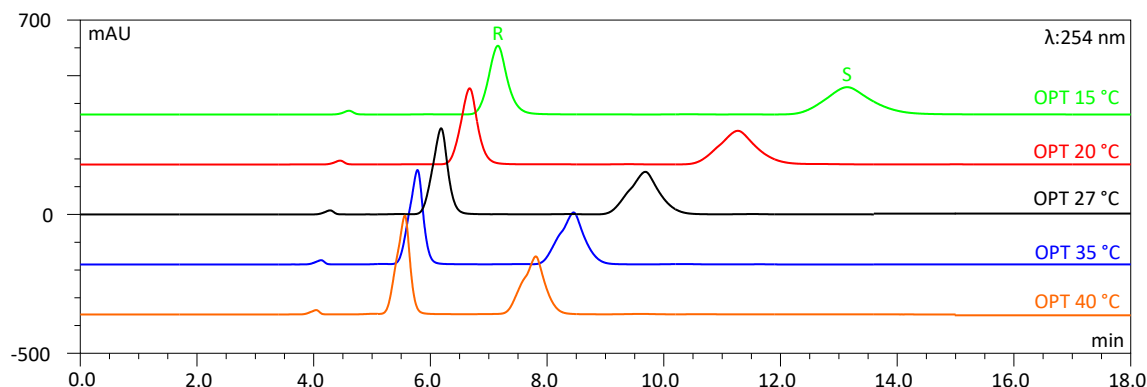
**Tab. 15 :** Přehled podmínek optimalizace koncentrace chloristanu sodného.

Označení	Doba analýzy (min)	Průtok (ml/min)	Teplota (°C)	Nástřik (μl)	Mobilní fáze (v/v)	Hodnocení t <sub>R</sub> (min); R
<b>OPT K 25 mM</b>	18	0,8	27	5	55 % ACN + 45 % H <sub>2</sub> O + 25 mM NaClO <sub>4</sub>	t <sub>R1</sub> = 6,42; t <sub>R2</sub> = 14,37 As <sub>1</sub> = 2,28; As <sub>2</sub> = 2,50 R = 6,87
<b>OPT K 50 mM</b>	18	0,8	27	5	55 % ACN + 45 % H <sub>2</sub> O + 50 mM NaClO <sub>4</sub>	t <sub>R1</sub> = 6,39; t <sub>R2</sub> = 13,04 As <sub>1</sub> = 1,32; As <sub>2</sub> = 1,51 R = 6,93
<b>OPT K 100 mM</b>	<b>18</b>	<b>0,8</b>	<b>27</b>	<b>5</b>	<b>55 % ACN + 45 % H<sub>2</sub>O + 100 mM NaClO<sub>4</sub></b>	<b>t<sub>R1</sub> = 6,36; t<sub>R2</sub> = 11,38</b> <b>As<sub>1</sub> = 1,02; As<sub>2</sub> = 1,14</b> <b>R = 6,36</b>

S rostoucí koncentrací chloristanu sodného přidávaného do MF dochází ke snižování retenčního času *S* – enantiomeru a ke zlepšení symetrie píků enantiomerů. Jako nejvhodnější koncentrace chloristanu sodného v MF byla zvolena koncentrace 100 mM (**OPT K 100 mM**). Prvním z důvodů tohoto výběru byla vhodná symetrie obou píků, druhým důvodem je výrazně nižší retenční čas *S* - enantiomeru (t<sub>R2</sub> = 11,38) a tím i celková kratší doba analýzy.

#### 4.2.4.3 Vliv změny teploty kolonového termostatu

Dalším parametrem optimalizace metody byla volba teploty kolonového termostatu. Teplota kolonového termostatu byla měněna v rozsahu od 15 °C do 40 °C. Přehled výsledků optimalizace teploty separace je uveden v tabulce č. 16 a chromatografické záznamy jsou uvedeny na obrázku 32.



**Obr. 32 :** Chromatografické záznamy optimalizace hodnoty teploty kolonového termostatu.

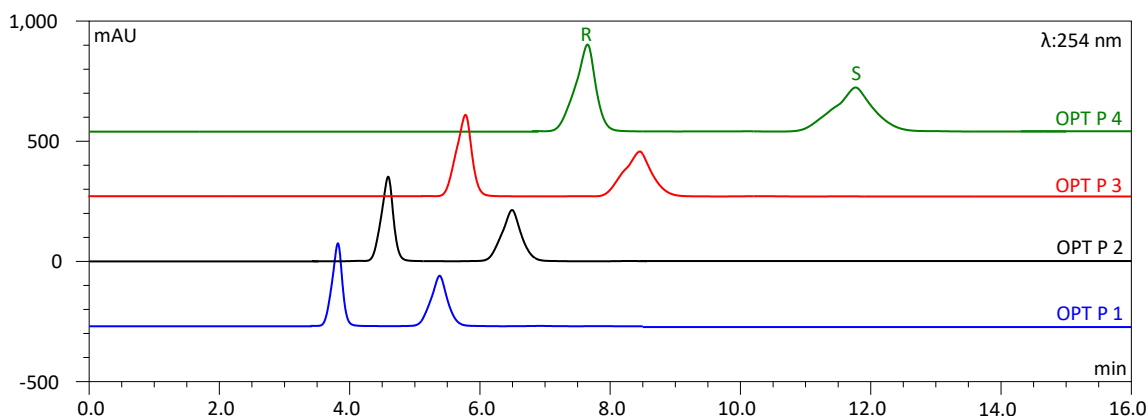
**Tab. 16 :** Přehled podmínek optimalizace teploty kolonového termostatu.

Označení	Doba analýzy (min)	Průtok (ml/min)	Teplota (°C)	Nástřik (μl)	Mobilní fáze (v/v)	Hodnocení tR (min)
OPT 15 °C	35	0,8	15	5	45% H <sub>2</sub> O + 55% ACN +100 mM NaClO <sub>4</sub>	t <sub>R1</sub> = 7,16; t <sub>R2</sub> = 13,14 AS <sub>1</sub> = 1,11; AS <sub>2</sub> = 1,16 R = 6,02
OPT 20 °C	31	0,8	20	5	45% H <sub>2</sub> O + 55% ACN +100 mM NaClO <sub>4</sub>	t <sub>R1</sub> = 6,67; t <sub>R2</sub> = 11,27 AS <sub>1</sub> = 1,03; AS <sub>2</sub> = 1,08 R = 5,46
OPT 27 °C	15	0,8	27	5	45% H <sub>2</sub> O + 55% ACN +100 mM NaClO <sub>4</sub>	t <sub>R1</sub> = 6,18; t <sub>R2</sub> = 9,68 AS <sub>1</sub> = 0,96; AS <sub>2</sub> = 1,02 H <sub>1</sub> = 309,7; H <sub>2</sub> = 153,2 R = 4,89
OPT 35 °C	15	0,8	35	5	45% H <sub>2</sub> O + 55% ACN +100 mM NaClO <sub>4</sub>	t <sub>R1</sub> = 5,78; t <sub>R2</sub> = 8,45 AS <sub>1</sub> = 0,89; AS <sub>2</sub> = 0,97 H <sub>1</sub> = 339,4; H <sub>2</sub> = 186,2 R = 4,29
OPT 40 °C	15	0,8	40	5	45% H <sub>2</sub> O + 55% ACN +100 mM NaClO <sub>4</sub>	t <sub>R1</sub> = 5,56; t <sub>R2</sub> = 7,81 AS <sub>1</sub> = 0,87; AS <sub>2</sub> = 0,93 R = 3,89

Díky nárůstu teploty kolonového termostatu dochází ke zvýšení účinnosti chromatografické kolony a klesá viskozita MF. S rostoucí hodnotou teploty kolonového termostatu se tedy snižují nároky na nezbytnou délku metody potřebnou pro separaci enantiomerů a dochází k poklesu retenčních časů enantiomerů. Zároveň však dochází také k postupnému mírnému poklesu rozlišení píků enantiomerů látky K 1277. Z hlediska vhodného minimálního času potřebného pro eluci obou enantiomerů, dostatečného rozlišení a dobré symetrie obou enantiomerů byly jako nejvhodnější kandidáti na optimální teplotu vybrány podmínky OPT 27 °C a OPT 35 °C. Za podmínek OPT 35 °C jsou hodnoty absolutních výšek píků (H) vyšší než je tomu při podmínkách OPT 27 °C. Z výše uvedených důvodů byly jako nejvhodnější podmínky pro další optimalizaci zvoleny separační podmínky **OPT 35 °C**. Takto optimalizovaná hodnota teploty kolonového termostatu je plně v souladu s požadavky výrobce kolony Lux Cellulose 1.

