

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra fyzikální a makromolekulární chemie

STANOVENÍ ENANTIOMERŮ VYBRANÝCH LÉČIV
POMOCÍ HPLC

Determination of enantiomers of selected drugs by HPLC

Bakalářská práce
studijního oboru chemie v přírodních vědách

Praha 2010

Radim Geryk

Název práce: Stanovení enantiomerů vybraných léčiv pomocí HPLC

Anotace: Práce je zaměřena na separaci vybraných enantiomerů léčiv pomocí chirálních stacionárních fází na bázi makrocyclických antibiotik

Klíčové slova: enantioseparace, chirální HPLC, makrocyclická antibiotika, citalopram

Title: Determination of enantiomers of selected drugs by HPLC

Annotation: This work is focused on separation of selected drugs using chiral stationary phases based on macrocyclic antibiotik by HPLC

Key words: enantioseparation, chiral HPLC, macrocyclic antibiotics, citalopram

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně pod vedením školitele Prof., RNDr. Evy Tesařové, CSc. a použil jsem jen pramenů, které cituji a uvádím v seznamu použité literatury.

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

V Praze dne 1. června 2010

Poděkování

Rád bych poděkoval svému školiteli Prof., RNDr. Evě Tesařové, CSc. za odborné vedení, pomoc a trpělivost při tvorbě bakalářské práce.

Poděkování patří také mým rodičům za velkou podporu během studia, bez které bych se neobešel.

Abstrakt

Léčiva se často vyskytují ve formě enantiomerů, přičemž v mnoha případech pouze jeden z enantiomerů vykazuje požadované terapeutické účinky.

Citalopram je chirální léčivo a používá se jako antidepresivum pro léčbu panické úzkosti, pocitu strachu či tlumení vnímání bolesti. Citadiol je jeho syntetický prekursor, který se rovněž vyskytuje ve formě dvou enantiomerů.

Pro chirální separace výše uvedených látek byla použita metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie s chirálními stacionárními fázemi na bázi makrocyclických antibiotik. Polárně-organický a ionotově-polární separační módy se ukázaly jako optimální pro chirální separace vybraných enantiomerů.

Cílem této práce bylo sledování enantioseparačního „chování“ citalopramu a citadiolu a nalezení vhodných separačních podmínek v HPLC.

Abstract

Drugs are often chiral compounds. In many cases only one of the enantiomers has required therapeutical effects.

Citalopram belongs to the group of chiral drugs. This drug is used as an antidepresivum for treating anxiety, fear or suppressing of pain feeling. Its synthetical precursor is named citadiol and is also chiral.

HPLC method with chiral stationary phases based on macrocyclic antibiotics was applied for enantioseparation of the above-mentioned compounds. Polar-organic and ionic-polar separation modes were found to be suitable for chiral separation of citalopram and citadiol enantiomers.

The aim of this work was monitoring of enantioseparation “behavior” of selected enantiomers in various separation systems and to find suitable separation conditions for HPLC analysis.

Obsah

	Seznam použitých zkratk a symbolů	8
1	ÚVOD.....	9
2	TEORETICKÁ ČÁST	9
2.1	Chiralita	10
2.2	Chirální léčiva	11
2.3	Léčiva studovaná v této práci.....	12
2.3.1	Citadiol	12
2.3.2	Citalopram	13
2.4	Metody používané nejen k separaci enantiomerů.....	14
2.4.1	Kapilární elektroforéza	14
2.4.2	Micelární elektrokinetická chromatografie	15
2.4.3	Chromatografické metody.....	15
2.4.3.1	Plynová chromatografie.....	15
2.4.4.2	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie.....	16
2.5	Chirální separace	16
2.5.1	Polysacharidové stacionární fáze.....	17
2.5.2	Proteinové stacionární fáze	17
2.5.3	Cyklodextriny.....	18
2.5.4	Makrocyclická antibiotika	18
2.5.4.1	Ristocetin A	19
2.5.4.2	Teikoplanin	20
2.5.4.3	Teikoplanin aglykon	21
2.5.4.4	Vankomycin.....	22
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	23
3.1	Přístroje a pomůcky	23
3.2	Použité chemikálie	23
3.3	Příprava vzorků	24
3.4	Podmínky separace	24
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	25

4.1	Enantioseparace na CSP s navázaným ristocetinem A	25
4.2	Enantioseparace na CSP s navázaným vankomycinem.....	27
4.3	Enantioseparace na CSP s navázaným teikoplaninem	32
5	ZÁVĚR	36
	Literatura	37

Seznam použitých zkratk a symbolů

α	relativní retence
ACN	acetonitril
CE	kapilární elektroforéza
CLC	kapilární kapalinová chromatografie
CSP	chirální stacionární fáze
GC	plynová chromatografie
HOAc	kyselina octová
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
k	retenční faktor
MA	makrocyclická antibiotika
MEKC	micelární elektrokinetická chromatografie
MeOH	methanol
R	rozlišení
SDS	sodium dodecylsulfate
T	teikoplanin
TEA	triethylamin
V	vankomycin

1 ÚVOD

Více než polovina dostupných léčiv vykazuje chiralitu. Léčiva jsou předepisována ve formě racemátů. V posledních dvou desetiletích sílí snaha o vývoj léčiv založených pouze na jednom, účinném enantiomeru.

Pro tyto účely je třeba hledat separační metody vhodné jak pro analytické, tak pro preparativní aplikace. Mezi používané metody sloužící k separaci enantiomerů patří kapilární elektroforéza (CE), plynová chromatografie (GC) či vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC).

Tato práce je zaměřena na porovnání enantioseparačního chování vybraných léčiv na různých kolonách s chirálními stacionárními fázemi na bázi makrocyclických antibiotik.

Cílem předkládané práce bylo sledování retenčního chování jednotlivých enantiomerů vybraných léčiv a nalezení vhodných podmínek k jejich rozdělení.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Chiralita

Přírodní látky se často vyskytují ve dvou prostorových formách, jejichž vzájemný vztah je totožný se vztahem pravé a levé ruky. Tyto molekuly se označují jako chirální (z řeckého *cheiro*, ruka). Chirální molekula nemá střed, osu ani rovinu symetrie. U organických molekul je např. atom uhlíku tetraedricky vázán k různým atomům či skupinám atomů. Takový uhlíkový atom nazýváme asymetrický a můžeme jej označit za centrum chiraloty. Kromě uhlíku může být centrem chiraloty atom křemíku, síry, dusíku, fosforu¹.

Molekuly, které nejsou identické se svými zrcadlovými obrazy, nazýváme enantiomery (z řeckého *enantio*, opačný). Enantiomery, v souvislosti s odlišným otáčením roviny polarizovaného světla, rozlišujeme v názvu sloučenin afixem (+) nebo (-), které se vztahují ke smyslu otáčení roviny polarizovaného světla definované vlnové délky, nejběžněji při sodíkové čáře 589 nm*.

Už v roce 1849 Luis Pasteur (1822-1895) studoval krystalické soli kyseliny vinné (soli 2,3-dihydroxybutandiové kyseliny) získané z vína a zjistil, že vznikaly současně dva rozdílné typy krystalů. Tyto dva druhy krystalů byly vzájemnými zrcadlovými obrazy a nebylo je možné ztotožnit. Enantiomerní soli kyseliny vinné se liší pouze interakcí se světlem, jinak mají vlastnosti shodné. Kromě tvaru krystalů mají stejné teploty tání, varu, stejnou rozpustnost či stejné spektroskopické vlastnosti².

*Světlo je příčné elektromagnetické záření a vektor intenzity elektrického pole E je vždy kolmý na směr šíření světla. Světlo je obecně nepolarizované a opticky aktivní látky otáčejí rovinu polarizovaného světla. V případě lineárně polarizovaného světla kmitá vektor E neustále v jedné rovině, v tzv. rovině kmitů.

Znaménkem (+) se označují izomery pravotočivé a znaménkem (-) izomery levotočivé. Změřená velikost úhlu otáčení α závisí na počtu molekul opticky aktivní látky, která vstoupila do dráhy světelnému paprsku. Enantiomery se strukturně liší absolutní konfigurací. Ve spojení s názvem sloučeniny a pro odlišení absolutní konfigurace se používá označení R a S, který se uvádí před názvem sloučeniny. Každou látku, která obsahuje ekvimolární množství obou enantiomerů, nazýváme racemát (značíme rac , $racem-$, RS či SR) nebo racemická modifikace, označuje se symbolem (\pm) a jde o směs pravotočivé a levotočivé formy o složení 1:1. Racemát má nulovou hodnotu optické aktivity a nižší bod tání než čistý enantiomer. Přidání malého množství čistého enantiomeru způsobí vždy zvýšení teploty tání².

