

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra fyzikální a makromolekulární chemie



Bc. Radim Geryk

Optimalizace a validace analytické metody na stanovení
vybraných léčiv

Optimization and validation of analytical method for
determination of selected drugs

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Prof. RNDr. Eva Tesařová, CSc.

Praha, 2012

Název práce: Optimalizace a validace analytické metody na stanovení vybraných léčiv

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

Klíčová slova: enantioseparace, chirální HPLC, chirální stacionární fáze, citalopram, citadiol

Title: Optimization and validation of analytical method for determination of selected drugs

Annotation: The thesis is focused on separation of enantiomers of selected drugs using chiral stationary phases

Keywords: enantioseparation, chiral HPLC, chiral stationary phases, citalopram, citadiol

Tato diplomová práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru v projektu KONTAKT LH11018, Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České Republiky.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně pod vedením školitelky 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 2. května 2012

Poděkování

Rád bych poděkoval své školitelce Prof. RNDr. Evě Tesařové, CSc. za odborné vedení, pomoc a trpělivost při tvorbě diplomové práce.

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

Abstrakt

Cílem této práce bylo nalezení vhodných podmínek k rozdělení enantiomerů citalopramu a citadiolu, optimalizace chromatografického systému a validace analytické metody ke stanovení daných enantiomerů v léčivech.

V dnešní době se velké množství léčiv vyskytuje ve formě racemátů. V mnoha případech pouze jeden z enantiomerů vykazuje farmakologické účinky. Pokrok v chemických technologiích spojených se syntézou, separací a analýzou čistých enantiomerů z racemátů, způsobil zvýšení počtu nových chirálních léčiv ve formě čistých enantiomerů, tzv. *chirální záměna*.

Citalopram je široce užívané antidepresivum, patřící do skupiny selektivních inhibitorů zpětného vychytávání serotoninu (SSRI). Požívá se pro léčbu depresí, panické úzkosti či obsedantně kompulzivních poruch patologického smíchu a pláče. Farmakologická aktivita je spojena s *S*-citalopramem, zatímco *R*-citalopram je považován za neaktivní, a dokonce působí proti účinku *S*-citalopramu. Citadiol je syntetický prekursor citalopramu, který se rovněž vyskytuje ve formě dvou enantiomerů.

Tato práce byla zaměřena na sledování enantioseparačního chování vybraných léčiv. Pro chirální separace výše uvedených látek byla použita metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie s chirálními stacionárními fázemi na bázi makrocyclických antibiotik, cyklofruktanů a celulosy.

Optimalizace chromatografického systému bylo dosaženo na koloně Chiralcel OD-H při požití mobilní fáze obsahující *n*-hexan/propan-2-ol/triethylamin 96/4/0,1 (v/v/v) při průtoku mobilní 1,0 ml/min a teplotě 25 °C. Byly sledovány vlivy přísad propan-2-olu a triethylaminu a teploty na enantioselektivitu a rozlišení enantiomerů.

Vypracovaná metoda byla validována a bylo zjištěno, že je vhodná ke stanovení enantiomerní čistoty citalopramu v lékových formách.

Abstract

The aim of this work was finding suitable conditions for separation of enantiomers of citalopram and citadiol, optimization of chromatographic system and validation of the analytical method for determination of selected enantiomers in drugs.

Drugs are often chiral compounds. In many cases, only enantiomer has required pharmacological effects. Advanced chemical technologies associated with the synthesis, separation and analysis of the individual enantiomers caused an increase of the number of new chiral drugs in the form of single pure enantiomers, *the chiral switch*.

Citalopram is one of the widely used antidepressants of selective serotonin reuptake inhibitors (SSRI). Citalopram is used for treatment of depression, panic anxiety or obsessive compulsive disorder of pathological laughing and crying. The pharmacological activity is associated with the *S*-citalopram, while *R*-enantiomer is essentially inactive and even counteracts the activity of escitalopram. Citadiol is a chiral synthetic precursor of citalopram.

This thesis was focused on monitoring enantioseparation “behaviour“ of selected enantiomers. HPLC method with chiral stationary phases based on macrocyclic antibiotics, cyclofructans and cellulose was applied for enantioseparation of the above-mentioned compounds.

The optimized chromatographic system was composed of Chiralcel OD-H column and mobile phase containing of *n*-hexane,/propane-2-ol/triethylamine 96/4/0,1 (v/v/v) at a flow rate of 1,0 ml/min and at 25 °C. Effects of propane-2-ol and triethylamine addition and temperature on enantioselectivity and resolution of the enantiomers were evaluated.

The method was validated and found to be suitable for determination of enantiomeric purity of citalopram in bulk drugs.

Obsah

	Seznam použitých zkratk a symbolů	9
1	ÚVOD	11
2	TEORETICKÁ ČÁST	12
2.1	Chiralita	12
2.2	Enantiomery	13
2.3	Chirální léčiva	13
2.3.1	Citadiol	14
2.3.2	Citalopram	16
2.3.3	Escitalopram	18
2.3.4	Escitalopram <i>versus</i> citalopram.....	18
2.4	Chirální chromatografické a elektromigrační techniky	19
2.5	Chirální separace	19
2.6	Chirální stacionární fáze.....	20
2.6.1	Polysacharidové stacionární fáze	21
2.6.2	Cyklofruktanové stacionární fáze.....	22
2.6.3	Makrocyclická antibiotika.....	24
2.6.3.1	Ristocetin A	25
2.6.3.2	Teikoplanin	26
2.6.3.3	Teikoplanin aglykon.....	27
2.6.3.4	Vankomycin	28
2.7	Vědecké práce zaměřené na chirální separace citalopramu a citadiolu	29
2.8	Validace metody.....	30
2.8.1	Validační parametry	31
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	33

3.1	Použité chemikálie	33
3.2	Přístroje a pomůcky	34
3.3	Příprava vzorků	35
3.4	Podmínky separace.....	35
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	37
4.1	Enantioseparace na CSP s navázaným teikoplaninem aglykonem.....	37
4.2	Enantioseparace na CSP s navázaným vankomycinem.....	38
4.3	Enantioseparace na CSP s navázaným CF7-DMP.....	44
4.4	Enantioseparace na CSP s navázanou celulosou tris(3,5-dimethylfenylkarbamátem).....	45
4.4.1	Chiralcel OD-RH	45
4.4.2	Chiralcel OD-H	46
4.5	Validace analytické metody	53
4.5.1	Preciznost	54
4.5.2	Linearita	54
4.5.3	Mez detekce a mez stanovitelnosti	56
4.5.4	Robustnost.....	57
4.5.5	Přesnost a analýza reálného vzorku.....	58
5	ZÁVĚR	60
6	Literatura	62

Seznam použitých zkratk a symbolů

α	enantioselektivita
α_{95}	hladina významnosti
ACN	acetonitril
As	faktor symetrie
CD	cyklodextrin
CE	kapilární elektroforéza
CEC	kapilární elektrochromatografie
CF	cyklofruktan
CIT	citalopram
CS	chirální selektor
CSP	chirální stacionární fáze
CTD	citadiol
DCP	dichlorfenyl
DMP	dimethylfenyl
Et	ethyl
GC	plynová chromatografie
HEX	<i>n</i> -hexan
h_{\max}	maximální kolísání základní linie
HOAc	octová kyselina
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
Ip	isopropyl
IPA	propan-2-ol
k_1	retenční faktor dříve eluujícího enantiomeru
MA	makrocyclická antibiotika
Me	methyl
MEKC	micelární elektrokinetická chromatografie
MeOH	methanol
<i>n</i>	počet měření
n_I	koncentrace referenční hodnoty
n_{II}	koncentrace analytu
NP	normální separační mód

$R_{1/2}$	enantiozlišení
Re	výtěžnost
RN	<i>R</i> -1-(1-naftyl)ethyl
RP	reversní separační mód
R.S.D.	relativní směrodatná odchylka
S.D.	směrodatná odchylka
SDS	dodecyl síran sodný
SFC	superkritická fluidní chromatografie
SSRI	selektivní inhibitor zpětného vychytávání serotoninu
T	teikoplanin
TAG	teikoplanin aglykon
<i>t</i> -Bu	<i>tert</i> -butyl
TEA	triethylamin
TFA	trifluoroctová kyselina
TLC	tenkovrstvá chromatografie
V	vankomycin
\bar{x}	aritmetický průměr

1 ÚVOD

Velké množství přírodních, uměle vyrobených látek či léčiv vykazuje chiralitu. Chirální dělení jednotlivých enantiomerů se stává v poslední době jedním z nejdůležitějších úkolů analytické chemie, především v oblasti farmaceutické nebo potravinářské analýzy. Pro tyto účely je třeba hledat separační metody vhodné jak pro analytické, tak pro preparativní aplikace. Mezi používané metody sloužící k separaci enantiomerů patří plynová chromatografie (GC), vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) či kapilární elektroforéza (CE).

Látky často tvořené specifickou směsí enantiomerů nebo vyskytující se ve formě racemátů se dělí v enantioselektivním separačním prostředí. V současné době je u chirálních léčiv tendence porovnávání farmaceutických účinků jednotlivých enantiomerů, které by měly zlepšit terapeutický účinek léčiva. Jde o to, zda je výhodnější používat čistý enantiomer nebo racemát léčiva.

Tato práce je zaměřena na sledování enantioseparačního chování vybraných léčiv na chromatografických kolonách s různými chirálními stacionárními fázemi. Cílem je nalezení vhodných podmínek k rozdělení enantiomerů citalopramu a citadiolu, optimalizace chromatografického systému a validace analytické metody ke stanovení daných enantiomerů v lékových formách.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Chiralita

Chiralita, optická aktivita nebo stereoizomerie jsou dány prostorovým uspořádáním molekuly. Název chiralita je odvozen od řeckého slova *chiros* – ruka. Chirální molekula nemá střed, osu ani rovinu symetrie. Chiralita molekul může být vyjádřena přítomností určitých prvků chiralilty. Mezi ně patří chirální centrum (centrální chiralita), chirální osa (axiální chiralita) a chirální rovina (planární chiralita).

Atom tetraedrálně vázaný ke čtyřem různým atomům či skupinám atomů nazýváme stereogenní centrum, které můžeme označit jako střed chiralilty. Střed chiralilty se může vyskytovat vázaný v oktaedrální struktuře nebo tetragonální bypyramidě.¹ Jako chirální centrum se nejčastěji vyskytuje atom uhlíku, dusíku, křemíku nebo fosforu.²

Asymetrický atom vyskytující se u molekul nemusí být jedinou příčinou, která vyvolává chiralitu. Axiální chiralita derivátů *o,o'*-disubstituovaných bifenylyů nebo binaftylů či allenů je dána stericky bráněnou rotací atomů nebo skupin atomů kolem jednoduché vazby C-C, tzv. atropoizomerismus.³

Planární chiralitu vyvolává dvojice různých substituentů ležících ve společné rovině (rovině chiralilty) a minimálně jednoho substituentu (tzv. pivota) ležícího mimo tuto rovinu a spojeného s touto rovinou chemickou vazbou.⁴

Inherentní chiralitu vykazují látky, které jsou chirální bez prvků chiralilty. Patří mezi ně sloučeniny s helikální strukturou, tzv. helicity.

2.2 Enantiomery

Objev enantiomerů se datuje do roku 1848, kdy Luis Pasteur zjistil, že krystalizací soli kyseliny vinné (2,3-dihydroxybutandiové) vzniká směs dvou typů krystalů.⁵ Mnohé látky se vyskytují ve formách izomerů s prostorovými strukturami, které mají k sobě vztah jako vzor a jeho obraz v zrcadle. Enantiomery, z řeckého slova *enantio* – opačný, stáčí rovinu polarizovaného světla doprava či doleva (měřeno při vlnové délce sodíkové čáry 589 nm) a označujeme je afixem (+) nebo (-) v názvu sloučeniny. Enantiomery se strukturně liší absolutní konfigurací. Rozumíme tím skutečné rozložení skupin kolem chirálního centra a používá se na jednoznačné vyjádření konfigurace. Ve spojení s názvem sloučeniny používáme obecně přijatého záznamu *R* a *S*, uváděného před názvem sloučeniny.¹ Enantiomery mají stejné fyzikálně-chemické vlastnosti (teplota tání, teplota varu, hustota), ale při interakci s chirálním objektem (čínidlo, rozpouštědlo či kruhově polarizované záření) se ve svých vlastnostech liší.⁶ Každá látka v libovolném skupenství obsahující ekvimolární množství enantiomerních molekul se označuje jako racemát.¹

2.3 Chirální léčiva

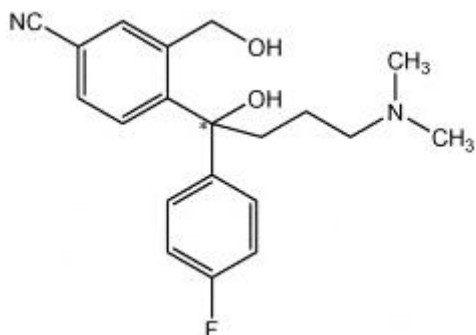
Po tisíce let lidé spoléhali na léčivé přípravky, které získávali z rostlin, stromů či zvířat. Už před 4000 lety lidé znali účinky chvojníku (*ephedra*), ze kterého se získává chirální látka zvaná efedrin, účinná látka v léčbě narkolepsie, ale i zneužívaná k přípravě pervitinu.⁵ Mezi další stará chirální léčiva získaná z přírodních zdrojů patří kokain (*kokainovník pravý*) či atropin (*rulík zlomocný*).

Dnes se stále velké množství léčiv vyskytuje ve formě racemátů. Snahou však je více využívat pouze jedné účinné enantiomerní formy. Pochopení interakce léčiv a cílových struktur (receptorů) vede k vývoji farmak, kde jejich prostorové uspořádání dokonale odpovídá struktuře receptorového místa.⁷ Vzhledem k tomu, že lidský organismus se skládá z chirálních molekul (sacharidy, proteiny, enzymy) budou se specificky vázat chirální léčiva s odpovídající strukturou. Jeden z enantiomerů pak může poskytovat žádoucí farmakologické, farmakodynamické či farmakokinetické vlastnosti, zatímco druhý z enantiomerů je farmaceuticky neúčinný, méně účinný

nebo dokonce působí proti účinku léčiva či toxický.⁸ První zmínka o enantioselektivitě v souvislosti s tím, co může být jejím důsledkem a může být považováno za odlišný farmakologický účinek, se objevila v roce 1886, kdy u (+)-asparaginu byla zaznamenána sladká chuť, zatímco (-)-asparagin byl bez chuti.⁹ Třibodový interakční model vysvětluje enantioselektivitu chirálních léčiv na základě interakce léčivo-receptor nebo enzym-substrát. Tento model slouží také k vysvětlení retenčního chování enantiomerů vyplývajícího s interakce molekul chirálního analytu s molekulami chirálních selektorů či chirálními stacionárními fázemi v separačním systému.¹⁰ Pokrok v chemických metodách a technologiích spojených se syntézou či separací čistých enantiomerů z racemátů způsobil zvýšení počtu registrovaných léčiv ve formě čistých enantiomerů. Mnoho racemických léčiv se převádí na léčiva obsahující pouze jednotlivé enantiomery, tzv. *chiral switch*, aby se zlepšil jejich terapeutický účinek. Na trhu se nyní vyskytují léčiva ve formě racemátu, ale stále ve větší míře i čistých enantiomerů.¹¹ Mezi tato léčiva patří citalopram nebo omeprazol. Proces chirální záměny vyústil v uvedení na trh velkého množství jednotlivých enantiomerů léčiv jako *S*-citalopram, *S*-omeprazol či *S*-ketamin. Vývoj léčiv tvořených jednotlivými enantiomery z racemátů nemusí však vždy vést k požadovaným výhodám nebo k odstranění vedlejších účinků, s tím souvisí také nebezpečí finanční ztráty farmaceutických firem.

