

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Analytická chemie



Bc. David Landl

CHIRÁLNÍ SEPARACE BIOLOGICKY AKTIVNÍCH LÁTEK
V CHROMATOGRÁFII

Chiral separation of biologically active compounds by
chromatography

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Doc. RNDr. Květa Kalíková, Ph.D.

Konzultant: RNDr. Petr Kozlík, Ph.D.

Praha 2020

Prohlášení

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

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

V Praze dne 5.5.2020

Abstrakt v češtině

Tato diplomová práce je zaměřena na zhodnocení a porovnání enantioselektivního potenciálu dvou kolon, CHIRAL ART Amylose-SA a CDShell-RSP, na sadě 29 chirálních léčiv metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Separace enantiomerů probíhala ve třech módech: reverzním, normálním a polárně-organickém. Kolona CHIRAL ART Amylose-SA byla testována v normálním módu, kolona CDShell-RSP v reverzním a polárně-organickém.

Kolona CHIRAL ART Amylose-SA obsahuje jako chirální stacionární fázi amylozu tris(3,5-dimethylfenylkarbamát), která je imobilizovaná na porézních silikagelových částicích o velikosti 3 μm . Kolona CDShell-RSP obsahuje jako chirální stacionární fázi hydroxypropyl- β -cyklodextrin, který je kovalentně navázán na pelikulárních částicích o velikosti 2,7 μm .

V normálním módu byly použity mobilní fáze složené z hexanu a propan-2-olu. Dále byl testován vliv aditiv (triethylamin, diethylamin, kyselina trifluoroctová, směs diethylaminu a kyseliny trifluoroctové) v mobilní fázi na enantioseparaci analytů. Nejuniverzálnějším aditivem byla směs diethylaminu a kyseliny trifluoroctové. Celkově se na koloně CHIRAL ART Amylose-SA enantioseparovalo 22 analytů, z toho 10 na základní linii.

Mobilní fáze pro reverzní mód byly složené z 10 mM octanu amonného (pH 3,0; 4,0; 6,5) a methanolu nebo 1% triethylaminooctanového pufru (pH 4,0; 6,5) a methanolu v různých objemových poměrech. Nejvíce enantiomerů léčiv se separovalo v mobilní fázi tvořené 10 mM octanem amonným, pH 6,5 a methanolem. Na koloně CDShell-RSP se v reverzním módu částečně separovalo 10 analytů.

V polárně-organickém módu byly použity mobilní fáze složené z acetonitrilu, methanolu, kyseliny octové a triethylaminu. Za těchto podmínek se žádný z analytů neseparoval.

Klíčová slova: chirální separace, chirální stacionární fáze, HPLC, léčiva

Abstract in English

This diploma thesis is focused on the evaluation and comparison of the enantioselective potential of two columns CHIRAL ART Amylose-SA and CDShell-RSP using a set of 29 chiral drugs in high performance liquid chromatography. The separations of enantiomers were performed in three modes: reversed-phase, normal-phase, and polar-organic mode. The CHIRAL ART Amylose-SA column was tested in normal-phase mode, the CDShell-RSP column in reversed-phase and polar-organic modes.

The CHIRAL ART Amylose-SA column contains amylose tris(3,5-dimethylphenylcarbamate) immobilized on 3 μm porous silica gel particles. The CDShell-RSP column contains a chiral selector hydroxypropyl- β -cyclodextrin, which is covalently bonded on 2.7 μm superficially porous particles.

In the normal-phase mode, mobile phases composed of hexane and propane-2-ol were used. Furthermore, the effect of various additives (triethylamine, diethylamine, trifluoroacetic acid, and the mixture of diethylamine and trifluoroacetic acid) in the mobile phase on the enantioseparation of chiral drugs was tested. The most universal additive was a mixture of diethylamine and trifluoroacetic acid. A total of 22 chiral drugs were enantioseparated on the CHIRAL ART Amylose-SA column, 10 of them were baseline separated.

Mobile phases for reversed-phase mode composed of 10 mM ammonium acetate (pH 3,0; 4,0; 6,5) or 1% triethylammonium acetate buffer (pH 4,0; 6,5) and methanol in various volume ratios. The best results were obtained in 10 mM ammonium acetate, pH 6,5/methanol (v/v) as mobile phases. Using the CDShell-RSP column, 10 drugs were partially separated in reversed-phase mode.

In the polar-organic mode, mobile phases composed of acetonitrile, methanol, acetic acid, and triethylamine were used. Under these conditions, none of the tested drugs were separated.

Key words: chiral separation, chiral stationary phase, HPLC, drugs

Poděkování

Rád bych poděkoval své školitelce RNDr. Květě Kalíkové, Ph.D., hlavně za její vstřícný a přátelský přístup, výborné rady, připomínky a v neposlední řadě za čas, který mi věnovala. Dále děkuji RNDr. Petrovi Kozlíkovi Ph.D. za to, že byl mým konzultantem. Velký dík patří mým rodičům, kteří mi umožnili studium a podporovali mě během pěti let.

Obsah

1.	Seznam zkratk a symbolů	- 7 -
2.	Úvod	- 8 -
3.	Teoretická část	- 9 -
3.1	Chiralita	- 9 -
3.2	Chirální léčiva	- 9 -
3.3	Chirální separace v chromatografii	- 10 -
3.4	Chirální stacionární fáze používané v HPLC	- 11 -
3.4.1	Chirální stacionární fáze založené na derivátech polysacharidů	- 11 -
3.4.2	Kolona CHIRAL ART Amylose-SA	- 14 -
3.4.3	Chirální stacionární fáze založené na cyklodextrinech	- 14 -
3.4.4	Kolona CDShell-RSP	- 15 -
3.5	Chromatografické nosiče	- 16 -
3.5.1	Pelikulární částice	- 16 -
3.6	Separční módy používané v HPLC	- 18 -
3.6.1	Normální mód	- 18 -
3.6.2	Reverzní mód	- 19 -
3.6.3	Polárně-organický mód	- 19 -
4.	Experimentální část	- 20 -
4.1	Použité přístroje a pomůcky	- 20 -
4.2	Použité chemikálie	- 20 -
4.3	Příprava vzorků a jejich struktura	- 23 -
4.4	Použité mobilní fáze a kolony	- 28 -
4.5	Podmínky separace	- 30 -
4.6	Určení mrtvého času	- 30 -
4.7	Chromatografické parametry	- 30 -
5.	Výsledky a diskuze	- 32 -
5.1	Kolona CHIRAL ART Amylose-SA	- 32 -
5.1.1	Retence a enantioseparace v normálním módu	- 32 -
5.2	Kolona CDShell-RSP	- 57 -
5.2.1	Retence a enantioseparace v reverzním módu	- 57 -
5.2.2	Separace v polárně-organickém módu	- 68 -
6.	Závěr	- 69 -
7.	Seznam použité literatury	- 70 -

1. Seznam zkratk a symbolů

AA	Kyselina octová
A_s	Faktor symetrie
CE	Kapilární elektroforéza
CSP	Chirální stacionární fáze
DEA	Diethylamin
GC	Plynová chromatografie
HEX	Hexan
HILIC	Hydrofilní interakční chromatografie
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IPA	Propan-2-ol
k_1, k_2	Retenční faktor 1. a 2. elujícího enantiomeru
R	Rozlišení
SFC	Superkritická fluidní chromatografie
SSP	Pelikulární částice
TEA	Triethylamin
TFA	Kyselina trifluoroctová
TLC	Chromatografie na tenké vrstvě
t_M	Mrtvý čas kolony
t_{R1}, t_{R2}	Retenční čas 1. a 2. elujícího enantiomeru
UV	Ultrafialová oblast
α	Enantioselektivita

2. Úvod

Chirální biologicky aktivní látky jsou ve velké většině syntetizovány jako směsi enantiomerů. Enantiomery, látky, které jsou svými zrcadlovými obrazy, mohou v lidském těle reagovat různě, jeden z nich může vykazovat i negativní účinky. To je důvod, proč některé léky, které byly původně registrovány jako recemáty byly změněny na verzi s jedním enantiomerem, například ibuprofen nebo citalopram. Tato změna má řadu výhod: snižuje vedlejší účinky, vylepšuje terapeutický index nebo umožňuje nižší dávky léku [1]. Z těchto důvodů je po syntéze často vyžadovaná kontrola enantiomerní čistoty produktu.

Pro kontrolu enantiomerní čistoty je možné využít řadu metod. Jednou z nejpoužívanějších je vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) s chirální stacionární fází. I když je dnes dostupných mnoho těchto fází, nové jsou stále vyvíjeny, a to zejména kvůli zvýšení efektivity separace a všestrannosti jejich použití [2].

Cílem předkládané práce bylo testování a porovnání enantiosektivního potenciálu dvou kolon: CHIRAL ART Amylose-SA a CDShell-RSP. Pro testování enantiosektivního potenciálu byla použita sada 29 strukturně odlišných chirálních léčiv. Kolona CHIRAL ART Amylose-SA byla testována v normálním módu, kolona CDShell-RSP v reverzním a polárně-organickém módu.

3. Teoretická část

3.1 Chiralita

Chiralita je vlastnost předmětů nebo molekul, které jsou svými zrcadlovými obrazy. Nemají tedy rovinu ani střed symetrie. Tuto vlastnost vykazují spousta látek vyskytujících se v přírodě. Příčinou chiralit molekul je nejčastěji přítomnost uhlíku, na který jsou vázány čtyři různé substituenty [3].

Atomy uhlíku s čtyřmi různými substituenty se nazývají stereogenní centra. Čím více je stereogenních center v molekule, tím má molekula více izomerů. Počet izomerů je dán závislostí 2^n , přičemž n je počet stereogenních center [4].

Pokud molekula obsahuje jen jeden asymetrický uhlík, může existovat ve dvou různých stereoizomerech – enantiomerech. Enantiomery mají shodné fyzikální vlastnosti kromě optické otáčivosti, ale liší se chemickými vlastnostmi. Rozdílné vlastnosti enantiomerů se proto projevují až v chirálním prostředí, kde interagují stereoselektivně s jinými chirálními molekulami [5].

3.2 Chirální léčiva

Ve farmaceutickém průmyslu je více než polovina léků chirálními produkty a asi tři čtvrtiny jsou registrovány jako racemické směsi – ekvimolární směsi obou enantiomerů. Naproti tomu většina chirálních přírodních látek je zastoupena zejména v podobě jediného enantiomeru, například aminokyseliny nebo cukry [6].

Léčiva, která jsou chirální a připravují se synteticky, jsou často vyráběna a podávána jako racemáty. Jednotlivé enantiomery mohou rozdílně interagovat s receptory, transportními systémy nebo enzymy, což vede k rozdílům v biologických aktivitách strukturně podobných látek. Jeden z enantiomerů často neslouží pro daný účel, je neúčinný nebo je jeho účinek nežádoucí. To je důvodem rostoucího počtu chirálních léků, které obsahují pouze jeden enantiomer. Postupy pro vývoj nového léčiva vyžadují metody pro kontrolu enantiomerní čistoty [7].

Získání jednoho enantiomeru je možné buď enantioselektivní syntézou, nebo chirální selekcí po syntéze [3]. Enantioselektivní syntéza je ideální pro získání čistého enantiomeru, avšak není vždy možná a často bývá časově i finančně náročná. I po této

syntéze je však potřebná metoda pro kontrolu enantiomerní čistoty. Pro separaci enantiomerů jsou využívány různé separační techniky jako kapalinová (HPLC), plynová (GC), superkritická fluidní (SFC) a tenkovrstvá chromatografie (TLC), nebo kapilární elektroforéza (CE). Přičemž hlavně SFC a HPLC se používají pro preparativní účely. To je dáno snadným zpracováním vzorku, rychlostí metod a jejich účinností [8].

3.3 Chirální separace v chromatografii

Chirální separace je proces, při kterém dochází k rozdělení racemické směsi na jednotlivé izomery. Metody pro separaci enantiomerů nachází uplatnění zejména ve farmaceutickém průmyslu, klinické analýze a potravinářském průmyslu. Pro vývoj enantioselektivních metod jsou nejčastěji používány techniky SFC a HPLC [9]. Chromatografické metody pro chirální separace je možné rozdělit na přímé a nepřímé.

Nepřímé metody jsou založeny na reakci enantiomeru s chirální derivatizační reagensy za vzniku diastereoizomeru s odlišnými fyzikálně-chemickými vlastnostmi. Nově vzniklé diastereoizomery jsou posléze separovány konvenčními achirálními chromatografickými metodami. Výhodou této metody je vysoká citlivost. Mezi nevýhody patří potřeba vysoké čistoty derivatizačního činidla, jeho cena a dostupnost. Nepřímé metody chirální separace se často používají v plynové chromatografii [10].

Přímé metody využívají chirální stacionární fáze (CSP), nebo chirální aditiva v mobilní fázi. Aplikace chirálních aditiv v mobilní fázi je málo používaná kvůli vysoké ceně aditiv a nízké efektivitě. Chirální stacionární fáze našly nejširší uplatnění v kapalinové chromatografii a SFC [2].

Kapalinovou chromatografií je dnes možné separovat látky s různou hmotností a počtem stereogenních center. Stovky odlišných chirálních stacionárních fází jsou dnes komerčně dostupné. Žádnou z nich však není možné označit jako univerzální, schopnou separovat všechny typy racemických směsí [11].

Volba vhodné chirální kolony pro separaci enantiomerů je složitá a spočívá zejména na empirických datech a zkušenostech. Rozpoznávací mechanismus chirálního selektoru je ovlivněn mnoha faktory jako je složení mobilní fáze, typ nosiče a teplota. Všechny chirální selektory poskytují chirální prostředí pro enantiomery, které tvoří s chirálními selektory přechodné komplexy. Enantiomery se liší ve vazebné energii s chirálním selektorem. Tudíž dochází k eluci enantiomerů v různých časech a ty mohou

být zvlášť zachyceny při preparativní chromatografii [12].

3.4 Chirální stacionární fáze používané v HPLC

Chirální stacionární fáze mohou být tvořené malými chirálními molekulami, makrocyclickými antibiotiky, opticky aktivními polymery jako například proteiny, syntetickými polymery, polysacharidy, cyklodextriny aj. [13].

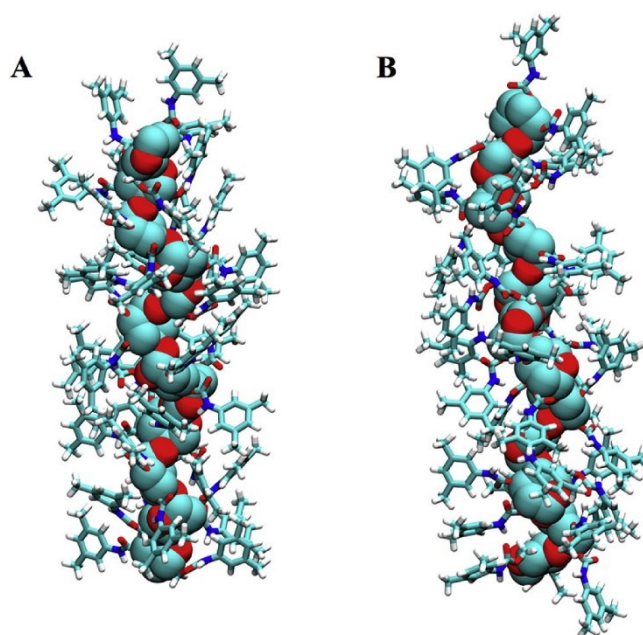
3.4.1 Chirální stacionární fáze založené na derivátech polysacharidů

Chirální stacionární fáze založené na derivátech polysacharidů, zejména celulózy a amyulózy, jsou v kapalinové chromatografii nejpoužívanější. To je dáno jejich velkým enantioselektivním potenciálem pro mnoho strukturně odlišných sloučenin. Polysacharidy jsou polymery složené z glukózových jednotek spojených vazbou $\beta(1\rightarrow4)$ pro celulózu nebo $\alpha(1\rightarrow4)$ pro amyulózu. Vývoj CSP založené na polysacharidu začal optimalizací sacharidové složky. Bylo vyzkoušeno několik různých polysacharidů jako celulóza, amyulóza, inulin, kurdlan, chytózan, xylan a dextran [14].

Celulóza a amyulóza se ukázaly jako nejúčinnější kvůli vysoké chirální rozpoznávací schopnosti, dostupnosti v čisté formě a jednoduchosti zpracování. Pro přípravu CSP se používá v případě celulózy hlavně mikrokrystická forma, pod obchodním názvem Avicel, v případě amyulózy to může být přírodní nebo semisyntetická amyulóza. Zdrojem přírodní amyulózy je škrob z rostlin. Přírodní zdroj škrobu ovlivňuje schopnosti chirálního rozpoznávání finálního produktu. Semisyntetická amyulóza má výhodu v možné úpravě molární hmotnosti a je také vhodnější pro kovalentní vazbu chirálního selektoru na silikagelový nosič [15]. Enantioselektivní potenciál polysacharidů je možno zvýšit správnou modifikací. Pouze amyulózové a celulózové deriváty se staly široce používanými v praxi [16]. Polysacharidy vykazují po derivatizaci vyšší enantioselektivitu než nederivatizované analogy [17].

Stacionární fáze s těmito deriváty byly nejprve připraveny jednoduchou adsorpcí na makroporézní silikagelový nosič [18]. Z tohoto důvodu mohly být použity jenom v kombinaci s limitovaným počtem rozpouštědel jako mobilních fází. CSP připravené adsorpcí se používají zejména v reverzním módu a mají odlišnou enantioselektivitu v porovnání s imobilizovanými CSP. Příprava imobilizovaných polysacharidů na silikagelu rozšiřuje možné použití těchto chirálních selektorů [19].

Dnes je známo několik metod pro přípravu kolon s polysacharidy imobilizovanými na silikagelovém nosiči [19]. Velké množství těchto kolon je komerčně dostupných. Vysoká chirální rozlišovací schopnost obvykle vyplývá z pravidelné helikální struktury, viz **Obrázek 1**. Zaujmut pravidelnou strukturu polysacharidového řetězce je však složitější po inkorporaci různých skupin potřebných pro imobilizaci [20].



Obrázek 1– Struktura amylozy tris(3,5-dimethylfenylkarbamátu) v methanolu (A) a v n-heptan/propan-2-olu (90:10) (v/v) (B). Atomy polysacharidového řetězce jsou znázorněny sféricky a deriváty paličkami [21].

Různé deriváty polysacharidů, tj. alkylové, cykloalkylové, arylové a také estery byly intenzivně studovány. Některé alkyl estery polysacharidů jsou stále komerčně dostupné. Nejúčinnějšími chirálními selektory jsou substituované aryl deriváty, benzoáty a fenyl karbamáty [22].

Polární karbamátová skupina je důležitá pro svou schopnost interakcí s analytem prostřednictvím vodíkových vazeb aminové a karbonylové skupiny a dipól-dipólovými interakcemi na karbonylové skupině. U aromatických analytů hrají významnou roli i π - π interakce s fenylovou skupinou fenylkarbamátového derivátu polysacharidu. V průběhu separace jsou enantiomery stabilizovány karbamátovou skupinou při stereogenní interakci s polysacharidem [23].

Největší důraz při přípravě nových chirálních selektorů založených na polysacharidech byl v posledních letech zaměřen na optimalizaci substituentů na fenylové části těchto derivátů. Vlastnosti aromatických esterů polysacharidů je možno výrazně ovlivnit správným umístěním elektron-donorových nebo elektron-akceptorových substituentů na fenylové části [24]. Benzoátové deriváty s elektron-donorovými substituenty (alkyly) vykazují vyšší rozpoznávací schopnost než ty, které obsahují elektron-akceptorové substituenty (halogeny, trifluormethyl) [15].

Substituenty ovlivňují elektronovou hustotu na karbamátové části polysacharidu, a tím i interakce s chirálními analyty. Například při separaci kyseliny chryzantémové v normálním módu vykazují amyložové benzoáty horší rozlišovací schopnost než celulózy. To je pravděpodobně způsobeno nižší konformační stabilitou amyložových derivátů, což může vést k tvorbě konformačních izomerů [22].

Zvýšení rozlišovací schopnosti amyložových fenyلكarbamátů je možné methylovými a chloridovými substituenty na fenylové části [25]. Přítomnost elektron-akceptorové skupiny na fenylové části způsobuje nárůst acidity protonu na atomu dusíku v karbamátové skupině. Tím jsou pravděpodobnější vodíkové interakce elektron-akceptorových skupin analytů s NH skupinami na selektorech [26]. Naopak přítomnost elektron-donorových substituentů na fenylové části zvyšuje elektronovou hustotu na karbonylovém kyslíku karbamátové skupiny. Následně analyty s elektron-donorovými substituenty mohou silně interagovat s tímto typem derivátů polysacharidů [22].

Chirální rozpoznávací schopnost závisí na schopnosti tvorby komplexu analytu se stacionární fází. Tyto komplexy jsou primárně zprostředkovány vodíkovými vazbami, π - π interakcemi a van der Waalsovými silami [21]. Obzvláště spojení s karbamátovou skupinou poskytuje flexibilitu aromatickému kruhu pro maximalizaci π - π interakcí a van der Waalsových sil pro interakci s analytem.

Polysacharidové CSP jsou nejčastěji používány v kombinaci s normálním módem, avšak umožňují i použití reverzního a polárně-organického módu [27]. Výběr reverzního módu je často spojen s nízkou rozpustností polárních analytů v nepolárních rozpouštědlech a nedostatkem enantioselektivity v organických rozpouštědlech. Výběr reverzního módu je výhodný pro následné použití hmotnostní spektrometrie [19].

V následující kapitole bude podrobně popsána kolona s CSP na bázi amyložy, která byla použita v této práci.

3.4.2 Kolona CHIRAL ART Amylose-SA

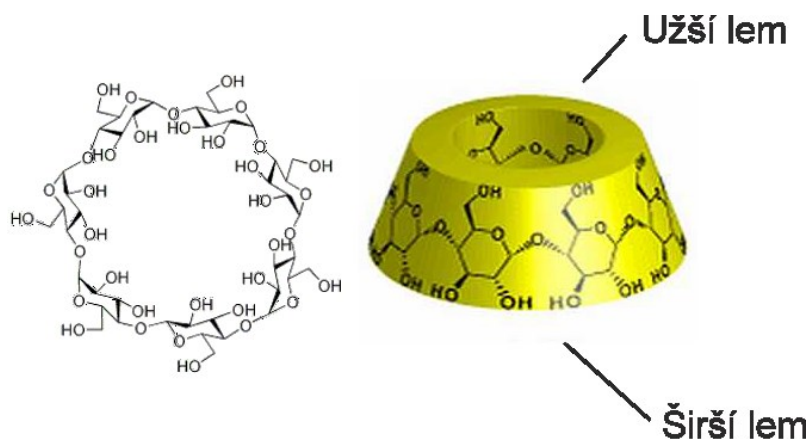
Kolona CHIRAL ART Amylose-SA společnosti YMC má jako chirální selektor amylozu tris(3,5-dimethylfenylkarbamát), která je imobilizovaná na porézních silikagelových částicích o velikosti od 3 do 20 μm . V této práci byla použita kolona s délkou 150 mm a vnitřním průměrem 3,0 mm a velikostí částic 3 μm . Tuto kolonu je možné použít pro techniky HPLC a SFC. V HPLC je kolona kompatibilní s mobilními fázemi pro reverzní i normální mód.

Kolona CHIRAL ART Amylose-SA byla v SFC úspěšně použita pro chirální separaci racemátů biologicky aktivních bazických látek [28]. V HPLC byla tato kolona použita např. pro separaci derivátů *N*-Benzoyl-5-hydroxy-1-benzazepinu, které jsou součástí antagonistů receptorů vazopresinu [29]. Mezi analyty, jejichž enantiomery byly separovány na této koloně patří také např. kyselá léčiva flurbiprofen a fenoprofen [30].

3.4.3 Chirální stacionární fáze založené na cyklodextrinech

Cyklodextriny jsou cyklické oligosacharidy složené z glukózových jednotek spojených $\alpha(1\rightarrow4)$ vazbou. Dle počtu glukózových jednotek se dělí na alfa (6 jednotek), beta (7 jednotek) a gama (8 jednotek) cyklodextriny [31]. Cyklodextriny se získávají štěpením škrobu různými kmeny bakterií *Bacillus*. Cyklodextriny jako chirální selektory našly využití především v kapilární elektroforéze, kde se přidávají do základního elektrolytu. V kapalinové chromatografii se cyklodextriny používají také, a to buď volně v mobilní fázi, nebo vázané na nosič [32].

Molekuly cyklodextrinů tvoří dutý kónický útvar s hydrofobní kavitou a hydrofilním okolím. Sekundární 2- a 3- hydroxylové skupiny jsou na širším lemu, zatímco primární 6- hydroxylové skupiny na užším, viz **Obrázek 2**. Počet glukózových jednotek určuje velikost kavity [21].



Obrázek 2 – Struktura β -cyklodextrinu a 3D struktura kavity, kterou cyklodextrin tvoří [33].

Hydroxylové skupiny je možné derivatizovat, což vede k široké nabídce komerčně dostupných nabitých i nenabitých derivátů cyklodextrinů. Deriváty jsou dostupné buď jako jednotlivé izomery (obsahují derivatizační vzorec), nebo jsou to náhodně substituované cyklodextriny, které jsou směsí substitučních a polohových izomerů. Stupeň substituce může ovlivňovat schopnost separace enantiomerů [34].

Tvorba komplexů cyklodextrinů a jiných molekul byla intenzivně studována. Ve většině případů vznikají komplexy se stechiometrií 1:1, jsou však známy i případy vzniku komplexů analyt-cyklodextrin v poměru 1:2, 2:2 i vyšším. Tvorba komplexu nastává po začlenění hydrofobních částí rozpuštěné látky do kavity cyklodextrinu, přičemž dojde k nahrazení molekul rozpouštědla. K začlenění může dojít buď na užší, nebo širší straně kavity. Hydrofobní interakce a van der Waalovy síly jsou pravděpodobně primárně zapojeny při tvorbě komplexu [35]. Dále hrají důležitou roli vodíkové vazby z hydroxylových skupin a sterické faktory. U nabitých derivátů se navíc uplatňují iontové interakce a u aromatických π - π interakce [36].

Většina vzniklých komplexů je inkluzního typu. Vznik inkluzního komplexu však není jednoznačným předpokladem pro separaci enantiomerů. K vazbě analytu může dojít i na vnější straně kavity cyklodextrinu, což stále může vést k separaci enantiomerů [37].

V této práci byla použita kolona CDShell-RSP, která jako CSP obsahuje derivát β -cyklodextrinu a bude podrobněji popsána v následující kapitole.