#### 4.2.4.4 Vliv změny velikosti průtoku mobilní fáze

Posledním optimalizovaným parametrem bylo nastavení hodnoty průtoku mobilní fáze. Testované hodnoty nastavení průtoku mobilní fáze byly 1,2 ml/min, 1,0 ml/min, 0,8 ml/min a 0,6 ml/min (Tab. 17). Chromatografické záznamy těchto podmínek separace jsou uvedeny na obrázku 33.



**Obr. 33 :** Chromatografické záznamy optimalizace průtoku mobilní fáze.

**Tab. 17 :** Přehled podmínek optimalizace průtoku mobilní fáze.

Označení	Doba analýzy (min)	Průtok (ml/min)	Teplota (°C)	Nástřik (μl)	Mobilní fáze (v/v)	Hodnocení tR (min)
OPT P 1	16	1,2	35	5	45% H <sub>2</sub> O + 55% ACN +100 mM NaClO <sub>4</sub>	t <sub>R1</sub> = 3,82; t <sub>R2</sub> = 5,38 As <sub>1</sub> = 0,91; As <sub>2</sub> = 1,00 R = 4,22
OPT P 2	16	1,0	35	5	45% H <sub>2</sub> O + 55% ACN +100 mM NaClO <sub>4</sub>	t <sub>R1</sub> = 4,56; t <sub>R2</sub> = 6,45 As <sub>1</sub> = 0,91; As <sub>2</sub> = 1,01 R = 4,34
OPT P 3	16	0,8	35	5	45% H <sub>2</sub> O + 55% ACN +100 mM NaClO <sub>4</sub>	t <sub>R1</sub> = 5,78; t <sub>R2</sub> = 8,45 As <sub>1</sub> = 0,89; As <sub>2</sub> = 0,96 R = 4,49
OPT P 4	16	0,6	35	5	45% H <sub>2</sub> O + 55% ACN +100 mM NaClO <sub>4</sub>	t <sub>R1</sub> = 7,65; t <sub>R2</sub> = 11,77 As <sub>1</sub> = 0,87; As <sub>2</sub> = 0,95 R = 4,93

S rostoucím průtokem mobilní fáze dochází k lineárnímu poklesu retenčních časů enantiomerů. Dále byla s rostoucím průtokem zaznamenána zlepšující se symetrie a zhoršující se rozlišení píků. Pokud porovnáme podmínky OPT P 1 a OPT P 2, které mají nejvhodnější tvar a hodnoty symetrie píků, můžeme pozorovat rozdíl v rozlišení a retenčních časech píků enantiomerů. Z hlediska dostatečného rozlišení píků enantiomerů byly jako optimální zvoleny podmínky **OPT P 2**, kde byl průtok mobilní fáze nastaven na hodnotu **1 ml/min**.

Takto optimalizovaná metoda byla zvolena jako optimální metoda pro separaci enantiomerů látky K 1277 a dále již nebyly prováděny žádné změny jejích parametrů. Metoda je v textu dále označována jako **metoda optimální**.

#### 4.2.4.5 Vliv velikosti nástřiku vzorku

U optimální metody byl také hodnocen vliv velikosti nástřiku vzorku, který se pohyboval v rozmezí od 0,1  $\mu$ l do 25  $\mu$ l. Změna velikosti hodnoty nástřiku však neměla žádný vliv na separaci enantiomerů. Retenční časy píků enantiomerů zůstávaly s minimální odchylkou na hodnotách 4,56 minut a 6,45 minut a rozlišení píků se se změnou hodnoty nástřiku rovněž výrazně neměnilo.

#### 4.2.4.6 Vliv změny rozpouštědla vzorku

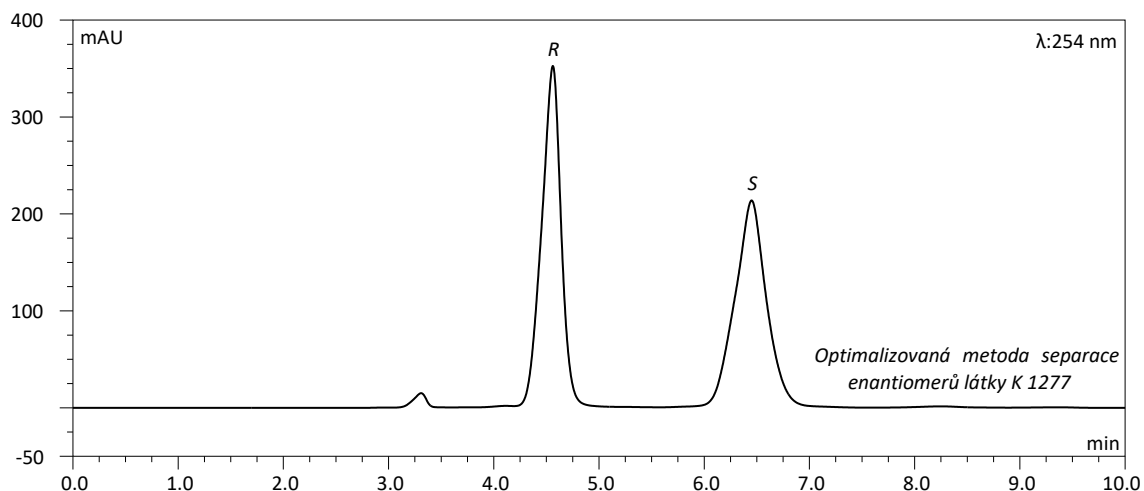
Dále byl testován vliv změny rozpouštědla vzorku. Koncentrace vzorku byla zachována na hodnotě 1 mg vzorku na 1 ml rozpouštědla a všechny vzorky rozpuštěné v níže uvedených rozpouštědlech byly analyzovány v jedné sekvenci. Zvolená rozpouštědla vzorku byla následující: methanol, voda, směs 45 % H<sub>2</sub>O a 55 % ACN a směs 45 % H<sub>2</sub>O a 55 % ACN s přidavkem 100 mM chloristanu sodného. Z chromatografických záznamů byl efekt různých rozpouštědel vzorku na separaci enantiomerů látky K 1277 stanoven jako zanedbatelný.

Toto tvrzení však neplatí v případě analýz biologických vzorků obsahujících látku K 1277, protože zde byly zaznamenány poměrně odlišné chromatografické záznamy v závislosti na chemikáliích použitých pro deproteinaci a v závislosti na matici vzorku. Například, pokud došlo ke snížení pH rozpouštědla vzorku (kyselina trichloroctová), bylo zaznamenáno úplné porušení separace enantiomerů látky K 1277 (viz kapitola 4.2.5.4.).

### 4.2.5 Hodnocení parametrů optimální metody separace enantiomerů látky K 1277

#### 4.2.5.1 Chromatografické záznamy optimalizované metody separace enantiomerů látky K 1277

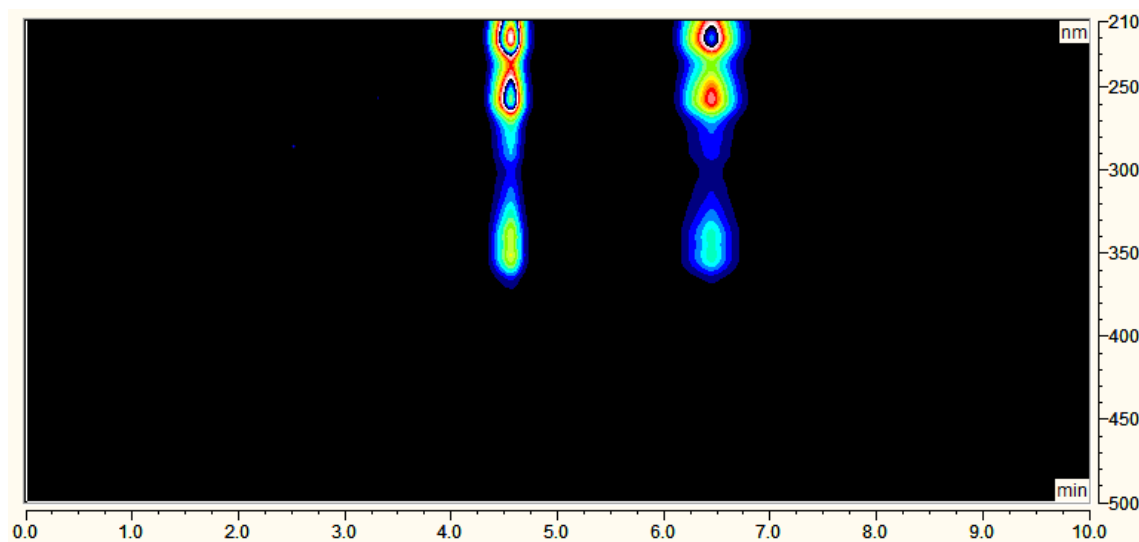
Tato kapitola se věnuje chromatografickým záznamům optimalizované metody naměřených na různých detektorech. Jako detektory byly využity čtyřkanálový ultrafialový detektor VWD - 3000 RS (Obr. 34) a detektor diodového pole DAD 3000 (Obr. 35).