2.2 Chirální léčiva

Enantiomery chirálních sloučenin mají stejné fyzikální vlastnosti, ale mohou mít odlišné biologické vlastnosti. R-enantiomer limonenu voní po pomerančích, zatímco S-enantiomer po citronu. Dalším příkladem je cyklický monoterpen karvon. Jeho R-izomer voní po mátě peprné, ale S-izomer vytváří charakteristickou vůni kmínu. Chemickou reaktivitu mají enantiomery shodnou v achirálním prostředí, zatímco v chirálním prostředí může být velký rozdíl reaktivity jednotlivých izomerů³.

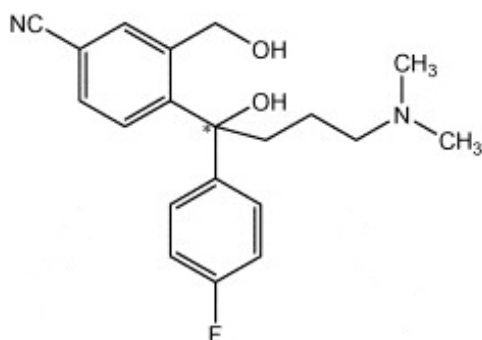
Protože vnitřní prostředí organismů je chirální, může být biologická aktivita chirálních sloučenin, např. léčiv, velice rozdílná. Dlouho mohly být enantiomery léčiv podávány jen ve formě racemátů, teprve moderní chemické metody umožnily připravovat pomocí stereoselektivních syntéz pouze jeden z enantiomerů. Při interakci léčiv s cílovými receptory v organismu se uplatňují molekuly, jejichž struktura odpovídá aktivnímu místu receptoru. Vyskytuje-li se léčivo ve dvou (nebo více) prostorových izomerech (enantiomerech), pak se lépe váže na receptor ten enantiomer, jehož struktura koresponduje dokonaleji struktuře aktivního místa. Nositelům žádoucích účinků je často jen jeden enantiomer. Druhý enantiomer může být farmakologicky méně účinný či neúčinný, může mít jinou farmakokinetiku, jiný způsob metabolismu či dokonce může být toxický. Proto je snaha podávat léčiva pouze s enantiomerem s farmakologickým účinkem (*eutomer*) bez přítomnosti nežádoucího enantiomeru (*distomer*). Například S-enantiomer ketaminu je silně

anestetikum, R-enantiomer má mnohem slabší anestetický účinek, ale má psychoaktivní účinky a může vyvolat halucinace. Neznalost biologického účinku jednotlivých enantiomerů se prokázala u hypnotika zvaného thalidomid, který byl podáván těhotným ženám. S-enantiomer se metabolizoval na teratogenní (S)-N-ftalylasparagovou kyselinu, která způsobovala četné malformace plodu⁴.

2.3 Látky a léčiva studovaná v této práci

2.3.1 Citadiol

Citadiol (viz obr. 1) je syntetický prekursor citalopramu, který se vyskytuje ve formě dvou enantiomerů. K rozdělení (S)-citadiolu a (R)-citadiolu lze použít chromatografickou separaci enantiomerů, ale častější je metoda krystalizace citadiolu pomocí (R) nebo (S) di-*p*-tuloyl vinné kyseliny⁵.



Obr. 1: Citadiol

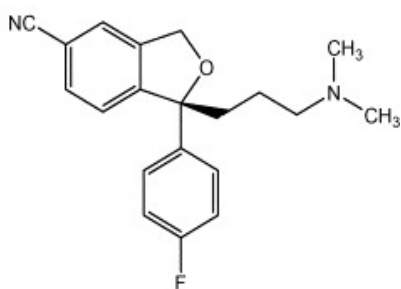
Všechna studovaná léčiva se používají jako SSRI (Selective serotonin reuptake inhibitors) antidepressiva. Mezi nejvíce používané látky patří citalopram a escitalopram⁶.

2.3.2 Citalopram

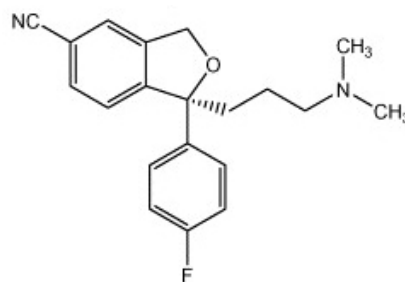
Citalopram je racemát, ekvimolární směs dvou, R- a S-enantiomerů (1-[3-(dimethylamino)propyl]-1-(4-fluorofenyl)-1,3-dihydroisobenzofuran-5-karbonitril) (viz obr. 2 a 3) je vysoce užívané antidepresivum, které slouží k léčbě depresivních onemocnění, panické úzkosti, strachu, prevenci relapsu, tlumení vnímání bolesti či obsedantně-kompulzivních poruch bez ohledu na příčinu či formu. Citalopram působí na centrální nervový systém a zvyšuje v určitých oblastech nervové soustavy hladinu serotoninu⁷.

Serotonin je tělu vlastní látka která je velmi důležitá pro správnou činnost nervové soustavy. Při depresivních poruchách dochází k nedostatku serotoninu v mozku*. Citalopram působí výhradně na serotonin, proto indukuje pouze méně závažné vedlejší účinky jako ospalost či zvýšená potivost.

Citalopram by se neměl užívat současně s antidepresivy ze skupiny inhibitorů monoaminoxidázy, protože by mohlo dojít k serotoninovému syndromu. Serotoninový syndrom je stav, který vzniká účinkem vysokého množství serotoninu v organismu. Projevuje se změnami chování, euforií, dezorientací či bolestmi hlavy. Léčba vzniklého syndromu je symptomatická. Nezbytností je okamžité vysazení antidepresiv, psychotropních látek (LSD), potravinových doplňků obsahujících



Obr. 2: Citalopram



Obr.3: Escitalopram

* Serotonin je neurotransmitér, který je syntetizován serotoninergními neurony v centrální nervové soustavě. Kromě extáze a některých antidepresiv serotonin obsahují potraviny jako sýr s modrou plísní, tuňák, drůbeží játra či listová zelenina.

tryptofan a jeho deriváty⁸. Jeho výskyt narůstá od té doby, kdy byly do léčby depresí zavedeny léky, které ovlivňují metabolismus tohoto biogenního aminu. Citalopram se metabolizuje na účinný demethylcitalopram, didemethylcitalopram, citalopram-N-oxid a neúčinný deaminovaný derivát propionové kyseliny. Z lidského těla se vylučuje především játry (85%). Má nízkou akutní toxicitu a nepůsobí mutageně ani karcinogenně⁹.

Escitalopram (S)-1-[3-(dimethylamino)propyl]-1-(4-fluorofenyl)-1,3-dihydroisobenzofuran-5-karbonitril je enantiomer citalopramu. Používá se k léčbě depresivních epizod nebo sociálně úzkostných poruch. Při léčbě s inhibitory monoaminoxidázy dochází ke kontraindikaci. Naopak jsou známy případy, kdy dochází ke zvýšení účinku antidepresiv při současném užívání s lithiem či tryptofanem. Nežádoucí účinky se často projevují zácpou, zvracením nebo poruchami metabolismu, při kterých dochází ke snížení či zvýšení chuti k jídlu. Escitalopram se metabolizuje v játrech na farmakologicky účinné demethylované a didemethylované metabolity a dochází k oxidaci dusíku na N-oxid. Předávkování escitalopramem se projevuje zhoršením funkce nervového systému¹⁰.

2.4 Metody používané nejen k separaci enantiomerů

2.4.1 Kapilární elektroforéza (CE, capillary electrophoresis)

Tato moderní separační technika je založena na elektroforetické migraci iontů v elektrickém poli. Separace se provádí v křemenných kapilárách o vnitřním průměru 50 – 100 μm a celkové délce 30 – 110 cm. Platí, že čím je menší průměr kapiláry, tím dochází k větší separační účinnosti na úkor citlivosti detekce. Kromě křemenných kapilár se používají i kapiláry z materiálů jako teflon či fluorované polymery¹¹. Kapilára je naplněna pufrům (základním elektrolytem), v jehož prostředí separace analytů probíhá. Migrace nabitých analytů je ovlivněna velikostí iontu a nábojem. Lze ji tudíž ovlivnit např. hodnotou pH základního elektrolytu. Mezi výhody kapilárních elektromigračních metod patří malá spotřeba vzorku a činidel pro separaci, vysoká rychlost analýzy a velká účinnost separace. Mezi nevýhody patří

nižší citlivost.