3.4.4 Kolona CDShell-RSP

Kolona CDShell-RSP od společnosti AZYP obsahuje chirální selektor

hydroxypropyl- β -cyklodextrin, který je imobilizovaný na pelikulárních částicích velikosti 2,7 μm . Délka kolony byla 50 mm a vnitřní průměr 2,1 mm. Tuto kolonu je možné použít v kapalinové i superkritické fluidní chromatografii. V HPLC metodách se kolona používá v reverzním a polárně-organickém módu.

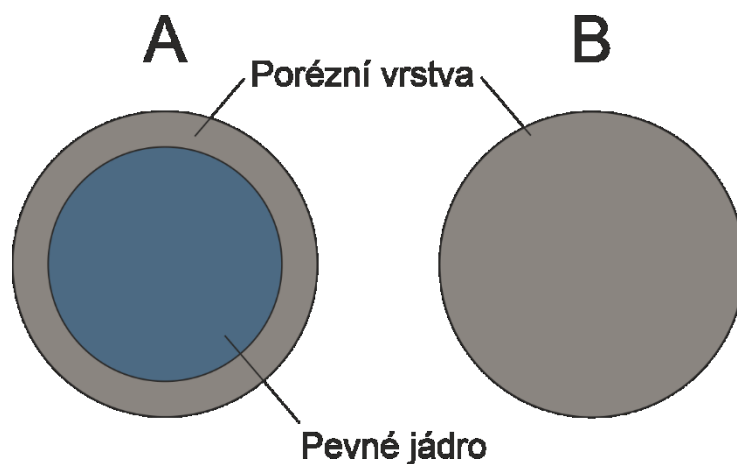
Kolona CDShell-RSP byla v kombinaci s HPLC úspěšně použita pro enantioseparaci různých typů primárních aminů v reverzním a polárně-organickém módu [38]. V dalších studiích byla tato kolona, také v HPLC uspořádání, úspěšně použita např. pro enantioseparaci pesticidů v reverzním a polárně-organickém módu [39], nebo nikotinu a jeho derivátů v reverzním a polárně-organickém módu [40].

3.5 Chromatografické nosiče

V chromatografických kolonách jsou používány dva základní typy nosičů, a to pelikulární a porézní částice. Pelikulární částice byly původně neporézní sférické kuličky ze skla nebo polymeru. Povrch těchto kuliček byl pokryt vrstvou oxidu křemičitého, aluminy, nebo pryskyřicemi. Velké pelikulární částice (průměr 30–40 μm) byly v HPLC postupně vytlačeny malými porézními částicemi o průměru 3–10 μm . V posledních letech se staly malé pelikulární částice znovu používanými [41].

3.5.1 Pelikulární částice

Pelikulární částice (superficially porous particles, SPP) jsou tvořeny pevným neporézním silikagelovým jádrem obaleným porézní vrstvou s vlastnostmi plně porézních materiálů (**Obrázek 3**). SPP kombinují výhody porézních materiálů a neporézních částic, výsledkem je kolona s rovnoměrnou distribucí částic a extrémně vysokým počtem teoretických pater [42].



Obrázek 3 – Struktura A – pelikulární částice, B – porézní částice

Pelikulární částice o průměru 3 μm dosahují stejné účinnosti jako porézní částice o průměru 2 μm při podstatně nižším tlaku.

Účinnost kolon popisuje Van Deemterova rovnice:

$$H = H_V + H_P + H_S + H_M \quad (3.1)$$

kde H je výškový ekvivalent teoretického patra, H_V je příspěvek vířivé difuze, H_P příspěvek podélné molekulární difuze, H_S odpor proti přenosu hmoty ve stacionární fázi a H_M odpor proti přenosu hmoty v mobilní fázi [43,44]. V praxi se používá upravená verze:

$$H = A + \frac{B}{u} + C * u \quad (3.2)$$

kde H je výškový ekvivalent teoretického patra v centimetrech, A je koeficient vířivé difuze, B/u koeficient podélné difuze, C koeficient odporu proti přenosu hmoty a u je lineární průtok mobilní fáze v centimetrech za sekundu. Člen A je závislý na kvalitním naplnění kolony. To zahrnuje homogenitu, uspořádání částic při stěnách a ve středu kolony a distribuci velikosti částic. Členy B/u a C jsou závislé na velikosti a retenci analytu. S retenčním časem analytu roste i člen B/u , protože je k dispozici více času pro difuzi analytu ve stacionární fázi. Člen C je důležitější pro velké molekuly, protože ty mají tendenci difundovat pomaleji [45].

Dle rovnice (3.2), vliv vířivé difuze na kolonu naplněnou SPP koresponduje s vnějším průměrem částice, ale odpor proti přenosu hmoty a podélná difuze korespondují s tloušťkou a velikostí pórů porézní vrstvy [46]. Kinetické výhody pelikulárních částic

proto závisí na velikosti analyzované látky. Kolony s SPP jsou velice efektivní pro separaci malých molekul [47].

Přítomnost pevného jádra v částicích má přímý vliv na podélnou difuzi, kterou snižuje. Tento vliv se uplatňuje zejména při analýze malých molekul a nízké průtokové rychlosti. Při separaci velkých molekul je tento vliv zanedbatelný [48].

Největší vliv mají SPP na velikost vířivé difuze, která je výrazně nižší v porovnání s porézními částicemi. Mechanismus tohoto jevu stále není plně objasněn. Příčinou může být těsná distribuce částic. Kromě toho existuje spousta jiných faktorů, které jsou schopny ovlivnit kvalitu náplně. SPP mají vyšší hustotu a některé jsou drsnější než porézní částice [46,49].

Vyšší účinnost separace malých molekul při použití kolon s SPP je pravděpodobně způsobena výrazným snížením vířivé difuze. Pro separaci velkých molekul je naopak nejdůležitější snížení odporu proti přenosu hmoty.

3.6 Separační módy používané v HPLC

V literatuře je popsána celá řada separačních módů používaných v HPLC. Některé tyto módy jsou si podobné, jiné se od sebe výrazně liší. Módy v HPLC jsou rozděleny podle různých kritérií: typ stacionární fáze a složení mobilní fáze, typ interakcí zodpovědných za separaci, nebo podle obsahu určitých rozpouštědel v mobilní fázi. Mezi nejčastější módy používané v HPLC patří: normální, reverzní, iontově výměnný, polárně-organický, hydrofilní interakční (HILIC), afinitní a jiné [50].

Dále budou podrobněji popsány pouze módy použité v této práci, a to normální, reverzní a polárně-organický mód.

3.6.1 Normální mód

V normálním módu je stacionární fáze polární, nejčastěji silikagel, a mobilní fáze je nepolární (směsi organických rozpouštědel hexanu nebo heptanu s přísadkou alkoholů např. methanol, propan-2-ol). Čím je separovaná látka polárnější, tím má vyšší retenci. Polaritu látky ovlivňují i vodíkové vazby, což se projevuje v selektivě separace. Během separace se uplatňují také stericke efekty, které způsobují rozdíly při separaci izomerů. U aromatických látek je polarita ovlivňována také mezomerními, kongruačními a indukčními interakcemi mezi aromatickým jádrem a funkční skupinou.

Normální mód ustupuje v běžné chromatografii pro své nevýhody do pozadí, ale pro separaci chirálních látek v kombinaci s CSP založenými na polysacharidech se stále používá nejčastěji [51]. Hlavní nevýhodou je používání nevodných a těžkých rozpouštědel. Normální mód je vhodný pro separaci analytů, které se rozkládají v přítomnosti vody nebo jsou nerozpustné ve vodných rozpouštědlech. Organické mobilní fáze jsou také populární pro krátké časy analýzy, ostré píky a dobrý poměr signálu k šumu [52].

3.6.2 Reverzní mód

Reverzní mód představuje opak normálního módu. Mobilní fáze je polárnější než stacionární. Nejsilněji jsou proto zadržovány nepolární látky a polární jsou eluovány rychleji. Mobilní fáze je nejčastěji tvořena vodou nebo vodným pufrem v kombinaci s organickým rozpouštědlem (nejčastěji methanol nebo acetonitril). Eluci v reverzním módu ovlivňují principy rozdělovací chromatografie, hydrofobní interakce a vodíkové vazby [50].

Reverzní mód je nejčastěji používaný mód v kapalinové chromatografii. Tento mód obecně vykazuje vyšší reprodukovatelnost a robustnost než normální mód. Výhodou je také kompatibilita s hmotnostní spektrometrií a vyšší citlivost při použití UV detekce [53].

3.6.3 Polárně-organický mód

V polárně-organickém módu se jako mobilní fáze používají jenom polární organická rozpouštědla, čisté alkoholy (methanol, ethanol a propan-2-ol), čistý acetonitril nebo jejich kombinace. Mezi výhody polárně-organického módu patří kratší časy analýzy a vysoká účinnost [54].

U mobilních fází tvořených kombinací acetonitrilu a alkoholu má jejich poměr vliv na retenci. Mobilní fázi je možné modifikovat přidávkem kyselých (např. kyselina octová) nebo bazických (např. triethylamin) aditiv pro ovlivnění selektivity. Polárně-organický mód se používá jen v kombinaci s určitými kolonami například založenými na polysacharidech, cyklodextrinech, nebo makrocyclických antibiotikách a pro chirální separace [55].

4. Experimentální část

4.1 Použité přístroje a pomůcky

Vysokoučinný kapalinový chromatograf

HPLC Waters 2690 D, Waters, Milford, MA, USA

Kolonový termostat, Waters Alliance series column heater, Waters, Milford, MA, USA

Detektor Waters 2487, Waters, Milford, MA, USA

Software Empower 2, Waters, Milford, MA, USA

Kolony

CHIRAL ART Amylose-SA®, rozměry 150×3,0 mm s velikostí částic 3 μm (YMC, Kjóto, Japonsko)

CDSshell-RSP®, rozměry 50×2,1 mm s velikostí částic 2,7 μm (AZYP, Arlington, Texas, USA)

Další pomůcky

Ultrazvuková lázeň Ultrasonic, LC 30, ELMA Německo

Váhy Mettler AE 240, Greifensee, Švýcarsko

pH metr PHM 240, Radiometer Analytical SAS, Villeurbanne Cedex, Francie

4.2 Použité chemikálie

- deionizovaná voda upravena pomocí zařízení Ultrapur a Rowapur (Watrex®, Praha, Česká republika)
- kyselina octová (AA), ReagentPlus® (čistota ≥ 99 %, Sigma-Aldrich®, Steinheim, Německo)
- octan amonný (čistota ≥ 99,00 %, Sigma-Aldrich®, Steinheim, Německo)
- methanol for HPLC, gradient grade (čistota ≥ 99,9 %, Sigma-Aldrich®, Steinheim, Německo)
- acetonitril, chromasolv gradient for HPLC, (čistota ≥ 99,9 %, Sigma-Aldrich®, Steinheim, Německo)
- diethylamin (čistota ≥ 99,5 %, Sigma-Aldrich®, Steinheim, Německo)
- triethylamin (čistota ≥ 99,5 %, Sigma-Aldrich®, Steinheim, Německo)

- kyselina trifluoroctová, reagent grade (čistota $\geq 99,0$ %, Sigma-Aldrich®, Steinheim, Německo)
- hexane, chromasolv for HPLC (čistota ≥ 97 %, Sigma-Aldrich®, Steinheim, Německo)
- propan-2-ol, chromasolv for HPLC (čistota $\geq 99,9$ %, Sigma-Aldrich®, Steinheim, Německo)

Standardy použité pro chirální separaci:

- (*R,S*)-7-chlor-3-hydroxy-5-fenyl-1,3-dihydro-2H-1,4-benzodiazepin-2-on (oxazepam, čistota ≥ 98 %, Sigma-Aldrich®, Steinheim, Německo)
- (*R,S*)-2-hydroxy-5-{1-hydroxy-2-[(4-fenyl-2-butanyl)amino]ethylbenzamid hydrochlorid (labetalol hydrochlorid, čistota > 98 %, Sigma-Aldrich®, Steinheim, Německo)
- (*R,S*)-10-[2-(1-methyl-2-piperidiny)ethyl]-2-(methylsulfanyl)-10H-fenothiazin hydrochlorid (thioridazin, čistota ≥ 99 %, Sigma-Aldrich®, Steinheim, Německo)
- (*R,S*)-7-chlor-5-(2-chlorfenyl)-3-hydroxy-1,3-dihydro-2H-1,4-benzodiazepin-2-on (lorazepam, čistota ≥ 98 %, Sigma-Aldrich®, Steinheim, Německo)
- (*R,S*)-1-(1H-indol-4-yloxy)-3-(propan-2-ylamino)-propan-2-ol (pindolol, čistota ≥ 98 %, Sigma-Aldrich®, Steinheim, Německo)
- (*R,S*)-2-(6-chlor-9H-karbazol-2-yl)propanová kyselina (karprofen, čistota ≥ 97 %, Sigma-Aldrich®, Steinheim, Německo)
- (*R,S*)-2-(3-fenoxyfenyl)propanová kyselina (fenoprofen, čistota ≥ 97 %, Sigma-Aldrich®, Steinheim, Německo)
- (*R,S*)-2-(2-fluor-4-bifenylyl)propanová kyselina (flurbiprofen, čistota $\geq 98,5$ %, Sigma-Aldrich®, Steinheim, Německo)
- (*R,S*)-2-[4-(1-oxo-1,3-dihydro-2H-izoindol-2yl)fenyl]propanová kyselina (indoprofen, čistota ≥ 97 %, Sigma-Aldrich®, Steinheim, Německo)
- (*R,S*)-1-(propan-2-ylamino)-3-(1-naftyloxy)-2-propanol hydrochlorid (propranolol hydrochlorid, čistota ≥ 99 %, Sigma-Aldrich®, Steinheim, Německo)
- (*R,S*)-1-(2-allylfenoxy)-3-(propan-2-ylamino)-2-propanol hydrochlorid

(alprenolol hydrochlorid, čistota ≥ 98 %, Sigma-Aldrich®, Steinheim, Německo)

- (*R,S*)-2-(2,6-dioxo-3-piperidiny)-1*H*-izoindol-1,3(2*H*)-dion (talidomid, čistota ≥ 98 %, Sigma-Aldrich®, Steinheim, Německo)
- (*R,S*)-1-[3-(dimethylamino)propyl]-1-(4-fluorofenyl)-1,3-dihydro-5-izobenzofurankarbonitril hydrobromid (citalopram hydrobromid, čistota ≥ 98 %, Sigma-Aldrich®, Steinheim, Německo)
- (*R,S*)-*trans*-3,3',4',5,7-pentahydroxyflavan (katechin hydrát, čistota ≥ 98 %, Sigma-Aldrich®, Steinheim, Německo)
- (*R,S*)-4-[2-hydroxy-3-[(1-methylethyl)amino]propoxy]benzenacetamid (atenolol, čistota ≥ 98 %, Sigma-Aldrich®, Steinheim, Německo)
- (*R,S*)-2-hydroxy-5-[1-hydroxy-2-[(1-methyl-3-fenylpropyl)amino]ethyl]benzamid hydrochlorid (labetalol, čistota ≥ 98 %, Sigma-Aldrich®, Steinheim, Německo)
- *N*-(3-acetyl-4-[(*R,S*)-2-hydroxy-3-(propan-2-ylamino)propoxy]fenyl)butanamid (acebutolol hydrochlorid, čistota ≥ 97 %, Sigma-Aldrich®, Steinheim, Německo)
- (*R,S*)-1-(2-allyloxyfenoxy)-3-propan-2-ylamino-2-propanol (oxprenolol hydrochlorid, čistota ≥ 97 %, Sigma-Aldrich®, Steinheim, Německo)
- (*R,S*)-2-(4-izobutylfenyl)propanová kyselina (ibuprofen, čistota ≥ 98 %, Sigma-Aldrich®, Steinheim, Německo)
- (*R,S*)-2-(5-benzoylthiofen-2-yl)propanová kyselina (kyselina tiaprofenová, čistota ≥ 98 %, Sigma-Aldrich®, Steinheim, Německo)
- (*R,S*)-2-[4-(thiofen-2-karbonyl)fenyl]propanová kyselina (suprofen, čistota ≥ 98 %, Sigma-Aldrich®, Steinheim, Německo)
- (*R,S*)-2-(3-benzoylfenyl)propanová kyselina (ketoprofen, čistota ≥ 98 %, Sigma-Aldrich®, Steinheim, Německo)
- 3-ethyl 5-methyl ester benzensulfonát (*R,S*)-2-[(2-aminoethoxy)-methyl]-4-(2-chlorfenyl)-1,4-dihydro-6-methyl-3,5-pyridindikarboxylové kyseliny (amlodipin, čistota ≥ 98 %, Sigma-Aldrich®, Steinheim, Německo)
- methyl 2-[methyl(fenylmethyl)amino]ethyl ester hydrochloridu (*R,S*)-1,4-

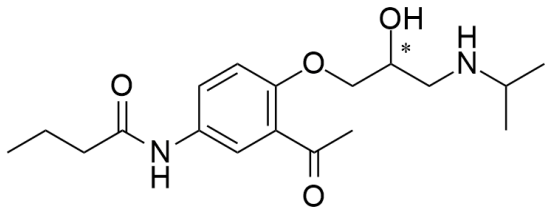
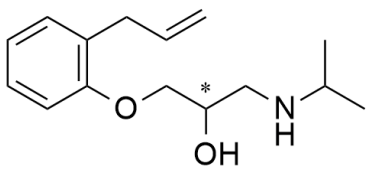
dihydro-2,6-dimethyl-4-(3-nitrofenyl)-3,5-pyridindikarboxylové kyseliny (nikardipin, čistota ≥ 98 %, Sigma-Aldrich®, Steinheim, Německo)

- 2-methoxyethyl 1-methylethyl ester (*R,S*)-1,4-dihydro-2,6-dimethyl-4-(3-nitrofenyl)-3,5-pyridindikarboxylové kyseliny (nimodipin, čistota ≥ 98 %, Sigma-Aldrich®, Steinheim, Německo)
- (*R,S*)-izobutyl methyl 1,4-dihydro-2,6-dimethyl-4-(*o*-nitrofenyl)-3,5-pyridin dikarboxylát (nisoldipin, čistota ≥ 98 %, Sigma-Aldrich®, Steinheim, Německo)
- ethyl methyl ester (*R,S*)-1,4-dihydro-2,6-dimethyl-4-(3-nitrofenyl)-3,5-pyridindikarboxylové kyseliny (nitrendipin, čistota ≥ 95 %, Sigma-Aldrich®, Steinheim, Německo)
- (*R,S*)-5-[*N*-(3,4-dimethoxyfenylethyl)methylamino]-2-(3,4-dimethoxyfenyl)-2-propan-2-olvaleronitril hydrochlorid (verapamil hydrochlorid, čistota ≥ 99 %, Sigma-Aldrich®, Steinheim, Německo)
- (*R,S*)-*cis*-2-(dimethylaminomethyl)-1-(3-methoxyfenyl)cyklohexanol hydrochlorid (tramadol hydrochlorid, čistota $\geq 99,0$ %, Sigma-Aldrich®, Steinheim, Německo)

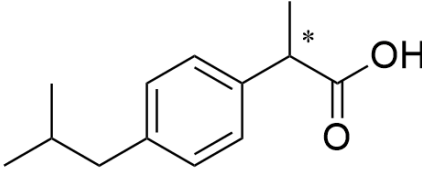
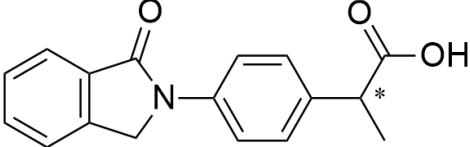
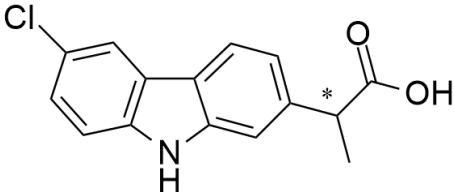
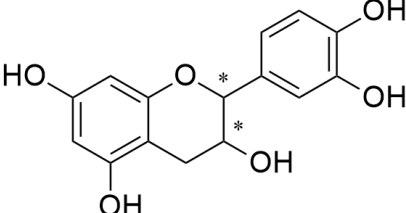
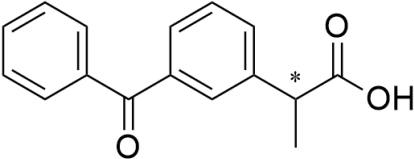
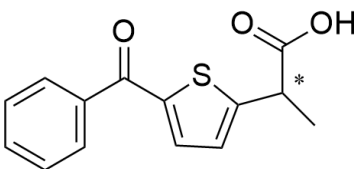
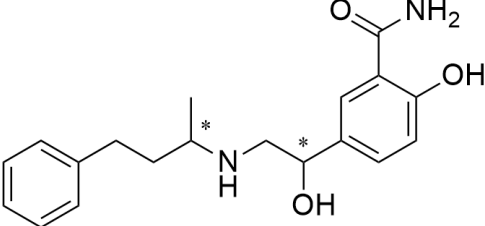
4.3 Příprava vzorků a jejich struktura

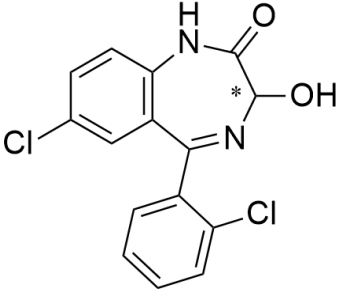
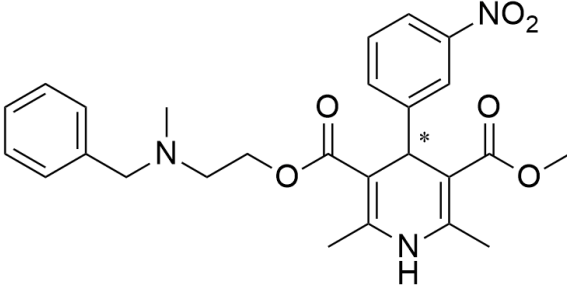
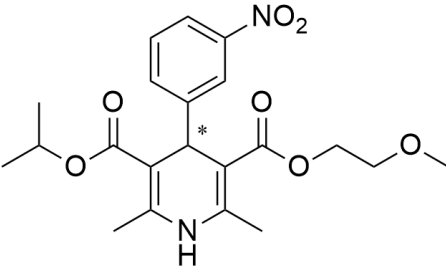
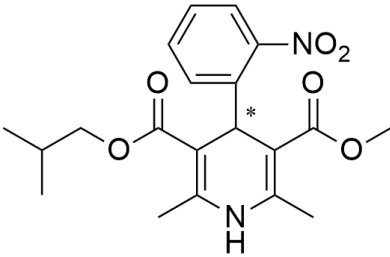
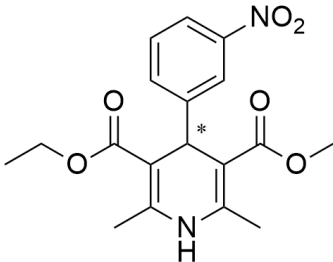
Všechny vzorky byly připraveny o koncentraci 1 mg/ml methanolu. V **Tabulce 1** jsou ukázány struktury chirálních léčiv testovaných v této práci.

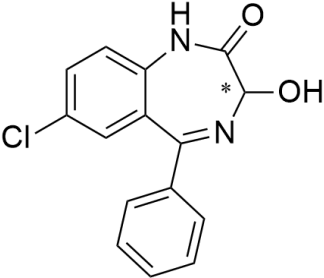
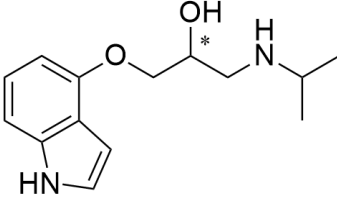
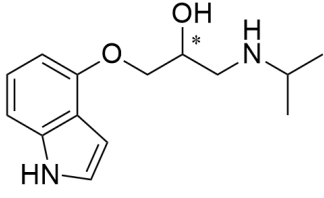
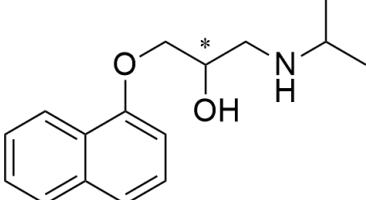
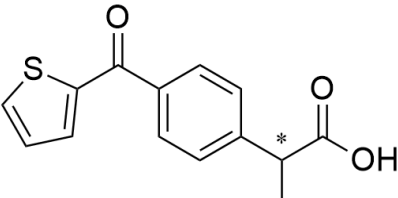
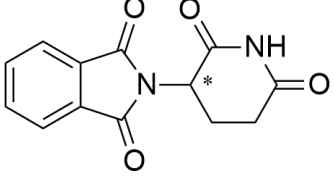
Tabulka 1 – Strukturní vzorce standardů použitých analytů a jejich zařazení do skupiny léčiv. Chirální centrum je označeno symbolem – *.

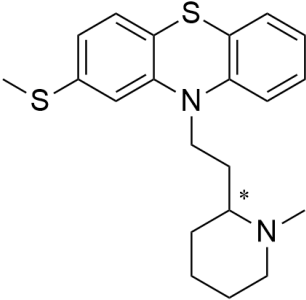
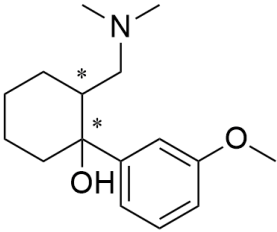
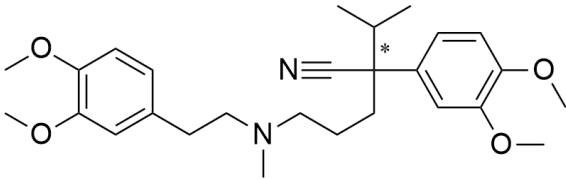
Název analytu	Struktura	Skupina
Acebutolol		beta-blokátor
Alprenolol		beta-blokátor

Název vzorku	Struktura	Skupina
Amlodipin		blokátor kalciového kanálu
Atenolol		beta-blokátor
Bopindolol		beta-blokátor
Citalopram		selektivní inhibitor spětného vychytávání serotoninu
Fenoprofen		profen
Flurbiprofen		profen

Název vzorku	Struktura	Skupina
Ibuprofen		profen
Indoprofen		profen
Karprofen		profen
Katechin		flavonoid
Ketoprofen		profen
Kyselina tiaprofenová		profen
Labetalol		beta-blokátor

Název vzorku	Struktura	Skupina
Lorazepam		benzodiazepin
Nikardipin		blokátor kalciového kanálu
Nimodipin		blokátor kalciového kanálu
Nisoldipin		blokátor kalciového kanálu
Nitrendipin		blokátor kalciového kanálu

Název vzorku	Struktura	Skupina
Oxazepam		benzodiazepin
Oxprenolol		beta-blokátor
Pindolol		beta-blokátor
Propranolol		beta-blokátor
Suprofen		profen
Thalidomid		ftalimid

Název vzorku	Struktura	Skupina
Thioridazin		fenothiazin
Tramadol		inhibitor zpětného vychytávání serotoninu a noradrenalinu
Verapamil		blokátor kalciového kanálu

4.4 Použité mobilní fáze a kolony

Použité mobilní fáze pro dané kolony jsou shrnuty **Tabulkách 2-4**.