**Obr. 34** : Chromatografický záznam optimální metody separace enantiomerů látky K 1277 (UV - 254 nm).

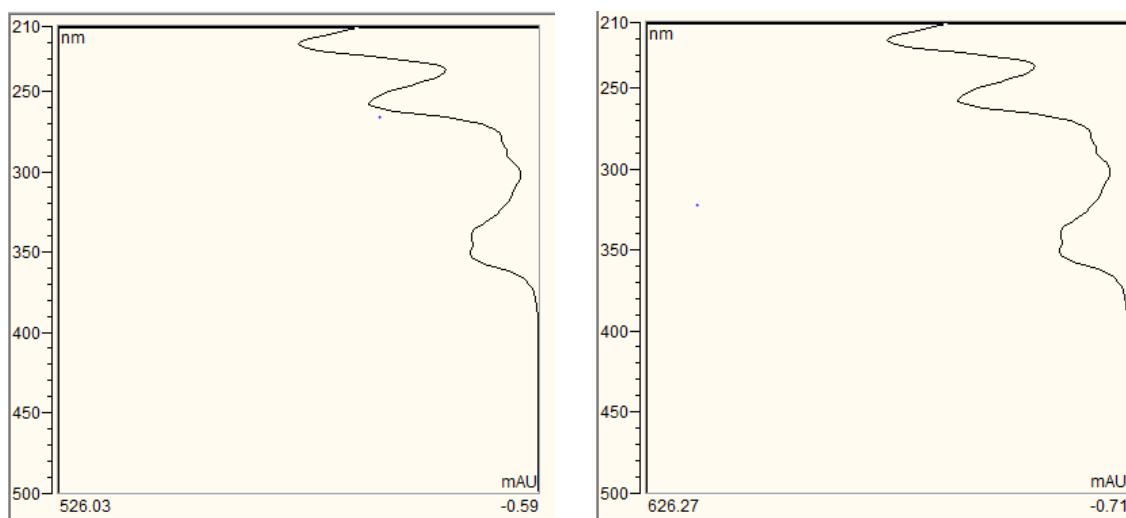
Prvním z využitých detektorů byl čtyřkanálový ultrafialový detektor VWD - 3000 RS . Záznamy byly snímány při čtyřech různých vlnových délkách a to při 210 nm, 254 nm, 270 nm a 290 nm. Jelikož při 254 nm byla naměřena nejvyšší intenzita snímaného signálu, byla tato vlnová délka stanovena jako reprezentativní.

Druhým z využitých detektorů byl detektor diodového pole DAD 3000. Tento typ detekce byl využit pro ověření specifity optimální metody (viz Obr. 35). *R* - izomer látky K 1277 se eluuje v retenčním čase  $t_{R1} = 4,56$  minut a *S* - izomer se eluuje v retenčním čase  $t_{R2} = 6,45$  minut.



**Obr. 35 :** Chromatografický záznam optimalizované metody separace enantiomerů látky K 1277 (DAD).

Na obrázku 36 jsou uvedena absorpční spektra jednotlivých enantiomerů. Absorpční spektrum bylo snímáno v rozsahu 210 - 500 nm. První spektrum (na obrázku 36 vlevo) je spektrum snímáno v retenčním čase  $t_{R1} = 4,56$  minut, který odpovídá *R* - izomeru. Druhé spektrum (na obrázku 36 vpravo) odpovídá spektru snímanému v retenčním čase  $t_{R2} = 6,45$  minut. Toto spektrum odpovídá *S* - izomeru. Z absorpčních spekter jednotlivých enantiomerů jsou patrná čtyři absorpční maxima ( $A_{max}$ ). Tato maxima byla naměřena v hodnotách  $A_{max 1} = 220,26$  nm,  $A_{max 2} = 257,29$  nm,  $A_{max 3} = 338,94$  nm a  $A_{max 4} = 351,47$  nm.

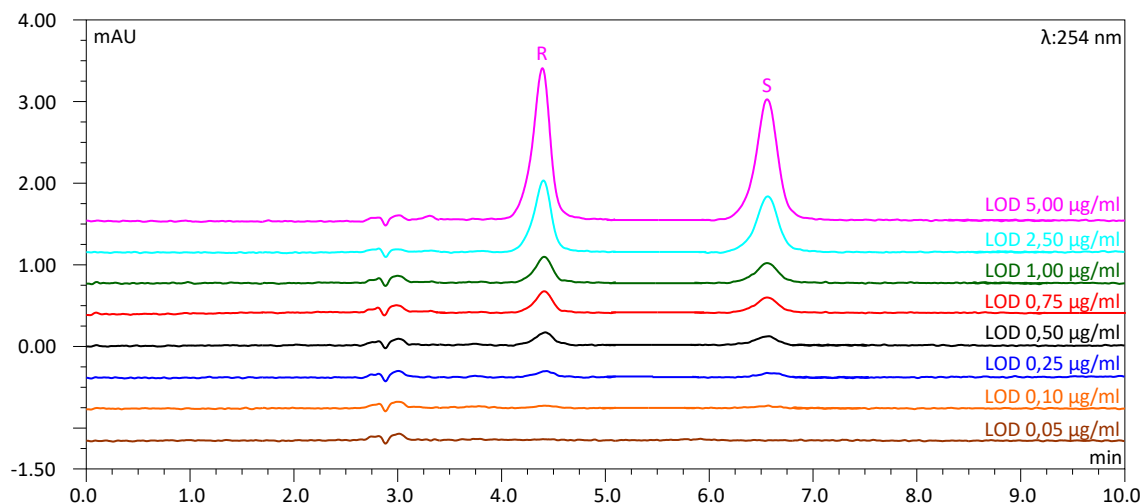


**Obr. 36 :** Záznam absorpčních spekter enantiomerů látky K 1277 (DAD: 210 - 500 nm). *R* - enantiomer (vlevo) a *S* - enantiomer (vpravo).

#### 4.2.5.2 Stanovení meze detekce optimální metody

Pro stanovení hodnoty meze detekce (LOD – Limit of Detection) u optimální metody bylo využito hodnoty S/N (Signal to Noise ratio – poměr signálu k šumu základní linie), která je hodnotou vypočítanou z poměru intenzity signálu k intenzitě šumu základní linie. Hladina limitu detekce (LOD) odpovídá hodnotě  $S/N = 3$ . [82]

Pro stanovení meze detekce byla využita 8 - mi úrovňová kalibrační řada vzorků (viz tabulka č. 18). Každá koncentrační hladina byla analyzována třikrát a ze záznamů byla odečtena hodnota S/N. (Obr. 37)



**Obr. 37 :** Stanovení meze detekce u optimální metody separace enantiomerů látky K 1277.

**Tab. 18 :** Stanovení meze detekce u optimální metody separace enantiomerů látky K 1277.

Označení	Doba analýzy (min)	Průtok (ml/min)	Teplota (°C)	Nástřik (µl)	Mobilní fáze (v/v)	Hodnocení tR (min)
LOD 5,00 µg/ml	10	1,0	35	5	45% H <sub>2</sub> O + 55% ACN +100 mM NaClO <sub>4</sub>	S/N = 30,4
LOD 2,50 µg/ml	10	1,0	35	5	45% H <sub>2</sub> O + 55% ACN +100 mM NaClO <sub>4</sub>	S/N = 16,8
LOD 1,00 µg/ml	10	1,0	35	5	45% H <sub>2</sub> O + 55% ACN +100 mM NaClO <sub>4</sub>	S/N = 4,8
LOD 0,75 µg/ml	10	1,0	35	5	45% H <sub>2</sub> O + 55% ACN +100 mM NaClO <sub>4</sub>	S/N = 3,5
LOD 0,50 µg/ml	10	1,0	35	5	45% H <sub>2</sub> O + 55% ACN +100 mM NaClO <sub>4</sub>	S/N = 2,7
LOD 0,25 µg/ml	10	1,0	35	5	45% H <sub>2</sub> O + 55% ACN +100 mM NaClO <sub>4</sub>	S/N = 1,2
LOD 0,10 µg/ml	10	1,0	35	5	45% H <sub>2</sub> O + 55% ACN +100 mM NaClO <sub>4</sub>	S/N = 0,6
LOD 0,05 µg/ml	10	1,0	35	5	45% H <sub>2</sub> O + 55% ACN +100 mM NaClO <sub>4</sub>	S/N = 0,3

V roztoku s koncentrací 0,75 µg/ml (LOD 0,75 µg/ml) byla stanovena hodnota S/N = 3,5 a v roztoku s koncentrací 0,50 µg/ml (LOD 0,50 µg/ml) byla naměřena hodnota S/N = 2,7. Vzhledem k uvedené definici byl LOD stanoven v intervalu mezi koncentracemi 0,75 µg/ml a 0,50 µg/ml a dále metodou lineární regrese a interpolací byla dle odpovídající definice S/N = 3 stanovena hodnota **LOD = 0,543 µg/ml**. [82]

#### 4.2.5.3 Stanovení přesnosti

U optimální metody byla rovněž stanovována přesnost kvantifikace a stabilita separace v deseti opakování shodných analýz. Opakovatelnost byla hodnocena při vlnové délce  $\lambda = 254$  nm u velikostí ploch pod píky, u retenčních času a u rozlišení enantiomerů látky K 1277. Dále pak byly vypočítány hodnoty S (výběrové směrodatné odchylky) a RSD (relativní směrodatné odchylky). Nástřik vzorku byl stanoven na hodnotu 5 µl a koncentrace vzorku na 1 mg/ml. Naměřené hodnoty jsou uvedeny v tabulce č. 19.