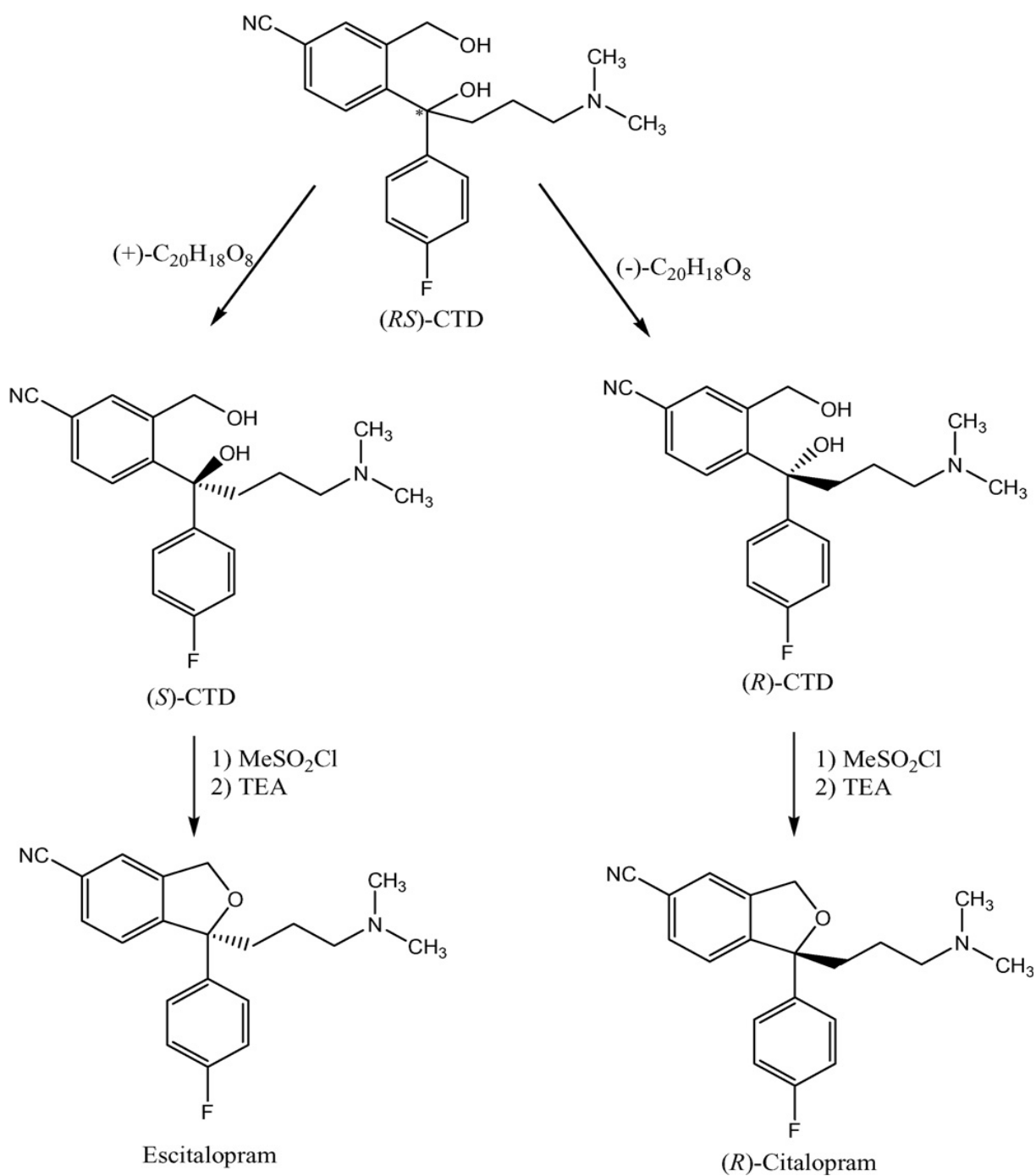
2.3.1 Citadiol

Citadiol, CTD, (obr. 1) je syntetický prekurzor a klíčový meziprodukt při syntéze escitalopramu. Vyskytuje se ve formě dvou enantiomerů.



Obr. 1: *RS*-citadiol

Příprava escitalopramu (obr. 2) vychází z racemátu citadiolu.¹² K rozdělení na jednotlivé enantiomery se používají chromatografické separační metody nebo lze využít krystalizaci pomocí (+) nebo (-)-di-*p*-tuloyl vinné kyseliny. Výsledná čistota escitalopramu závisí na enantiomerní čistotě jeho prekurzoru *S*-citadiolu.

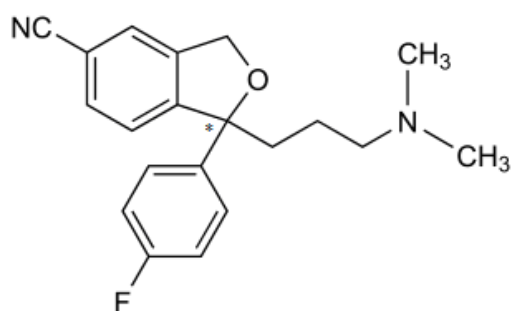


Obr. 2: Schéma syntézy escitalopramu ¹³

2.3.2 Citalopram

Citalopram, CIT, (obr. 3) je racemát *RS*(1-[3-(dimethylamino)propyl]-1-(4-fluorofenyl)-1,3-dihydroizobenzofuran-5-karbonitril) tvořený ekvimolární směsí

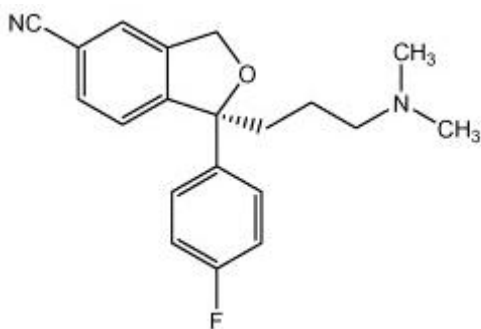
dvou enantiomerů, *R*-citalopramu a *S*-citalopramu. Farmakologický efekt je přisuzován *S*-citalopramu, zatímco *R*-citalopram působí proti účinku léčiva.¹⁴ Citalopram je jedním z nejvíce užívaných antidepresiv, patřících do skupiny selektivních inhibitorů zpětného vychytávání serotoninu (SSRI).¹⁵ Přebytečný serotonin je zpětně vychytáván pomocí transportérů v presynaptické membráně.¹⁶ Látky této skupiny léčiv selektivně blokují transportéry a zamezují zpětnému vychytávání serotoninu a zvyšují jeho hladinu v centrální nervové soustavě.¹⁷ Léčiva ze skupiny SSRI se používají k léčbě depresí, úzkosti nebo obsedantně kompulzivních poruch. Citalopram se nesmí podávat pacientům, kteří užívají inhibitory monoaminoxidasy. Nežádoucí účinky, jako je třes, průjem či sucho v ústech, mohou nastat při souběžném užívání citalopramu a lithia nebo bylinných přípravků obsahujících *třezalku tečkovanou*.¹⁵ Při současném užívání s přípravky jako je například tryptofan, které mají serotogenní účinky, může dojít k serotoninovému syndromu, který je vyvolán vysokým množstvím serotoninu v organismu.¹⁸ Citalopram je metabolizován na demethylcitalopram, didemethylcitalopram, citalopram-N-oxid a deaminovaný derivát kyseliny propionové. Derivát kyseliny propionové je farmakologicky neaktivní, avšak zbylé metabolity citalopramu jsou rovněž selektivními inhibitory zpětného vychytávání serotoninu, i když v menším rozsahu.



Obr. 3: *RS*-citalopram

2.3.3 Escitalopram

Escitalopram (obr. 4), (*S*)-1-[3-(dimethylamino)propyl]-1-(4-fluorofenyl)-1,3-dihydroisobenzofuran-5-karbonitril, je enantiomer citalopramu. Patří do skupiny SSRI antidepresiv.



Obr. 4: Escitalopram

2.3.4 Escitalopram *versus* citalopram

Citalopram je racemát, který se skládá ze *R* a *S*-enantiomerů. Studie ukázaly, že inhibice zpětného zachytávání serotoninu se přičítá *S*-enantiomeru, escitalopramu. Řada nedávných klinických a dalších studií srovnávající escitalopram a citalopram s placebem zjistila, že ekvivalentní dávky těchto dvou léčiv, tj. s obsahem stejného množství *S*-enantiomeru, ukázaly lepší a rychlejší nástup účinku escitalopramu. Tyto výsledky potvrzují, že *R*-citalopram zpomaluje účinek *S*-citalopramu. Inhibující účinek může být způsoben farmakokinetickými procesy mezi enantiomery nebo odlišnou farmakologickou aktivitou *R*-citalopramu na transportér serotoninu.¹⁹ Tato pozorování poskytla impuls k vývoji escitalopramu jako léčiva, které bylo v roce 2002 byl představeno jako nové antidepresivum.²⁰ Bylo potvrzeno, že jako inhibitor aktivity transportérů je escitalopram dvakrát účinnější než citalopram a nejméně 27-krát účinnější než *R*-citalopram. Proto podávaná množství escitalopramu v lékových formách odpovídají dvojnásobné dávce citalopramu.^{21,22}

2.4 Chirální chromatografické a elektromigrační techniky

Separace enantiomerů může být provedena přímo nebo po derivatizaci použitím plynové chromatografie (GC), tenkovrstvé chromatografie (TLC), vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC), superkritické fluidní chromatografie (SFC), micelární elektrokinetické chromatografie (MEKC), kapilární elektrochromatografie (CEC), kapilární elektroforézy (CE), případně dalších technik.

2.5 Chirální separace v HPLC

Separace enantiomerů je častým požadavkem při výzkumu biologicky aktivních látek, zejména léčiv či chirálních polutantů. Problém tkví v tom, že na rozdíl od diastereoizomerů mají enantiomery v achirálním prostředí stejné fyzikální a chemické vlastnosti.²³ Enantioseparační metody se značně rozšířily především ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii.²⁴ Separace enantiomerů kapalinovou chromatografií nabízí důležitý nástroj ve vývoji léčiv, jak pro analytické účely (stereoselektivní farmakokinetické analýzy), tak pro preparativní účely, které umožňují biologické testování jednotlivých enantiomerů.²⁵ První zaznamenaná chromatografická enantioseparace se datuje do roku 1960. Dnes jsou chirální separace pomocí kapalinové chromatografie velmi využívány pro relativní jednoduchost, velkou účinnost, opakovatelnost a reprodukovatelnost.²⁶ Pro rozdělení enantiomerů v chromatografickém systému je základem jejich převedení na diastereomery. Existují dva přístupy, jak lze uskutečnit separace enantiomerů pomocí chromatografie.

První způsob představuje tvorbu diastereoimerů derivatizací analytu opticky čistým derivatizačním činidlem, tj. pouze jedním enantiomerem, před vlastní separací. Jedná se o nepřímou metodu chirální separace.²⁷ Vzniká stabilní pár diastereoizomerů, které díky různým fyzikálně-chemickým vlastnostem lze separovat achirálními separačními technikami.^{28,29} Mezi další výhody nepřímé separace patří snadná změna elučního pořadí enantiomerů derivatizací opačným optickým isomerem a dosahování nízkých detekčních limitů. Mezi nevýhody patří problematická validace derivatizace, možnost tvorby vedlejších produktů nebo

nezbytná vysoká optická čistota derivatizačních činidel.^{30,31}

Přímá metoda dělení enantiomerů spočívá v zavedení vhodné opticky aktivní látky (chirálního selektoru, CS) do separačního prostředí. V HPLC lze chirální selektor přidat jako aditivum do mobilní fáze a stacionární fázi ponechat nechirální. Mezi hlavní výhody tohoto uspořádání patří snadná výměna chirálního selektoru a použití levné nechirální stacionární fáze. Přesto tento model dnes nemá velké praktické užití vzhledem k vysoké spotřebě drahého chirálního selektoru nebo interferencím při detekci díky jeho absorpci v UV oblasti spektra.³² V dnešní době jsou nejvíce využívané chirální stacionární fáze, kdy chirální selektor může být navázán na nosič, nejčastěji ze silikagelu, a mobilní fáze je nechirální. Základem přímé metody separace je interakce mezi analytem a chirálním selektorem a tvorba přechodných diastereoizomerních komplexů,³³ které jsou charakterizovány odlišnými konstantami stability, a proto mají různé retenční chování. K tvorbě diastereoizomerních komplexů přispívají intermolekulární interakce jako jsou coulombické síly, tvorba vodíkových vazeb, hydrofobní interakce, interakce π - π , interakce dipól-dipól apod.^{34,35} První pokusy o odůvodnění principu chirálního rozdělení na molekulární úrovni vedly k návrhu pevných geometrických modelů, které z biochemického a farmakologického hlediska byly studovány Bentleyem.³⁶ V roce 1933 Eason a Stedman navrhli strukturní model vysvětlující stereoselektivní navázání chirálních molekul na proteinový receptor.^{33,37} Pro úspěšné chirální rozlišení je nutnou podmínkou existence třibodové interakce, kde alespoň jedna z vazeb musí být stereoselektivní. Tento model byl v roce 1952 popsán Dalglishem.³⁸ Stereoselektivní charakter jedné z interakcí zajistí, že u jednoho z enantiomerů, může být některá z interakcí upřednostněna, což vede k různým afinitám enantiomerů k chirálnímu selektoru.

2.6 Chirální stacionární fáze

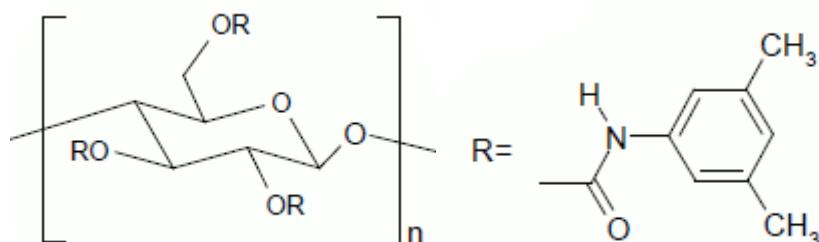
Výzkum a vývoj chirálních stacionárních fází (CSP) schopných účinného chirálního rozdělení širokého spektra enantiomerů je jedním z klíčových bodů chirálních chromatografických technik. Mnoho chirálních molekul přírodních nebo syntetizovaných bylo zkoumáno pro jejich možné využití jako chirální selektory.

Dnes je komerčně nabízeno více než 100 různých chirálních stacionárních fází. CSP obvykle tvoří jeden typ chirálních molekul nebo chirální polymer navázaný na silikagelu.³⁹ K nejčastěji používaným CSP patří crown ethery, derivatizované polysacharidy, makrocyclická antibiotika (MA), cyklodextriny (CD) či nově cyklofruktovany (CF). Jelikož v této práci byly použity CSP na bázi derivatizovaných polysacharidů, MA a CF bude jim v následujícím textu věnována větší pozornost.

2.6.1 Polysacharidové stacionární fáze

Polysacharidy jako amylosa nebo celulosa patří mezi nejvíce užívané opticky aktivní biopolymery s perfektně definovanou strukturou, které mohou být snadno převedeny na triestery či trikarbamáty^{40,41} a jsou hojně užívané jako chirální stacionární fáze v HPLC a TLC. Výjimečné enantioseparační vlastnosti polysacharidových CSP jsou zapříčiněny velkým množstvím strukturálních zvláštností. Molekulová chiralita vyplývá z přítomnosti několika stereogenních center na glukopyranosové jednotce. Navázané polysacharidové CSP mohou být používány v normálním separačním módu s mobilní fází tvořenou dvojicí rozpouštědel alkan-alkohol, polárně-organickém módu s mobilní fází tvořenou alkoholem nebo acetonitrilem, i reversním módu, tedy za přítomnosti pufrů.^{42,43} Jako aditiva se používají například triethylamin (TEA) nebo trifluoroctová kyselina (TFA) v normálním módu a hexafluorfosfát v reversním módu.³³ První využívaná CSP na bázi polysacharidů byla mikrokrystalická triacetát celulosa připravena Hessem a Hagelem.⁴⁴ Deriváty tribenzoátů a fenyلكarbamátů celulosy připravené Okamotoem jsou schopné rozdělit velkou škálu racemátů, především v závislosti na substituentech navázaných na fenylových skupinách polysacharidových CSP. U derivátů se substituenty s heteroatomem (methoxy, nitro skupiny) byly zaznamenány nižší hodnoty chirálních rozdělání vzhledem k vysoké polaritě samotného substituentu.^{45,46} V poslední době byla připravena řada fenyلكarbamátových derivátů s elektron donorovými methylovými skupinami nebo s halogenovými skupinami, které elektrony odebírají, jako například 4-chloro-3-methyl- nebo 3-fluoro-5-methylfenyl karbamáty. Tyto skupiny významně pozměňují výslednou polaritu

těchto CSP.^{47,48} Obecně substituce v poloze *meta* nebo *para* zvyšuje rozlišovací schopnost fenyلكarbamátových derivátů celulosy, ale substituce v poloze *ortho* ji snižuje. Naproti tomu *ortho* substituované deriváty amylosy vykazují relativně vysoké hodnoty chirálního rozlišení.⁴⁹ Okamotova skupina připravila řadu trifenyلكarbamátových derivátů a zkoumala vliv substituentů na enantioseparaci a navrhla mechanismus chirálního rozdělení podložený výsledky chromatografických, výpočetních a spektroskopických metod.⁵⁰ Polární karbamátové skupiny se nacházejí uvnitř, zatímco hydrofobní aromatické skupiny vně polymerního řetězce, a proto enantiomery interagují s karbamátovou skupinou přes vodíkové vazby, do kterých se zapojují NH a C=O skupiny. Kromě polárních nebo dipól-dipól interakcí hrají důležitou roli také π - π interakce mezi fenylovou skupinou CSP a aromatickou skupinou analytu.³⁹ V této práci byla použita celuloza tris(3,5-dimethylfenylkarbamát), která má vynikající rozlišovací schopnosti pro aminy, estery nebo chirální léčiva.