Tabulka 2 – Přehled mobilních fází použitých pro danou kolonu v normálním módu.

Kolona	Mobilní fáze
CHIRAL ART Amylose-SA	Hexan/Propan-2-ol; 80/20 (v/v)
CHIRAL ART Amylose-SA	Hexan/Propan-2-ol; 90/10 (v/v)
CHIRAL ART Amylose-SA	Hexan/Propan-2-ol; 95/5 (v/v)
CHIRAL ART Amylose-SA	Hexan/Propan-2-ol/Triethylamin; 80/20/0,1 (v/v/v)
CHIRAL ART Amylose-SA	Hexan/Propan-2-ol/Triethylamin; 90/10/0,1 (v/v/v)
CHIRAL ART Amylose-SA	Hexan/Propan-2-ol/Triethylamin; 95/5/0,1 (v/v/v)
CHIRAL ART Amylose-SA	Hexan/Propan-2-ol/Diethylamin; 80/20/0,1 (v/v/v)
CHIRAL ART Amylose-SA	Hexan/Propan-2-ol/Diethylamin; 90/10/0,1 (v/v/v)
CHIRAL ART Amylose-SA	Hexan/Propan-2-ol/Diethylamin; 95/5/0,1 (v/v/v)
CHIRAL ART Amylose-SA	Hexan/Propan-2-ol/Kyselina trifluoroctová; 80/20/0,1 (v/v/v)

Kolona	Mobilní fáze
CHIRAL ART Amylose-SA	Hexan/Propan-2-ol/Kyselina trifluoroctová; 90/10/0,1 (v/v/v)
CHIRAL ART Amylose-SA	Hexan/Propan-2-ol/Kyselina trifluoroctová; 95/5/0,1 (v/v/v)
CHIRAL ART Amylose-SA	Hexan/Propan-2-ol/Diethylamin/Kyselina trifluoroctová; 80/20/0,1/0,1 (v/v/v/v)
CHIRAL ART Amylose-SA	Hexan/Propan-2-ol/Diethylamin/Kyselina trifluoroctová; 90/10/0,1/0,1 (v/v/v/v)
CHIRAL ART Amylose-SA	Hexan/Propan-2-ol/Diethylamin/Kyselina trifluoroctová; 95/5/0,1/0,1 (v/v/v/v)

Tabulka 3 – Přehled mobilních fází použitých pro danou kolonu v reverzním módu.

Kolona	Mobilní fáze
CDSHell-RSP	10 mM Octan amonný; pH 4,0/Methanol; 20/80 (v/v)
CDSHell-RSP	10 mM Octan amonný; pH 4,0/Methanol; 40/60 (v/v)
CDSHell-RSP	10 mM Octan amonný; pH 4,0/Methanol; 60/40 (v/v)
CDSHell-RSP	10 mM Octan amonný; pH 4,0/Methanol; 80/20 (v/v)
CDSHell-RSP	10 mM Octan amonný; pH 4,0/Methanol; 90/10 (v/v)
CDSHell-RSP	10 mM Octan amonný; pH 3,0/Methanol; 80/20 (v/v)
CDSHell-RSP	10 mM Octan amonný; pH 3,0/Methanol; 90/10 (v/v)
CDSHell-RSP	10 mM Octan amonný; pH 6,5/Methanol; 80/20 (v/v)
CDSHell-RSP	10 mM Octan amonný; pH 6,5/Methanol; 90/10 (v/v)
CDSHell-RSP	1% Triethylaminoctanový pufr; pH 4,0/Methanol; 80/20 (v/v)
CDSHell-RSP	1% Triethylaminoctanový pufr; pH 4,0/Methanol; 90/10 (v/v)
CDSHell-RSP	1% Triethylaminoctanový pufr; pH 6,5/Methanol; 80/20 (v/v)
CDSHell-RSP	1% Triethylaminoctanový pufr; pH 6,5/Methanol; 90/10 (v/v)

Tabulka 4 – Přehled mobilních fází použitých pro danou kolonu v polárně-organickém módu.

Kolona	Mobilní fáze
CDSHell-RSP	Acetonitril/Methanol/Kyselina octová/Triethylamin (80/20/0,3/0,2) (v/v/v/v)
CDSHell-RSP	Acetonitril/Methanol/ Kyselina octová/Triethylamin (20/80/0,3/0,2) (v/v/v/v)
CDSHell-RSP	Acetonitril/Methanol/ Kyselina octová/Triethylamin (80/20/0,03/0,02) (v/v/v/v)
CDSHell-RSP	Acetonitril/Methanol/ Kyselina octová/Triethylamin (97/3/0,03/0,02) (v/v/v/v)

Pufr s octanem amonným o požadované koncentraci a objemu 1 l byl připraven navážením potřebného množství octanu amonného, který byl rozpuštěn v deionizované vodě. Požadované pH bylo dosaženo titrací kyseliny octové, poté byl pufr doplněn deionizovanou vodou do objemu 1 l. Pufr byl následně přefiltrován pomocí 0,45 µm filtru pro odstranění nečistot.

Triethylaminoctanový pufr byl připraven pipetováním požadovaného množství triethylaminu do vody. Roztok byl poté titrován kyselinou octovou na požadované pH. Z kádinky byl roztok přelit do 1 l odměrné baňky a doplněn vodou po rysku.

4.5 Podmínky separace

Separace analytů probíhala v reverzním a polárně-organickém módu na koloně CDShell-RSP a v normálním módu na koloně CHIRAL ART Amylose-SA. Dávkovaný objem vzorku byl 5 µl. Pro detekci byl použit duální spektrofotometr, měření probíhalo buď při vlnových délkách 220 a 254 nm nebo 254 a 280 nm. Kolony byly termostatovány na teplotu 25°C. Průtok mobilní fáze v normálním módu byl 1 ml/min, v reverzním módu 0,4 ml/min a v polárně-organickém módu 0,5 ml/min. Eluce probíhala izokraticky.

4.6 Určení mrtvého času

Mrtvý čas byl pro obě kolony určen nadávkováním methanolu. Pro kolonu CDShell-RSP byl mrtvý čas 0,63 min pro průtok 0,4 ml/min a 0,57 min pro průtok 0,5 ml/min. Pro kolonu CHIRAL ART Amylose-SA byl mrtvý čas 1,00 min při průtoku 1 ml/min.

4.7 Chromatografické parametry

Chromatografické parametry popisující separaci enantiomerů a jsou použity v této práci jsou: retenční faktor (k), enantioselektivita (α), rozlišení (R) a faktor symetrie (A_S). Retenční faktor byl vypočten dle rovnice:

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M} \quad (6.3)$$

kde k je retenční faktor analytu, t_R je retenční čas analytu a t_M je mrtvý čas.

Enantioselektivita byla vypočtena jako poměr retenčních faktorů:

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} \quad (6.4)$$

kde α je enantioselektivita, k_2 je retenční faktor později eluujícího enantiomeru a k_1 je retenční faktor dříve eluujícího enantiomeru.

Rozlišení sousedních píků bylo vypočteno dle rovnice:

$$R = \frac{1,18 \cdot (t_{R2} - t_{R1})}{w_1 + w_2} \quad (6.5)$$

kde R je rozlišení, t_{R2} a t_{R1} jsou retenční časy druhého a prvního eluujícího enantiomeru, w_1 a w_2 jsou šířky píků v polovině jejich výšky.

Faktor symetrie byl vypočten jen pro píky analytů rozdělených na základní linii, a to dle vztahu:

$$A_s = \frac{W}{2 \cdot f} \quad (6.6)$$

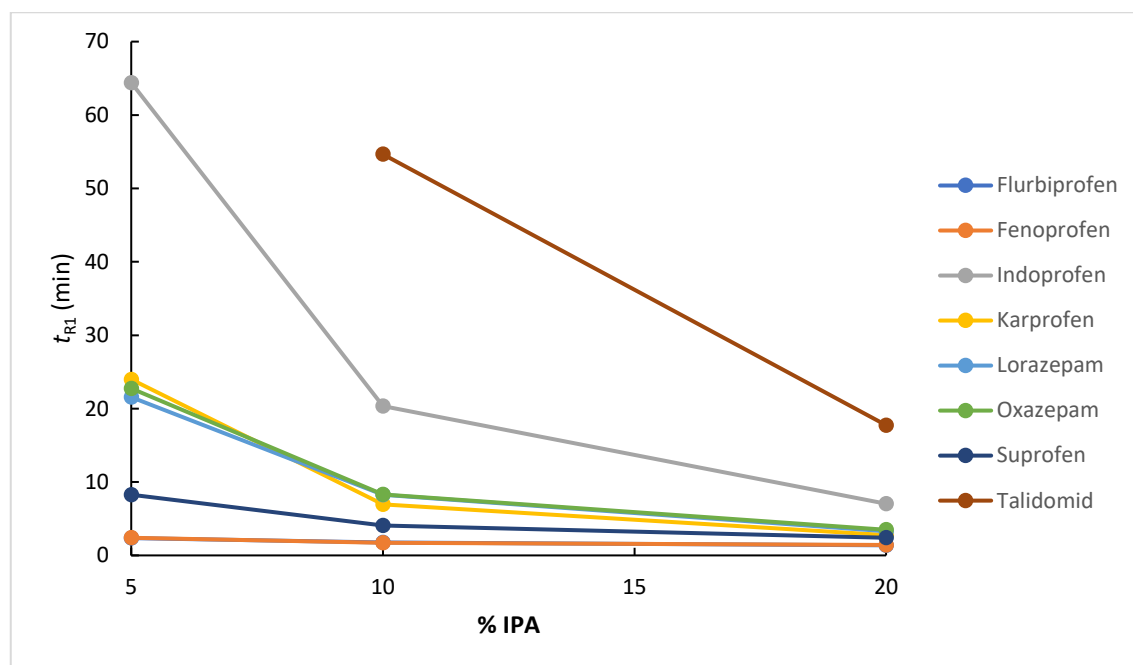
kde A_s je faktor symetrie, W je šířka píku v 5 % jeho výšky a f je poměr šířky píku vzestupné části k sestupné části píku v 5 % jeho výšky. V případě, že je pík symetrický, je hodnota faktoru symetrie 1,0. Pokud pík chvostuje, je hodnota faktoru symetrie >1 . V případě, že hodnota faktoru symetrie <1 pak dochází k tzv. frontování píku.

5. Výsledky a diskuze

5.1 Kolona CHIRAL ART Amylose-SA

5.1.1 Retence a enantioseparace v normálním módu

Měření v normálním módu začalo použitím jednotlivých mobilních fází složených z hexanu (HEX) a propan-2-olu (IPA) v různých objemových poměrech bez přidavku aditiv (80 HEX/20 IPA, 90 HEX/10 IPA, 95 HEX/5 IPA (v/v)). Závislost retenčních časů vybraných analytů na množství propan-2-olu v mobilní fázi ilustruje **Obrázek 4**.

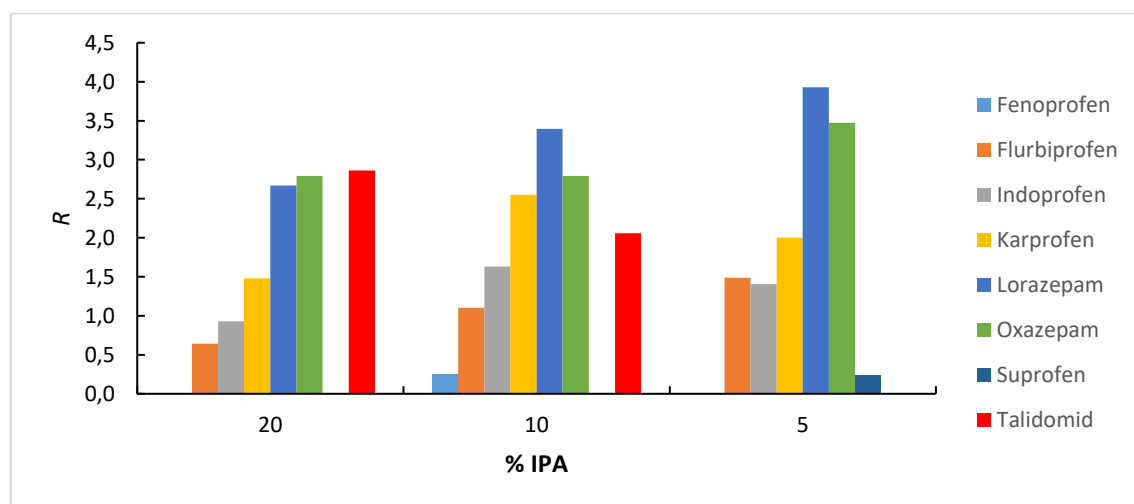


Obrázek 4 – Závislost retenčního času prvního elujícího enantiomeru (t_{R1}) uvedených analytů na procentuálním zastoupení propan-2-olu v mobilní fázi HEX/IPA (v/v).

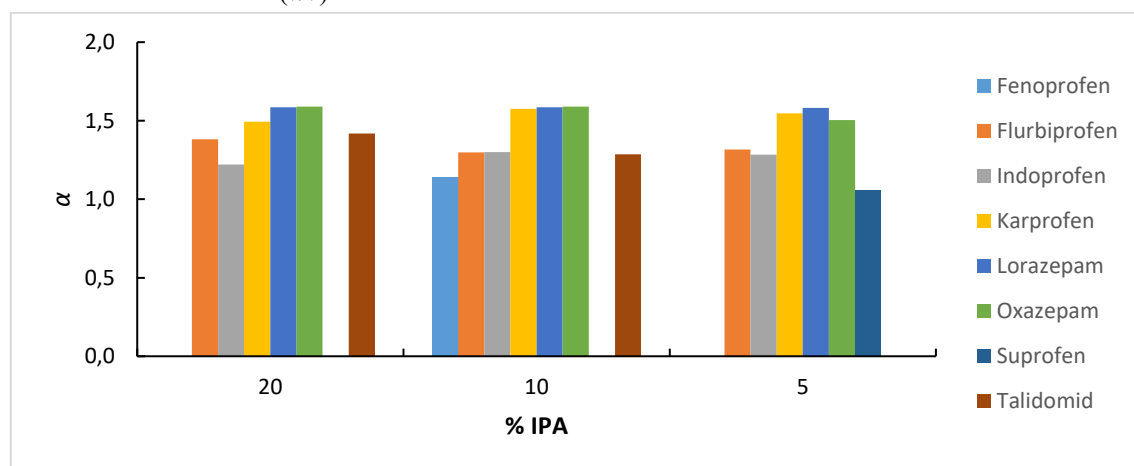
Na **Obrázku 4** jsou zobrazeny pouze analyty, jejichž enantiomery se dělily v daných mobilních fázích. U všech analytů se snižovala retence se zvyšujícím se množstvím propan-2-olu v mobilní fázi kromě flurbiprofenu, kdy se neměnila. Nejvýraznější nárůst retenčních časů se snížením množství propan-2-olu v mobilní fázi se projevil u analytů indoprofen a talidomid. U talidomidu doba analýzy přesáhla 2 hodiny v mobilní fázi s 5 % propan-2-olu (v/v). Retenční časy strukturně podobných

analytů lorazepam a oxazepam byly ve všech poměrech propan-2-olu srovnatelné. Analyty ze skupiny profenů se strukturně výrazně liší. Z tohoto důvodu byly retenční časy a jejich závislosti na množství propan-2-olu v mobilní fázi výrazně odlišné. Indoprofen oproti karprofenu a flurbiprofenu obsahuje navíc ve své struktuře karbonylovou skupinu, která je pravděpodobně zodpovědná za nárůst retenčních časů. To, že přítomnost karbonylové skupiny prodlužuje retenci je patrné i u talidomidu, který má podobnou strukturu jako indoprofen, 4 karbonylové skupiny a vykazuje výrazně vyšší retenci.

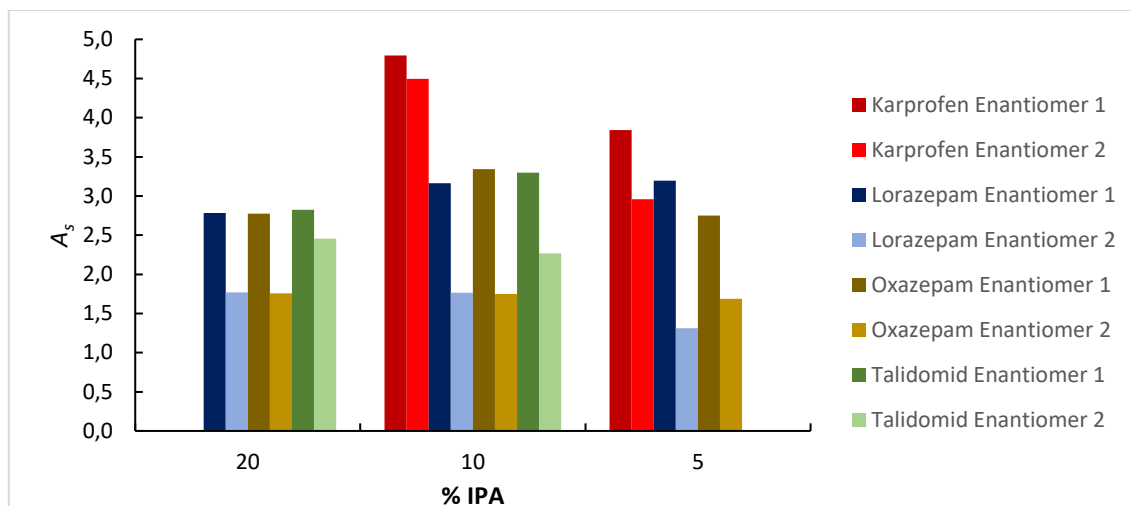
Na **Obrázcích 5 – 7** jsou zobrazeny chromatografické parametry, rozlišení (R), enantioselektivita (α) a faktor symetrie (A_s) pro analyty, které se enantioseparovaly v mobilních fázích HEX/IPA (v/v) v různých objemových poměrech.



Obrázek 5 – Závislost rozlišení (R) uvedených analytů na procentuálním zastoupení propan-2-olu v mobilní fázi HEX/IPA (v/v).



Obrázek 6 – Závislost enantioselektivity (α) uvedených analytů na procentuálním zastoupení propan-2-olu v mobilní fázi HEX/IPA (v/v).



Obrázek 7 - Závislost faktoru symetrie (A_s) uvedených analytů na procentuálním zastoupení propan-2-olu v mobilní fázi HEX/IPA (v/v).

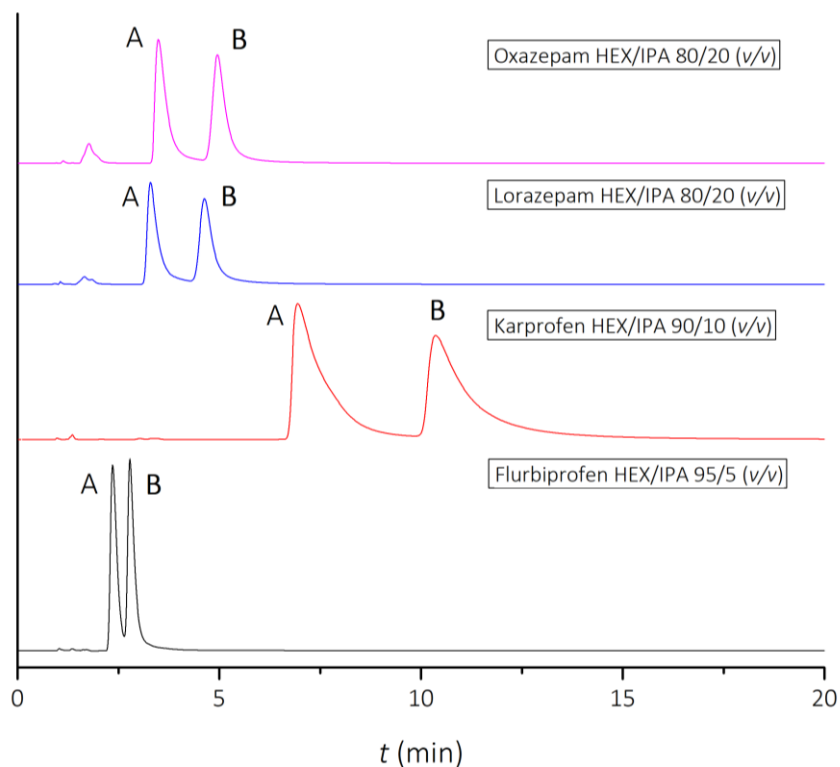
Pro rozdělení enantiomerů na základní linii je nutné dosáhnout hodnoty rozlišení 1,5. Z **Obrázku 5** (str. 33) vyplývá, že nižší zastoupení propan-2-olu v mobilní fázi neznamenalo vždy zvýšení rozlišení enantiomerů. To je dáno tím, že u některých analytů, zejména talidomidu, docházelo k výraznému rozmývání zón s rostoucí retencí. U analytů, například flurbiprofenu a lorazepamu, jejichž enantiomery eluovaly v úzkých zónách se rozlišení se snižujícím zastoupením propan-2-olu zvyšovalo.

Enantioselektivita se významně neměnila se změnou obsahu propan-2-olu v mobilní fázi, viz **Obrázek 6** (str. 33). Všechny analyty, jejichž enantiomery se dělily, měly píky málo symetrické a docházelo k výraznému chvostování. K největšímu chvostování všech uvedených analytů kromě lorazepamu docházelo při 10% obsahu propan-2-olu v mobilní fázi (**Obrázek 7**).

I když mají lorazepam a oxazepam až na jeden atom chlóru stejnou strukturu, jejich chromatografické parametry se lišily ve všech poměrech propan-2-olu kromě retence a enantioselektivity, která byla při všech poměrech IPA srovnatelná. Atom chlóru ovlivňuje elektronovou hustotu jak indukčním, tak mezomerním efektem. Indukční efekt je silnější, proto je v případě lorazepamu nižší elektronová hustota na benzenovém jádře v porovnání s oxazepamem. To je pravděpodobně důvod pro různý vývoj hodnot rozlišení a faktoru symetrie v závislosti na poměru propan-2-olu v mobilní fázi. Zajímavé je, že u kyselých profenů byly změny rozlišení a enantioselektivity podobné pro indoprofen a karprofen, i když se tyto dva analyty strukturálně liší. Indoprofen a karprofen

jako jediní zástupci ze skupiny profenů obsahují amino skupinu, což je pravděpodobně příčinou podobného chromatografického chování těchto analytů.

Chromatogramy enantioseparace vybraných analytů při použití mobilních fází bez aditiva jsou zobrazeny na **Obrázku 8**.



Obrázek 8 – Chromatogramy enantioseparace uvedených analytů v mobilních fázích HEX/IPA (v/v). A – první elující enantiomer, B – druhý elující enantiomer. Měřeno při vlnové délce 254 nm a průtoku 1,0 ml/min.

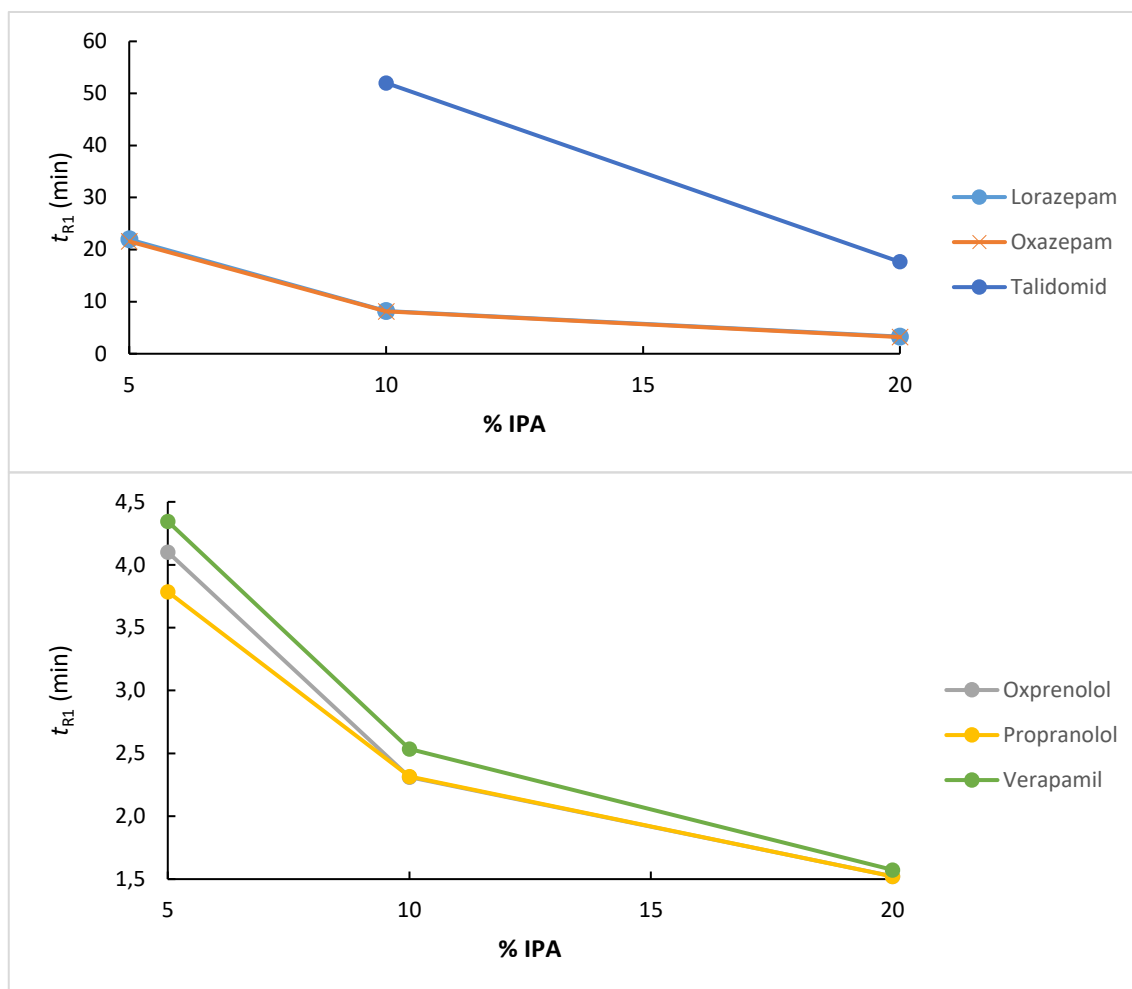
Tabulka 5 zobrazuje optimální zastoupení propan-2-olu v mobilní fázi bez aditiva a chromatografické parametry pro analyty, které se separovaly na základní linii.