**Tab. 19 :** Stanovení přesnosti opakování u optimální metody separace látky K 1277.

Pokus č.	Retenční čas R - enantiomeru $t_{R1}$ (min)	Plocha pod píkem R - enantiomeru $A_1$ (mAU - min)	Retenční čas S - enantiomeru $t_{R2}$ (min)	Plocha pod píkem S - enantiomeru $A_2$ (mAU - min)	Rozlišení
1	4,51	73,01	6,57	71,01	4,27
2	4,51	74,13	6,56	72,66	4,24
3	4,50	75,30	6,54	73,71	4,22
4	4,50	75,41	6,53	73,41	4,21
5	4,50	75,83	6,52	74,31	4,19
6	4,49	75,53	6,51	74,02	4,18
7	4,49	75,90	6,49	74,39	4,17
8	4,49	75,37	6,48	73,44	4,16
9	4,49	75,35	6,47	73,75	4,14
10	4,48	75,30	6,46	74,00	4,13
<b>Průměr</b>	<b>4,50</b>	<b>75,1</b>	<b>6,51</b>	<b>73,5</b>	<b>4,19</b>
<b>S</b>	<b>0,00781</b>	<b>0,835</b>	<b>0,0349</b>	<b>0,948</b>	<b>0,0421</b>
<b>RSD (%)</b>	<b>0,174</b>	<b>1,11</b>	<b>0,535</b>	<b>1,29</b>	<b>1,00</b>

Při testování opakovatelnosti metody je z hodnot retenčních časů obou píků patrné, že dochází k postupnému posunu retenčních časů směrem k nižším hodnotám (posun o jednu nebo dvě setiny minuty). Pravděpodobnou příčinou tohoto překvapivého a systematického posunu je postupné zakoncentrovávání acetonitrilu z mobilní fáze na koloně Lux Cellulose – 1. V době interakce analytu se SF je tedy v mobilní fázi vyšší procentuální zastoupení acetonitrilu, než tomu bylo v předchozí analýze. Acetonitril narušuje zřejmě  $\pi - \pi$  interakce analytu s fenylovými jádry stacionární fáze, a proto se retenční čas posouvá směrem k nižším hodnotám. [48]

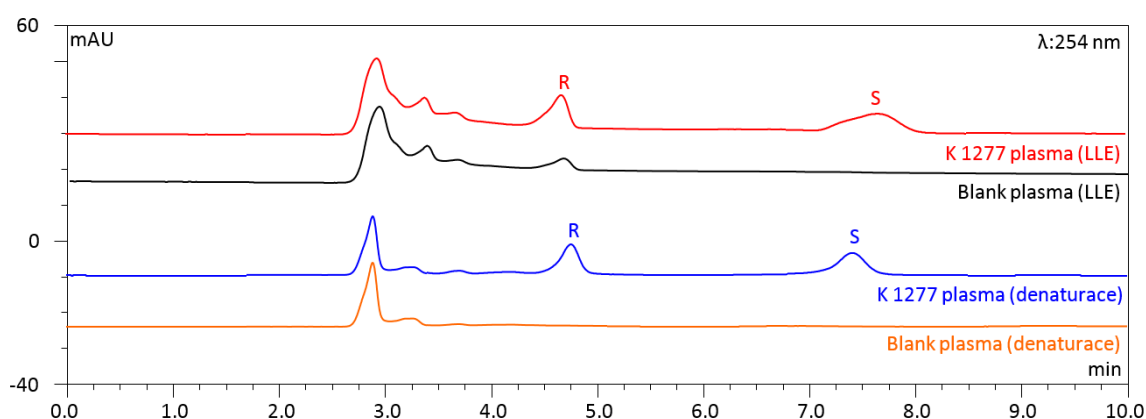
U stacionární fáze Lux Cellulose - 1 byla také vždy před začátkem měření nebo po výměně mobilních fází nutná ekvibrace kolony s trváním několika desítek minut. Kolonu bylo rovněž nutno s přibývajícím počtem nástřiků pravidelně regenerovat. Pravděpodobně výhodnějším řešením SF by v tomto případě byla volba kolony s nižší velikostí jejího vnitřního průtoku. Po snížení hodnoty vnitřního průtoku kolony by mohly klesnout i finanční nároky na jednotlivé analýzy, jelikož s poklesem obsahu sorbentu v koloně klesá také cena této kolony.

I přes výše uvedené komplikace lze závěrem zhodnotit, že opakovatelnost metody je vysoká, jelikož žádná z hodnot RSD není vyšší než 1,5%.

#### 4.2.5.4 Analýza látky K 1277 v lidské plasmě

Hodnocena byla rovněž možnost využití optimalizované metody po aplikaci látky K 1277 do lidské poolované plasmy. Větší množství zamražené lidské plasmy bylo nejprve rozmrazeno, poté rozaliquotováno na menší objemy, a poté byla plasma opět zamrazena na - 80 °C. Množství alikvoty potřebné pro analýzu bylo volně rozmrazeno na laboratorním stole a poté dále zpracováno.

Po aplikaci látky K 1277 do rozmražené lidské poolované plasmy bylo z důvodu obsahu proteinů z plasmy ve vzorku nutné provést úpravu vzorku před HPLC analýzou. Úprava spočívala v odstranění proteinů plasmy. Bylo testováno několik různých typů úpravy.



**Obr. 38** : Separace enantiomerů látky K 1277 po její aplikaci do lidské plasmy.

První testovanou metodou úpravy vzorku byla **LLE (liquid - liquid - extrakce) pomocí dichlormethanu**. Postup přípravy vzorku byl následující. K 190  $\mu$ l homogenizované lidské poolované plasmy bylo přidáno 10  $\mu$ l zásobního roztoku látky K 1277 rozpuštěné v methanolu o koncentraci  $c = 50 \mu\text{g/ml}$ . Poté bylo přidáno 100  $\mu$ l 20 % vodného roztoku NaOH. Následovalo protřepání na třepačce při otáčkách 600 rpm po dobu 30 sekund. Dalším krokem LLE bylo přidání 1,6 ml dichlormethanu. Směs těchto látek byla promísena pomocí třepačky. Extrakce byla provedena při laboratorní teplotě a při hodnotě otáček rovné 1000 rpm po dobu 120 minut. Po provedené extrakci do dichlormethanu byl vzorek centrifugován při laboratorní teplotě, otáčkách 600 rpm po dobu 1 minuty a následně byla pomocí pipety separována spodní vrstva kapaliny do mikrozkušavky. Takto separovaná spodní vrstva kapaliny byla následně odpařena do sucha. Rekonstituce látky K 1277 proběhla pomocí přídavku 50  $\mu$ l vody. V této studii nebyl využit žádný interní standard, protože cílem studie nebylo vyvinout kvantitativní analytickou metodu, ale pouze objasnit proveditelnost a možná úskalí stanovení látky K 1277 v lidské plasmě.



Po provedení úpravy vzorku pomocí LLE byl vzorek analyzován za využití optimalizované metody a výsledný chromatografický záznam (**K 1277 plasma (LLE)**) je uveden na obrázku 38. Na chromatogramu je patrná separace enantiomerů látky K 1277, kdy se *R*-izomer eluoval v retenčním čase  $t_R = 4,68$  minut a *S*-izomer v retenčním čase  $t_R = 7,67$  minut. Identita těchto píků byla ověřena stanovením hodnot čtyř absorpčních maxim ze záznamu DAD detektoru. Tato maxima se shodovala se záznamem uvedeným v kapitole 4.2.5.1. Po porovnání chromatografických záznamů extrahovaného vzorku se slepým vzorkem (**Blank plasma (LLE)**, Obr. 38) byla eluce komponent z plasmy detekována v retenčním čase 2,95 a 4,68 minut. Při tomto porovnání záznamů je možné sledovat, že se některé komponenty plasmy elují ve shodném retenčním čase jako *R*-izomer látky K 1277. Především z tohoto důvodu byla výše uvedená příprava vzorku vyhodnocena jako nevhodná.