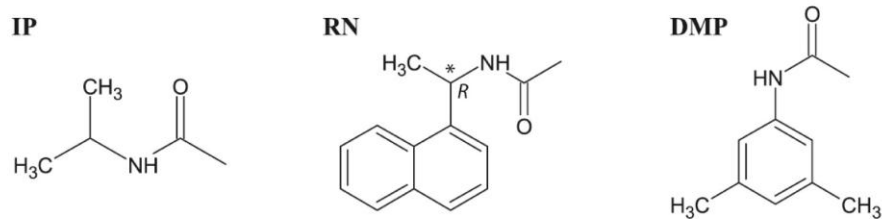
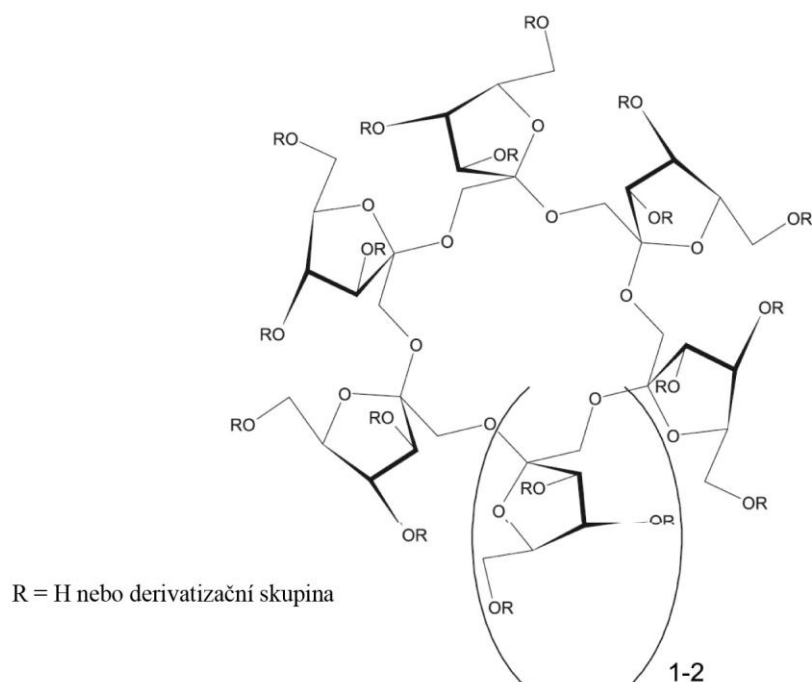


Obř. 5: Chemická struktura chirální stacionární fáze s navázanou celulosou tris(3,5-dimethylfenylkarbamátem), kolona Chiralcel OD-H

2.6.2 Cyklofruktanové stacionární fáze

Cyklofruktany byly poprvé popsány v roce 1989 Kawamurou a Uchiyamou.⁵¹ Od té doby se používají například jako přísady do jídla či regulátory hořkosti nápojů.⁵² Cyklofruktany jsou makrocyclické oligosacharidy,⁵³ které se získávají fermentací inulinu působením bakteriálních enzymů a skládají se z šesti nebo více β -(2 \rightarrow 1) spojených *D*-fruktofuranosových jednotek. Každá jednotka obsahuje čtyři stereogenní centra a tři hydroxylové skupiny. Běžné značení pro tyto sloučeniny

jsou (CF6, CF7, CF8 atd.), kde čísla označují počet fruktosových jednotek spojených v makrocyclickém kruhu. Centrální jádro má hydrofilní charakter a jeho struktura je analogická crown etherům.⁵² Pro použití cyklofruktanů jako CSP je nutná substituce hydroxylových skupin jinými funkčními skupinami. Mezi vhodné derivatizační skupiny patří alifatické, methylové (Me), ethylové (Et), isopropylové (IP), *tert*-butylové (*t*-Bu) skupiny a aromatické skupiny 3,5-dimethylfenyl (DMP), 3,5-dichlorfenyl (DCP) nebo *R*-1-(1-naftyl)ethyl (RN)⁵⁴ (obr. 6). Derivatizace menšími alifatickými skupinami způsobuje rozvolnění struktury a zpřístupnění crown etherového jádra a dalších hydroxylových skupin. Takto připravené CSP umožňují velmi dobrou separaci chirálních primárních aminů.⁵² Přítomnost aromatických a karbonylových skupin umožňuje dipólové, π - π či sterické interakce, tedy interakce, které hrají významnou roli v chirálním dělení v nepolárních rozpouštědlech.⁵⁵ Z toho plyne, že CSP na bázi cyklofruktanů se výrazně liší od crown etherových CSP.⁵⁶



Obr. 6: Cyklofruktan CF6 a CF7 a nevhodnější derivatizační skupiny

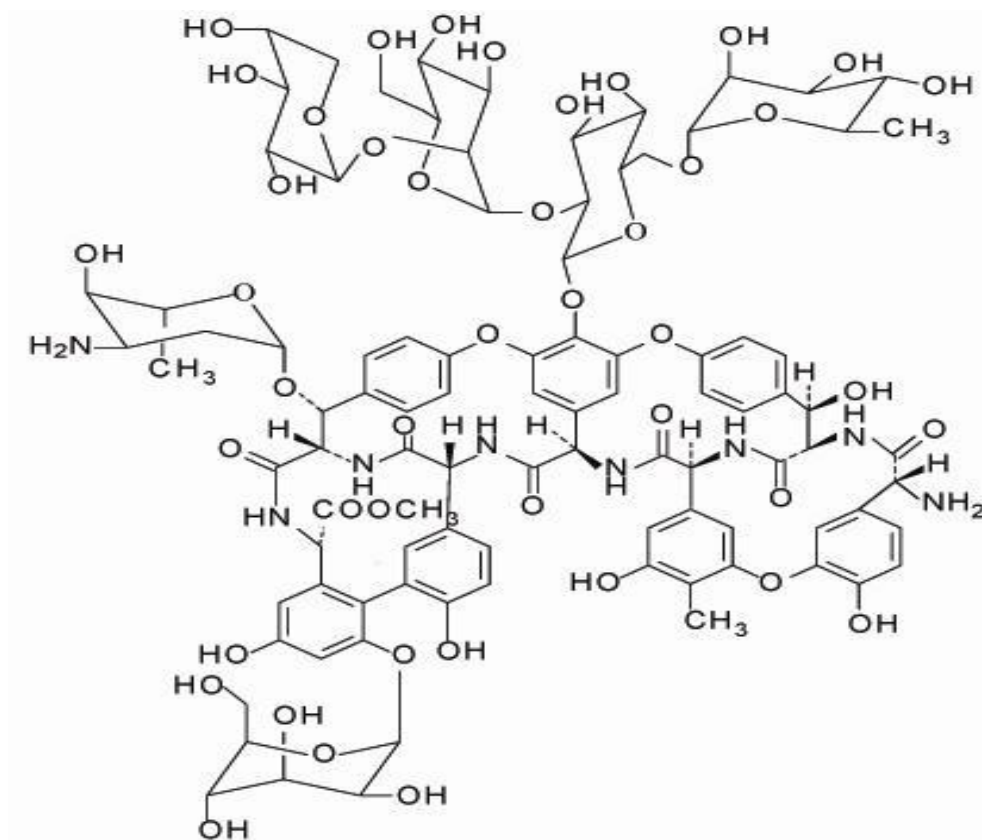
2.6.3 Makrocyclická antibiotika

Makrocyclická antibiotika se stala v poslední době velmi užívanou skupinou chirálních selektorů v HPLC, CZE a TLC. Podle struktury je lze rozdělit na čtyři základní skupiny na ansamyciny (rifamycin B, rifamycin SV), glykopeptidy (vankomycin, teikoplanin, avoparcin a ristocetin A), polypeptidy (thiostrepton) a aminoglykosidy (kanamycin, streptomycin, fradiomycin B a C).⁵⁷ Mezi nejpoužívanější MA patří glykopeptidy. Jsou to organické látky, jejich molekulová hmotnost se pohybuje v rozmezí od 600 do 2200 a obsahují velké množství

chirálních center a mnoho ionizovatelných kyselých a bazických funkčních skupin, čímž získávají amfoterní charakter. Struktura MA umožňuje nejrozličnější mezimolekulární interakce s chirálními molekulami (vodíkové interakce, dipól-dipól, hydrofobní interakce, inkluze atd.)⁵⁸ 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 rotovat.^{59,60} Aglykonový koš tvoří 3-4 makrocycly složené ze spojených aminokyselin a substituovaný fenoly.⁶¹ Využití MA jako chirálních selektorů poprvé popsal D. W. Armstrong.⁶² Lze je využít ve všech separačních módech, přičemž každý mód upřednostňuje jiný typ interakcí. V normálním separačním módu, kdy nepolární mobilní fázi tvoří alkan (*n*-hexan) s malými přísadkami polárního organického rozpouštědla (ethanol, propan-2-ol) se uplatňují vodíkové a v menším rozsahu dipól-dipól interakce.⁶³ Reversní mód je realizován mobilní fází obsahující organický modifikátor (methanol, acetonitril) a vodu nebo vodný roztok pufru. Při interakci s analytem dochází k hydrofobním či vodíkovým interakcím. Základem mobilní fáze v polárně organickém módu je methanol, popřípadě v kombinaci s acetonitrem, s přísadkou velmi malého množství kyselého (octová kyselina) a bazického (triethylamin) aditiva. Dominantní jsou pak především elektrostatické interakce.^{63,64} Chirální separace testovány v polárně-organickém módu, jsou použitelné pro molekuly analytu, které obsahují alespoň dvě funkční skupiny schopné interakce se stacionární fází (např. aminoskupinu, hydroxylovou skupinu nebo halogenidy), z nichž alespoň jedna se nachází v těsné blízkosti stereogenního centra.⁶⁵ V tomto separačním módu se uplatňují π - π a dipólové interakce mezi chirální stacionární fází a analytem.⁶⁵ CSP na bázi makrocyclických antibiotik dokážou separovat velkou škálu různých chirálních látek.

2.6.3.1 Ristocetin A

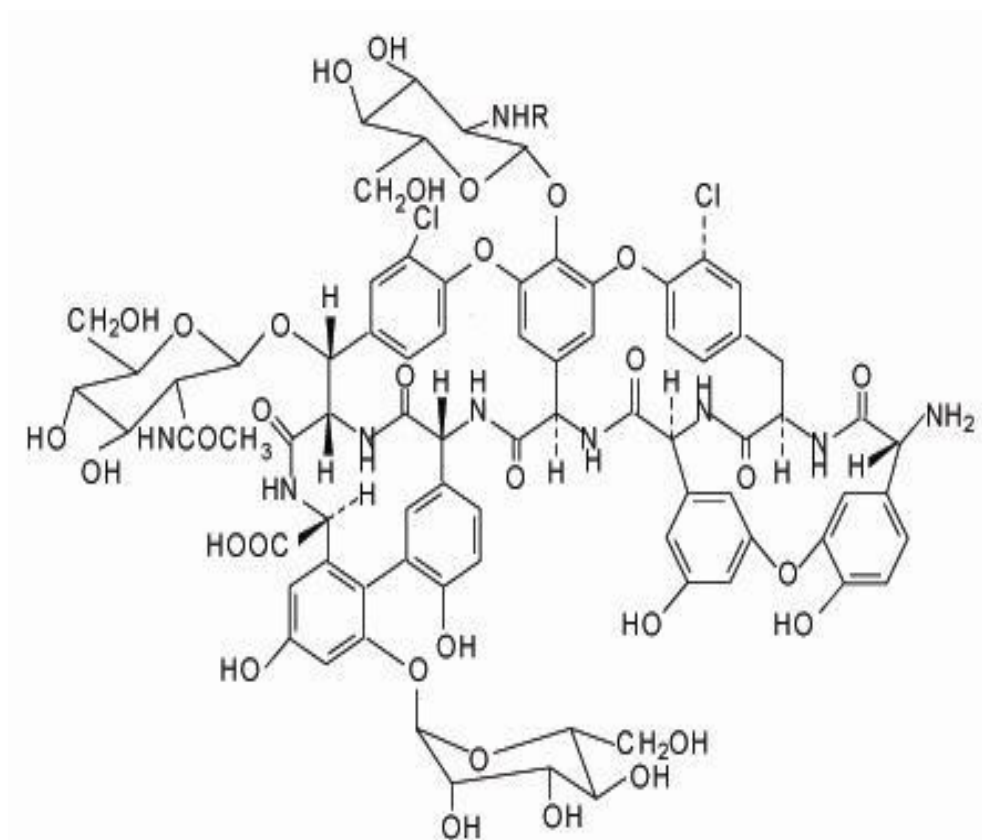
Ristocetin A (obr. 7) se používá jako antibiotikum k léčbě stafylokokových infekcí. Obsahuje 38 chirálních center a nemá volnou karboxylovou skupinu.⁶³ Slouží k enantioseparaci protizánětlivých léčiv, derivátů dinitrofenylů a dalších opticky aktivních látek.⁵⁹



Obr. 7: Ristocetin A

2.6.3.2 Teikoplanin

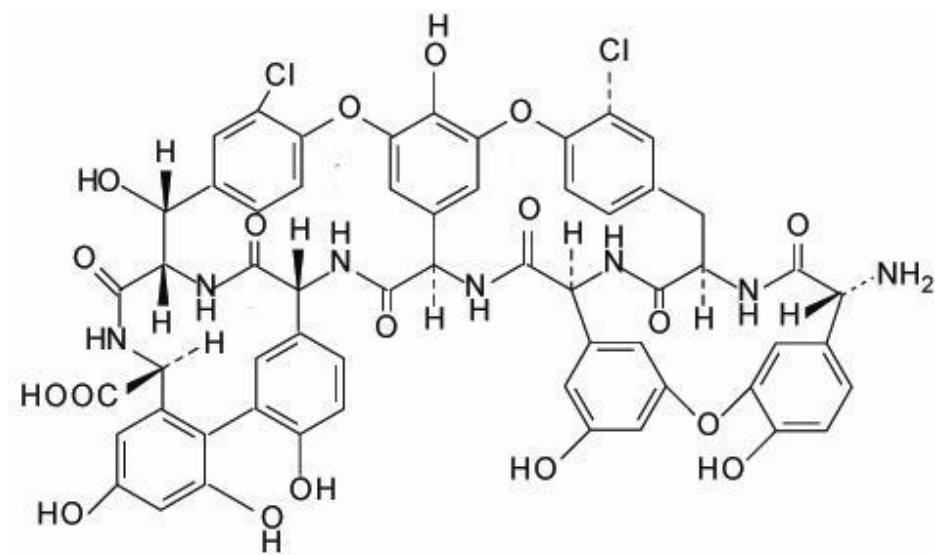
Teikoplanin (obr. 8) je antibiotikum, které se používá k léčbě infekcí způsobených grampozitivními bakteriemi.⁶⁶ Mezi glykopeptidickými chirálními selektory je specifický díky dlouhému hydrofobnímu řetězci, který přispívá k nižší rozpustnosti teikoplaninu ve vodě ve srovnání s ostatními MA.⁶⁷ Obsahuje 23 stereogenních center, sedm benzenových kruhů, pět z nich je propojeno třemi etherovými skupinami. Dále je v molekule teikoplaninu navázána primární aminová a karboxylová skupina.⁶⁷ CSP s navázaným teikoplaninem jsou vhodné pro enantioseparace aminokyselin⁶⁸ či neutrálních aromatických sloučenin.⁶⁹



Obr. 8: Teikoplanin

2.6.3.3 Teikoplanin aglykon

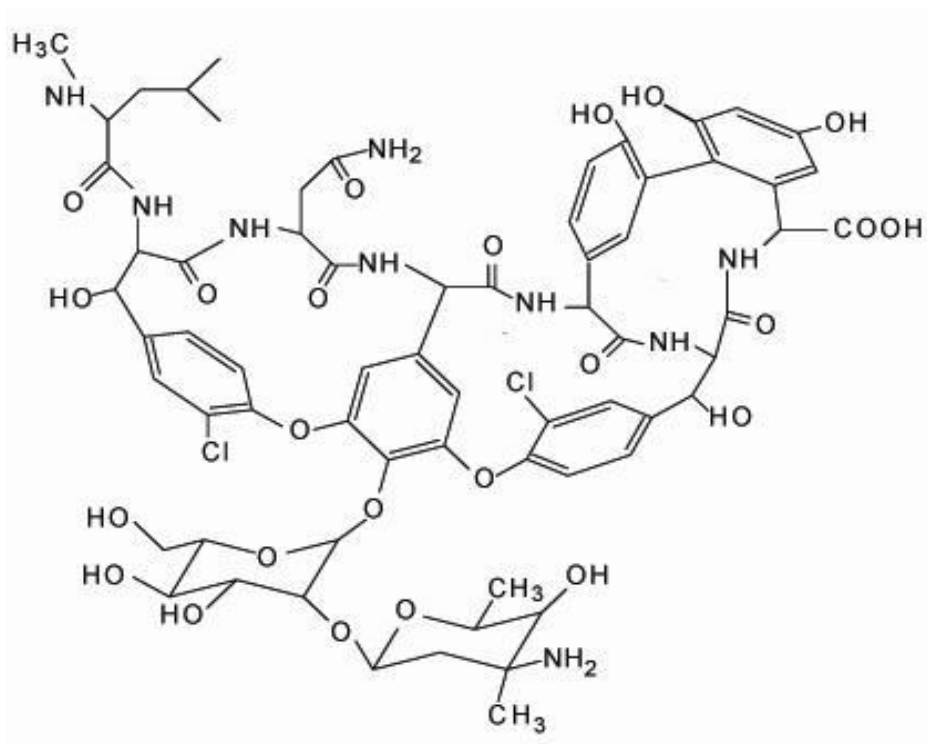
Teikoplanin aglykon (obr. 9) obsahuje 8 chirálních center a na rozdíl od molekuly teikoplaninu neobsahuje hydrofobní řetězec a cukerné složky, a proto jsou jeho ionizovatelné skupiny odhalenější a tím přístupnější interakcí s analyty.⁵⁹ Absence cukerných zbytků je však zodpovědná za jeho špatnou rozpustnost ve vodě.⁷⁰ Na CSP s navázaným teikoplaninem aglykonem bylo dosaženo lepšího enantioselektivního rozlišení některých α -aminokyselin⁷¹ či sulfoxidů⁷² než na teikoplaninové CSP.