Tabulka 5 – Optimální podmínky pro separaci uvedených analytů při použití mobilní fáze HEX/IPA (v/v). Rozlišení (R), retenční faktor 1. eluovaného enantiomeru (k_1) a enantioselektivita (α).

	propan-2-ol (%)	R	k_1	α
Flurbiprofen	5	1,50	1,35	1,32
Indoprofen	10	1,63	19,31	1,30
Karprofen	10	2,55	5,93	1,58
Lorazepam	20	2,67	2,29	1,59
Oxazepam	20	2,79	2,48	1,59
Talidomid	20	2,86	16,71	1,42

Doba potřebná pro enantioseparaci flurbiprofenu, lorazepamu a oxazepamu byla pod 10 min, v případě karprofenu pod 15 min. Nejdelší doba analýzy byla u indoprofenu a talidomidu, kdy trvala téměř 30 min. Faktor symetrie se pohyboval v rozmezí hodnot 4,5 – 5,0 pro karprofen, 1,5 – 3,0 pro lorazepam a oxazepam a 2,0 – 3,0 pro talidomid.

Pro zlepšení separace bazických analytů bylo do mobilní fáze přidáno bazické aditivum triethylamin (TEA). Následně byly použity mobilní fáze 80 HEX/20 IPA/0,1 TEA; 90 HEX/10 IPA/ 0,1 TEA; 95 HEX/5 IPA/0,1 TEA (v/v/v). Závislost retenčních časů vybraných analytů na množství propan-2-olu v mobilní fázi je zobrazena na **Obrázku 9** na straně 37.

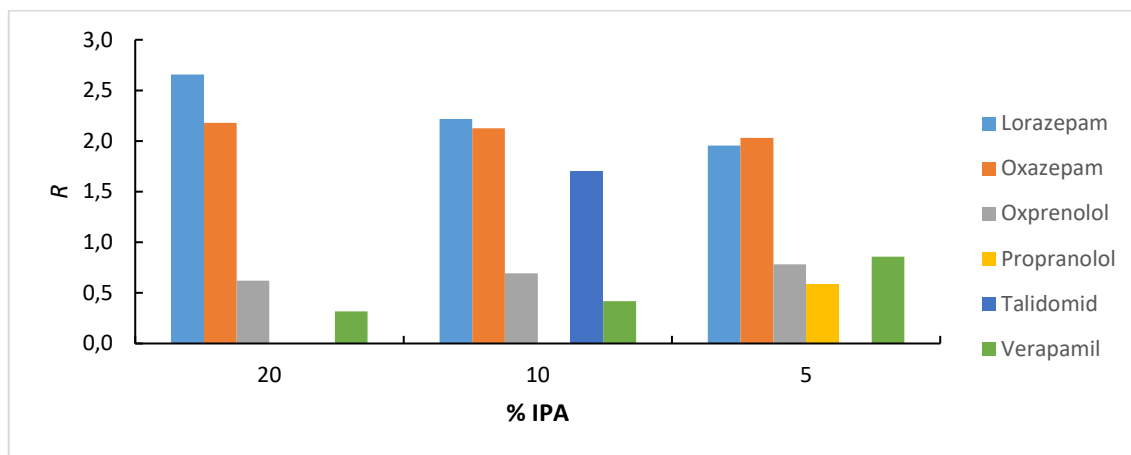


Obrázek 9 – Závislost retenčního času prvního elujícího enantiomeru (t_{R1}) uvedených analytů na procentuálním zastoupení propan-2-olu v mobilní fázi HEX/IPA/TEA (v/v/v).

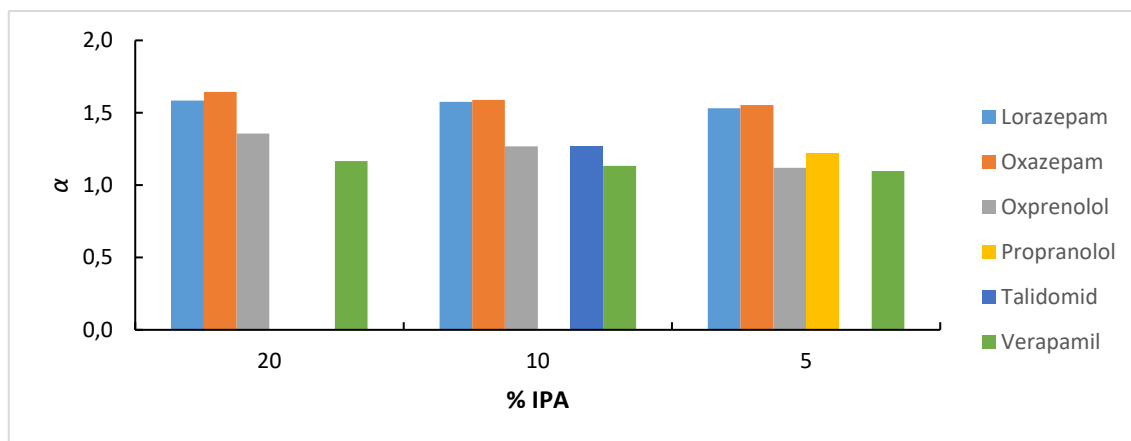
Retenční časy analytů ze stejných skupin se v mobilních fázích s triethylaminem měnily podobně. Verapamil patří do skupiny blokátorů kalciových kanálů, ale jeho retence se podobala retencím analytů ze skupiny beta-blokátorů. To je pravděpodobně způsobeno přítomností étherové a aminové funkční skupiny ve struktuře verapamilu, propranololu a oxprenololu. Retenční časy při všech poměrech HEX/IPA (v/v) v mobilních fázích bez aditiva a v mobilních fázích s triethylaminem jsou podobné pro lorazepam, oxazepam a talidomid. U oxprenololu, propranololu a verapamilu se retenční časy výrazně zkrátily ve všech poměrech IPA v mobilních fázích s triethylaminem při porovnání s mobilními fázemi bez aditiva.

Na **Obrázcích 10 – 12** (str. 38) jsou zobrazeny chromatografické parametry, rozlišení (R), enantioselektivita (α) a faktor symetrie (A_s) pro mobilní fáze HEX/IPA/TEA

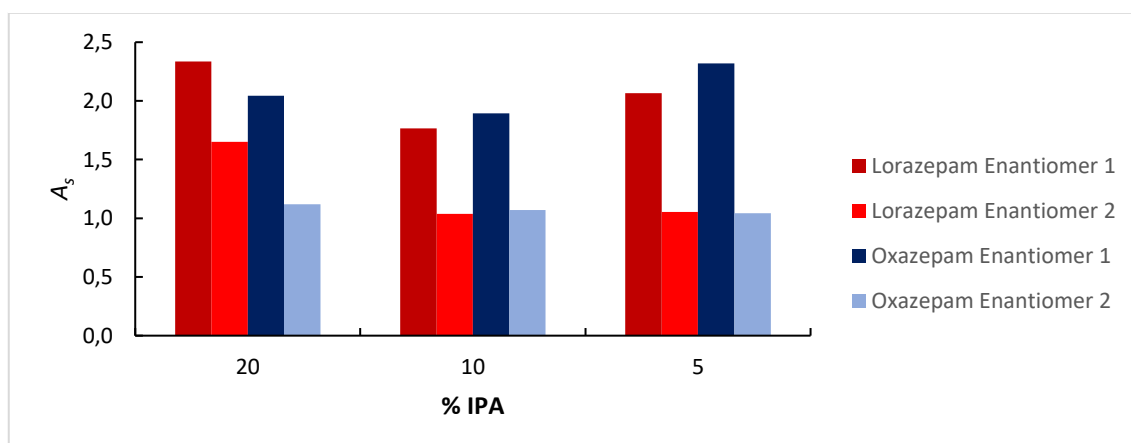
v různých objemových poměrech při konstantním množství triethylaminu 0,1 % (v/v/v).



Obrázek 10 – Závislost rozlišení (R) uvedených analytů na procentuálním zastoupení propan-2-olu v mobilní fázi HEX/IPA/TEA (v/v/v).



Obrázek 11 – Závislost enantioselektivity (α) uvedených analytů na procentuálním zastoupení propan-2-olu v mobilní fázi HEX/IPA/TEA (v/v/v).



Obrázek 12 – Závislost faktoru symetrie (A_s) uvedených analytů na procentuálním zastoupení propan-2-olu v mobilní fázi HEX/IPA/TEA (v/v/v).

V mobilních fázích HEX/IPA/TEA (v/v/v) se na základní linii rozdělilo méně analytů (**Obrázek 10**, str. 38) v porovnání s mobilními fázemi bez aditiva (**Obrázek 5**, str. 33). V mobilních fázích s triethylaminem se začaly separovat bazické analyty oxprenolol, propranolol a verapamil. U žádného z nich nedošlo k separaci na základní linii. Analyty oxazepam a talidomid vykazovaly v mobilních fázích s triethylaminem nižší rozlišení v porovnání s mobilními fázemi bez aditiva ve všech poměrech propan-2-olu. V případě lorazepamu byla hodnota rozlišení podobá pouze v mobilní fázi bez aditiva a s triethylaminem při 20 objemových % IPA. Ve všech ostatních poměrech byla hodnota rozlišení nižší v mobilních fázích s TEA. V prostředí bazického triethylaminu se přestaly separovat kyselé analyty karprofen, flurbiprofen a indoprofen, které se v mobilních fázích bez aditiva rozdělily na základní linii (**Obrázky 5 a 10**, str. 33 a 38). Tyto výsledky potvrzují pozitivní vliv bazického aditiva v mobilní fázi pro enantioseparace bazických chirálních analytů.

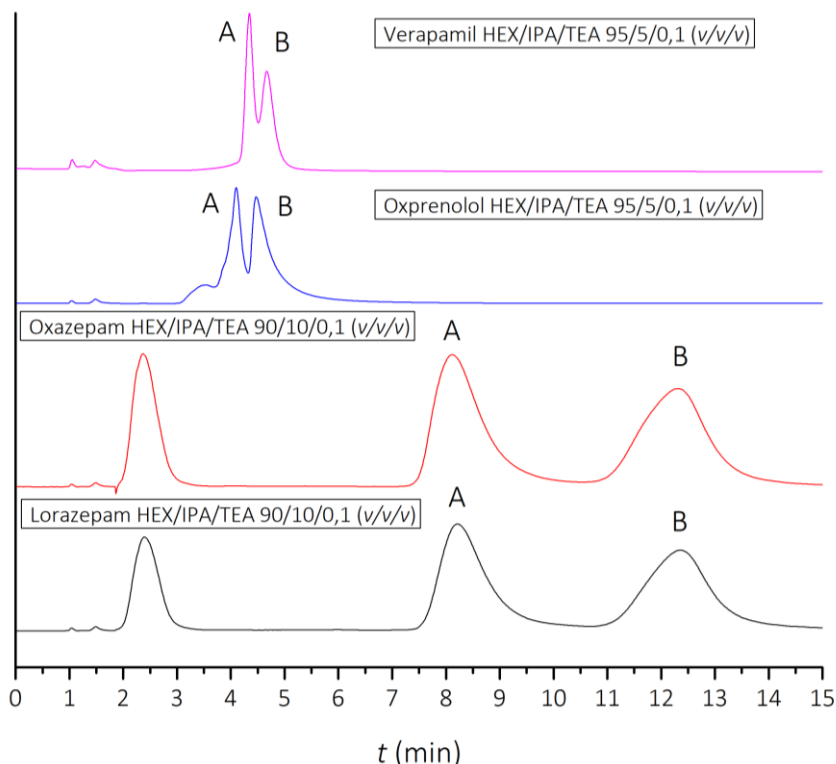
Enantioselektivita se se zvyšujícím zastoupením propan-2-olu v mobilních fázích snižovala (**Obrázek 11**, str. 38). Analyty lorazepam, oxazepam a talidomid měly v mobilních fázích bez aditiva srovnatelnou enantioselektivitu jako v mobilních fázích s triethylaminem a to při 20 a 10 objemových % IPA. Při 5 objemových % IPA byla enantioselektivita oxazepamu vyšší v mobilní fázi s triethylaminem (**Obrázky 6 a 11**, str. 33 a 38).

V mobilních fázích s triethylaminem se ve všech poměrech HEX/IPA/TEA (v/v/v) zlepšil faktor symetrie u enantiomerů lorazepamu a oxazepamu v porovnání s mobilními fázemi bez aditiva (**Obrázky 7 a 12**, str. 34 a 38). Nejlepší symetrie bylo dosaženo v mobilní fázi HEX/IPA/TEA 90/10/0,1 (v/v/v), kdy se hodnota faktoru symetrie druhého eluovaného enantiomeru blížila 1, ale první eluovaný enantiomer byl stále asymetrický.

V mobilních fázích s bazickými aditivami by se měly bazické analyty separovat lépe. Toto se potvrdilo v případě oxprenololu, propranololu a verapamilu. Tyto analyty obsahují ve své struktuře éterové a aminové funkční skupiny. Zejména éterové funkční skupiny hrají pravděpodobně důležitou roli při enantioseparaci, protože nejhůře se separoval propranolol, který má jen jednu tuto skupinu, oxprenolol má dvě a verapamil čtyři. U oxprenololu a propranololu je éterová funkční skupina vzdálená od chirálního centra pouze přes jeden atom uhlíku. U verapamilu dvě nejbližší éterové funkční skupiny od chirálního centra odděluje benzenové jádro, další dvě éterové funkční

skupiny se nacházejí na druhé straně molekuly, než je chirální centrum. Důležitost éterové skupiny pro separaci enantiomerů podporuje fakt, že alprenolol, který je strukturně podobný s oxprenololem se neseparoval. Alprenolol obsahuje v porovnání s oxprenololem o jednu éterovou funkční skupinu méně.

Chromatogramy enantioseparace vybraných analytů při použití mobilních fází s triethylaminem jsou zobrazeny na **Obrázku 13**.



Obrázek 13 – Chromatogramy enantioseparace uvedených analytů v mobilních fázích HEX/IPA/TEA (v/v/v). A – první eluující enantiomer, B – druhý eluující enantiomer. Měřeno při vlnové délce 254 nm a průtoku 1,0 ml/min.

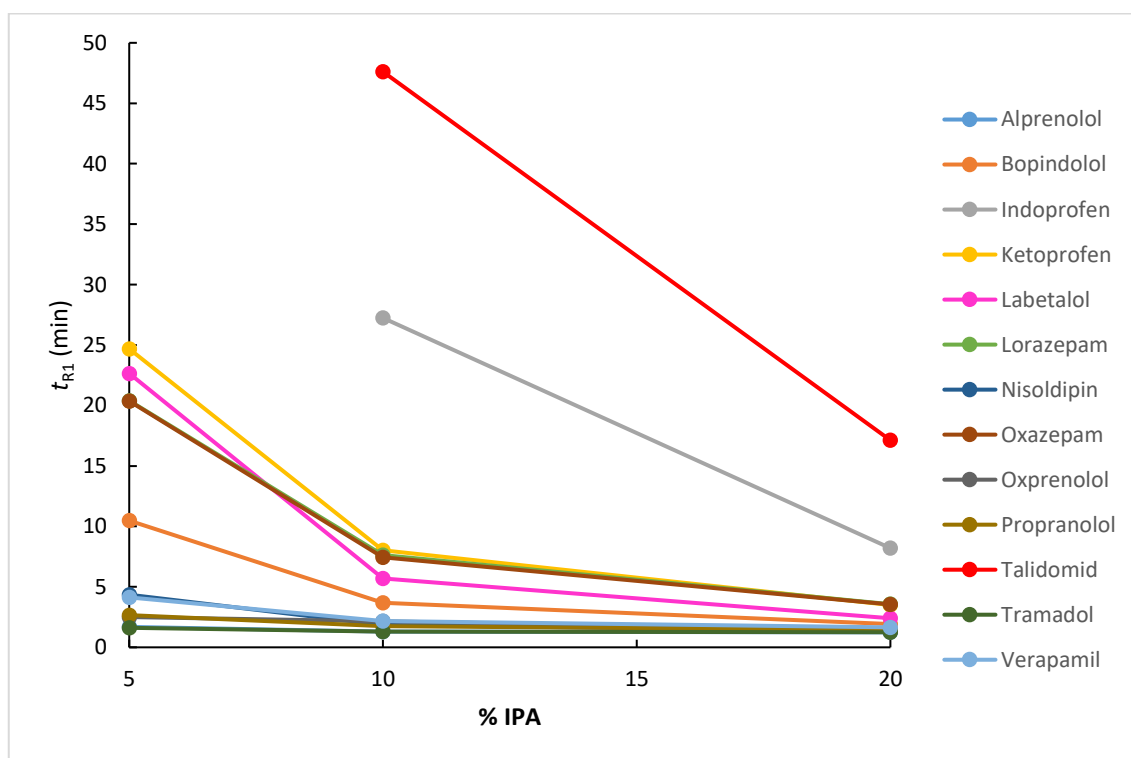
Tabulka 6 na další straně zobrazuje optimální podmínky pro separaci analytů v mobilní fázi HEX/IPA/TEA (v/v/v). V tabulce jsou dále uvedeny chromatografické parametry pro analyty, které se rozdělily na základní linii.

Tabulka 6 – Optimální podmínky separace uvedených analytů v mobilních fázích HEX/IPA/TEA (v/v/v). Rozlišení (R), retenční faktor 1. eluovaného enantiomeru (k_1) a enantioselektivita (α).

	propan-2-ol (%)	R	k_1	α
Lorazepam	10	2,13	7,20	1,58
Oxazepam	10	2,22	7,10	1,59
Talidomid	10	1,71	50,91	1,27

Hodnoty faktoru symetrie píků lorazepamu a oxazepamu byly v rozpětí 1,0 – 2,5. Po porovnání dat z **Tabulek 5** (str. 36) a **6** je zřejmé, že lepší výsledky byly dosaženy s mobilními fázemi bez aditiva, kdy byly doby analýzy kratší s vyšším rozlišením. Enantioselektivita byla srovnatelná v mobilních fázích bez aditiva a s triethylaminem. Symetrie píků byla však lepší v mobilních fázích s triethylaminem.

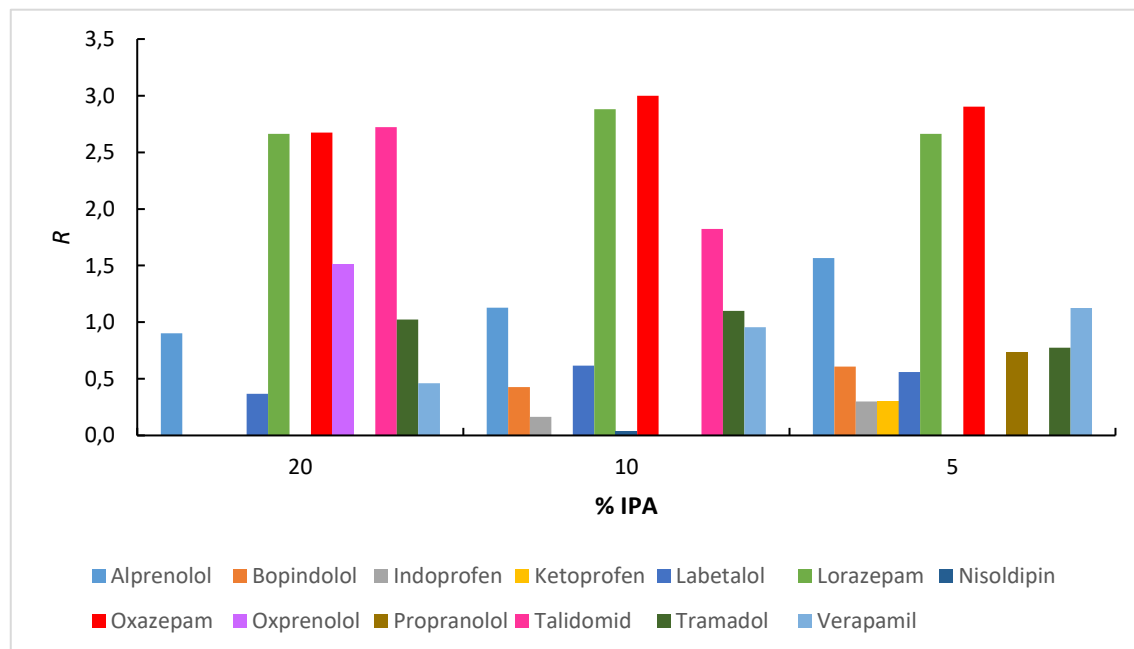
Výsledky získané v mobilních fázích s triethylaminem byly horší než v mobilních fázích bez aditiva. Proto bylo dále testováno bazické aditivum diethylamin (DEA). Následovalo použití mobilních fází 80 HEX/ 20IPA/0,1 DEA; 90 HEX/10 IPA/ 0,1 DEA; 95 HEX/5 IPA/0,1 DEA (v/v/v). **Obrázek 14** ilustruje závislost retenčních časů vybraných analytů na množství propan-2-olu v zmíněných mobilních fázích.



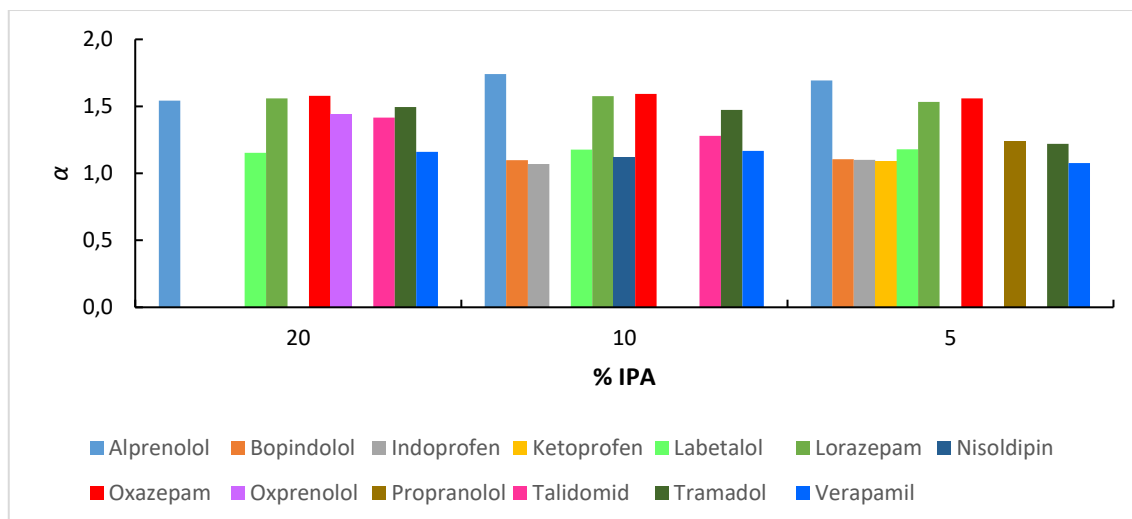
Obrázek 14 – Závislost retenčního času prvního elujícího enantiomeru (t_{R1}) uvedených analytů na procentuálním zastoupení propan-2-olu v mobilní fázi HEX/IPA/0,1 % DEA (v/v/v).

Retenční časy lorazepamu a oxazepamu byly srovnatelné v mobilních fázích bez aditiva, s triethylaminem i s diethylaminem pro jednotlivé poměry propan-2-olu v mobilní fázi. Talidomid má v mobilní fázi s diethylaminem při obsahu 20 % IPA (*v/v*) nižší retenční čas než v mobilních fázích bez aditiva a s triethylaminem. Indoprofen vykazuje výrazně vyšší retenční čas než ketoprofen. Oba tyto analyty mají karbonylovou funkční skupinu, indoprofen má také aminovou funkční skupinu, což pravděpodobně způsobuje delší retenci. U analytů ze skupiny beta-blokátorů měl pouze labetalol výrazně odlišné retenční časy, a to zejména v 10 a 5 objemových % propan-2-olu. Labetalol se od ostatních beta-blokátorů liší přítomností amidové funkční skupiny, která pravděpodobně způsobuje výrazný nárůst retenčních časů při nižším zastoupení propan-2-olu v mobilní fázi. Nisoldipin a verapamil ze skupiny blokátorů kalciových kanálů měly podobné retence ve všech poměrech IPA, a to i přesto, že se strukturně liší.

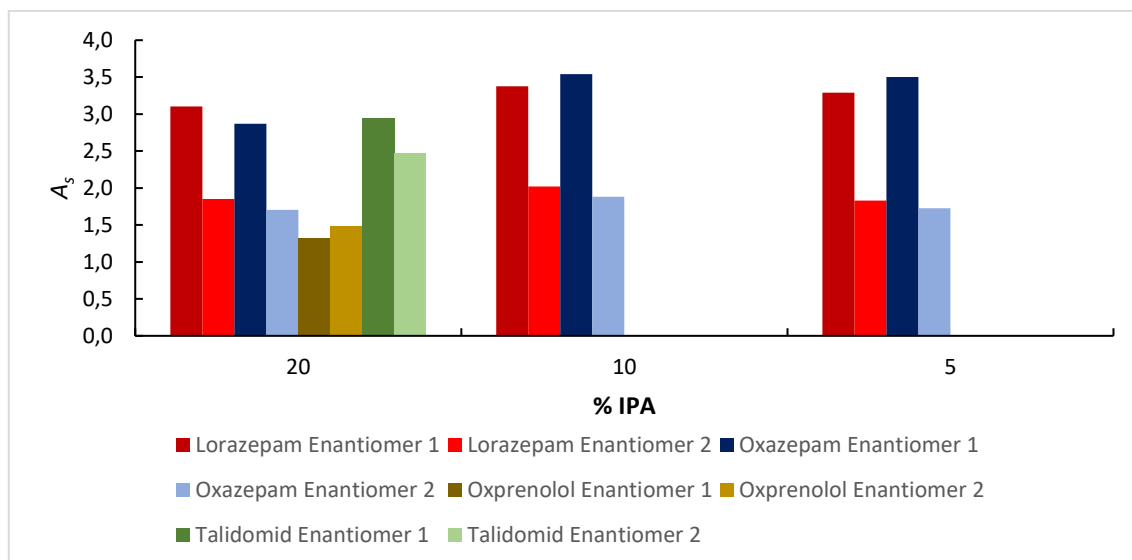
Obrázky 15 – 17 (str. 42 a 43) zobrazují chromatografické parametry, rozlišení, enantioselektivitu a faktor symetrie získané v mobilních fázích HEX/IPA/DEA (*v/v/v*) v různých objemových poměrech HEX/IPA (*v/v*) při konstantním množství diethylaminu 0,1 objemových %.