2.4.2 Micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC, micellar electrokinetic chromatography)

Tato separační technika patří rovněž mezi elektromigrační metody. Byla vyvinuta pro analýzu neutrálních molekul hydrofilní a hydrofobní povahy, které samy v kapiláře nemigrují. Pro separaci analytů se využívá jejich solvatace v micelách, které vznikají v separačním pufru po přidání vhodného tenzidu v koncentraci vyšší než je jeho kritická micelární koncentrace. Jako tenzid se nejčastěji používá dodecylsírán sodný (SDS, sodium dodecylsulfate), který obsahuje 12-ti uhlíkatý hydrofobní řetězec a hydrofilní sulfátovou skupinu.

2.4.3 Chromatografické metody

Chromatografie je separační metoda, při které se analyt dělí na základě fyzikálně-chemických interakcí mezi dvě nemísitelné fáze. Mobilní, která je pohyblivá, a stacionární, nepohyblivou. Mobilní fáze může být rovněž jak plynná, tak kapalná. Látky, které mají vysokou afinitu ke stacionární fázi se v koloně pohybují pomaleji než látky, které se stacionární fázi neinteragují.

Tato metoda byla objevena v roce 1903 ruským botanikem Cvětem, který na kolonu naplněnou rozemletou křídou nanesl petroletherový extrakt z rostlin a směs se rozdělila na barevné zóny.

2.4.3.1 Plynová chromatografie (GC, gas chromatography)

Plynová chromatografie je separační metoda založená na rozdílu v distribuci látek mezi dvě nemísitelné fáze. Mobilní fází je nosný plyn, pohybující se skrz nebo podél stacionární fáze, která je umístěna v koloně. Tato metoda je použitelná pro látky nebo jejich deriváty, které lze převést do plynné fáze za použitých teplot.

2.4.3.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC, high performance liquid chromatography)

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) se vyvinula z plynové chromatografie koncem 60. let. Mezi její největší výhody patří široký rozsah použitelnosti. Lze jí separovat až 80% známých látek, které se liší ve fyzikálních a chemických vlastnostech¹². Předností je možnost účinně ovlivňovat separaci volbou stacionární, ale rovněž změnami složení mobilní fáze, která je u plynové chromatografie inertní. Celý systém je pod tlakem několik MPa, proto se musela vyvinout čerpadla, které zajišťují průtok kapaliny při těchto tlacích, zařízení pro přesné dávkování malých objemů při vysokém tlaku a citlivá detekční zařízení. V dnešní době se kromě běžných kolon používají kapilární kolony, které mají řadu výhod. Např. je zapotřebí menších množství vysoce čistých chemikálií a rozpouštědel, jako mobilní fáze lze používat „exotické“ látky, které by nebylo možné jinak obstarat v dostatečných dávkách¹². Zkracuje se doba analýzy a zlepšují se separační výsledky. Kapilární LC (CLC) klade však mnohem větší nároky na instrumentaci, a proto se v řadě (komerčních) analytických laboratoří uplatňuje HPLC, která je robustnější a levnější.

HPLC se v dnešní době nejvíce využívá v klinické a farmaceutické analýze, biochemii, ale také v anorganické analýze, kdy se pomocí HPLC stanovují kationty, a především anionty ve všech druzích vod¹³.

Všechny výše zmíněné separační metody lze použít pro dělení enantiomerů. Taková aplikace vyžaduje interakci mezi chirálním selektorem a chirálním analytem.

2.5 Chirální separace

V dnešní době můžeme zaznamenat obrovský nárůst zájmu o chirální separace léčiv či pesticidů. To souvisí s vývojem a aplikací chirálně čistých léčiv a rozvojem nových enantioseparačních metod¹⁴.

Enantioseparační metody se značně rozšířily především ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii¹⁵. První zaznamenaná enantioseparace se datuje do roku 1960 a dnes je chirální separace pomocí chromatografie velmi využívána pro její

relativní jednoduchost, velkou účinnost, opakovatelnost a reprodukovatelnost¹⁶.

V kapalinové chromatografii lze uskutečnit chirální separace dvěma základními způsoby. Prvním způsobem je nepřímé dělení enantiomerů vytvořením diastereoizomerů derivatizací analytu před vlastní separací. Druhým způsobem je přímé dělení enantiomerů ve stereoselektivním prostředí¹⁷. Můžeme používat chirální stacionární fáze, kdy je chirální selektor navázán na nosič, a nechirální mobilní fáze nebo se používá nechirální stacionární fáze a chirální selektor je přidán do mobilní fáze. Využití chirální stacionární fáze se většinou dává přednost.

Základem chirálních separací jsou tedy interakce analytu a chirálního selektoru buď vázaného na stacionární fázi nebo v mobilní fázi. Dochází ke vzniku diastereoizomerních komplexů, které mají odlišné konstanty stability a tím i rozdílnou retenci. Na interakcích se mohou podílet např. vodíkové vazby, π - π interakce, dipól-dipólové interakce a stérické efekty. Separace enantiomerů na chirální stacionární fázi závisí rovněž na použité mobilní fázi, na objemové frakci organického rozpouštědla, pH, koncentraci a typu pufru a teplotě.

V dnešní době existuje několik hlavních typů chirálních stacionárních fází, mezi které patří polysacharidové, proteinové, cyklodextrinové, Pirklovy donor-akceptorové stacionární fáze, chirální crown ethery, enzymy s vysokou stereoselektivitou pro určité substráty a v neposlední řadě makrocyclická antibiotika.

2.5.1 Polysacharidové stacionární fáze

Polysacharidy jako celulosa a amylosa jsou jedny z nejvíce dostupných opticky aktivních polymerů a mohou být snadno upraveny na triestery a trikarbamáty¹⁸. Používají se především k enantioseparaci velmi polárních látek, které jsou schopny vytvářet vodíkovou vazbu na více místech.

2.5.2 Proteinové stacionární fáze

Využívají se přírodní proteiny navázané na silikagelové matici¹⁹. Používá se nejvíce lidský či hovězí sérový albumin nebo α_1 -kyselý glykoprotein. Tyto proteiny

obsahují velké množství chirálních center poskytujících tak velký počet vazebných míst.

2.5.3 Cyklodextriny

První zmínka o cyklodextrinech se datuje do roku 1891, kdy Villiers studoval degradaci škrobu pomocí bakterie *Bacillus amylobacter*. Villiers izoloval malou frakci dvou krystalických produktů, které byly později identifikovány jako α -cyklodextrin a β -cyklodextrin²⁰. V období mezi roky 1903-1911 studoval Schardinger fyzikální vlastnosti cyklodextrinů a izoloval bakterii *Bacillus macerans*, která se stala základním zdrojem glykosylové transferázy, enzymu, který přeměňuje škrob na cyklodextriny²¹.

Cyklodextriny jsou cyklické oligosacharidy tvořené z α -1,4 spojených D-glukopyranosových jednotek. Kruhy, které se tvoří z 6, 7 nebo 8 jednotek se nazývají α -, β - nebo γ - cyklodextriny. Se vzrůstajícím počtem jednotek dochází ke zkracování vzdálenosti mezi hydroxylovými skupinami a roste pevnost vodíkových vazeb. Enantioselektivní vlastnosti cyklodextrinů souvisejí s působením hydroxylových skupin glukosových jednotek v poloze 2 a 3. Dutina cyklodextrinové struktury vykazuje hydrofobní charakter, povrch cyklodextrinu je hydrofilní²².

2.5.4 Makrocyclická antibiotika

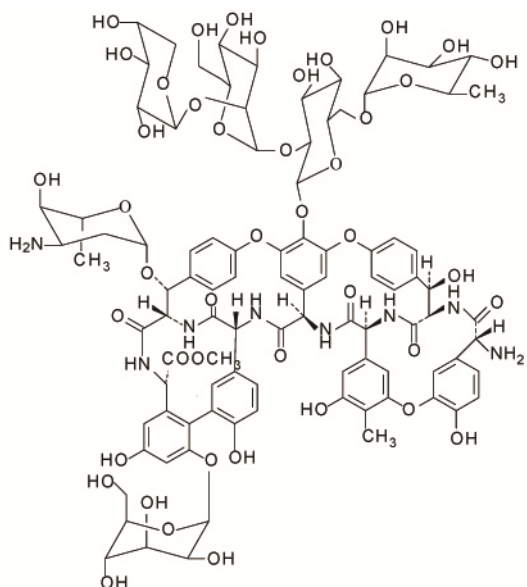
Makrocyclická antibiotika (MA) patří mezi relativně novou skupinu chirálních selektorů a získala obrovskou popularitu jako chirální selektor v mnoha separačních metodách. Jsou to složité organické látky, jejich molekulová hmotnost se pohybuje v rozmezí od 600 do 2200 a obsahují velké množství chirálních center a funkčních skupin, které umožňují nejrozličnější mezimolekulární interakce s chirálními molekulami (vodíkové interakce, dipól-dipól interakce, inkluze atd.) a síla těchto interakcí závisí také na volbě mobilní fáze. Kromě hydrofobního řetězce obsahují MA amidové vazby, hydroxylové skupiny, aminové skupiny a velké množství ionizovatelných skupin, které zajišťují dobrou rozpustnost ve vodných roztocích.