Obr. 9: Teikoplanin aglykon

2.6.3.4 Vankomycin

Vankomycin (obr. 10) je amfoterní glykopeptidové antibiotikum účinné proti grampozitivním bakteriím.⁷³ Stejně jako teikoplanin je využíván k léčbě závažných stafylokokových a streptokokových infekcí. Molekula se skládá ze tří makrocyklů, které obsahují 18 stereogenních center, z pěti aromatických kruhů, devíti hydroxylových skupin a dvou amino skupin.⁷⁴ Je komplementární s ristocetinem A a s teikoplaninem a oproti polysacharidovým CSP má větší univerzálnost.⁶³ Vankomycin jako CSP je vhodný k enantioseparaci neutrálních, bazických i kyselých analytů, zejména protinádorových léčiv, pesticidů, sekundárních a terciárních aminů nebo *N*-derivatizovaných aminokyselin.⁵⁸



Obr. 10: Vankomycin

2.7 Vědecké práce zaměřené na chirální separace citalopramu a citadiolu

Práce zabývající se stereoselektivními separacemi a stanovením racemického citalopramu a jeho použitím ve farmaceutickém průmyslu jsou v literatuře poměrně vzácné. Nejvýznamnější jsou chirální separační metody kapalinové chromatografie. HPLC byla použita pro stanovení enantiomerů citalopramu s využitím širokého spektra chirálních kolon.⁷⁵ Ve většině z těchto metod byl využíván reversní mód, kde polární rozpouštědla a pufrы byly použity v mobilní fázi. Použitím kolony s navázaným β -cyklodextrinem byly stanoveny enantiomery citalopramu v biologických matricích.¹³ Metoda pro kvantitativní analýzu obsahovala nejprve extrakci kapaliny kapalinou a následovala enantioseparace na koloně s CSP s navázaným α_1 -kyselým glykoproteinem, který se používá hlavně pro kyselá nebo bazická farmaka.⁷⁶ U enantioseparací pomocí CSP na bázi makrocyclických antibiotik bylo dosaženo nejlepších výsledků na kolonách s navázaným vankomycinem, za použití iontově polárního módu, kde se mobilní fáze skládala z bezvodého MeOH a malého přídatku kyselých a bazických aditiv, nejčastěji

kyseliny octové a triethylaminu.⁷⁷ Nejvýznamnějším CSP pro separaci enantiomerů citalopramu jsou polysacharidové CSP.⁷⁵ Chirální kolony Chiralcel OC s navázanou celulosou tris(fenylkarbamátem)⁷⁸, Chiralcel OD-H s navázanou celulosou tris(3,5-dimethylfenylkarbamátem)⁷⁵ sloužily ke stanovení enantiomerní čistoty escitalopramu v léčivech. Amylosová CSP (kolona AmyCoat) sloužila k enantiomerní analýze citalopramu v lidské plazmě.⁷⁹

Kapilární elektroforéza byla využita ke studiu enantiomerního složení citalopramu⁸⁰ a jeho metabolitů v lidské plazmě⁸¹ a moči⁸², kde jako chirální selektory byly použity sulfatovaný β -cyklodextrin a karboxymethyl- γ -cyklodextrin. MEKC byla využita pro stanovení citalopramu a jeho metabolitů v moči. Nejlepších výsledků bylo dosaženo použitím borátového pufru (pH= 9,2) obsahující dodecylsulfát sodný (SDS) a propan-2-ol jako základní elektrolyt.⁸³

Jak již bylo řečeno citadiol je syntetický prekursor citalopramu. Práce zaměřené na enantioseparace citadiolu byly prováděny v souvislosti s tím, že chirální čistota escitalopramu závisí na enantiomerní čistotě *S*-citadiolu. K separaci enantiomerů citadiolu byla použita enantioselektivní HPLC s CSP na bázi celulosy Chiralcel OD-H¹³ a amylosy Chiralpak AD-H.¹³ Pro enantioseparaci citadiolu v kapilární elektroforéze byl použit jako CS sulfatovaný β -cyklodextrin.⁸⁰

2.8 Validace metody

Validace analytické metody je číselné prokázání toho, že výsledky získané vypracovanou metodou jsou precizní, přesné, opakovatelné a reprodukovatelné. Validace metody v rámci jedné laboratoře se nazývá interní (vnitřní) validace. Externí (vnější) validaci zahrnuje interní validaci společně s validací metody srovnáním výsledků metody z více laboratoří (mezilaboratorní porovnávací zkoušky) a zahrnuje výpočet reprodukovatelnosti metody.⁸⁶ Pro účely enantioseparace citadiolu a citalopramu a stanovení enantiomerů citalopramu v léčivech byly vybrány tyto validační parametry.

- preciznost
- přesnost

- linearita
- mez detekce
- mez kvantifikace
- robustnost

Pro výpočet těchto parametrů se používá směrodatná odchylka. Směrodatná odchylka je definována jako rozdíl mezi skutečnou a střední hodnotou dané veličiny. Vzhledem k tomu, že skutečná hodnota je ale nedostupná, nahrazujeme směrodatnou odchylku jejím odhadem.⁸⁶

$$SD = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \quad (1)$$

kde n je počet měření, x_i je skutečná hodnota měření, \bar{x} je aritmetický průměr měření.

Výpočet relativní směrodatné odchylky je uveden níže:

$$\text{R.S.D.} = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100 [\%] \quad (2)$$

kde SD je směrodatná odchylka, \bar{x} je aritmetický průměr měření.

2.8.1 Validační parametry

Preciznost je definována jako těsnost shody mezi indikacemi nebo naměřenými hodnotami veličiny získanými opakovanými měřeními na stejném objektu nebo na podobných objektech za specifikovaných podmínek.⁸⁷ Bývá vyjádřena směrodatnou odchylkou opakovatelnosti nebo směrodatnou odchylkou reprodukovatelnosti. Opakovatelnost je definována jako těsnost shody mezi navzájem nezávislými výsledky měření stejného analytu získanými za podmínek opakovatelnosti. Nezávislé výsledky zkoušek se získají opakovaným použitím téže metody, stejným experimentátorem, na stejném přístroji, na stejném místě a za stejných podmínek v krátkém časovém intervalu. Opakovatelnost je vlastností

metody, ne výsledku. Reprodukovatelnost vyjadřuje těsnost souhlasu mezi výsledky měření stejného analytu ve vzorcích stejného materiálu, kdy jsou jednotlivá měření prováděna za různých podmínek (experimentátor, přístroj, místo, podmínky, čas), avšak při použití stejné metody.⁸⁶

Přesnost je definována jako těsnost shody mezi naměřenou hodnotou veličiny a pravou hodnotou měřené veličiny.⁸⁷ S přesností souvisí pojem výtěžnost (R_e), který udává poměr mezi množstvím (koncentrací) analytu získaného danou analytickou metodou k přijaté referenční hodnotě.

$$R_e = \frac{n_{II}}{n_I} \times 100 [\%] \quad (3)$$

kde n_{II} je koncentrace analytu, n_I koncentrace referenčního materiálu.

Linearita je definována jako schopnost metody poskytnout výsledky zkoušky přímo úměrné koncentraci analytu.⁸⁸ Těsnost vzájemné závislosti dvou náhodných proměnných charakterizuje korelační koeficient.

Mez detekce (LOD) je dána nejmenším množstvím analytu ve vzorku, které může být detekováno. U separačních metod se používá k výpočtu meze detekce velikost hodnoty signálu slepého pokusu. Z chromatogramu slepého pokusu se určí maximální kolísání základní linie (h_{\max}) v oblasti dané 20-ti násobkem pološířky píku stanovovaného analytu. Výpočet meze detekce je založen na detekci koncentrace analytu, který v detekčním systému vykazuje trojnásobek signálu k šumu.⁸⁶

Mez stanovitelnosti (LOQ) je nejnižší množství analytu ve vzorku, které může být stanoveno s předem zadanou nejistotou. Výpočet meze stanovitelnosti odpovídá desetinásobku signálu k šumu.⁸⁶

Robustnost analytického postupu je mírou jeho kapacity zůstat netečný vůči malým, ale záměrným změnám parametrů metody a poskytuje indikaci o jeho spolehlivosti během běžného používání.⁸⁸

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité chemikálie

- methanol, CHROMASOLV pro HPLC (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- acetonitril, CHROMASOLV pro HPLC (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- *n*-hexan, CHROMASOLV pro HPLC (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- propan-2-ol, CHROMASOLV pro HPLC (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- triethylamin, p.a., 99% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- octová kyselina, p.a., 99,8% (Lach-Ner, Neratovice, Česká republika)
- fosforečnanový pufr, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, p.a.; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$, p.a. (Penta, Chrudim, Česká republika)
- kyselina fosforečná, p.a., 85%, pro úpravu pH pufru (Lach-Ner, Neratovice, Česká republika)
- hydroxid sodný, p.a., pro úpravu pH pufru (Lach-Ner, Neratovice, Česká republika)
- deionizovaná voda, filtrovaná Milli-Q filtrovacím systémem (Millipore, Milford, MA, USA)

Fosforečnanový pufr byl připraven titrací 20 mM vodného roztoku dihydrogenfosforečnanu sodného s kyselinou fosforečnou na pH = 3,0 a pH = 6,0.

- standardy:
 - citadiol
 - citalopram
 - escitalopram

Vzorky standardů citadiolu, citalopramu a escitalopramu byly získány od Prof. G. E. Scriby, Univerzita v Jeně, Německo

3.2 Přístroje a pomůcky

Chromatografická měření byla provedena na HPLC systému (Waters, Milford, USA): Waters HPLC Breeze System, jehož součástí byly vysokotlaká gradientová pumpa 1525, autosampler 717Plus, kolonový termostat Jetstream 2 Plus a UV-Vis dualní detector 2487; Breeze software.

K chirální separaci byly použity kolony se stacionárními fázemi na bázi makrocyclických antibiotik, cyklofruktanů a polysacharidů. Jednalo se o komerčně dostupné kolony:

- Larihc CF7-DMP (AZYP, Arlington, TX, USA) kolona o rozměrech 250 mm x 4,6 mm se stacionární fází CF7 3,5-dimethylfenyl karbamát, vázanou na silikagelový nosič o zrnění 5 μm
- Chirobiotic TAG (Advanced Separation Technologies, Whippany, NJ, USA), kolona o rozměrech 250 mm x 4,6 mm, s teikoplaninem aglykonem vázaným na silikagelový nosič o zrnění 5 μm
- Chirobiotic V (Advanced Separation Technologies, Whippany, NJ, USA), kolona o rozměrech 250 mm x 4,6 mm, s vankomycinem vázaným na silikagelový nosič o zrnění 5 μm
- Chirobiotic V2 (Advanced Separation Technologies, Whippany, NJ, USA) o rozměrech 250 mm x 4,6 mm, s vankomycinem vázaným na silikagelový nosič o zrnění 5 μm

- Chiralcel OD-RH (Chiral Technologies Europe, Francie), kolona o rozměrech 150 mm x 4,6 mm, 3,5-dimethylfenyl karbamát celulosa vázaná na silikagelový nosič o zrnění 5 μm
- Chiralcel OD-H (Chiral Technologies Europe, Francie), o rozměrech 150 mm x 4,6 mm, 3,5-dimethylfenyl karbamát celulosa vázaná na silikagelový nosič o zrnění 5 μm

Kolona Chirobiotic V2 se liší od kolony Chirobiotic V vyšším pokrytím nosiče chirálním selektorem.

- jednorázová stříkačková frita: Watrex, Praha, Česká republika
- standardy byly váženy na váhách: METTLER AE 240, Greifensee, Švýcarsko.
- chromatogramy byly zpracovány do reprezentativních obrázků programem Origin 7.0 (OriginLab Corporation, USA)
- statistické vyhodnocení pomocí jednofaktorové analýzy rozptylů (ANOVA) bylo prováděno programem Origin 7.0 (OriginLab Corporation, USA)

3.3 Přípravy vzorků

Roztoky citadiolu, citalopramu a escitalopramu byly připraveny rozpuštěním 0,0010 g vzorku v 1 ml methanolu a následně podle potřeby ředěny.

3.4 Podmínky separace

K separaci enantiomerů byly použity chirální stacionární fáze uvedené v kapitole 3.2. Složení zkoumaných mobilních fází ukazuje tab. 1. Poměr zastoupení jednotlivých složek mobilních fází byly měněny ve snaze optimalizovat separaci enantiomerů. Průtoková rychlost mobilní fáze činila 1,0 ml/min. Pro detekci byl použit UV detektor a měření bylo prováděno při vlnové délce 250 nm.

Tab. 1: Seznam použitých chirálních kolon a mobilních fází

chirální kolona	mobilní fáze
Chirobiotic TAG	MeOH/ACN/HOAc/TEA; MeOH/HOAc/TEA
Chirobiotic V, V2	MeOH/HOAc/TEA
Larihc CF7-DMP	ACN/MeOH/HOAc/TEA; MeOH/HOAc/TEA
Chiralcel OD-RH	ACN/fosfátový pufr; ACN/okyselená voda
Chiralcel OD-H	<i>n</i> -hexan/propan-2-ol/TEA

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Enantioseparace na CSP s navázaným teikoplaninem aglykonem

Chirální rozlišení enantiomerů bylo zkoumáno za použití CSP na bázi teikoplaninu aglykonu. Mobilní fáze se skládala z methanolu, acetonitrilu a malých přídavků octové kyseliny a triethylaminu. Byl sledován vliv různého obsahu methanolu a obsahu HOAc a TEA v mobilní fázi na retenční chování jednotlivých enantiomerů (tab. 2).

Tab. 2: Vliv obsahu methanolu v objemových dílech v mobilní fázi na retenci analytů; kolona Chirobiotic T, Chirobiotic T2, Chirobiotic TAG; mobilní fáze MeOH/ACN/HOAc/TEA (v/v/v/v); teplota 25 °C; průtoková rychlost 1 ml/min; UV detekce při 250 nm; k_1 , retenční faktor prvního eluujícího enantiomeru;

MeOH/ACN/HOAc/TEA	citadiol			citalopram		
	k_1			k_1		
	T*	T2*	TAG	T*	T2*	TAG
70/30/0,1/0,1	5,63	7,38	10,8	5,16	5,21	12,3
85/15/0,1/0,1	6,62	6,38	10,6	6,65	4,59	10,1
100/0/0,2/0,2	3,75	5,74	7,62	4,06	5,86	8,44

*Měření na kolonách Chirobiotic T a Chirobiotic T2 byla prováděna v rámci bakalářské práce. Zde jsou chromatografická data uvedena pro srovnání.⁶⁰ Je patrné, že s rostoucím obsahem MeOH dochází k poklesu retence u obou analytů. Analogický efekt má zvýšení přídavku HOAc a TEA. Kromě pokrytí silikagelového nosiče teikoplaninem se kolony Chirobiotic T a T2 liší také délkou řetězce, který zprostředkovává vazbu mezi teikoplaninem a silikagelem. Z porovnání chirálních

kolon na bázi teikoplaninu a teikoplaninu aglykonu vyplývá, že výrazně vyšších retencí enantiomery dosahují na koloně Chirobiotic TAG, což může být způsobeno absencí cukerných složek a hydrofobního řetězce oproti teikoplaninovým kolonám, což usnadňuje přístup analytů do aglykonové dutiny, kde se nachází velké množství interakčních center.⁸⁴ Chirálního ani dílčího rozdělení enantiomerů však na žádné koloně s navázaným teikoplaninem ani teikoplaninem aglykonem za použití daných mobilních fází dosaženo nebylo.

4.2 Enantioseparace na CSP s navázaným vankomycinem

V případě CSP na bázi vankomycinu byly testovány dvě kolony lišící se pokrytím silikagelového nosiče vankomycinem: Chirobiotic V a Chirobiotic V2. CSP s vyšším pokrytím nosiče (Chirobiotic V2) byla účinnější díky poskytnutí většího počtu stereoselektivních míst, které zvyšují možnost chirální diskriminace. Mobilní fáze se skládaly ze 100 objemových procent bezvodého MeOH a přídavků HOAc a TEA v poměru 1:1.

Tab. 3: Srovnání chromatografických dat analytů na CSP lišících se různým pokrytím silikagelového nosiče vankomycinem; mobilní fáze MeOH/HOAc/TEA (v/v/v); teplota 25 °C; průtoková rychlost 1 ml/min; UV detekce při 250 nm; k_1 , retenční faktor prvního elujícího enantiomeru; $R_{1/2}$, enantiorozlišení; α , enantioselektivita

MeOH/HOAc/TEA (v/v/v)		citadiol			citalopram		
		k_1	$R_{1/2}$	α	k_1	$R_{1/2}$	α
100/0,05/0,05	V	4,14	-	-	4,50	1,48	1,09
	V2	7,17	-	-	6,22	1,69	1,11
100/0,1/0,1	V	2,71	-	-	2,95	1,50	1,09
	V2	4,73	-	-	4,18	1,52	1,11
100/0,2/0,2	V	1,91	-	-	1,99	1,34	1,09
	V2	2,88	-	-	2,43	1,34	1,11

- analyt nepodléhal ani částečné enantioseparaci

Jak vyplývá z tab. 3 na koloně s vyšším pokrytím nosiče vankomycinem docházelo k silnějším interakcím mezi enantiomery a stacionární fází, a tedy k prodlužování retenčních časů jednotlivých enantiomerů. Chirální rozlišení enantiomerů citalopramu nabývalo na obou kolonách hodnot $> 1,30$, zatímco citadiol se nedělil vůbec. Z tab. 3 dále vyplývá, že zvyšující se přídavek HOAc a TEA při zachování jejich poměru vede ke snižování retence obou analytů, jakož i rozlišení citalopramu, zatímco hodnoty enantioselektivity se nemění.

Vzhledem k dosažení lepších výsledků na koloně s vyšším pokrytím vankomycinem byl přídavek HOAc a TEA na této koloně studován detailněji (tab. 4).