Při pokusu o optimalizaci přípravy vzorku obsahujícího lidskou plasmu metodou LLE byla testována záměna dichlormethanu za ethylacetát. Druhou z optimalizačních úprav byla změna způsobu provedení a trvání LLE. Ani po těchto optimalizačních úpravách postupu extrakce však nebylo dosaženo vhodné separace enantiomerů látky K 1277 od píků pocházejícího z plasmy.

Druhým zvoleným typem úpravy vzorku byla **deproteinizace acetonitrilem**. Příprava vzorku spočívala v přidání 10  $\mu$ l zásobního roztoku látky K 1277 ( $c = 50 \mu\text{g/ml}$ ) k 190  $\mu$ l plasmy. Poté byla směs promísena pomocí třepačky při otáčkách 600 rpm při laboratorní teplotě po dobu 30 sekund. Následně bylo přidáno 1,7 ml acetonitrilu. Po denuraci proteinů plasmy acetonitrilem byla provedena centrifugace po dobu 15 minut, při otáčkách 9000 rpm a za teploty 25°C. Po centrifugaci byl z mikrozkuřavky odebrán supernatant do vialky a vialka byla vložena do autosampleru. Chromatografický záznam takto provedené úpravy má na obrázku 38 označení **K 1277 plasma (denaturace)**.

Výsledkem této analýzy byl chromatografický záznam, kde se *R*-izomer látky K 1277 eluoval v retenčním čase  $t_R = 4,76$  minut a *S*-izomer v retenčním čase  $t_R = 7,41$  minut. Retenční čas komponent z plasmy, viditelný na chromatogramu zaznamenaném při vlnové délce 254 nm (Obr. 38), byl po porovnání s blankovým záznamem určen na hodnotu 2,89 minut. V blankovém vzorku byl přírůstek zásobního roztoku nahrazen přírůstkem 10  $\mu$ l vody. Při takto provedené úpravě vzorku K 1277 komponenty plasmy nijak výrazně nezasahovaly do separace enantiomerů látky K 1277. Tato metoda úpravy vzorku byla vyhodnocena jako vhodná pro separaci enantiomerů látky K 1277 po její předchozí aplikaci do lidské plasmy.

Jako další denaturační činidlo byla testována také kyselina trichloroctová. Po přidání kyseliny trichloroctové došlo k poklesu pH vzorku a poté pravděpodobně také k porušení selektivity interakce enantiomerů s CSF z důvodu protonizaci primární aminoskupiny stanovovaného analytu a následné solvataci vodou. V chromatografickém záznamu poskytnutém po této úpravě vzorku byla zaznamenaná úplná ztráta schopnosti enantioseparace.

## 5. ZÁVĚR

Experimentální práce, naměření chromatografických dat, vyhodnocení a interpretace chromatografických záznamů byla poměrně náročná a trvala téměř dva roky. Během této doby byly naplněny všechny zadané cíle diplomové práce.

Na koloně Astec CHIROBIOTIC T se v žádném z elučních módu nepodařilo nalézt separační podmínky vedoucí k separaci enantiomerů látky K 1277.

Na koloně Lux Cellulose - 1 v nepolárním elučním módu také nebylo v žádných z testovaných podmínek dosaženo separace enantiomerů. V polárně - organickém elučním módu na této koloně byly nalezeny chromatografické podmínky vedoucí k separaci enantiomerů látky K 1277. Tyto separační podmínky však nebyly zvoleny jako vhodné pro vývin optimální metody z důvodu nedostatečného rozlišení enantiomerů. Reverzní eluční mód na koloně Lux Cellulose se ukázal jako nejvhodnější pro úspěšnou separaci enantiomerů látky K 1277 a byly zde vybrány vhodné chromatografické podmínky pro optimalizaci separační metody. Mezi optimalizované podmínky patřily: procentuální zastoupení složek mobilní fáze, koncentrace chloristanu sodného v mobilní fázi, teplota kolonového termostatu a průtok mobilní fáze. Pro výslednou optimalizovanou metodu byly zvoleny tyto podmínky: MFA (55 % acetonitrilu s přídavkem 100 mM chloristanu sodného) a MFB (45 % vody s přídavkem 100 mM chloristanu sodného), teplota kolonového termostatu 35°C a průtok mobilní fáze 1 ml/min. Změna nastavení velikosti nástřiku vzorku a změna rozpouštědla vzorku byly stanoveny jako zanedbatelné. U takto optimalizované metody byl rovněž zhodnocen vliv změny pH mobilní fáze a efekt různých chaotropních činidel.

Mez detekce optimální metody byla stanovena na hodnotu koncentrace 0,543 µg/ml a metoda byla stanovena jako velmi dobře opakovatelná. Optimální metoda byla hodnocena jako vhodná i pro separaci enantiomerů látky K 1277 po její aplikaci do biologické matrice (lidské plasmy).

Hlavním přínosem diplomové práce je nalezení nejvhodnější HPLC metody separace enantiomerů látky K 1277, její optimalizace a zhodnocení parametrů separace. Výhodou této separační metody je i možnost jejího využití při aplikaci látky K 1277 do biologické matrice. Velmi zajímavých závěrů bylo dosaženo i při porovnání vlivu řady chaotropních činidel na parametry separace látky K 1277.

První cestou, kterou by mohla být tato dosavadní studie v budoucnu obohacena je kompletní validace analytické a bioanalytické metody. Optimalizovanou a validovanou metodu by bylo následně možné aplikovat ve farmakokinetických studiích, například v rámci preklinického testování léčiv na zvířatech. Další možnou cestou, jak navázat na výsledky a částečné závěry v této práci, by bylo doplnění a publikování studie vlivu chaotropních činidel na chirální separaci takrinových hybridů v některém z impaktových časopisů.

## 6. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AA	Acetic acid (kyselina octová)
ACN	Acetonitril
AChE	Acetylcholinesteráza
ApoE4	Apoenzym E4
As	Asymetry (symetrie píku)
BSA	Bovine Serum Albumin (hovězí sérový albumin)
C 18	osmnácti uhlíkatý řetězec
CE	Capillary Electrophoresis (kapilární elektroforéza)
CEC	Capillary ElectroChromatography (kapilární elektrochromatografie)
CNS	centrální nervová soustava
CSP	Chiral Stationary Phase (chirální stacionární fáze)
CYP	Cytochrom P
č.	číslo
DAD	Diode Array Detector (detektor diodového pole)
EKC	ElectroKinetic Chromatography (elektrokinetická chromatografie)
FA	Formic acid (kyselina mravenčí)
GC	Gas Chromatography (plynová chromatografie)
HEX	Hexan
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (vysokoučinná kapalinová chromatografie)
HRMS	High Resolution Mass Spektrometry (vysokorozlišovací hmotnostní spektrometrie)
HSA	Human Serum Albumin (Lidský sérový albumin)
IC	inhibiční koncentrace
IČ	Infračervené záření
IPA	Propan - ol
kap.	Kapitola
LC - MS	Liquid Chromatography - Mass Spectrometry (kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí)
LLE	Liquid - Liquid - Extraction
LOD	Limit of detection (Mez detekce)
MEKC	Micellar Electrokinetic Chromatography (micelární elektrokinetická kapilární chromatografie)
MeOH	Methanol
MF	mobilní fáze
MFA	mobilní fáze A
MFB	mobilní fáze B
min.	minuty
MIP	Molecularly Imprinted Polymers
MS	Mass Spectrometry (hmotnostní spektrometrie)
MTCA	Microcrystalline cellulose triacetate
MTDL	Multi - Targed - Directed - Ligand
NM	Nepolární eluční mód
NMDA	N - methyl - D - aspartát
NMR	Nukleární magnetická rezonance
Obr.	Obrázek
pH	potential of Hydrogen (záporný dekadický logaritmus koncentrace H <sup>+</sup> iontů)
PO	Polárně - organický eluční mód
R	Rectus (pravý)
R	Resolution (rozlišení píků)

RM	Reverzní eluční mód
RSD	Relative Standard Deviation (relativní směrodatná odchylka)
S	Výběrová směrodatná odchylka
S	Sinister (levý)
SF	stacionární fáze
SFC	Supercritic Fluid Chromatography (superkritická chromatografie)
SMB	Simulated Moving Bed
SP	Senile Plaques
T	Tangles
Tab.	Tabulka
TEA	Triethylamin
TFA	Trifluoroacetic acid (kyselina trifluoroctová)
TLC	Thin Layer Chromatography (tenkovrstvá chromatografie)
TLC	Thin Layer Chromatography (tenkovrstvá chromatografie)
$t_R$	Retenční čas
UV	Ultraviolet (ultrafialové záření)
(v/v)	Poměr objemových procent
VWD	Variable Wavelength detector