Uplatnění ionizovaných skupin v interakčním mechanismu lze ovlivnit hodnotu pH pufru. Existuje velké množství makrocyclických antibiotik. V HPLC se používají tři základní typy makrocyclických sloučenin, které jsou kovalentně vázané na silikagel²³.

Nejpoužívanější makrocyclická antibiotika jsou glykopeptidy, mezi které patří ristocetin A, vankomycin, teikoplanin, teikoplanin aglycon²⁴ a avoparcin. Struktura MA ukazuje, že pro tyto látky jsou typické vodíkové, elektrostatické, π - π interakce a dipólové a sterické interakce. Všechna glykopeptidová antibiotika se skládají z aglykonové části spojené do makrocyclických kruhů, které vytvářejí charakteristický košovitý tvar a liší se počtem a typem sacharidových skupin, které mohou volně rotovat²⁵. Aglykonový koš tvoří 3-4 makrocycly složené ze spojených aminokyselin a substituovaných fenolů²⁶.

2.5.4.1 Ristocetin A

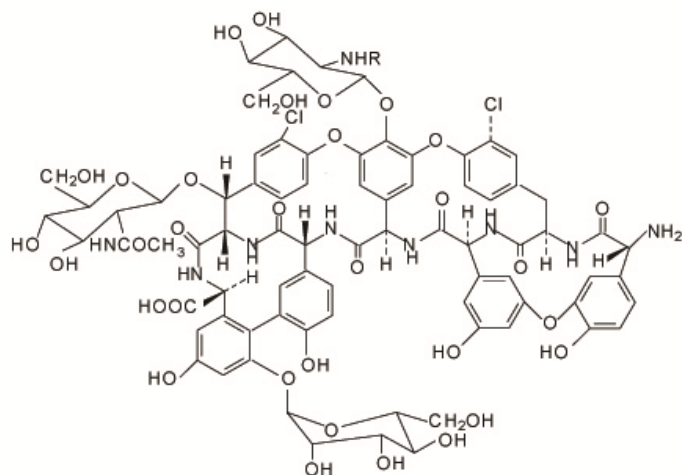
Ristocetin A (viz obr. 4) se používá jako antibiotikum k léčbě stafylokokových infekcí. Ristocetin A má řadu výhod při použití jako chirální selektor v CE a HPLC. Vzhledem k objemnější navázané cukerné složce se váže slaběji na stěnu kapiláry než vankomycin, což často vede ke zkrácení doby analýzy v CE. Ristocetin A má také větší stabilitu v roztoku než vankomycin. Obsahuje 38 chirálních center²⁷. Na rozdíl od teikoplaninu a vankomycinu nemá ristocetin A volnou karboxylovou skupinu, ale je to ester. Pomocí ristocetinu A jako chirální stacionární fáze bylo rozlišeno velké množství enantiomerů včetně protizánětlivých léčiv, herbicidů či důležitých biologických sloučenin²⁸.



Obr. 4: Ristocetin A

2.5.4.2 Teikoplanin

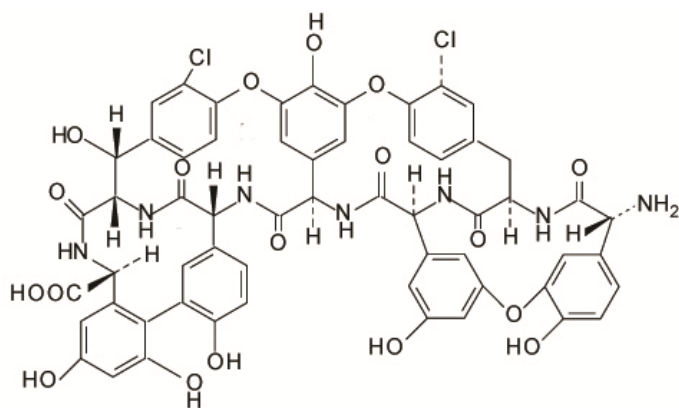
Teikoplanin (viz obr. 5) je antibiotikum, které se používá k léčbě infekcí způsobených grampozitivními bakteriemi²⁹. Teikoplanin je unikátní mezi chirálními selektory díky dlouhému hydrofobnímu konci. Jeho molekula obsahuje 23 chirálních center, 7 benzoových kruhů a velká množství funkčních skupin, včetně tří cukerných zbytků³⁰, které způsobují horší přístupnost analytů k aromatickým jádrům a karbonylovým skupinám a tím omezují schopnost interagovat s n a π -elektrony analytu²⁵.



Obr. 5: Teikoplanin

2.5.4.3 Teikoplanin aglykon

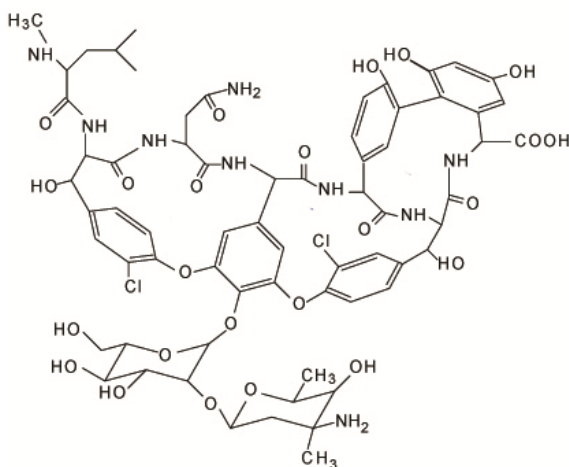
Teikoplanin aglykon (viz obr. 6) obsahuje 8 chirálních center a vyznačuje se vysokou selektivitou na aminokyseliny, peptidy, sulfoxidy či neutrální molekuly²⁴. Na rozdíl od molekuly teikoplaninu neobsahuje hydrofobní řetězec a cukerné složky, a proto jsou jeho ionizovatelné skupiny odhalenější a tím přístupnější interakcím s analyty²⁵.



Obr. 6: Teikoplanin aglykon

2.5.4.4 Vankomycin

Vankomycin (viz obr. 7) je glykopeptidové antibiotikum, které se používá s protí stafylokokům a při závažných či rezistentních infekcích. V jeho molekule se nachází 18 chirálních center. Vankomycin je tetrapeptid, který obsahuje v molekule kyslíkové můstky či karboxylovou skupinu. Rovněž CSP na bázi vankomycinu našly uplatnění při CE enantioseparacích. Používá se k separacím chirálních protizánětlivých a protinádorových léčiv či pesticidů.



Obr. 7: Vankomycin

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Přístroje a pomůcky

Kapalinový chromatograf:

Pumpa: DeltaChrom™ SDS 030 WATREX®, Praha, ČR

Detektor: DeltaChrom™ UVD 200 WATREX®, Praha, ČR

Dávkovací ventil: RHEODYNE s dávkovací smyčkou 20 µl, Cotati, CA, USA

Použité kolony:

250x4,6 mm, 5 µm, CHIROBIOTIC R- ristocetin A vázaný na silikagel

250x4,6 mm, 5 µm, CHIROBIOTIC T- teikoplanin vázaný na silikagel

250x4,6 mm, 5 µm, CHIROBIOTIC T2- teikoplanin vázaný na silikagel

250x4,6 mm, 5 µm, CHIROBIOTIC V- vankomycin vázaný na silikagel

250x4,6 mm, 5 µm, CHIROBIOTIC V2- vankomycin vázaný na silikagel

Počítačový program: Clarity, WATREX, Praha, ČR

Injekční stříkačka: objem 25 µl, Hamilton Bonadus, AG, Bonadus, Švýcarsko

Váhy: METTLER AE 240, Greifensee, Švýcarsko

3.2 Použité chemikálie

Methanol pro chromatografii, Sigma - Aldrich, ČR

Acetonitril pro chromatografii, Sigma - Aldrich, ČR

Triethylamin (čistoty > 99 %), Sigma - Aldrich, ČR

Kyselina octová (čistoty >= 99,5 %), Fluka, Německo

3.3 Přípravy vzorků

Roztoky citadiolu, citalopramu a escitalopramu byly připraveny rozpuštěním 0,0010 g vzorku v 1 ml methanolu a následně desetkrát zředěny.