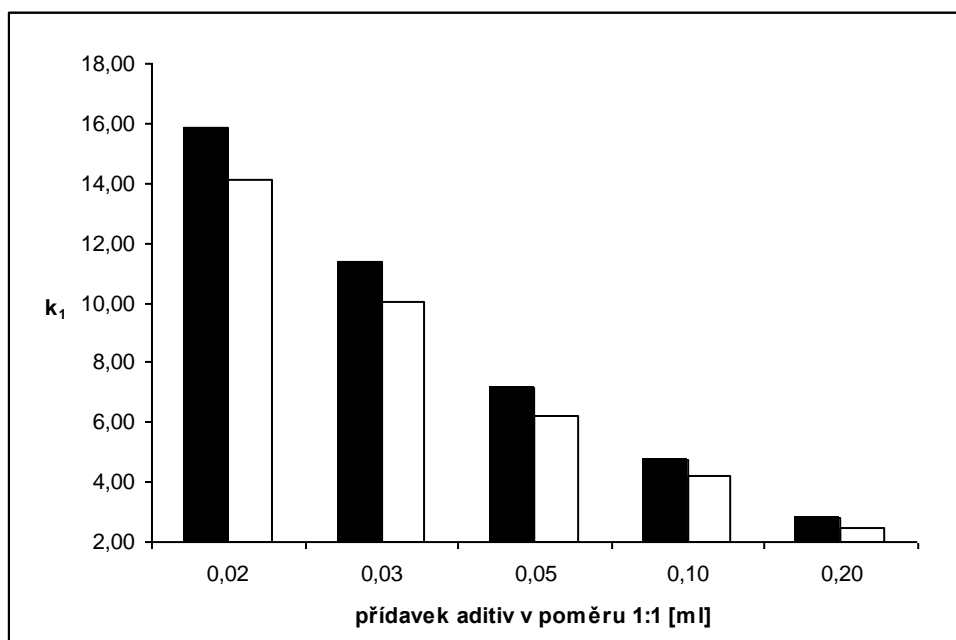
Tab. 4: Vliv přídavku octové kyseliny a triethylaminu v objemových dílech v mobilní fázi na retenci a separaci analytů; separace na koloně Chirobiotic V2; mobilní fáze MeOH/HOAc/TEA (v/v/v); teplota 25 °C; průtoková rychlost 1 ml/min; UV detekce při 250 nm; k_1 , retenční faktor prvního eluujícího enantiomeru; $R_{1/2}$, enantiorozlišení; α , enantioselektivita

MeOH/HOAc/TEA (v/v/v)	citadiol			citalopram		
	k_1	$R_{1/2}$	α	k_1	$R_{1/2}$	α
100/0,02/0,02	15,9	-	-	14,4	2,03	1,10
100/0,03/0,03	11,4	-	-	10,0	1,94	1,10
100/0,05/0,05	7,17	-	-	6,22	1,69	1,11
100/0,1/0,1	4,73	-	-	4,18	1,52	1,11
100/0,2/0,2	2,88	-	-	2,43	1,34	1,11

- analyt nepodléhal ani částečné enantioseparaci

Snížení obsahu octové kyseliny a triethylaminu vedlo ke zvýšení retence, které mělo za následek zlepšení enantioseparace citalopramu. Citadiol se nedělil ani částečně v žádné ze zkoumaných mobilních fází. Závislosti z tab. 4 jsou pro větší přehlednost graficky zpracovány v obr. 11. Velmi malé přídavky kyseliny a báze do methanolické mobilní fáze ovlivňují elektrostatické interakce analytů s CSP, tedy i retence a rozlišení polárních analytů. Nejvyššího enantioselektivního rozlišení dosáhl citalopram v mobilní fázi MeOH/HOAc/TEA 100/0,02/0,02 (v/v/v), tedy při nejnižším přídavku aditiv, kdy zadržování enantiomerů citalopramu na koloně bylo

největší. S přidavkem HOAc a TEA nedochází k podstatným změnám v selektivitě. U citadiolu na této koloně nedochází k enantioseparaci.



Obr. 11: Závislost retenčního faktoru dříve eluujícího enantiomeru na přidavek HOAc a TEA; separace na koloně Chirobiotic V2; mobilní fáze MeOH/HOAc/TEA (v/v/v); teplota 25 °C; průtoková rychlost 1 ml/min; UV detekce při 250 nm; ■ citadiol, □ citalopram

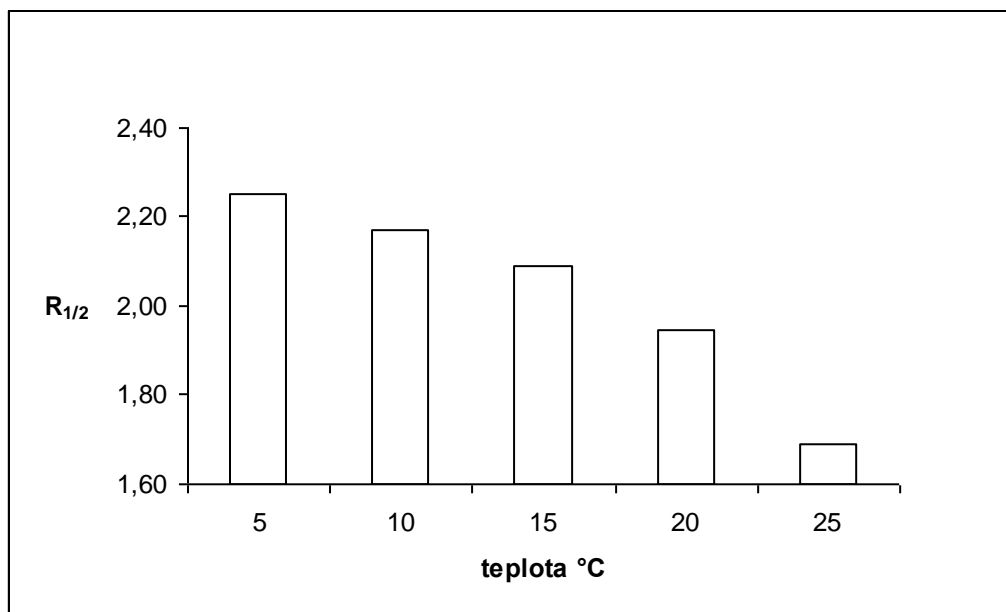
Faktorem, který může výrazně ovlivnit retenci analytů i enantioselektivní separaci je teplota. Proto byl zkoumán vliv teploty v rozmezí 5 - 25 °C. Výsledky jsou uvedeny v tab. 5, závislost rozlišení na teplotě je ještě znázorněna na obr. 12.

Tab. 5: Vliv teploty na retenci a separaci analytů; separace na koloně Chirobiotic V2; mobilní fáze MeOH/HOAc/TEA 100/0,05/0,05 (v/v/v); průtoková rychlost 1 ml/min; UV detekce při 250 nm; k_1 , retenční faktor prvního eluujícího enantiomeru; $R_{1/2}$, enantiorozlišení; α , enantioselektivita

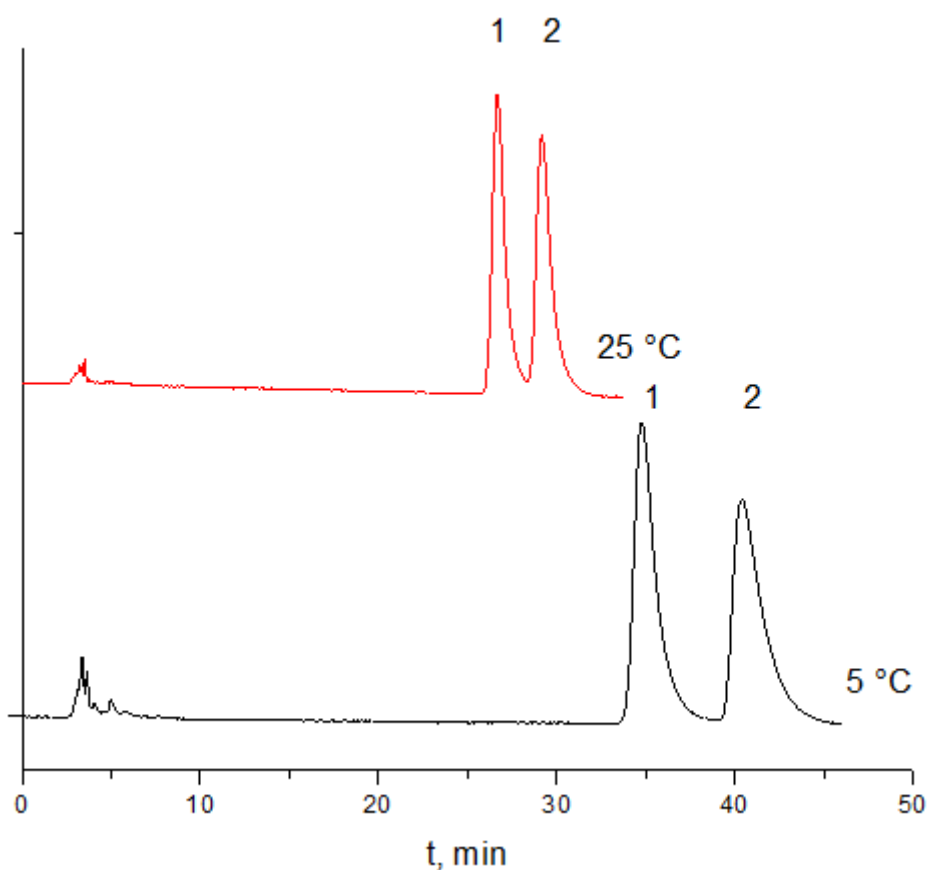
veličina	analyt	teplota [°C]				
		5	10	15	20	25
k_1	citadiol	11,0	9,71	9,07	8,75	7,18
	citalopram	9,54	8,39	7,87	7,58	6,13
$R_{1/2}$	citadiol	-	-	-	-	-
	citalopram	2,25	2,17	2,09	1,95	1,69
α	citadiol	-	-	-	-	-
	citalopram	1,18	1,16	1,14	1,12	1,11

- analyt nepodléhal ani částečné enantioseparaci

Obecně zvýšení separační teploty zrychluje přenos hmoty během separačního procesu a může pozitivně ovlivňovat analýzu, neboť vzrůstající separační teplota snižuje viskozitu mobilní fáze. Pro určení vlivu teploty na retenci a stereoselektivní rozlišení citalopramu byla optimalizována mobilní fáze ve složení MeOH/HOAc/TEA 100/0,05/0,05 (v/v/v), ve které byly získány poměrně nízké hodnoty retenčních faktorů obou enantiomerů a rozlišení enantiomerů citalopramu nabývajících hodnot $> 1,50$. Analýzy za nižších teplot obecně vedou k prodloužení doby analýzy, tedy zvýšení retence analytů, zlepšení selektivity a chirálního rozdělení enantiomerů. Na druhé straně dělení citalopramu bylo dosaženo až na základní linii i při vyšších teplotách, kdy se současně zkrátila doba analýzy, zlepšila se symetrie píků, jak dokazuje srovnání chromatogramů na obr. 13. Z obr. 13 dále plyne, že eluční pořadí se se změnou teploty nemění.



Obr. 12: Závislost enantiorozlišení na teplotě; separace na koloně Chirobiotic V2; mobilní fáze MeOH/HOAc/TEA 100/0,05/0,05 (v/v/v); průtoková rychlost 1 ml/min; UV detekce při 250 nm; □ citalopram



Obr. 13: Chromatogramy enantioseparace citalopramu na koloně Chirobiotic V2 při dvou různých teplotách; mobilní fáze MeOH/HOAc/TEA 100/0,05/0,05 (v/v/v); průtoková rychlost 1 ml/min; UV detekce při 250 nm; 1: *R*-citalopram, 2: *S*-citalopram

Z porovnání retenčních časů enantiomerů citadiolu a citalopramu na kolonách Chirobiotic V2 a Chirobiotic TAG vyplývá, že citadiol byl více zadržován na chirální koloně s navázaným vankomycinem, zatímco na chirální koloně s navázaným teikoplaninem aglykonem později eluoval citalopram. Prohození elučního pořadí ukazuje na odlišný interakční mechanismus na obou CSP.

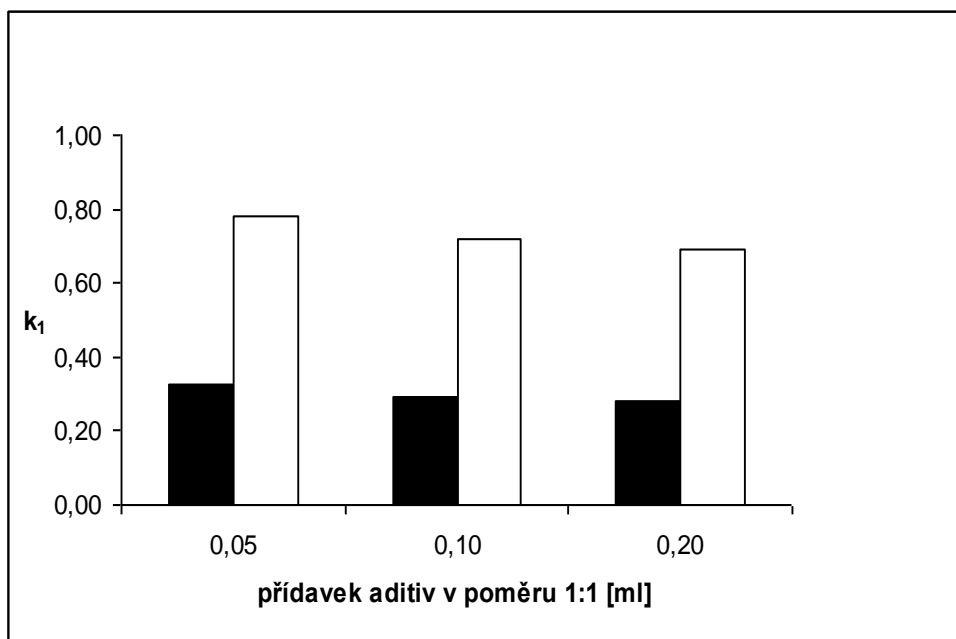
4.3 Enantioseparace na CSP s navázaným CF7-DMP

K separacím byla použita chirální stacionární fáze s navázaným cyklofruktanem tvořeným 7 fruktofuranosovými kruhy. Jako derivatizační skupina byl navázán 3,5-dimethylfenyl pomocí karbamátové vazby. Mobilní fáze v polárně organickém módu byla tvořena acetonitrem a methanolem v různém poměru a přidávkem aditiv triethylaminu a octové kyseliny v poměru 1:1. Výsledky jsou shrnuty v tab. 6, respektive na obr. 14.

Tab. 6: Vliv obsahu methanolu v objemových dílech v mobilní fázi na retenci analytů; kolona Larihc CF7-DMP; mobilní fáze MeOH/ACN/HOAc/TEA (v/v/v/v); teplota 25 °C; průtoková rychlost 1 ml/min; UV detekce při 250 nm; k_1 , retenční faktor prvního eluujícího enantiomeru;

MeOH/ACN/HOAc/TEA	citadiol k_1	citalopram k_1
100/0/0,1/0,1	0,29	0,72
70/30/0,1/0,1	0,26	0,54
60/40/0,1/0,1	0,32	0,60
40/60/0,1/0,1	0,46	0,80
20/80/0,1/0,1	1,74	2,76

S rostoucím zastoupením MeOH v mobilní fázi klesá retenční faktor citadiolu i citalopramu, a tím se zkracuje doba analýzy. To může být zapříčiněno soutěžením MeOH a analytu o interakci vodíkovými vazbami se stacionární fází. Zvýšená interakce analytů s chirálním selektorem však neměla stereoselektivní charakter. Při stejném zastoupení MeOH byl citadiol zadržován na separační koloně méně než citalopram. Největší rozdíl v retenčních časech obou studovaných analytů bylo dosaženo v mobilní fázi MeOH/ACN/HOAc/TEA 20/80/0,1/0,1 (v/v/v/v). V mobilní fázi, která je tvořena pouze MeOH a přidávkem aditiv však můžeme pozorovat opětovný nárůst retence. Zvyšování obsahu kyselých a bazických aditiv v mobilní fázi při zachování konstantních poměrů, nemá téměř žádný vliv na retenci analytů (obr. 14).



Obr. 14: Závislost retenčního faktoru dříve elujícího enantiomeru na přídavku HOAc a TEA; kolona Larihc CF7-DMP; mobilní fáze MeOH/HOAc/TEA (100/v/v); teplota 25 °C; průtoková rychlost 1 ml/min; UV detekce při 250 nm; ■ citadiol, □ citalopram

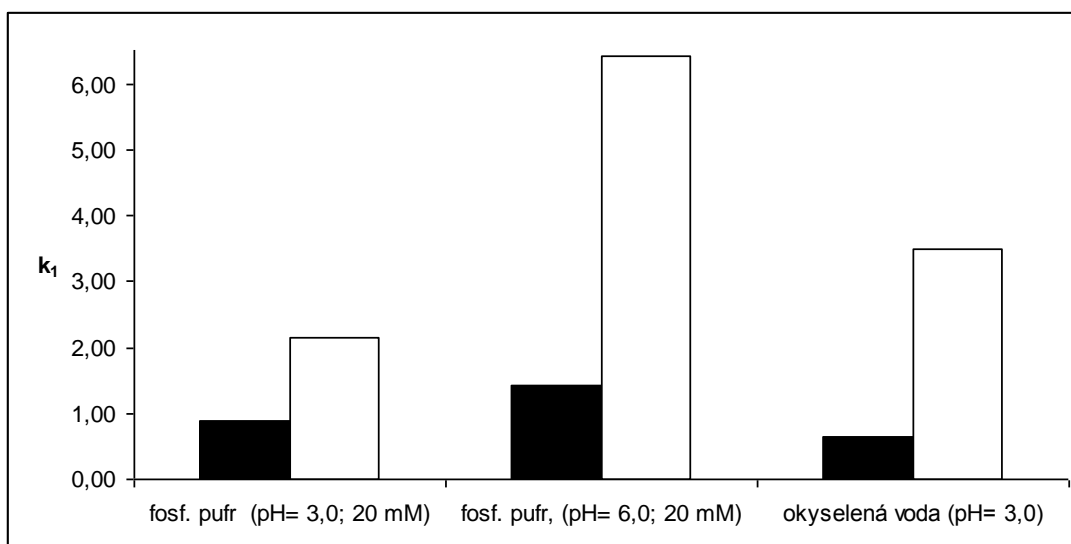
4.4 Enantioseparace na CSP s navázanou celulosou tris(3,5-dimethylfenylkarbamátem)

CSP na bázi celulosy jsou vhodnou alternativou ke CSP s navázanými MA. K separacím byly použity kolony Chiralcel OD-RH a Chiralcel OD-H. Na těchto kolonách je na silikagelový nosič navázána celulosa tris(3,5-dimethylfenylkarbamát). Chiralcel OD-RH se používá v reverzním separačním módu, zatímco Chiralcel OD-H v normální módu.