Obrázek 15 – Závislost rozlišení (*R*) uvedených analytů na procentuálním zastoupení propan-2-olu v mobilní fázi HEX/IPA/DEA (*v/v/v*).



Obrázek 16 – Závislost enantioselektivity (α) uvedených analytů na procentuálním zastoupení propan-2-olu v mobilní fázi HEX/IPA/DEA (v/v/v).



Obrázek 17 – Závislost faktoru symetrie (A_s) uvedených analytů na procentuálním zastoupení propan-2-olu v mobilní fázi HEX/IPA/DEA (v/v/v).

V mobilních fázích HEX/IPA/DEA (v/v/v) se začalo separovat více analytů v porovnání s mobilními fázemi bez aditiva a s TEA. Na základní linii se rozdělilo pět z nich (**Obrázek 15**, str. 42). Oproti mobilním fázím s triethylaminem se na základní linii rozdělily bazické analyty alprenolol a oxprenolol. Diethylamin je sekundární amin a kvůli indukčnímu efektu má na atomu dusíku nižší elektronovou hustotu než triethylamin, který je terciální amin. Atom dusíku diethylaminu je pravděpodobně stericky přístupnější, proto

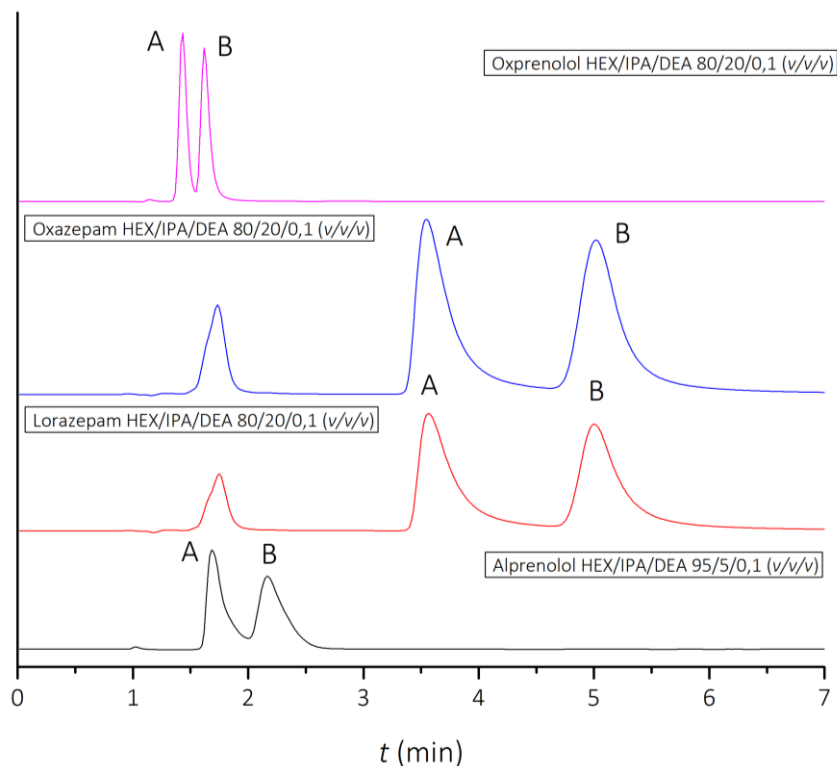
lépe interaguje s chirálními centry analytů a díky tomu jsou enantioselektivní interakce se stacionární fází silnější. Analyty, které se separovaly v mobilních fázích s triethylaminem dosáhly v mobilních fázích s diethylaminem vyšší hodnoty rozlišení ve všech poměrech propan-2-olu v mobilní fázi (**Obrázky 10 a 15**, str. 38 a 42). V porovnání s mobilními fázemi bez aditiva se v mobilních fázích s diethylaminem přestaly separovat kyselé analyty kromě indoprofenu a ketoprofenu. Žádný z kyselých analytů se neseparoval na základní linii. Pro enantiomery lorazepamu, oxazepamu a talidomidu bylo v mobilních fázích bez aditiva dosaženo vyššího rozlišení ve všech poměrech propan-2-olu kromě 10 % IPA (v/v), kdy bylo rozlišení oxazepamu vyšší v mobilní fázi s diethylaminem (**Obrázek 5**, str. 33).

Enantioselektivita se v mobilních fázích s diethylaminem u většiny analytů výrazně neměnila ve všech poměrech IPA, kromě talidomidu, tramadolu a verapamilu, kdy se zvyšujícím se obsahem propan-2-olu v mobilní fázi klesala. Enantioselektivita získaná v mobilních fázích s triethylaminem byla pro analyty lorazepam, propranolol, talidomid a verapamil srovnatelná ve všech poměrech při porovnání s mobilními fázemi s diethylaminem. Podobná enantioselektivita byla dosažena v mobilní fázi bez aditiva a s diethylaminem v 20 % a 10 % IPA pro analyty lorazepam, oxazepam a talidomid.

Symetrie píků byla v mobilních fázích s diethylaminem horší ve všech poměrech propan-2-olu pro píky lorazepamu a oxazepamu a srovnatelná pro talidomid v 20 % IPA (v/v) v porovnání s mobilní fází bez aditiva. Symetrie píků lorazepamu a oxazepamu v mobilních fázích s diethylaminem je výrazně horší než v mobilních fázích s triethylaminem a to ve všech poměrech propan-2-olu v mobilní fázi.

Při použití mobilních fází s diethylaminem se separovalo více bazických analytů než v mobilních fázích s triethylaminem a v mobilních fázích bez aditiva. Všechny bazické analyty dosáhly v mobilních fázích s DEA ve všech poměrech IPA vyšších hodnot rozlišení než v mobilních fázích s TEA nebo bez použití aditiva. Pouze lorazepam a oxazepam dosáhly vyššího rozlišení v mobilní fázi bez aditiva než při použití bazických aditiv, a to ve všech poměrech propan-2-olu kromě 10 % IPA (v/v), kdy bylo rozlišení vyšší v mobilní fázi s DEA.

Chromatogramy enantioseparace vybraných analytů při použití mobilních fází s diethylaminem jsou zobrazeny na **Obrázku 18**.



Obrázek 18 – Chromatogramy enantioseparace uvedených analytů v mobilních fázích HEX/IPA/DEA (v/v/v). A – první elující enantiomer, B – druhý elující enantiomer. Měřeno při vlnové délce 254 nm a průtoku 1,0 ml/min.

Optimální podmínky separace a chromatografické parametry analytů, které se separovaly na základní linii v mobilních fázích HEX/IPA/DEA (v/v/v) jsou uvedeny v **Tabulce 7**.

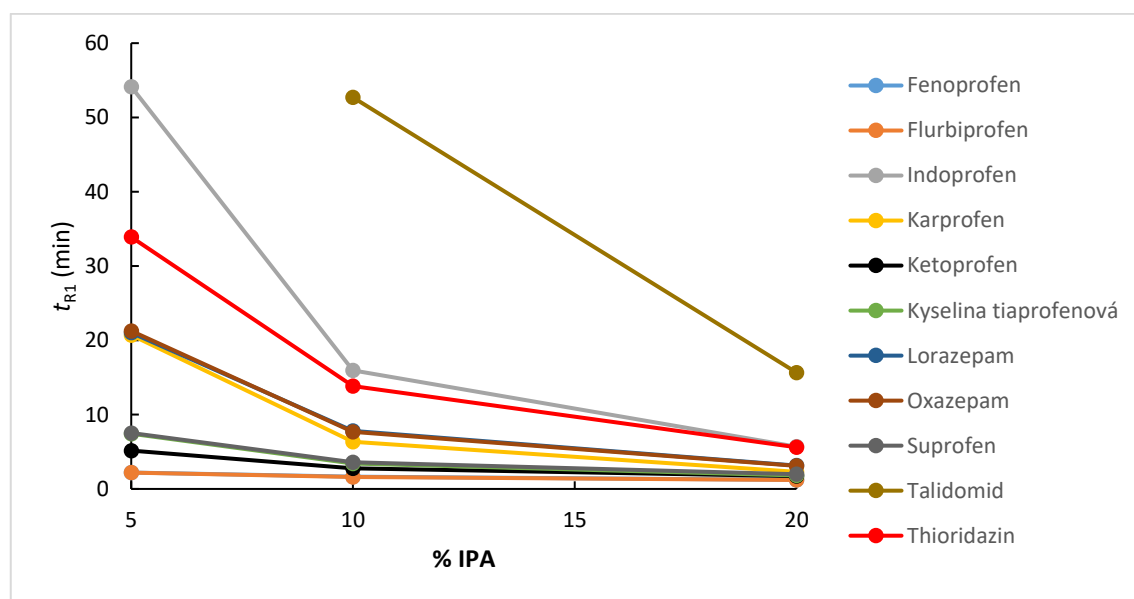
Tabulka 7 – Optimální podmínky pro separaci uvedených analytů při použití mobilní fáze HEX/IPA/DEA (v/v/v). Rozlišení (R), retenční faktor 1. eluovaného enantiomeru (k_1) a enantioselektivita (α).

	Propan-2-ol (%)	R	k_1	α
Alprenolol	5	1,57	0,69	1,54
Lorazepam	20	2,66	2,57	1,56
Oxazepam	20	2,68	2,55	1,58
Oxprenolol	20	1,51	0,43	1,44
Talidomid	20	2,72	16,13	1,42

Hodnoty faktoru symetrie píků byly při optimálních podmínkách v rozpětí

1,5 – 3,5 pro lorazepam, 1,5 – 3,0 pro oxazepam, 1,0 – 1,5 pro oxprenolol a 2,0 – 3,0 pro talidomid. V mobilních fázích s diethylaminem byly doby analýz všech analytů kratší než v mobilních fázích s triethylaminem. Za těchto podmínek bylo také dosaženo vyššího rozlišení a lepší symetrie píků (**Tabulky 6 a 7**, str. 41 a 45). Výsledky získané v mobilních fázích bez aditiva a s diethylaminem jsou srovnatelné, také symetrie píků je shodná pro oxazepam. Pro lorazepam byly získány lepší výsledky v mobilní fázi bez aditiva (**Tabulky 5 a 7**, str. 36 a 45).

Pro zlepšení separace kyselých analytů byla použita kyselina trifluoroctová (TFA) jako aditivum v mobilních fázích. Další použité mobilní fáze byly 80 HEX/20 IPA/0,1 TFA; 90 HEX/ 10 IPA/0,1 TFA; 95 HEX/5 IPA/0,1 TFA (v/v/v). Závislost retenčních časů vybraných analytů na obsahu propan-2-olu v těchto mobilních fázích zobrazuje **Obrázek 19**.

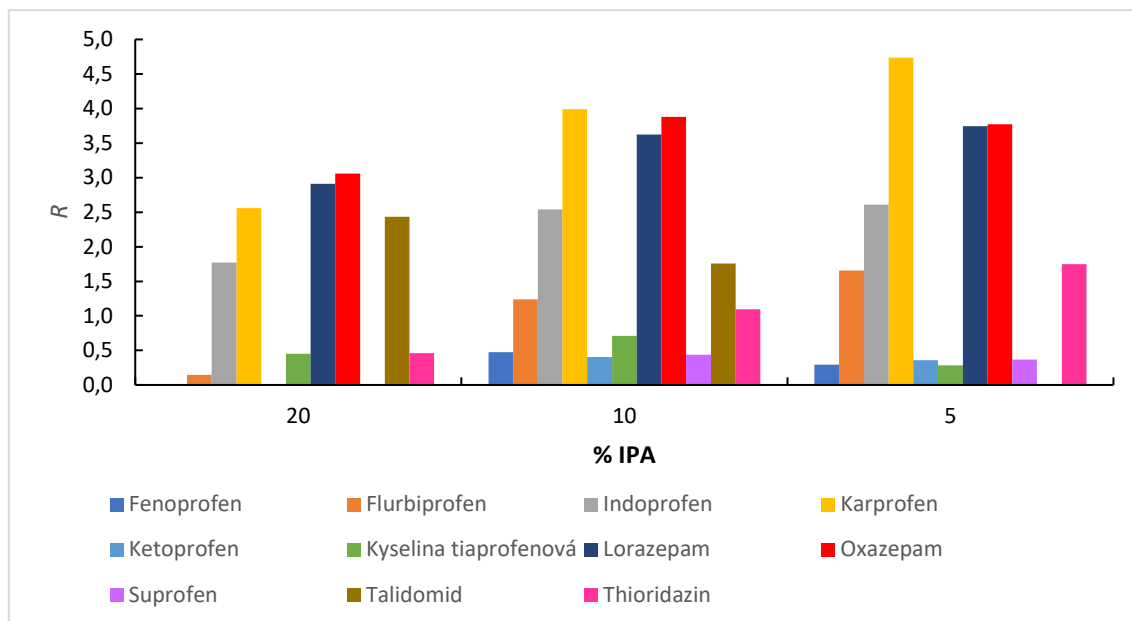


Obrázek 19 – Závislost retenčního času prvního eluujícího enantiomeru (t_{R1}) uvedených analytů na procentuálním zastoupení propan-2-olu v mobilní fázi HEX/IPA/TFA (v/v/v).

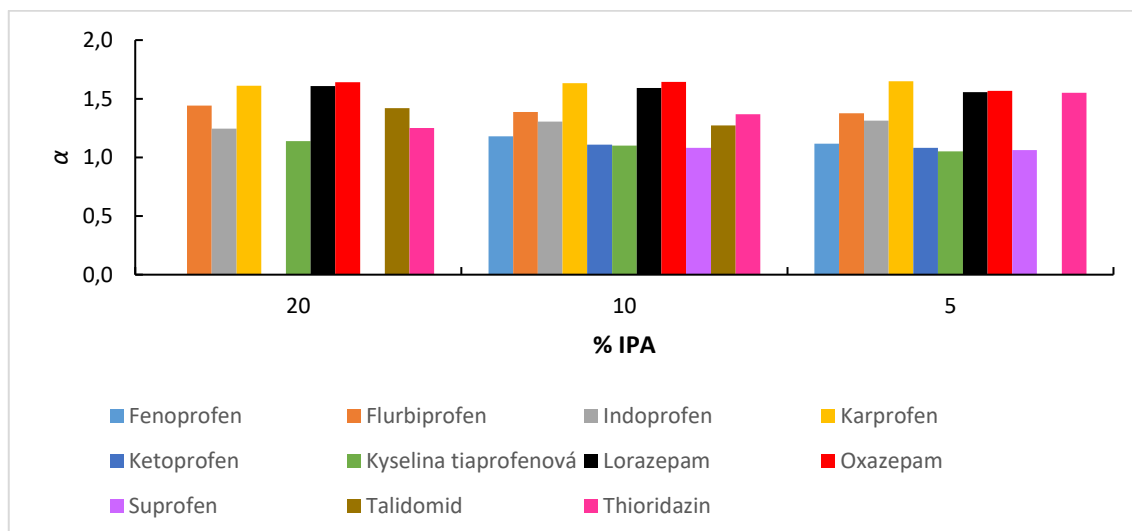
Retenční časy lorazepamu, oxazepamu a talidomidu byly nejnižší v mobilních fázích s kyselinou trifluoroctovou při 5% zastoupení propan-2-olu v mobilní fázi při porovnání s mobilními fázemi s diethylaminem, triethylaminem a bez aditiva. U všech kyselých analytů ze skupiny profenů byly retenční časy nižší v mobilních fázích s kyselým aditivem, a to ve všech poměrech propan-2-olu, při porovnání s mobilními

fázemi bez aditiva.

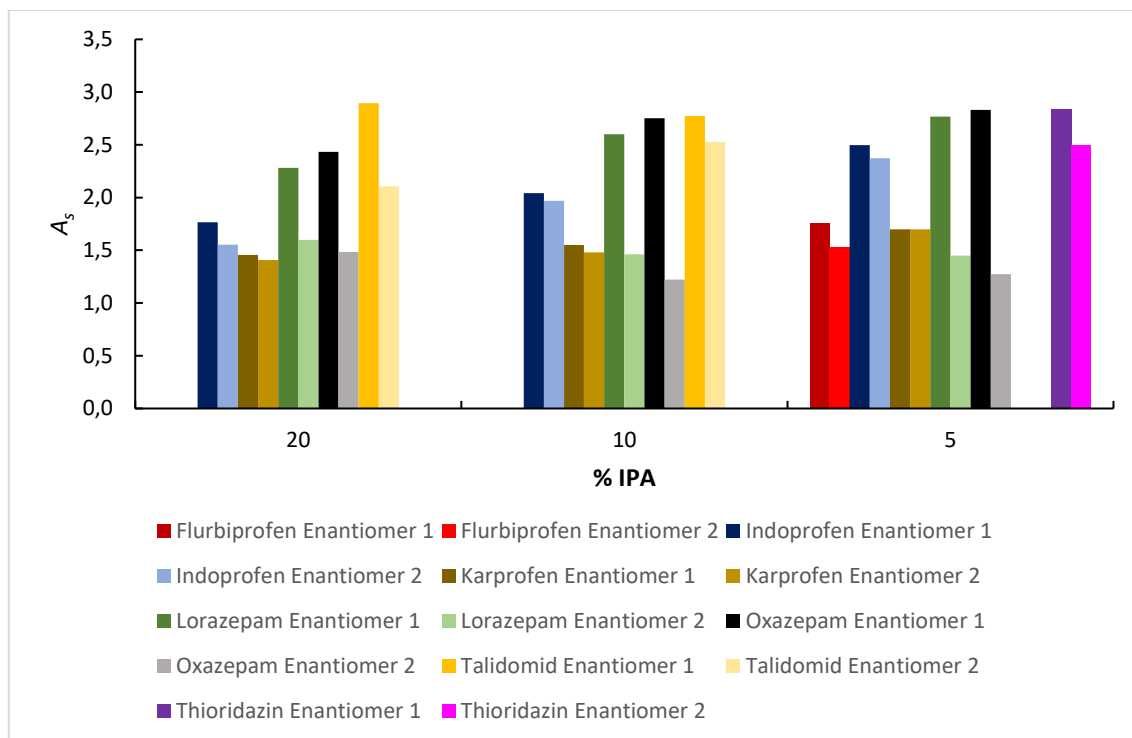
Na **Obrázcích 20 – 22** (str. 47 a 48) jsou zobrazeny chromatografické parametry, rozlišení (R), enantioselektivita (α) a faktor symetrie (A_s) pro mobilní fáze HEX/IPA/TFA ($v/v/v$).



Obrázek 20 – Závislost rozlišení (R) uvedených analytů na procentuálním zastoupení propan-2-olu v mobilní fázi HEX/IPA/TFA ($v/v/v$).



Obrázek 21 – Závislost enantioselektivity (α) uvedených analytů na procentuálním zastoupení propan-2-olu v mobilní fázi HEX/IPA/TFA ($v/v/v$).



Obrázek 22 – Závislost faktoru symetrie (A_s) uvedených analytů na procentuálním zastoupení propan-2-olu v mobilní fázi HEX/IPA/TFA (v/v/v).

V mobilních fázích s kyselinou trifluoroctovou se výrazně zlepšila separace kyselých analytů. Ze skupiny profenů se v těchto mobilních fázích separovaly na základní linii enantiomery karprofenu, flurbiprofenu a indoprofenu (**Obrázek 20**, str. 47). Většina bazických analytů se přestala separovat. Všechny kyselé analyty, které se dělily i v mobilních fázích bez aditiva dosáhly při použití TFA jako aditiva lepšího rozlišení ve všech poměrech propan-2-olu v mobilní fázi kromě flurbiprofenu v 20 objemových % propan-2-olu (**Obrázky 5 a 20**, str. 33 a 47). Lorazepam a talidomid dosáhly vyššího rozlišení v mobilních fázích bez aditiva ve všech poměrech IPA. Naproti tomu oxazepam dosáhl vyššího rozlišení v mobilních fázích s kyselinou trifluoroctovou, a to ve všech poměrech propan-2-olu.

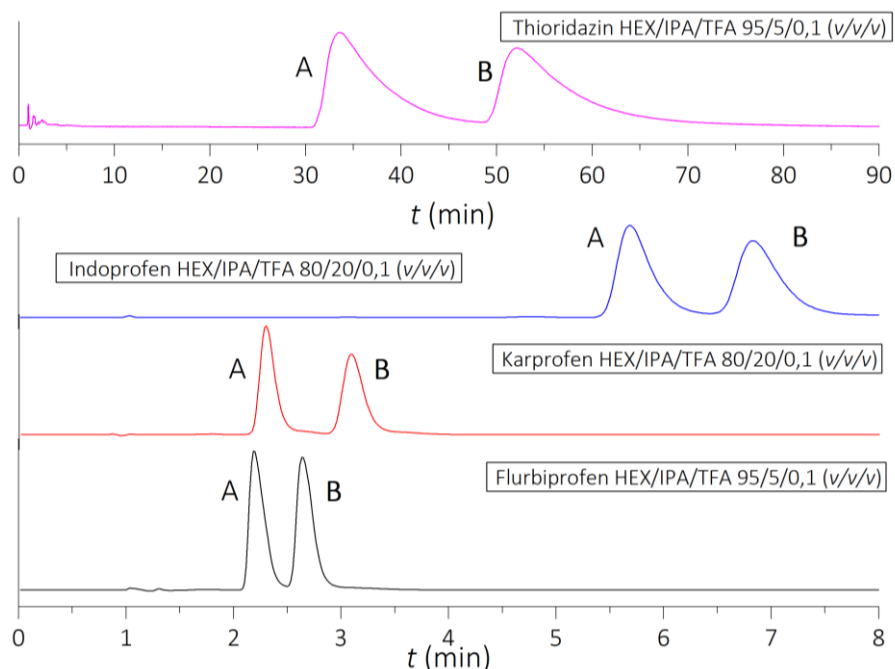
U většiny analytů nebyla hodnota enantioselektivity výrazně ovlivněna množstvím propan-2-olu v mobilní fázi (**Obrázek 21**, str. 47). U indoprofenu a thioridazinu se enantioselektivita zvyšovala s rostoucím zastoupením propan-2-olu v mobilní fázi, naproti tomu u kyseliny tiaprofenové se snižovala. Enantioselektivita kyselých analytů ze skupiny profenů byla vyšší v mobilních fázích s kyselinou

trifluoroctovou než v mobilních fázích bez aditiva ve všech poměrech IPA (**Obrázky 6 a 21**, str. 33 a 47). Vyšší enantioselektivitu vykazoval v mobilních fázích s TFA v porovnání s mobilními fázemi bez aditiva také oxazepam ve všech poměrech IPA. Lorazepam vykazoval vyšší enantioselektivitu v mobilních fázích s TFA pouze při 5% zastoupení propan-2-olu.

Symetrie píků všech analytů se snižovala se zvyšujícím se zastoupením IPA v mobilní fázi (**Obrázek 22**, str. 48). U enantiomerů karprofenu, lorazepamu, oxazepamu a talidomidu se faktor symetrie zlepšil v mobilních fázích s TFA oproti mobilním fázím bez aditiva ve všech poměrech propan-2-olu (**Obrázky 7 a 22**, str. 34 a 48).

Podle předpokladů byly pro kyselé analyty dosaženy lepší chromatografické parametry v mobilních fázích s kyselým aditivem než v těch bez aditiva. Při použití TFA jako aditiva se separovala většina analytů ze skupiny profenů. V těchto mobilních fázích se také začal separovat bazický thioridazin. Možnou příčinou je přítomnost atomů síry v jeho struktuře.

Chromatogramy enantioseparace vybraných analytů při použití mobilních fází s kyselinou trifluoroctovou jsou zobrazeny na **Obrázku 23**.



Obrázek 23 – Chromatogramy enantioseparace uvedených analytů v mobilních fázích HEX/IPA/TFA (v/v/v). A – první elující enantiomer, B – druhý elující enantiomer. Měřeno při vlnové délce 254 nm a průtoku 1,0 ml/min.

Optimální podmínky separace a chromatografické parametry analytů, které se separovaly na základní linii v mobilní fázi HEX/IPA/TFA (v/v/v) jsou uvedeny v **Tabulce 8**.

Tabulka 8 – Optimální podmínky separace uvedených analytů při použití mobilní fáze HEX/IPA/TFA (v/v/v). Rozlišení (R), retenční faktor 1. eluovaného enantiomeru (k_1) a enantioselektivita (α).

	Propan-2-ol (%)	R	k_1	α
Flurbiprofen	5	1,65	1,19	1,38
Indoprofen	20	1,77	4,68	1,24
Karprofen	20	2,56	1,30	1,61
Lorazepam	20	2,91	2,14	1,61
Oxazepam	20	3,06	2,10	1,64
Talidomid	20	2,43	14,64	1,42
Thioridazin	5	1,75	32,84	1,55

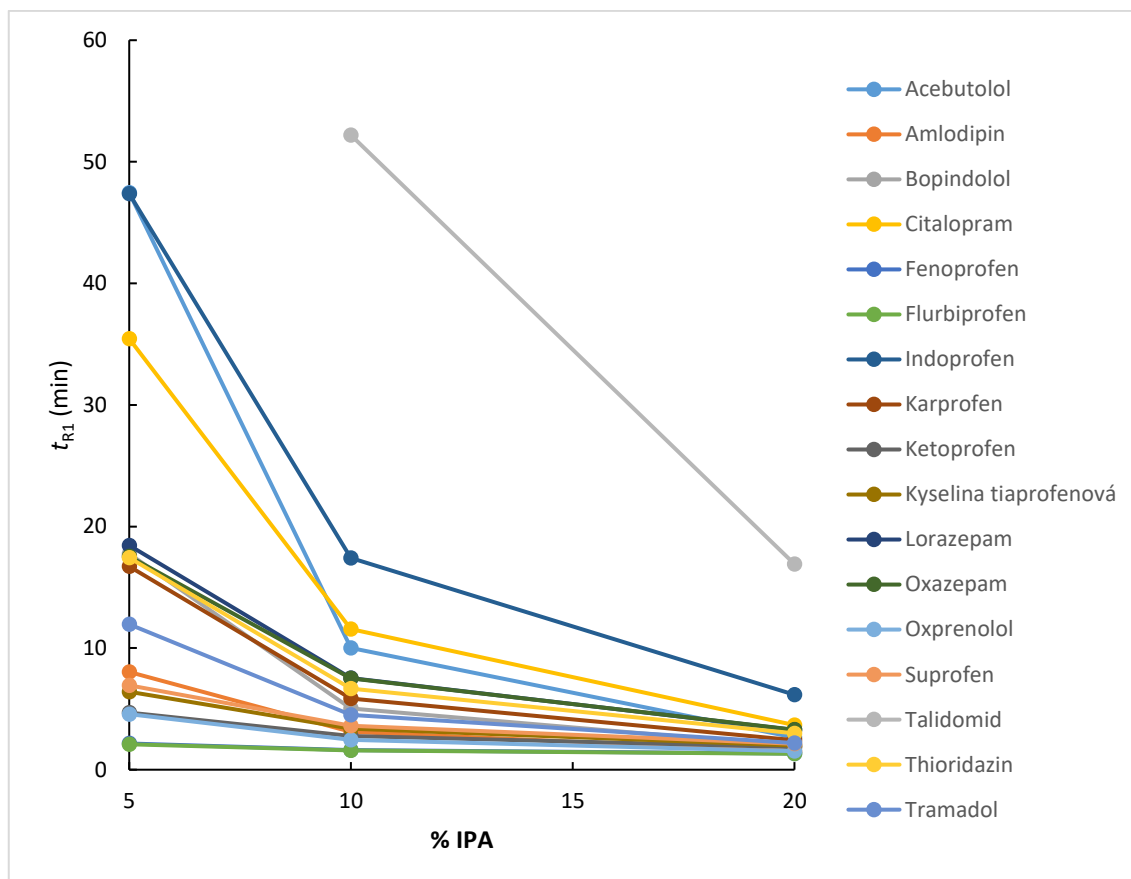
Nejlepší symetrii píků při optimálním poměru propan-2-olu v mobilních fázích měl karprofen s hodnotou v rozmezí 1,0 – 1,5; následovaly flurbiprofen a indoprofen 1,5 – 2,0; oxazepam 1,0 – 2,5; lorazepam 1,5 – 2,5. Nejhorší symetrii píků vykazovaly talidomid a thioridazin (2,0 – 3,0).

