

4. Závěr

Hlavním cílem této dizertační práce bylo posoudit možnosti využití kapilární kapalinové chromatografie jako účinné analytické metody pro achirální i chirální separaci (a kvantifikaci) biologicky aktivních, farmaceuticky významných látek. Miniaturizované uspořádání kapalinové chromatografického systému mělo umožnit snadnou variaci experimentálních podmínek směřující k pochopení dějů podílejících se na separačním mechanismu.

Za využití kapilární kapalinové chromatografie byla pro separaci a kvantifikaci nově syntetizovaných, farmaceuticky významných derivátů thioakridinu, dostupných v miligramových množstvích, vypracována nová analytická metoda. Pro jednotlivé analyty byl sledován vliv experimentálních podmínek na jejich retenci, separační účinnost i citlivost detekce, a to s ohledem na rozlišení hlavní složky od doprovodných nečistot a následnou kvantifikaci. Za optimalizovaných podmínek byla pro každý studovaný derivát thioakridinu určena jeho čistota metodou vnitřní normalizace.

Pro chirální separace vybraných opticky aktivních léčiv (β -blokátory, profeny) a herbicidů (deriváty chlorofenoxypropanové kyseliny) byly použity dva glykopeptidy, vankomycin a teikoplanin, patřící do skupiny nejmodernějších, multimodálních chirálních selektorů na bázi makrocyclických antibiotik. Chirální selektory byly použity jednak vázané na silikagelové matrici ve formě chirální stacionární fáze, jednak volné jako přídavek do mobilní fáze.

Bylo zjištěno, že teikoplaninová chirální stacionární fáze je vhodná pro separaci enantiomerů většiny studovaných β -blokátorů. Nejlepší výsledky byly dosaženy s mobilní fází o složení 100/0,01/0,01 (v/v/v) MeOH/HAc/TEA. Polárně organický mód poskytuje obecně vyšší separační účinnost ve srovnání s reverzním systémem při zachování podobné selektivity.

Podstatně méně se teikoplaninová CSP osvědčila pro enantioseparaci polárnějších profenů a CPPA.

Pro přídavek teikoplaninu do mobilní fáze byl vybrán systém 30/70 (v/v) MeOH/0,1% TEAA, pH 5,0, který zajišťuje potřebnou rozpustnost teikoplaninu v mobilní fázi a dostatečnou retenci pouze pro CPPA. Na achirální stacionární fázi C18 v kombinaci s mobilní fází s přídavkem teikoplaninu o výsledné koncentraci 0,1 mmol/l došlo k enantioseparaci dvou ze tří CPPA až na základní linii. Použití vyšší koncentrace teikoplaninu nebylo možné vzhledem k jeho omezené rozpustnosti.

Porovnáním výsledků získaných v obou systémech se ukázalo, že použití teikoplaninové CSP a achirální mobilní fáze je z analytického hlediska výhodnější, vzhledem k dosažení lepších hodnot chirálního rozlišení pro všechny studované deriváty při podstatně kratší době analýzy.

Pro studium přídavku vankomycinu do mobilní fáze za použití dvou achirálních stacionárních fází lišících se délkou navázaného alkylového řetězce (C8 a C18) byla variací jednotlivých experimentálních parametrů vybrána mobilní fáze methanol/0,1% TEAA, pH 5,0, 50/50 (v/v), která zajišťovala akceptovatelnou

dobu retence všech profenů a zároveň umožňovala rozpouštění vankomycinu až do koncentrace 4,0 mmol/l. Obecně vyšší hodnoty retence byly pro studované profeny pozorovány na koloně s kratším nepolárním řetězcem. Zvyšováním koncentrace vankomycinu v mobilní fázi docházelo k prodlužování retence všech analytů. Vyšší retence analytu při vyšší koncentraci vankomycinu je zřejmě způsobena silnější interakcí asociátu analyt-vankomycin se stacionární fází. Nejlepší separace enantiomerů všech studovaných profenů (s výjimkou flobufenu) bylo dosaženo při nejvyšší použité koncentraci vankomycinu (4,0 mmol/l). V žádném z testovaných separačních systémů však nedošlo k enantioseparaci flobufenu.

Obecně nižší byly hodnoty rozlišení enantiomerů profenů získané s vankomycinovou CSP v mobilní fázi MeOH/1,0% TEAA, pH 5,0, s nízkým obsahem methanolu (20 - 30 obj. %). Jedinou výjimkou byla úspěšná enantioseparace flobufenu, jehož aromatická část molekuly nacházející se dále od chirálního centra (ve srovnání s ostatními profeny) a přítomnost ketoskupiny mohou ze sterického hlediska k chirální diskriminaci přispívat lépe v případě vankomycinu vázaného na silikagelovém nosiči.

Z porovnání výsledků získaných s vankomycinovým chirálním selektorem testovaným ve formě vázané (CSP) versus volné vyplynulo, že v případě profenů je vhodnější (s výjimkou flobufenu) přidávek vankomycinu do mobilní fáze, pravděpodobně z důvodu lepší dostupnosti interakčních míst.

Výsledky získané v této dizertační práci demonstrují vysokou schopnost kapilární kapalinové chromatografie se podílet na řešení širokého spektra analytických úkolů zahrnujících problematiku achirálních i chirálních separací. Možnost vyzkoušet odlišná separační uspořádání přispěla v oblasti analýzy opticky aktivních látek k lepšímu pochopení složitého mechanismu chirálního rozpoznávání.