4.4.1 Chiralcel OD-RH

CSP tvoření celulosou tris(3,5-dimethylfenylkarbamátem) byla použita v reverzním módu v kombinaci s binární mobilní fází tvořenou acetonitrilem a 20 mM vodným roztokem fosforečnanového pufru nebo acetonitrilem a vodou

okyselenou na pH= 3,0 přidavkem octové kyseliny. Retence analytů je ovlivněna obsahem organického modifikátoru ACN v mobilní fázi. S rostoucím obsahem ACN klesá retenční faktor citadiolu a citalopramu. Obsah ACN vyšší než je 20 objemových dílů způsobuje eluci obou analytů s mrtvým časem. Se zvyšujícím se podílem vodné složky nabývají na významu hydrofobní interakce mezi analytem a chirálním selektorem a retence roste. Retence analytů roste také se vzrůstající hodnotou pH pufru. Ze získaných údajů (obr. 15) bylo patrné, že retence je ovlivněna nejen hodnotami pH, ale i složením pufru. Citadiol i citalopram dosahovaly nejvyšších retencí ve fosf. pufru o pH = 6,0. Předpokládá se, že kyselina přidaná do vodné fáze interaguje s CSP, zejména s hydroxylovou (Si-OH) skupinou silikagelu a amino a karbamátovou skupinou navázanou na celulóze.⁸⁵



Obr. 15: Závislost retenčního faktoru dříve eluujícího enantiomeru na složení vodné složky; kolona Chiralcel OD-RH; mobilní fáze ACN/fosf. pufr 20/80 (v/v); ACN/okyselená voda 20/80 (v/v); teplota 25 °C; průtoková rychlost 1 ml/min; UV detekce při 250 nm; ■ citadiol, □ citalopram

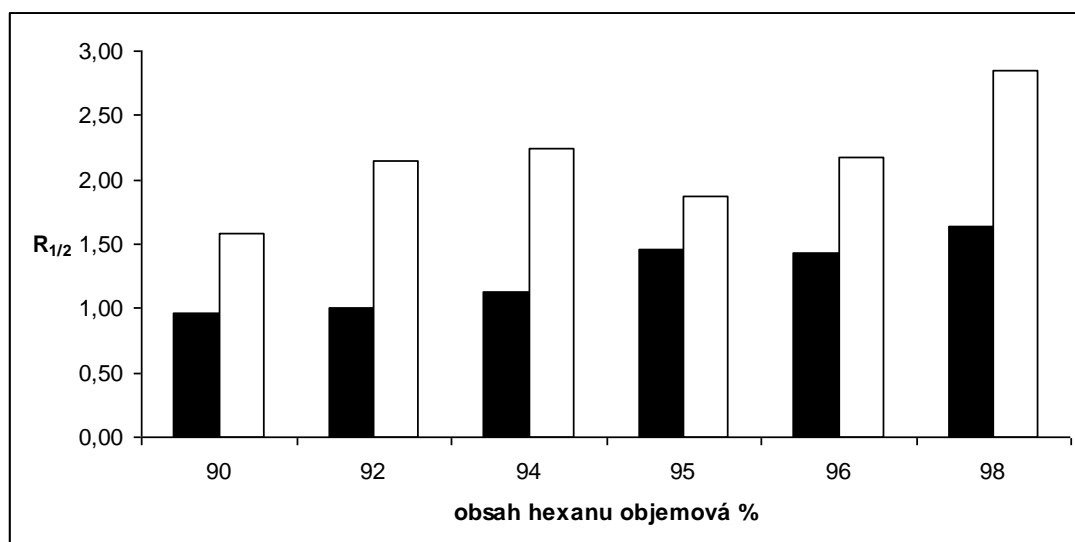
4.3.2 Chiralcel OD-H

CSP Chiralcel OD-H byla použita v normálním módu v mobilní fázi složenou z *n*-hexanu, propan-2-olu a malého přidavku triethylaminu. Získané výsledky jsou uvedeny v tab. 7 a 8 a na obr. 16. Na této CSP bylo dosaženo

nejlepších výsledků enantioseparace citadiolu a citalopramu. Schopnost separace zkoumaných enantiomerů v normálním separačním módu na polysacharidových CSP naprosto převyšovala možnosti enantioseparace v reverzním módu, který obecně vykazuje lepší selektivitu. Struktura obou analytů obsahuje aromatické jádro a velmi elektronegativní atomy fluoru a kyslíku. Chirální diskriminace jednotlivých enantiomerů mohla být dosažena pomocí π - π interakcí mezi aromatickými kruhy enantiomerů a CSP, vodíkových interakcí, dipól-dipól interakcí, které se více uplatňují v normálním separačním módu.

Tab. 7: Vliv obsahu hexanu v objemových dílech v mobilní fázi na retenci a separaci analytů; separace na koloně Chiralcel OD-H; mobilní fáze *n*-hexan/propan-2-ol/TEA (v/v/v); teplota 25 °C; průtoková rychlost 1 ml/min; UV detekce při 250 nm; k_1 , retenční faktor prvního eluujícího enantiomeru; $R_{1/2}$, enantiorozlišení; α , enantioselektivita

<i>n</i> -hexan/propan-2-ol/TEA	citadiol			citalopram		
	k_1	$R_{1/2}$	α	k_1	$R_{1/2}$	α
90/10/0,1	1,91	0,96	1,14	1,86	1,58	1,18
92/8/0,1	2,90	1,01	1,13	2,29	2,14	1,27
94/6/0,1	4,21	1,21	1,12	2,69	2,24	1,34
95/5/0,1	4,33	1,46	1,18	2,89	1,88	1,21
96/4/0,1	6,05	1,44	1,18	3,55	2,17	1,24
98/2/0,1	14,40	1,64	1,18	5,66	2,85	1,31



Obr. 16: Závislost enantiorozlišení na procentuálním obsahu hexanu v mobilní fázi; separace na koloně Chiralcel OD-H; mobilní fáze *n*-hexan/propan-2-ol/TEA (v/v/v); teplota 25 °C; průtoková rychlost 1 ml/min; UV detekce při 250 nm; ■ citadiol, □ citalopram

Koncentrace propan-2-olu má vliv na retenci i enantiorozlišení, přičemž se snižujícím zastoupením alkoholu v mobilní fázi, se zvyšuje retenční faktor a většinou i rozlišení. Hodnoty retence enantiomerů citadiolu jsou přitom vždy nižší než pro citalopram. Počínaje obsahem 5 objemových dílů propan-2-olu v *n*-hexanu bylo pro oba analyty dosaženo chirální rozlišení > 1,46 (tab. 7, obr. 16).

Tab. 8: Vliv koncentrace triethylaminu v objemových dílech v mobilní fázi na retenci a separaci analytů; separace na koloně Chiralcel OD-H; mobilní fáze *n*-hexan/propan-2-ol/TEA 96/4/*v* (*v/v/v*); teplota 25 °C; průtoková rychlost 1 ml/min; UV detekce při 250 nm; k_1 , retenční faktor prvního eluujícího enantiomeru; $R_{1/2}$, enantiozlišení; α , enantioselektivita

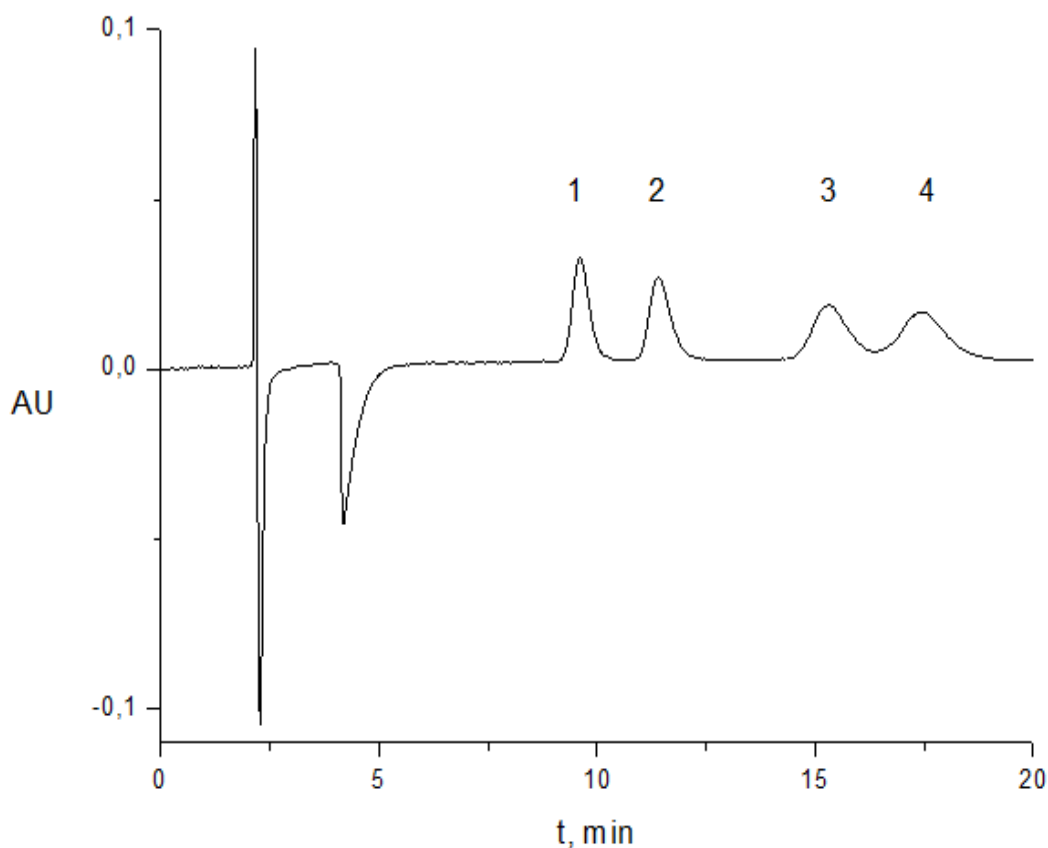
<i>n</i> -hexan/propan-2-ol/TEA (96/4/ <i>v</i>)						
objemový díl TEA	citadiol			citalopram		
	k_1	$R_{1/2}$	α	k_1	$R_{1/2}$	α
0	8,06	0,85	1,17	4,74	0,79	1,17
0,02	5,94	1,46	1,17	3,32	2,28	1,24
0,05	6,43	1,39	1,16	3,59	2,66	1,28
0,1	5,96	1,50	1,18	3,45	2,16	1,23
0,2	6,61	1,56	1,18	3,62	2,79	1,29

Tab. 9: Vliv koncentrace triethylaminu v objemových dílech v mobilní fázi na symetrii píků analytů; separace na koloně Chiralcel OD-H; mobilní fáze *n*-hexan/propan-2-ol/TEA 96/4/*v* (*v/v/v*); teplota 25 °C; průtoková rychlost 1 ml/min; UV detekce při 250 nm; A_S , symetrie

<i>n</i> -hexan/propan-2-ol/TEA (96/4/ <i>v</i>)		
objemový díl TEA	<u>citadiol</u>	<u>citalopram</u>
	A_S	A_S
0,00	1,75	1,53
0,02	1,24	1,38
0,05	1,18	1,26
0,10	1,16	1,24
0,20	1,12	1,08

Přídavek TEA do mobilní fáze nemá velký vliv na retenci analytů (tab. 8) a omezuje chvostování píků (tab. 9). Pouze v mobilní fázi bez přídavku bazického triethylaminu došlo k vyššímu nárůstu retenčních časů všech enantiomerů a k velkému poklesu rozlišení, které bylo způsobeno velkou asymetrií. Zvýšení koncentrace TEA na 0,2

objemových dílů, způsobilo zvýšení šumu na základní linii, a proto jako optimální byla vybrána koncentrace 0,1 objemových dílů. Jako kompromis mezi dobou analýzy a rozlišením enantiomerů obou analytů byla zvolena jako nejlepší mobilní fáze ve složení *n*-hexan/propan-2-ol/triethylamin v objemových poměrech 96/4/0,1. Separace je ukázána na obr. 17. Při porovnání retenčního chování sledovaných analytů bylo zjištěno, že na chirální koloně Chiralcel OD-RH v reverzním módu vykazoval citalopram vyšších retencí než citadiol, zatímco na koloně Chiralcel OD-H se eluční pořadí vyměnilo a vyšších retencí dosahoval citadiol. Tato skutečnost je v souladu s komplementaritou obou separačních systémů (RP x NP).



Obr. 17: Chromatogram enantioseparace citalopramu a citadiolu na koloně Chiralcel OD-H; mobilní fáze: *n*-hexan/propan-2-ol/TEA 96/4/0,1 (v/v/v); průtoková rychlost 1 ml/min; UV detekce při 250 nm; pořadí eluentů: 1: *R*-citalopram, 2: *S*-citalopram, 3: *R*-citadiol*, 4: *S*-citadiol*

*Retenční pořadí u citadiolu je udáno na základě dat z literatury¹³ (standardy enantiomerů nebyly k dispozici).

Tab. 10: Vliv teploty na retenci a separaci analytů; separace na koloně Chiralcel OD-H; mobilní fáze *n*-hexan/propan-2-ol/TEA 94/6/0,1 (v/v/v); průtoková rychlost 1 ml/min; UV detekce při 250 nm; k_1 , retenční faktor prvního eluujícího enantiomeru; $R_{1/2}$, enantiorozlišení; α , enantioselektivita

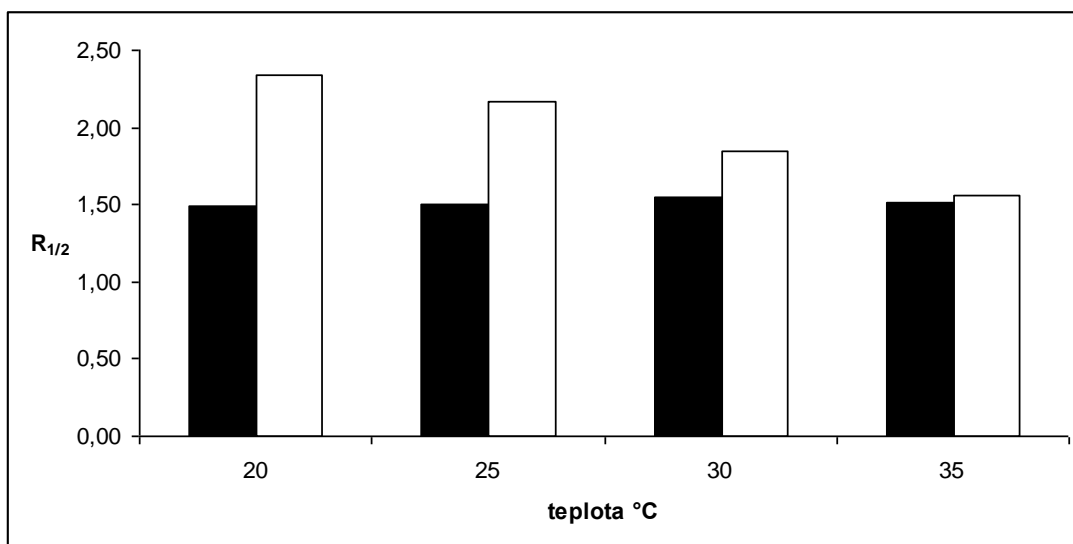
veličina	analyt	teplota [°C]				
		5	10	15	20	25
k_1	citadiol	5,78	5,31	4,74	4,48	4,21
	citalopram	4,38	3,98	3,47	3,15	2,69
$R_{1/2}$	citadiol	1,00	0,99	1,05	1,14	1,13
	citalopram	3,14	2,89	2,62	2,32	2,24
α	citadiol	1,14	1,15	1,15	1,15	1,12
	citalopram	1,51	1,42	1,35	1,28	1,34

Tab. 11: Vliv teploty na retenci a separaci analytů; separace na koloně Chiralcel OD-H; mobilní fáze *n*-hexan/propan-2-ol/TEA 96/4/0,1 (v/v/v); průtoková rychlost 1 ml/min; UV detekce při 250 nm; k_1 , retenční faktor prvního eluujícího enantiomeru; $R_{1/2}$, enantiorozlišení; α , enantioselektivita