3.4 Podmínky separace

K separaci enantiomerů vybraných léčiv bylo použito pět chirálních stacionárních fází na bázi makrocyclických antibiotik uvedených v kapitole 3.1. Složení zkoumaných mobilních fází ukazuje tabulka 1. Práce byla prováděna při laboratorní teplotě. Průtoková rychlost činila 1 ml/min. Tlak se pohyboval v rozmezí 36-85 barr v závislosti na složení mobilní fáze. Pro detekci byl použit spektrofotometrický detektor a měření bylo prováděno při vlnové délce 236 nm.

Tab. 1: Složení mobilních fází při enantioseparacích

acetonitril *	methanol *	triethylamin •	octová kyselina •
90	10	0,10	0,10
85	15	0,10	0,10
70	30	0,10	0,10
0	100	0,20	0,20
0	100	0,10	0,10
0	100	0,05	0,05

* objemová procenta

• přídavek v ml do celkového objemu organických rozpouštědel (100 ml)

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

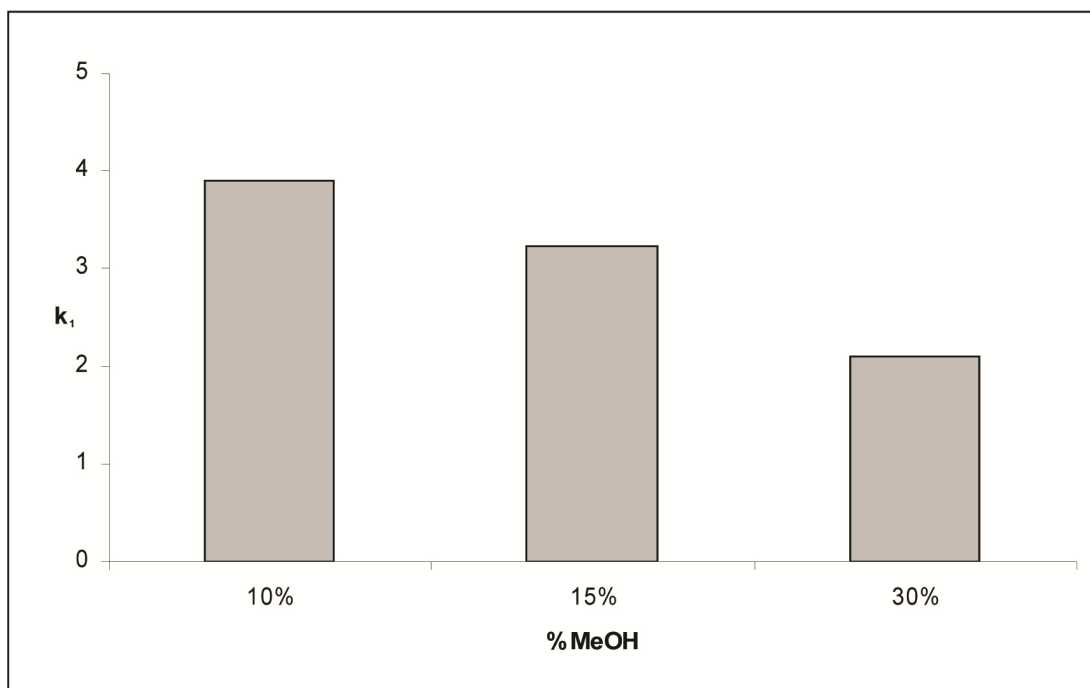
4.1 Enantioseparace na CSP s navázaným ristocetinem A

K separaci byla použita CSP s chirálním selektorem ristocetinem A. Mobilní fáze v polárně organickém módu byla tvořena acetonitrilem (ACN) s methanolem (MeOH) v různém poměru a byl přidán stejný objem malého množství triethylaminu (TEA) a octové kyseliny (HOAc). Výsledky jsou shrnuty v tabulce 2. Relativní retence (α) klesaly se zvyšujícím procentním obsahem methanolu v mobilní fázi. Hodnoty rozlišení jsou vysoké jen pro mobilní fáze s 10% methanolu. Doba analýzy se s klesajícím procentuálním obsahem methanolu zvětšovala.

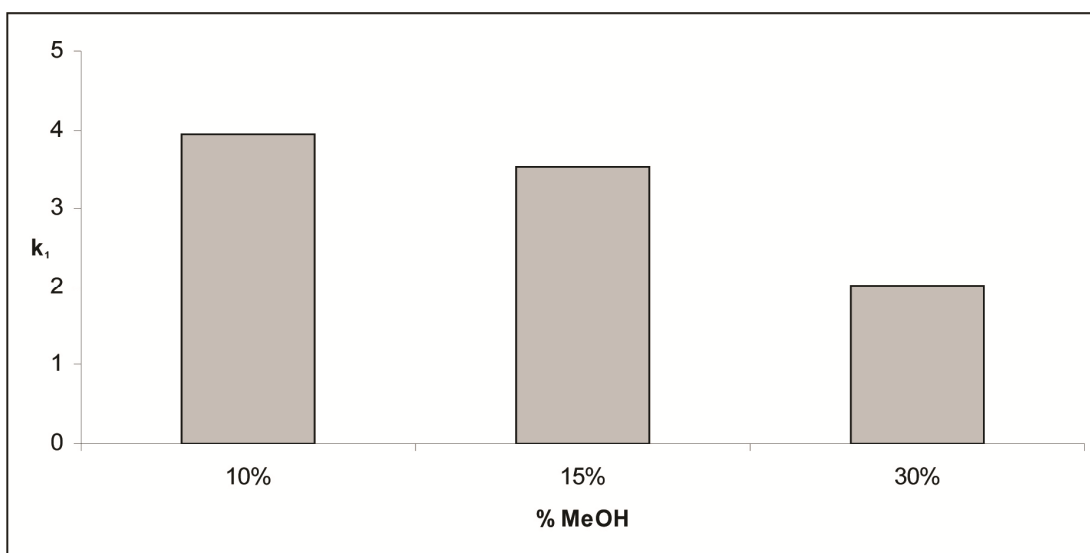
Tab. 2: Vliv složení mobilní fáze na retenci, selektivitu a rozlišení enantiomerů na CSP s vázaným ristocetinem A; mobilní fáze ACN / MeOH (v / v) + přídavek HOAc a TEA o stejném objemu (0,1 ml) do 100 ml mobilní fáze

		MeOH %		
		10	15	30
Citadiol	k_1	3,90	3,23	2,10
	α	1,31	1,14	1,00
	R	1,68	1,35	0,00
Citalopram	k_1	3,94	3,54	2,01
	α	1,26	1,14	1,00
	R	1,63	1,26	0,00

* k_1 retenční faktor prvního eluujícího enantiomeru



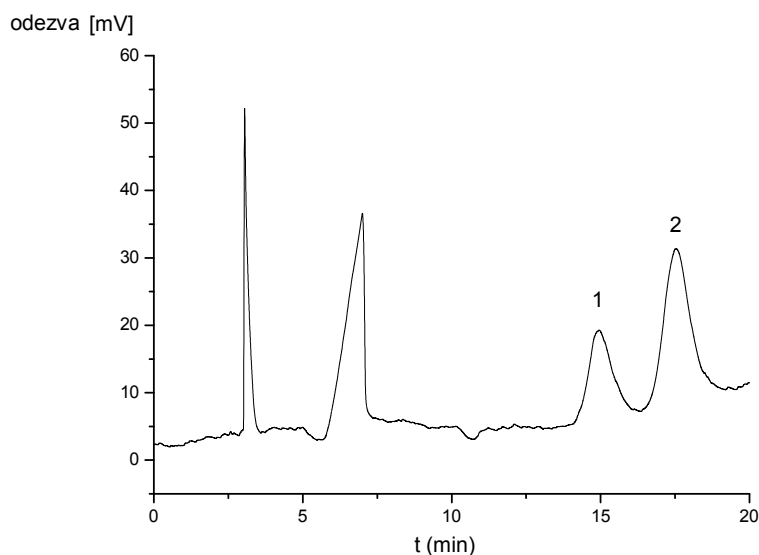
Obr. 8: Závislost retenčního faktoru 1. elujícího enantiomeru citadiolu na obsahu MeOH v mobilní fázi, mobilní fáze ACN / MeOH (10, 15, 30) + přídavek TEA (0,1 ml) a HOAc (0,1 ml) do 100 ml mobilní fáze



Obr. 9: Závislost retenčního faktoru 1. elujícího enantiomeru citalopramu na obsahu MeOH v mobilní fázi, mobilní fáze ACN / MeOH (10, 15, 30) + přídavek TEA (0,1 ml) a HOAc (0,1 ml) do 100 ml mobilní fáze

Ze závislosti na obr. 8 a 9 vyplývá, že retence obou analytů výrazně klesá se zvyšujícím se obsahem MeOH v mobilní fázi.