Rychlost analýzy kyselých analytů byla vyšší v mobilních fázích s kyselinou trifluoroctovou než v těch bez aditiva (**Tabulky 5 a 8**, str. 33 a 50). Retence se výrazně snížila zejména u indoprofenu a karprofenu. Retenční časy lorazepamu, oxazepamu a talidomidu byly také nižší v mobilních fázích s kyselinou trifluoroctovou než v mobilních fázích bez aditiva.

Nejlepší výsledky z kyselých analytů byly získány pro karprofen, který při optimálních podmínkách dosáhl nejvyššího rozlišení, enantioselektivity a nejsymetričtějších píků. Karprofen se liší od ostatních analytů ze skupiny profenů přítomností atomu chlóru ve struktuře.

Následně bylo použito směsné aditivum diethylamin a kyselina trifluoroctová. Diethylamin byl zvolen kvůli tomu, že při jeho použití byly získány lepší výsledky než v případě triethylaminu. Použité mobilní fáze byly 80 HEX/20 IPA/0,1 DEA/0,1 TFA; 90 HEX/ 10 IPA/0,1 DEA/0,1 TFA a 95 HEX/5 IPA/0,1 DEA/0,1 TFA (v/v/v/v). Mobilní

fáze se směsným aditivem by měly být univerzálnější a zajistit lepší separační podmínky pro širší spektrum analytů. Závislost retenčních časů separovaných analytů na poměru propan-2-olu v mobilních fázích se směsným aditivem je zobrazena na **Obrázku 24**.

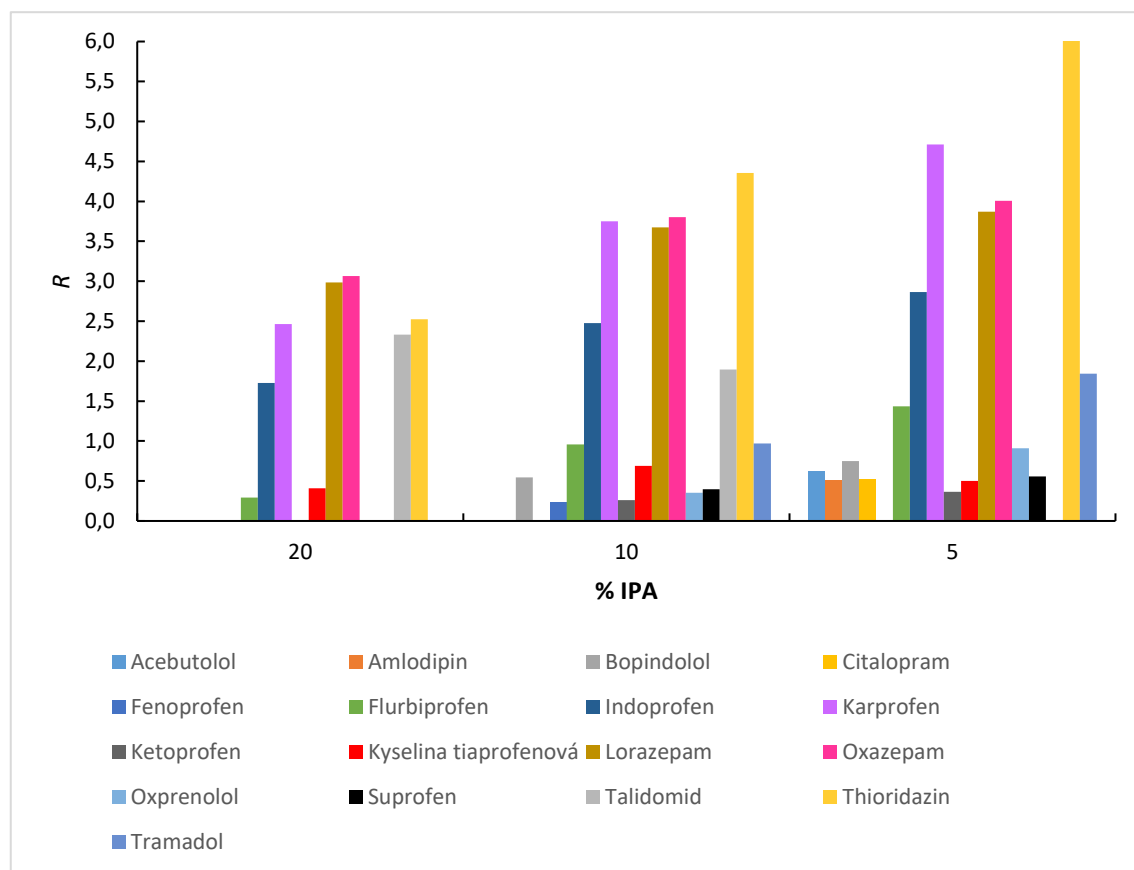


Obrázek 24 – Závislost retenčního času prvního eluujícího enantiomeru (t_{R1}) uvedených analytů na procentuálním zastoupení propan-2-olu v mobilní fázi HEX/IPA/DEA/TFA (v/v/v/v).

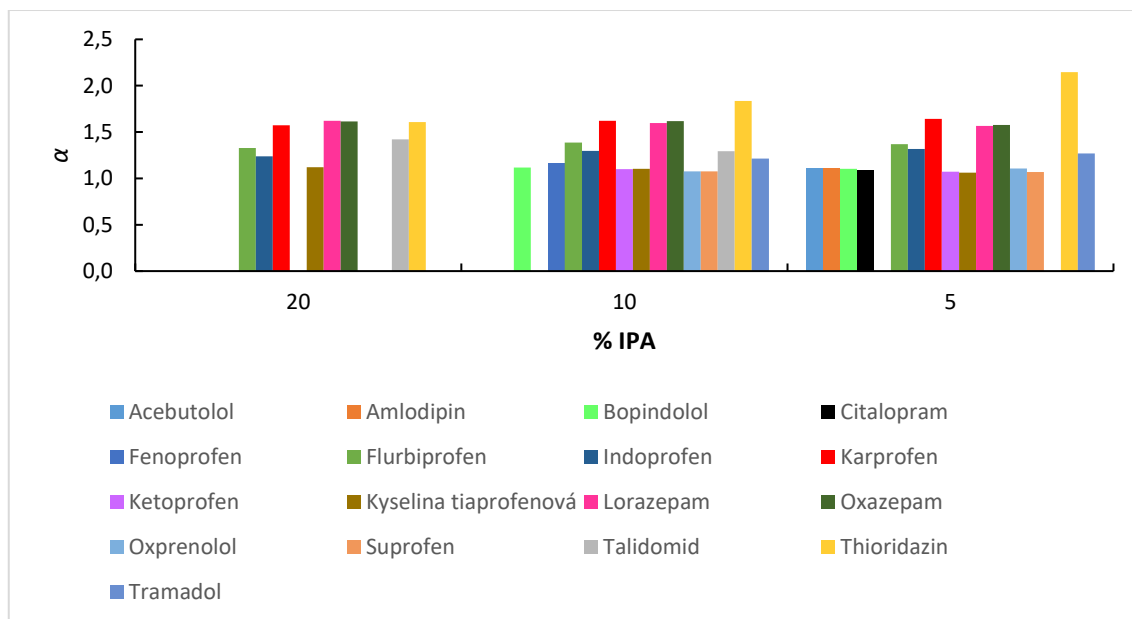
Při použití směsného aditiva se separovalo 17 analytů, 8 z nich se separovalo na základní linii. Toto aditivum bylo nejvariabilnější a poskytlo vhodné separační podmínky pro nejvíce typů analytů. Analyty, které se začaly separovat až při použití směsného aditiva byly všechny bazické. Z kyselých analytů se separovaly pouze ty, které se separovaly už při použití předchozích aditiv, zejména kyselého. Většina kyselých analytů měla při 20% zastoupení propan-2-olu nižší retenci v mobilní fázi s TFA, ale s postupným snižováním množství IPA v mobilní fázi stále více analytů eluovalo rychleji v mobilních fázích se směsným aditivem. Podobně se vyvíjely i retenční časy lorazepamu, oxazepamu a talidomidu. Retenční časy těchto tří analytů byly nižší v mobilních fázích se směsným

aditivem v porovnání s mobilními fázemi s triethylaminem, diethylaminem a bez aditiva ve všech poměrech IPA. Bazický thioridazin měl vyšší retenční časy v mobilních fázích s kyselým aditivem ve všech poměrech propan-2-olu v porovnání s mobilními fázemi se směsným aditivem. Bazické analyty bopindolol a oxprenolol ze skupiny beta-blokátorů a tramadol měly nižší retenci v mobilních fázích s diethylaminem ve všech poměrech propan-2-olu než při použití mobilních fází se směsným aditivem.

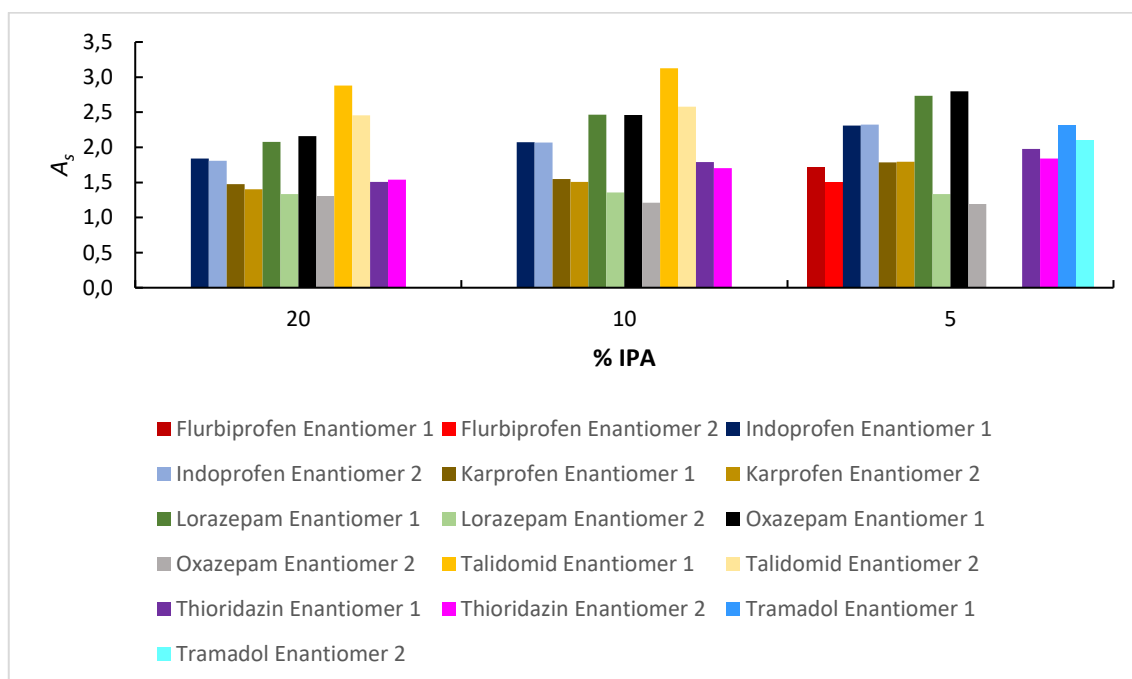
Obrázky 25 – 27 (str. 52 a 53) zobrazují chromatografické parametry, rozlišení (R), enantioselektivitu (α) a faktor symetrie (A_s) pro mobilní fázi HEX/IPA/DEA/TFA ($v/v/v/v$).



Obrázek 25 – Závislost rozlišení (R) uvedených analytů na procentuálním zastoupení propan-2-olu v mobilní fázi HEX/IPA/DEA/TFA ($v/v/v/v$).



Obrázek 26 – Závislost enantioselektivity (α) uvedených analytů na procentuálním zastoupení propan-2-olu v mobilní fázi HEX/IPA/DEA/TFA (v/v/v/v).



Obrázek 27 – Závislost faktoru symetrie (A_s) uvedených analytů na procentuálním zastoupení propan-2-olu v mobilní fázi HEX/IPA/DEA/TFA (v/v/v/v).

Rozlišení analytů rostlo se snižujícím se množstvím propan-2-olu v mobilní fázi s výjimkou talidomidu (**Obrázek 25**, str. 52). Nejvýrazněji rostlo rozlišení se změnou poměru hexanu a propan-2-olu u thioridazinu. Tramadol se částečně separoval už při

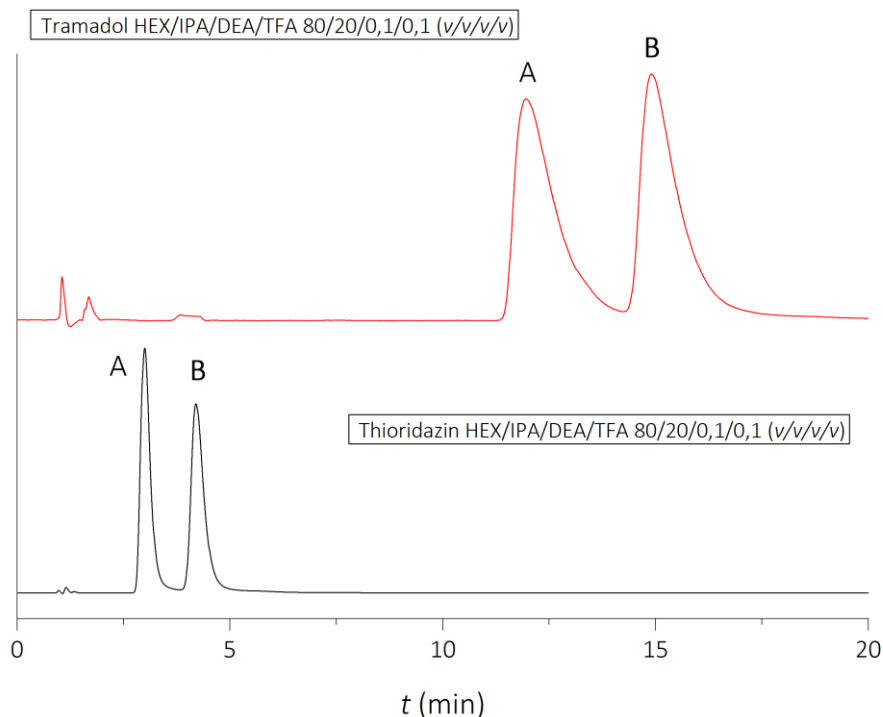
použití mobilních fází s diethylaminem. Na základní linii se rozdělil až v mobilních fázích se směsným aditivem.

Enantioselektivita většiny analytů se výrazně neměnila při změně obsahu propan-2-olu v mobilní fázi. U thioridazinu výrazně rostla s rostoucím obsahem propan-2-olu v mobilní fázi a u talidomidu klesala (**Obrázek 26**, str. 53). Enantioselektivita kyselých analytů byla srovnatelná v mobilních fázích se směsným a kyselým aditivem ve všech poměrech propan-2-olu. U lorazepamu a oxazepamu byla enantioselektivita vyšší v mobilních fázích se směsným aditivem než s triethylaminem, diethylaminem a bez aditiva, ale srovnatelná s mobilními fázemi s kyselým aditivem, a to ve všech poměrech IPA. Enantioselektivita talidomidu se neměnila při použití jiných aditiv nebo poměrů propan-2-olu a je srovnatelná ve všech poměrech propan-2-olu ve všech použitých mobilních fázích. V případě thioridazinu byla enantioselektivita výrazně vyšší při použití směsného aditiva než kyselého, a to ve všech poměrech IPA.

Symetrie píků všech analytů se zhoršovala se snižujícím se obsahem propan-2-olu v mobilní fázi. Příčinou horší symetrie bylo zvyšování retence a rozmývání zón. Symetrie píků talidomidu byla vyšší při použití kyselého aditiva než směsného ve všech poměrech propan-2-olu. Symetrie píků oxazepamu byla nejlepší v mobilních fázích s triethylaminem ve všech poměrech IPA. Rozdíly v symetrii píků kyselých profenů ve stejných poměrech IPA byly při použití směsného a kyselého aditiva nevýznamné.

V mobilních fázích se směsným aditivem se na základní linii separovalo nejvíce analytů. Enantiomery thioridazinu a tramadolu byly lépe rozlišeny při použití směsného aditiva. Tramadol byl jediný analyt, který se separoval na základní linii pouze při použití směsného aditiva, a ne v předchozích mobilních fázích. Všechny ostatní analyty, které se rozdělily na základní linii se separovaly dříve v přítomnosti samotného aditiva nebo bez použití aditiva.

Chromatogramy enantioseparace vybraných analytů při použití mobilní fáze se směsným aditivem jsou zobrazeny na **Obrázku 28** (str. 55).



Obrázek 28 – Chromatogramy enantioseparace uvedených analytů v mobilní fázi HEX/IPA/DEA/TFA (v/v/v/v). A – první eluující enantiomer, B – druhý eluující enantiomer. Měřeno při vlnové délce 254 nm a průtoku 1,0 ml/min.

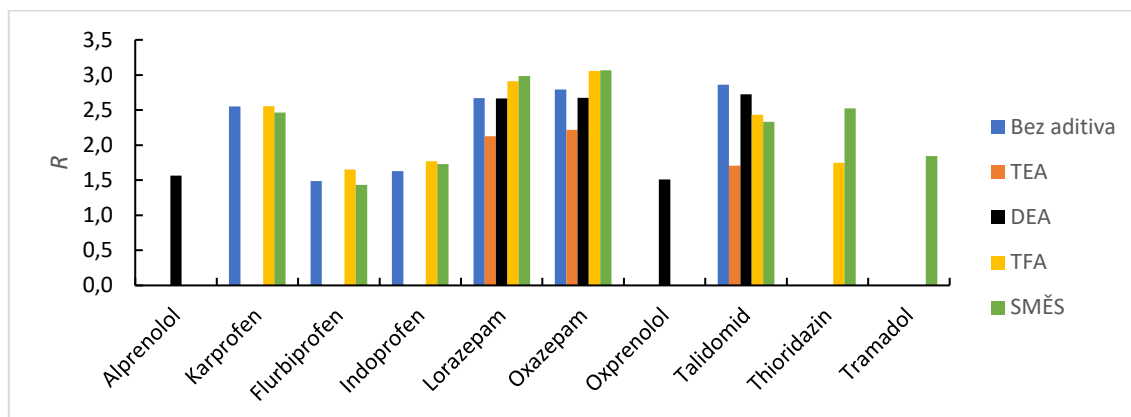
Optimální podmínky separace a chromatografické parametry analytů, které se separovaly na základní linii v mobilní fázi HEX/IPA/DEA/TFA (v/v/v/v) jsou uvedeny v **Tabulce 9**.

Tabulka 9 – Optimální podmínky separace uvedených analytů při použití mobilní fáze HEX/IPA/DEA/TFA (v/v/v/v). Rozlišení (R), retenční faktor 1. eluovaného enantiomeru (k_1) a enantioselektivita (α).

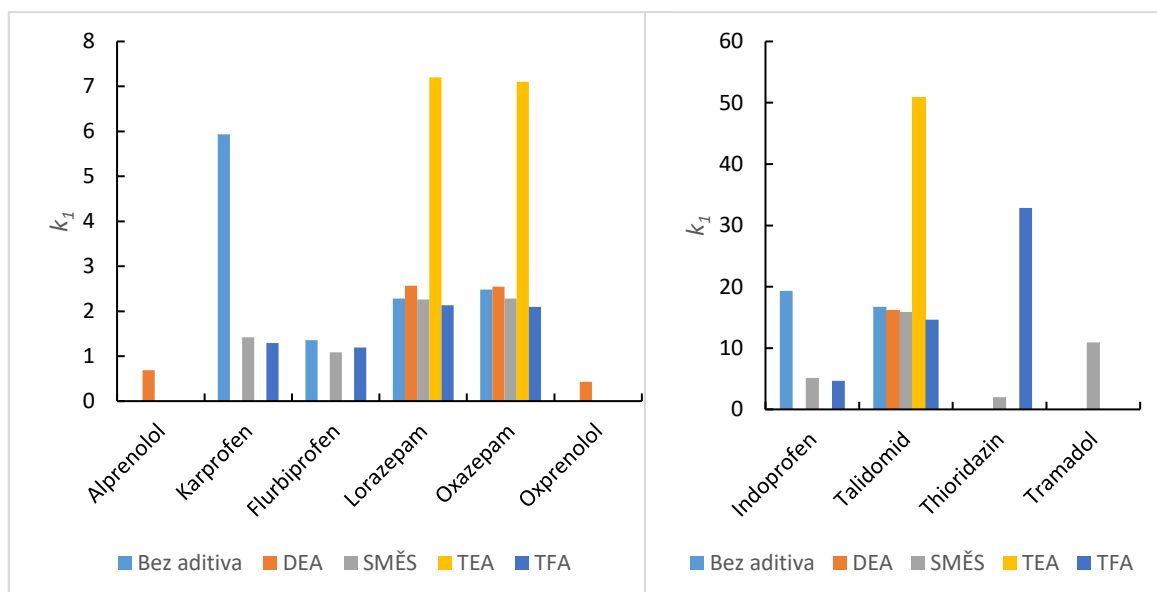
	Propan-2-ol (%)	R	k_1	α
Flurbiprofen	5	1,43	1,09	1,37
Indoprofen	20	1,73	5,15	1,24
Karprofen	20	2,47	1,42	1,57
Lorazepam	20	2,98	2,26	1,62
Oxazepam	20	3,06	2,28	1,62
Talidomid	20	2,33	15,88	1,42
Thioridazin	20	2,52	1,99	1,61
Tramadol	5	1,84	10,93	1,27

Nejsymetričtější píky vykazoval karprofen s faktorem symetrie v rozmezí 1,0 – 1,5; následovaly flurbiprofen, indoprofen, thioridazin 1,5 – 2,0; lorazepam a oxazepam 1,0 – 2,5; tramadol 2,0 – 2,5 a talidomid 2,0 – 3,0.

Výsledky rozlišení a retenčních faktorů při optimálních podmínkách ve všech mobilních fázích jsou porovnány na **Obrázcích 29 a 30**, jedná se o data z **Tabulek 5 – 9** (str. 36, 41, 45, 50 a 55).



Obrázek 29 – Závislost rozlišení uvedených analytů na typu aditiva v mobilní fázi v optimálním zastoupení propan-2-olu v mobilní fázi.



Obrázek 30 – Závislost retenčního faktoru prvního elujícího enantiomeru (k_1) uvedených analytů na typu aditiva v optimálním poměru propan-2-olu v mobilní fázi.

Výsledky enantioseparace kyselých analytů byly při optimálním zastoupení

propan-2-olu v mobilních fázích horší ve směsném aditivu v porovnání s kyselinou trifluoroctovou. Pouze u flurbiprofenu byla doba analýzy kratší při použití směsného aditiva, ale hodnota rozlišení klesla pod 1,5. V mobilních fázích bez aditiva měly flurbiprofen a ketoprofen vyšší rozlišení, ale také vyšší retenční faktor než v mobilních fázích se směsným aditivem. V případě ketoprofenu je retence v mobilních fázích se směsným aditivem výrazně kratší v porovnání s mobilními fázemi bez aditiva, u flurbiprofenu není tento rozdíl výrazný. Při použití mobilních fází se směsným nebo kyselým aditivem byly získány srovnatelné výsledky pro lorazepam a oxazepam. Talidomid měl vyšší rozlišení i retenční faktor při použití kyselého aditiva v porovnání se směsným aditivem. Retence thioridazinu byla nižší v mobilních fázích se směsným aditivem s vyšším rozlišením než při použití TFA v mobilních fázích.