## 7. SEZNAM TABULEK

Tab. 1 : Charakteristika kolony Waters Atlantis dC18 2,1 x 100,0 mm/3 $\mu$ m (Výrobce Waters). .....	30
Tab. 2 : Charakteristika kolony Astec CHIROBIOTIC T 2,1 x 250,0 mm/5 $\mu$ m (Výrobce Astec). .....	30
Tab. 3 : Charakteristika kolony LUX Cellulose 1 4,6 x 250,0 mm/5 $\mu$ m (výrobce Phenomenex). .....	30
Tab. 4 : Zvolené chromatografické podmínky Wa 1 na koloně Waters Atlantis <sup>R</sup> dC18. ....	31
Tab. 5 : Testované podmínky na koloně Astec CHIROBIOTIC <sup>TM</sup> T v nepolárním elučním módu. ....	34
Tab. 6 : Testované podmínky na koloně Astec CHIROBIOTIC <sup>TM</sup> T v polárně-organ. elučním módu. ....	35
Tab. 7 : Vybrané podmínky na koloně Astec CHIROBIOTIC <sup>TM</sup> T v reverzním elučním módu. ....	35
Tab. 8 : Ostatní testované podmínky na koloně Astec CHIROBIOTIC <sup>TM</sup> T v reverzním elučním módu. .	36
Tab. 9 : Testované podmínky na koloně Lux Cellulose - 1 v nepolárním elučním módu. ....	38
Tab. 10 : Testované podmínky na koloně Lux Cellulose - 1 v polárně - organickém elučním módu. ....	39
Tab. 11 : Testované separační podmínky na koloně Lux Cellulose - 1 v reverzním elučním módu. ....	41
Tab. 12 : Vliv přídavku kyselin do mobilní fáze v reverzním elučním módu .....	43
Tab. 13 : Přehled využitých chaotropních činidel. ....	44
Tab. 14 : Optimalizace procentuálního zastoupení složek mobilní fáze. ....	47
Tab. 15 : Přehled podmínek optimalizace koncentrace chloristanu sodného. ....	49
Tab. 16 : Přehled podmínek optimalizace teploty kolonového termostatu. ....	50
Tab. 17 : Přehled podmínek optimalizace průtoku mobilní fáze. ....	51
Tab. 18 : Stanovení meze detekce u optimální metody separace enantiomerů látky K 1277. ....	54
Tab. 19 : Stanovení přesnosti opakování u optimální metody separace látky K 1277. ....	55

## 8. SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1 : Zrcadlové obrazy lidských rukou a zrcadlové obrazy tetraedrických uhlíků.....	8
Obr. 2 : Asymetrický uhlík. ....	9
Obr. 3 : Thalidomid a fotografie dítěte s fokomelií. ....	10
Obr. 4 : Princip HPLC separace.....	11
Obr. 5 : Kontinuální proces separace při využití SMB.....	13
Obr. 6 : Znázornění třibodové interakce analytu a stacionární fáze. ....	14
Obr. 7 : Struktura teikoplaninu. ....	15
Obr. 8 : Struktury amylózy, celulózy a 3,5 – dimethylfenylkarbamátu. ....	16
Obr. 9 : SP – senile plaques (senilní plaky), T - tangles (neuronální klubka). ....	20
Obr. 10 : Porovnání zdravé mozkové kůry s atrofovanou mozkovou kůrou. ....	21
Obr. 11 : Obvyklý průběh Alzheimerovy choroby v čase. ....	21
Obr. 12 : Strukturní uspořádání AChE (ES: estratické centrum, AS: anionické místo) ....	23
Obr. 13 : Struktury kompetitivních inhibitorů AChE.....	24
Obr. 14 : Struktury nekompetitivních inhibitorů AChE.....	25
Obr. 15 : Struktura memantinu.....	25
Obr. 16 : Schéma syntézy molekul takrin - tryptofan. ....	26
Obr. 17 : Separovaná látka K 1277. ....	29
Obr. 18 : Chromatografický záznam, ze kterého byla stanovena čistota látky K 1277. ....	31
Obr. 19 : Experimentálně stanovené HRMS látky K 1277 a její predikované HRMS. ....	32
Obr. 20 : Chrom. záznamy na koloně Astec CHIROBIOTIC™ T v nepolárním elučním módu.....	33
Obr. 21 : Chrom. záznamy na koloně Astec CHIROBIOTIC™ T v polárně - organ. elučním módu. ....	34
Obr. 22 : Vybrané chrom. záznamy na koloně Astec CHIROBIOTIC™ T v reverzním elučním módu.....	35
Obr. 23 : Chromatografické záznamy na koloně Lux Cellulose - 1 v nepolárním elučním módu. ....	38
Obr. 24 : Chrom. záznamy na koloně Lux Cellulose - 1 v polárně - organickém elučním módu.....	39
Obr. 25 : Chromatografické záznamy testovaných podmínek Lu PO2. ....	40
Obr. 26 : Chromatografický záznam na koloně Lux Cellulose - 1 v reverzním elučním módu.....	41
Obr. 27 : Vliv přísavky kyselin do mobilní fáze v reverzním elučním módu ....	43
Obr. 28 : Chromatografické záznamy po využití řady chaotropních činidel. ....	44
Obr. 29 : Vzorec pro výpočet symetrie píku. ....	47
Obr. 30 : Chromatografické záznamy různého procentuálního zastoupení složek mobilní fáze ....	47
Obr. 31 : Chromatografické záznamy optimalizace koncentrace chloristanu sodného. ....	49
Obr. 32 : Chromatografické záznamy optimalizace hodnoty teploty kolonového termostatu.....	50
Obr. 33 : Chromatografické záznamy optimalizace průtoku mobilní fáze. ....	51
Obr. 34 : Chromatografický záznam separace enantiomerů látky K 1277 (UV - 254 nm). ....	52
Obr. 35 : Chromatografický záznam optimální metody separace enantiomerů látky K 1277 (DAD). ....	53
Obr. 36 : Záznam absorbních spekter enantiomerů látky K 1277 (DAD: 210 - 500 nm). ....	53
Obr. 37 : Stanovení meze detekce u optimální metody separace enantiomerů látky K 1277. ....	54
Obr. 38 : Separace enantiomerů látky K 1277 po její aplikaci do lidské plasmy. ....	56

(\*) Struktury uvedené v diplomové práci byly vytvořeny v počítačovém programu ChemDraw