Nejlepšího rozlišení bylo dosaženo v mobilní fázi v poměru ACN / MeOH, (v / v), 90 / 10 + přídavek TEA (0,1 ml) a HOAc (0,1 ml) do 100 ml mobilní fáze, viz chromatogram na obr. 10



Obr. 10: Chromatogram enantioseparace citadiolu za podmínek: CSP ristocetin A, mobilní fáze ACN / MeOH, (v / v), 90 / 10 + přídavek TEA (0,1 ml) a HOAc (0,1 ml) do 100 ml mobilní fáze; enantiomery 1, 2

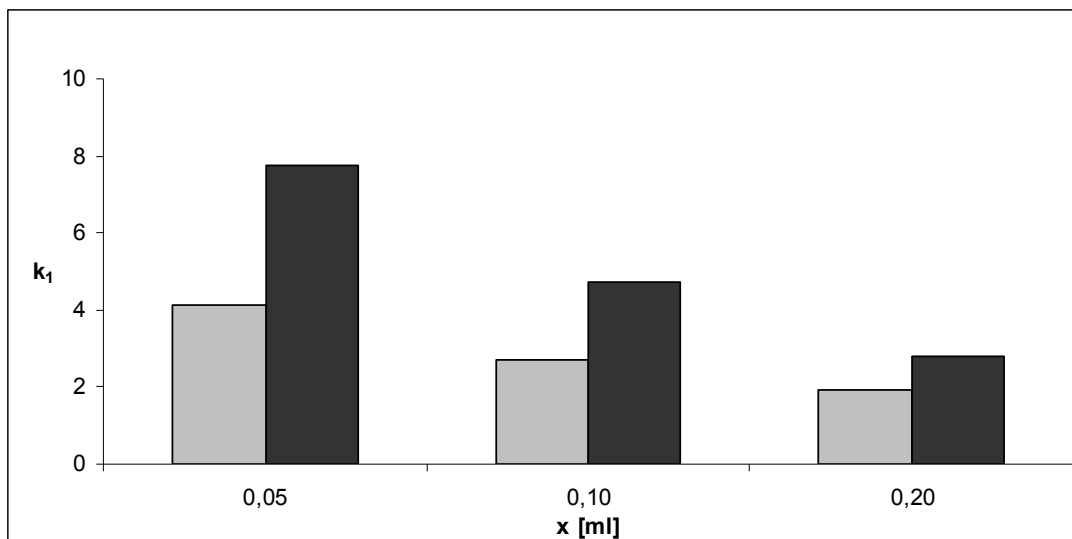
4.2 Enantioseparace na CSP s navázaným vankomycinem

V případě chirálních stacionárních fází na bázi vankomycinu byly testovány dvě kolony lišící se pokrytím silikagelového nosiče vankomycinem- Chirobiotic V a Chirobiotic V2. CSP s navázaným vankomycinem mají značnou enantioselektivitu pro neutrální molekuly, a také na molekuly ve formě amidů, kyselin, esterů a zejména sekundárních a terciárních aminů²⁴. V této práci byly studovány mobilní fáze v polárně iontovém módu, který je použitelný pro molekuly s nejméně jednou ionizovatelnou skupinou navázanou v blízkosti nebo na chirálním centru. V tomto separačním módu se uplatňují π - π a dipólové interakce mezi chirální stacionární fází

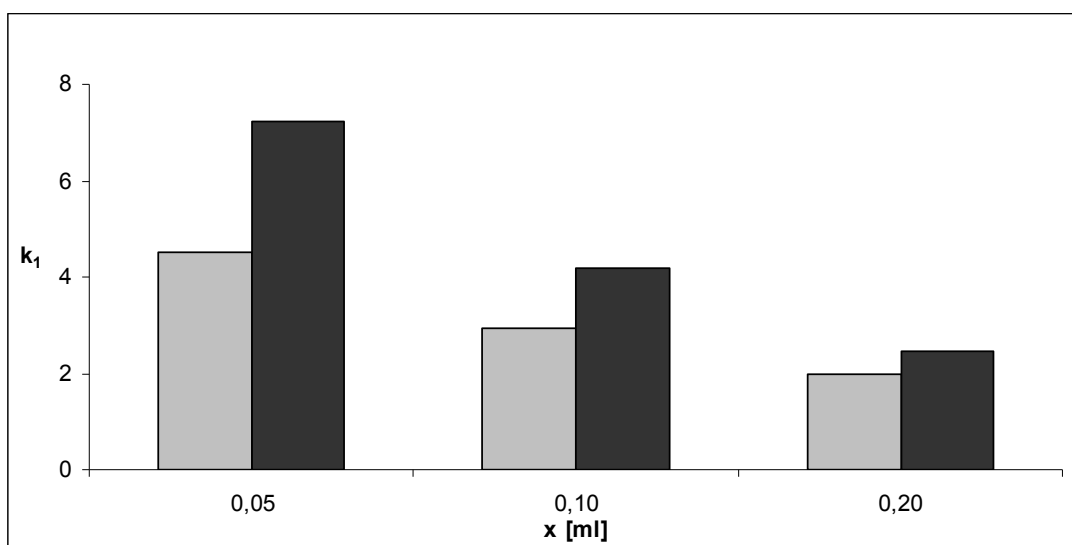
a analytem. Mobilní fáze se skládaly ze 100 objemových procent bezvodého methanolu a z malého přídavku triethylaminu a kyseliny octové v poměru 1:1 v rozmezí objemových procent 0,05 % - 0,2 %. U dalších CSP s navazanými MA nedocházelo k rozdělení jednotlivých enantiomerů při použití tohoto složení mobilní fáze. V tabulce 3 jsou uvedeny výsledky získané na obou CSP na bázi vankomycinu. Rozlišení obou enantiomerů se zvětšovalo s klesajícím množstvím TEA a HOAc, avšak současně docházelo ke zvětšování retenčních časů a tím k prodlužování doby separace.

Tab. 3: Vliv složení mobilní fáze na retenci, selektivitu a rozlišení enantiomerů na CSP s vázaným vankomycinem; mobilní fáze MeOH, 100, (v), + přídavek HOAc a TEA o stejném objemu x do 100 ml mobilní fáze

		x [ml]	0,05	0,10	0,20
Citadiol	k ₁	V	4,14	2,71	1,91
		V2	7,75	4,73	2,80
	α	V	1,03	1,03	1,05
		V2	1,00	1,00	1,00
	R	V	0,51	0,49	0,43
		V2	0,62	0,57	0,47
Citalopram	k ₁	V	4,50	2,95	1,99
		V2	7,22	4,18	2,47
	α	V	1,10	1,10	1,10
		V2	1,11	1,11	1,11
	R	V	1,48	1,45	1,34
		V2	1,64	1,52	1,34



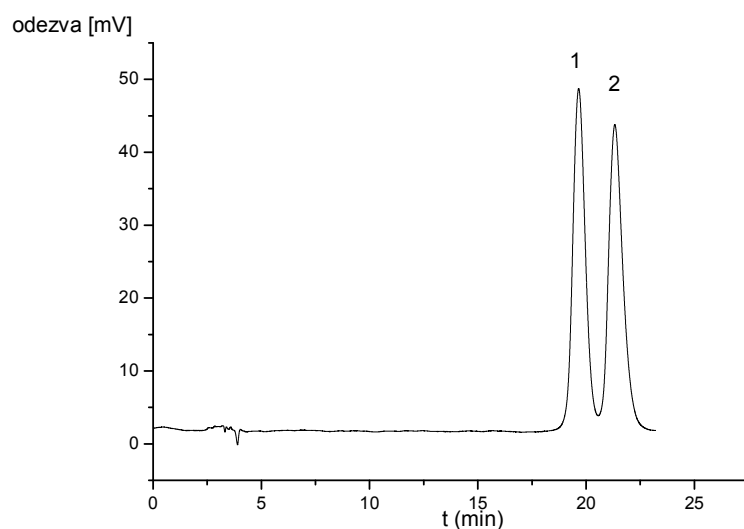
Obr. 11: Závislost retenčního faktoru 1. elujícího enantiomeru citadiolu na obsahu TEA a HOAc v mobilní fázi na CSP s navázaným vankomycinem; světlejší V, tmavší V2; x je objem TEA a HOAc přidaný do 100 ml MeOH