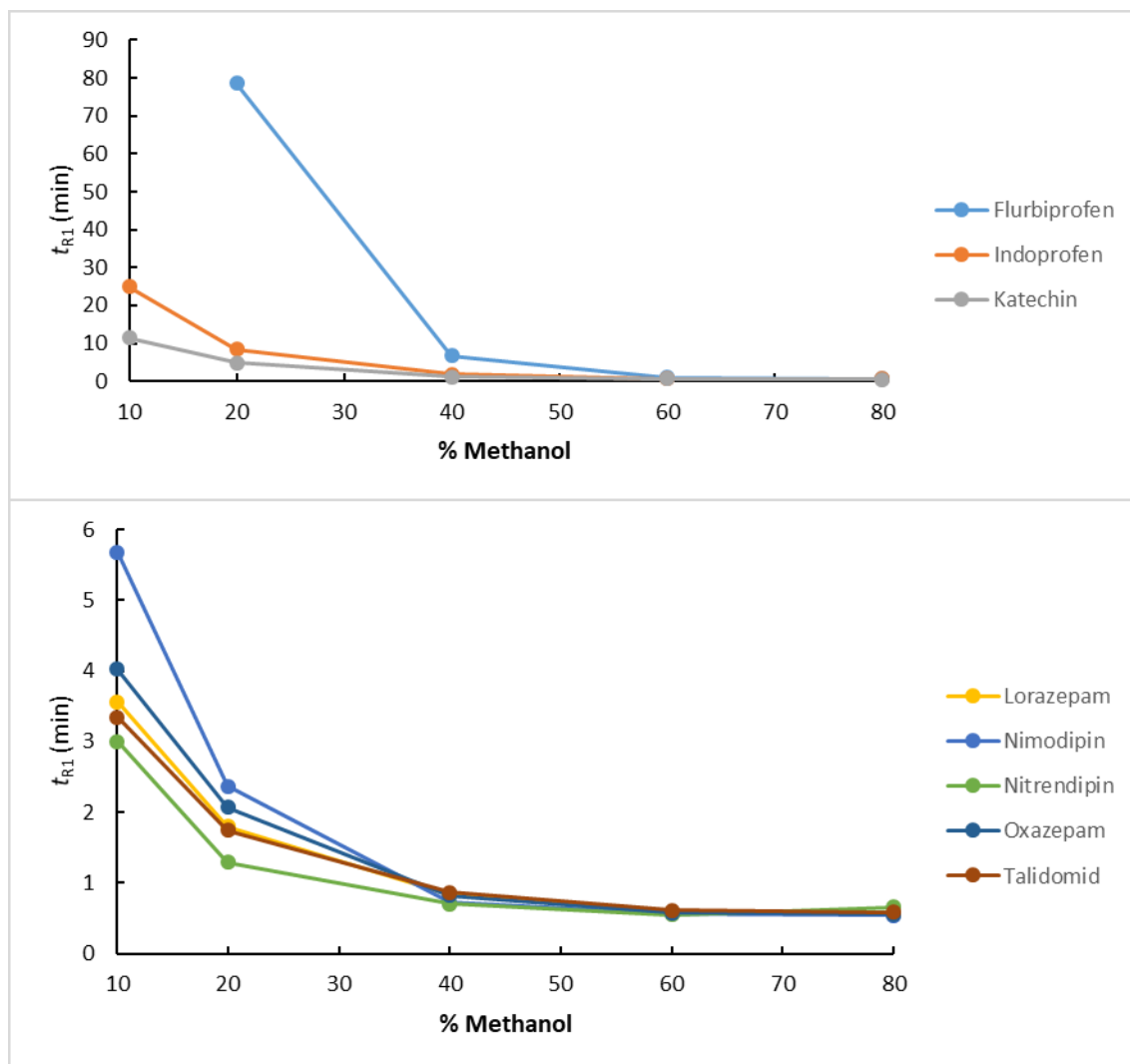
V normálním módu se na koloně CHIRAL ART Amylose-SA separovalo 22 analytů z celkového počtu 29, přičemž na základní linii se rozdělilo 10.

5.2 Kolona CDShell-RSP

Následně byla testována enantioselektivita kolony CDShell-RSP v reverzním a polárně-organickém módu.

5.2.1 Retence a enantioseparace v reverzním módu

Nejprve byly použity mobilní fáze složené z 10 mM octanu amonného, pH 4,0 a methanolu v různých objemových poměrech. Měření začalo v mobilní fázi se složením 10 mM octan amonný, pH 4,0/methanol 80/20 (v/v). Následně bylo zvyšováno zastoupení octanového pufru v mobilní fázi pro prodloužení retence analytů. Závislost retenčních časů vybraných analytů na množství methanolu v mobilní fázi ilustruje **Obrázek 31**.

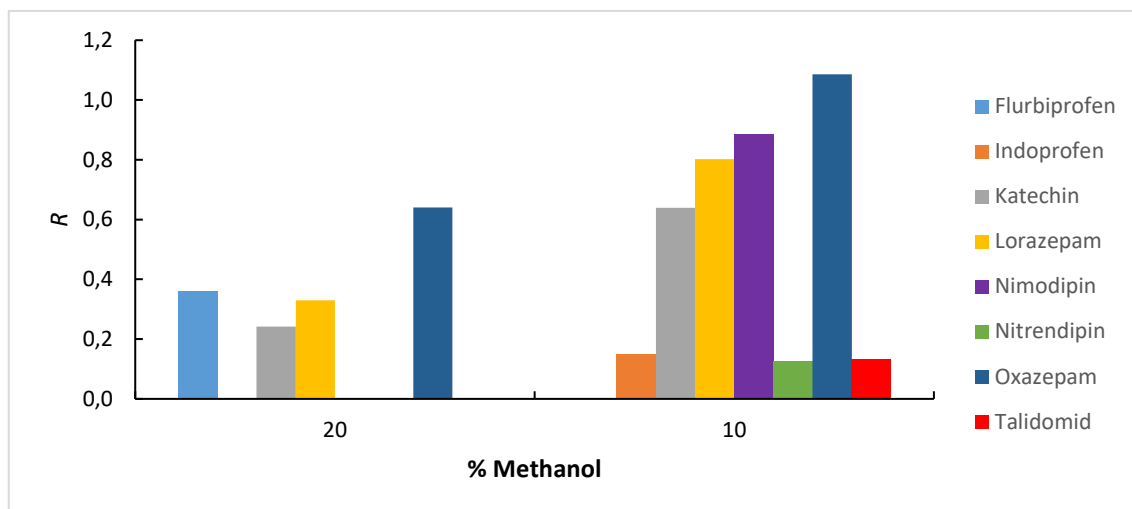


Obrázek 31 – Závislost retenčního času prvního eluujícího enantiomeru (t_{R1}) uvedených analytů na procentuálním zastoupení methanolu v mobilní fázi 10 mM octan amonný, pH 4,0/methanol (v/v).

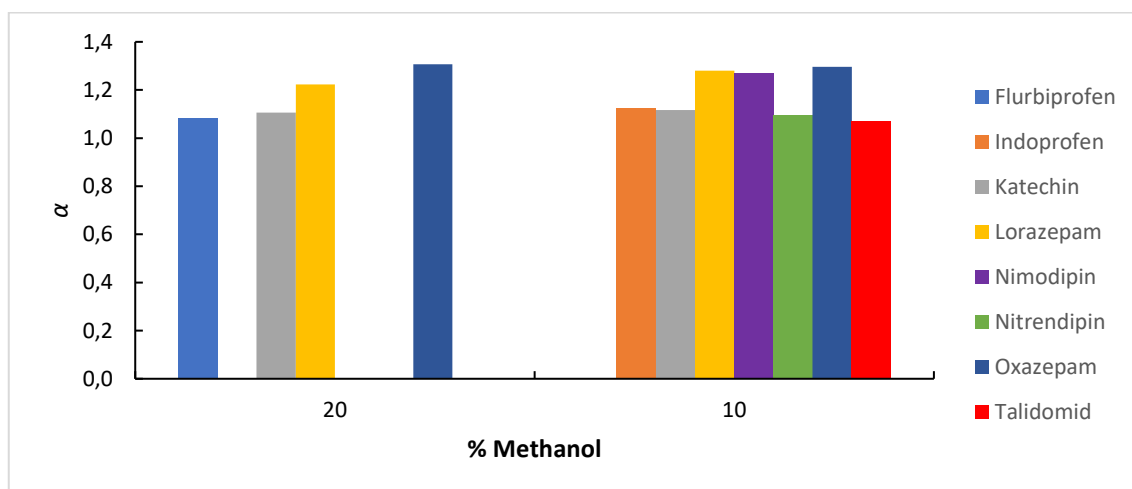
Na **Obrázku 31** jsou uvedeny analyty, které se separovaly v mobilních fázích 10 mM octan amonný, pH 4,0/methanol (v/v). Retence všech analytů rostla se zvyšujícím se obsahem pufru v mobilní fázi (**Obrázek 31**). Retenční čas flurbiprofenu při 10 % methanolu v mobilní fázi překročil dvě hodiny. Nejvýrazněji narůstaly retenční časy flurbiprofenu a indoprofenu, které mají ve struktuře karboxylovou funkční skupinu. Výrazný rozdíl mezi retencí flurbiprofenu a indoprofenu ve 20 objemových % methanolu v mobilní fázi je pravděpodobně způsoben bazickou aminovou skupinou ve struktuře indoprofenu. Katechin ve své struktuře neobsahuje karboxylovou skupinu, ale má 5 hydroxylových skupin. Ty se pravděpodobně podílejí na zvýšení retence v nižším poměru

methanolu v mobilní fázi oproti ostatním analytům.

Na **Obrázcích 32 – 33** jsou zobrazeny chromatografické parametry, rozlišení (R) a enantioselektivita (α).



Obrázek 32 – Závislost rozlišení (R) uvedených analytů na procentuálním zastoupení methanolu v mobilní fázi 10 mM octan amonný, pH 4,0/methanol (v/v).

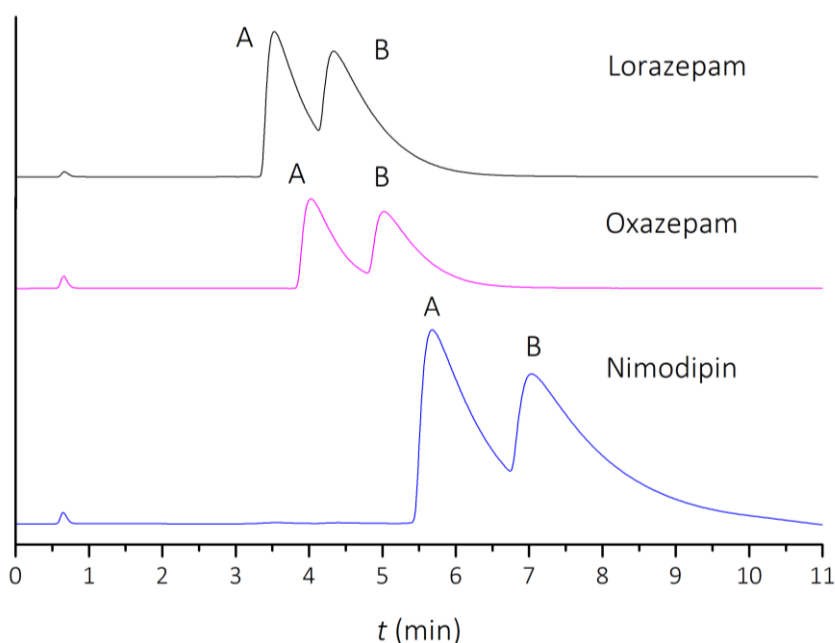


Obrázek 33 – Závislost enantioselektivity (α) uvedených analytů na procentuálním zastoupení methanolu v mobilní fázi 10 mM octan amonný, pH 4,0/methanol (v/v).

Hodnota faktoru symetrie nebyla vypočítána, protože se žádný analyt za těchto podmínek nerozdělil na základní linii. U všech analytů se zvýšilo rozlišení v 10 objemových % oproti 20 objemovým % methanolu v mobilní fázi. Analyty katechin, lorazepam, nimodipin a oxazepam překročily hodnotu rozlišení 0,5. Společným znakem ve struktuře katechinu, lorazepamu a oxazepamu je vazba hydroxylové skupiny na

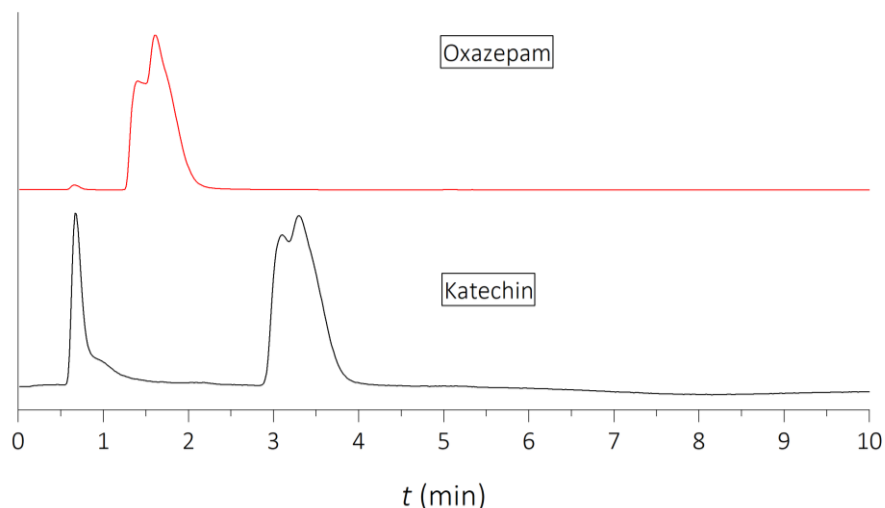
chirální atom uhlíku. Je možné, že právě hydroxylová funkční skupina hraje významnou roli při separaci. Nimodipin hydroxylovou skupinu neobsahuje, přesto dosáhl hodnotu rozlišení nad 0,5. Analyty nimodipin a nitrendipin jsou strukturně podobné. Jiné hodnoty dosaženého rozlišení budou pravděpodobně způsobeny odlišnou elektronovou hustotou na karboxylových funkčních skupinách v blízkosti chirálního centra. Rozdílná elektronová hustota je způsobena jinými esterovými skupinami.

Chromatogramy enantioseparace vybraných analytů jsou zobrazeny na **Obrázku 34**.



Obrázek 34 – Chromatogramy enantioseparace uvedených analytů v mobilní fázi 10 mM octan amonný pH 4,0/methanol 90/10 (v/v). A – první elující enantiomer, B – druhý elující enantiomer. Měřeno při vlnové délce 254 nm a průtoku 0,4 ml/min.

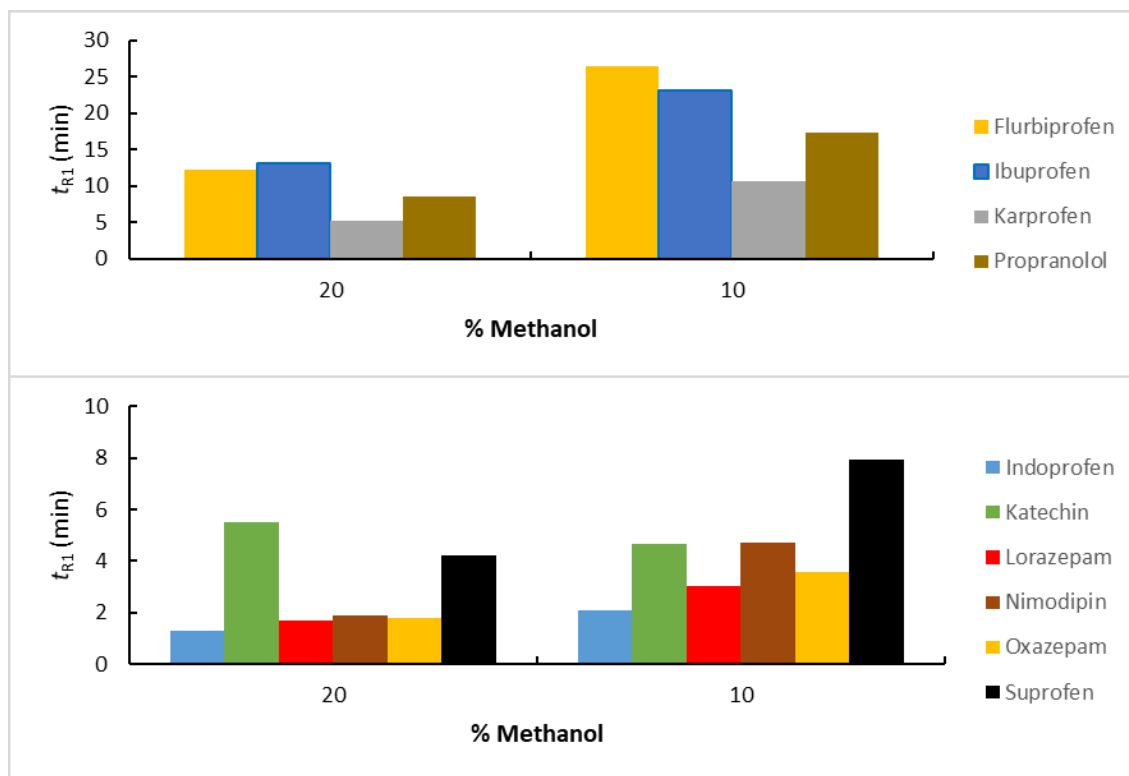
Pro ovlivnění separace kyselých analytů byly následně testovány mobilní fáze s nižším pH složené z 10 mM octanu amonného, pH 3,0 a methanolu v poměru 80/20 (v/v). V mobilní fázi 10 mM octan amonný, pH 3,0/methanol 80/20 (v/v) se začal separovat katechin a oxazepam. Oba tyto analyty nedosáhly v této mobilní fázi vyšší hodnotu rozlišení než 0,2. Chromatogramy enantioseparace obou analytů zobrazuje **Obrázek 35** (str. 61).



Obrázek 35 – Chromatogramy enantioseparace uvedených analytů v mobilní fázi 10 mM octan amonný, pH 3,0/methanol 80/20 (v/v). Měřeno při vlnové délce 254 nm a průtoku 0,4 ml/min.

Protože v této mobilní fázi nebyly získány lepší výsledky než při použití mobilní fáze 10 mM octan amonný, pH 4,0/methanol (v/v), nebyla tato mobilní fáze dále testována.

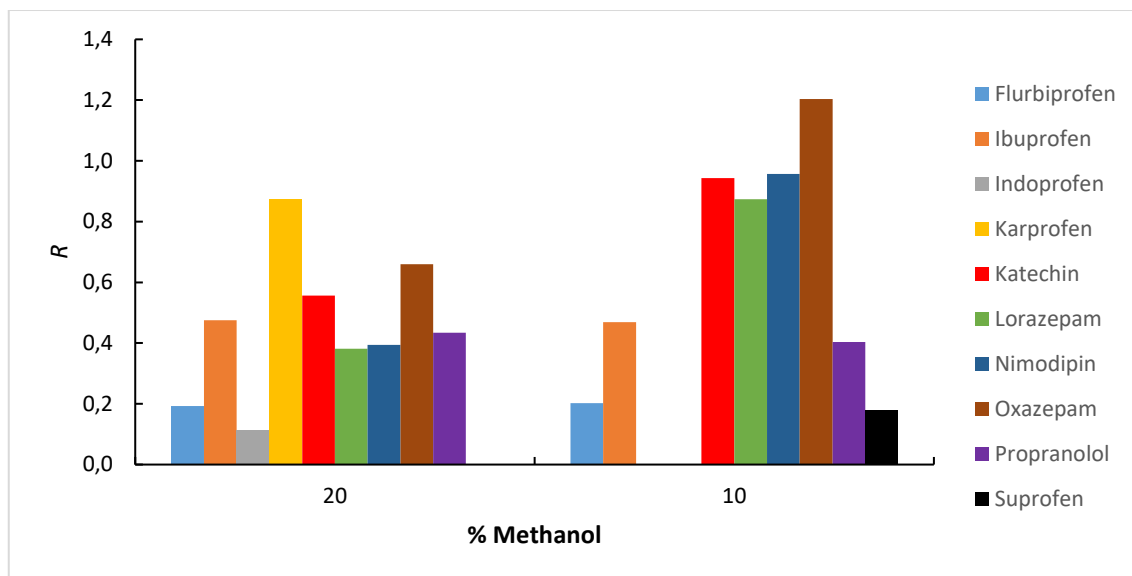
Následně byly použity mobilní fáze s vyšším pH vodné složky – pH 6,5. S tímto pH byly použité mobilní fáze 10 mM octan amonný, pH 6,5/methanol 80/20 a 90/10 (v/v). V mobilní fázi 10 mM octan amonný, pH 6,5/methanol 90/10 (v/v) byly měřeny jen ty analyty, které vykazovaly známky separace v poměru 80/20 10 mM octan amonný, pH 6,5/methanol. Závislost retenčních časů separovaných analytů na množství methanolu v mobilních fázích zobrazuje **Obrázek 36**.



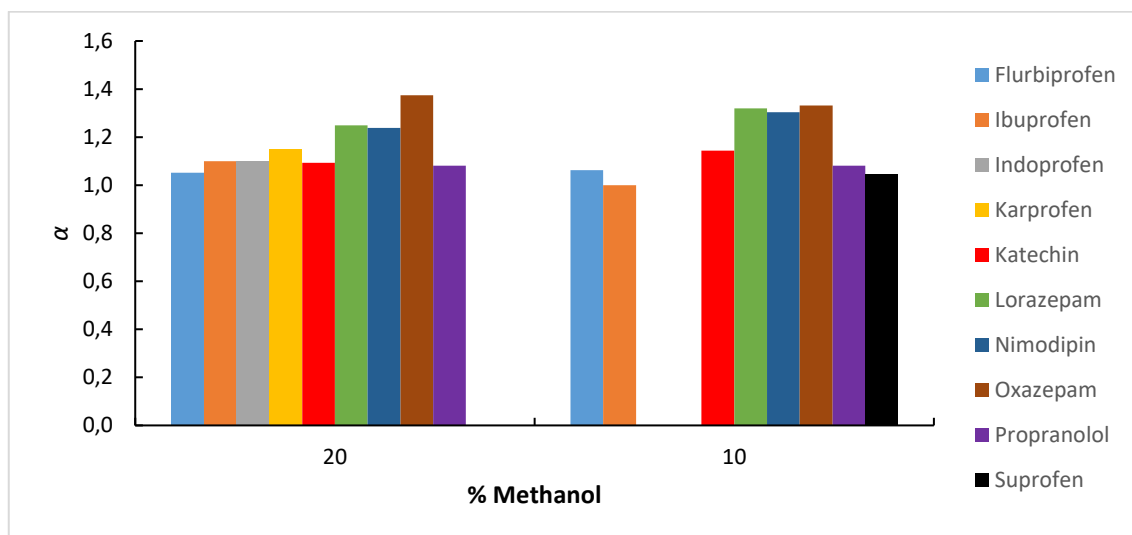
Obrázek 36 – Závislost retenčního času prvního eluujícího enantiomeru (t_{R1}) uvedených analytů na procentuálním zastoupení methanolu v mobilní fázi 10 mM octan amonný, pH 6,5/methanol (v/v).

V mobilních fázích s 10 mM octanem amonným, pH 6,5 se separovaly stejné analyty jako v mobilních fázích s 10 mM octanem amonným, pH 4,0 kromě nitrendipinu a talidomidu. Navíc se začaly separovat analyty ze skupiny profenů ibuprofen, karprofen, suprofen a propranolol ze skupiny beta-blokátorů. Všechny analyty uvedené na **Obrázcích 31 a 36** (str. 58 a 62) měly nižší retenci ve stejném množství methanolu při vyšším pH kromě katechinu, který měl ve 20 objemových % methanolu nižší retenční čas při nižším pH. Nárůst retenčních časů těchto analytů při přechodu z 20 objemových % na 10 objemových % methanolu v mobilní fázi byl při vyšším pH menší než při nižším pH.

Na **Obrázcích 37 – 38** jsou zobrazeny chromatografické parametry, rozlišení (R) a enantioselektivita (α) analytů, které se separovaly v mobilních fázích s vodnou složkou o pH 6,5.



Obrázek 37 – Závislost rozlišení (R) uvedených analytů na procentuálním zastoupení methanolu v mobilní fázi 10 mM octan amonný, pH 6,5/methanol (v/v).



Obrázek 38 – Závislost enantioselektivity (α) uvedených analytů na procentuálním zastoupení methanolu v mobilní fázi 10 mM octan amonný, pH 6,5/methanol (v/v).

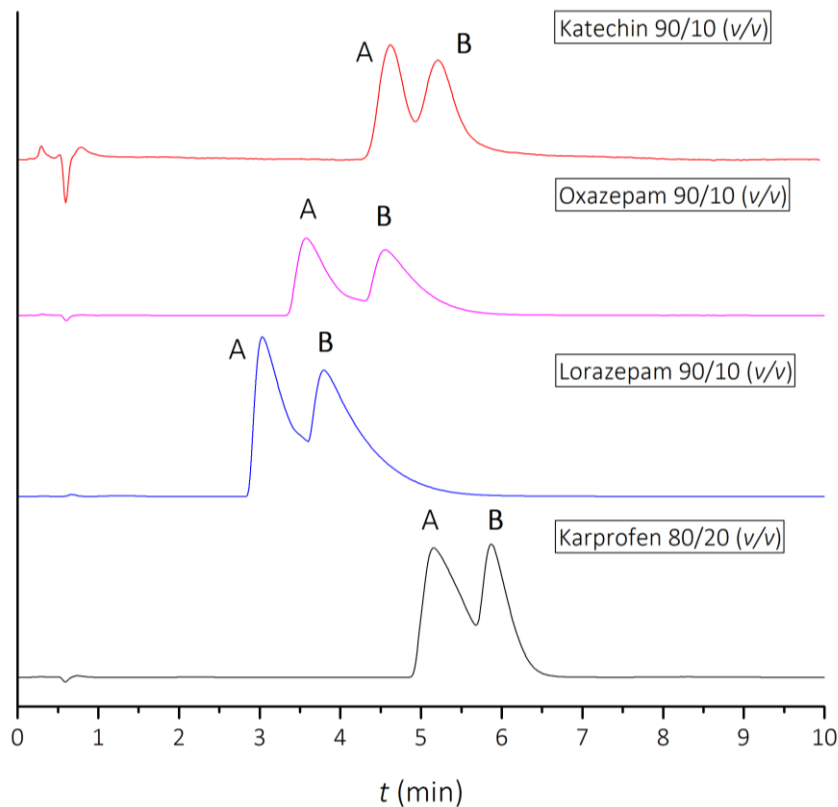
Hodnota faktoru symetrie píků nebyla vypočítána pro žádný z analytů, protože se žádný z nich neseparoval na základní linii (**Obrázek 37**). Analyty, které se separovaly jak v mobilních fázích s vodnou složkou o pH 4,0, tak i o pH 6,5, dosáhly vyšší hodnoty rozlišení při vyšším pH ve všech poměrech methanolu v mobilních fázích. Karprofen byl jediný analyt, který se separoval až v mobilní fázi s vodnou složkou o pH 6,5 a dosáhl hodnotu rozlišení vyšší než 0,5.

Hlavní interakcí, která se podílí na separaci enantiomerů je inkluze do kavity

cyklodextrinů. V případě použití vodných roztoků s methanolem se v kavitě nachází molekuly vody a methanolu, které mají vysokou entalpii. Kavita omezuje tvorbu vodíkových vazeb mezi molekulami vody, které jsou běžné ve volném vodném prostředí. Hlavní silou inkluze je proto vypuzení molekul vody a jejich náhrada méně polární molekulou. Tím dojde k vytvoření energeticky výhodnějšího a stabilnějšího komplexu [56].