## 9. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. ILISZ, Istvan; ARANYI Anita; PATAJ Zoltán; PÉTER Antal. Recent advances in the direct and indirect liquid chromatographic enantioseparation of amino acids and related compounds: A review. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2012, volume 69, pages 28 - 41.
2. SOBOTNÍKOVÁ, Jana. Historie, současnost a perspektivy analytických separačních metod na katedře analytické chemie přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze. *Chem. Listy.* 2010, ročník 104, s. 1226 - 1231. ISSN 1213 - 7103.
3. HROCH, Miloš. *Vývoj a validace HPLC metod pro stanovení endogenních a exogenních látek pro transportní a metabolické studie.* Hradec Králové: UK v Praze, Farmaceutická fakulta Hradec Králové, 2011. 163 s., 2 s. příl. Vedoucí disertační práce Milan Nobilis
4. NOVÁK, Martin. *Separace a stanovení takrinových inhibitorů acetylcholinestery pomocí HPLC.* Bakalářská práce, Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Hradec Králové 2016. 71 s. Vedoucí bakalářské práce Martin Doležal.
5. KORÁBEČNÝ, Jan. Soukromé sdělení týkající se vlastností, syntézy a výsledků předběžného testování látky K 1277. Citováno [2018 - 2 - 20].
6. ČELADNÍK, M. *Organická chemie.* 1. vydání. Praha: Avicenum, zdravotnické nakladatelství n. p., 1990. 595 s. ISBN 80 - 201 - 0093 - 8.
7. SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B. *Organic chemistry.* Ninth Edition. Hoboken, New Jersey: John Wiley and Sons, 2007. 1191 p. ISBN:978 - 0 - 470 - 05098 - 9.
8. NOVÁKOVÁ, Lucie. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I.* 1. vydání. Praha: Europrint a.s., 2013. 299 s. ISBN 978 - 80 - 260 - 4243 - 3.
9. MCMURRY, John. *Organická chemie: přeloženo z anglického originálu John McMurry: Organic Chemistry, Sixth Edition, 2004.* 1. Vydání. Brno: nakladatelství VUTIUM, 2007. 1176 s. ISBN 978 - 80 - 214 - 3291 - 8.
10. HARTL, Jiří. *Farmaceutická chemie I.* 3. vydání. Praha: nakladatelství Karolinum, 2011. 102 s. ISBN 978 - 80 - 246 - 2033 - 6.
11. SUBRAMANIAN, Ganapathy. *Chiral Separation Techniques – A Practical Approach.* Second edition. Weinheim (Federal Republic of Germany): WILEY - VCH Verlag GmbH, 2001. 350 pages. ISBN: 3 - 527 - 29875 - 4.
12. ERIKSSON, Thomas. Intravenous formulations of the enantiomers of thalidomide: Pharmacokinetic and initial pharmacodynamic characterization in man. *J. Pharm. Pharmacol.* 2000, July, volume 52, number 7, page 807 - 817, ISSN 2328 - 2150.
13. FASSIHI, A. R. Racemates and enantiomers in drug development. *Int. J. Pharm.* 1993, volume 92, page 1 - 14.
14. Vismaya – maitreya [online]. [citováno 2018 - 02 - 19]. Dostupné z: [https://www.vismaya-maitreya.pl/naturalne\\_leczenie\\_najdziwniejsze\\_choroby\\_xxi\\_wieku\\_i\\_niezwykly\\_przypadki\\_medyczne\\_cz2.html](https://www.vismaya-maitreya.pl/naturalne_leczenie_najdziwniejsze_choroby_xxi_wieku_i_niezwykly_przypadki_medyczne_cz2.html)
15. SCRIBA, Gerhard K. E. *Chiral Separations – Methods and protocols.* Second edition. Springer New York Heidelberg Dordrecht London, 2013. ISBN:978 - 1 - 62703 - 262 - 9.
16. YUASA, S.; SHIMADA, A. et al. Cellulose Thin Layer and Column Chromatography for Resolution of LD - Tryptophan. *J. Chromatogr. Sci.* 1980, volume 18, page 311 - 314, ISSN 1945 - 239X.
17. WANG, K. The thin - layer chromatographic separation of enantiomeric dipeptides. *Fresenius' J. Anal. Chem.* 1986, volume 324, page 339 - 340.
18. LEPRI, L.; DEL BUBBA, M.; CINCINELLI, A.; COAS, V. Reversed - phase planar chromatography of racemic flavonones. *J. Planar Chromatography.* 1999, volume 12, page 298 - 301.
19. KRIZ, DARLO; KRIZ, C. B.; ANDERSON, L. I.; MOSBACH, K.; Thin - layer Chromatography Based on the Molecular Imprinting Technique. *Anal. Chem.* 1994, volume 66, page 2636 - 2639.
20. BHUSHAN, R.; MARTENS, J.; WALBAUM, S.; JOSHI, S.; PASHARD, V. TLC Resolution of Enantiomers of Amino Acids and Dansyl Derivates Using (1R,3R,5R) - 2 - Azabicyclo[3,3,0]octan - 3 - carboxylic Acid as Impregnating Reagent. *Biomed. Chromatogr.* 1997, September, volume 11, pages 286 - 288.
21. LEPRI, L.; BODDI, L.; DEL BUBBA, M.; CINCINELLI, A. Reversed - phase planar chromatography of some enantiomeric amino acids and oxazolidinones. *Biomed. Chromatogr.* 2001, volume 15, page 196 - 201. doi: 10.1002/bmc.61.

22. LeFevre, J. W. Reverse - phase thin - layer chromatographic separations of enantiomers of dansyl - amino acids using  $\beta$  - cyclodextrin as a mobile phase additiv. *J. chromatogr. A.* 1993, volume 653, page 293 - 302.
23. LEPRI, L.; COAS, V.; DESIDERI, P. G., SANTIANI, D. Reversed Phase Planar Chromatography of Dansyl DL Amino Acids with Bovine Serum Albumin in the Mobile Phase. *Chromatographia.* 1993, volume 36, page 297 - 301.
24. PERRUT, Michael. Advances in supercritical fluid chromatographic proces. *J. Chromatogr. A.* 1994, volume 658, pages 293 - 313.
25. WILIAMS, Karen L.; SANDER, Lane C. Enantiomer separation on chiral stationary phases in supercritical fluid chromatography. *J. Chromatogr. A.* 1997, volume 785, pages 149 - 158.
26. WILIAMS, Karen L.; SANDER, Lane C.; WISE Stephen A. Comparision of luquid and supercritical fluid chromatography for separation of enantiomers on chiral stationary phases. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1997, July, volume 15, issue 11, pages 1789 - 1799.
27. WHATLEY, J. Enantiomeric separation by column chiral supercritical fluid chromatography. *J. chromatogr. A.* 1995, volume 697, pages 251 - 255.
28. SEEBACH, D.; HOFFMANN, M.; STING A. R.; KINKEL, J. N.; SCHULTE, M. Chromatografic resolution of sythetically useful chiral glycine derivates by high - performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A.* 1998, volume 796, pages 299 - 307.
29. JUZA, Marcus.; DI ORAZIN, Giovanni.; BIRESSI, Giovanni.; SCHURIG, Volker.; MAZZOTI, Marco.; MORBIDELLI, Massimo. Continuous enantiomer sepration of the volatile inhalation anesthetic enflurane with a gas chromatographic simulated moving bed unit. *J. Chromatogr. A.* 1998, volume 813, pages 333 - 347.
30. PYNNONEN, Bruce.; Simulated moving bed processing: escape from the high - cost box. *J. Chromatogr. A.* 1998, volume 827, pages 143 - 160.
31. RAJENDRAN, Arvind.; PAREDES, Galatea.; Mazzotti, Marco. Simulated moving bed for the separation of enantiomers. *J. Chromatogr. A.* 2009, volume 1216, pages 709 - 738.
32. YASHIMA, Eiji.; JUNKO, Noguchi.; OKAMOTO, Yoshio. Continious and Preparative Enantioseparation of Oxprenolol with Cellulose Tris(3,5 - dimethylphenylcarbamate) - coated Belt. *Assymetry.* 1995, volume 6, pages 1889 - 1890.
33. PIETRASZKIEWICZ, M.; MALGORZATA, K.; PIETRASZKIEWICZ, O. Chiral discrimination of amino acids and their pottasium or sodium salts by optically active ether derived from D - mannose. *J. Membr. Sci.* 1998, volume 138, pages 109 - 113.
34. ARMSTRONG, Daniel W. Enrichment of enantiomers and Other Isomers with Aqueous Liquid Membranes Containing Cycloddextrin Carriers. *J. Anal. Chem.* 1987, volume 59, pages 2237 - 2241.
35. WARD, J. Timothy.; OSWALD, Tanya M. Enantioselectivity in capillary electrophoresis using the macrocyclic antibiotics. *J. Chromatogr. A.* 1997, volume 792, pages 309 - 325.
36. GAO, Wenhua.; KANG, Jingwu. Separation of atropisomers of anti - hepatitis drug dimethyl diphenyl bikarboxylate analogues by capillary electrophoresis with vancomycin as the chiral selector. *J. Chromatogr. A.* 2006, volume 1108, page 145 - 148.
37. DESIDERIO, C.; POLCARO, C. M.; PADIGLIONI, P.; FANALI, S. Enantiomeric separation of acidic herbicides by capillary electrophoresis using vancomycin as chiral selector. *J. Chromatogr. A.* 1997, volume 781, pages 503 - 513.
38. FANALI, Salvatore.; DESIDERIO, Claudia. Use of vancomycin as chiral selector in capillary electrophoresis. Optimization and quantification of loxiglumide enantiomers in pharmaceuticals. *J. Sep. Sci.* 1996, June, volume 19, issue 6, pages 322 - 326.
39. BIWER, A.; ANTRANIKIAN, G.; HEINZLE, E. Enzymatic production of cyclodextrins. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2002, volume 59, pages 609 - 617.
40. REKHARSKY, V. Mikhail.; INOUE, Y. Comlexation Thermodynamics of Cyclodextrins. *Chemical Reviews.* 1998, volume 98, pages 1875 - 1918.
41. AKBAY, C.; GILL, N.; AGBARIA, A. R.; WARNER, I. R.; Copolymerized polymeric surfactants: Characterization and application in micellar elektrokinetic chromatography. *Electrophoresis.* 2003, volume 24, pages 4209 - 4220.