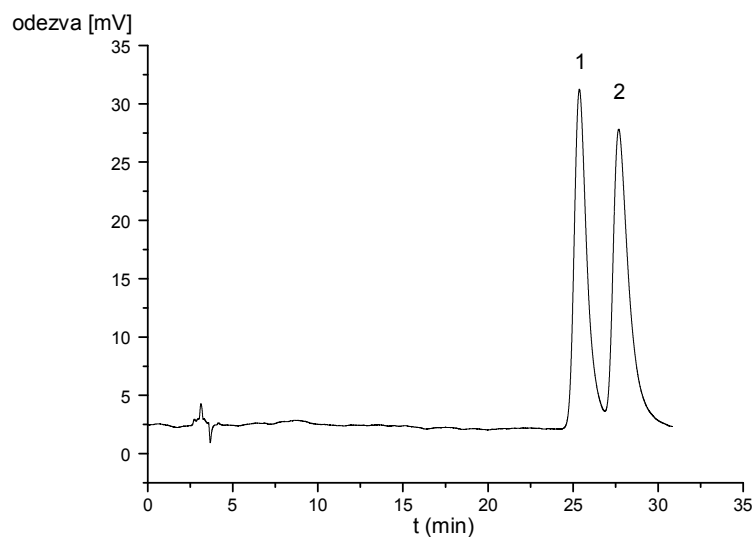
Obr. 12: Závislost retenčního faktoru 1. elujícího enantiomeru citalopramu na obsahu TEA a HOAc v mobilní fázi na CSP s navázaným vankomycinem; světlejší V, tmavší V2; x je objem TEA a HOAc přidaný do 100 ml MeOH

Separace všech analytů probíhala lépe na CSP s vyšším pokrytím chirálním selektorem. Se zvyšujícím obsahem kyseliny a báze v mobilní fázi se však rozdíly v hodnotách rozlišení snižovaly. V mobilní fázi s přidávkem 0,2 ml HOAc a TEA (ke 100 ml MeOH) už byly hodnoty rozlišení téměř identické na kolonách V a V2.

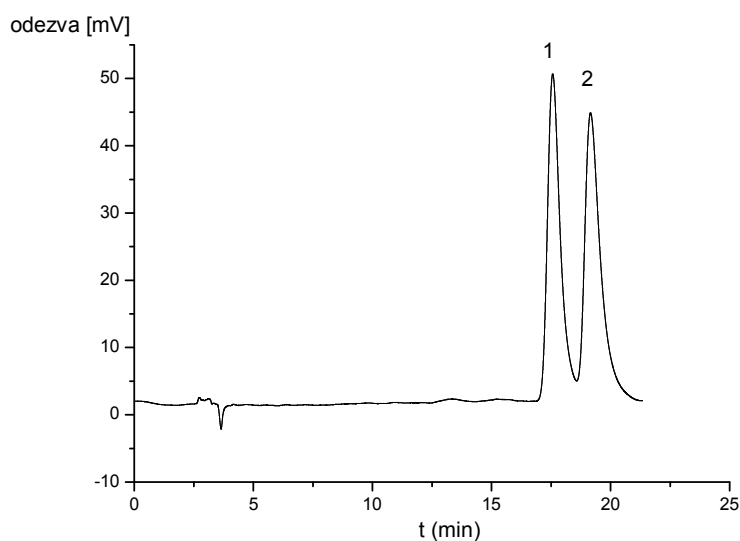
Ilustrativní chromatogramy enantioseparací citalopramu jsou uvedeny na obr. 13, 14, 15 a 16.



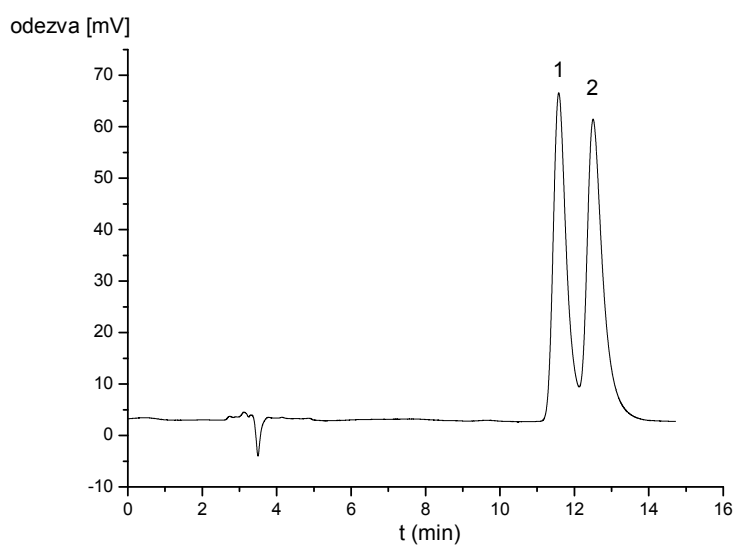
Obr. 13. Chromatogram enantioseparace citalopramu za podmínek: CSP vankomycin, mobilní fáze MeOH, (ν), 100 + přídavek TEA (0,05 ml) a HOAc (0,05 ml) do 100 ml MeOH; enantiomery 1, 2 (R-, S-)



Obr. 14. Chromatogram enantioseparace citalopramu za podmínek: CSP vankomycin 2, mobilní fáze MeOH, (ν), 100 + přídavek TEA (0,05 ml) a HOAc (0,05 ml) do 100 ml MeOH; enantiomery 1, 2 (R-, S-)



Obr. 15. Chromatogram enantioseparace citalopramu za podmínek: CSP vankomycin 2, mobilní fáze MeOH, (ν), 100 + přídavek TEA (0,1 ml) a HOAc (0,1 ml) do 100 ml MeOH; enantiomery 1, 2 (R-, S-)



Obr. 16. Chromatogram enantioseparace citalopramu za podmínek: CSP vankomycin 2, mobilní fáze MeOH, (ν), 100 + přídavek TEA (0,2 ml) a HOAc (0,2 ml) do 100 ml MeOH; enantiomery 1, 2 (R-, S-)

4.3 Enantioseparace na CSP s navázaným teikoplaninem

Podobně jako v případě vankomycinových CSP i teikoplaninové kolony jsou k dispozici ve dvou provedeních Chirobiotic T a Chirobiotik T2 lišících se pokrytím chirálním selektorem a způsobem jeho navázání na nosič. V polárně organickém ani v iontově organickém módu nedocházelo k enantioseparacím. V polárně organickém separačním módu (viz tab. 4) se snižujícím přídatkem methanolu docházelo ke zvyšování retenčního faktoru na teikoplaninové koloně T. Zatímco u CSP T2 vliv nebyl tak výrazný, ale spíše docházelo ke zvyšování retenčního faktoru se zvyšujícím přídatkem methanolu v mobilní fázi. Závislost získaná pro citalopram je ukázána na obr. 18. Citalopram i citadiol byly více zadržovány na teikoplaninové koloně T a s rostoucím obsahem HOAc a TEA docházelo ke snižování retenčního faktoru. V mobilní fázi s 30% MeOH však už byla retence obou analytů vyšší na CSP T2 než T.

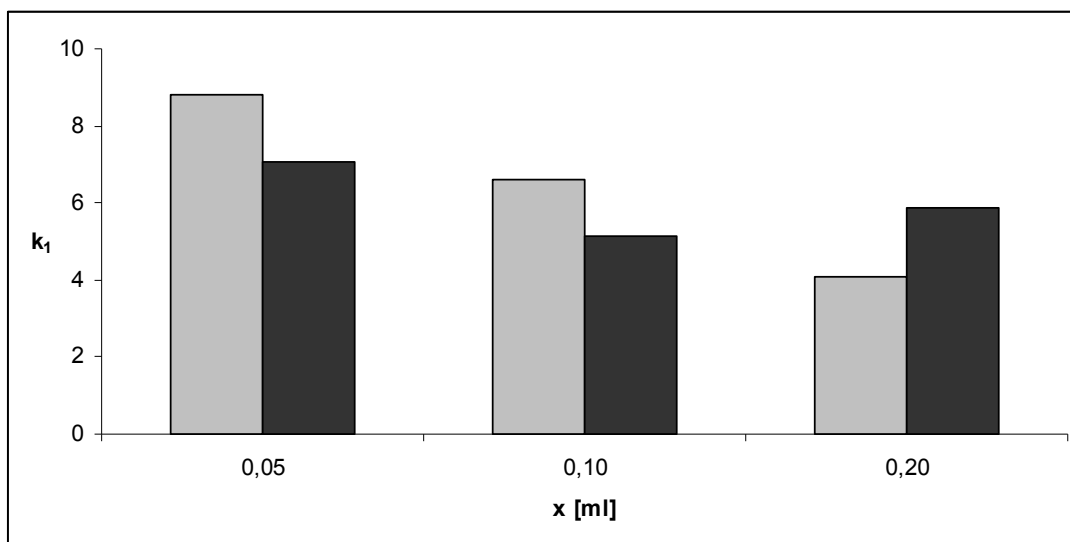
Tab. 4: Vliv složení mobilní fáze na retenci, selektivitu a rozlišení enantiomerů na CSP s vázaným teikoplaninem; mobilní fáze ACN / MeOH (v/v) + přídavek HOAc a TEA o stejném objemu (0,1 ml) do 100 ml mobilní fáze