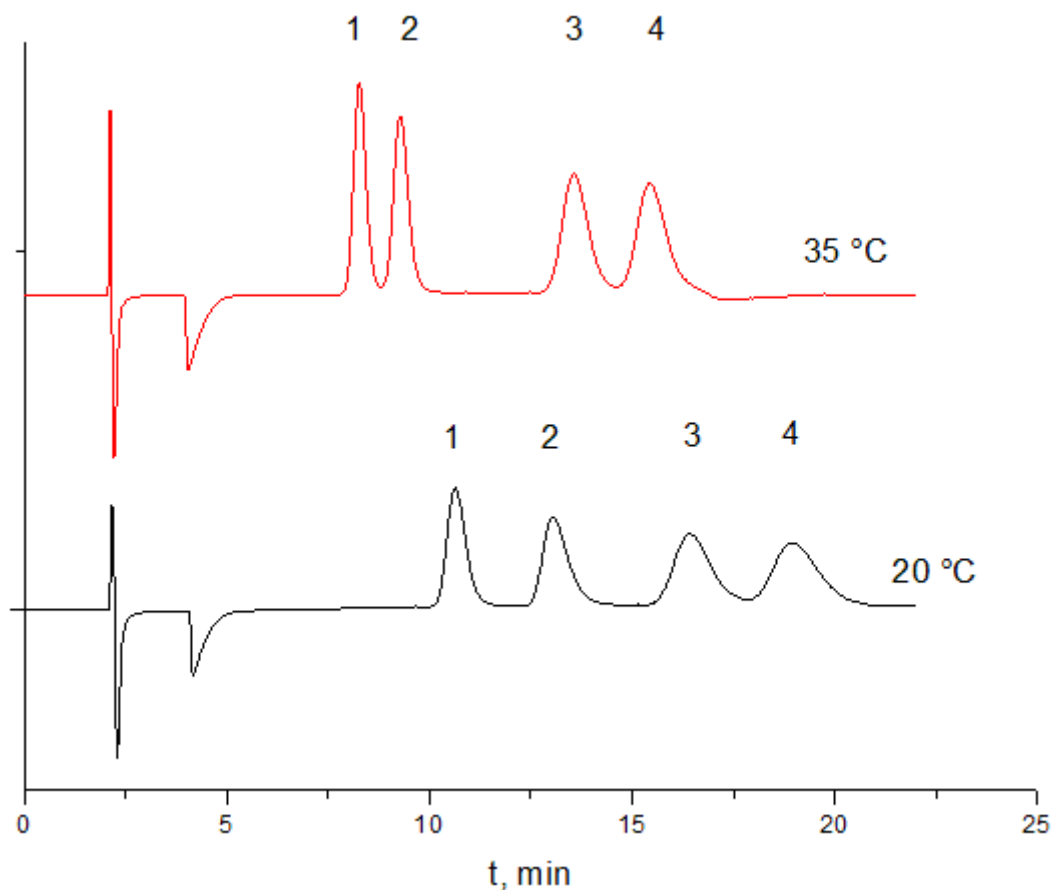
veličina	analyt	teplota [°C]			
		20	25	30	35
k_1	citadiol	6,56	5,96	5,54	5,34
	citalopram	3,92	3,45	3,12	2,89
$R_{1/2}$	citadiol	1,49	1,50	1,55	1,52
	citalopram	2,34	2,16	1,85	1,56
α	citadiol	1,19	1,18	1,17	1,17
	citalopram	1,28	1,23	1,20	1,16

Vliv teploty kolony na retenci byl sledován v systému s mobilní fází *n*-hexan/propan-2-ol/TEA 94/6/0,1 (v/v/v) v rozmezí teplot 5-25 °C a s mobilní fází *n*-hexan/propan-2-ol/TEA 96/4/0,1 (v/v/v) v rozmezí 20-35 °C. Výsledky shrnují tabulky 10 a 11. U obou analytů docházelo vlivem zvýšení teploty ke snižování retenčního faktoru i selektivity. Enantiorozlišení u citalopramu se s rostoucí teplotou snižovalo, zatímco u citadiolu nevykazovalo výrazný trend (obr. 18). Při porovnání teplotních závislostí získaných při složeních mobilních fází je patrné, že

stereoselektivní rozlišení citadiolu vykazuje separaci až na základní linii pouze v mobilní fázi s menším obsahem propan-2-olu. Obr. 19 ukazuje chromatogramy získané při krajních hodnotách teplot měřeného intervalu. Eluční pořadí se vlivem teploty nemění.



Obr. 18: Závislost rozlišení na teplotě; separace na koloně Chiralcel OD-H; mobilní fáze *n*-hexan/propan-2-ol/TEA 96/4/0,1 (v/v/v); průtoková rychlost 1 ml/min; UV detekce při 250 nm; ■ citadiol, □ citalopram



Obr. 19: Chromatogramy enantioseparace citalopramu a citadiolu na koloně Chiralcel OD-H při dvou různých teplotách; mobilní fáze *n*-hexan/propan-2-ol/TEA 96/4/0,1 (v/v/v); průtoková rychlost 1 ml/min; UV detekce při 250 nm; 1: *R*-citalopram, 2: *S*-citalopram, 3: *R*-citadiol, 4: *S*-citadiol

4.5 Validace analytické metody

Validace byla prováděna v systému s chirální kolonou Chiralcel OD-H, tj. s celulosou tri(3,5-dimethylfenylkarbamát) a s optimalizovaným složením mobilní fáze *n*-hexan/propan-2-ol/TEA 96/4/0,1 (v/v/v) při průtoku mobilní fáze 1 ml/min. Kolona byla termostatována na 25 °C a detekce byla prováděna při vlnové délce 250 nm.

4.5.1 Preciznost

S cílem vyhodnocení preciznosti HPLC metody byla studována opakovatelnost nástřiku, přípravy vzorku a reprodukovatelnost měření. Opakovatelnost nástřiku na hodnoty retenčních faktorů dříve eluujících enantiomerů k_1 a koncentrací analytů byly stanoveny jako relativní směrodatné odchylky (R.S.D.) pro 10 po sobě jdoucích nástřiků analytů o koncentraci 1,00 mg/ml. Opakovatelnost přípravy vzorku byla testována přípravou 5 individuálních roztoků citadiolu a citalopramu (každý změřen dvakrát) o koncentraci 1,00 mg/ml a opět byla určena R.S.D. retenčních faktorů dříve eluujících enantiomerů k_1 a koncentrací analytů. Reprodukovatelnost chromatografických měření pro testované analyty byla prováděna jiným pracovníkem a byla stanovena R.S.D. jen pro retenční faktor k_1 dříve eluujících enantiomerů. Výsledky v tab. 12 ukazují, že metoda je vhodná pro kvalitativní i kvantitativní analýzu sledovaných analytů.

Tab. 12: Přesnost vyjádřená jako relativní směrodatná odchylka hodnot retenčních faktorů a koncentrací; R.S.D, relativní směrodatná odchylka; k_1 , retenční faktor prvního eluujícího enantiomeru; c, koncentrace

analyt	opakovatelnost nástřiku		opakovatelnost přípravy vzorku		reprodukovatelnost
	<u>R.S.D. k_1</u>	<u>R.S.D. c</u>	<u>R.S.D. k_1</u>	<u>R.S.D. c</u>	<u>R.S.D. k_1</u>
	%	%	%	%	%
citadiol	0,33	3,70	0,49	4,98	0,70
citalopram	0,06	1,56	0,08	4,60	0,10

opakovatelnost - R.S.D. hodnoty byly vypočteny z 10 následujících nástřiků analytů

reprodukovatelnost – R.S.D. hodnoty byly vypočteny z měření prováděny jiným pracovníkem

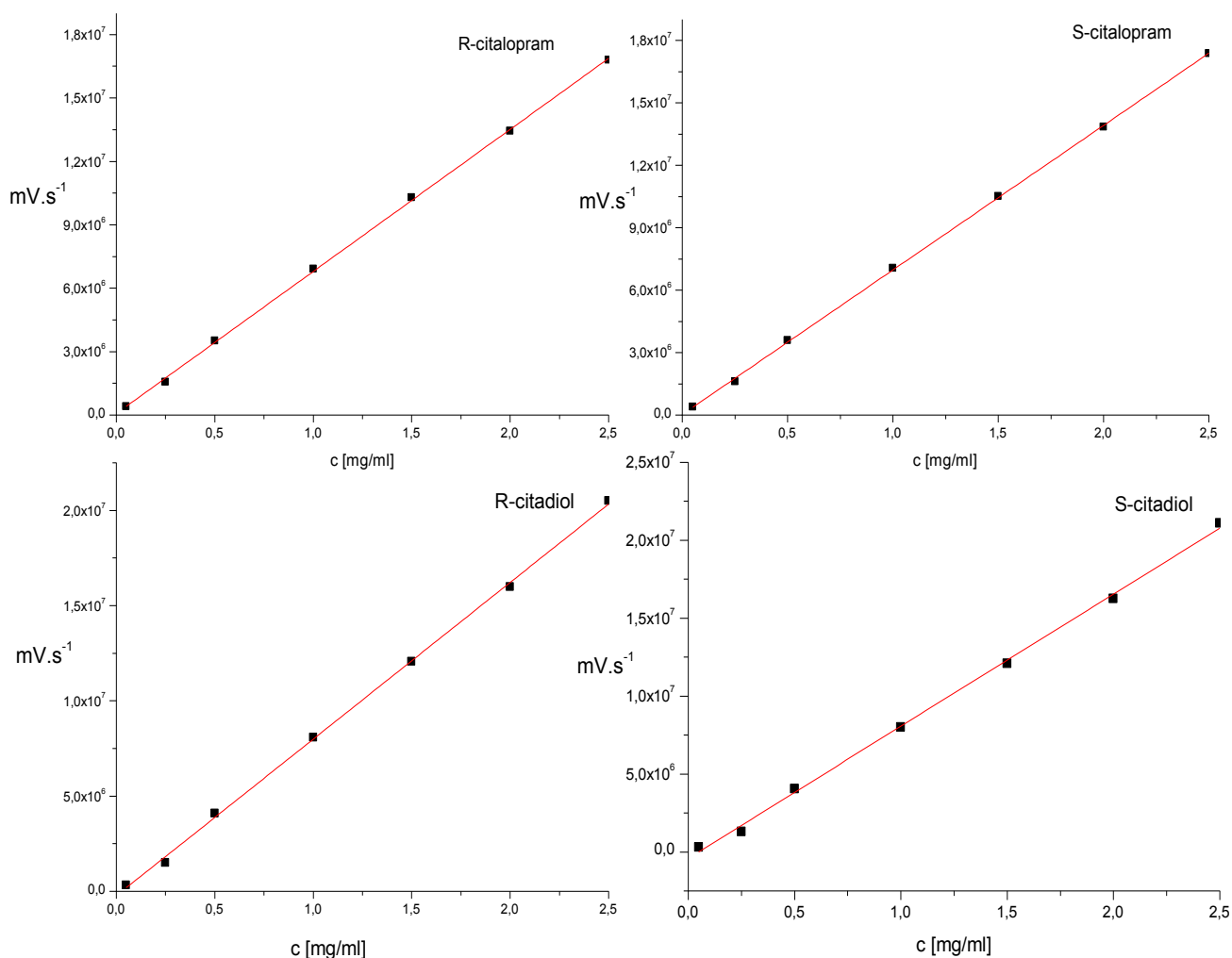
4.5.2 Linearita

Analyty pro testování linearity byly ve formě racemátů. Pro měření kalibrační křivky citadiolu a citalopramu bylo připraveno 7 roztoků o koncentracích 0,10; 0,50; 1,00; 2,00; 3,00; 4,00; 5,00 mg/ml. Kalibrační roztoky o požadovaných

koncentracích byly připraveny postupným ředěním analytů o koncentraci 5,00 mg/ml. Měření na všech koncentračních hladinách bylo uskutečněno třikrát. Parametry kalibračních závislostí ploch píků na koncentraci jsou uvedeny v tab. 13. Ze zjištěných vysokých hodnot koeficientů determinace je patrná dobrá linearita závislostí, což potvrzují grafy na obr. 20. Nejnižšího koeficientu determinace dosahoval *S*-citadiol, což mohlo být způsobeno jeho velkým zadržováním na koloně a velkou asymetrií píků.

Tab. 13: Linearita – parametry získané z kalibrační závislosti ploch píků na koncentraci: kolona Chiralcel OD-H; mobilní fáze *n*-hexan/propan-2-ol/TEA 96/4/0,1 (v/v/v); teplota 25 °C; průtoková rychlost 1 ml/min; UV detekce při 250 nm; R^2 , koeficient determinace

analyt	<u>směrnice</u> $\text{mV}\cdot\text{s}\cdot\text{ml}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot 10^6$	<u>úsek</u> $\text{mV}\cdot\text{s}\cdot 10^4$	R^2
<i>R</i> -citadiol	8,224	22,89	0,9993
<i>S</i> -citadiol	8,478	43,08	0,9985
<i>R</i> -citalopram	6,719	7,346	0,9996
<i>S</i> -citalopram	6,943	2,641	0,9997



Obr. 20: Kalibrační přímky enantiomerů citalopramu a citadiolu

4.5.3 Mez detekce a mez stanovitelnosti

Mez detekce (LOD) je dána nejmenším množstvím analytu ve vzorku, které může být detekováno. Šumu základní linie byl vyhodnocen zaznamenáním odezvy detektoru po dobu přibližně desetinásobku šířky píku stanovovaného analytu. Výpočet meze detekce je založen na detekci koncentrace analytu, který v detekčním systému vykazuje trojnásobek signálu k šumu. Mez stanovitelnosti (LOQ) je nejnižší množství analytu ve vzorku, které může být stanoveno s předem zadanou nejistotou. Výpočet meze stanovitelnosti odpovídá desetinásobku signálu k šumu. Při výpočtech

LOD a LOQ byly hodnoty úseků zanedbány. Tabulka 14 ukazuje, že nejnižších hodnot LOD a LOQ bylo dosaženo pro *R*-citalopram.

Tab. 14: Hodnoty limitů detekce a limitů stanovitelnosti: kolona Chiralcel OD-H; mobilní fáze *n*-hexan/propan-2-ol/TEA 96/4/0,1 (v/v/v); teplota 25 °C; průtoková rychlost 1 ml/min; UV detekce při 250 nm; LOD, limit detekce; LOQ, limit stanovitelnosti

analyt	LOD / $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	LOQ / $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$
<i>R</i> -citadiol	1,03	3,44
<i>S</i> -citadiol	1,30	4,32
<i>R</i> -citalopram	0,68	2,26
<i>S</i> -citalopram	0,85	2,84

4.5.4 Robustnost

K určení robustnosti byla jako statistická metoda použita jednofaktorová analýza rozptylu (ANOVA). Pro stanovení byla zvolena změna teploty na koloně $25\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ a změna obsahu hexanu v mobilní fázi $96\% \pm 0,5\%$. Robustnost byla stanovena pro čtyřnásobný nástřik analytů citadiolu a citalopramu o koncentraci 1,00 mg/ml. Byl sledován efekt parametrů metody na selektivitu, rozlišení a plochy píků. Hypotézy, že chyby vyplynuly z normálního rozdělení byly testovány nejdříve. Nulová hypotéza byla přijata v případě, kdy *p*-hodnoty nabývaly vyšších hodnot než hladina spolehlivosti ($\alpha_{95} = 0,05$). Vypočítané *p*-hodnoty jsou ukázány v tab. 15.

Tab. 15: Statistické p -hodnoty získané z jednofaktorové analýzy rozptylů; A, plocha píku; α , enantiosektivita; $R_{1/2}$, enantiorozlišení

Faktor	p -hodnota							
	R-CTD		S-CTD		R-CIT		S-CIT	
	A	α	$R_{1/2}$		A	α	$R_{1/2}$	
Teplota	0,53	0,19	0,17	0,39	0,17	0,30	0,05	0,07
obsah <i>n</i> -hexanu	0,76	0,45	0,05	0,07	0,10	0,22	0,10	0,05

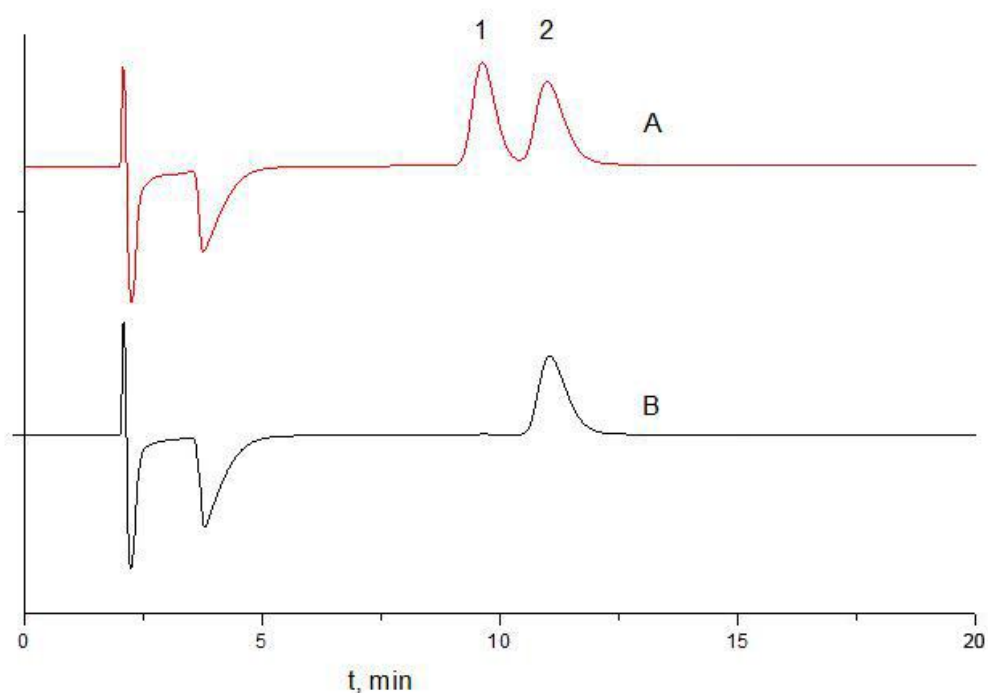
4.5.5 Přesnost a analýza reálného vzorku

Byl ověřován obsah účinné složky ve 4 tabletách dvou typů léčiv. První typ léčiva, Seropram, jako účinnou látku obsahoval 20 mg racemátu citalopramu. Druhé léčivo, Cipralex, obsahovalo 10 mg *S*-citalopramu. Tablety byly rozdrceny a rozetřeny na prach a rozpuštěny v MeOH na koncentraci 1,00 mg/ml u tablet Seropramu a 0,50 mg/ml u Cipralexu. Nerozpuštěné pevné částice byly přefiltrovány přes fritu. Za optimalizovaných podmínek analýzy byla stanovena přesnost metody, určená jako blízkost shody mezi deklarovaným obsahem účinné látky v tabletě a nalezenou hodnotou. Výsledky jsou uvedeny v tab. 16. Přesnost analýzy byla větší pro *S*-citalopram. Při analýze bylo zjištěno, že léčivo neobsahuje detekovatelné stopy citadiolu. Enantiomerně čisté léčivo Cipralex rovněž neobsahuje detekovatelné množství *R*-citalopramu viz obr. 21.