42. MILLOT, M.C. Separation of drug enantiomers by liquid chromatography and capillary electrophoresis, using immobilized proteins as chiral selectors. *J. Chromatogr. B.* 2003, volume 797, pages 131 - 159.
43. LIU, Z. S.; ZHENG, CH.; YAN, CH.; GAO, R. Y. Molecularly imprinted polymers as a tool for separation in CEC. *Electrophoresis.* 2007, volume 28, pages 127 - 136.
44. ARMSTRONG, Daniel; ZHANG, Bo. Choosing the right stationary phase can be daunting. *Anal. Chem.* 2001, October, pages 557 - 561.
45. CHEN, Xiaoming; YAMAMOTO, Chiyo; OKAMOTO, Yoshio. Polysaccharide derivatives as useful chiral stationary phases in high - performance liquid chromatography. *Pure and Applied Chemistry.* 2007, volume 79, pages 1561 - 1573.
46. BIWER, A; ANTRANKIAN, G; HEINZLE, E. Enzymatic production of cyclodextrins. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2002, volume 59, pages 606 - 617. ISSN: 1432 - 0614.
47. SCHELLINGER, Adam, P; CARR, Peter, W. Isocratic and gradient elution chromatography: A comparison in terms of speed, retention reproducibility and quantitation. *J. Chromatogr. A.* 2006, volume 1109, pages 253–266.
48. KAZAKEVICH, Yuri. Reversed phase high performance liquid chromatography behavior of chaotropic counteranions. *J. Chromatogr. A.* 2005, volume 1064, page 9 - 18, ISSN: 0021 - 9673.
49. HIPPIUS, Hanns.; EUNDÖRFER, Gabriele. The discovery of Alzheimer's disease. *Dialogues in clinical neuroscience.* 2003, volume 5, page 101 - 108,
50. KOUKOLÍK, F.; JIRÁK, R. *Alzheimerova nemoc a další demence: Neurobiologie, klinický obraz, terapie.* 1. vydání. Praha: Grada. 1998. 229s.
51. MAČÁK, Jirka.; MAČÁKOVÁ, Jana. *Patologie.* Praha: Grada Publishing, a.s., 2004. 348 s. ISBN 80 - 247 - 0785 - 3.
52. STŘÍTESKÝ, Jan. *Patologie.* 1. vydání. Olomouc: EPAVA, 2001. 338 s. ISBN 80 - 86297 - 06 - 3.
53. SILBERNAGL, Stefan; LANG, Florian. *Atlas patofyziologie: překlad 2. anglického vydání.* Praha: Grada Publishing, a.s., 2012. 416 s. ISBN 978 - 80 - 247 - 3555 - 9.
54. KAWAHARA, Masahiro et al. Membrane Incorporation, Channel Formation, and Disruption of Calcium Homeostasis by Alzheimer's  $\beta$  - Amyloid Protein. *Int. J. Alzheimer's Dis.* 2011, doi: 10.4061/2011/304583.
55. Slideplayer [online]. [citováno 2017 - 11 - 7]. Dostupné z: <http://slideplayer.cz/slide/11388842/>
56. MURPHY, M. Paul.; LeVINE, Harry. Alzheimer's Disease and the  $\beta$  - Amyloid Peptide. *J. Alzheimer's Disease.* 2010, doi: 10.3233/JAD - 2010 - 1221.
57. POLLARD, Thomas D.; EARNSHAW, William C. *Cell Biology.* 2. vydání. Saunders, 2007. 928 s. ISBN 1416022554.
58. DOLEŽAL, Martin a kolektiv. *Farmaceutická chemie léčiv působících na centrální nervový systém.* 1. vydání. Praha: nakladatelství Karolinum, 2013. 188 s. ISBN 978 - 80 - 246 - 2382 - 5.
59. VLČEK, Jiří.; FIALOVÁ, Daniela. *Klinická farmacie I.* 1. vydání. Praha: Grada Publishing, a.s., 2010. 368 s. ISBN 978 - 80 - 247 - 7022 - 2.
60. DOLEŽAL, Martin a kolektiv. *Farmaceutická chemie léčiv působících na autonomní nervový systém.* 1. vydání. Praha: nakladatelství Karolinum, 2011. 134 s. ISBN 978 - 80 - 246 - 1633 - 9.
61. AISLP, *Informační systém léčivých přípravků.*
62. Státní ústav kontroly léčiv [online]. [citováno 2017 - 11 - 7]. Dostupné z: <http://www.sukl.cz/modules/medication/search.php>
63. DVIR, Hay.; SILMAN, Israel.; HAREL, Michal. Acetylcholinesterase: From 3D structure to function. *Chem. – Biol. Interact.* 2010, doi: 10.1016/j.cbi.2010.01.042.
64. MARTÍNKOVÁ, Jiřina. *Farmakologie pro studenty zdravotnických oborů.* 1. vydání. Praha: Grada Publishing, a.s., 2007. 380 s. ISBN 978 - 80 - 247 - 1356 - 4.
65. Perenniculum [online]. [citováno 2017 - 11 - 7]. Dostupné z: <http://www.perenniculum.cz/trvalky/galanthus-woronowii/>
66. SELTZER, Ben. Galantamine - er for the treatment of mild - to - moderate Alzheimer's disease. *Clin. Interventions Aging.* 2010, volume 5, page 1–6.
67. MEGURO, Kenichi.; OUCHI, Yoshitaka.; AKANUMA, Kyoko. Donepezil can improve daily activities and promote rehabilitation for severe Alzheimer's patients in long - term care health facilities. *BMC Neurol.* 2014. doi: 10.1186/s12883 - 014 - 0243 - 7.
68. PARSONS, Chris, G; STÖFFLER, Albrecht; DANYSZ, Wojciech. Memantine: a NMDA receptor antagonist that improves memory by restoration of homeostasis in the glutamatergic system – too little activation is bad, too much is even worse. *Neuropharmacology.* 2007, volume 6, page 699 - 723.



69. ANGEL, Agis - Torres.; SÖLLHUBER, Monica.; FERNANDEZ, Maria. Multi - Target - Directed Ligands and other Therapeutic Strategies in the Search of a Real Solution for Alzheimer's Disease. *Curr. Neuropharmacol.* 2014, volume 12, page 2 - 36. doi: 10.2174/1570159X113116660047.
70. NEPOVÍMOVÁ, Eugenie. Tacrine - Trolox Hybrids: A Novel Class of Centrally Active, Nonhepatotoxic Multi - Targed - Directed Ligands Exerting Anicholinesterase and Antioxidant Activities with Low In Vivo Toxicity. *J. Med. Chem.* 2015, volume 58, page 8985 - 9003, ISSN 0022 - 2623.
71. KORÁBEČNÝ, Jan.; DOLEŽAL, Rafael.; ČÁBELOVÁ, Pavla. 7 - MEOTA - donepezil like compounds as cholinesterase inhibitors: Synthesis, pharmacological evaluation, molecular modeling and QSAR studies. *Eur. J. Med. Chem.* 2014, volume 82, page 426 - 438.
72. HAMULAKOVA, Slávka.; JANOVEC, Ladislav.; HRABINOVÁ, Martina. Synthesis and Biological Evaluation of Novel Tacrine Derivatives and Tacrine-Coumarin Hybrids as Cholinesterase Inhibitors. *J. Med. Chem.* 2014, volume 57, page 7073 - 7084.
73. ŠPILOVSKÁ, Katarina.; KORÁBEČNÝ, Jan., HOROVÁ, Anna. Design, synthesis and in vitro testing of 7 - methoxytacrine - amantadine analogues: a novel cholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease. *Med. Chem. Res.* 2015, volume 24, page 2645 - 2655.
74. ŠPILOVSKÁ, Katarina.; KORÁBEČNÝ, Jan., KRÁL, Jan. 7 - Methoxytacrine - Adamantylamine Heterodimers as Cholinesterase Inhibitors in Alzheimer's Disease Treatment — Synthesis, Biological Evaluation and Molecular Modeling Studies. *Molecules.* 2013, volume 18, page 2397 - 2418. doi: 10.3390/molecules18022397.
75. NEPOVIMOVA, Eugenie.; ULIASSI, Elisa.; KORABECNY, Jan. Multitarget Drug Design Strategy: Quinone-Tacrine Hybrids Designed To Block Amyloid- $\beta$  Aggregation and To Exert Anticholinesterase and Antioxidant Effects. *J. Med. Chem.* 2014, volume 57, page 8576 - 8589.
76. FANG, Lei.; KRAUS, Brigit.; Lehmann, Jochen. Design and synthesis of tacrine - ferulic acid hybrids as multi - potent anti - Alzheimer drug candidates. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2008, volume 18, page 2905 - 2909.
77. *Technická dokumentace od výrobce kolony Waters AtlantisR dC18 3.0  $\mu$ m.*
78. *Technická dokumentace od výrobce kolony Astec CHIROBIOTIC TM T.*
79. *Technická dokumentace od výrobce kolony Lux R 5  $\mu$ m Cellulose - 1.*
80. *Sigmaaldrich* [online]. [citováno 2016 - 4 - 10]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/analytical-chromatography/analytical-products.html?TablePage=101239050>.
81. NOBILIS, Milan. Sensitive chiral high - performance liquid chromatographic determination of anthelmintic flubendazole and its phase I metabolites in blood plasma using UV photodiode - array and fluorescence detection. Application to pharmacokinetic studies in sheep. *J. Chromatog. B.* 2008, volume 876, page 89 - 96, ISSN 1570 - 0232.
82. NOVÁKOVÁ, Lucie. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi II.* 1. vydání. Praha: Europrint a.s., 2013. 235 s. ISBN 978 - 80 - 260 - 4244 - 0.