			MeOH %		
			10	15	30
Citadiol	k_1	T	9,03	6,62	5,63
		T2	6,19	6,38	7,38
	α	T	1,00	1,00	1,00
		T2	1,00	1,00	1,00
	R	T	0,00	0,00	0,00
		T2	0,00	0,00	0,00
Citalopram	k_1	T	9,13	6,65	5,16
		T2	4,74	4,59	5,21
	α	T	1,00	1,00	1,00
		T2	1,00	1,00	1,00
	R	T	0,00	0,00	0,00
		T2	0,00	0,00	0,00

Vliv přídavku HOAc a TEA do mobilní fáze tvořené MeOH na selektivitu, retenční faktor, rozlišení ukazuje tabulka 5 a pro citalopram jsou závislosti na obou teikoplaninových CSP znázorněny na obr. 17.

Tab. 5: Vliv složení mobilní fáze na retenci, selektivitu a rozlišení enantiomerů na CSP s vázaným teikoplaninem; mobilní fáze MeOH, 100, (v), + přídavek HOAc a TEA o objemu x do 100 ml mobilní fáze

x [ml]			0,05	0,10	0,20
Citadiol	k_1	T	8,67	6,03	3,75
		T2	8,08	2,53	5,74
	α	T	1,00	1,00	1,00
		T2	1,00	1,00	1,00
	R	T	0,00	0,00	0,00
		T2	0,00	0,00	0,00
Citalopram	k_1	T	8,80	6,60	4,06
		T2	7,05	5,14	5,86
	α	T	1,00	1,00	1,00
		T2	1,00	1,00	1,00
	R	T	0,00	0,00	0,00
		T2	0,00	0,00	0,00



Obr. 17: Závislost retenčního faktoru 1. elujícího enantiomeru citalopramu na obsahu TEA a HOAc v mobilní fázi na CSP s navázaným teikoplaninem; světlejší T, tmavší T2; x je objem TEA a HOAc přidaný do 100 ml MeOH

Z obr. 17 vyplývá, že zatímco v mobilní fázi s nižším přídatkem kyseliny a báze (0,05 ml do 100 ml mobilní fáze) je retenční v dané mobilní fázi nižší na koloně T2, při nejvyšším přídatku TEA a HOAc (0,2 ml do 100 ml mobilní fáze) je retenční faktor citalopramu vyšší na této koloně. Z výše uvedeného vyplývá, že retenční chování a z toho plynoucí separace je primárně určena stacionární fází, mobilní fáze zásadně ovlivňuje retenční mechanismus.

5 ZÁVĚR

Pro enantioseparaci chirálních léčiv a jejich prekursoru byly vyzkoušeny různé chirální stacionární fáze na bázi makrocyclických antibiotik s navázaným ristocetinem A, vankomycinem a teikoplaninem. V případě vankomycinových a teikoplaninových kolon byl sledován též vliv pokrytí silikagelového nosiče chirálním selektorem na retenci a rozlišení enantiomerů. V polárně organickém módu byla mobilní fáze složena z ACN / MeOH v různých poměrech s konstantními přídávky HOAc a TEA. Mobilní fáze v iontově polárním módu se skládala z MeOH s malými přídávky HOAc a TEA.

Nejlepšího rozlišení enantiomerů citadiolu bylo dosaženo na CSP s navázaným ristocetinem A s mobilní fází ve složení ACN / MeOH, (v / v), 90 / 10 + přídavek TEA (0,1 ml) a HOAc (0,1 ml) do 100 ml mobilní fáze. V případě použití CSP s navázaným vankomycinem bylo docíleno dobrého rozlišení při použití mobilní fáze v polárním iontovém módu s minimálním přídávkem HOAc a TEA. Při použití teikoplaninových CSP k enantioseparaci citadiolu nedocházelo.

V případě enantiomerů citalopramu bylo docíleno nejlepšího rozlišení při použití CSP s navázaným vankomycinem (V2), s mobilní mobilní fází tvořenou MeOH s minimálním přídávkem HOAc a TEA. Na CSP s navázaným ristocetinem A bylo docíleno podobného rozlišení při použití mobilní fáze ve složení ACN / MeOH, (v / v), 90 / 10 + přídavek TEA (0,1 ml) a HOAc (0,1 ml) do 100 ml mobilní fáze. K enantioseparaci citalopramu nedocházelo při použití teikoplaninových CSP.

Literatura

1. O. Červinka: Chem. Listy 93 (1999) 294 - 305
2. J. McMurry: Organic Chemistry, Sixth Edition (2004) 275 - 284
3. J. Patočka, A. Dvořák: Psychiatrie 8 (2004) 27 - 30
4. P. Anzenbacher, J. Jezdinský: Klin. Farmakol. Farm. 17 (2003) 148 - 150
5. R. Nageswara Rao, A. Narasu Raju: J. Pharm. Biol. Med. Anal 43 (2007) 311 - 314
6. S.H. Preskorn, R. Ross, C. Y. Stanga: Selective Serotonin Reuptake Inhibitors (2004) 242 - 246
7. E.A. Wilson: BioSocieties 1 (2006) 125 - 131
8. K. Látalová, J. Praško: Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie 72 (2009) 518 - 530
9. M.B. Keller: The Journal of clinical psychiatry 61 (2000) 896 - 908
10. A. Wade, M. Lemming, K. Bang Hedegaard: Int. Clin. Psychopharmacology 17 (2002) 95 - 102
11. P. Jáč: Využití biologicky aktivních látek s využitím kapilárních elektromigračních metod (2004)
12. K. Štulík a kolektiv: Analytické separační metody (2004) 136 - 171
13. V. Pacáková, K. Štulík: Vysokoučinná kapalinová chromatografie (1986) 6 - 10
14. E. Cuřínová, B. Kafková, Z. Bosáková, E. Tesařová: J. Chromatogr A 1088 (2005) 94 - 103
15. R.Y. Gao, G.S. Yang, H.Z. Yang, Z.Y. Chen, Q.S. Wang: J. Chromatogr. A 763 (1997) 125 - 128
16. W.H. Pirkle, T.C. Pochapsky: Chem. Rev. 89 (1989) 347 - 362
17. I.W. Wagner, M.C. Alembik: J. Chromatogr. 367 (1986) 59 - 68
18. S. Allenmark, B. Bomgren, H. Boréna: J. Chromatogr. 264 (1983) 63 - 68
19. S. Allenmark: J. Chromatogr. A 666 (1994) 167 - 179

-
20. M. Villiers: Acad. Sci. (1891) 534 - 536
 21. F. Schardinger: Zentr. Bacterial Parasitenk 14 (1905) 772 - 781
 22. B. Chankvetadze, G. Blaschke, J. Chromatogr. A 906 (2001) 309 - 363
 23. D. W. Armstrong, Y. Tang, S. Chen, Y. Zhoun, Ch. Bagwill: Anal. Chem. 66 (1994) 1473 - 1484
 24. Chirobiotic Handbook, 5th edition, Advanced Separation Technologies Inc. (2004)
 25. T.J. Ward, T.M. Oswald, J. Chromatogr. A 792 (1997) 309 - 325
 26. D. W. Armstrong, U.B. Nair: Electrophoresis 18 (1997) 2331- 2342
 27. M. Hradiská: Bakalářská práce, PřF UK 2002
 28. J. T. Ward, A. B. Farris III: J. Chromatogr A 906 (2001) 73 - 89
 29. J . Beneš, M. Kabelková, V. Vacek, J. Viechová, B. Horová, M. Gebauerová.: Klin. mikromol. inf. lék. 3 (1997) 137 - 144
 30. J. Lehotay, K. Hrobonová, J. Krupčík: Pharmazie 53 (1998) 863 - 865