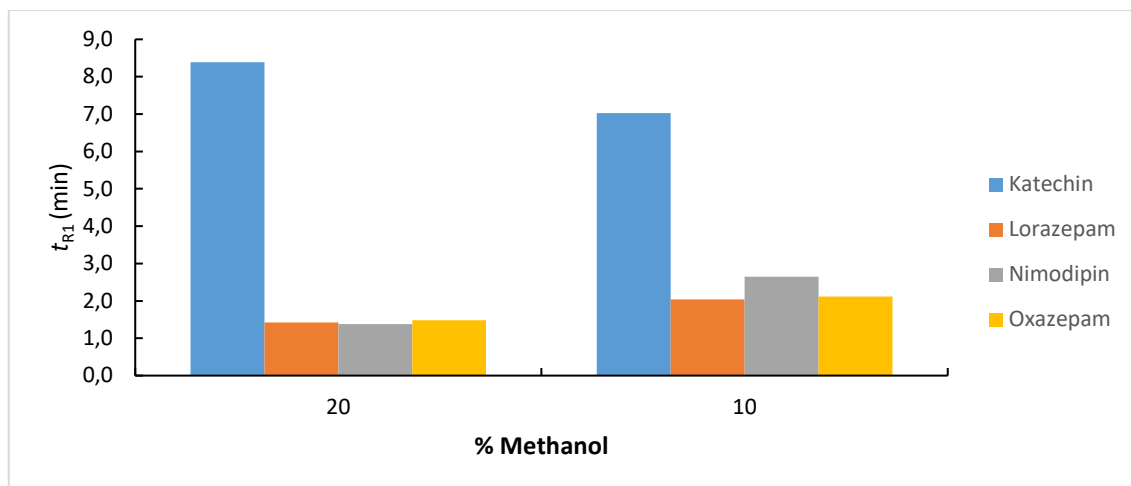
Ve vyšším pH může docházet k silnějším vodíkovým interakcím atomů vodíku z hydroxylových skupin cyklodextrinů s atomy s volnými elektronovými páry ve struktuře analytů, zejména dusíkem a kyslíkem. Všechny analyty, které se separovaly v mobilních fázích s vyšším pH obsahují dusík, kyslík nebo síru. Roli hraje pravděpodobně i počet atomů s volným elektronovým párem. Katechin (6 atomů kyslíku), nimodipin (1 atom dusíku, 5 atomů kyslíku) a oxazepam (1 atom chlóru, 2 atomy dusíku, 2 atomy kyslíku) dosáhly vysokých hodnot rozlišení. Naproti tomu suprofen (2 atomy kyslíku, 1 atom síry) nebo propranolol (1 atom dusíku, 2 atomy kyslíku) dosáhly nižších hodnot rozlišení. Sterická přístupnost atomu s volným elektronovým párem je také důležitá. Karprofen se stericky lépe přístupným atomem dusíku s dvěma substituenty byl lépe separován než indoprofen, jehož atom dusíku má tři substituenty a je kvůli vazbě na benzenové jádro hůře stericky přístupný. Tuto hypotézu podporuje také vyšší množství analytů, které se separovaly v mobilních fázích při vyšším pH v porovnání s nižším pH.

Separace analytů v mobilních fázích s 10 mM octanem amonným, pH 6,5 jsou ukázány na **Obrázku 39** (str. 65).



Obrázek 39 – Chromatogramy enantioseparace uvedených analytů v mobilních fázích 10 mM octan amonný, pH 6,5/methanol (v/v). A – první elující enantiomer, B – druhý elující enantiomer. Měřeno při vlnové délce 254 nm a průtoku 0,4 ml/min.

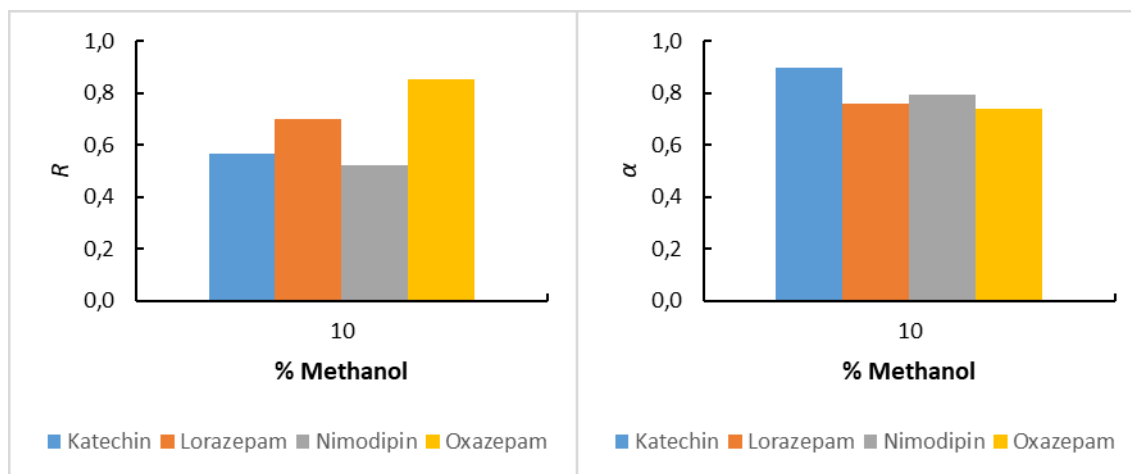
Dále byl testován vliv složení pufru na enantioseparaci studovaných chirálních léčiv. Nejprve byl použit 1% triethylaminoctanový pufr, pH 4,0. Byly použity následující poměry methanolu a pufru v mobilní fázi: 1% triethylaminoctanový pufr, pH 4,0/methanol 80/20 a 90/10 (v/v). Závislost retenčních časů analytů, které se separovaly, na množství methanolu v mobilních fázích zobrazuje **Obrázek 40** (str. 66).



Obrázek 40 – Závislost retenčního času prvního elujícího enantiomeru (t_{R1}) uvedených analytů na procentuálním zastoupení methanolu v mobilní fázi 1% triethylaminoctanový pufr, pH 4,0/methanol (v/v).

Všechny analyty uvedené na **Obrázku 40** měly nižší retenční časy v mobilních fázích s triethylaminoctanovým pufrém, pH 4,0 než s 10 mM octanem amonným, pH 4,0 v obou poměrech methanolu.

Na **Obrázku 41** jsou zobrazeny chromatografické parametry, rozlišení (R) a enantioselektivita (α) analytů, které se separovaly v mobilních fázích s triethylaminoctanovým pufrém, pH 4,0.

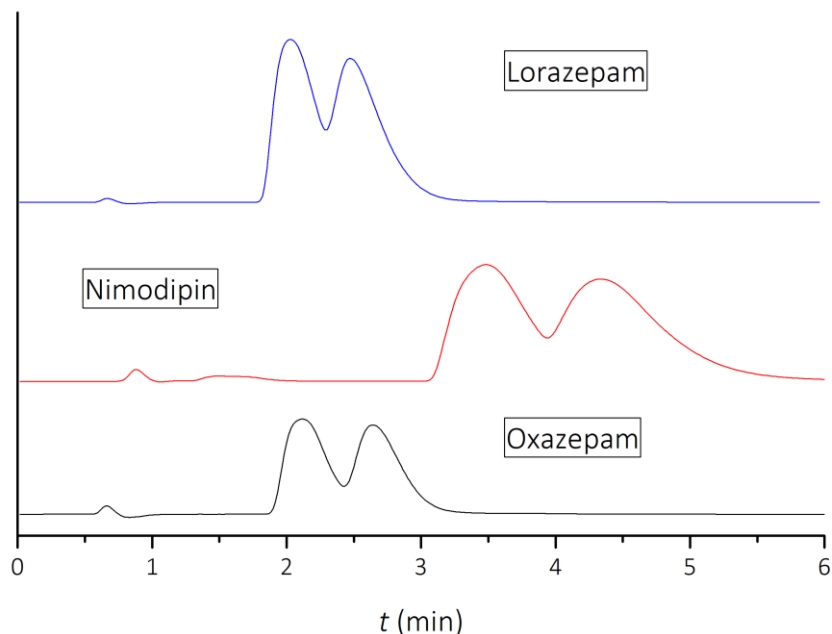


Obrázek 41 - Závislost rozlišení (R) a enantioselektivity (α) uvedených analytů na procentuálním zastoupení methanolu v mobilní fázi 1% triethylaminoctanový pufr, pH 4,0/methanol 90/10 (v/v).

Oproti mobilním fázím s 10 mM octanem amonným, pH 4,0 se v mobilních fázích s 1% triethylaminoctanovým pufrém, pH 4,0 dělilo méně analytů. Všechny analyty také

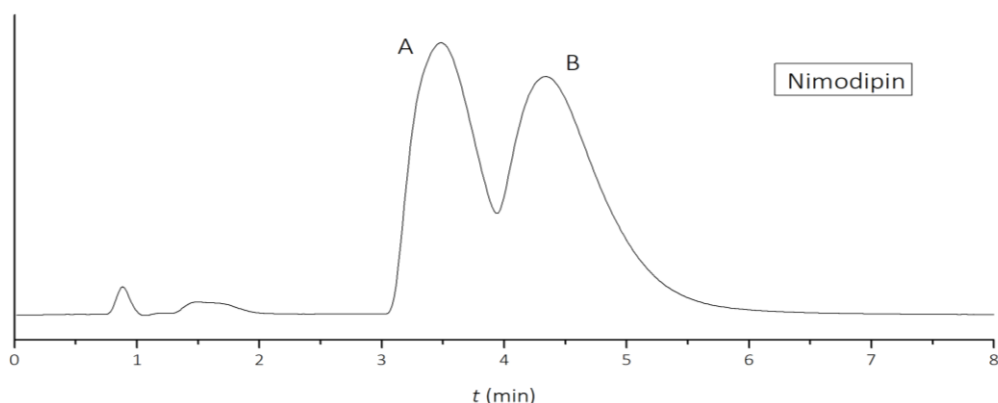
dosáhly nižšího rozlišení v mobilní fázi s 10 objemovými % methanolu. Nižší rozlišení v těchto mobilních fázích je pravděpodobně důsledek kratších retencí.

Chromatogramy vybraných analytů, které se separovaly v mobilních fázích s 1% triethylaminoctanovým pufr, pH 4,0 zobrazuje **Obrázek 42**.



Obrázek 42 – Chromatogramy enantioseparace uvedených analytů v mobilní fázi 1% triethylaminoctanový pufr, pH 4,0/methanol 90/10 (v/v). A – první eluující enantiomer, B – druhý eluující enantiomer. Měřeno při 254 nm a průtoku 0,4 ml/min.

Následně byl testován 1% triethylaminoctanový pufr, pH 6,5. Při použití tohoto pufru se separoval pouze nimodipin v mobilní fázi 1% triethylaminoctanový pufr, pH 6,5/methanol 90/10 (v/v). Nimodipin dosáhl hodnoty rozlišení 0,7 a enantioselektivity 1,3. Chromatogram enantioseparace nimodipinu v uvedené mobilní fázi je uveden na **Obrázku 43**.



Obrázek 43 – Chromatogram enantioseparace nimodipinu v mobilní fázi 1% triethylaminocyanový pufr, pH 6,5/methanol 90/10 (v/v). A – první eluující enantiomer, B – druhý eluující enantiomer. Měřeno při 254 nm a průtoku 0,4 ml/min.

Nejlepších výsledků na koloně CDShell-RSP bylo dosaženo v mobilní fázi 10 mM octan amonný, pH 6,5/methanol 90/10 (v/v). V této mobilní fázi se separovalo nejvíce analytů a dosáhly nejvyšších hodnot rozlišení. Ani jeden z testovaných analytů se nesePARoval na základní linii. Celkově se na koloně CDShell-RSP v reverzním módu částečně separovalo 10 z 29 analytů.

5.2.2 Retence a separace v polárně-organickém módu

V polárně-organickém módu byly použity mobilní fáze acetonitril/ methanol/ kyselina octová/ triethylamin v 4 poměrech: 80/20/0,3/0,2; 20/80/0,3/0,2; 80/20/0,03/0,02; 97/3/0,03/0,02 (v/v/v/v). Retence všech analytů byly krátké a nepřesáhly 6 minut. V žádné z použitých mobilních fází nedošlo k separaci některého z testovaných analytů, což může být způsobeno tím, že pro separaci použitých analytů je zapotřebí vodného prostředí při použití této kolony.

6. Závěr

Enantioselektivní potenciál kolon CHIRAL ART-Amylose SA a CDShell-RSP byl testován na sadě 29 strukturně odlišných chirálních léčiv. Pro kolonu CHIRAL ART-Amylose SA byl použit normální mód a pro kolonu CDShell-RSP byl použit jak reverzní, tak polárně-organický mód.

Na koloně CHIRAL ART-Amylose SA byly nalezeny optimální podmínky pro enantioseparaci 10 analytů na základní linii a částečnou separaci 12 analytů. Nejvíce analytů se separovalo v mobilní fázi HEX/IPA/DEA/TFA 80/20/0,1/0,1 (v/v/v/v). V případě použití kyseliny trifluoroctové jako aditiva v mobilní fázi byly chromatografické parametry (rozlišení, retenční faktor, enantioselektivita a faktor symetrie) lepší nebo srovnatelné pro kyselé analyty v porovnání s ostatními aditivy. V mobilní fázi s bazickým diethylaminem se enantioseparoval největší počet bazických analytů při porovnání s ostatními aditivy. Při použití směsného aditiva (diethylamin a kyselina trifluoroctová) v mobilní fázi se enantioseparovalo nejvíce z testovaných analytů.

Na koloně CDShell-RSP se v reverzním módu v mobilní fázi 10 mM octan amonný, pH 6,5/methanol 90/10 (v/v) částečně separovalo 10 analytů. V polárně-organickém módu se neseparoval žádný z testovaných analytů.

Enantioselektivní potenciál kolony CHIRAL ART Amylose-SA byl pro enantioseparaci vybraných chirálních léčiv vyšší než kolony CDShell-RSP. Nicméně analyty katechin, nimodipin a nitrendipin se částečně separovaly na koloně CDShell-RSP, zatímco na koloně CHIRAL ART Amylose-SA nedošlo k jejich separaci.

7. Seznam použité literatury

- 1 Calcaterra, A.; D'Acquarica, I.: The market of chiral drugs: Chiral switches versus de novo enantiomerically pure compounds. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **147**, 323–340 (2018).
- 2 Ilisz, I.; Bajtai, A.; Lindner, W.; Péter, A.: Liquid chromatographic enantiomer separations applying chiral ion-exchangers based on Cinchona alkaloids. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **159**, 127–152 (2018).
- 3 McMurry, J.: *Organic chemistry*. 8th ed. Belmont, CA, Brooks/Cole, Cengage Learning, 2012.
- 4 Bruice, P. Y. *Organic Chemistry*. 8th ed., Boston, MA, Prentice Hall, (2011).
- 5 Fox, M. A.; Whitesell, J. K.: *Organic chemistry*. 3rd ed. Boston MA, Jones and Bartlett, 2004.
- 6 Rentsch, K. M.: The importance of stereoselective determination of drugs in the clinical laboratory. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* **54**, 1–9 (2002).
- 7 Brooks, W. H.; Guida, W. C.; Daniel, K. G.: The Significance of Chirality in Drug Design and Development. *Current Topics in Medicinal Chemistry* **11**, 760–770 (2011).
- 8 Gübitz, G.; Schmid, M. G.: Chiral separation by chromatographic and electromigration techniques. A review. *Biopharmaceutics & Drug Disposition* **22**, 291–336 (2001).
- 9 Lesellier, E.; West, C.: The many faces of packed column supercritical fluid chromatography – A critical review. *Journal of Chromatography A* **1382**, 2–46 (2015).
- 10 Bernardo-Bermejo, S.; Sánchez-López, E.; Castro-Puyana, M.; Marina, M. L.: Chiral capillary electrophoresis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **124**, 115807 (2020).
- 11 Andersson, S.; Allenmark, S. G.: Preparative chiral chromatographic resolution of enantiomers in drug discovery. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* **54**, 11–23 (2002).
- 12 Nguyen, L. A.; He, H.; Pham-Huy, C.: Chiral Drugs: An Overview. *International Journal of Biomedical Science* **2**, 85–100 (2006).
- 13 Ikai, T.; Yamamoto, C.; Kamigaito, M.; Okamoto, Y.: Immobilized-type chiral packing materials for HPLC based on polysaccharide derivatives. *Journal of Chromatography B* **875**, 2–11 (2008).
- 14 Okamoto, Y.; Kawashima, M.; Hatada, K.: Chromatographic resolution. 7. Useful chiral packing materials for high-performance liquid chromatographic resolution of enantiomers: phenylcarbamates of polysaccharides coated on silica gel. *Journal of the American Chemical Society* **106**, 5357–5359 (1984).
- 15 Ikai, T.; Okamoto, Y.: Structure Control of Polysaccharide Derivatives for Efficient Separation of Enantiomers by Chromatography. *Chemical Reviews* **109**, 6077–6101 (2009).
- 16 Yamamoto, C.; Hayashi, T.; Okamoto, Y.: High-performance liquid chromatographic enantioseparation using chitin carbamate derivatives as chiral stationary phases. *Journal of Chromatography A* **1021**, 83–91 (2003).
- 17 Teixeira, J.; Tiritan, M. E.; Pinto, M. M. M.; Fernandes, C.: Chiral Stationary Phases for Liquid Chromatography: Recent Developments. *Molecules* **24** (2019).
- 18 Ichida, A.; Shibata, T.; Okamoto, I.; Yuki, Y.; Namikoshi, H.; Toga, Y.: Resolution

- of enantiomers by HPLC on cellulose derivatives. *Chromatographia* **19**, 280–284 (1984).
- 19 Padró, J. M.; Keunchkarian, S.: State-of-the-art and recent developments of immobilized polysaccharide-based chiral stationary phases for enantioseparations by high-performance liquid chromatography (2013–2017). *Microchemical Journal* **140**, 142–157 (2018).
- 20 Okamoto, Y.; Aburatani, R.; Miura, S.-I.; Hatada, K.: Chiral Stationary Phases for HPLC: Cellulose Tris(3,5-dimethylphenylcarbamate) and Tris(3,5-dichlorophenylcarbamate) Chemically Bonded to Silica Gel. *Journal of Liquid Chromatography* **10**, 1613–1628 (1987).
- 21 Scriba, G. K. E.: Chiral recognition in separation science – an update. *Journal of Chromatography A* **1467**, 56–78 (2016).
- 22 Chankvetadze, B.: Recent developments on polysaccharide-based chiral stationary phases for liquid-phase separation of enantiomers. *Journal of Chromatography A* **1269**, 26–51 (2012).
- 23 Ahuja, S.; Rasmussen, H.: *HPLC Method Development for Pharmaceuticals*, San Diego, CA, Elsevier Science Publishing (2007).
- 24 Okamoto, Y.; Aburatani, R.; Hatada, K.: Chromatographic chiral resolution: XIV. Cellulose tribenzoate derivatives as chiral stationary phases for high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* **389**, 95–102 (1987).
- 25 Chankvetadze, B.; Yashima, E.; Okamoto, Y.: Dimethyl-, dichloro- and chloromethylphenylcarbamates of amylose as chiral stationary phases for high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* **694**, 101–109 (1995).
- 26 Chankvetadze, B.: Recent trends in preparation, investigation and application of polysaccharide-based chiral stationary phases for separation of enantiomers in high-performance liquid chromatography. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **122**, 115709 (2020).
- 27 Zhang, J.; Sun, J.; Liu, Y.; Yu, J.; Guo, X.: Immobilized Cellulose-Based Chiralpak IC Chiral Stationary Phase for Enantioseparation of Eight Imidazole Antifungal Drugs in Normal-Phase, Polar Organic Phase and Reversed-Phase Conditions Using High-Performance Liquid Chromatography. *Chromatographia* **82**, 649–660 (2019).
- 28 Geryk, R.; Kalíková, K.; Schmid, M. G.; Tesařová, E.: Enantioselective separation of biologically active basic compounds in ultra-performance supercritical fluid chromatography. *Analytica Chimica Acta* **932**, 98–105 (2016).
- 29 Tabata, H.; Yoneda, T.; Oshitari, T.; Takahashi, H.; Natsugari, H.: Tolvaptan-Type Vasopressin Receptor Ligands: Important Role of Axial Chirality in the Active Form. *Journal of Medicinal Chemistry* **60**, 4503–4509 (2017).
- 30 Dostupné z URL: <<http://www.ymc.co.jp/en/columns/application/>> [cit. 4.3.2020]
- 31 Zhou, J.; Tang, J.; Tang, W.: Recent development of cationic cyclodextrins for chiral separation. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **65**, 22–29 (2015).
- 32 Adly, F. G.; Antwi, N. Y.; Ghanem, A.: Cyclodextrin-Functionalized Monolithic Capillary Columns: Preparation and Chiral Applications. *Chirality* **28**, 97–109 (2016).
- 33 Voncina, B.; Vivod, V.: Cyclodextrins in Textile Finishing. *Eco-Friendly Textile Dyeing and Finishing* [on-line]. 2013. Dostupné z: <<http://www.intechopen.com/books/eco-friendly-textile-dyeing-and->

- finishing/cyclodextrins-in-textile-finishing> [cit. 10.4.2020]
- 34 Folprechtová, D.; Kalíková, K.; Kozlík, P.; Tesařová, E.: The degree of substitution affects the enantioselectivity of sulfobutylether- β -cyclodextrin chiral stationary phases. *ELECTROPHORESIS* **40**, 1972–1977 (2019).
- 35 Biedermann, F.; Nau, W. M.; Schneider, H. J.: The Hydrophobic Effect Revisited—Studies with Supramolecular Complexes Imply High-Energy Water as a Noncovalent Driving Force. *Angewandte Chemie International Edition* **53**, 11158–11171 (2014).
- 36 Riesová, M.; Svobodová, J.; Tošner, Z.; Beneš, M.; Tesařová, E.; Gaš, B.: Complexation of Buffer Constituents with Neutral Complexation Agents: Part I. Impact on Common Buffer Properties. *Analytical Chemistry* **85**, 8518–8525 (2013).
- 37 Gogolashvili, A.; Tatunashvili, E.; Chankvetadze, L.; Sohajda, T.; Gumustas, M.; Ozkan, S. A.; Salgado, A.; Chankvetadze, B.: Separation of brombuterol enantiomers in capillary electrophoresis with cyclodextrin-type chiral selectors and investigation of structure of selector-selectand complexes using nuclear magnetic resonance spectroscopy. *ELECTROPHORESIS* **40**, 1904–1912 (2019).
- 38 Hellinghausen, G.; Roy, D.; Lee, J. T.; Wang, Y.; Weatherly, C. A.; Lopez, D. A.; Nguyen, K. A.; Armstrong, J. D.; Armstrong, D. W.: Effective methodologies for enantiomeric separations of 150 pharmacology and toxicology related 1°, 2°, and 3° amines with core-shell chiral stationary phases. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **155**, 70–81 (2018).
- 39 Hellinghausen, G.; Readel, E. R.; Wahab, M. F.; Lee, J. T.; Lopez, D. A.; Weatherly, C. A.; Armstrong, D. W.: Mass Spectrometry-Compatible Enantiomeric Separations of 100 Pesticides Using Core-Shell Chiral Stationary Phases and Evaluation of Iterative Curve Fitting Models for Overlapping Peaks. *Chromatographia* **82**, 221–233 (2019).
- 40 Hellinghausen, G.; Roy, D.; Wang, Y.; Lee, J. T.; Lopez, D. A.; Weatherly, C. A.; Armstrong, D. W.: A comprehensive methodology for the chiral separation of 40 tobacco alkaloids and their carcinogenic E/Z-(R,S)-tobacco-specific nitrosamine metabolites. *Talanta* **181**, 132–141 (2018).
- 41 Roy, D.; Armstrong, D. W.: Fast super/subcritical fluid chromatographic enantioseparations on superficially porous particles bonded with broad selectivity chiral selectors relative to fully porous particles. *Journal of Chromatography A* **1605**, 360339 (2019).
- 42 Grushka, E.; Grinberg, N.: *Advances in Chromatography*. 1st ed. Boca Raton, FL, CRC Press 2012.
- 43 van Deemter, J. J.; Zuiderweg, F. J.; Klinkenberg, A.: Longitudinal diffusion and resistance to mass transfer as causes of nonideality in chromatography. *Chemical Engineering Science* **5**, 271–289 (1956).
- 44 Dostupné z URL: <<https://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.html>> [cit.10.3.2020]
- 45 Skoog, D. A.: *Fundamentals of analytical chemistry*. 9th ed. Belmont, CA, Cengage - Brooks/Cole, 2012.
- 46 Bobály, B.; Veuthey, J. L.; Guillarme, D.; Fekete, S.: New developments and possibilities of wide-pore superficially porous particle technology applied for the liquid chromatographic analysis of therapeutic proteins. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **158**, 225–235 (2018).
- 47 Cabooter, D.; Fanigliulo, A.; Bellazzi, G.; Allieri, B.; Rottigni, A.; Desmet, G.: Relationship between the particle size distribution of commercial fully porous and

-
- superficially porous high-performance liquid chromatography column packings and their chromatographic performance. *Journal of Chromatography A* **1217**, 7074–7081 (2010).
- 48 Fekete, S.; Oláh, E.; Fekete, J.: Fast liquid chromatography: The domination of core–shell and very fine particles. *Journal of Chromatography A* **1228**, 57–71 (2012).
- 49 Gritti, F.; Leonardis, I.; Abia, J.; Guiochon, G.: Physical properties and structure of fine core–shell particles used as packing materials for chromatography: Relationships between particle characteristics and column performance. *Journal of Chromatography A* **1217**, 3819–3843 (2010).
- 50 Moldoveanu, Ş.; David, V.: *Essentials in modern HPLC separations*. Waltham, MA, Elsevier Science Publishing, 2013.
- 51 Nie, Y.; Liu, X.; Yang, X.; Zhao, Z.: Review: Recent Application of Chiral Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometric Methods for Enantiomeric Pharmaceutical and Biomedical Determinations. *Journal of Chromatographic Science* **51**, 753–763 (2013).
- 52 Robards, K.; Haddad, P. R.; Jackson, P. E.: *Principles and Practice of Modern Chromatographic Methods*. 1st ed. Boston, MA, Academic Press 2004.
- 53 Fanali, S.: *Liquid chromatography*. 2nd ed. Amsterdam, Elsevier Science Publishing, 2017.
- 54 Ferencz, E.; Kovács, B.; Boda, F.; Foroughbakhshfasaei, M.; Kelemen, É. K.; Tóth, G.; Szabó, Z.I.: Simultaneous determination of chiral and achiral impurities of ivabradine on a cellulose tris(3-chloro-4-methylphenylcarbamate) chiral column using polar organic mode. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **177**, 112851 (2020).
- 55 Mosiashvili, L.; Chankvetadze, L.; Farkas, T.; Chankvetadze, B.: On the effect of basic and acidic additives on the separation of the enantiomers of some basic drugs with polysaccharide-based chiral selectors and polar organic mobile phases. *Journal of Chromatography A* **1317**, 167–174 (2013).
- 56 Rajbanshi, B., Saha, S., Das, K.: Study to Probe Subsistence of Host-Guest Inclusion Complexes of α and β -Cyclodextrins with Biologically Potent Drugs for Safety Regulatory Discharge. *Scientific Reports* **8**, 13031 (2018).