Tab. 16: Výtěžnost účinné látky v léčivech. Kolona Chiralcel OD-H; mobilní fáze *n*-hexan/propan-2-ol/TEA 96/4/0,1 (v/v/v); teplota 25 °C; průtoková rychlost 1 ml/min; UV detekce při 250 nm;

léčivo	účinná látka	deklarované množství [mg/ml]	nalezené množství [mg/ml]	výtěžnost [%]
			1,053	105,3
Seropram	<i>RS</i> -citalopram	1,000	1,031	103,1
			0,501	100,1
Cipralex	<i>S</i> -citalopram	0,500	0,502	100,2

výtěžnost – hodnoty byly vypočteny z poměru stanovené hodnoty vypočtené z kalibrační závislosti ploch píků na koncentraci a deklarované hodnoty a vynásobeny 100



Obr. 21: Chromatogramy enantioseparace léčiv s účinnými látkami citalopramem a *S*-citalopramem na koloně Chiralcel OD-H; mobilní fáze *n*-hexan/propan-2-ol/TEA 96/4/0,1 (v/v/v); teplota 25 °C; průtoková rychlost 1 ml/min; UV detekce při 250 nm; A: Seropram; 1: *R*-citalopram, 2: *S*-citalopram B: Cipralex; *S*-citalopram

5 ZÁVĚR

Cílem této práce bylo nalezení a optimalizace podmínek k enantioseparaci citadiolu a citalopramu a validace analytické metody ke stanovení daných enantiomerů v léčivech. Byly využity komerčně dostupné kolony na bázi makrocyclických antibiotik, cyklofruktanu a derivatizované celulosy. Separace byly prováděny v polárně-organickém, reverzním i normálním módu. Veškeré analýzy probíhaly na termostatovaných kolonách při průtoku mobilní fáze 1 ml/min a UV detekce byla měřena při vlnové délce 250 nm.

U CSP s navázaným teikoplaninem aglykonem byla použita mobilní fáze ve složení MeOH/ACN/HOAc/TEA nebo MeOH/HOAc/TEA. Enantiomery citalopramu dosahovaly na koloně vyšších retencí než v případě citadiolu. Retenční faktory byly porovnány s těmi získanými na kolonách s navázaným teikoplaninem. Na žádné z kolon na bázi teikoplaninu nedocházelo chirálnímu dělení.

Na koloně Chirobiotic V a Chirobiotic V2 s vankomycinem navázaným na silikagelový nosič se enantiomery citalopramu dělily. Byl sledován vliv složení mobilní fáze na průběh enantioseparace. Rozlišení enantiomerů citalopramu se zvyšovalo se snižujícím množstvím přidaných kyselých a bazických aditiv do MeOH jako základní složky mobilní fáze. Teplotní efekt byl rovněž sledován. Se snižující se teplotou klesal retenční faktor a zvyšovalo se rozlišení. V případě enantiomerů citadiolu nedocházelo v žádné z použitých mobilních fází k enantioselektivnímu dělení.

Na chirální koloně s navázaným cyklofruktanem derivatizovaným 3,5-dimethylfenylkarbamátem byly sledovány hodnoty retence jednotlivých enantiomerů, v polárně-organickém separačním módu. S klesajícím obsahem ACN se snižovaly hodnoty retence citadiolu a citalopramu. Vlivem přídavku aditiv do bezvodého MeOH se rovněž mírně snižovala retence obou analytů. V žádné

z použitých mobilních fází však nedocházelo k enantiomernímu rozlišení.

Celulosové CSP byly použity k separaci enantiomerů citadiolu a citalopramu v reverzním i normálním separačním módu. V reverzním separačním módu byla použita mobilní fáze ve složení ACN/ fosf. pufr o pH= 3,0 či pH= 6,0 a ACN/voda okyselená octovou kyselinou na pH= 3,0. V žádné z těchto testovaných mobilních fází nedošlo ani k náznaku chirálního rozdělení. Obsah ACN větší než je 20 objemových % způsoboval eluci analytů s mrtvým časem. Citalopram interagoval s celulosovou CSP silněji než citadiol, proto byl na koloně více zadržován. Nejvyšších retencí obou analytů bylo dosaženo při použití mobilní fáze obsahující fosf. pufr o pH= 6,0.

V normálním separačním módu na celulosové chirální koloně Chiralcel OD-H byly studovány v rámci optimalizace podmínek pro chirální rozdělení enantiomerů mobilní fáze tvořené *n*-hexan/propan-2-ol/TEA. Byl sledován vliv obsahu *n*-hexanu na vybrané chromatografické parametry. Bylo zjištěno, že se zvyšujícím procentuálním zastoupením *n*-hexanu se zvyšují retence všech enantiomerů. Chvostování píků bylo minimalizováno přidavkem triethylaminu, ale tento přídatek neměl vliv na retenci. Změnami složení mobilních fází nedocházelo ke záměně elučního pořadí enantiomerů. Enantiomery citadiolu vykazovaly vyšší retence než enantiomery citalopramu. Toto retenční pořadí je opačné než v reverzním separačním módu, což souhlasí s teorií. Na koloně Chiralcel OD-H byl dále zjišťován vliv teploty na retenci a enantiomerní rozlišení. Podle očekávání s rostoucí teplotou klesaly retence i rozlišení jednotlivých enantiomerů.

Pro validaci byla vybrána optimalizována mobilní fáze ve složení *n*-hexan/propan-2-ol/TEA 96/4/0,1 (v/v/v) optimalizovaná teplota 25 °C a průtok mobilní fáze 1 ml/min. Metoda byla validována s ohledem na preciznost, linearitu, robustnost a přesnost. Nalezená metoda je jednoduchá, rychlá, citlivá a enantioselektivní. Relativní směrodatná odchylka pro opakovatelnost měření a přípravy vzorku nepřevyšovala 5 %. Kalibrační závislosti ploch píků na koncentraci byly lineární, koeficient determinace byl nejvyšší pro *S*-citalopram. Nejnižších hodnot LOD a LOQ bylo dosaženo *R*-citalopram. Bylo ukázáno, že metoda může být použita ke stanovení enantiomerní čistoty *S*-citadiolu, jako prekursoru pro přípravu escitalopramu, ale i k hodnocení enantiomerní čistoty escitalopramu v léčivech.

Literatura

1. Červinka, O.: *Chem. Listy* 93, 294 (1999)
2. McMurry, J.: *Organic Chemistry*, Sixth Edition, Brooks/Cole and Thomson Learning Company (2004)
3. Loukotková, L.; Rambousková, M.; Bosáková, Z.; Tesařová, E.: *Chirality* 20, 900 (2008)
4. Eliel, E. L.; Wilen S. H.; Mander L. N.: *Stereochemistry of Organic Compounds*, John Wiley&Sons (1994)
5. Chen, K. K.; Schmidt, C. F.: *Medicine*, (Baltimore MD) 9 (1930)
6. Nguyen, L. A.; He, H.; Pham-Huy, C.: *J. Biomed. Sci.* 2, 85 (2006)
7. Anzenbacher, P.; Jezdinský, J.: *Klin. Farmakol. Farm.* 17 (2003)
8. Izake, E. L.: *J. Pharm. Sci.* 96, 1569 (2007)
9. Cushny, A. R.: *Biological Relations of Optically Isomeric Substances*, Bailliere, Tindall and Cox, London (1926)
10. Francotte, E.; Lindner, W.; Mannhold, R.; Kubinyi, H.; Folkers, G.: *Chirality in drug research*, John Wiley & Sons (2007)
11. Hutt, A. J.; Valentová, J.: *Acta Facult. Pharm. Univ. Comenianae* 50, 7 (2003)
12. Bogeso, K. P.; Perregaard, J.: US 4 943 590, (1990)
13. Nageswara Rao, R.; Narasu Raju, A.: *J. Pharm. Biol. Med. Anal.* 43, 311 (2007)
14. Hyttel, J.; Larsen, J. J.: *Acta Pharmacol. Toxicol.* 56, 146 (1985)
15. Baumann, P.: *Int. Clin. Psychofarmacol.* 11, 5 (1996)
16. SÚKL: *Souhrn údajů o přípravku citalopram* (2009)
17. Wilson, E. A.: *BioSocieties* 1, 125 (2006)
18. Boyer, E. W.; Shannon, M.: *N. Engl. J. Med.* 352, 1112 (2005)
19. Sánchez, C.; Bogeso, K. P.; Ebert, B.; Reines E. H.; Braestrup, C.: *Psychopharmacology*, 174, 163 (2004)

20. Agranat, I.; Caner, H.; Caldwell, J.: *Nat. Rev. Drug. Discov.* 1, 753 (2002)
21. Owens, M. J.; Knight, D. L.; Nemeroff, C. B.: *Biol. Psychiatry* 50, 345 (2001)
22. Sánchez, C.: *Eur. J. Pharmacol* 464, 155 (2003)
23. Davankov, V. A.: *Pure Appl. Chem.* 69, 1469 (1997)
24. Gao, R. Y.; Yang, G. S.; Yang, H. Z.; Chen, Z. Y.; Wang, Q. S.: *J. Chromatogr. A* 763, 125 (1997)
25. Francotte, E. R.: *J. Chromatogr. A* 906, 379 (2001)
26. Pirkle, W. H.; Pochapsky, T. C.: *Chem. Rev.* 89, 347 (1989)
27. Ward, T. J.: *Anal. Chem.* 74, 2863 (2002)
28. Wan, H.; Andersson, P. E.; Engström, A.; Blomberg, L. G.: *J. Chromatogr. A* 704, 179 (1995)
29. Tesařová, E.; Armstrong D. W.; *Advanced Chromatographic and Electromigration Methods in Biosciences* (Deyl, Z.; ed.), kap. 5. Elsevier, Amsterdam 1998
30. Rizzi, A.: *Electrophoresis* 22, 3079 (2001)
31. Vespalec, R.; Boček, P.: *Chem. Rev.* 100, 3715 (2000)
32. McConnell, O.; II AB, Balibar, C.; Byrne, N.; Cai, Y.; Carter, G.; Chlenov, M.; Di, L.; Fan, K.; Goljer, I.; He, Y.; Herold, D.; Kagan, M.; Kerns, E.; Koehn, F.; Kraml, F.; Marathias, V.; Marques, B.; McDonald, L.; Nogle, L.; Petucci, C.; Schlingmann, G.; Tawa, G.; Tischler, M.; Williamson, R. T.; Sutherland, A.; Watts, W.; Young, M.; Zhang, M.; Zhang, Y.; Zhou, D.; Ho, D.: *Chirality* 19, 658 (2007)
33. Lämmerhoffer, M.: *J. Chromatogr. A* 1217, 814 (2010)
34. Pirkle, W. H.; Burke, J. A.: *Chirality*, 1, 57 (1989)
35. Ševčík, J.; Tesařová, E.; Stránský, Z.: *Chem. Listy* 95, 139 (2001)
36. Bentley, R.: *Arch. Biochem. Biophys.* 414, 1 (2003)
37. Easson, L. H.; Stedman, E.: *Biochem J.* 27, 1257 (1933)
38. Dalgliesh, C. E.: *J. Chem. Soc.* 137, 3940 (1952)
39. Yashima, E.: *J. Chromatogr. A* 906 105 (2001)
40. Fukuhara, T.; Isoyama, M.; Shimada, A.; Itoh, M.; Yuasa, S.: *J. Chromatogr.* 387, 562 (1987)
41. Allenmark, S.; Bomgren, B.; Boréna, H.: *J. Chromatogr.* 264, 63 (1983)
42. Chankvetadze, B.; Yamamoto, C.; Okamoto, Y.: *J. Chromatogr. A* 922, 127 (2001)

43. Tachibana, K.; Ohnishi, A.: *J. Chromatogr. A* 1126, 143 (2006)
44. Hesse, G.; Hagel, R.: *Chromatographia* 6, 277 (1973)
45. Okamoto, Y.; Aburatani, R.; Hatada, K.: *J. Chromatogr.* 389, 95 (1987)
46. Okamoto, Y.; Kawashima, M.; Hatada, K.: *J. Chromatogr.* 363, 173 (1986)
47. Chankvetadze, B.; Yashima, E.; Okamoto, Y.: *J. Chromatogr. A* 670, 39 (1994)
48. Chankvetadze, B.; Chankvetadze, L.; Sidamonidze, S.; Kasashima, E.; Yashima, E.; Okamoto, Y.: *J. Chromatogr. A* 787, 67 (1997)
49. Chankvetadze, B.; Yashima, E.; Okamoto, Y.: *J. Chromatogr. A* 694, 101 (1995)
50. Yashima, E.; Okamoto, Y.: *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 68, 3289 (1995)
51. Kawamura, M.; Uchiyama, K.: *Carbohydr. Res.* 192, 83 (1989)
52. Sun, P.; Wang, Ch.; Breitbach, Z. S.; Zhang, Y.; Armstrong, D. W.: *Anal. Chem.* 81, 10215 (2009)
53. Kawamura, M.; Uchiyama, K.: *Carbohydr. Res.* 260, 297 (1994)
54. Sun, P.; Armstrong, D. W.: *J. Chromatogr. A* 1217, 4904 (2010)
55. Sun, P.; Wang, Ch.; Padivitage, N. L. T.; Nanayakkara, Y. S.; Perera, S.; Qiu, H.; Zhang, Y.; Armstrong, D. W.: *Analyst* 136, 787 (2010)
56. Hyun, M. H.; Han, S. C.; Lipshutz, B. H.; Shin, Y.; Welch, C. J.: *J. Chromatogr. A* 959, 75 (2002)
57. Ilisz, I.; Berkecz, R.; Péter, A.: *J. Sep. Sci.* 29, 1305 (2006).
58. Ward, T. J.; Farris III, A. B.: *J. Chromatogr. A*, 906, 73 (2001)
59. Ward, T. J.; Oswald, T. M.: *J. Chromatogr. A* 792, 309 (1997)
60. Geryk R.: *Bakalářská práce*, Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Praha 2010
61. Armstrong, D. W.; Nair, U. B.: *Electrophoresis* 18, 2331 (1997)
62. Armstrong, D. W.; Tang, Y.; Chen, S.; Zhoun, Y.; Bagwill, Ch.: *Anal. Chem.* 66, 1473 (1994)
63. *Chirobiotic Handbook, 5th edition*, Advanced Separation Technologies Inc. (2004)
64. Ekborg-Ott, K. H.; Kullman, J. P.; Wang, X.; Gahm, K.; He, L.; Armstrong, D. W.: *Chirality* 10, 627 (1998).
65. Schlauch, M.; Frahm, A. W.: *J. Chromatogr. A* 868, 197 (2000)
66. Beneš, J.; Kabelková, M.; Vacek, V.; Viechová, J.; Horová, B.; Gebauerová, M.: *Klin. mikrobiol. inf. lék.* 3 137 (1997)

67. Gasper, M. P.; Berthod, A.; Nair, U. B.; Armstrong, D. W.: *Anal. Chem.* 68, 2501, (1996)
68. Antal, P.; Török, G.; Armstrong, D. W.: *J. Chromatogr. A* 793, 283 (1998)
69. Xiao, T. L.; Rozhkov, R. V.; Larock, R. C.; Armstrong, D. W.: *Anal. Bioanal. Chem.* 377, 639 (2003)
70. Berthod, A.; Chen, X.; Kullman, J. P.; Armstrong, D. W.: *Anal. Chem.* 72, 1767 (2000)
71. Péter, A.; Árki, A.; Tourwé, D.; Forró, E., Fülöp, F.; Armstrong, D. W.: *J. Chromatogr. A* 1031, 159 (2004)
72. Berthod, A.; Xiao, T. L.; Liu, Y.; Jenks, W. S.; Armstrong, D. W.: *J. Chromatogr. A* 955, 53 (2002).
73. Atkinson, B.A.: *Antibiotics in Laboratory Medicine*, 2nd ed., The Williams and Wilkins Co., Philadelphia, PA, USA (1986)
74. Illisz, I.; Berkecz, R.; Antal, P.: *J. Chromatogr. A* 1216, 1845 (2009)
75. Rao Nageswara, R.; Raju Nasara, A.; Nagaraju, D.: *J. Pharm. Biol. Med. Anal* 41, 280 (2006)
76. Haupt, D.: *J. Chromatogr. B* 685, 299 (1996)
77. Kosel, M.; Eap, C. B.; Amey, M.; Baumann, P.: *J. Chromatogr. B* 719, 234 (1998)
78. Semreen, M. H.; Aboul-Enein, H. Y.: *Acta Chromatographica* 23, 389 (2011)
79. Gupta, V. K.; Ali, I.; Agarwal, S.: *Int. J. Electrochem. Sci*, 6, 5639 (2011)
80. Andersen, S.; Halvorsen, T. G.; Pedersen-Bjergaard, S.; Rasmussen, K. E.; Tanum, L Refsum, H.: *J. Pharm. Biol. Med. Anal.* 33, 263 (2003)
81. Berzas, J; *Electrophoresis* 27, 905 (2006)
82. Sungthong, B.; Jáč, P.; Scriba, G. E.: *J. Pharm. Biol. Med. Anal.* 46, 959 (2008)
83. Florés Rodríguez, J.; Salcedo Contento, A. M.; Llreana Villasenor, M. J.; Fernández Munoz, L.: *J. Chromatogr. A* 1185, 281 (2008)
84. Péter, A; Török, R; Armstrong, D. W.: *J. Chromatogr. A* 1057, 229 (2004)
85. Hou, J. G.; Wang, Y. L.; Li, C. X.; Han, X. Q.; Gao, J. Z.; Kang, J. W.: *Chromatographia* 50, 89 (1999)
86. Suchánek, M.: *Kvalimetrie, 10. Jakost v analytické laboratoři 2000*, Eurachem (2000)
87. Plzák, Z.; Milde, D: *Chem. Listy* 106, 44 (2012)

-
88. *Metrologická terminologie v chemii.* Dostupné z URL:
< http://www.vscht.cz/lam/new/barekterminologie2000_07_01.pdf > [cit. 29.3.
2012]